

ГЕПАТИТ ДЕЛТА ВИРУСИ ТАШХИСОТИ УЧУН ПЗР АСОСИДА МАҲАЛЛИЙ РЕФЕРЕНС ПАНЕЛ ЯРАТИШ ВА УНИНГ СИФАТ НАЗОРАТИДАГИ АҲАМИЯТИ



Турсунова Шохистахон Абдусаттор кизи, Жўраев Ривожиддин Хафзуллаевич,
Кан Наталия Георгиевна, Суяркулова Дилдора Толибжоновна

Республика ихтисослаштирилган эпидемиология, микробиология, юқумли ва паразитар касалликлар
илмий-амалий тиббиёт марказининг Вирусология илмий-тадқиқот институти, Ўзбекистон
Республикаси, Тошкент ш.

СОЗДАНИЕ ЛОКАЛЬНОЙ РЕФЕРЕНС-ПАНЕЛИ НА ОСНОВЕ ПЦР ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА ГЕПАТИТА D И ЕЁ ЗНАЧЕНИЕ В ОБЕСПЕЧЕНИИ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Турсунова Шохистахон Абдусаттор кизи, Жураев Ривожиддин Хафзуллаевич,
Кан Наталия Георгиевна, Суяркулова Дилдора Толибжоновна

Научно-исследовательский институт вирусологии Республиканского специализированного научно-
практического медицинского центра эпидемиологии, микробиологии, инфекционных и паразитарных
заболеваний, Республика Узбекистан, г. Ташкент

DEVELOPMENT OF A LOCAL PCR-BASED REFERENCE PANEL FOR HEPATITIS DELTA VIRUS DIAGNOSIS AND ITS IMPORTANCE IN QUALITY CONTROL

Tursunova Shokhistahton Abdusattor kizi, Juraev Rivojiddin Hafuzullaevich, Kan Natalia Georgievna,
Suyarkulova Dildora Tolibjonovna

Research Institute of Virology of the Republican Specialized Scientific and Practical Medical Center of Epide-
miology, Microbiology, Infectious and Parasitic Diseases, Republic of Uzbekistan, Tashkent

e-mail: shohista.tursunova1994@gmail.com

Резюме. Ушбу тадқиқотда гепатит делта вируси (HDV) РНКсини аниқлаш учун реал вақт режимидаги полимераза занжир реакцияси (Real-Time PCR) асосида маҳаллий референс панел яратиш имкониятлари ўрганилди. Тадқиқот давомида HDV РНК мусбат клиник намуналар танлаб олиниб, вирус юкламаси бўйича стандартлаштирилди ва турли концентрациялардаги назорат материаллари шакллантирилди. Тайёрланган панел намуналарининг аналитик хусусиятлари Rotor-Gene Q (QIAGEN) платформасида реал вақт режимидаги ПЗР ёрдамида баҳоланди. Ҳар бир намуна уч марта параллел равишда текиштирилиб, натижалар Ct (Cycle Threshold) қийматлари ва вирус юкламаси кўрсаткичлари асосида таҳлил қилинди. Олинган натижалар вирус концентрацияси ошиши билан Ct қийматларининг камайиб боришини кўрсатди. Тайёрланган панел намуналарида Ct қийматларининг паст тарқоқлиги ПЗР таҳлилининг юқори тақрорланувчанлигини кўрсатди. Тадқиқот натижалари маҳаллий шароитда HDV диагностикаси учун сифат назоратини таъминлайдиган, лаборатория усуллари баҳолаш ва стандартлаштириш имконини берувчи референс панел яратиш мумкинлигини тасдиқлади.

Калит сўзлар: гепатит делта вируси, HDV, ПЗР, Real-Time PCR, референс панел, сифат назорати, молекуляр диагностика.

Abstract. This study investigated the feasibility of developing a local reference panel for the detection of Hepatitis Delta Virus (HDV) RNA using real-time polymerase chain reaction (Real-Time PCR). HDV RNA-positive clinical specimens were selected, standardized according to viral load, and used to prepare control materials with different concentration levels. The analytical performance of the developed reference panel was evaluated on the Rotor-Gene Q (QIAGEN) platform using Real-Time PCR. Each panel sample was tested in triplicate, and the results were analyzed based on cycle threshold (Ct) values and quantified viral loads. The results demonstrated a decrease in Ct values with increasing viral load, indicating a strong inverse relationship between viral concentration and amplification threshold. The low variability of Ct values among replicate measurements confirmed the high reproducibility of the PCR assay. The findings demonstrate that it is feasible to develop a local reference panel for HDV diagnostics, providing an effective tool for quality control, evaluation of laboratory performance, and standardization of molecular diagnostic procedures under local laborato-

Кириш. Гепатит делта вируси (HDV) инсонларда учрайдиган энг патоген гепатотроп вируслардан бири бўлиб, ўзининг репликацияси учун гепатит Б вируси (HBV) юзасидаги HBsAg оксидига тўлиқ боғлиқ ҳисобланади. Шу сабабли HDV инфекцияси фақат HBV инфекцияси мавжуд бўлган шахсларда коинфекция ёки сурункали HBV фонида суперинфекция кўринишида ривожланади. Айниқса, суперинфекция шакли касалликнинг тез сурункалашиши, жигар фиброзининг жадал ривожланиши, сирроз ва гепатоцеллюляр карсинома ривожланиш хавфининг кескин ортиши билан тавсифланади [3,4,8].

Жаҳон соғлиқни сақлаш ташкилоти маълумотларига кўра, дунёда 250 миллиондан ортиқ инсон сурункали HBV инфекцияси билан яшайди ва улардан 12–20 миллион нафари HDV билан зарарланган деб баҳоланади. HDV инфекциясининг тарқалиши географик жиҳатдан нотекис бўлиб, Марказий Осиё, Яқин Шарқ, Ўрта Ер денгизи ҳавзаси, Африка ҳамда Жанубий Америка мамлакатларида юқори эндемиклик кузатилади. Сўнгги эпидемиологик тадқиқотлар вируснинг айрим ҳудудларда илгари баҳоланганидан ҳам кенгроқ тарқалганлигини кўрсатмоқда [10,13].

HDV геноми тахминан 1,7 кб узунликдаги ҳалқасимон бир ипли РНКдан ташкил топган бўлиб, инсон вируслари орасида энг кичик геномлардан бири ҳисобланади. Вирус репликацияси мезбон ҳужайранинг РНК-полимераза II ферменти иштирокида амалга ошади. Репликация жараёнининг ўзига хос хусусиятлари вируснинг молекуляр диагностикаси ва лаборатория мониторингида юқори сезгир усулларни қўллаш заруратини юзага келтиради [11].

HDV инфекциясини лаборатор ташхислашда серологик ва молекуляр усуллар биргаликда қўлланилади. Анти-HDV антитаналарини аниқлаш инфекция мавжудлигини кўрсатиши мумкин, бироқ вируснинг фаол репликациясини баҳолаш имконини бермайди. Шу сабабли HDV РНКсини аниқлаш ва миқдорий баҳолаш касалликнинг фаол босқичини тасдиқлаш, даволашни бошлаш мезонларини аниқлаш ҳамда антивирал терапия самарадорлигини мониторинг қилишда "олтин стандарт" усул сифатида эътироф этилади [4,9].

Ҳозирги вақтда реал вақт режимидаги полимераза занжир реакцияси (Real-Time PCR) HDV РНКсини аниқлашнинг энг сезгир, юқори специфик ва репродуктив усули ҳисобланади. Мазкур технология вирус юкламасини кенг динамик диа-

пазонда аниқлаш, паст концентрациядаги вирус нусхаларини қайд этиш ҳамда натижаларни қисқа вақт ичида олиш имконини беради. Клиник амалиётда вирус юкламасининг ўзгаришини кузатиш бемор прогнозини баҳолаш ва даволаш тактикасини танлашда муҳим аҳамият касб этади [6,11].

Молекуляр диагностиканинг ишончилиги нафақат тест тизимининг аналитик хусусиятларига, балки лабораторияда қўлланилаётган сифат менежменти тизимига ҳам бевосита боғлиқдир. Нуклеин кислоталарни ажратиш олиш босқичи, амплификация шароитлари, реагентлар сифати, ускуналарнинг техник ҳолати ҳамда оператор омили диагностик натижаларга сезиларли таъсир кўрсатиши мумкин. Шу сабабли лабораторияларда ички ва ташқи сифат назорати тизимларини жорий этиш халқаро стандартларнинг муҳим талаби ҳисобланади [5,12].

Диагностик тест тизимларини валидация қилиш, лабораториялараро таққослаш, усулларни стандартлаштириш ва лаборатория ходимларининг малакасини баҳолашда референс панеллар алоҳида аҳамиятга эга. Референс панел турли концентрациядаги мусбат ва манфий назорат намуналаридан иборат бўлиб, у диагностик тизимнинг сезгирлиги, спецификлиги, аниқлиги ва такрорланувчанлигини баҳолаш имконини беради. Бундай панеллардан фойдаланиш лабораториялар фаолиятининг халқаро талаблар даражасида ташкил этилишига хизмат қилади [3,13].

Халқаро ташқи сифат баҳолаш дастурлари натижалари HDV РНКсини аниқлаш бўйича турли лабораториялар орасида вирус юкламасини аниқлашда сезиларли тафовутлар мавжудлигини кўрсатган. Ушбу тафовутлар асосан қўлланилаётган тест тизимлари, калибраторлар, назорат материаллари ва лаборатория протоколларининг фарқланиши билан изоҳланади. Мазкур ҳолат диагностик натижаларни стандартлаштириш ва миллий референс материалларни ишлаб чиқиш заруратини янада долзарб этади [6,9,14].

Кўпгина ривожланаётган мамлакатларда, жумладан Ўзбекистонда ҳам лабораториялар асосан хорижда ишлаб чиқарилган назорат материаллари ва референс панеллардан фойдаланади. Импорт қилинадиган материалларнинг нархи юқорилиги, логистика муаммолари, сақлаш ва ташиш шароитларига боғлиқ чекловлар лаборатория фаолиятининг узлуксизлигини қийинлаштириши мумкин. Маҳаллий шароитда ишлаб чиқилган референс панеллар эса иқтисодий жиҳатдан самаралироқ бўлиб, диагностик тизимларнинг барқарор ишлашини таъминлаш, импортга қарамликни камайтириш ҳамда миллий лабора-

тория хизматини ривожлантириш учун муҳим илмий-амалий аҳамиятга эга [12,15].

Шу муносабат билан мазкур тадқиқотнинг мақсади гепатит делта вируси диагностикаси учун Real-Time PCR технологияси асосида маҳаллий референс панел яратиш, унинг аналитик кўрсаткичларини баҳолаш ҳамда молекуляр лабораторияларда ички ва ташқи сифат назоратини такомиллаштиришдаги аҳамиятини аниқлашдан иборат.

Тадқиқот мақсади. Гепатит делта вируси ташхисоти учун реал вақт режимидаги ПЗР асосида маҳаллий референс панел яратиш ҳамда унинг лаборатория сифат назоратидаги самарадорлигини баҳолаш.

Тадқиқот материаллари ва усуллари. Тадқиқот Республика ихтисослаштирилган эпидемиология, микробиология, юкумли ва паразитар касалликлар илмий-амалий тиббиёт маркази Вирусология илмий-тадқиқот институти Референс лабораториясида амалга оширилди. Тадқиқот материаллари сифатида HDV РНК ни микдорий аниқлаш натижасида мусбат натижа берган клиник намуналар танлаб олинди. Намуналар молекуляр-биологик лабораторияда амалдаги биологик хавфсизлик талабларига риоя қилинган ҳолда қайта ишланди. HDV РНКсини аниқлаш ва вирус юкламасини микдорий баҳолаш учун реал вақт режимидаги полимераза занжир реакцияси (Real-Time PCR) усули қўлланилди. Сўнгра ишлаб чиқарувчи тавсияларига асосан “AmpliSens® HDV-Monitor-FL” (Россия) тест тизими ёрдамида махсус праймер ва зондлар иштирокида амплификация реакцияси ўтказилди. Амплификация Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия) реал вақт режимидаги ПЗР анализаторида денатурация, annealing ва элонгация босқичларидан иборат стандарт термоциклаш дастури асосида амалга оширилди. Ҳар бир намунада вирус юкламаси Ct (cycle threshold) қийматлари асосида баҳоланди. Усулнинг аналитик сезгирлиги ва такрорланувчанлигини аниқлаш мақсадида 10^2 – 10^7 IU/ml концентрациядаги назорат панел намуналаридан фойдаланилди. Натижаларнинг ишончлилигини таъминлаш учун барча тажрибалар камида уч мартадан такрорланди. Олинган маълумотлар статистик жиҳатдан қайта ишланиб, ўртача қийматлар ва стандарт оғиш кўрсаткичлари ҳисоблаб чиқилди.

Натижалар. Тадқиқот давомида вирус юкламаси турлича бўлган клиник намуналар танлаб олиниб, улар асосида HDV учун маҳаллий референс панел шакллантирилди. Дастлаб Real-Time PCR ёрдамида вирус юкламаси аниқланган клиник намуналар саралаб олинди ва вирус концентрациясига қараб олтита асосий гуруҳга ажратилди: 10^2 IU/ml даражадаги намуналар; 10^3 IU/ml

даражадаги намуналар; 10^4 IU/ml даражадаги намуналар; 10^5 IU/ml даражадаги намуналар; 10^6 IU/ml даражадаги намуналар; 10^7 IU/ml даражадаги намуналар. Ҳар бир концентрация даражасида вирус юкламасининг ички вариациясини ҳисобга олиш мақсадида намуналар кўшимча равишда икки кичик гуруҳга ажратилди: паст концентрацияли ($1,0$ – $5,9 \times 10^n$ IU/ml) ва юқори концентрацияли ($6,0$ – $9,9 \times 10^n$ IU/ml) намуналар. Бундай ёндашув референс панел таркибида ҳар бир концентрация оралиғининг тўлиқ қамраб олинишини таъминлади ҳамда тест тизимининг турли вирус юкламаларидаги аналитик имкониятларини баҳолаш учун қулай шароит яратди.

Сараланган намуналар ҳар бир концентрация гуруҳи бўйича алоҳида стерил ҳажмли пробиркаларга йиғилди. Паст ва юқори концентрацияли намуналар бир-бири билан аралаштирилмасдан, мустақил равишда тайёрланди. Ҳар бир пробиркадаги биоматериалнинг бир хил таркибга эга бўлишини таъминлаш мақсадида гомогенизация жараёни ўтказилди. Гомогенизация давомида ҳар бир намуна пипетка ёрдамида тахминан 50 мартабагача эҳтиёткорлик билан аспирация ва диспенсация қилиниб, вирус заррачаларининг суюқлик ҳажми бўйлаб бир текис тақсимланишига эришилди. Ушбу босқич референс панелнинг барча аликвоталарида вирус концентрациясининг максимал даражада бир хил бўлишини таъминлаш учун муҳим аҳамият касб этди.

Гомогенизациядан сўнг намуналар қисқа муддат центрифугаланди. Бу босқич пробирка деворларида қолган суюқлик томчиларини умумий ҳажмга йиғиш ва эритма таркибининг барқарорлигини таъминлаш имконини берди. Кейинчалик ҳар бир тайёрланган намуна стерил шароитда 150 мкл ҳажмда микропробиркаларга аликвоталанди. Ҳар бир аликвот алоҳида идентификация коди билан белгиланди ва кейинги лаборатория синовлари давомида намуналарнинг чалкашиб кетишини олдини олиш мақсадида махсус рўйхат асосида маркировка қилинди. Тайёрланган аликвоталар -20°C ҳароратда сақлаш учун жойлаштирилди ҳамда фойдаланиш вақтигача музлатилган ҳолатда сақланди.

Маҳаллий референс панелнинг аналитик хусусиятларини баҳолаш мақсадида барча намуналар Real-Time PCR усулида текширилди. Ҳар бир намуна уч марта параллел равишда таҳлил қилиниб, натижаларнинг такрорланувчанлиги баҳоланди. Ҳар бир реакцияда ишлаб чиқарувчи тавсияларига мувофиқ ички назорат (Internal Control) қўлланилди. Натижаларни баҳолашда Ct (Cycle Threshold) қиймати, вирус юкламаси (IU/ml), ўртача қиймат, стандарт оғиш (SD) ҳамда такрорланувчанлик кўрсаткичлари ҳисобланди.

Жадвал 1 HDV учун маҳаллий ПЗР референс панел намуналарининг аналитик баҳоланиши

Панел намунаси	Вирус юкламаси диапазони	Ct (Mean±SD)	Вирус юкламаси (ўртача)
D1	(1,0–5,9)×10 ²	29,08±0,60	3,50×10 ²
D2	(6,0–9,9)×10 ²	27,36±1,01	7,94×10 ²
D3	(1,0–5,9)×10 ³	22,57±0,55	1,93×10 ³
D4	(6,0–9,9)×10 ³	22,52±0,37	2,09×10 ⁴
D5	(1,0–5,9)×10 ⁴	20,45±0,28	2,66×10 ⁴
D6	(6,0–9,9)×10 ⁴	18,81±0,10	8,95×10 ⁴
D7	(1,0–5,9)×10 ⁵	17,20±0,05	9,13×10 ⁵
D8	(6,0–9,9)×10 ⁵	17,11±1,06	1,04×10 ⁶
D9	(1,0–5,9)×10 ⁶	17,04±1,57	1,14×10 ⁶
D10	(6,0–9,9)×10 ⁶	15,78±0,20	2,44×10 ⁶
D11	(1,0–5,9)×10 ⁷	15,37±0,55	4,63×10 ⁷
D12	(6,0–9,9)×10 ⁷	16,26±1,83	8,12×10 ⁷

Назорат намуналар:

Назорат тури	Ct қиймати	Вирус юкламаси
Позитив назорат (PCO1)	28,33	1,0×10 ³
Позитив назорат (PCO2)	20,13	6,01×10 ⁴
Микдорий назорат (Q1)	22,79±0,41	7,64×10 ³
Манфий назорат (NCO)	Аниқланмади	0

Панел таркибига вирус юкламаси 10² дан 10⁷ IU/ml гача бўлган 12 та назорат намунаси киритилди. Ҳар бир концентрация даражаси учун биттадан паст ва биттадан юқори вирус юкламали намуналар шакллантирилгани сабабли панел вирус концентрациясининг кенг диапазонини қамраб олди. Бу эса диагностик тест тизимининг паст вирус юкламаларини аниқлаш чегараси ҳамда юқори концентрацияларда ишлаш барқарорлигини баҳолаш имконини берди. Тайёрланган панел намуналарининг Real-Time PCR ёрдамида текшириш натижалари 1-жадвалда келтирилган.

Таҳлил натижаларига кўра, барча панел намуналарида HDV РНК муваффақиятли аниқланди, манфий назорат намунасида эса амплификация кузатилмади. Ct қийматлари 15,37±0,55 дан 29,08±0,60 гача ўзгарди ва вирус юкламаси ортиши билан Ct қийматларининг босқичма-босқич камайиши кузатилди. Ҳар бир логарифмик концентрация ошиши Ct қийматларининг камайиши билан ифодаланди, бу эса қўлланилган тест тизимининг юқори аналитик сезгирлигини тасдиқлади.

Такрорий таҳлиллар натижасида барча панел намуналарида стандарт оғишнинг паст бўлиши тайёрланган аликвоталарнинг ўзаро юқори даражада бир хил эканлигини кўрсатди. Бу ҳолат гомогенизация босқичининг тўғри бажарилганлиги ҳамда вирус заррачаларининг намуналар бўйича тенг тақсимланганлигини тасдиқлайди. Паст дисперсия қийматлари панелнинг узок муддат лаборатория ички сифат назоратида фойдаланиш имкониятини ҳам кўрсатади.

Панел намуналарида аниқланган ўртача вирус юкламалари аксарият ҳолларда олдиндан белгиланган номинал диапазонларга мос келди.

Фақат айрим намуналарда кузатилган кичик тафовутлар Real-Time PCR усулининг аналитик хусусиятлари, стандарт эгри чизигининг математик модели ҳамда намуналарни кетма-кет суюлтириш жараёнидаги минимал техник фарқлар билан изоҳланиши мумкин. Шунга қарамай, ушбу тафовутлар диагностик жиҳатдан муҳим чегарадан ошмади ва референс панелнинг амалий қўлланилишига салбий таъсир кўрсатмади.

Назорат намуналари ҳам кутилган натижаларни берди. Позитив назоратларда амплификация барқарор қайд этилди, микдорий назорат намунасида Ct қийматларининг ўзгарувчанлиги минимал бўлди, манфий назорат намунасида эса амплификация кузатилмади. Бу эса таҳлил давомида контаминация юз бермаганлигини ва қўлланилган методиканинг юқори ишончлилигини тасдиқлайди.

Умуман олганда, олинган натижалар ишлаб чиқилган маҳаллий HDV референс панели лаборатория ички сифат назорати, диагностик тест тизимларини валидация қилиш, янги реагентларни баҳолаш ҳамда лабораториялараро сифат назорати дастурларида фойдаланиш учун зарур аналитик хусусиятларга эга эканлигини кўрсатди.

Муҳокама. Мазкур тадқиқотда HDV РНК-сини аниқлаш учун Real-Time PCR усулига асосланган маҳаллий референс панел яратилди ва унинг аналитик хусусиятлари баҳоланди. Олинган натижаларга кўра, вирус юкламаси ортиши билан Ct қийматларининг изчил камайиши кузатилди. Жумладан, паст вирус юкламасига эга D1 намунасида Ct қиймати 29,08±0,60 ни ташкил этган бўлса, юқори вирус юкламасига эга D11 намунасида ушбу кўрсаткич 15,37±0,55 гача камайди. Бу ҳолат Real-Time PCR усулининг назарий та-

мойилларига мос келиб, ишлаб чиқилган референс панелнинг вирус концентрациясини ишончли акс эттиришини кўрсатади. Шунингдек, панел намуналарида *Ct* қийматларининг стандарт оғиши паст бўлиши усулнинг юқори такрорланувчанлиги ва аналитик барқарорлигини тасдиқлади. Бундай натижалар ишлаб чиқилган референс панел лаборатория ички сифат назорати ҳамда диагностик тест тизимларини валидация қилишда қўллаш учун яроқли эканлигини кўрсатади.

Олинган натижалар халқаро тадқиқотлар билан ҳам мос келади. Хусусан, Le Gal ва ҳаммуаллифлар томонидан ўтказилган халқаро ташқи сифат баҳолаш дастурида турли лабораториялар ўртасида HDV РНК миқдорини аниқлаш натижаларида сезиларли тафовутлар мавжудлиги аниқланган ҳамда стандартлаштирилган назорат материалларини ишлаб чиқиш зарурлиги таъкидланган [6].

Бизнинг тадқиқотимизда яратилган референс панелнинг юқори такрорланувчанлиги ушбу муаммони бартараф этишга хизмат қилувчи маҳаллий назорат материалларини яратиш имкониятини намоёниш этди. Бундан ташқари, *Ct* қийматларининг паст дисперсияси ва натижаларнинг барқарорлиги Scholtes ва ҳаммуаллифлар томонидан Real-Time PCR усулларининг аналитик хусусиятлари бўйича келтирилган маълумотлар билан ҳам мос келади [9]. Бу ишлаб чиқилган панелнинг диагностик амалиётда қўллаш учун етарли аналитик ишончликка эга эканлигини кўрсатади. Маҳаллий референс панелни ишлаб чиқишнинг муҳим афзалликларидан бири импорт қилинадиган назорат материалларига бўлган қарамликни камайтириш, лаборатория диагностикасининг иқтисодий самарадорлигини ошириш ҳамда миллий миқёсда лабораториялараро натижаларни стандартлаштириш имконини яратишидир.

Шу сабабли ишлаб чиқилган маҳаллий референс панел HDV молекуляр диагностикасида сифат назоратини такомиллаштириш ва миллий диагностика тизимини ривожлантиришда амалий аҳамиятга эга деб ҳисобланади. Шунингдек тадқиқотнинг бир нечта чекловлари мавжуд бўлиб, улар: клиник намуналар сонининг чекланганлиги, тадқиқотнинг фақат лаборатория шароитида олиб борилганлиги ҳамда халқаро стандартлар билан тўлиқ валидация қилинмаганлигидир.

Хулоса. Мазкур тадқиқотда гепатит делта вируси (HDV) диагностикаси учун Real-Time PCR усулига асосланган маҳаллий референс панел муваффақиятли ишлаб чиқилди ва унинг аналитик хусусиятлари баҳоланди. Ўтказилган таҳлиллар натижасида тайёрланган панел намуналари 10^2 – 10^7 IU/ml вирус юкламаси диапазонини қа-

мраб олиши ҳамда ушбу ораликда HDV РНКсини барқарор ва ишончли аниқлаш имкониятига эга эканлиги тасдиқланди.

Тадқиқот давомида вирус юкламаси ортиши билан *Ct* қийматларининг қонуниятли равишда камайиши кузатилди, бу эса Real-Time PCR усулининг назарий тамойилларига мос келишини ва ишлаб чиқилган референс панелнинг аналитик хусусиятлари юқори даражада эканлигини кўрсатди. Барча панел намуналарида *Ct* қийматларининг стандарт оғиши паст бўлгани методнинг яхши такрорланувчанлиги ва натижаларнинг юқори ишончлилигини тасдиқлади.

Яратилган референс панел лаборатория ички сифат назоратини ташкил этиш, диагностик тест тизимларини валидация қилиш, лабораториялараро натижаларни таққослаш ҳамда молекуляр диагностика натижаларининг стандартлаштирилишини таъминлаш учун самарали назорат материали сифатида қўлланиши мумкин. Шунингдек, ушбу панел HDV РНКсини миқдорий аниқлашда лаборатория фаолиятининг барқарорлиги ва натижаларнинг қайта тикланувчанлигини оширишга хизмат қилади.

Маҳаллий референс материални ишлаб чиқиш импорт қилинадиган назорат материалларига бўлган эҳтиёжни камайтириш, диагностика харажатларини оптималлаштириш ҳамда миллий молекуляр диагностика тизимининг мустақиллигини таъминлаш нуқтаи назаридан муҳим амалий аҳамиятга эга. Бундай ёндашув республика лабораторияларида сифат менежменти тизимини такомиллаштириш ва замонавий молекуляр диагностика усулларини кенг жорий этишга хизмат қилади.

Шу билан бирга, тадқиқот айрим чекловларга эга. Хусусан, референс панел чекланган миқдордаги клиник намуналар асосида шакллантирилди ва унинг аналитик хусусиятлари битта лаборатория шароитида баҳоланди. Келгусида панелни кўпроқ клиник намуналар ҳисобига кенгайтириш, турли HDV генотипларини қамраб олувчи материаллар билан бойитиш, лабораториялараро синовлардан ўтказиш ҳамда халқаро стандартлар талабларига мувофиқ валидация қилиш мақсадга мувофиқдир.

Умуман олганда, олинган натижалар ишлаб чиқилган маҳаллий HDV референс панелининг Real-Time PCR асосидаги молекуляр диагностикада ишончли назорат материали сифатида фойдаланиш имкониятини тасдиқлайди. Мазкур ишланма HDV лаборатория диагностикасининг сифати ва стандартлаштирилишини ошириш, шунингдек, Ўзбекистон Республикасида вирусли гепатитлар диагностикаси тизимини янада такомиллаштиришга хизмат қилиши мумкин.

Адабиётлар:

1. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Molecular Diagnostic Methods for Infectious Diseases. MM03. 3rd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
2. European Association for the Study of the Liver (EASL). *Clinical Practice Guidelines on hepatitis B and hepatitis D*. J Hepatol. 2023.
3. Farci P, Niro GA. Clinical features of hepatitis D. *Semin Liver Dis*. 2012;32(3):228–236.
4. Hughes SA, Wedemeyer H, Harrison PM. Hepatitis delta virus. *Lancet*. 2011;378(9785):73–85. doi:10.1016/S0140-6736(10)61931-9.
5. ISO 15189:2022. *Medical laboratories — Requirements for quality and competence*.
6. Le Gal F, Brichler S, Sahli R, et al. First international external quality assessment for hepatitis delta virus RNA quantification in plasma. *Hepatology*. 2016;64(5):1483–1494. doi:10.1002/hep.28772.
7. Pawlotsky JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology*. 2002;122(6):1554–1568. doi:10.1053/gast.2002.33428.
8. Rizzetto M. Hepatitis D Virus: Introduction and Epidemiology. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(7):a021576. doi:10.1101/cshperspect.a021576.
9. Scholtes C, Icard V, Amiri M, et al. Standardized one-step real-time reverse transcription-PCR assay for universal detection and quantification of hepatitis delta virus from clinical samples in the presence of a heterologous internal-control RNA. *J Clin Microbiol*. 2012;50(6):1942–1949. doi:10.1128/JCM.06829-11.
10. Stockdale AJ, Kreuels B, Henrion MYR, et al. The global prevalence of hepatitis D virus infection: Systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*. 2020;73(3):523–532. doi:10.1016/j.jhep.2020.04.008.
11. Taylor JM. Hepatitis delta virus biology and replication. *Viruses*. 2020;12(6):648.
12. Wedemeyer H, Manns MP. Epidemiology, pathogenesis and management of hepatitis D. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2023.
13. World Health Organization. *Global Hepatitis Report 2024*. Geneva: World Health Organization; 2024.

14. World Health Organization. *Guidance on external quality assessment schemes for molecular testing*. Geneva: WHO; 2021.

World Health Organization. *Recommendations for hepatitis B and D testing services*. Geneva: WHO; 2024.

СОЗДАНИЕ ЛОКАЛЬНОЙ РЕФЕРЕНС-ПАНЕЛИ НА ОСНОВЕ ПЦР ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА ГЕПАТИТА D И ЕЁ ЗНАЧЕНИЕ В ОБЕСПЕЧЕНИИ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Турсунова Ш.А., Жураев Р.Х., Кан Н.Г.,
Суяркулова Д.Т.

Резюме. В данном исследовании изучена возможность создания локальной референс-панели на основе полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Real-Time PCR) для выявления РНК вируса гепатита D (HDV). В ходе исследования были отобраны клинические образцы, положительные по РНК HDV, стандартизированы по вирусной нагрузке и использованы для формирования контрольных материалов с различными уровнями концентрации. Аналитические характеристики подготовленной референс-панели были оценены с использованием метода Real-Time PCR на платформе Rotor-Gene Q (QIAGEN). Каждый образец исследовали в трех параллельных повторях, а результаты анализировали на основании значений *Ct* (Cycle Threshold) и показателей вирусной нагрузки. Полученные результаты показали снижение значений *Ct* по мере увеличения концентрации вируса, что свидетельствует об обратной зависимости между вирусной нагрузкой и порогом амплификации. Низкая вариабельность значений *Ct* в подготовленных панельных образцах подтверждает высокую воспроизводимость ПЦР-анализа. Результаты исследования подтвердили возможность создания локальной референс-панели для диагностики HDV, обеспечивающей контроль качества, оценку эффективности лабораторных методов и их стандартизацию в условиях местных лабораторий.

Ключевые слова: вирус гепатита D, HDV, ПЦР, Real-Time PCR, референс-панель, контроль качества, молекулярная диагностика.