МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ «ВИТЕБСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ П.М. МАШЕРОВА»

Факультет Биологический

Кафедра Экологии и охраны природы

КУРСОВАЯ РАБОТА

по дисциплине Биохимия

БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ РАЗВИТИЯ ПАРЕНТЕРАЛЬНЫХ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ

Карпова Наталья Михайловна,

курс 33(2) БФ ОЗО

Витебск, 2015

Реферат

Перечень терминов: Парентеральные вирусные гепатиты, гепатит В, С, Д, маркеры парентеральных вирусных гепатитов (HBsAg, HCV, дефектный-HDV), лактатдегидрогеназа, аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, билирубин, щелочная фосфатаза.

Предмет исследования: биохимические маркеры парентеральных вирусных гепатитов.

Объект исследования: сыворотка крови, направленная на исследование в клинико-диагностическую лабораторию УЗ «Могилевский областной лечебно-диагностический центр».

Цель данной работы: выявить основные биохимические критерии диагностики парентеральных вирусных гепатитов.

Задачи работы:

. Сформировать общее представление о природе .

. Систематизировать данные по применению биохимических маркеров для диагностики парентеральных вирусных гепатитов.

. Изучить качественные и количественные методы определения маркеров парентеральных вирусных гепатитов.

. На основании экспериментальных данных, сделать вывод об основных методах диагностики парентеральных вирусных гепатитов среди населения, используемых в клинической практике.

Методы исследования: описательно-аналитический, сравнительно-сопоставительный, статистический, лабораторные методы диагностики маркеров парентеральных вирусных гепатитов. Теоретическая и практическая значимость: в работе представлена и систематизирована ключевая информация по биохимическим критериям диагностики парентеральных вирусных гепатитов.

Введение

Всемирная организация здравоохранения объявила 28 июля Всемирным Днем борьбы с гепатитами для повышения осведомленности и привлечения к этой проблеме внимания людей во всем мире. Установлено, что вирусные гепатиты - это группа распространенных и опасных для человека инфекционных заболеваний, которые довольно значительно различаются между собой, вызываются разными вирусами, но все же имеют общую черту - это заболевание, которое поражает в первую очередь печень человека и вызывает ее воспаление. Печень является самым крупным непарным органом в организме человека. Она располагается в правом подреберье под диафрагмой. Это гигантская химическая лаборатория, которая выполняет в организме человека около 500 жизненных функций, например: обезвреживает инородные вещества, перерабатывает вещества в энергию и "строительные материалы", продуцируют желчь, которая помогает организму переваривать пищу, хранит множество витаминов (А, B, C.К, РР, фолиевая кислота и др.) и микроэлементов (железо, медь, цинк, марганец, молибден), сахаров и многое другое.

За последнее время с проблемой парентеральных вирусных гепатитов (далее ПВГ) столкнулись миллионы людей. В мире насчитывается около 240 млн. хронических носителей вируса гепатита В и около 700 млн. носителей вируса гепатита С, т.е. каждый 6 житель нашей планеты. Это широко распространённая патология среди населения, Ежегодно 1,5 млн. жителей планеты погибают от острых и хронических процессов, обусловленных вирусами гепатитов.

Парентеральные вирусные гепатиты на протяжении ряда последних лет продолжают оставаться широко распространенным инфекционным заболеванием среди населения. Ежегодно регистрируются, в среднем, около 300-350 случаев ПВГ. В 94% случаев обнаружения маркеров вируса парентеральных гепатитов происходит при обращении за медицинской помощью по другим причинам, т.к. в большинстве случаев болезнь протекает бессимптомно, лишь в 3-5% развивается острое клинически выраженное заболевание. Лечение парентеральных гепатитов длительное и дорогостоящее, при хроническом течении может продолжаться всю жизнь.

Проблема вирусных гепатитов является одной из самых актуальных и в нашей стране, поэтому Министерством здравоохранения Республики Беларусь в целях усиления профилактической работы и привлечения внимания общественности поддержана инициатива Международного Альянса по борьбе с гепатитами объединяющего более 200 ассоциаций больных гепатитами по всему миру. В Беларуси с 2010 года организуются мероприятия в рамках Международного дня борьбы с гепатитами. [ 3]

В настоящее время учеными разработаны эффективные вакцины против вирусных гепатитов А и В. Поэтому раннее выявление больных гепатитом и вакцинация являются на сегодняшний день основными методами предотвращения этих заболеваний.

Предмет исследования: биохимические маркеры парентеральных вирусных гепатитов.

Объект исследования: сыворотка крови, направленная на исследование в клинико-диагностическую лабораторию УЗ «Могилевский областной лечебно-диагностический центр».

Цель данной работы: выявить основные биохимические критерии диагностики парентеральных вирусных гепатитов.

Задачи работы:

. Сформировать общее представление о природе .

. Систематизировать данные по применению биохимических маркеров для диагностики парентеральных вирусных гепатитов.

. Изучить качественные и количественные методы определения маркеров парентеральных вирусных гепатитов.

. На основании экспериментальных данных, сделать вывод об основных методах диагностики парентеральных вирусных гепатитов среди населения, используемых в клинической практике.

вирус гепатит болезнь маркер

1. Общее представление о заболеваемости

.1 Классификация ПВГ

Парентеральный вирусный гепатит - это воспалительное заболевание печени, которое вызывают вирусы, проникающие в организм человека через нарушения и повреждения целостности кожных и слизистых покровов. Инфицирование наступает при контакте с зараженной кровью или другими биологическими жидкостями. К группе парентеральных вирусов относятся вирусы гепатита В, D, С, F, G, TTV, Sen V.В настоящее время детально индетифицировано и включено в международную классификацию вирусов пять гепатотропных вирусных возбудителей: вирус гепатита А ( HAV ), вирус гепатита В ( HBV ), вирус гепатита С ( HCV ), вирусгепатита D ( HDV ) и вирус гепатита E ( HEV ).

А - энтеральный (РНК-HAV)

В - парентеральный (ДНК-HBV)

С - парентеральный (РНК-HCV)- парентеральный (дефектный-HDV)- энтеральный (РНК-HEV)

Предполагается, что существуют и другие гепатотропные вирусы ещё недостаточно изученные.( GB ) - парентеральный (РНК-HGV)\*

ТТ - парентеральный (ДНК-TTV)\*- парентеральный (ДНК-SENV)\*

\*не утверждены по таксономии и номенклатуре вирусов.

Устойчивость вирусов в окружающей среде чрезвычайно высокая - при комнатной температуре на предметах и поверхностях инфекционность вирусов сохраняется от 3 до 6 месяцев, в замороженном виде - 15-25 лет.

Источником инфекции парентерального вирусного гепатита является человек - больной острым, хроническим гепатитом или носитель вируса, у которого клинические проявления заболевания отсутствуют. Вирус содержится во всех биологических жидкостях источника инфекции: крови, сперме, вагинальном секрете. В меньших концентрациях - в слюне, моче, грудном молоке, поте, желчи. Для заражения достаточно мельчайшей капли крови (10-6 - 10-7 мл.крови), порой даже невидимой невооруженным глазом. Заражение происходит естественными и искусственными путями. Естественные пути реализуются при половом контакте, от матери к ребенку (внутриутробно через плаценту или во время родов при прохождении через родовые пути). Важное место имеет контактно-бытовой путь передачи инфекции. Контактно-бытовой путь реализуется:

а) при использовании общих с больным предметов личной гигиены (бритвенных приборов, маникюрных принадлежностей, мочалок, расчесок, постельных принадлежностей);

б) при соприкосновении с любыми поверхностями помещений и предметов, загрязненными кровью (при наличии у контактных порезов и микротравм);

в) возможно заражение и во время уличных драк;

Искусственные пути передачи в настоящее время чаще всего реализуются при проведении немедицинских парентеральных вмешательств, в частности - во время инъекционного введение наркотиков с использованием общих шприцев, игл или уже инфицированного наркотика.

Существует риск заражения во время проведения татуировок, пирсинга, маникюра и педикюра загрязненным инструментарием.

Некоторый риск заражения существует и при проведении медицинских манипуляций: при переливании крови, во время гемодиализа, при различных хирургических вмешательствах. Однако в нашей стране этот риск сведен к минимуму, т.к. для проведения инъекций и манипуляций используются одноразовые стерильные шприцы, инструментарий и перевязочный материал, а для предупреждения заражения через донорскую кровь- вся кровь при каждой кроводаче исследуется на маркеры ПВГ.

Заболевание может протекать в клинически выраженной и бессимптомной форме. Инкубационный период (период от момента заражения до первых клинических проявлений) в среднем составляет от 6 недель до 6 месяцев. В течение этого времени вирус размножается и его концентрация в организме увеличивается. Наступает преджелтушный период (4-10 дней), в течение которого возникает чувство общей слабости, усталости, появляется тошнота, рвота, ухудшается аппетит, вплоть до его отсутствия, беспокоят боли в крупных суставах, особенно в утренние часы, внешне суставы не изменяются, возможен и гриппоподобный вариант начала заболевания. Постепенно увеличивается печень и селезенка, появляется зуд кожи, моча темнеет и становится «цвета пива», кал обесцвечивается. Иногда может появляться сыпь типа «крапивницы». И, наконец, наступает желтушный период, длительностью от 2 недель до 1,5 месяца. Вначале желтеют глаза, слизистая оболочек твердого неба и уздечки языка, позднее окрашивается кожа. Желтуха сопровождается кожным зудом и ухудшением общего состояния, нарастают симптомы интоксикации (головная боль, сонливость, повышение температуры). Возникает чувство тяжести и ноющие или приступообразные боли в правом подреберьи, особенно усиливающиеся при пальпации печени. Изменяются биохимические показатели печени. В этом периоде можно поставить правильный диагноз на основании обнаружения повышенной активности в крови АЛТ, ACT и других гепатоспецифическихэнзимов высокой концентрации в крови: HBsAg и HBeAg, анти-HBsAg, IgM, ДНК-вируса. Далее желтуха постепенно угасает и наступает период выздоровления. Однако острая инфекция у части больных переходит в носительство маркеров ПВГ либо в хронический гепатит. Если для гепатита В характерна хронизация процесса в 5-10% случаев, для гепатита В+Д - в 60% случаев, то для гепатита С - в 80-90% случаев. Развитие цирроза печение и гепатоцеллюлярной карциномы - итог длительного персистирования вируса в организме.

Основой профилактических мероприятий по предотвращению инфицирования вирусом гепатита Вявляется вакцинация. В Республике в рамках приказа Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 05.12.2006 №913 «О совершенствовании организации проведения профилактических прививок» прививаются против гепатита В:

· новорожденные дети

· 13-летние подростки

· дети и взрослые, в семьях которых есть носитель HBsAg, больной острым или хроническим гепатитом В.

· дети и взрослые регулярно получающие кровь и ее препараты, а также находящиеся на гемодиализе и онкогематологические больные.

· лица, у которых произошел контакт с материалом, контаминированным вирусом гепатита В.

· медицинские работники, имеющие контакт с кровью и другой биологической жидкостью человека.

· лица, занятые в производстве иммунобиологических препаратов из донорской и плацентарной крови.

· студенты медицинских университетов и учащиеся средних медицинских учебных заведений.

· пациенты перед плановой операцией, ранее не привитые

К очень важным профилактическим мероприятиям относятся меры по предупреждению рискованного поведения:

· необходимо избегать случайных половых связей, иметь одного надёжного полового партнёра.

· использовать презерватив при половом контакте;

· никогда не экспериментировать и не употреблять наркотики;

· косметические процедуры (татуировки, пирсинг, маникюр, педикюр) проводить только в специальных учреждениях, имеющих лицензию на их проведение.

· пользоваться только индивидуальными предметами личной гигиены: бритвенными и маникюрными принадлежностями, ножницами, расческами, мочалками, полотенцами.[5,1,13]

· Основным резервуаром вируса гепатита В являются вирусоносители, которых по данным ВОЗ насчитывается более 300 млн. человек. Кроме вирусоносителей, резервуаром вируса являются больные острыми и хроническими формами гепатита В, в том числе больные циррозом печени.

По данным Всемирной организации здравоохранения около 1-ого миллиарда человек в мире инфицировано вирусом гепатита С. Вирус гепатита Сявляется однонитевым РНК - вирусом и по структуре генома относится к флавивирусам. Для вируса гепатита С характерна высокая частота мутаций. Заражение вирусом гепатита С в 80-85% случаев происходит парентерально, то - есть также как гепатитами В и D . Вирусный гепатит D ( HDV ) как правило наблюдается в ассоциации с вирусным гепатитом В ( HBV ), но значительно реже, чем другие вирусные гепатиты. Вирусным гепатитом D часто заражаются при переливании крови или её компонентов, редко при половых контактах[6,18]

1.2 Диагностика ПВГ

Диагностика вирусного гепатита основывается на данных опроса, осмотра и лабораторного обследования пациента. При помощи лабораторной диагностики оценивают глубину повреждения печени, выявляют тип вируса и стадию процесса. Кроме клинической картины диагностическую ценность имеют общий клинический анализ крови, в котором во время болезни определяется увеличенное содержание лимфоцитов, а также замедленная скорость оседания эритроцитов (СОЭ) и анализ мочи, в котором с первых дней болезни наблюдается положительная реакция на уробилин и желчные пигменты. Информативным является УЗИ печени, показывающее ее увеличение и уплотнение. Опираясь только на осмотр и общие клинические методы обследования, довольно сложно установить тип вирусного гепатита. Косвенно предположить тип вируса можно, если установлена связь с источником поражения, а также по длительности периодов заболевания.[8]

Диагностика вирусного гепатита С: основана на выявлении специфических антител к антигенам вируса и определении РН вируса, его количества и генотипа. Антитела IgM к вирусу гепатита С ( HCV ), определяемые иммуноферментным методом являются доказательством во-первых инфицирования HCV , во-вторых - свидетельствуют об остроте гепатита или обострении хронического гепатита, несмотря на отсутствие гиперферментемииАлТ и АсТ и симптомов гепатита. Определение РНК вируса гепатита С полимеразной цепной реакцией (ПЦР) позволяет достоверно определить наличие или отсутствие HCV в крови пациента, определить вирусный генотип, количество РНК (его генокопий) в 1мл. крови больного. Необходимо сделать: биохимическое исследование крови на АлТ, АсТ, холестерин билирубин, УЗИ органов брюшной полости. Все больные переболевшие любой формой гепатита С должны быть на диспансерном учёте и 2-3 раза в году проходить лабораторное обследование.

Диагностика гепатита В: Вирус гепатита B является ДНК-содержащим вирусом.

Он имеет 4 антигена:- поверхностный антиген, имеет специфические рецепторы, с помощью которых вирус цепляется за клетки-мишени, этот антиген может быть заблокирован антителами анти-HbsAg. Является наиболее частым маркером вируса гепатита B.- сердцевинный антиген, связывается прочно с ядрами клеток-мишеней, в крови практически не определяется. Антитела к нему могут определяться всю жизнь, но защитной способностью они не обладают.- антиген инфекциозности. Обнаружение свидетельствует о размножении вируса в организме.- антиген, кодируемый определенными генами. Этот антиген отвечает за начало развития онкологического процесса, т.к. через угнетение белка р-53 он активирует протоонкогены.

### Диагностика гепатита В:

Для диагностики вирусного гепатита В (и возможного гепатита Д) используют их специфические маркеры:

ИФА (иммуноферментный анализ) определение в сыворотке крови антигенов (HBsAg, HBeAg) и антител к вирусу гепатита B (anti-HBcorAg), антитела к гепатиту Д. - ПЦР определение ДНК вируса гепатита В (по назначению врача - может быть качественное и количественное). Для начала проводится качественное определение, затем при необходимости - количественное (оно более дорогостоящее).

При гепатите В наиболее достоверным является отслеживание вируса по антигену HBsAg методом ИФА (иммуноферментный анализ).

Достоинства метода ИФА:

доступность методики, распространенность в лабораториях, - показатель достоверно отражает уровень зараженных клеток печени, - изменение динамики соответствует уровню иммунного ответа организма на вирус, - исчезновение антигена HBsAg является наиболее надежным показателем полного излечения пациента.[9,11]

Лабораторная диагностика гепатита Д (ГД) Вирус гепатита Д (ВГД) - это дефектный вирус, содержащий одно-спиральную РНК, которому для репликации необходимо помощь вируса ГВ для синтеза оболочечных белков, состоящих из HBsAg, который используется для инкапсуляции генома ВГД. ВГД не принадлежит ни к одному из известных семейств вирусов животных, по своим свойствам ВГД наиболее близок к вироидам и сателлитным вирусам растений. Лабораторная диагностика осуществляется путем обнаружения серологических маркеров ВГД, включая наличие антигена, антител к нему и РНК ВГД. Обнаружение антигена ВГД и РНК ВГД в сыворотке крови или ткани печени свидетельствует о наличии активной ГД-инфекции, однако, следует отметить, что эти маркеры могут не обнаруживаться в сыворотке больных фульминантным ГД. Маркером активной репликации ВГД также является анти-ВГД класса IgМ. Серологические маркеры инфекции ГД зависят от того, как был приобретен вирус - в виде коинфекции с ВГВ (у большинства больных заболевание имеет острое течение и заканчивается выздоровлением) или суперинфекции у больных с хронической ГВ-инфекцией (протекает тяжелее, чем коинфекция - в 10% развивается фульминантный гепатит). При коинфекции в большинстве случаев антитела - анти-ВГД класса IgМ и IgG - обнаруживаются в течение заболевания. Титр анти-ВГД обычно снижается до практически неопределяемых уровней после выздоровления, и не сохраняется никаких серологических маркеров того, что человек был когда-либо инфицирован ВГД. Антиген ВГД определяется только у 25% больных и обычно исчезает вместе с исчезновением HВsAg. При суперинфекции у больных с хронической ГВ-инфекцией серологическая картина имеет следующие характерные особенности: - титр HBsAg снижается к моменту появления антигена ВГД в сыворотке; - антиген ВГД и РНК-ВГД продолжают определяться в сыворотке, так как обычно у большинства пациентов с суперинфекцией ГД (70-80%) развивается хроническая инфекция, в отличие от случаев коинфекции; - определяются высокие титры антител (анти-ВГД) как класса IgМ, так и IgG, которые сохраняются неопределенное время. Серологические маркеры вируса ГД определяют методом иммуноферментного и радиоиммунного анализа, а РНК-ВГД - методом полимеразной цепной реакции. Отечественными и зарубежными промышленными биотехнологическими предприятиями выпускаются диагностические наборы, включающие все необходимые компоненты и реактивы для постановки теста. В диагностических препаратах используют дельта-антиген, полученный из печени сурков, экспериментально зараженных ГД; антиген, выделенный из печени погибших носителей ВГД; дельта-антиген, полученный генно-инженерным способом.[12,11]

2. Методы определения маркеров ПВГ

Результаты проведенных лабораторных исследований играют существенную, если не ведущую, роль для подтверждения диагноза вирусного гепатита и установления его этиологии.

Основным диагностическим маркером ВГВ является HBsAg. Определение HBsAg осуществляется методами ИФА, ФИА, МФА, а также мембранным экспресс-методом. Антитела к HBsAg (далее ~ антиHВS) являются маркером, свидетельствующим о ранее перенесенной инфекции либо наличии поствакцинального иммунитета.

В случаях первичного обнаружения HBsAg, анти-НВsАg методами ИЛА или ФИА необходимо проведение конфирматорного теста.

Для выявления HBeAg используются методы ИФА и ФИА, а также мембранный экспресс-метод. Первично-положительные по HВеАg результаты исследования подтверждаются конфирматорным тестом. HBeAg представляет собой диагностический маркер, ассоцированный с высокой инфекционностью крови, активной репродукцией вируса гепатита В и риском перинатальной передачи возбудителя.

Выявление антител к HBeAg свидетельствует о завершении активной репродукции вирусных частиц и начале стадии реконвалесценции (за исключением мутантных форм вируса).

Для выявления HBcAg применяется преимущественно МФА. Наличие HBcAg в гепатоцитах свидетельствует об активной репродукции вирусных частиц.

Антитела к HBcAg класса М (далее ~ анти-НВс IgM) появляются через 1 - 2 недели после появления HBsAg и циркулируют крови от 2 до 18 месяцев у пациентов с острым вирусным гепатитом В и пациентов с хроническим вирусным гепатитом В - при реактивации инфекции.

Суммарные антитела к HBcAg и составляющие их антитела класса G появляются после анти-НВс IgM и длительно (часто пожизненно) определяются у переболевших острым вирусным гепатитом В, пациентов с хронической формой заболевания.

Качественное определение ДНК вируса гепатита В методом ПЦР указывает на наличие и репродукцию в организме возбудителя.

Количественное обнаружение ДНК вируса гепатита В методом ПЦР (определение вирусной нагрузки) позволяет оценить активность репликации вируса и эффективность противовирусной терапии. Метод IЦР используется также для определения генотипов вируса гепатита В целью выбора оптимальной схемы лечения заболевания.

Специфическая лабораторная диагностика маркеров ВГD проводится у лиц, имеющих маркеры вируса гепатита В.[14]

Выявление серологических маркеров вирусных гепатитов

Установить вирусную природу гепатита и получить информацию об его этиологии возможно только путем выявления серологических маркеров вирусов гепатита. К таким маркерам относят вирусные белки (антигены), специфичные антитела, вырабатываемые организмом в ответ на инфекцию, и нуклеиновые кислоты вируса (ДНК или РНК), представляющие его геном.

Совокупность методов, позволяющих выявлять в биологических тканях и жидкостях специфические вирусные или бактериальные белки (антигены) или антитела, вырабатываемые в организме хозяина в присутствии того или иного возбудителя, относят к иммунологическим методам лабораторного анализа. За последние несколько десятилетий иммунологические методы исследования получили повсеместное распространение. Причиной этого явилось тесное слияние иммунологии и биотехнологии, которое позволило разработать и внедрить в практику широкий спектр тест-систем, основанных на взаимодействии антиген - антитело. Применительно к вирусным гепатитам, иммуноферментный анализ относится к непрямым методам обнаружения возбудителя, позволяющим установить этиологию болезни.

Сравнительно недавно в практику клинико-диагностических лабораторий вошли методы генодиагностики, позволяющие обнаруживать и характеризовать гены или несмысловые последовательности ДНК и/или РНК. Своим развитием эти методы обязаны разработкой в 1983 г принципа полимеразной цепной реакции (ПЦР). Первые сообщения по практическому применению ПЦР появились в 1985 г и с тех пор количество публикаций, где ПЦР используется в качестве одного из методов исследования, занимает одно из первых мест в мировой научной литературе. Эти подходы приложимы для обнаружения и исследования геномов инфекционных агентов, обнаружения маркеров онкологических заболеваний, выявления генетических изменений в геноме человека, связанных с теми или иными функциональными нарушениями. В отличие от ИФА, ПЦР-анализ относится к прямым методам обнаружения возбудителя в клиническом материале, что позволяет оценить активность вирусного процесса и проследить процессы распространения возбудителя в различных органах и тканях.

Серодиагностика вирусного гепатита В.

Вирус гепатита В (hepatitis B virus, HBV) относится к семейству Hepadnoviridae. Геном вируса представлен частично сдвоенной кольцевой молекулой ДНК размером 3200 п.н. При световой микроскопии HBV выглядит сферической частицей диаметром 42 нм (частица Дейна), состоящей из ядра - нуклеоида, имеющего форму икосаэдра диаметром 28 нм, внутри которого находится двуцепочечная ДНК, концевой белок и фермент ДНК-полимераза. В состав нуклеоидного белка входят HBcAg и HBeAg. Внешняя оболочка (толщиной 7 нм) образована поверхностным антигеном HBV - HBsAg (рис. 2, 3). Вирус гепатита В является псевдоретровирусом, т. е. его ДНК может частично встраиваться в геном гепатоцитов. При ОВГ и обострении ХГ вирусные частицы можно обнаружить в гепатоцитах и сыворотке крови больного. При интегративной форме ХГ В и в стадии ремиссии HBV в сыворотке крови не выявляется.Основой лабораторной диагностики инфекции HBV является определение серологических маркеров инфицирования вирусом: HBsAg, HВeAg, анти-НВс класса IgM и IgG, анти-НВе и анти-HBs, HBV ДНК и активности вирусной ДНК - полимеразы. В зависимости от течения вирусного гепатита В спектр изменения серологических маркеров выглядит по-разному - основной маркер инфицирования HBV. При остром вирусном Вв большинстве случаев (90-80 %) HBsAg удается выявить в инкубационном периоде, начиная с 3-5-й недели заражения. Средняя продолжительность циркуляции антигена - 70-80 дней. Быстрое исчезновение HBsAg (в первые дни желтухи) с появлением антиНВs - плохой прогностический признак. При хроническом гепатите ВHBsAg может циркулировать в крови больного на протяжении многих лет. Следует отметить, что применяющиеся в настоящее время методы определения HBsAg, в том числе ИФА, имеют порог чувствительности. Поэтому при наличии клинических признаков гепатита и отсутствии HBsAg в сыворотке крови необходимо исследовать другие маркеры инфекции HBV. Наличие HBsAg в крови свидетельствует о присутствии вируса в печени и с большой долей вероятности в крови. Не всякая сыворотка, содержащая HВsAg, содержит вирус гепатита В. В ряде случаев ДНК вируса встраивается в ДНК гепатоцита не полностью, а частично, только тем участком, который кодирует синтез HBsAg. В этих случаях синтезируются HBsAg без других компонентов вириона, (то есть без других антигенов). Считают, что такая ситуация возникает при "здоровом" носительстве HBsAg.HBeAg вируса гепатита В характеризует высокую инфекционность крови, являясь показателем активной репликации HBV. HBeAg циркулирует в крови больного только в присутствии HBsAg. В первую неделю желтушного периода он выявляется у 85-95 % больных. Выявление HBeAg в течение двух и более месяцев служит прогностическим признаком развития хронического гепатита. У большинства больных хроническим гепатитом с высокой активностью процесса HBeAg сохраняется на длительный срок (до нескольких лет).Антитела к ядерному антигену вируса гепатита В класса M (анти-НВcIgM) - маркер активной репликации НВV и острой инфекции. Выявляются через 1-2 недели после обнаружения HBsAg и сохраняются на протяжении 2-18 месяцев. У 4-20 % больных острым гепатитом В анти-HBcIgM являются единственным маркером инфекции. При ХГ В анти-НВсIgM могут быть выявлены у некоторых больных в меньших титрах, чем при острой инфекции, причем титр антител отражает тяжесть гепатита. Антитела к HBcAg класса G (анти-НВсIgG) появляются практически одновременно с анти-НВсIgM. Как првило, они остаются у всех лиц, переболевших гепатитом В, пожизненно. У 95 % носителей HBsAg наряду с HBsAg циркулируют и анти-НВсIgG. Антитела к HBsAg (анти-НВs) свидетельствуют о ранее перенесенной инфекции или о наличии поствакцинального иммунитета (защитный уровень - 10 МЕ/мл). Они появляются в период выздоровления, через 4 недели после исчезновения HBsAg, достигая максимальной концентрации через 1-2 года, с последующим постепенным снижением уровня, недоступного выявлению современными методами диагностики. В некоторых случаях анти-HВs могут циркулировать пожизненно. Появление анти-HBs на фоне клинического улучшения у больного гепатитом В является хорошим прогностическим признаком. Важно отметить, что в динамике острой инфекции HBV имеется "окно", когда HBsAg уже не определяется, а анти-HBs еще не появились. При этом выявляются анти-HBcIgM и IgG. Из этого следует вывод о необходимости обследования больных ОВГ на анти-HBcIgM даже при отрицательных результатах исследования HBsAg и анти-НВs. Антитела к HBeAg (анти-НВе) появляются в крови после элиминации HBeAg и завершения репликации вируса. К концу 9-й недели острого периода гепатита В более 90 % больных имеют анти-НВе. В период выздоровления анти-НВе могут исчезать. Однако, наличие анти-НВе не является показателем отсутствия инфекционности конкретной сыворотки крови. Показано, что у ряда больных в ходе развития гепатита В (около 10%) под влиянием "иммунного давления" на вирус возникают мутантные формы, которые "избегают" иммунного надзора и не элиминируются. У носителей анти-HBe был выделен мутант, неспособный продуцировать HBeAg из-за дефектов в области precore и получивший обозначение HBeAg-отрицательного. Появление HBeAg-отрицательного мутанта приводит к прогрессированию поражения печени при продолжающейся репликации вируса (наличие ДНК HBV в сыворотке крови). При первичном инфицировании HBeAg-отрицательным мутантом существенно возрастает риск развития фульминантного гепатита. Описанные маркеры гепатита В исследуются методом ИФА. Спектр антител (анти-НВе, анти-НВs, анти-НВcIgM, анти-НВcIgG) и антигенов (HBsAg, HBeAg) позволяет установить диагноз гепатита В и определить стадию заболевания (таблица 1). Недостатком данного метода является невозможность его использования при заражении мутантными формами вируса, при иммуносупрессии (больные онкологическими заболеваниями, наркоманы и т.д.) и для количественной оценки присутствующего в организме возбудителя. Решение этих задач стало возможным в результате внедрения молекулярно-биологических методов в практику клинико-диагностических лабораторий.

Таблица 1. Различные сочетания серологических маркеров инфицирования вирусом гепатита В и их интерпретация

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| HBsAg | HBeAg | антиНВc IgM | антиНВ c сумм | антиНВе | антиНВs | HBV ДНК | Трактовка результата |
| + | + | + | + | - | - | + | Острый гепатит В. Дикий штамм |
| + | - | + | + | - | - | + | Острый гепатит В. Мутантный штамм |
| + | - | +/- | + | + | - | -/+ | Разрешившийся острый гепатит В.Сероконверсия. |
| + | + | +/- | + | -/+ | - | + | Хронический активный гепатит В |
| +/- | -/+ | -/+ | + | +/- | - | +/- | Хронический интегративный гепатит В |
| + | - | - | + | - | -/+ | - | "Здоровое" носительство |
| - | - | - | + | -/+ | + | - | Перенесенный вирусный гепатит В |
| - | - | - | - | - | + | - | Состояние после иммунизации |

Методы генодиагностики, к которым относится ПЦР, существенно расширяют возможности лабораторной диагностики вирусного В, позволяя непосредственно выявить возбудитель, установить тканевую и внутриклеточную локализацию HBV, выявить и охарактеризовать мутантные формы вируса, оценить уровень виремии в течение заболевания, в том числе - на фоне противовирусной терапии.

В настоящее время существует широкий спектр диагностических тест-систем для выявления ДНК HBV в лабораторных условиях, основанных на методах ПЦР - фирмы "Roche", НПФ "Литех", "ДНК технология", LCR (лигазная цепная реакция) - фирма "Abbott", bDNA (метод "развлетвленных" ДНК зондов) - фирма "Chiron". Эти тест-системы позволяют проводить качественное определение наличия возбудителя в биологическом материале: сыворотке или плазме крови, ткани печени, мононуклеарах. Одним из вариантов качественного определения ДНК HBV является технология ПЦР insitu (в гистологических срезах), позволяющая установить внутриклеточную локализацию вируса в гепатоцитах.

Единственная коммерческая тест-система дифференциальной диагностики НВеAg-отрицательного гепатита В создана фирмой "Abbot" с использованием LCR. Существенным недостатком этой системы является выявление только одной из многих мутаций, приводящих к отсутствию синтеза НВеAg вирусом. Выявление всей совокупности генетических изменений, характерных для НВеAg-отрицательных вирусов гепатита В, возможно пока только прямым секвенированием ПЦР-амплифицированных фрагментов вирусного генома.

Количественная характеристика содержания ДНК HBV в клинических образцах важна для оценки эффективности противовирусной терапии и имеет прогностическое значение для определения хронизации HBV. При исходно низком уровне виремии (ДНК HBV менее 500 фг/мкл) процент хронизации острого гепатита В близок к нулю, при концентрации HBV ДНК от 500 до 2000 фг/мклхронизация процесса наблюдается у 25-30% больных, а при высоком уровне виремии у пациента (более 2000 фг/мкл) острый гепатит В чаще всего переходит в хронический.

Известные коммерческие тест-системы оценки концентрации ДНК HBV реализуют принцип конкурентного ПЦР-анализа с последующей гибридизационной схемой определения продуктов амплификации (фирма "Roche", НПФ "Литех"). Этот подход основан на внесении в клинический образец внутреннего стандарта известной концентрации, качественно отличающегося от определяемой матрицы. После ПЦР концентрация ДНК HBV в исследуемом материале рассчитывается на основании известной концентрации внутреннего стандарта и соотношения накопления продуктов амплификации внутреннего стандарта и определяемой матрицы.

В настоящий момент развитие методов лабораторной диагностики гепатита В идет по направлению создания коммерческих тест-систем для идентификации клинически значимых мутантных штаммов HBV, а также использованию новых оптических приборов (биосенсоров) для комплексной диагностики инфекции HBV (вирусных белков, антител к ним и ДНК HBV)

Серодиагностика гепатита С

Вирус гепатита С (hepatitis C virus, HCV) является РНК содержащим гепатотропным и лимфотропным вирусом, относящимся к семейству Flaviviridae. Геном вируса представлен одноцепочечной молекулой (+) РНК размером около 9500 оснований, кодирующей структурные и неструктурные белки.К структурным белкам относят белок сердцевины (кор) и гликопротеины оболочки (Е1 и Е2). Неструктурную область представляет комплекс белков с ферментативной активностью, в первую очередь РНК-зависимая - РНК полимераза. Помимо вирусных белков, снаружи вирион покрыт липидной оболочкой состоящей из липопротеинов организма хозяина низкой плотности. До 1990 г. ХГ ни-А-ни-В с парентеральным путем передачи диагностировали на основании повышенной активности АЛТ сыворотки в течение 6 месяцев, при отсутствии других известных маркеров вирусных гепатитов. Однако у части больных ХГ С уровень АЛТ не повышается. В современной диагностике гепатита С основная роль отводится определению антител к HCV и выявлению РНК HCV.

В отличие от гепатита В, при котором могут быть определены антигены вируса и антитела к ним, при гепатите С методом ИФА улавливаются только антитела. Антигены HCV, если и попадают в кровь, то в количествах, которые практически не улавливаются. Они могут быть обнаружены только в ткани печени при использовании иммунногистохимических методов исследования. Это существенно ограничивает возможность оценки течения и активности инфекционного процесса.

Анти-HCV не свидетельствуют о продолжающейся репликации вируса, и могут являться признаком как текущей, так и перенесенной инфекции. Приходится также учитывать, что у реципиентов, которым была перелита инфицированная кровь, могут обнаруживаться анти-HCV донора, не обязательно свидетельствующие о заражении HCV. У больных ХГ С анти-HCV обнаруживаются в крови не только в свободной форме, но и в составе циркулирующих иммунных комплексов. Антитела образуются к каждому из вирусных белков, расположенных в структурной и неструктурной области вирусного генома. Этим определяется их различная специфичность и, соответственно, разная диагностическая информативность. Для скрининга гепатита С используют метод ИФА, а в качестве подтверждающего теста - метод иммунноблота (RIBA). Существует несколько поколений диагностических тест-систем для выявления анти-HCV, отличающихся своей чувствительностью и специфичностью (таблица 2).

Таблица 2. Сравнение разных поколений диагностических иммуноферментных тест-систем для выявления антител к ВГС.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Тест-система | Шифр фрагментов | Белок, содержащий данный фрагмент | Эффективность |
| 1 поколение | С100-3 | NS3 и NS4 | до 82,2% |
| 2 поколение | С100-3, С22, С33с | NS4, кор, NS3 | до 97,5% |
| 3 поколение | С100-3, С22, С33с, NS5 | NS4, кор, NS3, NS5 | до 99,7% |
| 4 поколение\* | С100-3, С22, С33с, NS5 | NS4, кор, NS3, NS5 | до 99,7% |
| RIBA-3 | С100-3, С22, С33с, NS5, e1, e2 | NS4, кор, NS3, NS5, E1, E2 | до 99,6% |

\*Тест-системы 4-го поколения содержат синтетические и рекомбинантные вирусные антигены, размеры которых могут отличаться от фрагментов 3-го поколения.

В заключении следует упомянуть о необходимости комплексного обследования больного с привлечением новейших достижений медицинской и биологической науки для правильной диагностики вирусных гепатитов и назначения адекватной терапии больному.[2,4,7,21]

Биохимический анализ крови

Биохимический анализ крови пациентов давно вошел в практику клинических лабораторий. Совокупность получаемых данных о показателях обмена биллирубина, сывороточных белках и ферментах позволяют обнаружить воспалительные процессы, происходящие в организме человека и предположить их локализацию. Эти критерии не специфичны и не характеризуют этиологию вирусных гепатитов, вместе с тем существенны для оценки функционального состояния печени.

Показатели обмена билирубина.

Оценить у пациента состояние обмена билирубина можно на основании биохимического анализа крови, мочи и кала. Свободный билирубин является производной гемоглобина, высвобождающегося в процессе гемолиза эритроцитов. В физиологических условиях каждые сутки гемолизируется примерно 1% циркулирующих эритроцитов, из которых образуется 200-250 мг билирубина. Основная часть билирубина поступает в кровяное русло из клеток системы мононуклеарных фагоцитов селезенки и костного мозга. Билирубин нерастворим в воде, поэтому в крови его перенос осуществляют неспецифические транспортные белки - альбумины. Свободный билирубин является токсичным соединением, способным проникать через гемато-энцефалический барьер, вызывая энцефалопатии. Детоксикация билирубина происходит в клетках печени, где к нему присоединяется глюкуроновая кислота, образуя глюкурониды билирубина. Эти соединения уже не токсичны и водорастворимы, что облегчает их выведение из организма в составе желчи. В кишечнике под действием бактериальных ферментов образуются две группы продуктов распада билирубина - уробилиногены и стеркобилиногены, основная часть которых выводится с калом. В нормальных физиологических условиях почки в выведении билирубина не участвуют. Билирубин в крови здорового человека содержится в концентрации 1,7 - 17,1 мкмоль/л и представлен двумя фракциями: нерастворимый билирубин, связанный с альбумином - непрямой билирубин, и растворимые глюкорониды билирубина - прямой билирубин. В норме их соотношение составляет 3:1. При гепатитах повреждаются клетки печени и, вследствие этого, снижается продукция желчи. Кроме того, в результате повреждения паренхимы печени желчь поступает не только в желчные канальцы, но и в кровь. Эти процессы приводят к увеличению общего билирубина крови за счет обоих его фракций. Отмечено, что уже в конце преджелтушного периода у части больных на фоне нормального общего билирубина начинает расти фракция прямого билирубина, что является ранним показателем цитолитических процессов в печени. В моче начинают выявляться билирубин и уробилины, а концентрация стеркобилина в кале резко снижается (таблица 3).

Таблица 3. Соотношение показателей обмена билирубина в норме и при развитии печеночной желтухи.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Показатели | Нормальные значения | Печеночная желтуха |
| Общий билирубин сыворотки крови | 1,7 - 17,1 мкмоль/л | Значительное повышение |
| Прямой билирубин сыворотки крови | до 3,4 мкмоль/л | Повышение |
| Непрямой билирубин сыворотки крови | 1,7 - 12,7мкмоль/л | Повышение |
| Реакция мочи на билирубин и уробилин | Отрицательная | Положительная |
| Реакция кала на стеркобилин | Положительная | Отрицательная |

Следует отметить, что показатели обмена билирубина для диагностики вирусного гепатита играют роль только при развитии желтухи. Безжелтушная форма и преджелтушная фаза вирусных гепатитов в своем большинстве остаются нераспознанными.

Оценка активности ферментов.

Определение активности аминотрансфераз сыворотки (аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ)) является высокочувствительным показателем цитолиза гепатоцитов, что определяет ее ведущую роль в диагностике гепатитов различной этиологии. При цитолитическом процессе, развивающимся в печени больного вирусным гепатитом, преобладает "вымывание" АЛТ, степень повышения АСТ существенно меньше (таблица 4).

Таблица 4. Определение активности ферментов в сыворотке крови

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Фермент | Нормальные\* значения | Значения при гепатитах | Специфичность для гепатоцитов |
| Аланинаминотрансфераза (АлАТ) | до 40 Ед/л | увеличение | - |
| Аспартатаминотрансфераза (АсАТ) | до 40 Ед/л | увеличение | - |
| Сорбитдегидрогеназа (СДГ) | до 17 Ед/л | увеличение | + |
| Фруктозо-1-фосфатальдолаза (Ф1ФА) | до 1 ЕД | увеличение | + |
| Урокиназа | до 1ЕД | увеличение | + |
| Щелочная фосфатаза (ШФ) | 31-115 Ед/л дети: до 350 Е/л | увеличение | - |

\* значения приведены в соответствии с рекомендациями диагностических тест-систем, используемых в КДЛ НПФ "Литех"

Для дополнительного подтверждения гепатогенной природы ферментемии можно определить активность печеночно-специфических ферментов - сорбитдегидрогеназы, фруктозо-1-фосфатальдолазы, урокиназы и др. Они локализуются преимущественно в гепатоцитах и их выявление в крови однозначно связано с патологией печени. Вместе с тем, эти тесты уступают по чувствительности определению активности АЛТ. Активность АЛТ и АСТ отражает выраженность воспаления в печени, но не этиологию гепатита.

Белковые пробы

При острых вирусных гепатитах общее содержание белков плазмы крови и их состав практически не изменяются. Исключение представляет тимоловая проба, в норме имеющая значения до 4 ЕД и возрастающая до 6-8 ЕД при гепатитах.

При ХГ на стадии ЦП могут наблюдаться уменьшение концентрации альбумина в сыворотке крови, снижение протромбинового индекса (менее 70%), уменьшение концентрации других факторов свертывания крови в рамках синдрома печеночно-клеточной недостаточности. Дополнительными показателями активности гепатита являются ускорение СОЭ (і15 мм/ч), повышение концентрации гамма-глобулинов сыворотки.[10,16,19]

Определения лактатдегидрогеназы.

Принцип метода:

Модифицированный метод в соответствии с рекомендациями Скандинавского Комитета по Ферментам (СКФ).

ЛДГ

Пируват + НАДН + Н+ ∞ Лактат + НАД+

Состав набора:

. Буферный раствор:

ТRIS-буфер (рН 7,4) 50ммоль/л

Пируват 1,5ммоль/л

. Субстратный раствор:

НАДН 0,8ммоль/л

Подготовка и стабильность реагентов

Метод работы с индивидуальными реагентами. Реагенты готовы к применению. Реагенты, даже после вскрытия флаконов, могут сохраняться при 2-8 С до указанного срока годности. Буферный раствор необходимо хранить в защищённом от света месте. Следует избегать загрязнения реагентов!

Метод работы с рабочим реагентом. Для приготовления рабочего реагента следует: Осторожно - смешать реагент 1 (Буферный раствор) и 2 (Субстрат) в соотношении 4:1 Рабочий реагент можно хранить в течение 3 недель при 2-80С или 3 дня - при 15-25С. Рабочий реагент следует хранить в защищённом от света месте.

Исследуемый материал:

Сыворотка, гепарин- или ЭДТА-плазма.

Не использовать гемолизированные пробы!

Падение активности в течение 3 дней

при 2-8С - 8%, при 15-25°C - 2%.

Схема проведения анализа:

Длина волны: Hg 334 им, 340 нм, Hg 365 нм

Длина оптического пути: 1 см

Температура: 25С, 30С или 37С

Измерение: относительно воздуха (уменьшение поглощения). Реагенты и кюветы прогреть до необходимой температуры. Температуру в течение анализа поддерживать постоянной (±О.5С).

Схема пипетирования \*

Таблица 5 Метод работы с индивидуальными реагентами

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| В кюветы пипетировать | 25С, 30С | 37С |
| Проба | 20мкл | 10мкл |
| Буферный раствор | 1000мкл | 1000мкл |
| Перемешать, инкубировать 1-5 минут при необходимой температуре | | |
| Субстрат | 250мкл | 250мкл |
| Перемешать, через 1минуту измерить поглощение и одновременно включить секундомер. Точно через 1,2,3 мин повторить измерение. | | |

Таблица 6 Метод работы с рабочим реагентом

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| В кюветы пипетировать | 25С, 30С | 37С |
| Проба | 20мкл | 10мкл |
| Рабочий раствор | 1000мкл | 1000мкл |
| Перемешать, через 1минуту измерить поглощение и одновременно включить секундомер. Точно через 1,2,3 мин повторить измерение. | | |

• При использовании микрокювет объемы можно уменьшить вдвое

Расчёт

Рассчитать среднюю величину изменения поглощения в минуту (\*А/мин) и её подставить в формулу:

Активность ЛДГ (Ед/л) = \*А/мнн Х F Применять следующие факторы:

Таблица 7 Метод работы с индивидуальными реагентами:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Значение фактора F | Hg334нм | 340нм | Hg 365нм |
| F(25С, 30С) | 10275 | 10080 | 18675 |
| F (37С) | 20390 | 2000 | 37060 |

Таблица 8 Метод работы с рабочим реагентом:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Значение фактора F | Hg334нм | 340нм | Hg 365нм |
| F(25С, 30С) | 8250 | 8095 | 15000 |
| F (37С) | 16345 | 16030 | 29705 |

Фактор пересчета результатов, выраженных в традиционной системе единиц (Ед/л), в Международную систему единиц (кат/л):

Ед/л =16,67х10-3 мккат/л, 1 мккат/л=60 Ед/.

Эксплуатационная характеристика

Линейность: Если изменение адсорбции в минуту составляет \*A/min=0,150 при Hg 334 нм, 340 нм или 0,070 при Hg 365 нм, необходимо 100 мкл пробы смешать с 900 мкл физ. раствора (0,9% NaCl) и повторить определение. Полученный результат умножить на 10.

Таблица 9 Диапазон референтных величин

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Температура | 25С,Ед/л | 30С,Ед/л | 37С,Ед/л |
| Взрослые | 120-140 | 160-320 | 225-450 |
| Дети (до года) | До 500 |  |  |

Определения аланинаминотрансферазы

Кинетический метод.

Кат №~ 001.017.01 Ферментный реагент 1\* 80мл

Субстратный раствор 1\*20млт №~ 001.017.10 Ферментный реагент 1\* 800мл

Субстратный раствор 2\*100млт № 001.017.11 Ферментный реагент 4\* 80мл

Субстратный раствор 2\*40мл

Принцип метода

Модифицированный, оптимизированный кинетический метод в соответствии с рекомендациями Международной Федерации Клинической Химии (IFCC), без активации пиридоксальфосфатом:

АЛАТ

-0ксоглутарат + L-Аланин ~ L-Глутамат + Пируват

ЛДГ

Пируват + НАДН +Н+ ---- L -Лактат + НАД+

Состав набора

. Ферментный реагент:

ТРИС-буфер (рН 7,5) 150 ммоль/л -Алании 750 ммоль/л

ЛДГ ≥1,2 кЕд/л

. Субстратный раствор:

-0ксоглугарат 90 ммоль/л

НАДН 0,9 ммоль/л

Подготовка и стабильность реагентов

При работе с индивидуальными реагентами: Реагенты готовы к использованию и устойчивы, даже после вскрытия флаконов, до указанного срока годности при хранении при-2 - 8 С в защищенном от света месте. Следует избегать загрязнения реагентов.

При работе с рабочим реагентом для приготовления рабочего реагента следует:

Осторожно смешать реагент 1 (Ферментный) и 2 (Субстрат) в соотношении 4:1 Рабочий реагент можно хранить в течение 4-х недель при 2-80С и 5 дней при 15-250С.

Исследуемый материал:

Сыворотка, ЭДТА- или гепарин-плазма. Гемолиз мешает проведению анализа! Потеря активности в течение 3 дней при 4°С: <10%, при 20-250С: <17%

Схема проведения анализа

Длина волны: 340нм или Hg 334 нм, 365 нм

длина оптического пути: 1 см

Температура измерения: 25°С, 30°С, 37С

Измерение: против воздуха (снижение поглощения). Перед измерением реагенты и кюветы прогреть до необходимой температуры и в течение измерения Поддерживать температуру постоянной

(± 0,50С).

Схема пипетирования\*

Таблица 10 Метод работы с индивидуальными реагентами

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| В кюветы пипетировать | 25С, 30С | 37С |
| Проба | 200мкл | 100мкл |
| Ферментный реагент | 1000мкл | 1000мкл |
| Перемешать, инкубировать 5 минут при необходимой температуре | | |
| Субстрат | 250мкл | 250мкл |
| Перемешать, через 1минуту измерить поглощение и одновременно включить секундомер. Точно через 1,2,3 мин повторить измерение. | | |

Таблица 11 Метод работы с рабочим реагентом

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| В кюветы пипетировать | 25С, 30С | 37С |
| Проба | 200мкл | 100мкл |
| Рабочий раствор | 1000мкл | 1000мкл |
| Перемешать, через 1минуту измерить поглощение и одновременно включить секундомер. Точно через 1,2,3 мин повторить измерение. | | |

\*Полумикрометод; для макрометода объемы удвоить

Расчет

Рассчитать среднюю величину изменения поглощения за 1минуту (А/мин) и использовать ее в расчете:

Активность АлаТ (ед/л) = А/мин х

При изменении поглощения в минуту (А/мин) 0,06-0,08 (Hg 365нм) или 0,12-0,16 (Hg 334нм и 340нм) следует принимать во внимание результаты измерения только в первые 2 минуты (1 мин инкубировать и 2мин измерять). Применять следующие значения фактора F/

Таблица 12 Метод работы с индивидуальными реагентами:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Значение фактора F | Hg334нм | 340нм | Hg 365нм |
| F(25С, 30С) | 1173 | 1151 | 2132 |
| F (37С) | 2184 | 2143 | 3971 |

Таблица 13 Метод работы с рабочим реагентом:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Значение фактора F | Hg334нм | 340нм | Hg 365нм |
| F(25С, 30С) | 971 | 952 | 1765 |
| F (37С) | 1780 | 1745 | 3235 |

Фактор пересчета результатов, выраженных в традиционной системе единиц (Ед/л), в Международную систему единиц (кат/л):

Ед/л = 16,67 х 10-3 мккат/л

мккат/л = 60 Ед/л

Таблица 14 Эксплуатационная характеристика

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | А/мин | 25С, 30С | 37С |
| Hg 365нм | 0,080 | 170 Ед/л | 320 Ед/л |
| Hg334нм/340нм | 0,160 | 190Ед/л | 350Ед/л |

При такой активности /поглощении или выше необходимо 0.1 мл пробы смешать с 0,9 мл раствора NaCl (0,9%) и повторить определение, а результат умножить на 10. Высокоактивные сыворотки могут показывать очени низкие величины начального поглощения, так как большая часть НАДН будет израсходована до начала измерения. В этом случае необходимо провести разведения, как описано выше.

Таблица 15 Диапазон референтных величин

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 25С | 30С | 37С |
| Мужчины | До 22 Ед/л | До 30 Ед/л | До 42 ЕД/л |
| Женщины | До 17 Ед/л | До 23 Ед/л | До 32 Ед/л |

Контроль качества

Допускается использование контрольных сывороток, активность АлаТ в которых определена (аттестована) данным методом.

Примечание

Ферментный реагент и субстрат содержат азид натрия (0,095%). Следует избегать их контакта с кожей и слизистыми оболочками!

определение аспартатаминотрансферазы

кинетический метод

Принцип метода: основан на последовательности ферментативных реакций:

- аспартат+ 2 - оксоглутарат АЛТ ~ глутамат + оксалоацетат оксалоацетат + НАДН+ Н лдг ~ лактат + НАД +

Скорость уменьшения концентрации НАДН, который имеет максимум поглощения при 340 нм, пропорциональна активности АЛТ и измеряется фотометрически.

Методика анализа:

Набор реагентов предназначен для ручного определения и для определения на автоматических и полуавтоматических анализаторах.

Ручное определение:

Длина волны 340 им, температура измерений 37 С.

В кювету помещают 500 мкл рабочего реагента, прогревают 5 минут, затем добавляют 50 мкл исследуемого материала и перемешивают.

Инкубируют 1 мин при 37 С, измеряют оптическую плотность раствора по отношению к воздуху или воде. Точно через 2 минуты повторяют измерение, вычисляют среднее изменение оптической плотности за 1 мин. (~А/мин)

Расчет:

Е/л =\*A /мин х F, где F = 1770

Нормальные значения: мужчины до 40 Е/Л

Женщины до 40 Е/л [10]

определеиия аланинаминотрансферазы кинетическии метод

Принцип метода:

основан на последовательности ферментативных реакций:

- аланин + 2 - оксоглутарат АЛТ ~ глутамат + пируват

Пируват + НАДН+ Н лдг ~ лактат + НАД +

Скорость уменьшения концентрации НАДН, который имеет максимум поглощения при 340 нм, пропорциональна активности АЛТ и измеряется фотометрически.

Методика анализа:

Набор реагентов предназначен для ручного определения и для определения на автоматических и полуавтоматических анализаторах.

Ручное определение:

Длина волны 340 нм, температура измерений 37 С .

В кювету помещают 500 мкл рабочего реагента, прогревают 5 минут, затем добавляют 50 мкл исследуемого материала и перемешивают.

Инкубируют 1 мин при 37 С, измеряют оптическую плотность раствора по отношению к воздуху или воде. Точно через 2 минуты повторяют измерение, вычисляют среднее изменение оптичемкой плотности за 1 мин. (\*А/мин)

Расчет:

Е/л = \*А /мин х F, где F = 1746 Нормальные значения: мужчины до 42 Е/Л Женщины до 32 Е/л

определения щелочной фосфатазы.

Кинетический метод.,N'g 001.006.01-001 1. Буфер 80мл

. СУбстрат 20 мл

Кат № 001.006.10-001 1. Буфер 160 мл

.Субстрат40мл

Принцип метода

Оптимизированный стандартный метод в соответствии с рекомендациями IFCC.

ЩФ п-нитрофенилфосфат+н.о ~ фосфат +п-нитрофенол

Состав набора

. Буфер:

Буфер АМР (рН 10,4) 435ммоль/л

Магния ацетат 2,5 ммоль/л

. Субстрат:

п-нитрофенилфосфат 60 ммоль/л

Подготовка и устойчивость реагентов

Метод работы с индивидуальными реагентами. Реагенты готовы к применению. Реагенты, даже после вскрытия флаконов, могут сохраняться при 2-8ОÑ до указанного срока годности. Следует избегать загрязнения реагентов!

Метод работы с рабочим реагентом.

Для приготовления рабочего реагента следует:

Осторожно смешать реагент 1 (Буферный раствор) и 2 (Субстрат) в соотношении 4: l. Рабочий реагент устойчив 4 недели при 2-80С или; 5 дней при 15·25С. Рабочий реагент следует хранить в защищённом от света месте.

Исследуемый материал

Сыворотка, гепаринизированная плазма. Не использовать гемолизированные пробы!

Падение активности в сыворотке в течение 7 дней: 0% при 4°С, 10% при 20-250с.

Схема проведения анализа

Длина волны: Hg 405 нм (400 - 420 нм)

Длина оптического пути: 1 см Температура: 30ОÑ, 37°С

Измерение: против воздуха (увеличение поглощения).

Реагенты и кюветы прогреть до необходимой температуры. Температуру в течение анализа поддерживать постоянной (±0.5С).

Таблица 16 Схема пипетирования\*

|  |  |
| --- | --- |
| В кюветы пипетировать | 25С, 30С 37С |
| Проба | 20мкл |
| Буферный раствор | 1000мкл |
| Перемешать, инкубировать 1 минут при необходимой температуре | |
| Субстрат | 250мкл |
| Перемешать, через 1минуту измерить поглощение и одновременно включить секундомер. Точно через 1,2,3 мин повторить измерение. | |

Таблица 17 Метод работы с рабочим реагентом

|  |  |
| --- | --- |
| В кюветы пипетировать | 25С, 30С 37С |
| Проба | 20мкл |
| Рабочий раствор | 1000мкл |
| Перемешать, через 1минуту измерить поглощение и одновременно включить секундомер. Точно через 1,2,3 мин повторить измерение. | |

• При использовании микрокювет объемы можно уменьшить вдвое

Расчёт активности

Рассчитать среднюю величину изменения поглощения за 1 минуту (\*А/мин) и подставить её в формулу расчёта активности. Активность щелочной фосфатазы рассчитывается по следующим формулам:

• метод работы с индивидуальными реагентами,

Активность ЩФ (Ел/л) = А/мин х 3433

• метод работы с рабочим реагентом:

Активность ЩФ (ЕД/л) = М/мин х 2757

Фактор пересчёта результатов, выраженных в традиционной системе единиц (Ед/л), в Международную систему единиц (кат/л):

Ед!л = 16,67 х 10-3 мккат/л, 1 мккат/л = 60 Ед/л

Характеристика метода

Линейность: до 700 Ед/л

При такой и более высокой активности необходимо 100 мкл пробы смешать с 500 мкл физ.раствора (0,9% NaCl) и повторить определение. Результат умножить на 6.

Таблица 18 Нормальные показатели

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Температура | 30С,ед/л | 37С,ед/л | IFCC |
| Женщины | 28-78 | 42-98 | 35-104 |
| Мужщины | 38-94 | 53-123 | 40-129 |

Контроль качества

Допускается использование контрольных сывороток, активность Щелочной Фосфатазы в которых определена (аттестована) данным методом.

Автоматизация

Программы адаптации для автоматических и полуавтоматических клинико-химических анализаторов поставляем по заказу.

Примечание

Реагенты содержат азид натрия (0,095%). В реакционной смеси содержится п-нитрофенол. Это вещество ядовито! Следует избегать вдыхания, контакта с кожей и слизистыми оболочками! При контакте с кожей необходимо немедленно промыть её большим количеством воды. [10]

Определения концентрации общего и прямого билирубина в сыворотке крови

Предназначение набор реагентов для определения концентрации общего и прямого билирубина в сыворотке крови колориметрическим методом (метод Йендрашека-Грофа, method Jendrassik-Grof) на биохимических или автоматических анализаторах.

Принцип метода: Общий билирубин определяется на основе реакции с диазотированной сульфаниловой кислотой, после диссоциации не конъюгированного (непрямого, свободного) билирубина при участии кофеинового реагента. Для определения содержания конъюгированного (прямого, связанного) билирубина из реакционной смеси исключается кофеиновый реагент. Концентрация не конъюгированного билирубина рассчитывается по разнице концентрации между общим и конъюгированным билирубином .

Исследуемый материал

Негемолизированная сыворотка крови.

Состав набора

Реагент №1. Кофеиновый реагент;

Реагент №2. Сульфаниловая кислота;

Реагент №3. Натрия нитрит;

Реагент №4. Физиологический раствор;

Калибратор - 85,5 мкмоль/л (при разведении в 2-х мл воды);

мкмоль/л (при разведении в 1-ом мл воды)

Аналитические характеристики набора:

Линейность - до 220 мкмоль/л;

Значение коэффициента вариации - не более 5%.

Время проведения анализа - не более 16 мин (общий билирубин), не более 4 мин (прямой билирубин).

Для оценки правильности определений можно использовать контрольные сыворотки, аттестованные данным методом.

### Приготовление рабочего реагента и его стабильность:

Флаконы №1,2,3 и 4 содержат готовые к использованию реагенты.

Содержание флакона с калибратором перед использованием растворите в 2мл (1мл) дистиллированной воды. После полного растворения концентрация билирубина - 85,5 мкмоль/л (171 мкмоль/л).

Разведенный реагент стабилен в течение 5 дней при 40С. Сухой реагент стабилен в течение года при комнатной температуре (18-25С).

Реагент светочувствителен! Хранить в защищенном от света месте!

Диазорегент: смешайте реагент №2 и реагент №3 в соотношении 100:2,5. Диазореагент стабилен не менее 48 часов при комнатной температуре (18·25С) и не менее 10 дней при 4С в плотно закрытой посуде из темного стекла.

Внимание! Тщательно закрывайте флаконы после каждого использования реагентов.

Проведение анализа:

Набор· предназначен для проведения анализа на биохимических полуавтоматических или автоматических анализаторах.

Таблица 19 Общий билирубин

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Реагенты | Опытная проба | Контрольная проба | Калибровочная проба |
| Сыворотка, мкл | 200 | 200 | - |
| Реагент №1, мкл | 1400 | 1400 | 1400 |
| Реагент №4, мкл | 200 | 400 | 200 |
| Калибратор, мкл | - | - | 200 |
| Диазореагент, мкл | 200 | - | 200 |

При определении содержания общего билирубина время инкубации после добавления диазореагента составляет 20 минут при температуре 200С или 15 минут при 37'С. Измерение экстинкции опытной пробы: против соответствующей контрольной пробы произведите при длине волны 535 нм (500 - 560 нм). Экстинкцию калибровочной пробы измерьте тех же условиях против дистиллированной воды.

Таблица 20 Прямой билирубин

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Реагенты | Опытная проба | Контрольная проба | Калибровочная проба |
| Сыворотка, мкл | 200 | 200 | - |
| Реагент №1, мкл | - | - | 1400 |
| Реагент №4, мкл | 1600 | 1800 | 200 |
| Калибратор, мкл | - | - | 200 |
| Диазореагент, мкл | 200 | - | 200 |

При определении содержания прямого (связанного) билирубина время инкубации - 5 минут при 200С или 3 минуты при 37С. Измерение экстинкции опытной пробы против соответствующей контрольной пробы произведите при длине волны 535 нм (500 - 560 нм). Экстинкцию калибровочной пробы измерьте в тех же условиях против дистиллированной воды.

Расчет концентрации (с) общего или прямого билирубина (мкмоль/л) проведите по формуле:

С = (Епробы / Е калибратора) х 85,5 мк/моль/л

Где: Е пробы - экстинкция калибровочной пробы;

,5 - концентрация билирубина в калибраторе, мкмоль/л;

Нормальные величины:

Общий билирубин - 3,4-17,1 мкмоль/л

Прямой билирубин - 0-4,2 мкмоль/л.

При оценке уровня билирубина в крови есть еще один важный показатель. Количество прямого билирубина должно составлять не более 20-22 % от общего билирубина, а непрямого - 78-80 %.

Клинико-диагностическое значение исследования: Содержание непрямого билирубина в сыворотке крови резко возрастает при гемолитической анемии, пернициозной анемии, гемолитической болезни новорожденных, болезни Жильбера, синдроме Криглера - Найяра, синдроме Ротора.

Содержание прямого билирубина повышено в сыворотке крови больных вирусным гепатитом, циррозом печени, при опухолевых поражениях печени, жировой дистрофии печени, синдроме Дубина - Джонсона.

Требования безопасности;

При работе с реагентами следует применять индивидуальные средства защиты (резиновые перчатки, спецодежда) ГОСТ 12.4.103, а так же соблюдать общие правила техники безопасности, работы с химическими веществами и биологическим материалом.

Инструменты, оборудование и лабораторную посуду обрабатывать в соответствии с требованием приказа МЗ РБ №165 от 25.11.2002г, СанПиН 22-10 химическими дезинфицирующими средствами, разрешенными к применению МЗ РБ в установленном порядке, согласно инструкции по их применению.

Общие требования к использованию наборов реагентов - медреал:

Не используйте наборы реагентов с истекшим сроком годности.

Не допускайте замораживания реагентов.

Отбирайте из флаконов только необходимое количество реагентов, никогда не сливайте излишки реагентов обратно во флаконы во избежание контаминации. Закрывайте каждый флакон своей крышкой. Перекрестное загрязнение реагентов и/или образцов может привести к получению ложных результатов. Для каждого реагента и исследуемого образца используйте новые сменные наконечники, кюветы, пробирки и др.

Избегайте попадания прямых солнечных лучей во время работы.

При работе с компонентами набора или с образцами всегда надевайте одноразовые перчатки, маски.

Для контроля качества НЕОБХОДИМО использовать контрольные сыворотки Humatrol, $erodos, т.к. совместимость данных сывороток с реагентом-Медреал была подтверждена при проведении клинических испытаний в МЗ РБ. За применение других контрольных сывороток, которые могут привести к недостоверным результатам, производитель ответственности не несет. [10]

Анализатор для клинической химии "Clima МС-15" представляет собой управляемый микропроцессором спектрофотометр, способный выполнять измерение проб и обрабатывать результаты измерения в соответствии с параметрами, заданными пользователем. Прибор оборудован сухим термостатом для инкубации 4 блоков кювет по 15 кювет в каждом, а также мешалкой для гомогенизации проб и реагентов. Конструкция измерительного отделения позволяет выполнить 15 анализов автоматическим образом.

Программирование осуществляется с клавиатуры. Прибор запрашивает требуемые параметры с помощью 160-точечного дисплея, на котором показывается также текущее состояние прибора и флаги. Результаты выводятся непосредственно в единицах измерения, выбранных при программировании, и распечатываются на термобумаге. Этот метод печати позволяет избежать всех проблем технического обслуживания, типичных для принтеров, использующих краситель (ленту, чернила или тонер). Прибор выполняет 15 анализов по конечной точке ориентировочно за 60 секунд. Для кинетических анализов это время составляет 2-4 минуты, в зависимости от используемого метода. Выполнение смешанных измерений по различным методам в одном и том же блоке кювет может занять 5 минут.Прибор снабжён 60 свободными позициями в памяти для хранения методов. Все методы после их запоминания постоянно хранятся в памяти прибора. Возможно выполнение многостандартных тестов по сохранённой в памяти калибровочной кривой

Технические характеристики:

 Моно- и бихроматический режим измерений с высоким разрешением;

 Интерференционные фильтры - 340, 405, 500, 546, 578, 630 и 670 нм;

 Термостат на 4 мультикюветы - (37±0,2)°С;

 Объем реактива на исследование - 500 мкл

 Объем пробы - 5-10 мкл

 Количество программируемых методик в памяти - 60

Преимущества анализаторов BS 200 и BS 200i:

· полностью автоматический, производительность до 200 тестов в час, возможность выполнения срочных проб (Stat)

· автоматический мониторинг остаточного объема реагентов, предварительный подогрев реагентов перед смешиванием

· тщательное перемешивание образцов с минимальными временными затратами и без опасности кросс-контаминации

· автоматическая очистка пробоотборника

· автоматический контроль измерительных кювет

· объем образца на одну пробу от 2 до 45 мкл с шагом в 0,5 мкл

· объем реагента на одну пробу 30 - 450 мкл; конечный объем пробы 180 - 450 мкл

· анализатор произвольного доступа (RandomAccess)

· открытая система

· независимый холодильник на борту

· низкое потребление воды

· многоканальная фотометрирующая система

· Определяемые тесты

Увеличить изображение

Таблица 21 Технические характеристики автоматического биохимического анализатора BS 200

|  |  |
| --- | --- |
| Модель | BS 200/200i |
| Производительность | |
| без ионселективного блока | 200 тестов/час |
| С ионселективныи блоком | 360 тестов/час |
| Длина волны | 340, 405, 450, 510, 546, 578, 630, 670 нм |
| Объем образца | 2 мкл ~ 45 мкл; точность: 0,5 мкл |
| Количество образцов на борту | 40 |
| Объем реагента | 30 мкл ~ 450 мкл; точность: 1 мкл |
| Количество реагентов на борту | 40 |
| Наличие охлаждающего блока для реагентов | Есть |
| Температура охлаждения | 4-10 С |
| Методы измерения | конечная точка, кинетика, двухточечная кинетика, дифференциальный режим, двухволновые методы |
| Реакционный диск | 80 реакционных кювет |
| Реакционный объем | 180 ~ 450 мкл |
| Количество воды для промывки | 3 л/час |
| Габариты: | Настольный вариант: 780мм x 680мм x 630мм (Ш x Г x В) |
| Вес: | Настольный вариант: 100кг |

Вывод

Парентеральный вирусный гепатит - это воспалительное заболевание печени, которое вызывают вирусы, проникающие в организм человека через нарушения и повреждения целостности кожных и слизистых покровов. Инфицирование наступает при контакте с зараженной кровью или другими биологическими жидкостями. К группе парентеральных вирусов относятся вирусы гепатита В, D, С, F, G, TTV, Sen V.В настоящее время детально индетифицировано и включено в международную классификацию вирусов пять гепатотропных вирусных возбудителей : вирус гепатита А ( HAV ), вирус гепатита В ( HBV ), вирус гепатита С ( HCV ), вирус гепатита D ( HDV ) и вирус гепатита E ( HEV ).

Диагностика вирусного гепатита С: основана на выявлении специфических антител к антигенам вируса и определении РН вируса, его количества и генотипа. Антитела IgM к вирусу гепатита С ( HCV ), определяемые иммуноферментным методом являются доказательством инфицирования HCV Определение РНК вируса гепатита С полимеразной цепной реакцией (ПЦР) позволяет достоверно определить наличие или отсутствие HCV в крови пациента,

Диагностика гепатита В: для диагностики вирусного гепатита В (и возможного гепатита Д) используют их специфические маркеры:

ИФА (иммуноферментный анализ) определение в сыворотке крови антигенов (HBsAg, HBeAg) и антител к вирусу гепатита B (anti-HBcorAg), антитела к гепатиту Д. - ПЦР определение ДНК вируса гепатита В (по назначению врача - может быть качественное и количественное). Для начала проводится качественное определение, затем при необходимости - количественное (оно более дорогостоящее).

Лабораторная диагностика гепатита Д (ГД) : Серологические маркеры вируса ГД определяют методом иммуноферментного и радиоиммунного анализа, а РНК-ВГД - методом полимеразной цепной реакции.

Таким образом, постановка диагноза проводится по результатам лабораторных исследований. Изменяются биохимические показатели печени: повышенной активности в крови АЛТ, ACT и других гепатоспецифическихэнзимов высокой концентрации в крови: HBsAg и HBeAg, анти-HBsAg, IgM, ДНК-вируса

Список использованных источников

1. Комар, В.И. Инфекционные болезни ./ В.И.Комар- Минск, 2008- стр.87.

2. Шифф, Ю. Вирусные гепатиты и холестатические заболевания/ переводчик Халатов В.Ю. изд. ГЭОТАР-медиа, 2010г.-с26

. Национальный Интернет-портал Республики Беларусь / Сайт администрации заводского района г.Минска. - Минск, 2014.-

. Лобзин, Ю. «Вирусные гепатиты: клиника диагностика лечение» . /Ю Лобзин - Москва, 1998 -с.147

. Национальный Интернет-портал Республики Беларусь / сайт санитарно-эпидемиологическая служба г.Минска - Минск, 2013.

. Национальный Интернет-портал Республики Беларусь / сайт центральной клинической больницы №1 ОАО «РЖД». - Москва, 2012.

. Радченко, В.Г. Основы клинической гепатологии / Радченко В.Г., Шабров А.В., Зиновьева Е.Н. / -СПб.: Диалект, 2005.- с.306-318.

. Национальный Интернет-портал Республики Беларусь / сайт доктор Лернен. -Санкт-Петербург, 2012.

. Национальный Интернет-портал Республики Беларусь / сайт центра фитологии.- Москва, 2013.

. Инструкция к набору реагентов для определения активности ферментов в сыворотке и плазме крови. Алгоритмы их определения.: утв. М-вом здравоохранения Республики Беларусь 20.12.04. - Минск: Дикта, 2004. - 6 с.

. Логинов А.С. Хронические гепатиты и циррозы печени/ Логинов А.С., Блок Ю.Е. / - М.: Медицина, 1987., с.76-82.

. Национальный Интернет-портал Республики Беларусь / сайт независимой лаборатории Инвитру .- Новосибирск, 2011.

. Сологуб, Т.В. Комбинированная терапия хронического вирусного гепатита В и ее влияние на качество жизни. / Сологуб Т.В., Романцов М.Г., Коваленко С.Н./ Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. И.И. Мечникова. - 2006. - №1. - С.3-12.

. . Санитарные правила и нормы «Организация противоэпидемических мероприятий в очагах вирусных гепатитов.: утвержденные Постановлением №11 от 06.02.2013г.- Минск, 2013.-25с.

. Национальный Интернет-портал Республики Беларусь / сайт росбиомедика.- Москва, 2012.

. Балаян М.С. Энциклопедический словарь. Вирусные гепатиты./ Балаян М.С., Михайлов М.И./ - М.: Амипресс, 1999. - с. 113 - 115.

. Национальный Интернет-портал Республики Беларусь [Электронный ресурс] / сайт компании Стормовъ, - Москва, 2014

. Блюгер А.Ф. Вирусные гепатиты / Блюгер Α.Φ., Новицкий И.H./ - Рига: Звайгзне- 1988г.-с.258

. Нагоев Б.С. Острые и хронические вирусные гепатиты . / Нагоев Б.С./- Эльбрус, 2006г. - 128 с.

. Ильин В.Ф. Вирусные гепатиты: лечение и профилактика /Ильин В.Ф./- Вектор, 2011-с 59.

. Балаян М.С. Вирусный гепатит ни А, ни В // Успехи гематологии / Под ред. А.Ф. Блюгера. - Рига: Б. и; 1984. - С. 185 - 194.