

В.С. МАЛЫШЕВ,
А.Г. ТОНЕВИЦКИЙ,
А.М. ВЕДЯКОВ,
О.Е. ПОТЕХИН,
Н.А. АРЕФЬЕВА,
Ю.В. СЕРГЕЕВ, В.Г. ЛУНИН.
Центральная клиническая
больница
Медицинского центра
УД Президента РФ,
Институт
трансплантологии
и искусственных органов
МЗ РФ,
Институт аллергологии
и клинической иммунологии,
Москва.

УДК 616.36-002:678:233.444

ВЫЯВЛЕНИЕ РНК ВИРУСА ГЕПАТИТА С У ДОНОРОВ КРОВИ

При обследовании доноров на трансмиссивные инфекции на первое место по распространенности за последние годы вышел вирусный гепатит С (ВГС). Серопозитивные к ВГС лица составляют, по нашим данным, 1,7 % среди первичных доноров. Тесты иммуноблотта на анти-ВГС, применяемые в качестве подтверждающих при положительных/сомнительных результатах ИФА, при исследовании доноров отличаются высоким процентом неопределенных результатов. В группе доноров, отведенных от кроводач по наличию анти-ВГС (18 человек), с сомнительными результатами в иммуноблотте LiaTek HCV III на анти-ВГС (1 человек) или по эпидемиологическим показателям провели повторный анализ на РНК ВГС с помощью двухстадийной (nested) ПЦР (разработка НИИТиИО) и в тесте “Amplicor HCV-test” (Roche) спустя 6-24 месяцев после отвода. Обнаружено наличие РНК ВГС у 5 доноров (25%). Отмечено полное совпадение результатов, полученных в двухстадийной ПЦР и в “Amplicor HCV-test”.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: вирус гепатита С, РНК, доноры крови, ПЦР.

DETECTION OF HCV RNA IN BLOOD DONORS

MALYSHEV V.S., TONEVITSKIY A.G., VEDIACOV A.M., POTEXIN O.E., AREPHEVA N.A.,
SERGEEV J.V., LUNIN N.A.

Central Clinica Hospital, Institute of Transplantology, Institute of Allergology
and Clinical Immunology, Moscow, RF

HCV as a transfusion transmitted virus appears as an actual problem of Blood service. The aim of this study is to evaluate the prevalence of serum HCV RNA among blood donors. 20 blood donors with anti-HCV AB were included in the study. HCV RNA was detected by nested PCR. Only 5 of 20 blood donors (20%) were positive in our nested PCR and in “Amplicor HCV-test” (Roche), but earlier 13 of them (65%) were positive in screening PCR. Additionally HCV RNA was detected in one anti-HCV EIA-negative, LIA-weak-positive serum sample. We concluded that weak result in serological tests serum samples should be tested by PCR.

KEY WORDS: HCV, RNA, PCR, Blood donors.

Вирус гепатита С (ВГС) является причиной большинства случаев гепатитов “ни А, ни В” с парентеральным механизмом передачи. ВГС относится к семейству флавивирусов с одноцепочечным РНК-геномом. ВГС-инфекция представляет серьезную проблему для здравоохранения из-за высокой частоты развития хронического гепатита С (хронизация у 75-80 %), с риском развития цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы [3].

Заражение ВГС индуцирует выработку антител к ВГС (анти-ВГС), которые, ввиду высокой хронизации инфекции, рассматриваются в качестве маркера инфицирования. Уровень анти-ВГС позитивных лиц колеблется от 0,2 - 0,6 % в Северной Европе до 4 - 20 % в Африке. В России анти-ВГС выявляется у 1 - 3 % населения, с более высокими показателями в Сибири и на Дальнем Востоке. При этом наблюдается дальнейший рост числа инфици-

рованных [1]. При скрининге донорской крови определяют антитела к вирусу гепатита С. Однако данный подход не в полной мере предотвращает случаи посттрансфузионных гепатитов [6]. В связи с этим в некоторых странах Западной Европы с 1999г. введено обязательное тестирование донорской крови на РНК ВГС, основанное на полимеразной цепной реакции (ПЦР) и широко применяемое в диагностике и мониторинге ВГС-инфекции [2].

Цель работы

Оценка актуальности тестирования доноров крови на РНК ВГС с помощью различных ПЦР-методик: двустадийной (nested) и теста Amplicor hepatitis C virus test (Roche).

Материалы и методы. В работе рассмотрены результаты исследования, выполненного в Центральной клинической больнице МЦ УД Президента РФ и в НИИ-ТиИО МЗ РФ. Было обследовано 20 доноров отделения “Банк крови” с положительными/сомнительными данными при тестировании на анти-ВГС. Данные по биохимическим показателям (активность трансаминаз АЛТ и АСТ) и маркеры вирусного гепатита В (антитела к HBs и к HBc) получены при рутинном обследовании доноров. Подробная характеристика доноров представлена в таблице 1.

Определение антител против вируса гепатита С

Скрининг сыворотки крови доноров проводили при каждой кроводаче с помощью иммуноферментной тест-системы UBI HCV EIA 4.0 (United Biomedical Inc. USA). Данная тест-система содержит сорбированные синтетические пептиды, соответствующие основным антигенным участкам белков ВГС: *Core*, *NS3*, *NS4* и *NS5*, что позволяет выявлять антитела класса IgG соответствующей специфичности в сыворотке крови. Анализ спектра специфичности антител к белкам ВГС проводили в тесте иммуно-блотта с помощью тест-системы LiaTek HCV III (Organon Teknika), позволяющей отдельно учитывать следующие специфичности антител: *Core* (2 специфичности), *E2/NS1*, *NS3*, *NS4* и *NS5*. Данные до 1996 г. получены при использовании более ранней версии тест-системы LiaTek, включавшей аналогичные пептиды, за исключением *E2/NS1* и *NS5*.

Детекция РНК ВГС с помощью тест-системы Amplicor hepatitis C virus test. Детекцию РНК вируса гепатита С проводили согласно инструкции, прилагаемой фирмой. Амплификацию осуществляли на амплификаторе Perkin Elmer 2400.

Детекция РНК ВГС методом двустадийной (nested) ПЦР с использованием фермента Tth-

ДНК-полимеразы. Для выделения РНК использована модифицированная методика, описанная ранее[5]. РНК выделяли из 200 мкл плазмы. Полученную РНК растворяли в 15 мкл буфера для элюции РНК. Для синтеза кДНК и 1 раунда ПЦР 10 мкл полученной РНК. Реакцию обратной транскрипции (RT) и 1-й раунд ПЦР проводили в объеме 25 мкл в одной пробирке с использованием фермента Tth-полимеразы с высокой степенью RT-активности (ВНИИ СБ РАСХН, Россия). Реакционная смесь для 1-раунда ПЦР состояла из 1X Tth one tube RT-PCR буфера, 2,5 Ед Tth-днк-полимеразы 0,2 мМ каждого из 4, дезоксинуклеозидтрифосфатов (дАТФ, д ЦТФ, дТТФ, дГТФ), 10 мкл РНК и по 10 пмоль внешних праймеров [8]:

5'-3' - ctg tga gga act act gtc tt- прямой

5'-3' - tat cag gca gta cca caa gg-обратный

Для 2 раунда ПЦР брали 0,5 мкл продукта 1 раунда амплификации. 2-й раунд ПЦР проводили с помощью Taq ДНК-полимеразы в объеме 25 мкл. ПЦР проводили в объеме 25 мкл. Стандартная реакционная смесь включала: 67 мМ Трис-НСl (рН 8,4), 16 мМ сульфата аммония, 2,5 мМ MgCl₂ 0,125 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 8% глицерин, 0,001% ксиленианол, 2,5 Ед Taq-ДНК-полимеразы (ВНИИ СБ РАСХН, Россия), 0,2 мМ каждого из четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов и по 8 пкмоль внутренних праймеров [8]:

5'-3' - ttc acg cag aaa gcg tct ag - прямой

5'-3' -acc caa cac tac tcg gct ag - обратный

RT-ПЦР проводили на многоканальном амплификаторе “Терцик” МС-2 (ДНК-технология, Россия) по следующей программе:

RT + 1 раунд ПЦР:

75⁰ С – 5 мин., 56⁰ С – 35 мин., 94⁰ С – 2 мин.,

затем

94⁰ С – 10 сек

56⁰ С – 10 сек

72⁰ С – 10 сек

40 циклов

2 раунд ПЦР:

94,5⁰ С – 2 мин

95⁰ С – 10 сек

55⁰ С – 10 сек

72⁰ С – 10 сек

28 циклов

Детекцию продуктов реакции проводили методом электрофореза в 2% агарозе с 0,001% этидиум бромидом, с последующей визуализацией в ультрафиолете на трансиллюминаторе. Для исключения ложноположительных результатов вследствие контаминации детекцию продуктов ПЦР и работу с продуктами 1 раунда проводили в отдельных комнатах, 30% исследуемых образцов составляли негативные контроли.

Таблица 1

**Характеристика группы доноров крови,
отведенных от кроводач по показателям риска инфицирования ВГС**

№	Донор	Г/р /Пол	Профессия	Стаж донорства	Причина и дата отвода	Анти-ВГС повторно	Иммуноблотт Lia Tek/ Lia TekII (месяц,год)	РНК ВГС Исходно	РНК ВГС Тесты*: Amplisor /НИИТи ИО	Биохимия** (год)	Маркеры: АтНВс АтНВс
1	Абр.	60 Ж	Гос. служ.	С 1995г.	Ат-ВГС 03.95	Сомн. 08.98	10.98 следы Cor1	+ 06.99	- / -	Н	Полож Полож
2	Алб.	61 Ж	Гос. служ.	С 1995г.	Ат-ВГС 08.98	Сомн. 10.98	10.98 следы NS5	- 06.99	- / -	Н	Отр Отр
3	Ащ.	58 М	Строитель	Перв.	Ат-ВГС 01.99	+ 03.00	03.00 Cor2+, NS3+ NS4++	- 07.99	- / -	Н	Отр Отр
4	Бир.	53 Ж	Мед/с	С 1972г.	Ат-ВГС 01.95	+ 02.00	02.00 Cor1,2, NS3,4,5+++	+ 07.97	- / -	В 96 ^х10	Отр Отр
5	Бат.	68 Ж	Врач	С 1994г.	Ат-ВГС 06.98	+ 02.00	11.98 NS4+/- 02.00 NS4,5+	- 07.98	- / -	Н	Отр Отр
6	Вай.	70 Ж	Мед/с	С 1994г.	Ат-ВГС 10.98	Сомн. 03.99	10.98 отр	+ 07.99	- / -	Н	Отр Отр
7	Ган.	59 М	Техник	Перв	Ат-ВГС 08.96	+ 03.00	03.00 Cor1,2, NS3,4,5 +++	+ 06.98 - 07.99	+ / +	В 96 ^х10	Отр Отр
8	Г-а	59 Ж	Лаборант	С 1993г.	Ат-ВГС 12.97	Сомн. 10.98	12.96 сл. Cor 11.98 отр	+ 06.99	- / -	Н	Отр Пол
9	Даг.	68 Ж	Студ. м/уч.	Перв	Ат-ВГС 04.98	+ 04.00	02.00 Cor1,2, NS3,4,5 +++	+ 04.98	+ / +	Н	Отр Отр
10	Каф.	60 Ж	Лаборант	С 1998г.	Ат-ВГС 10.98	Сомн. 04.00	10.98 сл. NS4 11.98 отр	+ 06.99	- / -	Н	Пол. Отр
11	Кол.	50 Ж	Врач	С 1972г.	Ат-ВГС 04.96	+ 12.96	12.96 сл. Cor	- 07.97	- / -	Н	Отр Отр
12	Ков.	69 Ж	Мед/с	С 1993г.	Блотт АтВГС+ 12.93	Сомн. 11.95 -11.98	02.94 сл. NS4 10.98 отр 11.99 сл. NS4	- 06.99	+ / +	Н	Отр Отр
13	Куз.	50 Ж	Мед/с	С 1970г.	Ат-ВГС 01.95	+ 02.00	1.95 Cor+ 02.00Cor1+++ NS3,4 ++	- 06.99	- / -	Н	Отр Отр
14	Куп.	53 Ж	Гос. служ.	С 1997г.	Ат-ВГС 01.98	+ 11.98	11.98 отр	+ 06.99	- / -	Н	Отр Отр
15	Куц.	63 Ж	Мед/с	С 1991г.	Ат-ВГС 05.93	+ 09.95	05.93 отр 11.93 слNS3,4	+ 04.96	- / -	Н	Отр Отр
16	Лун.	56 Ж	Дом/х	С 1997г.	Ат-ВГС 10.98	Сомн. 05.98	10.98 отр	- 06.99	- / -	Н	Отр Отр
17	Мар.	62 Ж	Мед/с	С 1996г.	Ат-ВГС 04.98	+ 11.98	10.98 сл NS3	+ 06.99	- / -	Н	Отр Отр
18	Пет.	41 Ж	Врач	С 1992г.	Ат-ВГС 11.93	+ 02.00	01.94 NS4+++ 02.00 Cor1,2, NS3,4 +++	+ 04.98 06.99	+ / +	В 94 ^ х5	Отр Отр
19	Рас.	65 М	Строитель	С 1995г.	Эпид. показ-я	+ 10.98	10.98 отр	+ 06.99	- / -	Н	Отр Отр
20	Усм.	76 Ж	Студ.	Перв.	Ат-ВГС 06.99	+ 02.00	11.99 Cor1,2, NS3,4,5+++	+ 06.99	+ / +	Н	Отр Пол

* – анализы выполняли 03-04.00 одновременно, в разных лабораториях

** – включает оценку уровня трансаминаз: АЛТ и АСТ (нор – в пределах нормы, ^ - повышена)

Н – норма, Отр - отрицательно, Сомн – сомнительно

Результаты и обсуждение

При тестировании системой “Amplicor HCV-test” РНК HCV была обнаружена у 5 из 20 исследованных доноров крови (25 %). С помощью разработанной двустадийной (nested) ПЦР РНК HCV была выявлена в сыворотках крови тех же доноров, что и предыдущей методикой (Таблица 1). При этом оба вида ПЦР анализа проводили в начале 2000 года практически одновременно (но в разных лабораториях) с идентичными образцами замороженной сыворотки крови.

При сравнении полученных данных с результатами ПЦР-анализа, проведенного ранее (главным образом в середине 1999 года) для данной группы доноров в различных лабораториях, отмечается значительно большая частота выявления РНК ВГС - у 14 человек (70 %).

Отмечено, что РНК ВГС обнаруживали в ряде случаев при сомнительных данных о наличии анти-ВГС (доноры 1, 6, 9, 11) и даже при их отсутствии в скрининговом тесте (донор 13). При этом в последнем случае положительный результат на РНК был ассоциирован с минимальным уровнем анти-NS4 антител, определяемых только в иммуноблотте.

Повышение активности трансаминаз в сыворотке крови во время отвода донора было только у 3 доноров (12%). Не обнаружено изменения в частоте исследованных маркеров вирусного гепатита В в анализируемой группе доноров относительно остальных доноров.

С момента открытия ВГС в 1989г. выявление антител стало основным методом диагностики этой инфекции. При этом повышение надежности тест-систем шло путем расширения спектра используемых синтетических или рекомбинантных полипептидов [4]. Используемые в настоящее время тест-системы третьего поколения включают, наряду с антигенами нуклеокапсида (Сог-пептиды), основные неструктурные белки: NS3, NS4, NS5. Однако даже в таких тест-системах выявление анти-ВГС становится возможным только спустя 12 – 20 недель после заражения [7]. Таким образом, на протяжении серонегативного периода, а также в случае угнетенного антителообразования, единственным методом профилактики посттрансфузионного заражения ВГС является выявление РНК ВГС [6] .

Выбор представленной группы доноров для повторного ПЦР-анализа на РНК ВГС в значительной степени был связан с задачей уточнения уровня вирусносительства среди анти-ВГС позитивных или сомнительных доноров. Полученные с использованием наборов Amplicor test и двустадийного собственного ПЦР-набора данные подтвердили наличие РНК ВГС только у 4 из 14 ранее РНК-позитивных доноров (28,6%) и позволили обнаружить РНК у 1 из 6 ранее РНК-негативных доноров (16,7%). Учитывая высокую чувствительность и специфичность результатов, получаемых в Amplicor hepatitis C virus test, а так же их идентичность с данными собственного ПЦР-анализа (nested-ПЦР), следует признать значительный уровень ложноположительных результатов данных ПЦР-анализа, полученных ранее при исследовании данной группы доноров в других лабораториях. Отсутствие ложноположительных результатов при использовании высокочувствительной методики nested-ПЦР можно объяснить строгим разделением отдельных стадий анализа, а также применением фермента Tth-ДНК-полимеразы с высокой степенью обратнотранскриптазной активностью. Данное свойство фермента позволяет объединять этапы RT и 1-й раунд амплификации в одной пробирке и уменьшить объем манипуляций.

Выявление РНК ВГС у одного из ранее РНК-негативных доноров свидетельствует о недостаточной чувствительности одностадийного ПЦР. Этот пример также указывает на возможность вирусносительства при минимальном уровне антител у доноров.

Выводы:

1. Представленный двустадийный метод ПЦР анализа на РНК ВГС сопоставим по чувствительности и специфичности с методом Amplicor hepatitis C virus test (Roche).

2. На фоне отрицательных результатов в ИФА тестах на наличие антител к ВГС в крови доноров возможно достоверное обнаружение РНК ВГС с помощью ПЦР.

3. Использование метода ПЦР в массовом скрининге донорской крови на наличие РНК ВГС может сопровождаться появлением как ложнонегативных, так и ложноположительных результатов, что требует дополнительных исследований с помощью сертифицированных тест-систем.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Г.С. Коршунова / В Сб.: “Гепатит В, С и D - проблемы диагностики, лечения и профилактики”- М.:1999.-С.111-112.

2. Н. А. Федоров, В. П. Чуланов, Е. В. Волчкова и др. // Российский журнал гастроэнтрологии, гепатологии, колопроктологии.- 1995.- N 4. - том 3 - С. 12-15.
3. Ш. Шерлок, Дж. Дули. Заболевания печени и желчных путей. – М.: Гэотар Медицина, 1999 - 859 С.
4. Alter HJ. // Hepatology - 1992 – 15 – p.350-353.
5. P. Chomczynski, N. Sacchi //Analyt. Biochem.- 1987.- Vol.162., - P.156-159.
6. Farci P, London WT, Wong DC at al. // J Infect Dis. – 1992 – 165 – p.1006-1011.
7. Huber KR, Sebesta C, Bauer K. // Hepatology, 1996 – 24 – p.471-473.
8. Okamoto H., Sugiyama Y., Okada S. et al. // J. Gen. Virol.. – 1992.- Vol. 73 – P. 673-679.