2/2004

СУЧАСНІ ІНФЕКЦІЇ

На допомогу практичному лікарю

МОЗ повідомляє

Оригінальні дослідження

Випадки з практики

Огляди, лекції

УДК: 616.36 - 002.14-022:578.891-085.03

Специфічна діагностика HCV-інфекції у дорослих

М.Ч. КОРЧИНСЬКИЙ

Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, м. Київ
кафедра інфекційних хвороб, зав. кафедри академік АМН України,
професор Ж.І. Возіанова.

ключові слова:
вірусний гепатит С,
HCV- інфекція, хронічні форми,
специфічна діагностика

Актуальність. Актуальність вдосконалення специфічної діагностики HCV-інфекції обумовлена її швидким зростанням та поширенням у світі з надзвичайно високою частотою негативних наслідків [1, 2, 4].

Політропність збудника хвороби, здатність до ураження інших органів та систем (особливо імунної) в той час, коли ані лабораторних, ані гістоморфологічних ознак патології печінки немає або вони мінімальні, свідчать, що термін "HCV - інфекція" найбільше відповідає особливостям хвороби. Тому саме його ми використали в нашій роботі. Враховуючи можливості використання сучасних методів обстеження на маркери вірусних гепатитів у більшості медичних закладів України, на разі також слід мовити про діагностику саме інфекції, спричиненої вірусом гепатиту С (HCV), а не вірусного гепатиту С (ВГС). ВГС є однією з найпоширеніших форм HCV - інфекції, але зовсім не єдиним її проявом [1, 7].

Необхідність проведення нашого дослідження була зумовлена розмаїттям рекомендацій щодо обстеження хворих із підозрою на ВГС на його специфічні маркери та відомими розбіжностями результатів різних поколінь ІФА, ПЛР [2, 3, 4, 6]. До того ж недостатньо вивчено вплив інших гепатотропних вірусів на вірогідність специфічної діагностики HCV - інфекції [4, 6, 7].

Методи. Нині в Україні найпоширеніші та найдоступніші економічно методи ІФА II покоління [1]. Але їхня чутливість становить лише 92 - 95% [4]. Саме їх ми були вимушені широко застосовувати для первинного виявлення хворих на HCV-інфекцію, одночасно з якісним та напівкількісним варіантами ПЛР (RT PCR). Методи ж ІФА III покоління, підтвердження результатів ІФА за допомогою імуноблотінгу або ІХЛА застосовували вибірково. Їх ми використовували при сумнівних (як позитивних, так і негативних) результатах обстеження на загальні anti - HCV за допомогою ІФА II покоління, а також у випадках їх розходження з результатами визначення RNA HCV у плазмі крові, біоптатах печінки, отриманих за допомогою ПЛР згідно з існуючими рекомендаціями [2, 3, 6].

Для визначення маркерів HCV- інфекції (табл. 1) за допомогою ІФА ми використовували сертифіковані в Україні тест - системи: Bio Rad MONOLISA Anti HCV, Sanofi Pasteur Diagnostic systems Anti HCV, ABBOT Anti HCV, Анти - HCV (Нижній Новгород), ELISE Анти - HCV (Vector Best), ELISE Anti - HCV cor Ag, NS 4, NS5 Ig M (Vector Best), ELISE Anti - HCV cor Ag, NS 4, NS5 Ig G (Vector Best). Кожний з 348 хворих, в яких підозрювали HCV - інфекцію, був обстежений щонайменше двічі за допомогою наведених тест-систем ІФА. Внаслідок розбіжностей результатів ІФА та ПЛР 32 хворих обстежено на загальні

anti - HCV ще й за допомогою імунохемілюмінісцентного аналізу (ІХЛА), більш чутливого та специфічного, ніж ІФА III покоління, на автоматизованому аналізаторі Access.

Слід зазначити, що й вибір ПЛР, як методу генодіагностики HCV - інфекції, був також зумовлений насамперед економічними міркуваннями.

Для діагностики HCV - інфекції за допомогою RT PCR ми використовували тест-системи російського виробництва НПФ "ЛИТЕХ", НПФ "ДНК - технологии". При цьому для оцінки концентрації RNA HCV застосовували метод розведень відповідно до відомих рекомендацій [2]. На жаль, цей метод недостатньо точний, тому що не враховує можливість пригнічення ампліфікації в пробірці з досліджуваним зразком [2, 3]. Але він досить простий й відносно не дорогий, тому переважно саме його ми й використовували у своїй роботі. Для підвищення точності результатів ми застосували автоматичну комп'ютеризовану систему оцінки товщини ліній електрофорезу кінцевих продуктів ампліфікації. Результати порівнювали з внутрішнім контролем. Використовували цифрову камеру, що передавала оптичні сигнали на комп'ютер. Інтенсивність цих сигналів оброблялась математично за допомогою стандартних програм, розроблених фірмою "Литех". Для ампліфікації зразків використовували ампліфікатори Perkin - Elmer 2400 (США) та діагностичні тест-системи виробництва НПФ "Литех". Як зразок для внутрішнього контролю використовували ще й плазму крові, досліджену за допомогою кількісних діагностичних тест - систем "Amplicor HCV monitor kit" ("Roche"). У 20 хворих у динаміці одночасно досліджували вміст RNA HCV в плазмі крові за допомогою як цих тест-систем, так і тест-систем виробництва "Литех" з напівкількісною оцінкою результатів.

Ще у 34 хворих для кількісної оцінки вірусемії використовували визначення вмісту RNA HCV за допомогою кількісних тест-систем " bDNA Quantiplex (Bayer Diagnostics). Результати кількісного тестування за їх допомогою також збігалися з напівкількісним визначенням вірусемії. Але у 2 хворих вони були негативні, на відміну від двох позитивних результатів (при низькій, < 1000 ге /мл, вірусемії), отриманих незалежно у двох різних лабораторіях за допомогою RT PCR і тест-систем виробництва НПФ "Литех". Це підтверджує відомі дані про порівняно меншу чутливість методу з використанням bDNA Quantiplex.

Аналіз отриманих даних заслуговує окремої публікації, але зазначимо, що в цілому результати збігалися і свідчили про можливість використання наведеного вище напівкількісного методу визначення вмісту RNA HCV у плазмі крові для слідкування за перебігом хвороби, прогнозування її наслідків, визначення тактики лікування та для контролю за його ефективністю.

Протягом 1997 - 2003 років були обстежені 348 дорослих хворих із HCV - інфекцією або з підозрою на неї за допомогою наведених вище методів маркерної діагностики. Всіх цих хворих також обстежено за допомогою ІФА та ПЛР на маркери HBV, HDV, HGV, HIV. 48 хворих додатково, за клінічними показаннями, обстежені ще й на HTTV-інфекцію за допомогою ПЛРsyatrws. Діагноз HCV-інфекції підтверджено як за допомогою наведеного методу ПЛР з напівкількісною або й кількісною оцінкою результатів, так і за допомогою методів ІФА II - III поколінь у 280 дорослих хворих, що не вживали наркотики. Ще у 68 таких хворих він був виключений (19,5% із обстежених). Підставою для додаткового обстеження цих 68 хворих були первинні позитивні результати досліджень на один із маркерів HCV - інфекції (табл. 1).

У таблиці 1 наведено порівняння (відносно загальної кількості обстежених) позитивних результатів обстеження на маркери HCV- інфекції у хворих з її остаточним виключенням або підтвердженням. Отримані нами результати свідчать, що як для підтвердження, так і для виключення HCV - інфекції слід одночасно застосовувати ПЛР й ІФА із визначення загальних anti-HCV.

Як свідчать матеріали таблиці 1, дослідження на anti-HCV Ig G, IgM при первинному обстеженні не раціональне лише у випадках, коли наявність HCV-інфекції викликає сумнів й надалі виключається. У цих

Таблиця 1

Порівняння позитивних результатів обстеження на маркери HCV- інфекції у хворих з її остаточним виключеним або підтвердженням

Остаточні результати обстеження на HCV-інфекцію	Всього обстежено		з них хворих з позитивними маркерами							
			загальні anti-HCV		anti-HCV Ig M (ІФА)		anti-HCV Ig G (ІФА)		RNA HCV у RT PCR	
	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%
HCV – інфекцію підтверджено	280	80,5%	250	89,3%	148	52,9*	260	92,9%*	272	97,1%*
HCV – інфекцію виключено	68	19,5%	41	60,3%*	3	4,4%*	6	8,8*	18	26,5%*
Всього обстежено	348	100%	291	83,6%	151	43,4%	266	78,2%	290	83,5%

*Примітка: * — позначено вірогідність відмінності P<0,05 порівняно з загальною кількістю обстежених.*

хворих достатньо повторних негативних досліджень на загальні anti - HCV в ІФА та на RNA HCV у ПЛР. Слід зазначити, що в 4 з таких хворих двічі були позитивні результати ПЛР при первинно негативній ІФА. У них HCV - інфекцію було виключено завдяки повторним негативним дослідженням за допомогою ІФА та ПЛР. У жодного з них anti-HCV Ig G чи IgM не були позитивними. Навпаки, у хворих з остаточно підтвердженою HCV - інфекцією визначення anti-HCV Ig G, IgM було вірогіднішим, ніж визначення загальних anti-HCV, але поступалось за вірогідністю результатам ПЛР. Це спростовує поширену думку, що визначення anti-HCV Ig G та IgM необхідне лише для визначення гостроти та активності хвороби у хворих з позитивною ІФА й (або) ПЛР.

Дослідження на anti-HCV Ig G та IgM в ІФА виявились вірогіднішими порівняно з результатами ІФА на загальні anti HCV й у хворих, в яких надалі HCV-інфекцію було виключено. У таких хворих їх визначення було вірогіднішим, ніж результати ПЛР. Однак, остання все ж за вірогідністю істотно переважала результати ІФА для визначення загальних anti-HCV.

Порівняння різних методів діагностики та тест-систем ІФА заслуговує на окрему публікацію. Однак слід зауважити, що при першому негативному результаті обстеження на загальні anti - HCV у хворих з позитивною у плазмі крові RNA HCV в ПЛР не слід застосовувати такий дорогий метод, як ІХЛА. Слід лише повторити ПЛР в іншій лабороторії й, на разі повторного позитивного результату (який був у 12 із 22 хворих, що мали негативні результати ІФА), дослідити в крові через 1 - 2 тижні anti - HCV cor Ag, NS 4,NS5 Ig M. Вони виявились позитивними у всіх 19 хворих з повторно позитивною ПЛР на RNA HCV при негативних Ig G. У цих 19 хворих клініко - інструментальне (з пункційною біопсією печінки та гістоморфологічним дослідженням біоптатів включно) обстеження дозволило встановити діагноз гострого ВГС.

У всіх інших 10 хворих із первинно негативною ПЛР все ж підтверджено HCV - інфекцію ще двічі позитивною в динаміці ПЛР (незалежно отримані результати в 2 різних лабораторіях) та позитивними anti - HCV за допомогою ІХЛА (дуже низький — майже на межі контролю вміст антитіл). 5 хворих із цих 10 виявились хворими на ХВГС - моноінфекцію, а 3 — ще й одночасно були інфіковані HBV.

З іншого боку, у 41 хворих, обстежених за вищезазначеною схемою, отримані при первинному обстеженні позитивні результати на загальні anti-HCV не були підтверджені в подальшому ані результатами повторного ІФА, ані подвійною перевіркою на RNA HCV у ПЛР (табл. 3). Ще одне негативне обстеження (ІФА та ПЛР одночасно) через рік дозволило остаточно виключити в цих хворих HCV - інфекцію.

Для визначення можливого впливу гостроти процесу та наявності мікст-інфекцій на вірогідність визначення маркерів ВГС ми провели додатковий аналіз, результати якого підсумовані у таблиці 2.

Аналізуючи дані, наведені в таблиці 2, слід насамперед зазначити, що найбільш вірогідним методом діагностики була ПЛР у хворих як на гострий (позитивна в усіх 19 обстежених), так і на хронічний ВГС (98,7% позитивних результатів). Не виявлено суттєвої різниці у вірогідності цього методу й у хворих з мікст-інфекціями: ВГС на тлі гострого чи хронічного ВГВ, HGV - інфекції.

Також достатньо обґрунтований висновок, що визначення загальних anti-HCV не раціональне у хворих з підозрою на гострий ВГС порівняно з хронічним. При гострому ВГС найдоцільніше обстеження плазми крові на RNA HCV у RT PCR (найбільш вірогідний метод) та на anti-HCV Ig M в ІФА на разі позитивної ПЛР. При позитивних anti-HCV Ig M в ІФА у хворих з підозрою на гострий ВГС більш раціональне дослідження на anti-HCV Ig G, а не на загальні anti-HCV. Це економить і час обстеження, і його вартість.

Істотного впливу наявності як гострих, так і хронічних HBV та HGV - інфекцій на вірогідність обстеження на загальні anti-HCV та на anti-HCV Ig G в ІФА не виявлено. Рідше виявляли anti-HCV Ig M в ІФА у хворих із поєднанням HCV - інфекції та хронічних ВГВ, ВГG, гострого ВГВ. Це не збігалося з результатами дослідження на RNA HCV, тому необхідним є порівняння рівнів віруссемії та кількісних значень ІФА для визначення anti-HCV Ig M у таких хворих. Але це дослідження вже є темою окремої роботи, присвяченої можливому впливу наявності HCV, HGV та HBV - інфекцій на особливості й вірогідність діагностики кожної з них.

Таким чином, як скринінговий метод у хворих із підозрою на HCV - інфекцію, раціональніше слід застосовувати ПЛР, а не ІФА II покоління, що відповідає й висновкам інших досліджень [3, 7, 8]. Наявність маркерів гострого чи хронічного ВГВ, HGV - інфекції не виключає й одночасного перебігу HCV-інфекції, враховуючи досить значні відсотки їх поєднань (12,14, 17,4 та 10% відповідно) у нашому дослідженні. Але наявність цих інфекцій істотно не впливає на вірогідність найпоширеніших в Україні методів діагностики HCV - інфекції - ІФА II покоління для визначення загальних anti - HCV та ПЛР. Вплив ХВГС на перебіг та вірогідність діагностики HBV-, HGV-інфекцій заслуговує на додаткове вивчення.

Не припустиме призначення противірусної терапії хворим, діагноз ВГС у яких встановлений лише на основі одного позитивного результату ІФА II покоління чи ПЛР. На жаль, із 41 хворого, що мали, як виявилось потім, псевдопозитивні результати

Таблиця 2

Результати обстеження хворих на маркери HCV - інфекції та їх тлумачення з урахуванням клінічного обстеження

Варіанти перебігу HCV – інфекції	Кількість хворих		Кількість хворих з позитивними маркерами HCV-інфекції			
	абс	%	загальні anti-HCV (ІФА)	anti-HCV Ig M (ІФА)	anti-HCV Ig G (ІФА)	RNA HCV у RT PCR
Гострий ВГС	19	6,79%	4	19	0	19
Хронічний ВГС	149	53,21%	141	86	149	144
Хронічний ВГС у поєднанні з ХВГВ	48	17,14%	46	23	48	48
Хронічний ВГС у поєднанні з ХВГG	27	9,64%	25	12	27	26
Гострий ВГВ на тлі HCV-інфекції	34	12,14%	31	14	34	32
Хронічний ВГС у поєднанні з гострим ВГG	1	0,36%	1	0	1	1
Хронічний ВГС у поєднанні з HTTV-інфекцією	2	0,72%	2	0	1	1
Всього хворих з підтвердженою HCV-інфекцією	280	100%	250 /89,29%	148 /52,85%	260 /92,85%	272 /97, 14%

дослідження крові на загальні anti HCV в ІФА, 26 вже встигли отримати ті чи інші противірусні препарати протягом 1 - 3 місяців до звернення в нашу клініку. Один із них отримував препарати α 2 - інтерферону протягом 4 місяців. Ретельне його обстеження із застосуванням не тільки ПЛР, а й ІФА III покоління, ІХЛА дозволило остаточно виключити ВГС.

Підсумовуючи отримані дані, враховуючи відомі рекомендації [1, 2, 3, 4, 5], можна запропонувати таку схему обстеження хворих при підозрі на HCV - інфекцію (рис. 1).

Проведені дослідження дозволяють зробити такі висновки:

1. Найбільш важливим й вірогідним методом специфічної діагностики HCV - інфекції є ПЛР, що дає найменшу кількість помилкових результатів (16,5%) при діагностиці ВГС. При цьому у хворих з підтвердженим діагнозом ВГС кількість негативних результатів найнижча (2,86%) незалежно від варіантів перебігу та поєднання з HBV-, HGV - інфекціями.
2. Доволі значна кількість (26,5%) псевдопозитивних результатів ПЛР на RNA HCV у плазмі хворих, у яких надалі ВГС було виключено, потребує подвійного додаткового обстеження їх у ПЛР на разі двічі негативних результатів ІФА II покоління.
3. Велика кількість (60,3%) псевдопозитивних результатів ІФА II покоління для визначення загальних anti-HCV у хворих, в яких надалі HCV-інфекцією було остаточно виключено, порівняно з результатами визначення відповідних Ig M та Ig G у цих же осіб, дозволяють не рекомендувати повторні дослідження за допомогою ІФА II покоління. Застосування ж ІХЛА поки що надто дороге, а ІХА — не досить чутливий. Тому на разі виявлення хвороби вперше при специфічній діагностиці ВГС більш важливим і вірогідним є визначення anti-HCV corAg,NS4, NS 5 IgM, anti-HCV corAg,NS4, NS 5 IgG в ІФА, ніж загальних anti-HCV за допомогою ІФА II покоління.
4. При негативному результаті дослідження на загальні anti-HCV в ІФА позитивний результат обстеження на RNA HCV у ПЛР потребує подвійного підтвердження (одне з них — в іншій лабораторії), а також дослідження на anti-HCV corAg,NS4, NS 5 IgM.

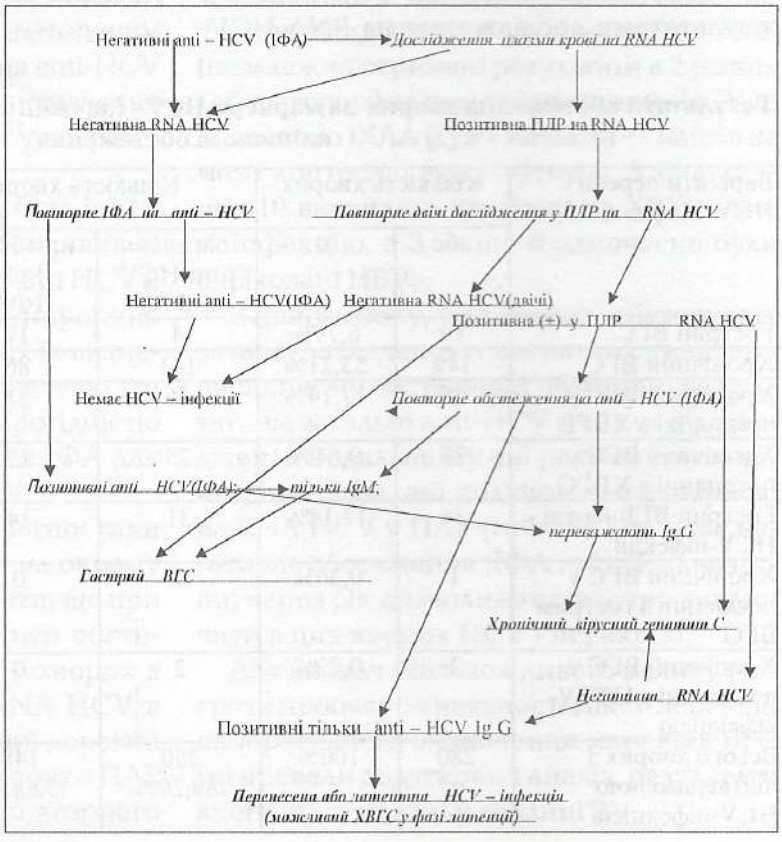

Рис. 1. **Алгоритм діагностичного пошуку при ВГС**

5. У хворих при одноразовому позитивному результаті дослідження крові на загальні anti-HCV як позитивні, так і негативні результати дослідження плазми крові на RNA HCV у ПЛР потребують перевірки в іншій лабораторії або за допомогою інших тест - систем.
6. Діагноз ВГС не може бути підтверджений ані одноразово позитивною ПЛР, ані, тим більше, одноразовою ІФА II покоління. Призначення противірусної терапії в таких випадках неприпустиме й призводить до значно більших матеріальних витрат, ніж подальше обстеження відповідно запропонованому нами алгоритму.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гепатит С: Епідеміологія, діагностика, клініка, лікування / Методичні рекомендації // Укладачі: Громашевська Л.Л., Гураль А.Л., Марієвський В.Ф., Вовк А.Д., Сергеєва Т.А., Шагінян В.Р., Матяш В.І. — К.: МОЗ України, АМН України, 2003.— 31 с.

2. Ильина Е.Н., Фомина Е.Е., Артемов Е.К., Говорун В.М., Иванников И.О., Сюткин В.Е. Хронические вирусные заболевания печени // Методическое пособие для врачей. 2-е издание. — М., 2002.— С. 41.

3. Ильина Е.Н. Особенности генодиагностики трансфузионных вирусных гепатитов // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. — 2003. — №1. — С. 28 - 36.

4. Сергеєва Т.А. Серологічна діагностика гепатиту С: проблеми і перспективи // Лабораторна діагностика. — 2003. — №1. — С. 7-15.

5. Хронический вирусный гепатит /Под ред. В.В. Серова, З.Г. Апросиной. — М.: Медицина, 2002. — 384 с.

6. Arase Y., Chayama K., Murashima N. et all. Fluctuation patterns of HCV-RNA serum level in patients with chronic hepatitis C // J. Gastroenterology. — 2000. — V. 35. — P. 221. - 225.

7. Purcell R. The Hepatitis C Virus: Overview . Hepatology, 1997. — V.26. — N 3. — Suppl.1. — P. 11 - 14.

***

УДК: 616.36-002-022.7-07:578.27:578.891

Н.Ч. Корчинский

Специфическая диагностика HCV - инфекции у взрослых

В статье анализируются собственные результаты обследования при помощи различных методов ИФА и ПЦР 348 взрослых больных с подозрением на ВГС. У 280 из них диагноз HCV - инфекции был подтвержден. Наиболее информативным и специфическим методом ее диагностики оказалась ПЦР, которая дала наименьшее количество как ложноположительных (26,5 %), так и ложно-отрицательных (2,86 %) результатов. Определение соотношения специфических Ig M и Ig G при первичной диагностике HCV - инфекции рационально как для дифференциации острого и хронического ВГС, так и для подтверждения положительных и отрицательных результатов ПЦР. На достоверность результатов ПЦР для определения RNA HCV не влияет наличие острого и хронического ВГВ, HGV - инфекции. Использование только одних методов ИФА 2 поколения не достаточно как для подтверждения, так и для исключения HCV - инфекции. На основе проведенных исследований усовершенствована схема специфического обследования больных с подозрением на HCV - инфекцию.

UDC: 616.36-002-022.7-07:578.27:578.891

N.Ch. Korchinskiy

Specific diagnostics of HCV - infection in adults

In the article we have analysed the specific diagnostics of HCV infection and the results of the examination with the help of ELISA and PCR of 348 patients with the markers of HCV. 280 patient's HCV diagnosis has been proved. The most informative and specifical method of it's diagnosis turned out to be PCR, which gave the smallest number of false positive (26,5 %) as well as false negative (2,86 %) results. The determination of correlation of specifical Ig M and Ig G at the primary diagnostics of the HCV - infection is rational for the differentiation of the acute and chronic viral hepatitis C as well as for the confirmation of positive and negative results of PCR. The presence of the acute and chronic viral hepatitis B, HGV - infection do not influence upon the reliability of the PCR results for the determination of the RNA HCV. Using only these methods of ELISA II generation is not enough for the conformation as well as for the exclusion of HCV - infection. The scheme of specifical investigation of patients with suspicion to HCV - infection is improved on the basis of those studies.