Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю, Пленум Асоціації інфекціоністів України і нарада завідувачів кафедр інфекційних хвороб вищих медичних навчальних закладів III-IV рівнів акредитації

“ТРУДНОЩІ ДІАГНОСТИКИ І ТЕРАПІЇ ІНФЕКЦІЙНИХ ХВОРОБ”

19-20 травня 2011 року, м. Суми

ПРОБЛЕМЫ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ГЕПАТИТА С

д.мед.н., проф. А.Л. Гураль
д.мед.н. Т.А. Сергеева
д.мед.н. В.Р. Шагинян

ГУ “Институт эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л.В. Громашевского НАМНУ”

Вирусом гепатита С инфицированы от 500 млн. до 1 млрд. людей. Фактически, в настоящее время в мире наблюдается пандемия гепатита С, которая по своим масштабам в 5 раз превышает распространение ВИЧ-инфекции

У 70-85% инфицированных HCV развивается хронический гепатит – основная клиническая форма этой болезни. Диагноз гепатита С чаще устанавливают на этапе сформировавшегося хронического гепатита или цирроза печени.

В последние годы в странах ЕС были предприняты инициативы, направленные на повышение «настороженности» в плане вирусных гепатитов. В 2006 г. в Европейском парламенте было определено, что процесс гармонизации систем надзора за вирусными гепатитами в ЕС – одно из приоритетных направлений деятельности *European Centre for Disease Prevention and Control – ECDC*.

М.С.Балаян, М.И.Михайлов, 2000; J.H. Kao, D.S. Chen, 2002; D. Lavanchy, 2004; J. Alexander, K.V. Kowdley, 2006-2008; A. Craxi, 2003; A.-M. Giroud-Robert 2004; G.L. Atmstrong et al., 2006-2008; ECDC, 2008; P. Marcellin, 2009

ИЭИБ

Основные проблемы специфической диагностики гепатита С

- Отсутствие нормативной базы в отношении проведения обследований на специфические маркеры HCV-инфекции различных групп населения;
- Отсутствие в широкой лабораторной практике (и в первую очередь в службе крови) молекулярно-биологических методов исследования; коммерциализация этой сферы лабораторных услуг;
- Отсутствие регламентированной унифицированной стратегии специфической диагностики HCV-инфекции и соответствующего алгоритма проведения первичных (скрининговых) и подтверждающих исследований на наличие серологических и генетических маркеров инфицирования в зависимости от целей и задач исследования;
- Недостаточный охват тестированием различных групп населения.

ИЭИБ

Нормативная база в отношении проведения специфических обследований на маркеры инфицирования HCV ограничивается Приказом МЗ Украины 106 «Про обстеження донорів на гепатит С» (1994), № 385 «Про інфекційну безпеку донорської крові та її компонентів» (2005) и Приказом Минобороны Украины № 402 (2008)

Основные контингенты, подлежащие регламентированным обследованиям	ВИЧ-инфекция	Гепатит В	Гепатит С
Доноры крови, органов, тканей, клеток и др.	+	+	+
Беременные	+	+	
Реципиенты крови и ее компонентов	+	+	
Медицинские работники с профессиональным риском	+	+	
Пациенты с высоким риском инфицирования	+	+	
Больные с хроническими поражениями печени		+	
Дети детских домов и специнтернатов		+	
Лица с ИППП	+	+	
Потребители инъекционных наркотиков	+	+	
Лица с рискованным сексуальным поведением	+		
Лица, имевшие сексуальные контакты с инфицированными	+		
Призывники	+	+	+
Дети, рожденные инфицированными матерями	+	+	
Лица, находящиеся в местах лишения свободы	+		
Лица, обратившиеся с профилактической целью (здоровые)	+		

ИЭИБ

Результаты обследований на серологические маркеры гепатита С некоторых групп населения в 2008-2009 гг. (ЦСЭС)

Контингенты обследованных лиц	2008		2009	
	n	Анти-HCV	n	Анти-HCV
• Больные острым вирусным гепатитом	15471	3029 / 19,6%	13052	2386 / 18,3%
• Больные с хроническими заболеваниями печени	59194	10092 / 17,0%	62371	8941 / 14,3%
• Больные с заболеваниями ЖКТ	24240	2018 / 8,3%	28367	1977 / 7,0%
• Другие больные	90576	12862 / 14,2%	95911	11654 / 12,1%
• Контактные лица	27987	1336 / 4,8%	5906	645 / 10,9%
• Переболевшие вирусными гепатитами	7293	1403 / 19,2%	9542	1675 / 17,6%
• Беременные	137976	4937 / 3,6%	165362	4223 / 2,6%
• Дети детских домов и специнтернатов	7224	446 / 6,2%	6589	498 / 7,6%
• Медработники	74034	3027 / 4,1%	73466	2707 / 3,7%
• Больные, длительно находившиеся на стационарном лечении	36968	4247 / 11,5%	33968	3660 / 10,8%
• Больные наркодиспансеров	7484	2651 / 35,4%	9141	3309 / 36,2%
• Больные вензаболеваниями	12446	1646 / 13,2%	10775	859 / 8,0%
Всего проведено исследований	1167032	68943 / 5,9%	1279817	61534 / 4,8%

В 2008 г. официально зарегистрировано 873 случая острого ГС,
В 2009 г. – 964, в 2010 г. – 786 случаев

ИЭИБ

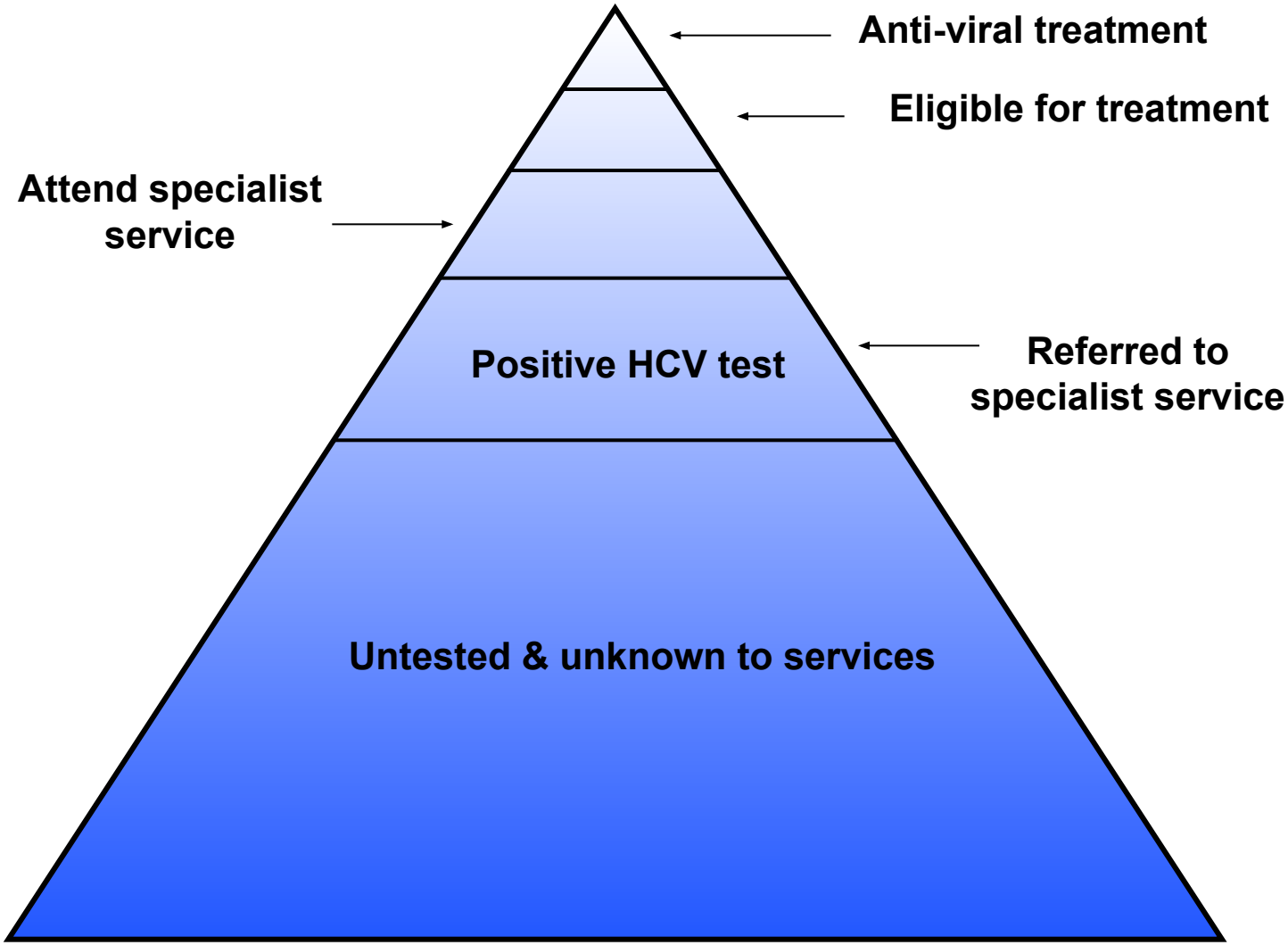
Распространение гепатита С в различных группах населения

А.Л. Гураль, В.Ф. Мариевский, 2006-2010; Т.А. Сергеева, 2008; О.Н. Рубан, 2010

Группы обследованных	N	Выявлены анти-HCV	
		Абс.	% ± m_p
Группы медицинского риска			
Пациенты неинфекционных ЛПУ, * в том числе:	2368	119	5,0 ± 0,4
- с хроническими заболеваниями печени	716	75	10,4 ± 1,6
- с хроническими заболеваниями желчных путей и поджелудочной железы	671	44	6,6 ± 1,0
Медицинские работники	2253	75	3,3 ± 0,4
Группы поведенческого риска			
Инъекционные потребители наркотиков	1429	879	61,5 ± 1,3
ВИЧ-инфицированные лица	1211	646	53,3 ± 1,4
Работники коммерческого секса	1606	495	30,8 ± 1,2
Лица с инфекциями, передаваемыми половым путем,	1274	164	12,9 ± 0,9
* в том числе: больные сифилисом	151	65	43,0 ± 4,1
Группы сравнения			
Доноры крови	*1186*	*16*	*1,3 ± 0,3*
Беременные	*900*	*28*	*3,1 ± 0,6*

The disease iceberg for Hepatitis C

(J. Parkes, P. Roderick, B. Bennett-Lloyd, and W. Rosenberg, BMC Public Health. 2006)



ИЭИБ

Специфические лабораторные обследования

- ***Диагностические исследования*** направлены на установление и/или верификацию диагноза; их необходимо осуществлять при подозрении (или с целью исключения) острого или хронического инфекционного процесса гепатита В и гепатита С.
- ***Обследования по эпидемическим показаниям*** направлены на расследование вспышек, оценку эффективности противоэпидемических и профилактических мероприятий, проводятся с целью сероэпидемиологических исследований. Эпидемическими показаниями также являются: возникновение единичных или групповых заболеваний в ЛПУ, детских дошкольных, специализированных заведениях, других организованных коллективах, в семейных очагах инфекции, в окружении больных острыми или хроническими вирусными гепатитами, вирусоносителей; при возможном профессиональном инфицировании и в ряде других случаев.
- ***Профилактические обследования*** должны распространяться на определенные группы лиц, к числу которых относятся: доноры крови, костного мозга, органов и тканей; беременные; медицинские работники и целый ряд других контингентов.
- ***Целевые обследования***, направленные на обеспечение потребностей дозорного эпидемиологического надзора, который основывается на систематическом сборе и анализе данных об особенностях развития эпидемического процесса в выборочных группах населения (дозорных, целевых, фокусных) с целью раннего выявления случаев заболевания в группах риска или же для получения индикаторных показателей в отношении тенденций развития эпидемического процесса в конкретных популяциях.

ИЭИБ

Контингенты обследуемых лиц / цели обследования

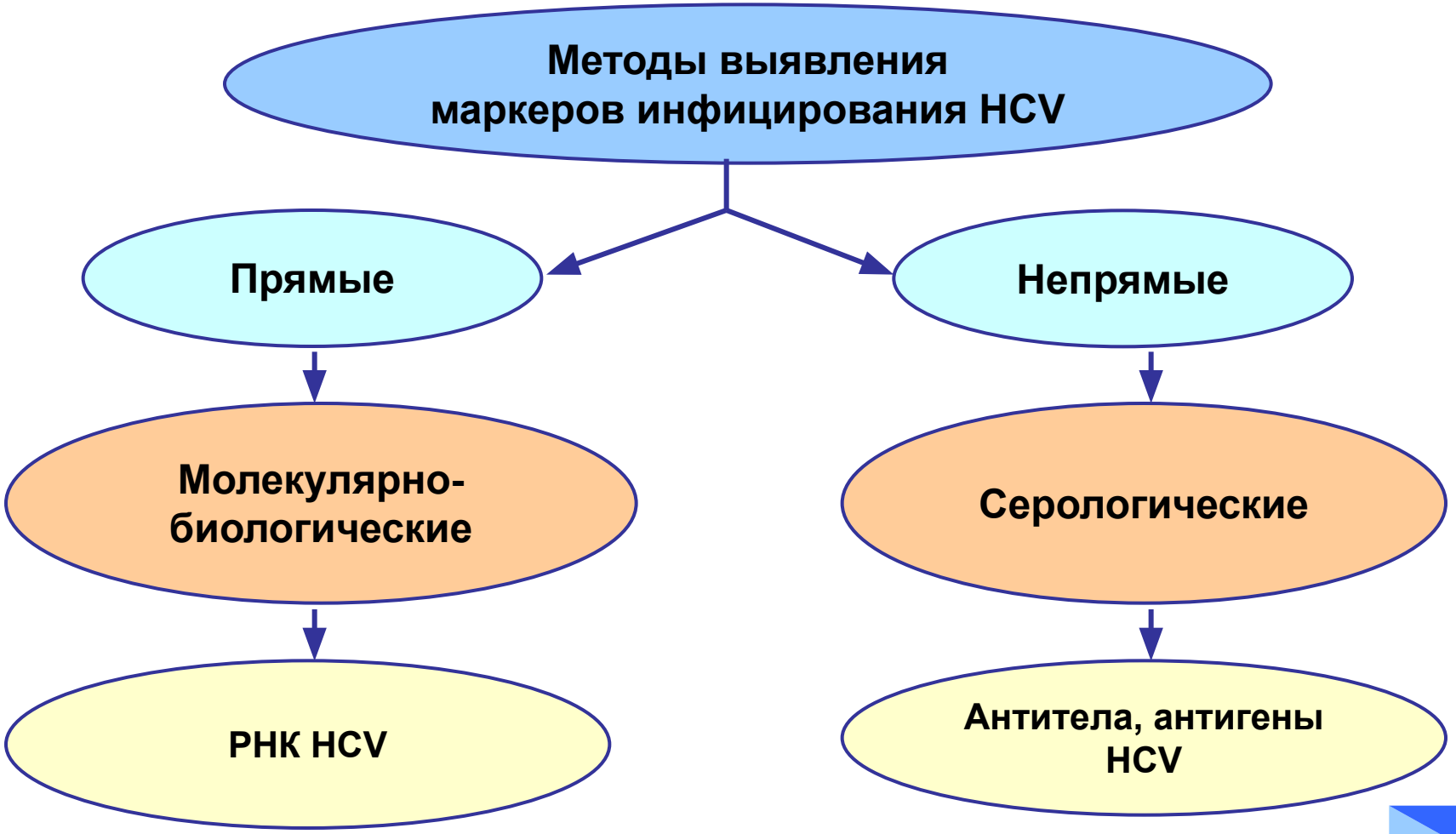
Диагностические	По эпидпоказаниям	Профилактические
- Больные с патологией гепатобилиарной системы; - Дети, рожденные инфицированными матерями; - Пациенты с патологией, которая может указывать на внепеченочные проявления вирусных гепатитов; - Лица, у которых наблюдалось повышение активности аминотрансфераз и любого происхождения и др.	- При вспышках, единичных или групповых заболеваниях ВГ; - Лица в окружении больных острыми, хроническими ВГ, вирусоносителей	- Доноры, беременные; - Исследования при определении напряженности иммунитета против ГВ.
	- Доноры и реципиенты инфицированной крови; - Медицинские работники; - Дети и персонал специализированных учреждений; - Лица с высоким медицинским риском инфицирования HBV и HCV; - Персонал и спецконтингенты учреждений пенитенциарной системы и др.	

- Больные, госпитализированные в отделения гемодиализа; пациенты, подвергающиеся частым трансфузиям крови и / или ее препаратов, курсам инъекционной терапии; длительно и часто болеющие;
- Пациенты с врожденными или приобретенными иммунодефицитами любого генеза;
- Пациенты кожно-венерологических диспансеров;
- Больные туберкулезом, онкологическими заболеваниями, с хроническими поражениями различных органов и систем;

ИЭИБ

Специфическая диагностика гепатита С

- выявление диагностических маркеров инфицирования: антигенов, антител, генетического материала вируса с помощью современных серологических и молекулярно-биологических методов исследования.

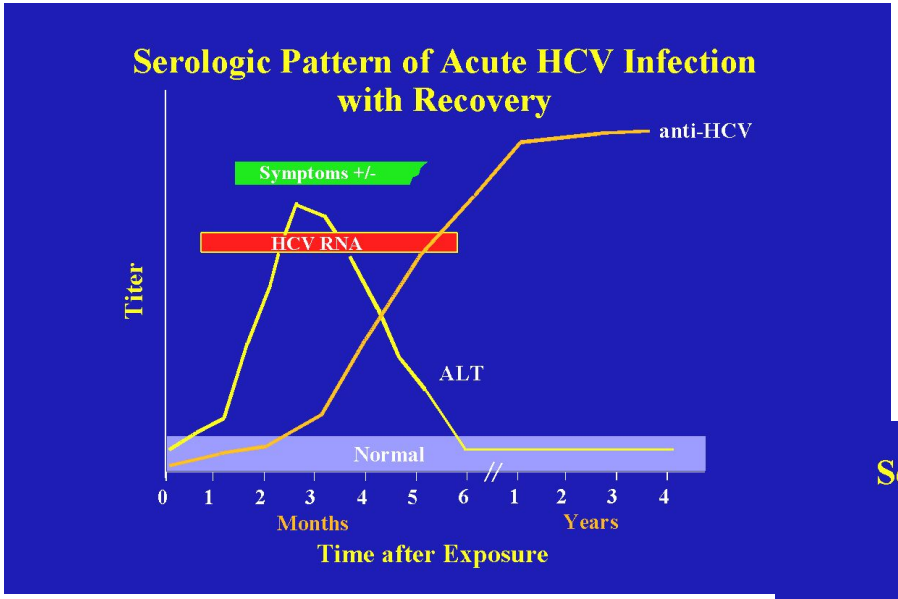


ИЭИБ

Серологические методы исследования

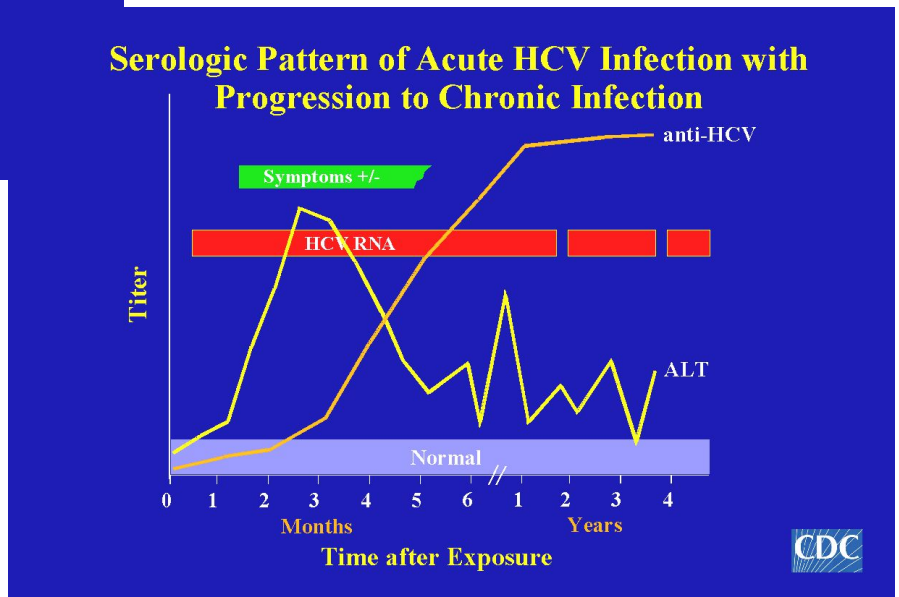
- применяются как при первичном скрининге, так и в диагностике HCV-инфекции.

- Первичные скрининговые тесты (главным образом, ИФА);
- Дополнительные аналитические тесты (ИБ);
- Исследования, направленные на серологическое определение генотипа вируса («серотипирование»).



- **При остром гепатите С специфические антитела могут быть определены у 50-70 % пациентов в начале симптоматической фазы.**
- **В среднем, сероконверсия определяется в сроки от 8 до 12 недель от момента инфицирования, (это время может варьировать от 5 до 50 недель).**

- **Промежуток времени, предшествующий сероконверсии – период «окна» (серонегативное, латентное, инфекционное, диагностическое окно).**



ИЭИБ

Возможные причины ложно-положительных и ложно-отрицательных результатов выявления анти-HCV:

***Ложно-положительные*:**

- Неспецифическое связывание иммуноглобулинов сыворотки крови с компонентами иммуносорбента тест-системы;
- Повышенный уровень гамма-глобулина в сыворотке (у больных с ревматизмом, некоторыми злокачественными заболеваниями и т. п.);
- Аутоиммунные заболевания, заболевания соединительной ткани;
- Некоторые инфекционные болезни (гепатит В, туберкулез и др.);
- Следствие иммунизации; беременность и др.
- Проведение исследования в популяции с низкой распространенностью HCV-инфекции.

***Ложно-отрицательные*:**

- У лиц с иммуносупрессией (у ВИЧ-инфицированных, реципиентов трансплантатов солидных органов, при гипо- и агаммаглобулинемии, у пациентов, находящихся на гемодиализе.

Частота ложно-положительных результатов при выявлении анти-HCV среди различных групп обследованных лиц

Пациенты амбулаторно-поликлинического отделения	0,6%
Беременные	1,4%
Медицинские работники	1,6%
ВИЧ-инфицированные лица	1,6%
Потребители инъекционных наркотиков	2,5%
Пациенты кожно-венерологического диспансера	2,7%
Пациенты гастроэнтерологических отделений	2,8%
Онкологические больные	5,4%
Больные на гемодиализе	6,2%

ИЭИБ

Конфирматорные подходы, подтверждающие присутствие анти-HCV

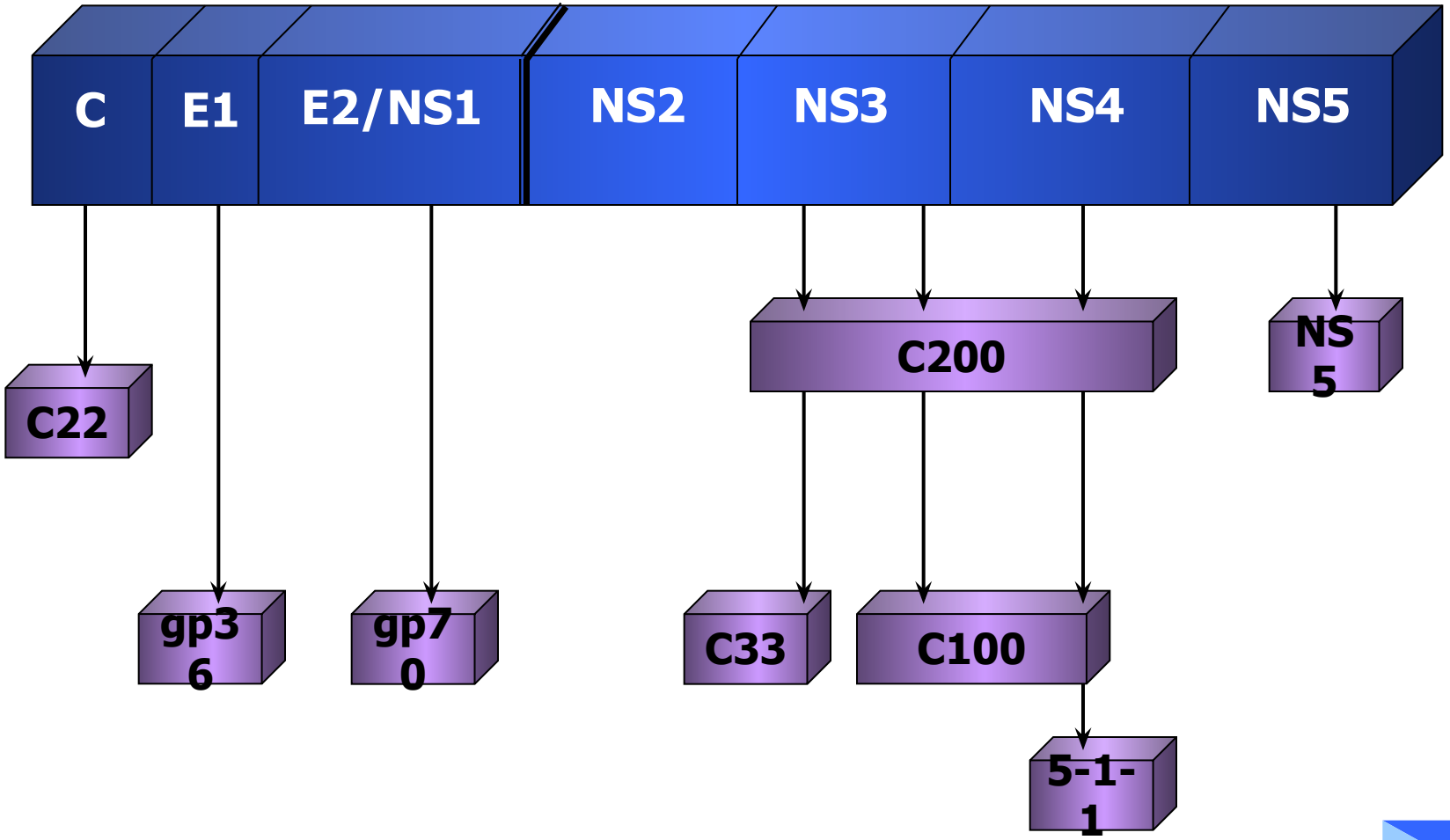
- Повторное тестирование реактивных образцов в той же самой тест-системе ИФА
- Перестановка позитивного образца в другом, альтернативном тесте ИФА
- Исследование методом ИБ
- Определение антител к отдельным белкам вируса в формате ИФА
- NAT тесты для выявления РНК ВГС (но они не могут рассматриваться как истинно конфирматорные тесты)

- В идеале, все первично реактивные образцы необходимо повторно исследовать при помощи более специфичных тестов.

- Верификация присутствия анти-HCV минимизирует ненужные посещения медицинских учреждений и психологическую травму для людей с ложно-положительными результатами тестирования

ИЭИБ

СХЕМА ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОМА ВИРУСА ГЕПАТИТА С



ИЭИБ

Благоприятные и неблагоприятные признаки выявления антител к структурным и неструктурным белкам HCV

Благоприятные признаки	
Анти-HCV core IgM	Отсутствие в сыворотке после 1-го мес. болезни
Анти-NS4 IgM	Исчезновение после 7-го мес.; низкий уровень через 1 мес.
Анти-NS5 IgM	Отсутствие в сыворотке
Анти-HCV core IgG	Быстрое нарастание уровня в течение первых 72 дней с максимальным показателем в период 72-120 дней и последующий спад до полного исчезновения до 10-13 мес.
Анти-NS4 IgG	Снижение уровня через 8 мес. или раньше
Анти-NS5 IgG	Минимальный уровень, особенно после 1 мес. болезни
Неблагоприятные признаки	
Анти-HCV core IgM	Присутствие в сыворотке после 1 мес. болезни
Анти-NS4 IgM	Появление после 7 мес. болезни; относительно высокий уровень после 1 мес.
Анти-NS5 IgM	Присутствие в сыворотке крови
Анти-HCV core IgG	Постепенное нарастание уровня в течение первых 6-7 мес. инфекционного процесса и быстрое нарастание концентрации после 6-7 мес. с достижением максимальных значений к 8-12 мес.
Анти-NS4 IgG	Присутствие в сыворотке после 8 мес. болезни
Анти-NS5 IgG	Высокий и относительно высокий уровень

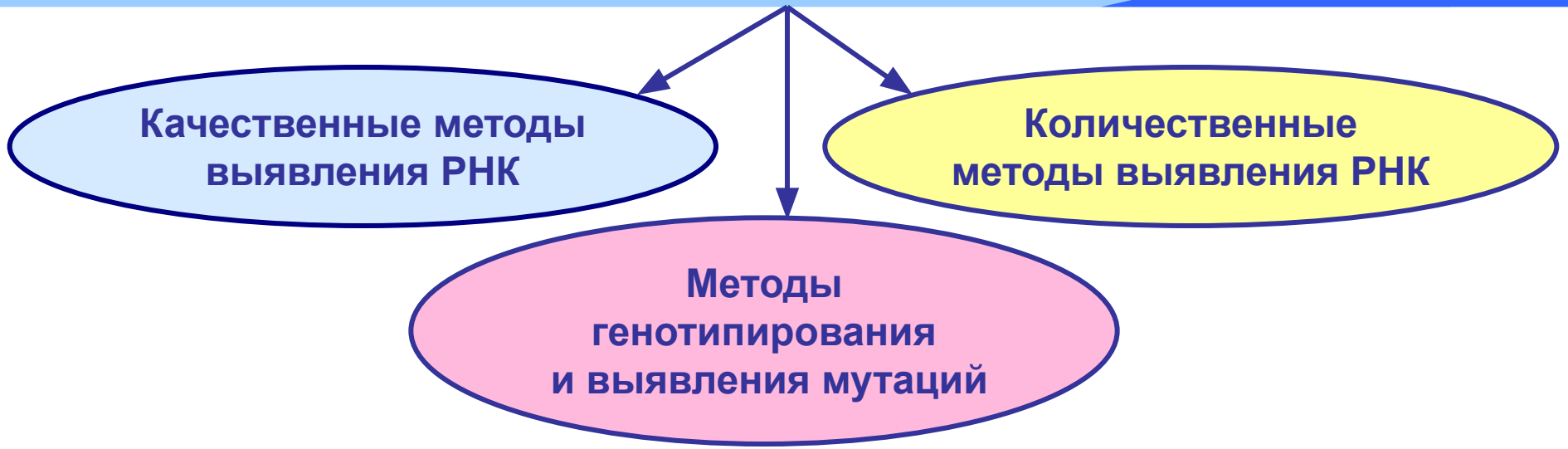
Варианты интерпретации результатов выявления антител к ВГС

Анти-HCV (суммарные)	•Острый гепатит С •Хронический гепатит С •паст-инфекция
Анти-HCV core IgM + Анти-HCV core IgG	• Острый гепатит С • Переход в латентную фазу хронического ГС
Анти-HCV core IgG + антитела к неструктурным белкам	• Начало выздоровления • Латентная фаза хронического ГС
Анти-HCV core IgM + Анти-HCV core IgG + антитела к неструктурным белкам	• Острый гепатит С • Обострение в латентную фазу хронического ГС • Реактивация хронического гепатита С

- **Коррелирует с присутствием анти-HCV core IgM и обнаружением РНК вируса в сыворотке крови и составляет от 77 % до 92 %.**
- **Анти-HCV core IgM обнаруживаются в сыворотке крови 50-93 % пациентов с острым и 50-70 % больных хроническим гепатитом С.**
- **Присутствие анти-NS3, анти-NS4, анти-NS5 коррелирует с наличием вирусной РНК.**
- **Антитела к антигенам NS4 могут свидетельствовать о перенесенной инфекции; косвенно подтверждать активность репликации ВГС при хроническом гепатите С; свидетельствовать о начале хронизации процесса у больных острым ГС.**

ИЭИБ

Молекулярно-биологические методы диагностики



- *Ранняя и эффективная диагностика*
- *Подтверждение результатов скрининга*
- *Прогноз течения и исходов заболевания*
- *Определение показаний к терапии*
- *Выбор оптимальной тактики лечения*
- *Предсказание эффективности специфической терапии*
- *Мониторинг эффективности терапии*
- *Оценка устойчивости ответа на терапию*

HCV РНК может быть определена через 2 недели от момента инфицирования HCV

ИЭИБ

Возможные причины ложных результатов выявления РНК HCV

- Утрата или разрушение нуклеиновых кислот вируса во время подготовки образцов;
- Наличие в исследуемом материале различных химических или белковых субстанций, которые могут служить ингибиторами для отдельных компонентов ПЦР;
- Концентрация НК у обследуемого лица может быть ниже предела чувствительности используемого метода и т.д.;
- Контаминация: между пробами, положительным контрольным образцом, ампликонами;
- Оккультная HCV-инфекция.

Оккультная HCV-инфекция – присутствие РНК HCV на уровнях, которые повторно не обнаруживаются в сыворотке или плазме крови при текущих клинико-лабораторных исследованиях, но обнаруживаются в мононуклеарах периферической крови и / или тканях печени с помощью молекулярных методов исследования более высокой чувствительности. В большинстве случаев состояние оккультного гепатита С сопровождается наличием анти-HCV (вместе с тем, отсутствие этих антител не исключает оккультную инфекцию).

Pham TNQ, MacParland SA, Mulrooney PM et al., 2004;
Radkowski M, Gallegos-Orozco JF, Jablonska J et al., 2005;
Castillo I, Rodriguez-Inigo E, Lopez-Alcorocho JM, Pardo M, 2006;
Pham TNQ, Mulrooney-Cousins PM, Mercer SE et al., 2007; Blackard JT, Kemmer N, Sherman KE, 2006

ИЭИБ

Интерпретация результатов исследования

Анти-HCV	РНК HCV	Интерпретация
+	+	Острая или хроническая HCV-инфекция, в зависимости от клинических проявлений.
+	-	Разрешение HCV-инфекции; острая HCV-инфекция в период низкой виремии или транзиторного клиренса; хронический гепатит С с флуктуациями уровня РНК; ингибиция РНК вируса вследствие различных причин; уровень РНК у обследуемого лица ниже порога чувствительности примененного метода; ложно-положительный результат ИФА; ложноотрицательный результат ПЦР; оккультная HCV-инфекция.
-	+	Ранний период острой HCV-инфекции (*период «серонегативного окна»*); хроническая HCV-инфекция у пациентов с иммунодефицитом; инфицирование «редкими» генотипами HCV; ложно-отрицательный результат ИФА; ложно-положительный результат на РНК HCV
-	-	Отсутствие HCV-инфекции

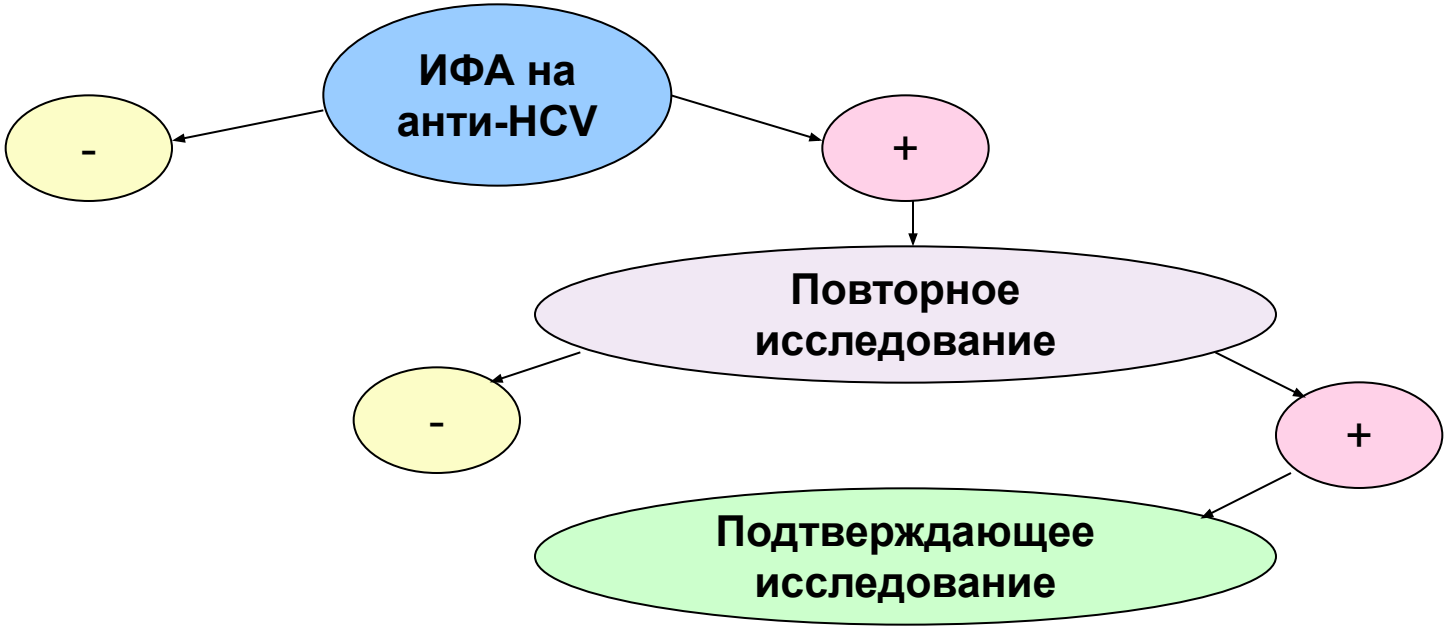
ИЭиБ

Диагностическая значимость специфических маркеров инфицирования ВГС

(М.И.Михайлов, 2001)

Маркер	Скрининг в службе крови	Подтвер-ждение резуль-татов	Диагно-стика	Мониторинг терапии	Прогноз эффекти-вности терапии	Эпидемио-ологичес-кие иссле-дования
Анти-HCV	+		+			+
Спектр (антитела к отдельным белкам HCV)		+	+	+	+	
Анти-HCV core IgM		+	+	+	+	
Анти-HCV core IgG	+	+	+	+	+	+
РНК HCV	+	+	+	+		+
РНК HCV *количество*				+	+	
Генотип					+	+
Серотип					+	+

Примерный алгоритм тестирования



1. Предварительная оценка степень риска инфицирования пациента.
2. Первоначально показано исследование на наличие анти-HCV.
3. Определение HCV RNA рекомендуется:

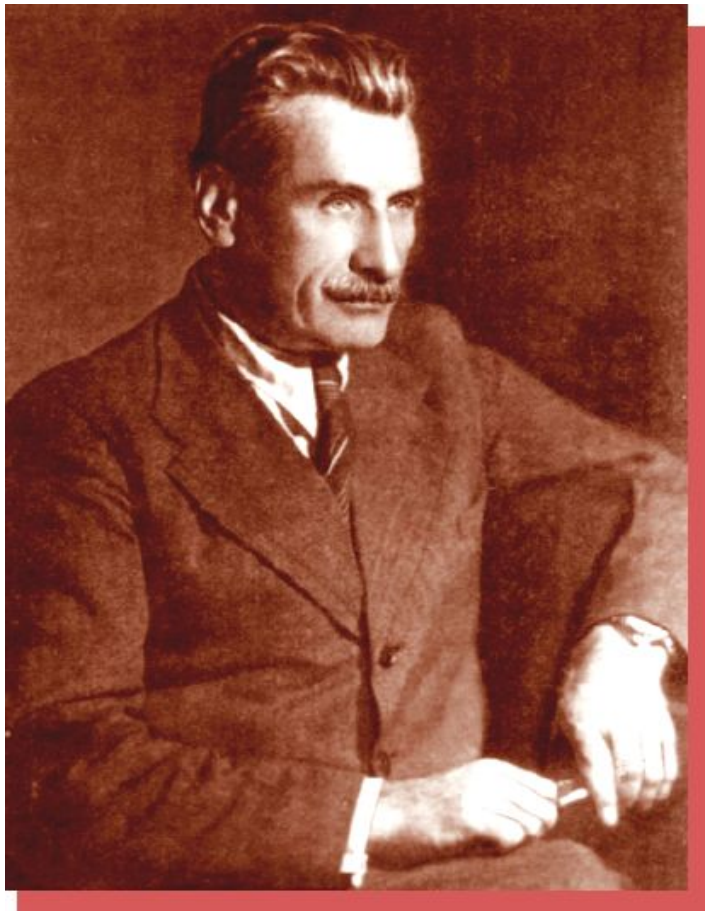
а) позитивный результат ИФА на анти-HCV;

б) планирование противовирусная терапии (количественная ПЦР для определения исходного значения вирусной нагрузки);

в) при иммуносупрессии, признаках заболевания печени, подозрении на острый гепатит С и негативных результатах обнаружения анти-HCV

4. Определение генотипа HCV – всем пациентам до начала противовирусной терапии (для выбора дозы препаратов, длительности лечения и оценки ожидаемой эффективности).

ИЭИБ



«… Если же сюда добавить и все те хронические состояния здоровья и ограничения трудоспособности, которые являются последствиями перенесенных острых инфекционных болезней, то удельный вес отрицательного значения инфекционной заболеваемости еще более возрастет ...»

Громашевский Л.В. От обороны к нападению // На фронте здравоохранения. – 1931. – № 22. – С. 43-49

ИЭИБ

Спасибо
за внимание !

д.мед.н., проф. А.Л. Гураль, д.мед.н. Т.А. Сергеева, д.мед.н. В.Р. Шагинян
лаборатория эпидемиологии парентеральных
вирусных гепатитов и ВИЧ-инфекции
ГУ “Институт эпидемиологии и инфекционных болезней
им. Л.В Громашевского АМН Украины”
03680, ул. Н. Амосова, 5, г. Киев; тел./факс: (044) 2758333
E-mail: epidemics@ukr.net

ИЭИБ