

Скрининг донорской крови с помощью молекулярно-генетических методов

Богословская Е.В., Цыганова Г.М., Шипулин Г.А.

ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва

В России распространение ВИЧ-инфекции и вирусных гепатитов приобрело характер эпидемии, что в свою очередь привело к повышению числа инфицированных лиц среди доноров крови. Обязательное тестирование донорской крови с помощью серологических методов на наличие антител к ВИЧ и вирусу гепатита С, а также на HBs-антиген вируса гепатита В значительно сократило риск переливания инфекционно опасной крови от донора к реципиенту. Однако серологические методы в ряде случаев бывают не эффективны для обнаружения инфицированной крови, в первую очередь из-за наличия так называемого «серологического окна» – периода времени от внедрения инфекционного агента в организм человека до выработки специфических антител. Наибольшую проблему в этом плане представляет вирус гепатита С, поскольку его отличает высокая скорость репликации и позднее появление специфических антител.

Сокращение «серологического окна» возможно с помощью прямых методов выявления инфекционного агента. Одним из таких методов является выявление антигенов вируса. Так, в последние годы для диагностики ВИЧ кровь тестируют на наличие p24-антигена в комплексе с антителами к ВИЧ. Однако максимальной чувствительностью обладают тесты, направленные на выявление нуклеиновых кислот вирусов. В англоязычной литературе такие тесты называют NAT-тестами (Nucleic Acid Tests).

За рубежом первые попытки внедрения NAT в службу крови были предприняты еще в 1995 году. За период с 1998 по 2000 годы в США, Канаде, Австралии, Японии и во многих Европейских странах NAT-методы были внедрены для тестирования всех компонентов крови [3]. В первую очередь молекулярные методы были использованы для выявления РНК вируса гепатита С (HCV).

По официальным данным американской организации «Красный крест» с помощью NAT тестов было обследовано более 48 миллионов доноров, и 196 человек

из них оказались позитивными по РНК HCV при отсутствии антител [9]. Таким образом, из 245000 серонегативных образцов один образец оказывался положительным по содержанию РНК HCV. В год таких случаев регистрируется от 30 до 35. С момента повсеместного введения NAT тестов для диагностики вируса гепатита С был опубликован только один случай инфицирования реципиента, причем донорская кровь была протестирована в формате мини-пула на наличие РНК HCV и для нее был получен отрицательный результат [11]. Ретроспективное исследование данного образца крови показало очень низкий уровень вирусной нагрузки в исследуемом материале.

Внедрение NAT методов за рубежом позволило в 10 раз снизить риск инфицирования вирусом гепатита С по сравнению с использованием одних только серологических методов диагностики. В США остаточный риск инфицирования вирусом гепатита С снизился до одного случая на 2 миллиона доноров [5]. Этот же показатель для Европейских стран приблизительно в 5 раз ниже и составляет 1-2 случая на 10 млн. [7].

По официальным данным [8] в США с марта 1999 года по январь 2002 года пять лабораторий с помощью теста «Gen-Probe assay» обследовали 27956758 донаций на наличие РНК ВИЧ, тринадцать лабораторий протестировали 9207296 донаций с помощью теста «Cobas AmpliScreen HIV-1». По результатам исследований один образец на 3,1 миллиона обследованных дал положительный результат на наличие РНК ВИЧ (всего 12 образцов) и отрицательный результат на наличие антител к ВИЧ. Разница в результатах лабораторий, использующих разные тесты, не наблюдалась. Было установлено, что скрининг донорской крови с помощью NAT-тестов снижает остаточный риск инфицирования ВИЧ-1 приблизительно до 1 случая на 2 миллиона донаций для повторных доноров, по сравнению с цифрами о возможности 1 случая инфицирования ВИЧ-1 на 1,5 миллиона доноров в случае проведения скрининга только с помощью серологических

тестов [5]. Полученные данные приведены с учетом проведения NAT-тестирования в формате мини-пулов [4], индивидуальное тестирование каждого образца приведет к еще большему снижению остаточного риска инфицирования, однако, это будет также сопровождаться увеличением стоимости анализа.

Современные тесты, основанные на обнаружении нуклеиновых кислот, позволяют с вероятностью 95% для вируса гепатита С и ВИЧ выявлять образцы с вирусной нагрузкой от 30 до 60 копий/мл [14]. Высокая аналитическая чувствительность NAT методов позволяет тестировать как индивидуальные образцы, так и несколько образцов крови (от 6 до 24), объединенных в один мини-пул [14].

Несмотря на то, что тестирование индивидуальных образцов крови позволяет увеличить чувствительность выявления инфекционных образцов, на практике это позволяет выявлять дополнительно около 1-2 случаев инфицированных образцов на 10 миллионов доноров [1, 2].

В тоже время преимущество тестирования именно индивидуальных образцов крови подтверждается публикацией нескольких случаев инфицирования реципиентов при переливании крови, причем, в крови донора РНК ВИЧ или гепатита С не обнаруживали при скрининге в формате мини-пула в силу низкой концентрации вируса. Так, в США было зарегистрировано 3 случая переливания препаратов крови, инфицированных ВИЧ, для которых были получены отрицательные результаты при NAT-тестировании [4, 10, 13]. В одном случае, инфицирование произошло при переливании эритроцитов крови, содержание РНК ВИЧ в инфицированном препарате было менее 150 копий/мл. Еще один случай произошел в Южной Африке. Донором был 53 летний мужчина, в крови которого не было выявлено ни антител, ни р24 антигена, ни РНК ВИЧ. Позднее ретроспективно была определена концентрация РНК ВИЧ в порции перелитой крови, которая составила 12 копий/мл [6].

Что касается вируса гепатита В, то молекулярные методы, направленные на выявление ДНК HBV, широко не использовались за рубежом в службе донорской крови. Во многих эндемичных странах для скрининга применяются высокочувствительные тесты для обнаружения HBsAg в сочетании с тестами для обнаружения anti-HBc антител, однако опубликовано очень мало данных об остаточном риске инфицирования вирусом гепатита В [3]. Предполагается, что в США эта цифра колебалась от 1 на 205000 до 1 на 488000 доноров в период с 1995 по 2001 годы [5]. Хотя остаточный риск заразиться вирусом гепатита В выше, чем вирусом гепатита С или ВИЧ,

клинические случаи заражения HBV-инфекцией, связанные с переливанием крови или ее компонентов редко публикуются. Причинами тому могут быть недостаточность проводимых исследований, небольшое количество информации об инфицированных реципиентах, бессимптомное течение заболевания (у 95% инфицированного взрослого населения), а также активная вакцинация населения [12].

Низкая активность внедрения молекулярных тестов для выявления ДНК HBV в препаратах крови связана с неэффективностью таких тестов при тестировании мини-пулов. Сокращение периода серологического окна на 14 дней (от 1 до 18 дней) было показано на панели образцов пациентов на разных стадиях сероконверсии, протестированной с помощью NAT тестов в индивидуальных образцах. В случае тестирования мини-пулов продолжительность серологического окна сокращается всего на 6 дней (от 3 до 8 дней), если пул состоит из 8 индивидуальных образцов, и на 3 дня (от 0 до 5 дней), если пул состоит из 16 образцов. В том случае, если размер мини-пула увеличивали до 24 образцов, сокращение периода серологического окна не наблюдалось. Таким образом, было показано, что тестирование крови на наличие вируса гепатита В с помощью NAT методов в формате мини-пулов имеет небольшую диагностическую ценность по сравнению с высокочувствительным тестом по выявлению HBsAg.

Если в развитых странах данные по остаточным рискам вирусного инфицирования публикуются регулярно, то у нас в стране аналогичных данных нет. Согласно изданным за последние пять лет приказам Министерства здравоохранения и Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации: № 311 от 18. 08. 2000 г., «О мерах по повышению безопасности гемотрансфузий»; № 244/63 от 3. 07. 2001 г. «О внедрении в работу учреждений службы крови устройств для удаления лейкоцитов из донорской крови»; № 193 от 7. 05. 2003 г. «О внедрении в практику работы службы крови в Российской Федерации метода карантинизации свежезамороженной плазмы» органы здравоохранения субъектов Российской Федерации обязаны создать условия для полномасштабного внедрения методов лабораторного тестирования крови доноров, карантинизации плазмы, лейко- и микрофилтрации для предупреждения посттрансфузионных осложнений.

Карантинизация плазмы и лейкофилтрация донорской крови находятся в России до сих пор на стадии внедрения. Методы NAT-диагностики, а также вирус-

инактивации плазмы практически не применяются, на этот счет отсутствуют какие-либо директивные документы Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации. Это привело к тому, что сегодня в Российской Федерации на каждые 5000 гемотрансфузий имеется один случай гепатита В, гепатита С на каждые 2000 трансфузий и ВИЧ - инфекция 1 случай на 600 000 трансфузий по данным материалов Коллегии МЗ РФ от 2001 г., обсуждавшей проблему: «О состоянии заболеваемости вирусными гепатитами в Российской Федерации».

В настоящее время разработано несколько коммерческих тестов, основанных на молекулярных методах и предназначенных для скрининга донорской крови. К наиболее известным и широко используемым за рубежом относятся тест-системы «Procleix» фирмы Gene Probe, «UltraQual» Национального Института Генетики США, «AmpliScreen» фирмы Хоффманн-Ля Рош. В России NAT-тестирование проводится только в добровольном порядке и только в некоторых регионах, поскольку требует серьезных денежных вложений, специальных лабораторий и грамотного, хорошо обученного медицинского персонала. Те единичные станции переливания крови (СПК), которые используют молекулярные методы, работают только на отечественных тест-системах. Ни одна из зарубежных тест-систем не используется в службе крови в нашей стране из-за крайне высокой стоимости, в ряде случаев низкой пропускной способности и необходимости закупки дорогостоящего оборудования.

Необходимым условием внедрения NAT в отечественную службу крови является наличие зарегистрированных тест-систем, которые будут обладать следующими характеристиками:

- доступность для Российского здравоохранения (низкая себестоимость);
- высокая аналитическая чувствительность;
- высокая пропускная способность (возможность работы с мини-пулами);
- возможность автоматизации.

В последние годы широкое распространение получает метод ПЦР с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени (Real-Time ПЦР). В основе метода лежит зависимость между количеством специфического продукта амплификации и величиной флуоресцентного сигнала, который детектируется непосредственно в процессе ПЦР. Высокая популярность метода связана с целым рядом преимуществ по сравнению

с традиционными подходами. Во-первых, отсутствие отдельного этапа работы с ампликонами приводит к снижению риска контаминации и таким образом позволяет упростить требования, предъявляемые к организации ПЦР-лаборатории. Во-вторых, отсутствие отдельной стадии детекции продуктов ПЦР приводит к сокращению времени анализа и его себестоимости. В-третьих, метод Real-Time ПЦР позволяет проводить количественные измерения, причем в отличие от традиционных методов, он обладает более широким линейным диапазоном измерения концентрации нуклеиновых кислот. Высокая аналитическая чувствительность метода в совокупности с выше перечисленными преимуществами позволяет рассматривать его как наиболее предпочтительный метод для использования его при обследовании донорской крови.

Одной из основных причин низкой пропускной способности лабораторий СПК на сегодняшний день является необходимость тестирования крови на 3 инфекционных маркера, т.е. каждый исследуемый образец должен быть протестирован трижды. Поэтому для службы крови наиболее предпочтительной будет тест-система, позволяющая одновременно выявлять ВИЧ, HCV и HBV. Использование автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот в комплексе с методом Real-Time ПЦР позволяет максимально автоматизировать процедуру тестирования, что сводит к минимуму число лабораторных ошибок и повышает пропускную способность лаборатории. Наиболее актуально использование автоматических станций, позволяющих работать с мини-пулами объемом 1 мл. Это позволит одному врачу-лаборанту проводить тестирование до 200–300 образцов донорской крови в формате мини-пулов в течение 4–5 часов без потери аналитической чувствительности.

Таким образом, актуальность внедрения молекулярных методов в службу крови России не вызывает сомнения, поскольку это позволит сократить остаточный риск инфицирования, связанный как с наличием «серологического окна», так и с лабораторными ошибками. Доказательством тому служит опыт других стран, использующих NAT-скрининг в службе крови на протяжении 10 лет. Быстрые темпы развития ПЦР-индустрии в России позволят в ближайшее время иметь в арсенале дешевые отечественные тесты, обладающие необходимыми аналитическими характеристиками для использования их в скрининге донорской крови.

* Список литературы находится в редакции