

Безопасность донорской крови в период серологического окна



Причины парентеральных заражений (Использование инфицированной крови и ее продуктов)

- ❖ Период «серологического окна»
- ❖ Вирусная гетерогенность (варианты, штаммы и субтипы вируса, не детектируемые скрининговыми тестами)
- ❖ Хроническая иммунонегативность, Атипичная сероконверсия (низкие титры антител на поздних стадиях хронической инфекции)
- ❖ Технические и лабораторные ошибки

15 : 0,6 : 0,1 : 0,4

(Bush et al, 2001)



Период «окна» посттрансфузионных вирусных инфекций



Вирус	«Период окна» (недели)
ВГВ	8
ВГС	12
ВИЧ	>3

Расчетный остаточный риск трансфузионного инфицирования в 2012 году составил: для ВИЧ – 162; ВГС – 337; ВГВ – 971 на 1 млн донаций.

Остаточный риск инфицирования при переливании крови

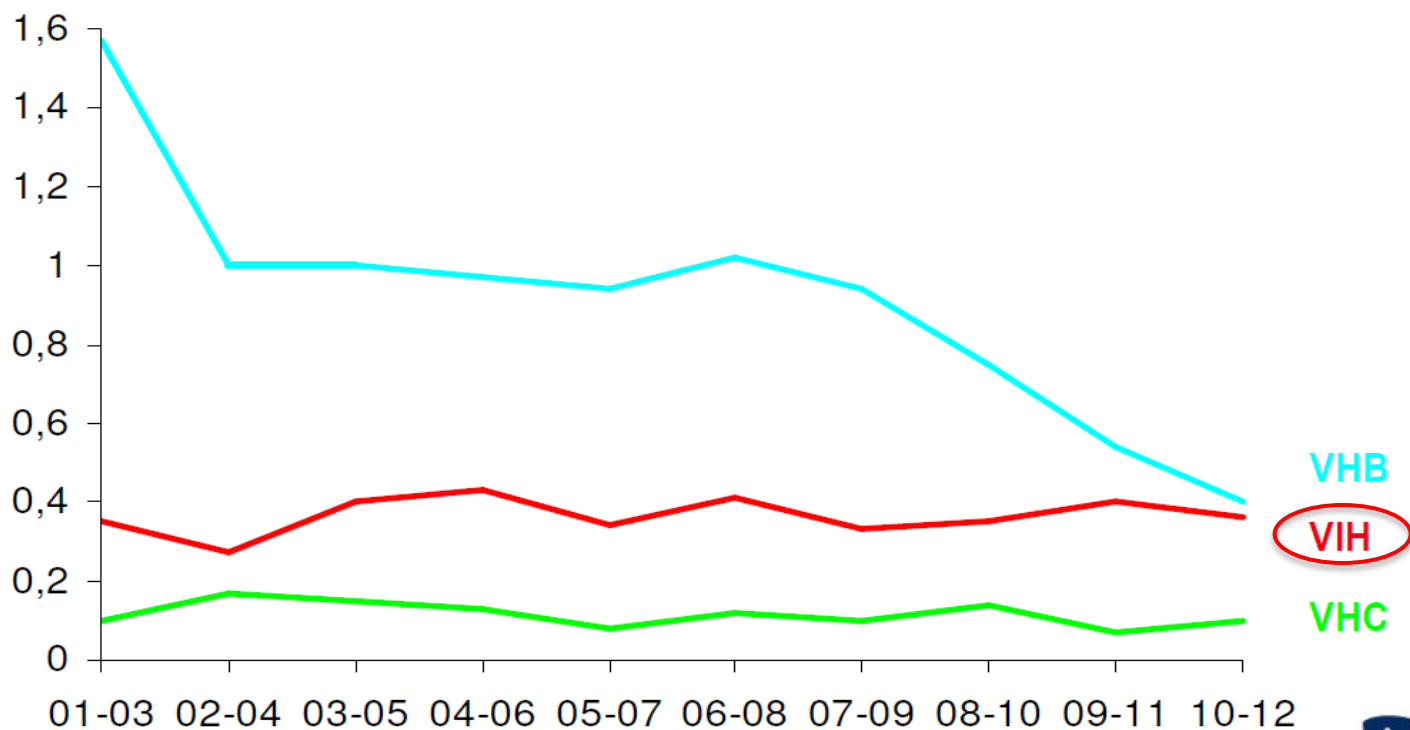
М.Н. Губанова, С.Р. Мадзаев, К.С. Аветисян, А.В. Бахметьев, М.В. Зарубин, А.В. Караваев, Е.А. Ключева, А.В. Коденев, К.В. Кузнецов, А.Р. Максимов, У.С. Султанбаев, Н.Г. Филина, К.В. Хальзов, Л.М. Яковлева, Е.Б. Жибурт
Российская ассоциация трансфузиологов. *Трансфузиология* №4, 2013



Остаточный (резидуальный) риск в Службе крови:

Ситуация во Франции (данные БиоРад)

Остаточный риск передачи вирусных инфекций при переливании крови (на миллион кроводач , с 2001 по 2012)



Source : InVS, INTS, EFS, CTSA

Остаточный риск ВИЧ-инфекции остается неизменным, несмотря на внедрение ПЦР



Снижение риска в Службе Крови: Данные Службы Крови Франции за 3 года (данные БиоРад)

- Выявление ВИЧ-инфицированных доноров, 8,5 млн кроводач.
- Около 2% ВИЧ-положительных доноров пропущено в ПЦР, но положительны в ИФА



Results of HIV and HCV screening between Jan. 2007 and Dec. 2009 (8.5 million donations)

	HIV		HCV	
	N	%	N	%
RNA + / Ab +	98	93.3	381	64.9
RNA + / Ab -	5 *	4.8	6 **	1.0
RNA - / Ab +	2	1.9	200	34.1
Total	105	100	587	100

* 1 in first-time donors
4 in repeat donors

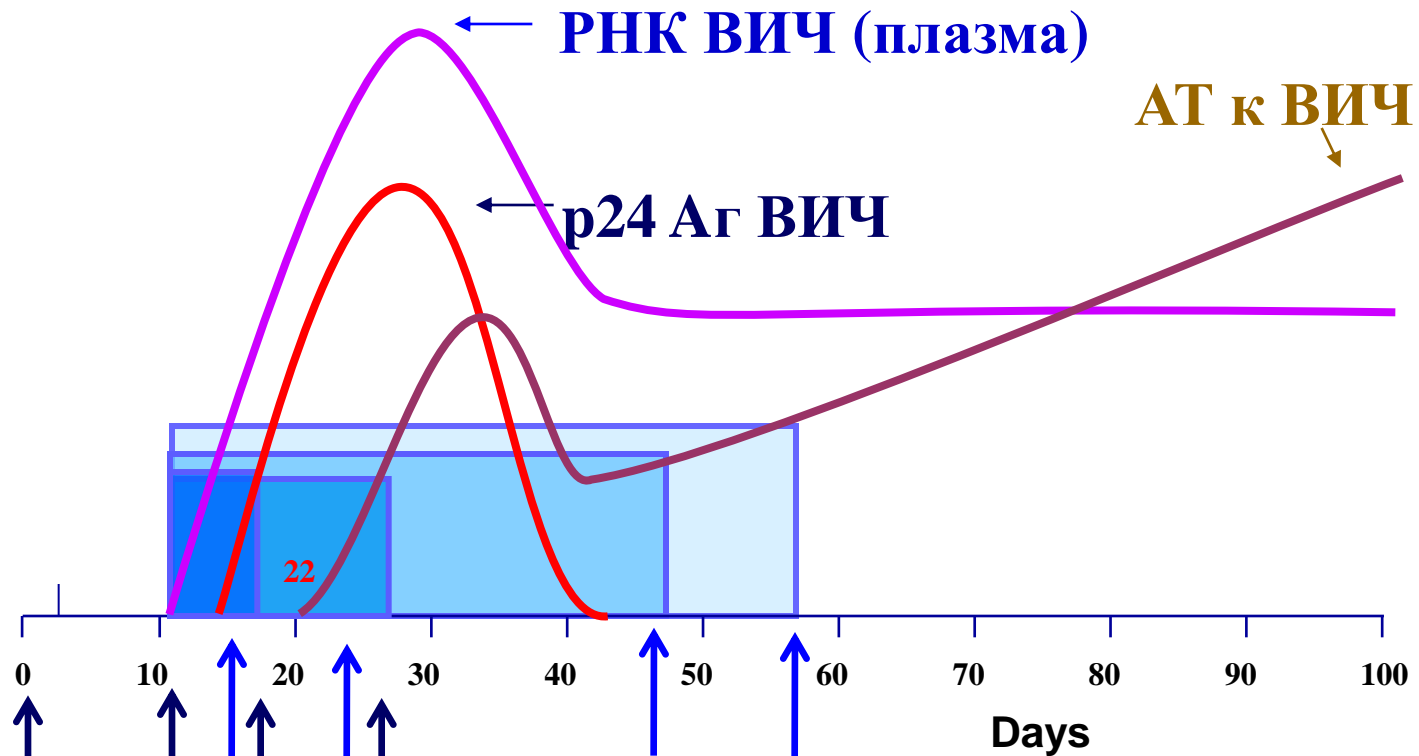
** 1 in first-time donors
5 in repeat donors

ВИЧ-инфекция и лабораторные маркеры

Непрерывное улучшение чувствительности

From B Branson (CDC Atlanta)

Modified after Busch et al. Am J Med. 1997



Инфицирование

4е
пок

3е
пок

2е
пок

1е
пок

Серологическое окно

РНК ВИЧ в плазме крови
p24-ВИЧ-антиген
антитела к ВИЧ

11 день
16 день
22 день

5 дней
6 дней



**Результаты исследования возможности сокращения
серонегативного окна при использовании
ИФА тест-систем с различной чувствительностью при
выявлении антигена р24 ВИЧ
(исследование проведено на 21 сероконверсионной
панели)**

Чувствительность тестов при выявлении антигена р24 (пг/мл)	0,5	5	10	25
Сокращение серонегативного окна (в днях) по сравнению с тест-системами 3 поколения	10,83	8,44	7,25	3,39



Повышение качества лабораторной диагностики для выявления маркеров вирусных инфекций осуществляется двумя путями:

Улучшение качества скрининговых исследований;

Повышение качества (чувствительности и специфичности) диагностикумов;

Внедрение системы менеджмента качества лабораторных исследований;

Создание максимально эффективного алгоритма тестирования

Оба направления тесно связаны экономическими узлами – высокие технологии дороги, а неверная схема скрининга сводит на нет все достижения науки и технологий.



Алгоритмы диагностики - ВОЗ 2010 для скрининга крови

Рисунок 2: Типовой алгоритм ведения доноров крови на основании результатов скрининга и подтверждающего тестирования

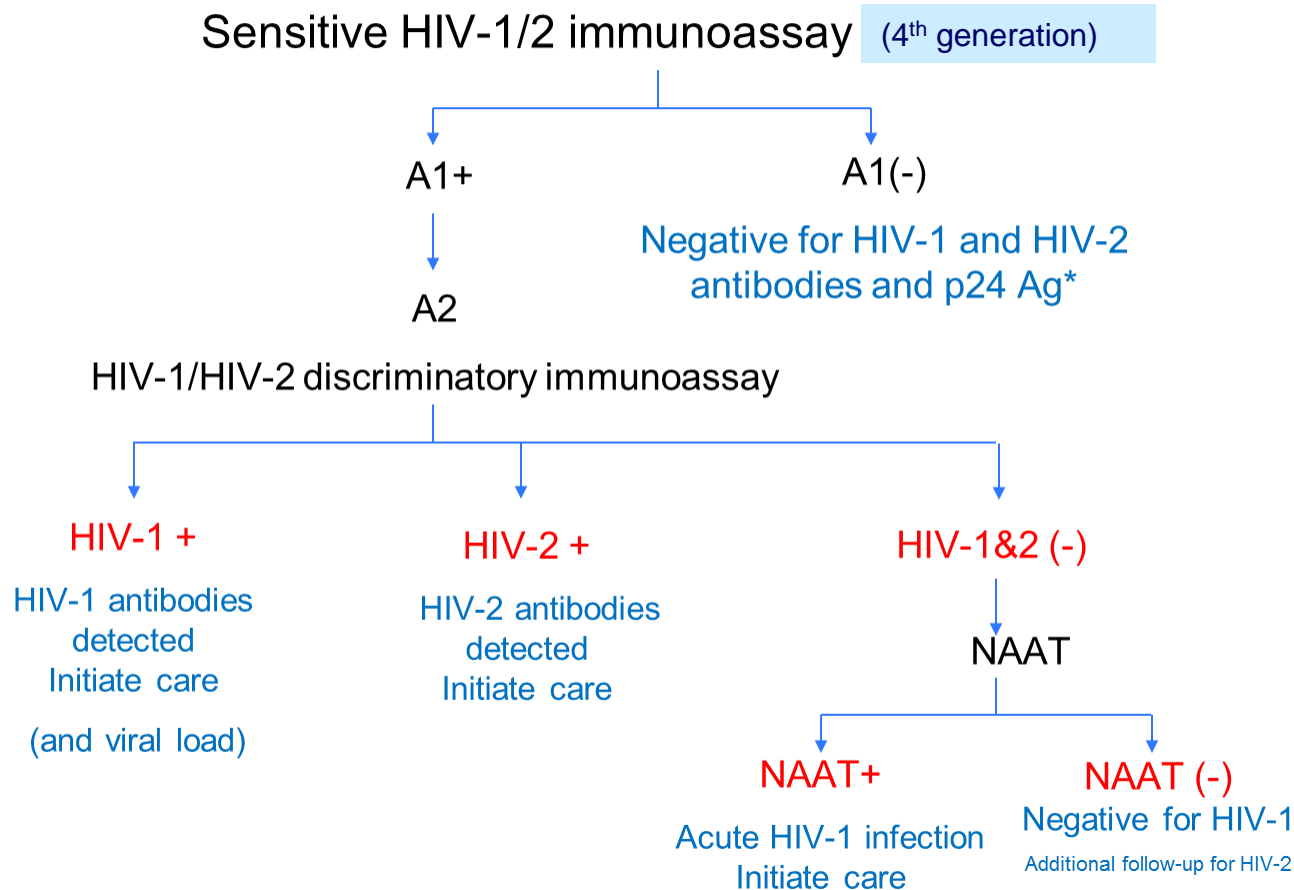


A = Анализ
A+ = Реактивный результат в A
A- = Нереактивный результат в A



Диагностический алгоритм с использование тест-систем 4^{го} Поколения (США)

Proposed HIV Algorithm



Алгоритмы диагностики - анализ особенностей предложенных схем, отличие от Российских стандартов

- Редкое использование 2-х тестов – чаще повторные исследования в том же тесте (определяется требованиями CTS)
- Подтверждение дискордантных результатов, а не повторно позитивных



Что же делает алгоритмы эффективными?

- Требования к рабочим характеристикам теста (CTS) .
Полевые характеристики в соответствующем регионе.
- Требования к процедурам обеспечения качества
(необходимость учитывать их отсутствие)

Факторы риска:

- алгоритм, приводящий к неэффективному использованию средств
- отсутствие или неэффективная система менеджмента качества
- малочувствительные и\или малоспецифичные тесты
- ненадежные поставщики или неэффективная логистика



Что же делает алгоритмы эффективными?

1. Прежде всего требования, предъявляемые к тестам!
Национальный алгоритм: нужно определить минимальные требования по чувствительности и специфичности тестов с использованием региональных панелей!

В Европе – CTS.

с декабря 2010 ужесточились и включают: необходимость детектировать все генотипы и субтипы вируса, определение чувствительности на ранней стадии сероконверсии с использованием не менее 40 образцов.

Тест –системы, отобранные по подобным требованиям эффективно работают в любом алгоритме, при внедренной системе управления качеством в лаборатории.

По оценке экспертов ВОЗ 2010, отсутствие СМК является важнейшей причиной малоэффективного скрининга!



Алгоритмы диагностики - анализ особенностей предложенных схем, требования к тестам

- В качестве 1-го скринингового теста должен быть тест с максимальной чувствительностью
- Тесты должны **различаться** свойствами используемых антигенов или методами детекции/связывания аналитов
- 2 –ой тест должен быть по крайней мере с **сопоставимой чувствительностью** с 1-ым (скрининговым) тестом для уменьшения количества дискордантных результатов!

(HIV testing Algorithms. A status report. APHL& CDC, 2009, USA, p33)



В России нет требований по чувствительности и специфичности, предъявляемых к тест-системам для скрининга крови на ВИЧ!



Какой тест на ВИЧ использовать?

«ХОРОШАЯ» тест-система для скрининга ВИЧ - это:

Максимальная чувствительность и по антигену и по антителам для того, чтобы выявлять ВИЧ-инфекцию на возможно ранней стадии (сокращать период серологического окна)

Высокая специфичность.



Тест-системы ИФА для диагностики ВИЧ-инфекции производства ООО «НПО «Диагностические системы»

ДС-ИФА-ВИЧ-АГАТ-СКРИН **СЕ**

Для одновременного выявления антител к ВИЧ 1,2 и антигена p24
ВИЧ-1 с чувствительностью 10 пг/мл

ДС-ИФА-ВИЧ-АГ+АТ

Для одновременного выявления антител к ВИЧ 1,2 и антигена p24
ВИЧ-1 с чувствительностью 5 пг/мл

МилаЛаб-ИФА-ВИЧ-АГАТ-ЭКСПРЕСС

для одновременного выявления антител к ВИЧ 1,2 и антигена p24 ВИЧ-1 с
чувствительностью 5 пг/мл

МилаЛаб-ИФА-ВИЧ-АГАТ

Для одновременного выявления антител к ВИЧ 1,2 и антигена p24 ВИЧ-1 с
чувствительностью 20 пг/мл

МилаЛаб-ИФА-ВИЧ-АГ+АТ

Для одновременного выявления антител к ВИЧ 1,2 и антигена p24 ВИЧ-1 с
чувствительностью 20 пг/мл



Минимальные требования CTS (*Common Technical Specification – Общие технические условия*), и количество образцов, на которых была аттестована система ДС-ИФА-HBsAg-0,01

Характеристика образцов		Количество образцов	
		Требования CTS	Реально протестированные образцы на тест-системе ДС-ИФА-HBsAg-0,01
1. HBsAg – негативные образцы			
а) доноры (случайная выборка)		5000	5348
б) пациенты (случайная выборка)		200	285
в) кросс-реактивные образцы (случайная выборка)		100	2588
Беременные женщины (случайная выборка)			477
Сыворотки, содержащие ревматоидный фактор (случайная выборка)			182
Образцы сывороток от пациентов с Гепатитами А и С, ВИЧ, пневмонией, герпесом, ЦМВ, хламидиозом, сифилисом (случайная выборка)			1929
Ложно-положительные результаты в соответствующем скрининговом тесте		-	-
2. HBsAg – положительные образцы		400	2530
- свежие образцы		включая 25	включая 25
- образцы с разных стадий инфекции:			453
острая инфекция			34
хроническая инфекция			419
- сильноположительные образцы (>50 нг HBsAg/мл)			2251
- сыворотки на границе ОПкрит			63
3. Образцы с субтипами	Субтип ad (включая adw2, adw4, adr)		48
	Субтип ay (включая ayw1, ayw2, ayw3 var B, ayw3 var A, ayw4)		28
4. HBsAg сероконверсионные панели		30	37 (398 образцов)
5. Другие панели			8 панелей (150 образцов)
6. Стандарты			
Second International Standard for HBsAg (33 IU/ml), subtype adw2, genotype A, NIBSC code number: 00/588		+	+
British Working Standard for HBsAg (0.2 IU/ml) NIBSC code: 01/476-xxx (subtype ad)		+	+
Отраслевой стандартный образец СОС-HBsAg 42-28-311-03Р (ГИСК им. Тарасевича)		+	+
Общее количество сывороток		13885	

Диагностика гепатита В

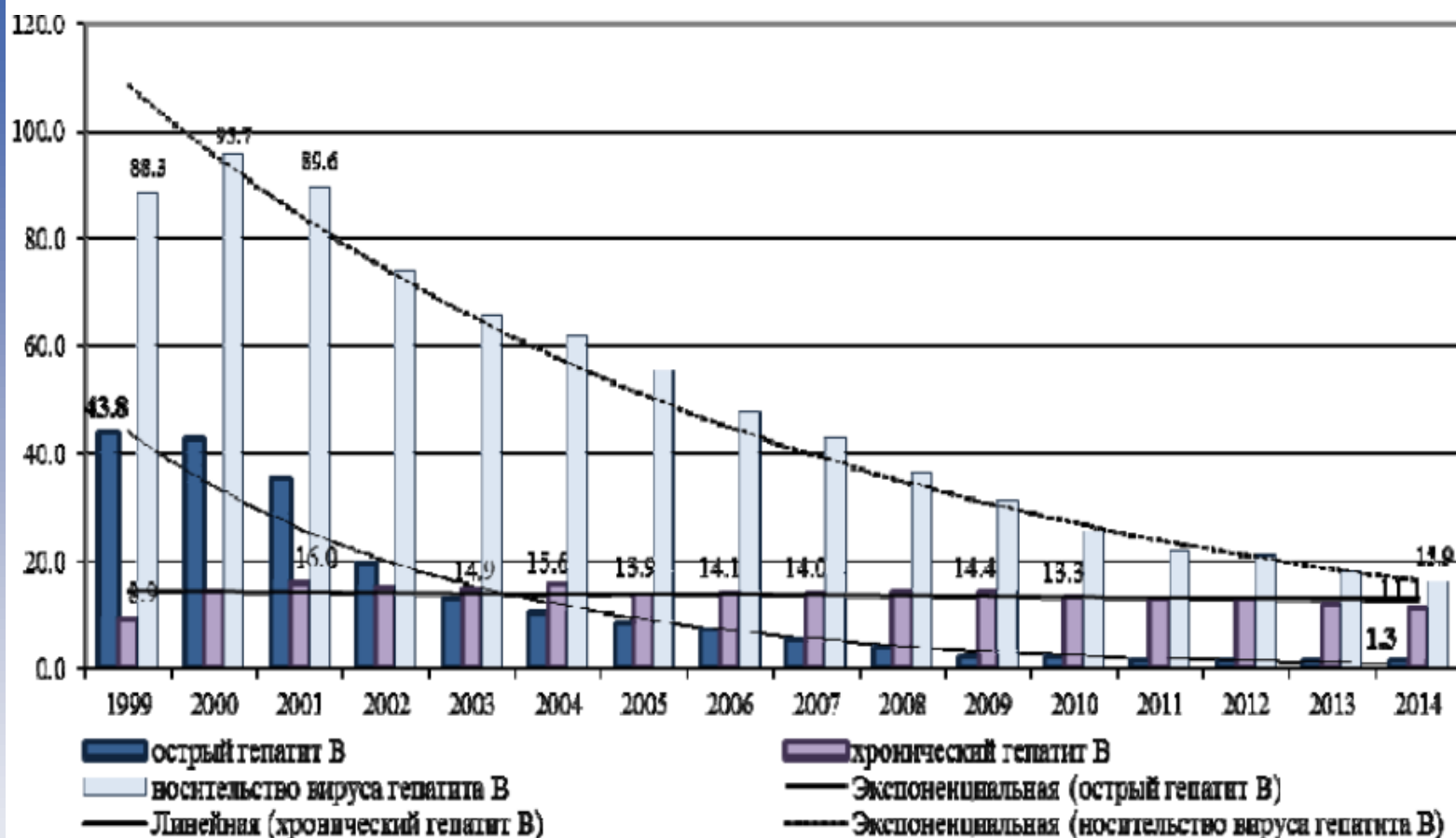


Рис. 86. Динамика заболеваемости острым гепатитом В, хроническим гепатитом В и носительства вируса гепатита В. на 100 тыс. населения

Государственный доклад "О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2014 году"



Occult hepatitis B in blood donors: a description of two cases

Ciro Capezzuto¹, Eva Franchi¹, Simona Urbani¹, Luisa Romanò², Massimo Franchini¹

¹*Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma, Parma;* ²*Dipartimento di Sanità Pubblica -Microbiologia – Virologia, Sezione di Virologia applicata alla Sanità Pubblica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Milano, Milano, Italy*



Пациент, мужчина, 55 лет, кадровый донор, сделавший 50 донаций. Не вакцинировался против гепатита В и не имевший рискованного поведения.

Результаты тестирования последней донации:

HBsAg – отрицательно

HBV ДНК – положительно

До этого кровь тестировалась только на присутствие HBsAg

При дальнейшем обследовании обнаружили:

Анти-HBc – положительно

Анти-HBs – положительно

Анти-Hbe – положительно

АЛaТ – в норме

Генотип D субтип ауw с мутациями в S-регионе

Пациент, мужчина, 60 лет, кадровый донор, сделавший 58 донаций. Не вакцинировался против гепатита В и не имевший рискованного поведения.

Результаты тестирования последней донации:

HBsAg – отрицательно

HBV ДНК – положительно

До этого кровь тестировалась только на присутствие HBsAg

При дальнейшем обследовании обнаружили:

Анти-HBc – положительно

Анти-HBs – положительно

Анти-HBe – отрицательно

Анти-HBc-M – отрицательно

АЛaТ – в норме

Генотип А субтип ауw с мутаций в участке pre-core, которая ведет к блокированию транскрипции HBeAg

Латентная HBV инфекция

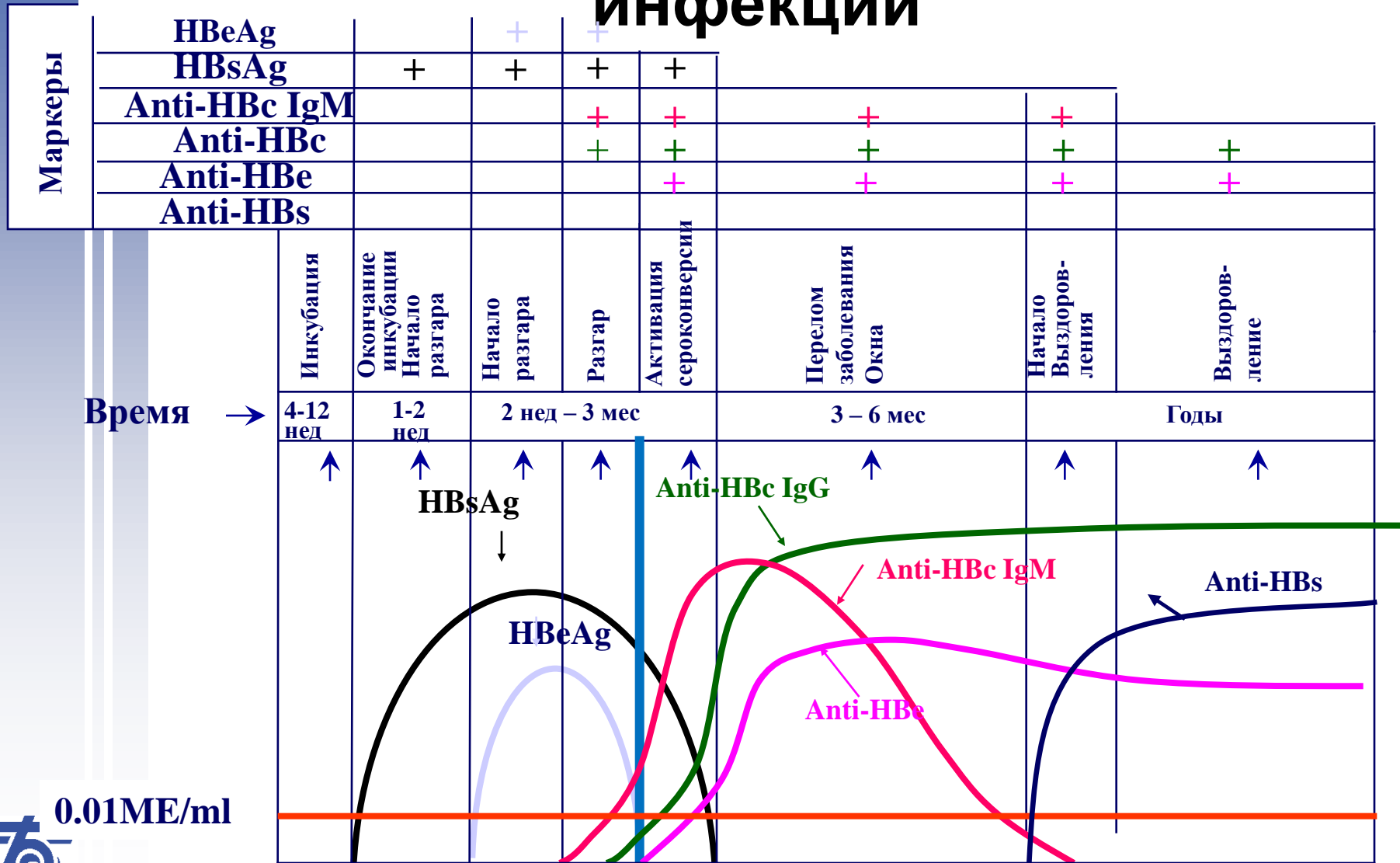


```
graph TD; A[Латентная HBV инфекция] --> B[Occult hepatitis B virus infection];
```

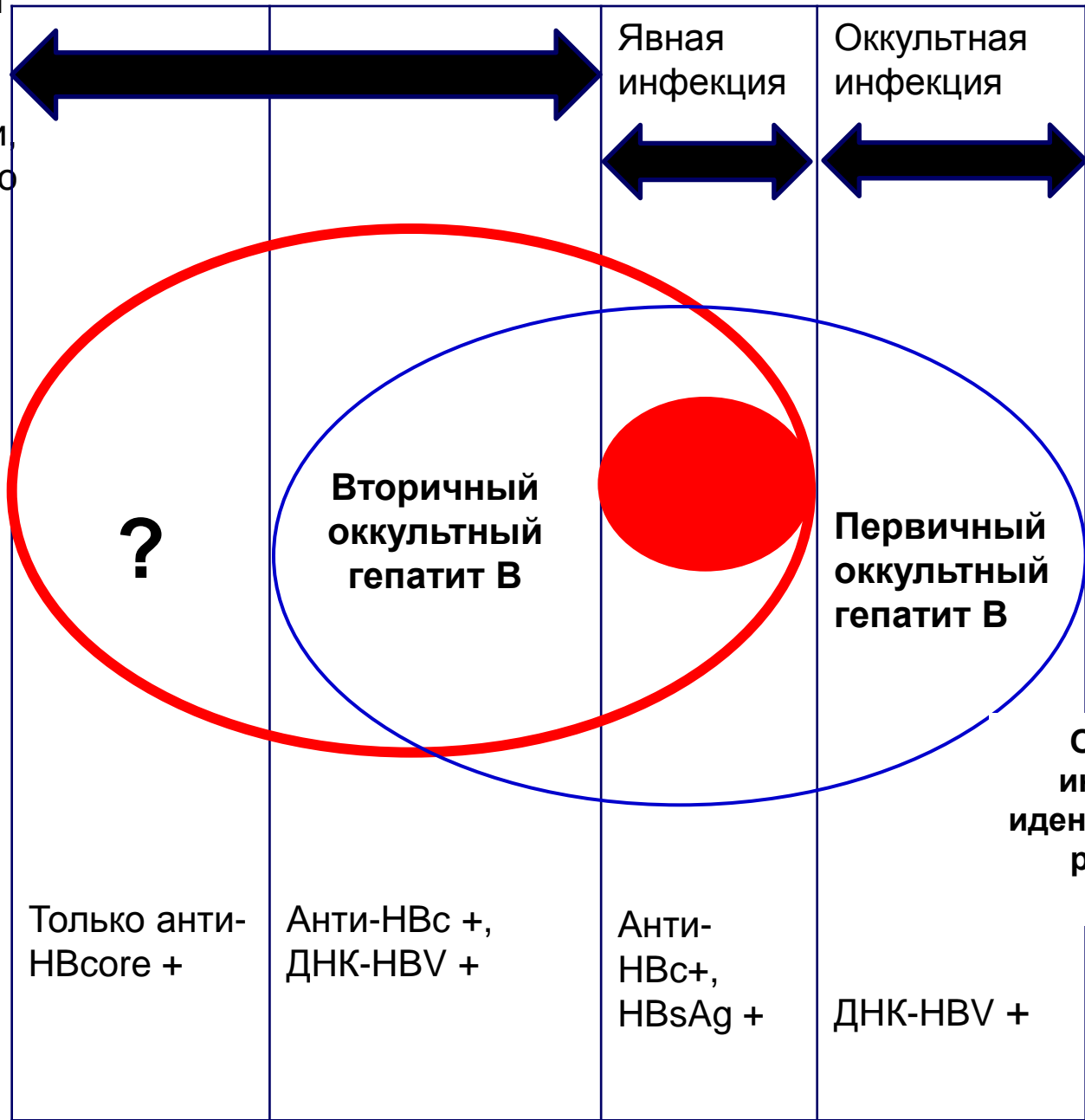
**Occult
hepatitis B
virus infection**



Динамика маркеров гепатита В при остром и хроническом течении инфекции



Оккультный гепатит
идентифицируется
не инвазивными и
рутинными тестами,
но результаты часто
игнорируются



«Мутантные формы Гепатита В могут возникать у пациентов под воздействием иммунного ответа или лечения. Мутантные формы, которые возникают в иммунодоминантных эпитопах поверхностного антигена вируса Гепатита В (HBsAg), позволяют вирусу размножаться при наличии нейтрализующего иммунного ответа, в то время, как классический тип вируса снижается до неопределяемого уровня. В некоторых тест-системах мутантные формы HBsAg определяются как ложно-негативные. Изучение реактивности тест-систем с мутантными формами вируса Гепатита В – ключ к установлению правильного алгоритма тестирования на вирус Гепатита В»

*Paul F. Coleman**

**Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, USA*

По материалам CDC (Центра по контролю и профилактике заболеваний, г. Атланта, США).



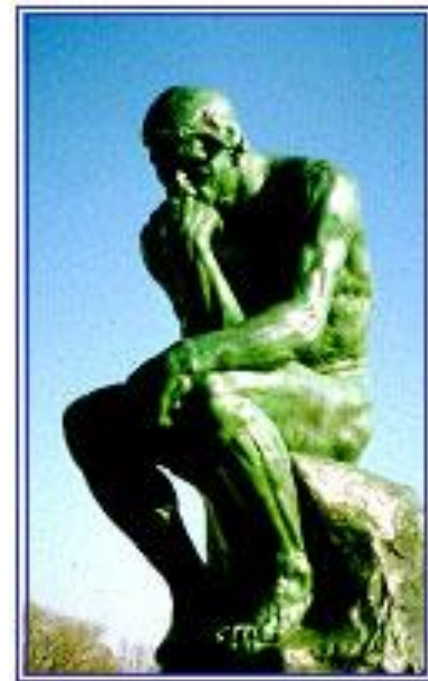
Низкое содержание HBsAg в сыворотке крови (менее 0,1 МЕ/мл) :

- в инкубационном периоде, до появления клинических симптомов болезни;
- перед исчезновением HBsAg из циркуляции;
- при наличии мутаций в вирусном геноме, которые вызывают:
 - изменение структуры антигенных эпитопов HBsAg;
 - снижение секреции вируса из клеток;
- в случае двойной инфекции вирусов HBV и HCV или HBV и HIV. HIV и HCV могут подавлять репликацию HBV.



«ДС-ИФА-НВsAg-0,01»

**ИММУНОФЕРМЕНТНАЯ ТЕСТ-
СИСТЕМА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
НВsAg С ПОВЫШЕННОЙ
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ,
равной 0,01 МЕ/мл**





Results

Seroconversion Sensitivity

To assess early seroconversion sensitivity of the DS-EIAHBsAg-0,01 and for completion of the

CTS study, 31 commercial seroconversion panels were investigated. The results of the individual

panels are given in Appendix 1 Table 6 Part A and Part B.

Results were compared to data available at PEI of further state of the art CE-marked HBsAg assays listed in Table 3. The DS-EIA-HBsAg-0,01 detected 8 panels (PHM 914, PHM 927, PHM

928, PHM 934, 6272, 6273, 6274 and 11011) reactive in the same bleed as the most sensitive

assay from Table 3. Ten panels (PHM 925, PHM 926, PHM 929, PHM 931, PHM 933, 6275

Таким образом, «ДС-ИФА-НВsAg-0,01» - наиболее чувствительный тест, который когда-либо тестировался в институте Пауля-Эрлиха. В среднем «ДС-ИФА-НВsAg 0,01» определяли НВsAg на 5 дней раньше, чем самый чувствительный тест и в целом на 14 дней раньше чем наименее чувствительный.

0,01 results are compared the earliest detection by any of the assays.

Taken together the results demonstrate that the DS-EIA-HBsAg-0,01 is by far the most sensitive

HBsAg test investigated at the Paul-Ehrlich-Institut (Fig. 1). On average the DS-EIAHBsAg-0,01 detected HBsAg 1.35 bleeds (or 5.0 days) earlier than the most sensitive assay and on average 3.32 bleeds (or 14.1 days) earlier than the least sensitive assay.

КАКИЕ ГАРАНТИИ ДАЕТ СЕ-СЕРТИФИКАЦИЯ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ HBsAg?

1. ПОЛУЧЕНИЕ СЕРТИФИКАТА ISO 13485



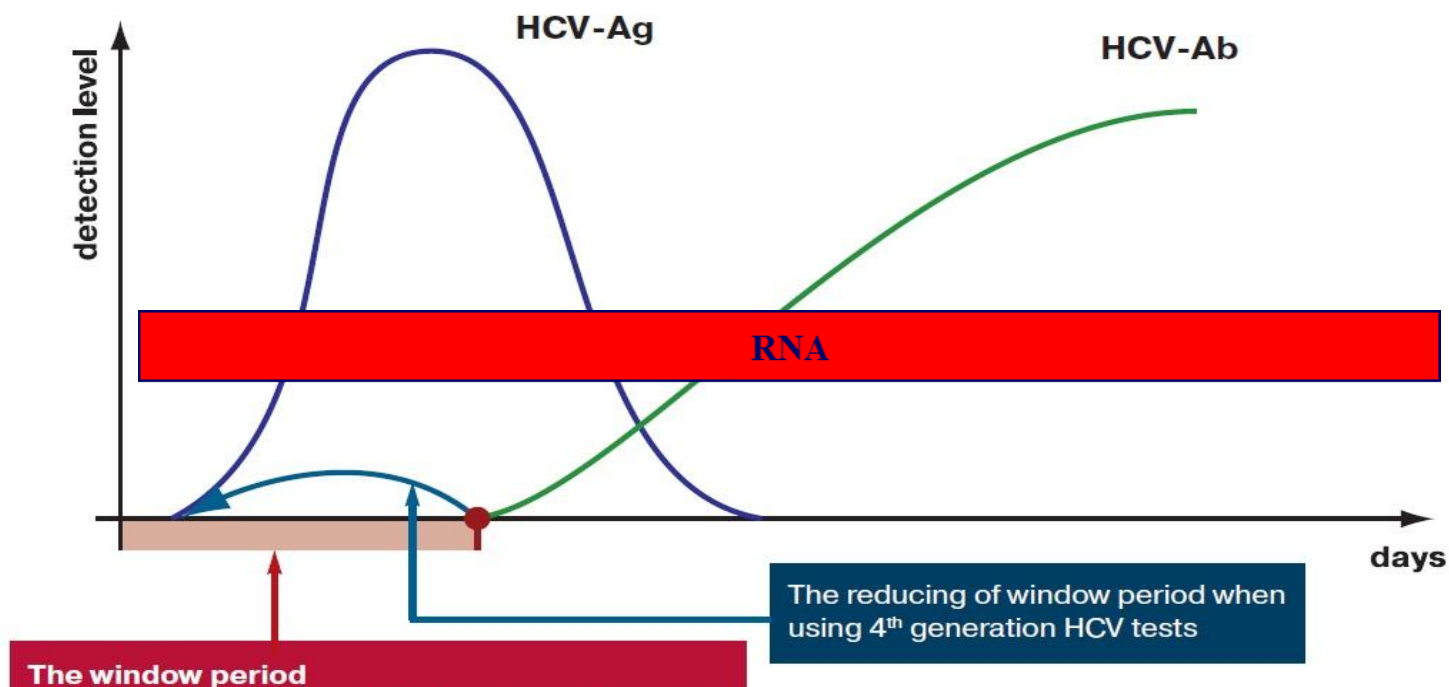
2. ПОЛУЧЕНИЕ СЕРТИФИКАТА ГАРАНТИИ КАЧЕСТВА НА РАЗРАБОТКУ ТЕСТ-СИСТЕМ И СЕРТИФИКАТА ЭКСПЕРТИЗЫ РАЗРАБОТКИ ИЗДЕЛИЯ.



3. ПОЛУЧЕНИЕ СЕРТИФИКАТА НА СЕРИЮ



Динамика маркеров вирусного гепатита С



От 52 до 87 % HCV РНК поз./ анти-HCV нег. образцов, положительны в тестах 4-го поколения

Позволяют сократить период «окна» до 2-3 недель

В некоторых случаях недостаточная чувствительность при выявлении АТ



УТВЕРЖДЕНЫ
постановлением Правительства
Российской Федерации
от 31 декабря 2010 г. № 1230

Правила и методы исследований и правила отбора образцов донорской крови, необходимые для применения и исполнения технического регламента о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии

11. При определении маркеров вирусов иммунодефицита человека, гепатитов В и С и возбудителя сифилиса необходимо соблюдать следующие правила:

...

Допускается проведение исследования с целью одновременного определения наличия антител к вирусу гепатита С и антигена вируса гепатита С;



ДС-ИФА-НСV-АГАТ

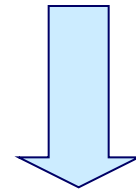
Рекомендуется для первичной лабораторной диагностики гепатита С и обследования доноров крови

- Создание и применение тестов для выявления свободного core-антигена вируса является важным шагом к снижению риска передачи вируса при гемотрансфузиях
- Поскольку длительность циркуляции свободного core-антигена в крови непродолжительна, необходимы «комбо»-тесты — для одновременного выявления вирусного антигена и антител к вирусу






Использование высокочувствительных ИФА тест-систем



- Повышение качества скрининга донорской крови
- Уменьшение риска посттрансфузионного инфицирования
- Коррекция терапии двойной инфекции.



A large crowd of people is gathered at the bottom of the frame, looking up at a sky filled with hundreds of red heart-shaped balloons. The balloons are of various sizes and are scattered across the upper two-thirds of the image. In the background, there are bare trees and a construction crane. The text "Благодарю за внимание!" is overlaid in the center of the image in a large, bold, orange font.

**Благодарю за
внимание!**

Алгоритм тестирования anti-HBc-положительных, HBsAg-отрицательных образцов

