

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМ «АМПЛИСЕНС HCV-1/2/3» С ДЕТЕКЦИЕЙ ПРОДУКТОВ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ГЕНОТИПИРОВАНИЯ РНК HCV В РУТИННОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКЕ

Шипулина О.Ю., Гуцин А.Е., Миронов К.О., Носкова О.М., Шипулин Г.А.
ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Рос-
сия

Важным прогностическим маркером эффективности противовирусной терапии при инфекции вирусом гепатита С (HCV) является его генотип. Генотип HCV определяет дозу препарата и продолжительность курса лечения, что актуально, учитывая широкий спектр побочных действий и низкую переносимость интерферона в процессе терапии. Выделяют шесть генотипов вируса (1-6). Для генотипа 1 характерен крайне низкий ответ на проводимую терапию. Факторами, обуславливающими эффективность лечения, являются генотипы 2 или 3, низкая вирусная нагрузка и незначительные гистологические изменения при биопсии печени. Для практического врача, принимающего решение о назначении этиотропной терапии, результат теста, определяющего генотип вируса, не менее важен, чем определение репликативной активности HCV и вирусной нагрузки.

В настоящее время используются методики и коммерческие тест-системы на основе полимеразной цепной реакции для определения как генотипов, так и субтипов HCV. Методики, предназначенные для субтипирования как правило сложны, трудоемки, дороги и используются только для решения эпидемиологических задач. В рутинной лабораторной практике используются методики для определения только генотипов HCV, причем, спектр выявляемых генотипов часто ограничен несколькими из них, встречающимися на данной территории. Поскольку для территории России характерна циркуляция HCV генотипов 1, 2 и 3, генотип 4 представлен единичными завозными случаями, а генотипы 5 и 6 не выявлены, такой подход позволяет снизить экономические затраты на решение актуальной клинической задачи.

В Центре Молекулярной Диагностики (ЦМД) при ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора в течение длительного времени для выявления РНК HCV и определения генотипа HCV использовались ПЦР-тесты с использованием метода экстракции РНК на частицах силикагеля (РИБО-сорб) и электрофоретической детекцией продуктов амплификации – «АмплиСенс HCV» и «АмплиСенс HCV-генотипы». Аналитическая чувствительность тест-системы для выявления РНК HCV составляет 10^3 МЕ/мл плазмы, аналитическая чувствительность тест-системы для генотипирования, которая выполняется в формате «мультиплекс» не превышает 10^4 МЕ/мл плазмы, тест-система

позволяет выявлять и дифференцировать 1a, 1b, 2, 3a генотипы HCV. Удобство совместного применения этих двух тестов заключается в том, что сначала выполняется тест на качественное определение РНК HCV, в процессе которого с помощью случайных гексануклеотидов получают тотальную кДНК, содержащую продукты обратной транскрипции всех РНК. Полученная при проведении анализа кДНК затем используется в тесте для определения генотипа HCV. Случаи отрицательного результата теста для определения генотипа при положительном результате теста для выявления HCV часто связаны с низкой вирусной нагрузкой (менее 10^4 МЕ/мл), существенно реже – с присутствием в образце редкого генотипа (например, 4 генотипа HCV). В случае небольшой разницы в чувствительности тестов, доля нетипируемых образцов будет небольшой, но при увеличении чувствительности теста для выявления РНК HCV, доля нетипируемых образцов будет неизбежно увеличиваться.

Согласно требованиям международного консенсуса, тест-системы для выявления РНК HCV должны обладать высокой чувствительностью, порядка 50 МЕ/мл, поэтому с недавнего времени для выявления РНК HCV в практических лабораториях стала использоваться тест-система с детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени» «АмплиСенс HCV-FRT», чувствительность которой составляет не ниже 100 МЕ/мл. Поскольку, с увеличением аналитической чувствительности тест-системы, доля РНК HCV-положительных образцов, которые содержат вирус в низкой концентрации (менее 10^4 МЕ/мл) увеличилась, то, соответственно, увеличился и процент нетипируемых образцов при использовании тест-системы для генотипирования в формате с электрофоретической детекцией продуктов амплификации. Для решения этой проблемы мы использовали новую недавно разработанную тест-систему «АмплиСенс HCV-1/2/3». Тест-система «АмплиСенс HCV-1/2/3» разрабатывалась для определения в HCV-положительных пробах наиболее распространенных на территории России генотипов HCV (1-3), с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени; аналитическая чувствительность тест-системы «АмплиСенс HCV-1/2/3» – 500 МЕ/мл.

Цель

Адаптация тест-системы «АмплиСенс HCV-1/2/3» для использования в практической лаборатории. Анализ результатов генотипирования, определение доли и структуры нетипируемых образцов. Сопоставление результатов, полученных с помощью тест-системы «АмплиСенс HCV-1/2/3» с результатами, полученными при использовании тест-системы «АмплиСенс HCV-генотип».

Материалы и методы

Материалом для сравнительной апробации тестов являлись образцы плазмы периферической крови от пациентов, поступающие в лабораторию ЦМД. Образцы были тестированы на наличие РНК HCV

с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп» для экстракции РНК и комплекта реагентов для проведения ОТ-ПЦР с детекцией продуктов в режиме реального времени «АмплиСенс HCV FRT», вариант 100 с использованием двухканальных приборов «RotorGene3000» (Corbett Research, Австралия) в формате ротора на 72 пробирки. Всего было протестировано 753 образца, 250 из этих образцов также были протестированы в тест-системе «АмплиСенс HCV-Монитор FRT» с целью определения вирусной нагрузки. Все 753 образца выделенной РНК были протестированы с помощью теста «АмплиСенс HCV-1/2/3» для определения генотипа HCV, а 85 из этих образцов плазмы были параллельно протестированы с помощью теста «АмплиСенс HCV-генотип». Образцы, в которых генотип HCV не определялся при первичном тестировании, были протестированы повторно, с использованием двух методов экстракции РНК – «РИБО-сорб» и «РИБО-преп», с целью сравнения эффективности методик. Образцы, в которых генотип воспроизводимо не определялся, были проанализированы с помощью секвенирования. Для тестирования использовали кДНК, полученную в реакции обратной транскрипции. На первом этапе анализа амплифицировали участок кДНК с использованием специфических праймеров, позволяющих амплифицировать 5'-нетранслируемую область и часть Core-области (длина фрагмента ~670 п.о.), затем определяли последовательность амплифицированного участка. При секвенировании использованы реактивы и оборудование фирмы Applied Biosystems (США), согласно инструкции производителя. Следует отметить, что методика позволяет определить последовательность кДНК HCV в случае достаточного количества ампликона, а значит, достаточного количества исходной РНК HCV. По нашим данным, концентрация РНК в плазме клинических образцов должна быть не ниже 10^5 МЕ/мл.

Результаты

Из **753** образцов, протестированных на наличие РНК HCV 62 оказались негативными, из 691 HCV-положительных образцов в десяти образцах концентрация РНК HCV была меньше 500 МЕ/мл. При определении генотипа HCV с помощью тест-системы «АмплиСенс HCV-1/2/3» 62 негативных образца также оказались негативными, из десяти HCV-положительных образцов с низкой вирусной нагрузкой (менее 500 МЕ/мл, группа А), в четырех генотип определился. Из оставшихся 681 образца, девять образцов показали недостоверный результат (1,3%, группа Б), т.е. значения пороговых циклов (Ct) для флуоресцентного сигнала внутреннего контроля в них было больше допустимого (>35.0), следовательно, вследствие низкой эффективности экстракции РНК в этих образцах, чувствительность ее выявления была значительно ниже допустимого предела. В 348 (51,8%) образцах определился генотип 1, в 59-ти (8,8%) - определился генотип 2, в 262 (39,0%) - определился генотип 3. Только в восьми образцах (группа В) генотип не определился

при первом тестировании, что составило 1,2%, при этом концентрация РНК HCV в них была достаточно высокой, не менее 1000 МЕ/мл. 18 образцов из группы А и группы Б были тестированы повторно, начиная с этапа экстракции РНК, причем экстракцию РНК проводили параллельно с помощью комплектов реагентов «РИБО-сорб» и «РИБО-преп». Генотип в повторном тестировании определяли с помощью тест-системы «АмплиСенс HCV-1/2/3». Результаты тестирования показали, что метод экстракции РНК не влияет на чувствительность выявления и определения генотипа HCV – получено полное совпадение положительных и отрицательных результатов. Генотип не определялся во всех образцах с концентрацией РНК HCV менее 500 МЕ/мл и в одном образце с концентрацией 970 МЕ/мл. Все образцы из группы В были тестированы повторно. В таблице 1 представлены значения концентраций РНК HCV и результаты повторного тестирования с помощью тест-системы «АмплиСенс HCV-1/2/3» или секвенирования.

Таблица 1. Результаты повторного тестирования образцов, которые при первичном тестировании на генотип HCV были негативны

№ образца	Ct ВК в тесте «АмплиСенс HCV-1/2/3»	Генотип в тесте «АмплиСенс HCV-генотип»	Концентрация РНК HCV, МЕ/мл	Повторное тестирование
bd67	34.6	1b	1.1E+05	1
bd76	34.3	1b	5.8E+04	1
e3	34.7	Не типифируется	9.7E+02	3
e14	35.5	2a	1.4E+06	2
f27	34.6	1b	8.1E+05	1
dM31	35.2	Не типифируется	4.3E+04	Не типифируется*
bb8	35.5	Не типифируется	3.0E+03	Не типифируется*
bs153	34.7	Не типифируется	1.1E+05	4**

* вследствие низкой концентрации РНК HCV не удалось получить достаточное для секвенирования количество кДНК

** генотип определяли с помощью секвенирования участка 670 п.н. кДНК HCV

Из 8 образцов при повторном тестировании генотип удалось определить в пяти и три образца оказались повторно не типифируемыми. При попытке протипировать эти образцы с помощью теста секвенированием, в двух образцах не удалось получить продукт амплифицированной кДНК вследствие низкой концентрации РНК HCV в плазме. Из плазмы третьего образца удалось получить достаточное для секвенирования количество ампликона. Результаты секвенирования этого образца показали его принадлежность к **четвертому** генотипу. Таким образом, доля

образцов с высокой концентрацией РНК HCV, нетипируемых по причине содержания другого генотипа, составляет, по нашим данным, не более 0,015% к общему количеству HCV-положительных образцов (1/681). Доля образцов с достаточной концентрацией РНК (более 500 МЕ/мл) нетипируемых как при первичном, так и при повторном тестировании с помощью тест-системы «АмплиСенс HCV-1/2/3» составляет 0.44% (3/681).

Из 85 образцов, типированных с помощью тест-системы «АмплиСенс HCV-генотип», 8 были негативны, нетипировалось 11 образцов, что составляет 14,3%, из них образцов с достаточной для типирования вирусной нагрузкой ($>10^4$ МЕ/мл) было 7 (9,1%). Таким образом, эффективность выявления генотипов с помощью этой тест-системы значительно ниже. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Результаты тестирования образцов, нетипируемых в тесте «АмплиСенс HCV-генотип»

№ образца	Результаты типирования в тесте «АмплиСенс HCV-1/2/3» (Ct)					Концентрация РНК HCV, МЕ/мл
	Fam (1)	Joe (2)	Rox (3)	Cy5 (VKO)	генотип	
bd119		34.5		34.3	2	2.0E+05
be86	34.6			34.3	1	2.2E+04
de5			34.3	42.5	3	4.0E+03
e3			35.2	34.7	3	9.7E+02
e4			30.5	34.3	3	2.5E+05
bf45			30.9	34.1	3	2.3E+04
bf68	34.6		35.3	34.7	1+3	9.9E+03
bh97		26.3		36.0	2	1.6E+07
d110	32.2			35.1	1	9.0E+03
bd24		31.4		37.1	2	1.0E+05
bf36	29.4			35.1	1	1.7E+05

Заключение

Использование в практической лаборатории адаптированных тестов «АмплиСенс HCV-FRT» и «АмплиСенс HCV-1/2/3» для выявления и генотипирования РНК HCV в формате ОТ-ПЦР с детекцией продуктов в режиме реального времени позволило упростить процедуру выполнения ПЦР-анализа, а также увеличить чувствительность выявления РНК HCV с 1000 МЕ/мл до 100 МЕ/мл и снизить процент HCV-позитивных нетипируемых образцов с 14,3% до 1,5%.