

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЦР ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ВГВ И ВГС НА СТАНЦИИ ПЕРЕЛИВАНИЯ КРОВИ

Туполева Т.А.¹, Богословская Е.В.², Грумбова Л.О.¹, Башкирова Л.Ю.², Зайцев В.С.², Ярославцева Н.Г.¹, Тихомиров Д.С.¹, Суворова П.А.², Романова Т.Ю.¹, Гуляева А.А.¹, Орлова Г.К.¹, Цыганова Г.М.², Шипулин Г.А.², Филатов Ф.П.¹

¹ГУ Гематологический научный центр РАМН, Москва, Россия, ²ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия.

Вирусная безопасность гемотрансфузий остается одной из наиболее острых проблем Службы крови. В ее основе лежит качество отбора доноров и тестирование их на маркеры вирусных инфекций. Для серологического скрининга донорской крови в РФ используются иммуноферментные (ИФА) тест-системы на антиген (HBsAg) – для вируса гепатита В (ВГВ) и на антитела – для вируса гепатита С (ВГС). Эти тесты не охватывают весь спектр маркеров ВГВ и ВГС и не могут обеспечить 100%-го выявления инфицированных доноров. Серонегативное окно также открывает возможность допуска инфицированного донора к кроводаче.

Применение полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяет сократить негативное окно для ВГВ – в полтора раза, а для ВГС – в 3 раза [2], соответственно снижая риск передачи этих вирусов через донорскую кровь и ее препараты. В настоящее время в России ПЦР используется ограниченно - при исследовании минипулов плазмы на отдельных станциях переливания крови (СПК). В ряде стран Западной Европы, Америки и др. молекулярные методы (в частности, ПЦР) уже несколько лет используется в национальных масштабах для отбора донорской крови - в формате минипулов и даже больших производственных пулов плазмы [3]. В этих странах, характеризующихся в т.ч. низкими показателями эндемичности по ВГВ и ВГС и высококачественной системой отбора доноров, для оценки ситуации используется понятие остаточного риска инфицирования при гемотрансфузиях. Согласно данным Stramer S.L. [6] в США с внедрением молекулярных методов остаточный риск посттрансфузионного вирусного гепатита С (и ВИЧ) снизился до $1:2 \times 10^6$ донаций, а вирусного гепатита В – до $\sim 1:3 \times 10^5$ донаций. Из стран Западной Европы самые низкие показатели остаточного риска характерны для Франции: остаточный риск для вируса гепатита С составлял приблизительно $1:1,5 \times 10^6$ (до внедрения молекулярных тестов и $\sim 1:10^7$ после внедрения молекулярного тестирования за период 2001-2003 г.) [7]. Надежный расчет остаточного риска возможен только при многоцентровых исследованиях в течение, как минимум, трех лет. В нашей стране полноформатный анализ остаточного риска до последнего времени практически не проводился.

В Отделе заготовки компонентов крови ГНЦ РАМН (который соответствует небольшой станции переливания крови и называется здесь поэтому СПК) около 4,5% заготовленной крови бракуется сегодня по результатам скрининга маркеров гемотрансмиссивных инфекций; в структуре брака донорской крови ВГВ составляет 16,3%, ВГС – 26,8% [1].

Цель настоящего исследования – испытание метода ПЦР на СПК НИИ переливания крови ГНЦ РАМН - в классическом варианте с электрофоретической детекцией продуктов ПЦР и в формате реального времени (Real-Time), сравнение обоих вариантов и выбор оптимального. При этом, ставя чисто практическую задачу, мы не стремились (да и не могли – в силу принципиально невысокой частоты выявления носителей ВГВ и ВГС в условиях СПК) анализировать большое число позитивных доноров; для решения поставленных задач это не имело существенного значения.

Материалы и методы

Материалы

Образцы плазмы крови 558 доноров, полученные из отдела заготовки компонентов крови НИИ переливания крови ГНЦ РАМН, из которых пять образцов содержали антитела к ВГС и два – ВГВ-антиген HBsAg. Кровь отбирали до кроводачи в стерильную пластиковую пробирку с раствором ЭДТА (200 мкл 3% ЭДТА на 5 мл крови).

Методы

1. ПЦР: Кровь (анализу подвергалась только т.н. *теплая кровь*, полученная в день донации) центрифугировали в течение 15 мин при 2.000об/мин (800g, центрифуга CM-6.02, ELMi); плазму отбирали в пробирки *эппендорф* (100 мкл на выделение ДНК и РНК, и две пробирки по 500 мкл на хранение). Затем пробирки с оставшейся кровью передавали в группу ИФА-исследований.

Плазму пулировали, смешивая в 1,5-мл пробирке по 100 мкл каждого образца. Было изготовлено 25 пулированных образцов, из них 13 – от 6 доноров и 12 – от 12 доноров. 16 пулов были смешаны в момент разливки образцов. 9 пулов изготовлены из предварительно размороженных, находившихся на хранении при минус 80 С, образцов плазм после их предварительного тестирования.

Для выявления РНК ВГС и ДНК ВГВ использовали следующие коммерческие наборы производства ЦНИИЭ:

- в формате *реального времени*:
- АмплиСенс HCV-FRT (качественный тест на РНК ВГС)
- АмплиСенс HBV-FRT (качественный тест на ДНК ВГВ)
- АмплиСенс HCV-Монитор-FRT (количественный тест на РНК ВГС)
- АмплиСенс HBV-Монитор-FRT (количественный тест на ДНК ВГВ)
- в формате *электрофоретической детекции*:

- АмплиСенс HBV-470/770-ВКО (качественный тест на ДНК ВГВ)
- АмплиСенс HCV-240/440-ВКО(качественный тест на РНК ВГС)
- Ампли-Сенс-50-Р HCV-генотип” (определение генотипов ВГС)

Заявленная аналитическая чувствительность тест-систем составляет для АмплиСенс HCV-FRT - 100 МЕ/мл, для АмплиСенс HCV-240/440-ВКО – 1000 МЕ/мл, для АмплиСенс HBV-FRT – 100 копий/мл, для АмплиСенс HBV-470/770-ВКО - 1000 копий/мл. Линейный диапазон измерения тест-системы АмплиСенс HCV-Монитор-FRT - 500–50 млн. МЕ/мл, АмплиСенс HBV-Монитор-FRT - 300–100 млн. копий/мл.

Оборудование:

- Gene Amp PCR System 2400 фирмы “Applied Biosystemes”
- Gene Amp PCR System 9700 фирмы “Applied Biosystemes”
- Rotor Gene RG-3000 фирмы “Corbett research”

2. ИФА: проводился согласно инструкциям к наборам для определения

- ВГС: тесты на HCV Ag/Ab:
- МОНОЛИЗА Ultra HCV Ag-Ab фирмы “Bio-Rad”;
- Мюрекс анти- HCV фирмы “Abbot- Мюрекс”

3. Иммуноблот РИБА-ИБ фирмы “Орто-Кайрон”.

- ВГВ: тесты на HBsAg фирмы “Bio-Rad”:

1. МОНОЛИЗА Ultra HBsAg – скринирующий;
2. МОНОЛИЗА HBsAg (с нейтрализацией) подтверждающий.

Результаты

Детекция-идентификация вируса гепатита С.

В результате тестирования 558 образцов плазмы доноров, из которых 5 (0,9%) были серопозитивны по антителам к ВГС, методом ПЦР получено 4 положительных результата (Таблица 1). Стандартную ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации мы обозначили здесь аббревиатурой PCR, а ПЦР в формате реального времени – FRT. 3 донора были серопозитивны по анти-ВГС и по РНК ВГС, а у 1 донора сигнал на РНК ВГС при отсутствии антител к ВГС. 2 донора были положительны по анти-ВГС, но не содержали вирусной РНК. В данном случае совпадение результатов ИФА и ПЦР составило ~60%, а дополнительное выявление носительства (за счет применения ПЦР) ~ 0.2%.

Таблица 1. Результаты исследования образцов плазмы доноров на маркеры ВГС.

ИФА (анти-ВГС)	Количество образцов	ПЦР+ (РНК ВГС)	
		PCR	FRT
+	5	3	3
-	553	1	1
Всего	558	4	4

Результаты ПЦР, полученные в формате реального времени и в стандартном варианте реакции, полностью совпали. Один серопозитивный образец (№5, Таблица 2) был негативен по РНК ВГС в стандартном ПЦР и в ПЦР в формате реального времени. Еще один образец плазмы донора, содержащий анти-ВГС, был позитивен по ПЦР в формате реального времени, а при повторном тестировании негативен по FRT и по стандартной ПЦР – вероятно, в силу низкой концентрации РНК ВГС (№4, Таблица 2). Определить дальнейшую серологическую судьбу донора, позитивного по РНК ВГС при негативном ИФА, не удалось, т.к. он был снят с донорства по соматическим причинам.

Таблица 2. Детальная характеристика образцов донорской плазм, позитивных по маркерам ВГС.

№	анти-ВГС	FRT	PCR	генотип ВГС	количественная FRT
1	+	+	+	3а	10 ⁴ МЕ/мл
2	+	+	+	3а	10 ⁷ МЕ/мл
3	+	+	+	3а	7,7x10 ⁶ МЕ/мл
4	+	+ /-	-	не определяли	не определяли
5	+	-	-	не определяли	не определяли
6	-	+	+	?*	-

* - « ? » - означает, что в данном случае генотип определить не удалось.

В силу регламентированной чувствительности используемого набора определить генотипы ВГС представилось возможным только в трех положительных образцах с концентраций РНК ВГС 10⁴-10⁷МЕ/мл. Во всех случаях имел место генотип 3а, распространенный преимущественно среди лиц, страдающих наркотической зависимостью.

Детекция-идентификация вируса гепатита В.

В результате тестирования 441 образца плазмы доноров в тест-системе АмплиСенс HBV-FRT на HBV-ДНК получено 10 положительных сигналов (2,3%), из которых только один (0,2%) совпал с положительным результатом ИФА на HBsAg. Этот же образец был положительным при использовании стандартного формата ПЦР с электрофоретической детекцией (Таблица 3).

Таблица 3. Результаты исследования образцов плазмы доноров на маркеры ВГВ.

ИФА (HBsAg)	Количество образцов	ПЦР+ (РНК ВГС)	
		PCR	FRT
+	2	1	1
-	439	1	9
Всего	441	2	10

При использовании FRT-теста выявлено 9 образцов, негативных в ИФА по HBsAg (2,0%), причем один образец содержал антитела к ВГВ (анти- HBs) (Таблица 4). Вопрос о дальнейшем мониторинге доноров с целью выявления возможной сероконверсии остался открытым, т.к. эти доноры были однократными (военнослужащими).

Таблица 4. Детальная характеристика образцов, положительных по маркерам ВГВ.

№	HBsAg	анти-HBsAg, анти-HBcore, анти-HBe	FRT	PCR	Количественный FRT
1	+	не определяли	+	+	1,7x10 ³ копий/мл
2	+	Анти-HBsAg/анти-HBcore	-	-	не определяли
3	-	-	+	-	не определяли
4	-	-	+	-	не определяли
5	-	-	+	-	не определяли
6	-	-	+	-	не определяли
7	-	-	+	-	не определяли
8	-	анти-HBsAg	+	-	не определяли
9	-	не определяли	+	-	не определяли
10	-	-	+	-	не определяли
11	-	-	+	-	не определяли

Пулирование образцов плазм доноров

На наличие РНК ВГС было протестировано пятнадцать пулов: восемь пулов состояло из 6 образцов плазмы (из них три пула содержали серопозитивные образцы с концентрацией РНК 10⁴, 10⁷, 10⁶МЕ/мл) и семь – из 12 образцов плазмы доноров (два пула содержали серопозитивные образцы с концентрацией РНК 10⁴ и 10⁶МЕ/мл). Пул из 12 образцов, содержащий серонегативный образец с низкой концентрацией РНК ВГС (№6, Таблица 2.), был отрицателен. Пять пулов, содержащие позитивный образец, показали положительный результат в FRT. Пулы, состо-

ящие из негативных по РНК донорских образцов, были отрицательны (Таблица 5).

Таблица 5. Результаты тестирования пулированных образцов плазмы доноров на РНК ВГС.

N*	FRT	PCR
6 (РНК+)	+	+
6 (РНК+)	+	+
6 (РНК+)	+	+
6	-	-
6	-	-
6	-	-
6	-	-
6	-	-
12	-	-
12 (РНК+)	+	+
12 (РНК+)	+	+
12	-	-
12	-	-
12	-	-
12 (РНК+ №6)	-	-
всего позитивных по РНК ВГС пулов:	5	5

* N – величина пула, содержащего или не содержащего образец, контаминированный по РНК ВГС

На наличие ДНК ВГВ было протестировано десять пулов: пять пулов состояло из 6 образцов плазмы доноров (из них два пула содержали образец плазмы с концентрацией $1,7 \times 10^3$ копий/мл ДНК ВГВ) и пять – из 12 образцов (два содержали тот же ДНК-положительный образец плазмы).

Из четырех пулов, содержащих позитивный образец, положительным в FRT оказался только один (~25% выявления). В стандартной ПЦР тот же пул был позитивен. Пулы, состоящие из негативных по ДНК донорских образцов, были отрицательны (Таблица 6).

Таблица 6. Результаты тестирования пулированных образцов плазм доноров на ДНК ВГВ.

N*	Результат в АмплиСенс HBV-FRT	Результат в АмплиСенс-100-R HBV-470/770-ВКО
6 (ДНК+)	+	+
6 (ДНК+)	-	-
6	-	-
6	-	-
6	-	-
12 (ДНК+)	-	-
12 (ДНК+)	-	-
12	-	-
12	-	-
12	-	-
всего позитивных по ДНК ВГВ пулов:	1	1

* N – величина пула, содержащего или не содержащего образец, контаминированный по ДНК ВГВ

Для сравнения относительной чувствительности ПЦР с электрофоретической детекцией и ПЦР в формате реального времени были однократно протестированы разведения образцов с известной концентрацией РНК или ДНК. Стандартная методика продемонстрировала в ряде случаев меньшую чувствительность по сравнению с Real-Time ПЦР (результаты не представлены).

Обсуждение

Представленные результаты не противоречат тем, что были получены нами ранее при использовании стандартной ПЦР: частота выявления ДНК ВГВ у доноров с HBsAg в ~50 раз превышала такую у негативных доноров и составила 36,6% против 0,74% - соответственно (тогда); 50% и 2%, соответственно (по представленным выше данным). Обращает на себя внимание, что у половины анти-ВГС-позитивных доноров было зарегистрировано наличие РНК ВГС, тогда как среди негативных доноров положительный сигнал в ПЦР обнаружен лишь в 0,9% случаев (в выше описанном эксперименте – 60% и 0,2%, соответственно) – вполне серьезное основание для использования ИФА для обеспечения вирусной безопасности гемотрансфузий.

Возможность отбора проб на ИФА и на ПЦР из одной пробирки с образцом плазмы донора представляется удобной и целесообразной

ной, она снижает вероятность ошибки и не влечет дополнительных правовых нагрузок и нарушений действующего приказа (по объему крови донора, предназначенной для исследований).

При сравнении двух вариантов ПЦР были выявлены следующие преимущества варианта ПЦР в формате реального времени. Время постановки FRT примерно на час меньше, чем стандартной ПЦР (исключается этап электрофореза). Пробоподготовка требует около 2 часов (24 образца - один оператор). Постановка амплификации в режиме реального времени на ДНК ВГВ занимает 2 часа, ВГС – 3 часа. Анализ полученных результатов на ПК - 10-15 мин. Достоинством FRT для Службы крови (по сравнению со стандартной ПЦР) являются (а) снижение риска контаминации образцов, (б) документированный объективный ответ через 5-6 часов - при наличии отдельных амплификаторов на каждую инфекцию, а также (с) более высокая аналитическая чувствительность и большая воспроизводимость. Таким образом, ПЦР в формате реального времени является предпочтительной для внедрения в службу крови.

Пулирование исследуемых донорских образцов, используемое в ряде стран, снижает экономические затраты на проведение анализа, но одновременно снижает чувствительность метода и существенно увеличивает расход времени (в случае положительного сигнала на поиск позитивного образца требуется еще 5-6 часов).

Однако, во Франции, например, на РНК ВГС рутинно тестируют минипулы из 8-24 образцов. Это – в сравнении с ИФА (*Monolisa HCV antigen-antibody Ultra, Bio-Rad*) - позволяет выявлять на ~30% больше образцов, собранных от лиц, находящихся в серонегативном окне, которое, таким образом сокращается в среднем на 5,1 день [5].

ПЦР-скринирование пулированной плазмы на ВГВ может быть недостаточно эффективным из-за его низких концентраций в период серонегативного окна (1-2.400 геном-экв/мл [4]); это обусловлено более продолжительным временем удвоения ВГВ, составляющим 2,8 дня - по сравнению с 17 часами для ВГС и 22 часами для ВИЧ-1. ПЦР-скринирование в формате минипулов имеет минимальное преимущество и по сравнению с новыми ИФА-тестами на ВГВ (на HBsAg). В то же время ПЦР индивидуальных образцов обеспечивает обнаружение ВГВ на 25-36 дней раньше – и, конечно же, с более высокой чувствительностью, нежели эти ИФА-тесты. Однако, немало данных показывает существование HBsAg-негативной донорской плазмы, позитивной, тем не менее, по анти-HBcore и по вирусной ДНК (в концентрациях <100 геном-экв/мл).

Выводы

1. Испытания метода ПЦР на стандартной СПК (в Отделе заготовки компонентов крови НИИ переливания крови ГНЦ РАМН) показало безусловную необходимость внедрения его в практику Службы Крови России.

2. ПЦР в формате реального времени имеет очевидные преимущества перед стандартным вариантом ПЦР - в отношении чувствительности, удобства, быстроты постановки и документированного ответа.

3. Методы, выявляющие белковые маркеры вирусов гепатитов В и С, с одной стороны, и методы, выявляющие нуклеиновые кислоты этих вирусов, дополняют друг друга и не являются альтернативными.

4. Пулирование исследуемых образцов донорской плазмы при тестировании на РНК ВГС и ДНК ВГВ в наших условиях нецелесообразно, поскольку не выявляет пулы с низкими концентрациями нуклеиновых кислот.

Литература

1. Сомова А.В., Туполева Т.А., Грумбкова Л.О., Ярославцева Н.Г., Гуляева А.А., Багрянцева С.Ю., Овчинникова Е.Н., Игнатова Е.Н., Голосова Т.В., Орлова Г.К., Филатов Ф.П. Частота выявления маркеров ВИЧ и вирусов гепатитов у доноров и в компонентах и препаратах плазмы (в ИФА и ПЦР). Ж. «Вестник Службы крови России», 2005 г, № 2, стр 37-46

2. Федоров Н.А., Черкасов Е.Г., Елов А.А., Суханов Ю.С., Сущенко И.Б., Гришаев М.П.. Состояние проблемы NAT-миниупул-тестирования донорской крови на наличие HIV, HCV и HBV. Научно-практический сборник «NAT-миниупул-геноскринирование на основе международных стандартов ВОЗ – гарантия вирусной и бактериальной безопасности реципиентов». Москва-Новосибирск-Франкфурт-на-Майне, 2004, стр 3-23.

3. Федоров Н.А., Елов А.А. и др. Кн. Генамплификационное (NAT) тестирование крови и других материалов на патогены и мутации, М.2003.

4. Bush MP. Closing the windows on viral transmission by blood transfusion. In: Stramer SL., editor. Blood safety in the new millennium. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks; 2001: 33-54.

5. Laperche S., Elghouzzi V-H., Morel P. Asso-Bonnet M., Le Marrec N., Girault A., Servant-Delmas A., Bouchardeau F., Deschaseaux M., Pequet Y. Is an assay for simultaneous of hepatitis C virus core antigen and antibody a valuable alternative to nucleic acid testing? Transfusion, 2005, V.45, p. 1965-1972.

6. Stramer S.L. Viral diagnostics in the arena of blood donor screening. Vox Sang., 2004, v.87. (Suppl. 2), p.180-183.

7. Pillonel J, Laperche S. Evolution du risque transfusionnel de transmission d'infections virales (VIH, VHC, VHB) entre 1992 et 2003 en France et impact du dépistage génomique viral. Euro Surveill 2005; 10(2).