

**Фонд «Служба крови – людям»  
Центр крови Минздрава России  
НИИ средств диагностики ЗАО «Вектор-Бест»  
Институт трансфузионной медицины и иммуногематологии  
Красного креста Германии**

# **NAT-МИНИПУЛ-ГЕНОСКРИНИРОВАНИЕ КРОВИ НА ОСНОВЕ МЕЖДУНАРОДНЫХ СТАНДАРТОВ ВОЗ – ГАРАНТИЯ ВИРУСНОЙ И БАКТЕРИАЛЬНОЙ БЕЗОПАСНОСТИ РЕЦИПИЕНТОВ**

Российско-немецкий научно-методический сборник

*По инициативе и под научной редакцией члена международной рабочей группы ВОЗ по стандартизации методов генной амплификации (NAT) для тестирования вирусной безопасности донорской крови (SoGAT) – профессора Федорова Николая Алексеевича.*

*Общая редакция – директора НИИ средств диагностики ЗАО «Вектор-Бест» кандидата химических наук Гришаева Михаила Петровича.*

Москва – Новосибирск – Франкфурт-на-Майне  
2004

## АВТОРСКИЙ КОЛЛЕКТИВ:

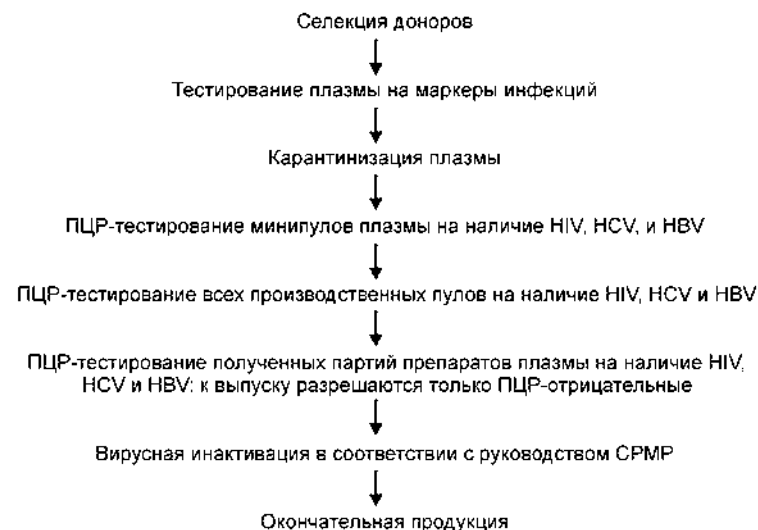
Бур С.<sup>1</sup>  
Вайхерт В.<sup>1</sup>  
Валид Сирайс В.<sup>1</sup>  
Вебер М.<sup>1</sup>  
Гришаев М.П.<sup>2</sup>  
Дростен К.<sup>1</sup>  
Ёлов А.А.<sup>3</sup>  
Жибурт Е.Б.  
Зайфрид Э.<sup>1</sup>  
Курт Рос В.<sup>1</sup>  
Петерсен Д.<sup>1</sup>  
Суханов Ю.С.<sup>4</sup>  
Сущенко И. Б.<sup>3</sup>  
Фёдоров Е.Н.<sup>4</sup>  
Фёдоров Н.А.<sup>3</sup>  
Хеджес Д.<sup>1</sup>  
Черкасов Е.Г.<sup>3</sup>

1. Институт трансфузионной медицины и иммуногематологии Красного Креста, Франкфурт-на-Майне, Германия.
2. НИИ средств диагностики ЗАО «Вектор- Бест», Новосибирск, Россия.
3. Цетр крови Минздрава России.
4. Фонд «Служба крови – людям», Москва, Россия.

## СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ НАТ-МИНИПУЛ-ТЕСТИРОВАНИЯ ДОНОРСКОЙ КРОВИ НА НАЛИЧИЕ HIV, HCV И HBV

*Н.А. Федоров, Е.Г. Черкасов, А.А. Ёлов, Ю.С. Суханов,  
И.Б. Сущенко, М.П. Гришаев.*

Необходимость гарантировать вирусную безопасность донорской крови, ее компонентов и препаратов, получаемых из плазмы, побудила к дополнительному генамплификационному тестированию крови и ее компонентов на наличие в них HIV, HCV, HBV, а теперь и парвовируса B19 методами ПЦР, NASBA (Nucleic Acid Seaquence Based Amplification), branch-DNA, TMA (Transcription-mediated Amplification) и другими NAT (Nucleic amplification techniques). Первое практическое использование ПЦР-тестирования плазмы и препаратов, полученных из нее, на наличие HIV, HCV, HBV было осуществлено на крупной международной фирме «Иммуно» в Австрии в 1994 году. Эта фирма перерабатывает более 1,5 млн доз плазмы в год и с 1994 года препараты, получаемые на ней, имеют сертификат «ПЦР-качество» [1, 2]. Как показывает схема (рис.1), на фирме «Immuno-Hyland-Baxter»



**Рис.1.** Схема ПЦР-контроля качества «IQ-PCR» на фирме «Immuno-Hyland-Baxter».

ПЦР-контроль при производстве препаратов плазмы осуществляется на входе (ПЦР-тестирование всех донаций плазмы и производственных пулов плазмы, которые создаются из NAT-негативных донаций) и на выходе (ПЦР-тестирование полученных партий препаратов).

Данные, приводимые в таблице 1, в которой сопоставляется частота выявления ИФА-маркеров HIV, HCV и HBV у первичных и кадровых доноров крови и плазмы восьми стран Европы, свидетельствуют о том, что частота ИФА-положительных донаций в группе кадровых доноров значительно ниже (на порядок и больше), чем в группе первичных доноров [3].

Однако полного освобождения группы кадровых доноров от носителей серологических маркеров не наблюдается по той причине, что инфицирование и сероконверсии происходят и у доноров этой группы. В связи с высокой частотой заражения реципиентов вирусным гепатитом С через препараты иммуноглобулинов (IVIG) в 1994 году [4, 5] ИФА-HCV-негативные производственные пулы плазмы в разных странах были проанализированы на наличие РНК HCV методом РТ-ПЦР. Оказалось, что процент вирусосодержащих пулов составляет от 0 (редко) до 41% (табл. 2).

Таблица 1

**Частота выявления ИФА- маркеров HIV, HCV и HBV у первичных и кадровых доноров крови и плазмы восьми стран Европы, Австралии и США**

	Европа	Австралия	США
Кадровые доноры			
Всего донаций	667740	452508	1631497
Положительные реакции (на 10 000 донаций)			
Anti-HIV 1+2	0,07	0,04	0,25
Anti-HCV	0,31	0,55	2,48
HBsAg	0,12	0,11	0,36
Первичные доноры			
Положительные реакции (на 10 000 донаций)			
Anti-HIV 1+2	0,42	0,015	2,68
Anti-HCV	11,86	21,53	45,08
HBsAg	9,58	12,76	13,72

Таблица 2

**Результаты HCV-ПЦР анализа производственных пулов плазмы из Центров фракционирования Европейского союза.**

Производители	Количество проанализированных пулов плазмы	HCV-ПЦР-положительные	HCV-ПЦР-отрицательные
A	177	72 (41%)	105 (59%)
B	28	10 (36%)	18 (64%)
C	44	0	44 (100%)
D	14	3 (21%)	11 (79%)
E	21	3 (14%)	18 (86%)
F	21	9 (42%)	12 (58%)
G	38	2 (5%)	36 (95%)

Nubling C. M. et al. [6]

Такая высокая контаминация производственных пулов плазмы HCV связана с большими объемами производственных пулов (до 10–20 тыс. донаций), широким распространением этого вируса и, прежде всего, с самым длительным серонегативным периодом при инфицировании HCV, бессимптомном носительстве его, неполнотой сероконверсии, а так же маскировкой от обнаружения существующими иммуноферментными тест-системами, основанными на рекомбинантных вирусных белках вследствие высокой изменчивости антигенных детерминант вируса [7, 8].

Риск инфекций, вызываемых ВИЧ, HCV и HBV, в результате трансфузий компонентов или препаратов крови от серонегативных по этим вирусам доноров остается и составляет соответственно  $1:3 \times 10^6$ ,  $1:(2-5) \times 10^4$  и  $1:(1-3) \times 10^4$  для Германии, в которой до 80% составляют безвозмездные доноры [9], что хорошо коррелирует с риском инфицирования, рассчитанным Schreiber G. et al. [10] и D. Gluck [11].

Для снижения такого остаточного риска трансфузионных вирусных инфекций в 1994 году в Германии и ряде других стран была введена карантинизация свежезамороженной плазмы (Q-FFP). Тем не менее, при ежегодных трансфузиях Q-FFP в Германии около 800 000 единиц и в США около 2 500 000 единиц риск трансфузионных заражений HCV и ВИЧ, хотя и снижается в несколько раз, но не ликвидируется совсем и соответственно

составляет 1:100 000 (HCV) и 1:680 000–1 000 000 (HIV) [12, 13].

Обычно Q-FFP допускается к применению после получения отрицательных результатов ИФА при повторном (через 6 месяцев) тестировании доноров данной плазмы. Но известны случаи с длительным периодом серонегативности в присутствии РНК HCV, например, у пациентов с иммуносупрессией и наркоманов [14]. Такой период может продолжаться до 40,8 месяцев [15]. Описаны также случаи спонтанного исчезновения антител к HCV или «серореинверсии» как у иммунокомпетентных, так и у иммунодефицитных пациентов, инфицированных HCV [38].

Как следствие таких явлений остается риск заражения вирусными инфекциями даже после трансфузий Q-FFP или препаратов, полученных из нее. Например, Humpe A. et al. [8] описали 8 подтвержденных случаев инфицирования HCV после трансфузии Q-FFP от донора с частыми плазмафорезами, который имел неполный профиль сероконверсии в течение 400 дней после наступления вирусемии. Эта неполная сероконверсия не была обнаружена ИФА и инфицированная Q-FFP была реализована и трансфузирована 12 пациентам.

Для исключения серонегативных донаций, содержащих эти вирусы, была проведена большая работа по применению прямого генамплификационного тестирования донорской крови методами ПЦР, бранч-DNA, NASBA, TMA и другими NAT.

Необходимость дополнительного NAT-тестирования донорской крови, компонентов и препаратов, полученных из нее, стала очевидной в 1995 году. Тогда же Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) создала рабочую группу по стандартизации генамплификационных методов исследования, применяемых в службе крови (WHO SoGAT: WHO International working group on the standardisation of genomic amplification techniques for the virological safety testing of blood and blood products).

Конечно, главная цель NAT-тестирования донорской крови – повысить вирусную безопасность, но также оно позволяет решить и другую важную задачу, а именно, определить истинных вирусносителей среди доноров, имеющих положительные серологические реакции на HIV, HBV и HCV. В качестве примера можно привести данные из работы Kocazeybek B. et al. [16].

Отсутствие ДНК HBV и РНК HCV в плазме крови доноров, имеющих HBsAg и антитела к HCV, указывают на возможность

полной элиминации этих вирусов из организма человека без клинических проявлений гепатита или депонирования этих вирусов в печени без проявлений репликации [17].

В силу больших вариаций концентраций ВИЧ и вирусов гепатитов в крови инфицированных лиц, а также больших вариаций чувствительности NAT-детектирования этих вирусов в разных лабораториях, SoGAT сделал акцент на разработке международных стандартов для повседневного контроля лимита NAT-детекции в реальных образцах плазмы крови человека. Такая работа завершена в 1998 году созданием международных стандартов для контроля чувствительности NAT-тестирования на ВИЧ, HCV и HBV. Концентрация ДНК HBV в стандарте ВОЗ на основе инфицированных образцов плазмы человека [18] была определена по данным многократных тестирований в процессе международных испытаний и составила  $10^6$  МЕ на 1 мл ( $5 \times 10^6$  геноэквивалент/мл, ГЭ/мл). Концентрация ДНК HBV не изменялась в процессе хранения при  $-20^\circ\text{C}$  и оставалась стабильной в течение 18 недель при  $+20^\circ\text{C}$ . Концентрация HIV и HCV в стандартах ВОЗ составляет 100 000 МЕ/мл, стабильность при положительных температурах около 2–3 суток. Для определения лимита NAT-детекции делают разведения стандартов 1:10, 1:100 и 1:1000, используя в качестве разбавителя NAT-негативную плазму. Разумеется, лимит NAT-детекции в конкретных лабораториях может значительно различаться в зависимости от метода экстракции нуклеиновых кислот, тест-систем и способа детекции продукта амплификации. Например, Институт Пауля Эрлиха в Германии ввел минимальную чувствительность NAT-тестирования плазмы на HCV, соответствующую 5 000 МЕ/мл, что эквивалентно 25 000 геноэквивалентов вируса в 1 мл [19].

После того, как были созданы международные стандарты для контроля NAT-тестирования HIV, HCV и HBV, появилась реальная возможность с целью уменьшения затрат времени и материалов осуществлять NAT-скринирование не каждой донации, а минипулов, включающих ряд донаций. В настоящее время наиболее распространен метод минипул-NAT-тестирования донорской крови в микропланшетном варианте, где минипулы включают 96, 12 и 8 донаций в соответствии с количеством лунок, горизонтальных и вертикальных рядов в 96-луночном планшете. Авторами данной статьи в 1998–2001 годах был предпринят

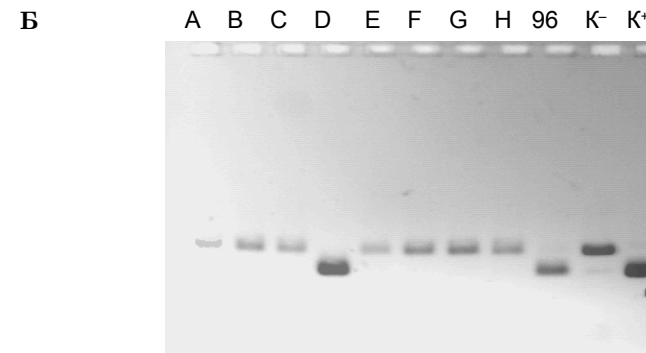
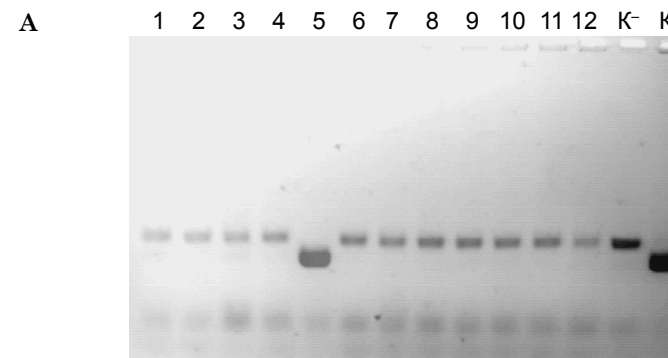
первый российский опыт полуавтоматического и ручного NAT-тестирования донорской крови на наличие ВИЧ, вирусов гепатитов В и С [20]. Создавались минипулы из 8 и 12 донаций, соответствующих определенным лункам вертикальных и горизонтальных рядов микропланшета. Объединением аликвот этих минипулов создавался пул второго порядка, содержащий все 96 образцов. Если последний при ПЦР-анализе давал положительный результат, идентификация вирусосодержащих донаций осуществлялась ретестированием минипулов из 8 и 12 донаций, как показано на примере выявления HBV-ДНК-положительной донации, рис. 2 и рис. 3. Однако с учетом небольших объемов анализируемой донорской крови (в пределах 1000 донаций в месяц) определение вирусов, в основном, проводилось в небольших минипулах из 8 или 10 донаций, как и при исследованиях аналогичного уровня в некоторых зарубежных банках крови, например, в Гане и Бразилии [21, 22]. Выявляемость РНК вируса

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
C	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
D	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
E	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
F	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
G	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
H	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96

**Рис.2.** Идентификация вирус-положительных донаций методом перекрестных промежуточных пулов из 8 и 12 донаций. Образцы плазмы, обозначенные цифрами 1-96, объединяются по 8 в промежуточные минипулы **1-12** (по столбцам планшета) и по 12 в минипулы **A-H** (по строкам планшета), и далее получают общий минипул из 96 образцов. На рисунке показан пример идентификации вирусосодержащей донации по результатам ПЦР-анализа, приведенных далее на рис.3. На пересечении столбца 5 и строки D, минипулы которых дали положительные сигналы, находят донацию 41, которую следует выбраковать. Если будут две ПЦР-позитивные донации, то они дадут два ПЦР-положительных промежуточных пула из 8 донаций и два ПЦР-положительных промежуточных пула из 12 донаций.

гепатита С среди первичных доноров Московского региона (0,34%) по сравнению с первичными донорами Сан-Паулу (0,45%) или Ганы (0,12%) находилась в пределах одного порядка.

В Японии уже несколько лет применяется дополнительное NAT-скринирование донорской крови в масштабах всей страны,



**Рис.3.** Результаты ПЦР-анализа при идентификации донации, содержащей вирус гепатита В, в ПЦР-положительном пуле из 96 образцов. Проанализированы минипулы **1-12**, собранные по столбцам планшета (А), и минипулы **A-H**, собранные по строкам планшета (Б). Положительные сигналы минипулов 5 и D позволяют точно определить инфицированную донацию 5D как показано на рис.2. Проба 96 – повтор анализа общего пула из 96 образцов, K<sup>-</sup> и K<sup>+</sup> – соответственно отрицательный и положительный контроли, во всех отрицательных образцах и K<sup>-</sup> присутствует полоса внутреннего стандарта.

проведено сопоставление частот выявления NAT-положительных донаций в минипулах из 50 и 500 донаций [23], (табл. 3).

Поскольку частота выявления NAT-положительных донаций была выше в пулах из 50, то, по-видимому, разбавление в пулах из 500 донаций в некоторых пулах снижает концентрацию вируса ниже лимита детекции.

Чтобы избежать этого эффекта, в Германии Roth W.K. и Seifried E. [24] минипулы из 96 образцов стали подвергать ультрацентрифугированию при 48 000 g в течение одного часа. Они показали, что после ультрацентрифугирования плазмы, содержащей разные концентрации вирусов гепатита С и ВИЧ, вирусы содержатся только в осадке, а в супернатанте обнаруживаются лишь следы вирусов при условии наличия высоких концентраций вируса ( $10^6$ – $10^5$  ГЭ/мл) в исходных образцах плазмы.

Крупномасштабное практическое минипул-NAT-скринирование на наличие HCV и HIV в препаратах крови было впервые введено в институте трансфузионной медицины и иммуногематологии Службы крови Красного Креста земли Hesse (Германия) с января 1997 г., который производит 270 000 донаций в год [17], обеспечивая на 90% потребности этого региона в трансфузионных средах. В дальнейшем институт расширил масштабы такого тестирования на другие земли Германии и на Люксембург, доведя количество тестируемых донаций до 640 000 в год или 4 000 образцов в день. В сентябре 1998 года аналогичную технологию минипул-NAT-скринирования создали в Баварии

Таблица 3

### Результаты NAT – скрининга донорской крови в Японии

Вирус	Абсолютное и относительное (на миллион) число NAT-положительных донаций		
	Минипулы из 500 образцов <sup>1)</sup>	Минипулы из 50 образцов <sup>2)</sup>	P- value
HBV	19 (8,9)	18 (13,6)	n.s.
HCV	8 (3,7)	5 (3,8)	n.s.
HIV	0 (0,0)	2 (1,5)	n.s.
Количество образцов	2 140 207	1 322 589	

<sup>1)</sup> – с июля 1999 г. по январь 2000 г.,

<sup>2)</sup> – с февраля 2000 г. по апрель 2000 г.

(Wiesenheim) с производительностью 660 000 донаций в год, получив суммарную производительность NAT-скрининга в 1,2 миллиона донаций в год, с лимитом детекции HCV 5 000 МЕ в индивидуальной донации. С июня 1999 года вся плазма, полученная любыми способами, тестируется в обязательном порядке на HCV, а с 1 января 2001 года введено NAT-тестирование и на ВИЧ-1.

Процедура проведения NAT-скринирования плазмы крови представлена Roth W.K. с соавт. в работах [25, 26].

*Формирование минипулов из плазмы доноров осуществляли автоматически на установке Tecan Genesis путем отбора 100 мкл каждой донации, и производили его ночью, включая ИФА-положительные образцы. Формирование минипулов из плазмы первичных доноров производили отдельно, поскольку они имели частоту ИФА- и NAT-положительных донаций в 10 раз выше, чем кадровые доноры.*

*Полученные минипулы объемом 9,6 мл центрифугировали при 48 000 g один час, декантировали надосадочную часть, а осадок, содержащий вирусы, растворяли в лизирующем буфере AVL Qiagen, используя для очистки РНК HCV и HIV-1 набор Qiagen. Элюированную РНК в объеме 75 мкл воды использовали для постановки ПЦР: 10 мкл для HIV-1 и 15 мкл для HCV ПЦР. Остаточную часть использовали для повторной ПЦР для подтверждения положительных реакций или проверки некачественных результатов. Объемы экстракта РНК, введенного в ПЦР, соответствуют 13,3 мкл и 20 мкл плазмы каждой донации соответственно для HIV-1 и HCV.*

*Минипул-ПЦР-амплификацию HCV осуществляли тест-системой COBASAMPLICOR, а HIV-1 – тест-системой «in-house» до сентября 1998 года, затем тест-системой TaqMan ПЦР в реальном режиме времени. Лимит детекции для 95% определений составлял 800 МЕ/мл для HCV и 2 000 геномэквивалентов/мл для HIV-1. Достоверность и чувствительность каждой индивидуальной ПЦР контролировали внутренним стандартом. Для HCV внутренним стандартом являлся полученный in vitro транскрипт РНК (COBAS Ic), а для HIV-1 – армированная РНК (Ambion, USA), содержащая HIV-1 ампликон с введенным участком связывания зонда, определяющего этот стандарт. Стандарты вводились в минипул до экстракции нуклеиновых кислот. Для ПЦР-тестирования индивидуальных образцов экс-*

*тракцию РНК HCV и HIV-1 производили из 100 мкл и 200 мкл соответствующих индивидуальных образцов. Чувствительность ПЦР-тестирования в ГЭ/мл была выше в два раза по сравнению с ПЦР-тестированием в минипулах.*

*Look-back procedures (ретроспективные исследования) осуществляли по правилам, принятым в Германии. Они проводятся в случае обнаружения донаций с повторно положительными реакциями в скрининговых и подтверждающих тестах и направлены на выявление соответствующих доноров и анализ их предыдущих донаций. Архив донаций со сроком 6 месяцев до последней негативной донации оттаивали и повторно тестировали ИФА-скрининговыми и подтверждающими тестами, а также индивидуальными ПЦР. Реципиентов выявляли и тестировали на присутствие вирусных маркеров. Исследования реципиентов по программе Look-back procedures начинали после получения информации о возможном переносе вирусов реципиенту через компоненты крови. Соответствующих доноров также выявляли и тестировали.*

В процессе работы в режиме проведения TaqMan ПЦР в реальном времени для HIV-1 удалось снизить частоту получения ложноположительных результатов при скрининге пулов с 1,1% до 0,4%, а для HCV до 0,2%. По аналогичным технологиям в Wiesenheid (были внедрены позже) частоты ложноположительных пулов были 0,0% и 0,1% для HCV и HIV-1, соответственно. Частота получения неопределенных результатов в минипул-ПЦР-тестировании составляла 0,6% как для Hesse, так и для Wiesenheid.

В практике ИФА-скринирования довольно часто встречаются так называемые ИФА-реактивные донации, которые требуют ретестирования на наличие антител более чувствительным методом иммуноблота. Германский опыт по NAT-тестированию таких ИФА-реактивных, но негативных в подтверждающем иммуноблот-тестировании образцов, показал, что все эти донации были негативными как в минипул-ПЦР-тестировании, так и в ПЦР-тестировании индивидуальных донаций.

Из 462 ИФА-положительных на HCV и подтвержденных в иммуноблоте 271 были минипул-ПЦР-положительными (58,7%): отдельно в Hesse 187 из 268 (69,8%), в Wiesenheid – 84 из 194 (43,3%). Аналогичные результаты были получены и при ПЦР-тестировании индивидуальных донаций.

Путем сравнения уровней активности ALT у этой группы доноров в зависимости от результата ПЦР-анализа на РНК HCV было установлено, что ИФА-позитивные донации, но ПЦР-негативные, имели сравнимые уровни ALT для земель Hesse и Wiesenheid: 12,4 и 13,9 Е/л, соответственно. В то же время доноры с положительными реакциями как ИФА-, так и ПЦР-тестирования имели в несколько раз выше уровни ALT: 45,5 и 37,8 Е/л для земель Hesse и Wiesenheid соответственно ( $p < 0,000$ ;  $p < 0,000$ ). Повышенный уровень ALT является дополнительным косвенным свидетельством виремии только у доноров с положительной ПЦР-реакцией.

Донации, реактивные по антителам к HIV-1/2, но не подтвержденные в иммуноблоте, были негативными как в ПЦР-минипулах, так и в ПЦР-индивидуальных анализах. Но все 11 донаций, положительные по антителам к HIV-1/2 и подтвержденные в иммуноблоте, были минипул-ПЦР-положительные.

NAT-минипул тестирование 3,6 млн донаций выявило 6 HCV и 2 HIV-1 положительные донации (ИФА-негативные), которые были бы использованы для переливания реципиентам в случае отсутствия NAT-тестирования. Частота HIV-1 NAT-положительных донаций для земли Hesse составила 1:590 000, для Германии – 1:1,63 млн, для Австрии – 1:77 000. У двоих HIV-1 NAT-положительных доноров позднее произошла сероконверсия, в ИФА у них были выявлены антитела к белку р24 HIV.

Ретроспективный анализ как доноров, у которых произошла сероконверсия, так и реципиентов, подозреваемых на инфицирование их трансфузиями компонентов крови, показали, что риск заражения HCV и HIV с января 1997 года с началом введения минипул-NAT-тестирования и NAT-тестирования индивидуальных донаций снизился более чем в 10 раз.

В силу низкого остаточного риска посттрансфузионных гепатитов при использовании системы минипул-NAT-тестирования, диагностическая ценность исследования донаций на ALT становится сомнительной [9].

Технологию NAT-минипул тестирования на ДНК HBV осуществляли также в формате микропланшетов из 96 образцов. Для ПЦР-амплификации HBV использовали с одинаковым успехом как «in-house», так и TaqMan системы. Лимит детекции достигал 1 000 геноэквивалентов/мл плазмы донора при концентрировании вируса из минипулов центрифугированием. При

**Доноры с низким уровнем носительства HBV, выявленные методом ПЦР в индивидуальных образцах, обогащенных центрифугированием**

Донор	Минипул-ПЦР, 0,1 мл	Обогащенная ПЦР, 9,6 мл	HBsAg, s/co	Анти-HBc-IgM, s/co	Анти-HBc-IgG, s/co	Анти-HBs, мМЕ/мл
1	–	++++	0,17	0,027	0,29	93,7
2	–	+++--	0,25	0,756	0,05	213,1
3	–	+++–	0,22	0,066	0,08	>1000,0
4	–	+++	0,13	1,148	0,15	>1000,0
5	–	+++	0,17	0,044	0,17	23
6	–	+++	отр.	н/д	положит.	положит.
7	–	+++	0,19	0,034	0,05	отр.

Обогащенная ПЦР = ПЦР индивидуальных образцов после обогащения центрифугированием, объем образца 9,6 мл;

s/co = образец/катофф;

HBsAg s/co  $\geq$  1,0 = положит.;

анти-HBc IgM s/co  $\geq$  1,0 = положит.;

анти-HBc IgG s/co  $\leq$  1 = положит.;

анти-HBs  $\geq$  10 мМЕ/мл = положит.;

+ = положит.

н/д = недоступна информация.

(Roth B.K. et al., [26])

часть доноров с HBc-антителами являются хроническими носителями с очень низким уровнем HBV, который ниже, чем 300 геномэквивалентов/мл. Для эффективного тестирования таких доноров нужны специальные индивидуальные ПЦР-тесты с выделением вируса из 10 мл плазмы предварительным центрифугированием (табл. 4).

В Германии значительный опыт минипул-NAT-тестирования накоплен и в других центрах, например, в Марбурге на фирме «Aventis Behring». На сентябрь 2000 года NAT-минипул тестированию подвергнуто свыше 7 000 000 донаций плазмы. Выявлено 904, 110 и 7 NAT-позитивных, соответственно, на HCV, HBV и HIV, что составляет 12,8; 1,6 и 0,1 на 100 тыс. единиц плазмы. Количество выявленных HAV- и парвовирус В19-

ПЦР-анализе индивидуальных донаций без центрифугирования лимит детекции был 300 геномэквивалентов/мл, а с центрифугированием – 5–10 геномэквивалентов/мл, соответственно. Для экстракции нуклеиновых кислот применяли набор Qiagen. Экстрагированную нуклеиновую кислоту растворяли в конечном объеме 75 мкл. В ПЦР-анализ вводили 20 мкл, что соответствовало 26,7 мкл введенной в экстракцию плазмы.

TaqMan ПЦР была введена в 1998 году и осуществлялась на установке ABI Prism 7700. В качестве внутреннего стандарта использовали плазмиду, содержащую модифицированную амплифицированную последовательность ДНК HBV, которую вводили в пул до экстракции нуклеиновых кислот. Центрифугирование плазмы 1 час при 48000 g почти в 2 раза повышало чувствительность. С введением системы TaqMan и наконечников с поршнями частота получения ложноположительных результатов снизилась с 1,4% до 0,1%.

Из обследованных 3,6 млн донаций в институте трансфузионной медицины и иммуногематологии во Франкфурте-на-Майне было выявлено 292, а в Wiesenheid 140 HBsAg-подтвержденных (положительных) донаций, из которых 195 (66,8%) и 103 (73,6%), соответственно, были минипул-NAT-положительными. Среди HBsAg-негативных было выявлено 6 ПЦР-положительных донаций, которые распределялись по регионам следующим образом: 1:600 000 для всех регионов Германии, Австрии и Люксембурга вместе взятых, 1:390000 в земле Hesse, 1:820 000 в Германии и 1:153 000 в Австрии. Все только HBV-ПЦР положительные донации имели низкий уровень ALT – ниже 22 МЕ/л, из них 2 были в стадии пресероконверсии (с отсутствием антител к HBc- и HBs-антигенам), 4 – анти-HBc-положительные и анти-HBs-негативные с низким уровнем HBV-носительства.

729 HBsAg-негативных доноров с антителами к core-антигену HBV (446 из них с наличием антител к HBsAg) были ПЦР-негативны при исследовании в минипулах. Однако проведение ПЦР после концентрирования вируса центрифугированием из индивидуальных образцов объемом 9,6 мл позволило выявить 7 доноров с наличием ДНК HBV (табл. 4). Концентрация вируса в этих образцах была на уровне 10–100 геномэквивалентов/мл.

Таким образом, минипул-NAT-тестирование надежно идентифицирует HBV-инфицированных доноров, в том числе и в периоде пресероконверсии без HBc-маркеров. Следует отметить, что



NAT-положительных донаций составило 13 и 299, соответственно (табл. 5).

Производственные пулы из NAT-негативной плазмы были также негативны на HBV, HCV и HIV-1. Размер используемых ими минипулов соответствовал 1200 образцам плазмы, а чувствительность в расчете на концентрацию вируса в индивидуальном образце плазмы, которая детектировалась в минипулах из 1200 образцов, соответственно была: HBV –  $10^3$  МЕ/мл, HCV –  $2 \times 10^4$  МЕ/мл, HIV –  $5 \times 10^4$  МЕ/мл, HAV – 250 ГЭ/мл, парвовирус B19 –  $10^7$  геномэквивалентов/мл (данные Weimer T., [27]).

NAT-скринирование плазмы по технологии, аналогичной технологии фирмы «Immuno», освоено на крупном предприятии немецкого Красного Креста «Transfusionsdienst Plauen» в Германии. Уже в 1998 году Gubbe K. [28] представил результаты NAT-скринирования 187 400 донаций в 2 374 пулах (табл. 6).

Hitzler W.E. и Runkel S. из Центра трансфузиологии клиники Гутенбергского университета (Майнц, Германия) [29, 37] сообщили о NAT-тестировании 251 737 ИФА-негативных доноров на наличие HCV в минипулах из 40 образцов. Было выявлено 3 NAT-положительных ИФА-негативных донации.

Большой опыт минипул-NAT-тестирования получен в США и Канаде. На втором рабочем совещании в декабре 1999 года в Бетезде (США) представители производств сообщили, что более 99% всей плазмы, полученной в США, и более 95% цельной крови тестировалось минипул-NAT-технологией на наличие HCV

Таблица 5

**NAT- скрининг на фирме Aventis Behring (Германия) сентябрь 2000 г.**

	HCV	HBV	HIV-1	HAV	B19
Количество доз плазмы	7084000	7084000	7084000	2074000	2317000
Количество реактивных доз плазмы	904	110	7	13	299
Частота на 100000 донаций	12,8	1,6	0,1	0,6	12,9

T. Weimer, SoGAT XII Nov. 17, 2000 [27]

**Результаты NAT-скринирования плазмы доноров на фирме Transfusionsdienst Plauen (Германия) (187400 донаций в 2374 минипулах)**

	HCV	HIV	HBV
ПЦР+ ИФА+	1	1	15
ПЦР+ ИФА-	0	0	1

и HIV. Размеры минипулов были от 96 до 1200 донаций плазмы и от 16 до 120 единиц цельной крови. Для контроля эффективности NAT-тестирования FDA предоставил 3 хорошо охарактеризованные стандартные сероконверсионные коммерческие панели плазмы: одну на HCV и две на HIV. Кроме того, в США использовались стандартные контрольные образцы ВОЗ, полученные из NIBSC, содержащие РНК HCV – 100 000 МЕ/мл, РНК HIV – 100 000 МЕ/мл и ДНК HBV – 1 000 000 МЕ/мл. Для оценки эффективности минипул-NAT-тестирования требуется протестировать от 300 000 до 1 000 000 донаций в 10 000 пулах. В соответствии с требованиями FDA лимит детекции всех вирусов методом NAT должен соответствовать 100 ГЭ/мл в минипулах и 5 000 ГЭ/мл в отдельной донации [30].

Как показано в таблице 7 [31], за приблизительно один 1999/2000 год в США и Канаде было проверено методом минипул-NAT-тестирования 16,3 млн донаций и выявлено 62 HCV-положительных среди ИФА-негативных донаций.

Весьма значителен вклад Англии в развитии NAT-тестирования донорской крови и ее препаратов. Следует напомнить, что первый международный опыт по оценке реальной чувствительности ПЦР-детекции провирусной ДНК HIV был получен в исследованиях, инициированных NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control, Англия), проведенных в 26 лабораториях 9 стран [32]. Эти исследования впервые убедительно показали, что нельзя внедрять NAT-технологии в медицину без использования стандартов для контроля чувствительности и специфичности проводимых анализов, так как некоторые лаборатории могли детектировать 1 вирусную частицу, а некоторые и при наличии 10 000 копий вируса в исследуемом образце получали не-

Таблица 7

## NAT-скрининг доноров США и Канады

	ARC <sup>1)</sup> (Gen-probe) <sup>5)</sup>	ABC <sup>2)</sup> (Gen-probe)	AIBC <sup>3)</sup> (Gen-probe)	ABC (RMS) <sup>6)</sup>	CBS <sup>4)</sup> (RMS)
Количество донаций	7,7 млн	2,96 млн	375 000	4,8 млн HCV 1,6 млн HIV	463 000
HCV	25 (1:308000)	16 (1:185000)	2 (1:187500)	19 (1:252600)	0
HIV-1	1 (1:7,7 млн)	2 (1:1,5 млн)	0	1 (1:1,6 млн)	NA
Задержанные доноры	187 (1:28650)	486 (1:4800)	93 (1:4000)	195 HCV (1:24600); 4 HIV (1:400000)	NA

<sup>1)</sup> ARC – американский Красный Крест

<sup>2)</sup> ABC – американские Банки крови

<sup>3)</sup> AIBC – американские независимые Банки крови

<sup>4)</sup> CBS – канадская служба крови

<sup>5)</sup> Gen-probe – установка “Tigris”

<sup>6)</sup> RMS – молекулярные тест-системы фирмы «РОШ»

NA – не анализировались

Указано количество NAT-положительных ИФА-негативных донаций.

гитивный результат. В дальнейшем на базе NIBSC организовала свою работу по созданию стандартных контрольных препаратов международная рабочая группа WHO SoGAT. В итоге проведено 14 заседаний, были получены международные стандарты ВОЗ на HIV, HCV, HBV и парвовирус B19. C. Sims (BPL, UK – Bio Product Laboratory, SoGAT XII, 17 Nov., 2000, NIBSC) сообщил о NAT-скрининговании на наличие HCV 3,8 млн доноров. Из 295 серопозитивных 185 были NAT-положительными. Были выявлены 3 пресероконверсионные донации: в двух из них концентрация HCV составляла  $10^8$  ГЭ/мл и  $10^5$  ГЭ/мл.

В Японии, в соответствии с национальной стратегией, только Японский Красный Крест (JRC) является ответственным за донорское движение, сбор, проверку и распределение всей крови. Около 6 млн единиц донорской крови собирают от безвозмездных доноров в 77 пунктах сбора крови JRC. Пожертвованная кровь разделяется на клеточные компоненты для переливания и плазму, используемую для производства препаратов. Япония удовлетворяет потребности национального здравоохранения в кле-

точных компонентах крови. Однако потребности в препаратах плазмы, особенно в альбумине и иммуноглобулинах, производимыми в трех частных компаниях и одном Центре фракционирования плазмы, управляемым JRC, обеспечены менее чем наполовину.

Вирусная безопасность препаратов плазмы, производимых JRC и компаниями по фракционированию плазмы, в Японии обеспечивается опросными листами для доноров перед донациями, серологическим скринингом на наличие вирусных инфекций, карантинизацией плазмы, удалением и инактивацией вирусов в процессе производства, и NAT-тестированием конечных продуктов перед реализацией. Изготовители иногда вынуждены были браковать большие партии препаратов, так как невозможно только методами ИФА детектировать плазму, полученную в период иммунологического окна, как вирусосодержащую. В ноябре 1997 для увеличения вирусной безопасности продуктов крови JRC ввел NAT-тестирование на HBV, HCV и HIV прошедшей серологический скрининг исходной плазмы. В течение последующих двух лет благодаря NAT-тестированию 5,6 млн единиц плазмы было дополнительно выявлено и отбраковано 78 единиц плазмы, инфицированной HBV, 10 – HCV и 2 – HIV, что существенно способствовало снижению вирусной нагрузки в исходном пулированном материале для производства препаратов. С другой стороны, поскольку NAT-тестирование использовали только для скрининга плазмы, почти все компоненты крови, которые являлись ИФА-негативными, но позже доказанные как NAT-положительные, были ранее использованы для переливания реципиентам. К сожалению, передача вирусов произошла нескольким больным через эти переливания, включая 2 случая ВИЧ-инфицирования. Последующее исследование этих инфицированных больных показало, что более низкая вирусная нагрузка и более замедленное течение инфекции у них является следствием пороговых количеств вируса, вызвавших инфекцию.

Основываясь на этом опыте, JRC ввел NAT-тестирование не только для препаратов крови, но и для переливаемой крови. В июле 1999 JRC внедрил NAT-скрининг в практику трансфузиологии, который обеспечивается быстрой системой доставки образцов, автоматизированным пулированием их, NAT-системой для детекции вирусов и автоматизированной компьютерной сетью. Мультиплексная тест-система для одновременного обнару-

жения HBV, HCV и HIV-1 делает возможным NAT-скринирование трех вирусов для всей заготовленной крови в течение двух дней после кроводачи в двух NAT-центрах, третий NAT-центр, в Киото, начал работу в мае 2000 года. Образцы крови со всей Японии доставляют для исследования в любой из этих трех центров воздушным путем или наземным транспортом.

Вначале размер минипулов для NAT-тестирования составлял 500 образцов, но с февраля 2000 года был уменьшен до 50 образцов. NAT-минипул из 50 образцов обеспечивает достаточную чувствительность NAT-тестирования ИФА-негативных образцов. К концу апреля 2000 года из 3,4 млн донаций крови и плазмы были изъяты 37 донаций, содержащих HBV, 13 – содержащих HCV и 2 – содержащие HIV.

Таким образом, в Японии NAT-скринирование обеспечивает вирусную безопасность крови, ее компонентов и препаратов в масштабах всей страны.

Одновременно с SoGAT NAT-скринирование плазмы доноров стала активно внедрять в практику Европейская Ассоциация фракционирования плазмы (EPFA), и уже за 1997 год организациями EPFA ряда стран были сообщены результаты по NAT-скринированию 11 миллионов донаций от безвозмездных доноров Европы и Австралии, которые сведены в таблице 8. Частота донаций от доноров в стадии пресерококонверсии в Австралии находится в тех же пределах, что и в Европе.

Legler T.J. et al. [33] при тестировании индивидуальных образцов плазмы получили на порядок выше частоту HCV-ПЦР-положительных донаций среди ИФА-негативных (по сравнению с минипул-тестированием), и ими высказано ошибочное заключение

о том, что NAT-тестирование индивидуальных образцов уменьшает остаточный риск трансфузионного HCV-гепатита в большей степени, чем минипул-NAT-тестирование, которое, по их мнению, может пропустить значительное число пресерококонверсионных донаций. Однако точные расчеты и убедительные аргументы, приведенные Roth W.K. и Seifried E. [34], полностью опровергают такое заключение Legler T.J. et al. Да и с точки зрения производительности, затрат времени на анализ, материальных затрат NAT-тестирование индивидуальных донаций несовместимо с требованиями службы крови. Так, согласно [35], для тестирования 192 образцов требовалось 7 часов, тогда как в институте трансфузиологии во Франкфурте-на-Майне за 8 часов NAT-минипул-тестированием получают результаты анализа для 4 000 образцов на наличие 5 вирусов. Но самым убедительным доказательством эффективности минипул-NAT-тестирования является ретроспективное исследование инфицирования реципиентов через трансфузии. За последние три года после введения минипул-NAT-тестирования в институте трансфузионной медицины во Франкфурте-на-Майне не было ни одного случая инфицирования реципиентов, а ретестирование при помощи ПЦР индивидуальных образцов из минипулов не выявляло пресерококонверсионных донаций.

Основой надежности NAT-технологии является обязательное использование международных стандартов для установления лимита детекции вирусов в МЕ или в ГЭ/мл. Также благодаря таким стандартам появилась возможность получить сопоставление различных частот остаточного риска инфицирования HCV, HBV и HIV в различных странах мира, а имеющиеся различия обосновать с точки зрения состава донорского контингента и эпидемиологической ситуации в различных странах и регионах. Наряду с международными стандартами, производимыми NIBSC, в 2001 году и фирма «Bio Clinical Partners» (США) начала производить стандарты для NAT на эти вирусы, которые стабильны при положительных температурах и не являются инфекционными.

Уже приведенных данных достаточно для заключения о том, что NAT-скринирование донорской крови в ближайшем будущем может заменить ИФА-скринирование, т.к. оно уже близко к полному закрытию диагностического окна [36], но в случаях, когда вирусия HIV после проведения активной антиретровирусной те-

Таблица 8

**Частота донаций крови от безвозмездных доноров в стадии пресерококонверсии в Европе и Австралии**

	Европа	Австралия
HIV 1+2	1:2 323 778	1:4 627 923
HCV	1:620 754	1:311 956
HBV	1:398 499	1:499 485

Muller-Breitkreutz K. [3]

рапии становится ниже порога обнаружения NAT, необходимо сочетание NAT с высокочувствительными ИФА-системами.

Важно подчеркнуть, что миниупл-НAT-тестирование – это не только более высокий уровень вирусной безопасности донорской крови и возможность выявления вирусосодержащих доноров крови, а также точный метод оценки эпидемиологического состояния больших контингентов людей посредством выявления истинных вирусоносителей, являющихся основными распространителями инфекций.

### Литература

1. Dorner F., Eibl J., Zerlauth G.: A quality-assured gene amplification assay system (PCR) for use on an industrial scale- a proposal for validation. // Clin. Lab. 42: 879–882 (1996).
2. Zerlauth G.: IQ- PCR: A Quality-Assured and Validated Viral Genome Assay System. // Hemostaseologie 16: 279–281 (1996).
3. Muller-Breitkreutz K.: Result of viral marker screening of unpaid blood donations and probability of window period donations in 1997 // Vox Sanguinis, 78, 149–157 (2000).
4. Nubling C.M., Willkommen H., \*Lover J.: Hepatitis C transmission associated with intravenous immunoglobulins. // The Lancet, V. 345, 1173–1174, May 6 (1995).
5. Peng Lee Yap, Fiona McOmish, Webster A., David B., Lennart Hammarstrom, C.I. Edward Smith, Janne Bjerkander, Hans D. Ochs, Sue H. Fisher, Isabella Quinti and Peter Simmonds: Hepatitis C virus transmission by intravenous immunoglobulin. // Journal of Hepatology, 21: 455-460 (1994).
6. Nubling C.M., Lover J.: The role of nucleic acid amplification techniques (NATs) in viral safety testing of blood and blood products. // Biotest Bulletin 5: 377–381 (1997).
7. Федоров Н.А., Федоров Е.Н., Елов А.А., Черкасов Е.Г., Блохина Н.П., Суханов Ю.С., Сущенко И.Б. Новые данные об отсутствии прогрессирования инфицирования вирусами гепатита С у здоровых молодых людей. // Российские медицинские вести, 2001, № 2, том VI.
8. Humpe A., Legler T.J., Nubling C.M., Riggert J., Unger G., Wolf C., Heermann K.-H., Kohler M. Hepatitis C Virus Transmission through Quarantine Fresh-frozen Plasma. // Thromb. Haemost., 2000, v. 84, p. 784–88.
9. Seifried E. Optimal blood donation screening // British Journal of Haematology, 2000, v.19, p. 694–698.
10. Schreiber G., Busch M.P., Kleinman S.H. and Korelitz J.J. The risk of transfusion-transmitted viral infections. // New England Journal of Medicine, 1996, v. 334, p. 1685–1690.
11. Gluck D., Maurer C. & Kubanek B. Infektionsmarker bei Blutspenden. // Infusionstherapie und Transfusionsmedizin, 1997, v. 24, p. 167–170.
12. AuBuchon J.P., Birkmeyer J.D., Busch M.R. Safety of the blood supply in the United States: opportunities and controversies. // Ann Intern Med 1997, v. 127, p. 904–909.
13. Gluck D., Maurer C., Kubanek B., Petersen N. Seroconversion of HIV, HCV and HBV in blood donors in 1996-risk of virus transmission by blood products in Germany. // Infusionsther Transfusionsmed, 1998, v. 25, p. 82–84.
14. Maple P.A., McKee T., Desselberger U., Wreghitt T.G. Hepatitis C virus infections in transplant patients: serological and virological investigations. // J. Med. Virol., 1994, v. 44, p. 43–48.
16. Kocazeybek B., Erenturk S., Sonmez B., Demiroglu C.: Prospective analyses of the prevalence of Anti-HCV in blood donors and comparison of positive sera by using polymerase chain reaction and recombinant immunoblot assay. // Transfusion today, no. 27, June, (1996).
17. Roth W.K., Weber M., Seifried E. Feasibility and efficacy of routine PCR screening of blood donations for hepatitis C virus, hepatitis B virus, and HIV-1 in a blood-bank setting. // The Lancet, 1999, v. 353, p. 359–363.
18. Saldanha J., Gerlich W., Lelie N., Dawson P., Heermann K., Heath A. Et The WHO Collaborative Study Group. An international collaborative study to establish a World Health Organisation standard for hepatitis B virus DNA nucleic acid amplification techniques. // Vox Sanguinis, 80: 63–71, (2001).
19. Nubling C.M., Chudy M., Lover J.: Validation of HCV-NAT Assays and Experience with NAT Application for Blood Screening in Germany. // Biologics (1999) 27, 291–294.
20. Черкасов Е.Г., Федоров Н.А., Елов А.А., Суханов Ю.С., Сущенко И.Б.: Первый российский опыт ручного и полуавтоматического миниупл-НAT-тестирования донорской крови на HIV, HCV, HBV. // в печати.
21. Allain J., Reddy R., Candotti D., Sarcodie F., Nel T. Genomic detection of HIV & HCV by TMA in high prevalence areas of Sub Saharian Africa. // Transfusion, 2000, v. 40, Supplement, S26-030E, p. 9S.

22. Levi J.E., Contri D.G., Takaoka D.T., Fachini R., Wendel S. PCR as a tool for primary screening of blood donors. // *Transfusion*, 1998, v. 38, Supplement, S207, p. 57S.
23. Wakisaka A. et al.: Nation-wide blood safety assurance by NAT in Japan. // XI SoGAT meeting, Madrid, 10–12 May, (2000).
24. Seifried E., Roth W.K. First statistical survey of HCV, HBV, HIV-1 Nucleic Acid Amplification Technology screening of blood donors in the Red Cross Blood Service Centers in Germany. // *Transfusion*, 2000, v. 40, Supplement, S29-030E.
25. Roth W.K., Weber M., Buhr S., Drosten C., Weishert W., Sireis W., Seifried E.: Yield of HCV and HIV-1 NAT after screening of 3,6 million blood donations in Central Europe. // *Transfusion*, 2002, V. 42, p. 862–868.
26. Roth W.K., Weber M., Petersen D., Drosten C., Buhr S., Sireis W., Weishert W., Hedges D., Seifried E.: HBV NAT and anti HBc testing increase blood safety. // *Transfusion*, 2002, V. 42, P. 869–875.
27. Weimer T. Update on NAT screening program. SoGAT XII, Nov. 17, 2000.
28. Gubbe K.: PCR a new tool for improved plasma safety. // Symposium organized by «Baxter-Hyland- Immun», Vienna, Austria, September, 1998.
29. Hitzler W.E., Runkel S.: Routine HCV PCR screening of blood donations to identify early HCV infection in blood donors lacking antibodies to HCV // *Transfusion*, 2001, v. 41, p. 333–337.
30. Tabor E., Yu Mei-Ying, Hewlett I., Epstein J.S.: Summary of workshop on the implementation of NAT to screen donors of blood and plasma for viruses // *Transfusion*, 2000, v. 40, p. 1273–1275.
31. Stramer S.L., Caglioti S., Strong D.M.: NAT of the United States and Canadian blood supply // *Transfusion*, 2000, v. 40, p. 1165–1168.
32. Bootman J.S., Kitchin P.A.: An international collaborative study to assess set of reference reagents for HIV-1 PCR. // *Journal of Virological Methods*, 37 (1992) 32–42.
33. Legler T.J., Riggert J., Simson G., Wolf C., Humpe A., Munzel U., Uy A., Kohler M., Heermann K.-H.: Nesning of individual blood donations for HCV RNA reduces the residual risk of transfusion-transmitted HCV infection. // *Transfusion*, 2000, v. 40, p. 1192–1197.
34. Roth W.K., Seifried E.: Reducing the residual risk of transfusion-transmitted viruses: mini-pool or single-donation NAT? // *Transfusion*, 2001, v. 41, p. 845–847.
35. Legler T.J., Kohler M., Heermann K.-H.: High-throughput extraction, amplification and detection (HEAD) of HCV RNA in individual blood donations. // *J. Clin. Virol.*, 1999, v.13, p. 95–103.
36. Murthy K.K., Henrard D.R., Eichberg J.W., Cobb K.E., Busch M.P., Allain J.P. and Alter H.J.: Redefining the HIV-infectious window period in the chimpanzee model: evidence to suggest that viral nucleic acid testing can prevent blood-borne transmission. // *Transfusion*, 1999, v. 39, p. 688–693.
37. Hitzler W.E., Runkel S.: Screening of blood donations by hepatitis C virus polymerase chain reaction (HCV-PCR) improves safety of blood products by window period reduction // *Clin. Lab.*, 2001, v. 47, p. 212–222.
38. Lefrere J.J., Guiramand S., Lefrere F., Mariotti M., Aumont P., Lerab- le J., Petit J.C., Girot R., Morand J.L. Full or partial seroreversion in patients infected by hepatitis C virus. // *J. Infect. Dis.*, 1997, v. 175, p. 316–22.

## МЕЖДУНАРОДНЫЕ СТАНДАРТЫ ВОЗ ДЛЯ NAT\*-ТЕСТИРОВАНИЯ ВИРУСОВ В КРОВИ ЧЕЛОВЕКА – ГАРАНТИЯ НАДЕЖНОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСЕМИИ

*Н.А. Фёдоров, А.А. Ёлов, Е.Г. Черкасов,  
Ю.С. Суханов, М.П. Гришаев, Е.Б. Жибурт*

### Введение

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) уже много лет отдает приоритет не субъективному отбору лучших приборов и тест-систем для NAT-диагностики, а объективной оценке чувствительности на основе созданных и создаваемых международных стандартов. В связи с этим в ряде стран Европы и Америки наряду с тест-системами известных фирм широко используются так называемые «in-house» тест-системы, которые намного доступнее, а по чувствительности не уступают коммерческим наборам. Качественные ИФА- и NAT-стандарты могут быть созданы только путем международных и многолетних испытаний. К сожалению, к настоящему времени в России нет охарактеризованных надежных стандартов для контроля чувствительности NAT-тестирования вирусов в крови доноров и пациентов, которые могли бы быть разработаны при участии контрольных институтов РАМН и Минздрава России в международных программах по созданию таких стандартов. В силу этого в России отсутствует в полной мере объективная оценка качества диагностики инфекций посредством NAT для целого ряда тест-систем.

Первый международный опыт по оценке реальной чувствительности ПЦР-тестирования ДНК HIV (лимита детекции, определяемого по числу копий вируса в пробе) был инициирован Национальным институтом биологических стандартов и контроля (Англия) еще в 1992 г. [1]. Зашифрованные разведения рекомбинантной плазмиды (pВН10), содержащей HIV-геном без длинных повторов (LTRs), с концентрацией 0; 0,1; 1,0; 10; 100; 1000 и 10 000 копий в 2,5 мкл тестировали 26 лабораторий из 9 стран Европы. Двенадцать лабораторий детектировали 10 копий, 9 из которых детектировали 1 копию плазмиды. В то же

время некоторые лаборатории получили отрицательные результаты даже при тестировании образцов, содержащих 10 000 копий. Этот опыт показал, что без стандартов нельзя внедрять NAT-технологию в медицинскую практику.

К началу 1995 г. уже был накоплен достаточный опыт, свидетельствующий о том, что рекомбинантные структуры или сами вирусы, содержащиеся в культуральных средах, не могут быть использованы в качестве стандартов для определения лимита детекции ПЦР-анализа, поскольку не моделируют реальный материал для исследования – сыворотку или плазму крови, которые могут содержать ингибиторы Taq-полимеразы и нуклеазы. Оптимальным материалом для создания стандартов для ПЦР-детекции HIV, HCV и HBV является плазма людей-носителей этих вирусов, в которой они тестируются в течение нескольких лет независимыми методами в соответствии с протоколом международных испытаний в условиях стабилизации этой плазмы ультранизкими температурами (–80°C, жидкий азот), лиофилизацией, добавкой бактерицидных и консервирующих веществ. Получение 95% участников воспроизводимых результатов ПЦР-тестирования исходных образцов плазмы и их разведений 1:10 и 1:100 при использовании разных методов амплификации и тест-систем, в том числе и «in-house», является основанием для утверждения этих материалов в качестве международных стандартов ВОЗ.

Разработка международных NAT-стандартов была инициирована службой крови, которая требует полной вирусной безопасности донорской крови, ее компонентов и препаратов. С применением только методов ИФА этого достичь невозможно в силу косвенного характера выявления инфекционных агентов иммунотестированием вирусных антигенов и антител к ним. Однако, чтобы начать дополнительное генотестирование донорской крови на наличие вирусов, необходимо объективно оценивать чувствительность, с которой оно ежедневно ведется в конкретной лаборатории, и минимальные концентрации вирусов, которые могут быть у серонегативного донора. Создание международных стандартов одновременно снимает и проблему отбора метода генамплификации, приборов и наборов, так как международный стандарт каждый раз дает объективную совокупную оценку всего процесса генотестирования, включая и человеческий фактор.

---

\*Nucleic Acids Techniques

Стандартизация ген-амплификационного тестирования стала разрабатываться с 1995 года по отношению к вирусам гепатитов В, С, ВИЧ и парвовирусу В19 международной рабочей группой ВОЗ по стандартизации методов генной амплификации для тестирования донорской крови и ее компонентов (WHO SoGAT: WHO International working group on the standardisation of genomic amplification techniques for the virological safety testing of blood and blood products) на базе Национального института биологических стандартов и контроля в Англии (NIBSC: National Institute for Biological Standards and Control) и центральной лаборатории службы крови Красного Креста Нидерландов (CLB: Central Laboratory of the Red Cross Blood Transfusion Services of the Netherlands). Суть проводимой работы состояла в получении больших объемов вирусосодержащей плазмы, определении концентрации этих вирусов независимыми лабораториями, рассылки зашифрованных аликвот разведений этих сывороток в сухом льду десяткам лабораторий Европы и Америки, получении результатов, обобщении и обсуждении их 2 раза в год. Проведено 12 таких заседаний и одно дополнительное по TTV (transfusion transmitted virus) [2].

### NAT-стандарты для РНК ВИЧ

Работа по созданию NAT-стандартов для контроля детекции РНК ВИЧ проводилась более 5 лет в Национальном институте стандартов и контроля в Англии (NIBSC) в отделе ретровиологии под руководством докторов Clare Davis и Harvey Holmes.

Материалом для изготовления рабочего стандарта РНК ВИЧ-1 «PVS-1» со средним числом копий (код 99/634-002) и «PVS-2» с высоким числом копий (код 99/636) являлся изолят ВИЧ субтипа В, культивированный на мононуклеарных лейкоцитах крови человека. Взвесь этого вируса была разведена криосупернатантом плазмы крови человека, не содержащей HIV, HBsAg и HCV, и распределена по флаконам аликвотами по 1 мл.

Рабочий стандарт на РНК ВИЧ-1 «PVS-3» с низким содержанием копий вируса (код 99/766) был получен из плазмы человека, позитивной по РНК HIV-1, но отрицательной по антителам к HIV-1. Методом секвенирования гена Env V3 показано, что вирус является субтипом В HIV-1. Плазма, полученная методом плазмафореза от данного человека, была разведена дефиб-

ринированной плазмой, отрицательной по HIV, HBsAg и HCV, и распределена по флаконам аликвотами по 1,25 мл.

Все три NAT-стандарта РНК HIV-1 могут использоваться как для количественных, так и для качественных тестирований. Все флаконы должны храниться при  $-70^{\circ}\text{C}$  или ниже.

В соответствии с решением ВОЗ стандарты «PVS-1» и «PVS-3» были прокалиброваны в международных единицах:

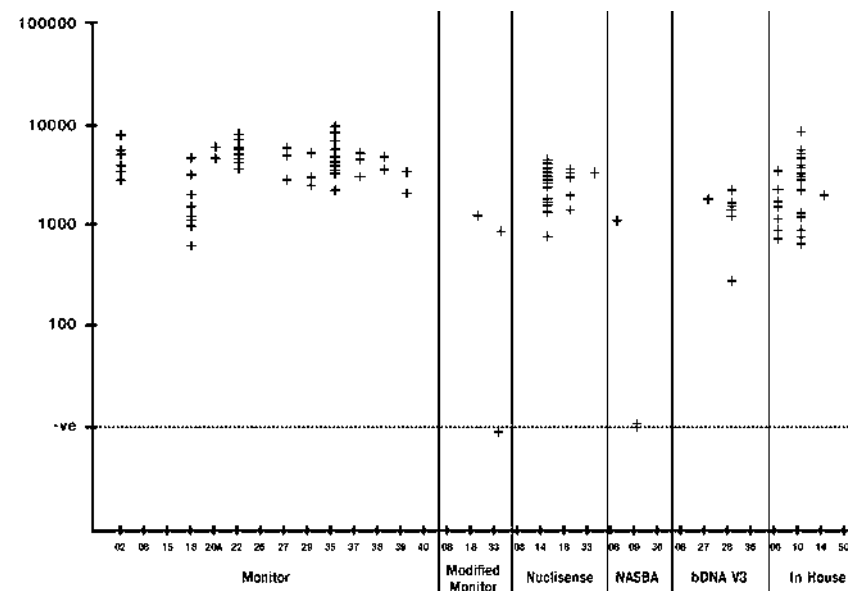
«PVS-1» = 3981 IU/мл или 3,60 ( $\log_{10}$  IU/мл);

«PVS-3» = 575 IU/мл или 2,76 ( $\log_{10}$  IU/мл);

«PVS-2» не был включен в эти испытания, но известно, что содержание в нем вируса в 10 раз больше, чем в «PVS-1».

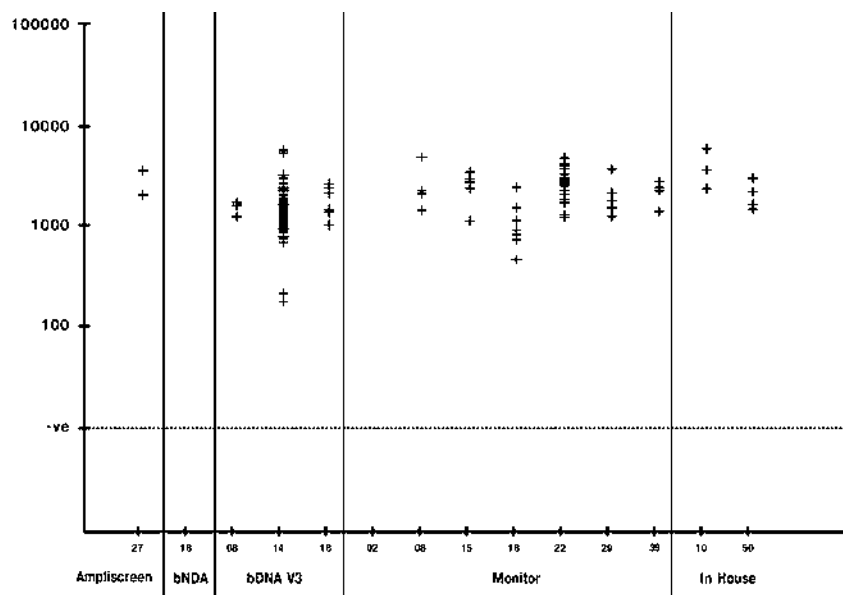
Для качественного NAT-тестирования следует использовать разведения в 3, 5 и 10 раз.

На рис. 1 и рис. 2 приведены результаты международных испытаний рабочего стандарта РНК HIV-1 «PVS-1», проведенных в 1997 и 1999 гг.



Ось абсцисс – номер лаборатории и метод определения.  
Ось ординат – число детектируемых копий HIV-1 в 1 мл.

**Рис.1.** Вариации результатов NAT-тестирования РНК-HIV-1 рабочего стандарта «PVS-1» лабораториями-участниками международных испытаний. Июнь 1997 г.



Ось абсцисс – номер лаборатории и метод определения.  
Ось ординат – число детектируемых копий HIV-1 в 1 мл.

**Рис.2.** Вариации результатов NAT-тестирования РНК-HIV-1 рабочего стандарта «PVS-1» лабораториями-участниками международных испытаний. Июнь 1999 г.

Стоимость 5 флаконов составляет 45 £ UK, дополнительная плата за инфекционно безопасную упаковку 25 £ UK. Цены за перевозку зависят от расстояния.

Международный рабочий стандарт РНК HIV-1 («International Standard for HIV-1 RNA», code 97/656), одобренный Европейским Комитетом экспертов по биологическим стандартам (ESBS), также может быть получен из NIBSC. Материалом для его изготовления являлась плазма крови человека, содержащая РНК HIV-1, антиген р24, и не содержащая антител к HIV-1, полученная методом плазмафореза. Эта плазма была разведена дефибрированной плазмой, отрицательной по HBsAg и антителам к HCV и HIV-1/2. Секвенирование генов V3 и gag показали принадлежность этого вируса к субтипу В. Концентрация вируса в этом международном стандарте (code 97/656) составляет 100 000 IU/мл [3]. Все флаконы хранятся при  $-20^{\circ}\text{C}$  и использу-

ются только один раз. Стоимость одного флакона составляет 45 £ UK, дополнительная плата 25 £ UK за инфекционно безопасную упаковку.

Известно, что HIV-1 может принадлежать к трем различным филогенетическим группам: М (субтипы А-Л), N и О, именно с этим связаны трудности детектирования некоторых субтипов. В связи с этим SoGAT решил создать референс-панели, содержащие РНК этих субтипов HIV-1. Такие панели изготовлены NIBSC (Code 01/466).

Панели состоят из разведений вирусов этих субтипов в неинфицированной криоплазме в диапазоне (2–20) тыс. копий/мл, и одного образца плазмы-разбавителя в качестве отрицательного контроля. Результаты международных испытаний по калибровке этой панели должны были быть готовы к концу 2001 года. Стоимость панели 100 £ UK. Предоставляется только полный комплект. Дополнительная цена 25 £ UK за вирусобезопасную упаковку.

### NAT-стандарт для ДНК HBV

NAT-системы детектируют ДНК HBV с различной чувствительностью, и поэтому возможны случаи переноса HBV с кровью, оцененной как NAT-негативной, вследствие недостаточной чувствительности использованной технологии NAT-тестирования [4]. В связи с этим создание международного стандарта для оценки и контроля чувствительности геноскринирования крови на наличие HBV также являлось чрезвычайно актуальной задачей. Проведенные в течение нескольких лет международные испытания, в которых участвовали 22 лаборатории из 9 стран, позволили ВОЗ утвердить международный NAT-стандарт на ДНК HBV. В качестве материала была использована лиофильно высушенная (материалы AA и BB) и жидкая плазма вирусносителя гепатита В. Несмотря на разнообразные методы и системы NAT, использованные участниками, были получены хорошо согласующиеся данные по оценке концентрации ДНК HBV в геномэквивалентах/мл (ГЭ/мл) в разных лабораториях при использовании как количественного анализа, так и метода предельных разведений (табл. 1). Вариации  $\log_{10}$  ГЭ/мл составляли 1,25–1,75 для указанных трех материалов. Различия в двух лиофилизированных материалах были статистически незначимыми. Материал AA был применен в качестве первого международного NAT-стан-



Таблица 1

**Концентрация HBV ( $\log_{10}$  ГЭ/мл) в трех материалах (AA, BB, CC), определенная в 23 лабораториях разных стран методом предельных разведений и различными количественными методами**

Лаборатория	Метод	$\log_{10}$ ГЭ/мл		
		AA	BB	CC
Качественный анализ				
1	AM	5-83	5-30	4-76
2	IN	6-70	6-89	5-39
4	A	5-82	4-79	2-91
5	IS	6-64	6-72	5-12
6	IN	5-68	5-99	4-99
7	IN	5-83	6-27	4-43
8	IS	7-04	6-34	4-97
9	IS	6-96	6-04	5-00
10	IS	6-51	6-54	5-01
11	IS	6-91	6-97	5-18
12	IN	6-48	6-31	5-59
13A <sup>c</sup>	SU	6-64	6-54	4-93
13B <sup>c</sup>	IN	6-66	7-06	5-33
14	IS	7-04	6-76	5-37
15	IN	5-67	6-53	4-87
16	A	6-31	5-35	4-73
17A <sup>d</sup>	IN	6-04	6-23	5-32
17B <sup>d</sup>	IN	6-38	6-30	5-65
18	IS	6-50	6-50	5-22
19	IS	6-36	6-44	5-42
21	IT	6-35	6-60	5-48
22	IN	6-86	6-55	5-32
23	IN	5-81	5-38	4-38
Количественный анализ				
1	AQ	6-70	6-62	5-37
3	BQ	6-48	6-46	–
9	IQ	6-69	6-56	5-12

A – ампликор;  
 AM – ампликор модифицированный;  
 AS – амплискрин;  
 IS – «in house», однораундовая ПЦР;  
 N «in house», двураундовая ПЦР с «вложенными» праймерами;  
 SU – сумаи-тест;  
 IT – «in house», «TaqMan» ПЦР;  
 BQ – «branch»-ДНК-анализ;  
 с – использовались различные методы;  
 d – образцы разводились водой (A) или негативной плазмой (B).

дарта на ДНК HBV с концентрацией  $10^6$  международных единиц/мл (IU/мл) (code 97/746). Поскольку этот NAT-стандарт содержал генотип A adw-изолята, в последующих испытаниях необходимо получить данные о том, насколько он может применяться для контроля NAT-тестирования других генотипов HBV. Разумеется, этот NAT-стандарт необходим не только для контроля NAT-технологии скрининга крови, но и для контроля диагностики и мониторинга терапии HBV-инфекции.

#### **NAT-стандарт для РНК HCV**

Международный NAT-стандарт для РНК HCV был создан также из плазмы вирусносителя путем разведения ее HCV-негативной плазмой. Международные испытания этого материала, в которых участвовало 19 лабораторий из разных стран, были начаты в 1995 г. Координировал эти работы доктор J. Saldanha из отдела вирусологии NIBSC. В таблице 2 представлены результаты итоговых испытаний трех материалов в период с 1997 г. по 1998 г. [5]. ECBS ВОЗ (Европейский комитет по биологическим стандартам ВОЗ) в октябре 1999 г. утвердил материал AA в качестве международного стандарта ВОЗ. Утвержденная концентрация HCV в этом стандарте составляет  $5 \times 10^5$  ГЭ/мл или  $10^5$  IU/мл.

#### **NAT-стандарт для ДНК парвовируса B19**

Двадцать шесть лабораторий из четырнадцати стран участвовали в международных совместных испытаниях, чтобы принять международный NAT-стандарт ВОЗ для человеческого парвовируса B19. Четыре материала, представленные для испытаний (AA и BB лиофилизированные, CC и DD в жидком виде) были проанализированы с использованием нескольких различ-

Таблица 2

Результаты итоговых испытаний трех материалов (AA, BB, CC) NAT-стандарта для РНК HCV в период с 1997 г. по 1998 г.

Образец	Среднее значение	Min величина	Max величина	Интервал
<b>AA</b>				
Качественный анализ	5,01	3,14	6,20	3,06
Количественный анализ	5,82	5,27	6,36	1,09
<b>BB</b>				
Качественный анализ	5,03	3,00	5,96	2,96
Количественный анализ	5,77	5,31	6,32	1,01
<b>CC</b>				
Качественный анализ	4,61	3,13	6,20	3,07
Количественный анализ	5,06	3,59	5,65	2,06

ных NAT-технологий. В ходе испытаний было определено среднее содержание ДНК парвовируса В19 в каждом материале. В результате получены хорошо согласующиеся данные при использовании различных NAT-технологий. Средний  $\log_{10}$  ГЭ/мл для материала AA составил 5,72, для материала BB – 5,68, для материала CC – 5,79, для DD – 7,66. Различия в титрах между образцами AA, BB и CC не были статистически значимыми, но титр DD был существенно выше.

Основываясь на этом испытании, материал AA был предложен как международный стандарт ВОЗ. Это был первый международный NAT-стандарт ВОЗ для ДНК парвовируса В19. Каталожный номер этого стандарта – 99/800, концентрация ДНК вируса, определенная в ходе международных испытаний, составляет  $10^6$  IU/мл. Поскольку каждая пробирка этого стандарта содержит 0,5 мл, то количество вируса в нем составляет  $5 \times 10^5$  IU.

### Заключение

Международные NAT-стандарты на HIV, HBV, HCV и парвовирус В19 (табл. 3), являются доступными и могут быть по-

Таблица 3

Международные NAT-стандарты на HIV, HBV, HCV и парвовирус В19

Концентрация вирусов в международных стандартах ВОЗ	
HIV-1	100 000 МЕ/мл
HCV	100 000 МЕ/мл
HBV	1 000 000 МЕ/мл
В19	1 000 000 МЕ/мл

лучены в NIBSC в соответствии с условиями, размещенными на странице в интернете: <http://www.nibsc.ac.uk/catalog>.

Но работа над ними продолжается как в плане изучения длительности сохранности исходных титров вирусов, так и в отношении инфекционной безопасности. Весьма интенсивные работы по этим вопросам проводятся Компанией Bioclinical Partners, INC (США), которая в конце 2001 г. была готова предоставить полученные NAT-стандарты на основе плазмы, содержащей инактивированные вирусы гепатитов В и С, ВИЧ, парвовируса В19 и вируса гепатита А, которые не требуют замораживания.

Мы считаем уместным привести полученные обобщенные данные международных испытаний профессионализма NAT-тестирования 6 вирусов десятками лабораториями мира с 1992 по 2000 год (табл. 4), которые опубликованы в сети Интернет [6].

Приведенные данные свидетельствуют, что использование NAT-стандартов для контроля скрининговых и диагностических исследований позволило значительно повысить чувствительность и специфичность генотестирования. В России, в лучшем случае, основная масса лабораторий получает результаты по чувствительности и специфичности анализа на уровне зарубежных лабораторий 1992 г.

Поэтому не подлежит сомнению, что для качественного улучшения работы лабораторий в России совершенно необходимо внедрять использование NAT-стандартов для контроля генотестирования, участвовать в Международных программах по созданию и испытанию NAT-стандартов, стандартизации методов генамплификации, разрабатывать и осуществлять программы по

Таблица 4

**Обобщенные данные международных испытаний  
профессионализма NAT-тестирования 6 вирусов  
с 1992 по 2000 год [6]**

Маркер	Год	Число лабораторий участников	Число лабораторий, представивших данные	Число исследований	Правильно определенные отр. образцы	Правильно определенные пол. образцы	Правильно определенные серийные разведения	Правильные результаты на всех образцах
HCV-RNA	1992	38	31	31	22 (71%)	23 (74%)	15 (48%)	12 (39%)
	1994	97	86	136	108 (79%)	119 (87%)	65 (48%)	61 (45%)
	1997	88	81	141	122 (87%)	135 (96%)	98 (70%)	95 (67%)
	1999	83	64	116	107 (92%)	113 (97%)	106 (91%)	99 (85%)
	2000	92	76	129	126 (98%)	116 (90%)		113 (88%)
HIV-RNA	1997	76	61	74	70 (95%)	71 (96%)	62 (84%)	61 (82%)
	1999	52	39	60	58 (97%)	50 (83%)	54 (90%)	50 (83%)
	2000	60	42	63	62 (98%)	60 (95%)		59 (94%)
HBV-DNA	1993	49	39	43	28 (65%)	34 (79%)	26 (60%)	19 (44%)
	1997	60	47	86	76 (88%)	86 (100%)	69 (80%)	54 (63%)
	1999	31	26	43	39 (91%)	43 (100%)	42 (98%)	39 (91%)
	2000	39	32	58	51 (88%)	49 (84%)		48 (83%)
CMV-DNA	1997	27	21	34	28 (82%)	31 (91%)	26 (76%)	23 (68%)
	1999	21	13	21	18 (86%)	19 (90%)	19 (90%)	16 (76%)
	2000	24	15	21	21 (100%)	19 (90%)		19 (90%)
Parvo-B19 DNA	2000		26	46	41 (89%)		44 (96%)	41 (89%)
HAV-RNA	2000	16	9	13	13 (100%)		13 (100%)	13 (100%)

созданию Национальных NAT-стандартов с использованием уже имеющегося опыта. В частности, один из авторов этой статьи (проф. Федоров Н.А.) с 1996 г. принимает участие в работе международной рабочей группе ВОЗ по стандартизации методов генной амплификации для тестирования донорской крови и ее ком-

понентов. Информация о работе SoGAT ежегодно публикуется им в ряде журналов, является темой его выступлений на различных конференциях, съездах, опубликованы переводы статей о зарубежном опыте.

### Литература

1. Bootman J.S., Kitchin P.A.: An international collaborative study to assess set of reference reagents for HIV-1 PCR. // *Journal of Virological Methods*, 1992; 37: 32–42.
2. Holmes H., Davis C., Heath A., Hewlett I., Lelie N. An International Collaborative Study to establish the 1<sup>st</sup> International Standard for HIV-1 RNA for use in Nucleic Acid-Based Techniques. // *Journal Virological Methods*, 2001; 92: 141–150.
3. Материалы 12 рабочих совещаний WHO SoGAT (WHO International working group on the standardisation of genomic amplification techniques for the virological safety testing of blood and blood products) за период 1995–2001 гг.
4. Saldanha J. Standardization of Nucleic Acid Amplification Techniques (NAT) for the Detection of Viral Contamination of Blood and Blood Products. // Cambridge Healthtech Institutes, Conference «Blood Safety-Europe», Nov. 16–17, 1998, Lisbon, Portugal.
5. Saldanha J., Gerlich W., Lelie.N., Dawson P., Heermann K., Heath A. Et The WHO Collaborative Study Group. An international collaborative study to establish a World Health Organisation standard for hepatitis B virus DNA nucleic acid amplification techniques. // *Vox Sanguinis*, 2001; 80: 63–71.
6. Lelie P.N., van Drimmelen A.A.J., McGavin K., Best S.J., Dax E.M. «International VQC proficiency programme for HBV/HCV/HIV NAT assays in blood screening laboratories», [www.vqs.nl](http://www.vqs.nl).

## HBV NAT И АНТИ-НВс-ТЕСТИРОВАНИЕ ПОВЫШАЮТ БЕЗОПАСНОСТЬ КРОВИ

*В.Курт Рос, Марйике Вебер, Детлев Петерсен, Кристиан Дростен, Силвиа Бур, Валид Сирайс, Вольфганг Вайхерт, Дорис Хеджес, Эрхард Зайфрид*

Институт Трансфузионной медицины и иммуногематологии Германского Красного Креста, Гессе, Зандхофштрассе 1, 60528 Франкфурт, Германия

Перевод: Фёдоров Е.Н.

Научная редакция: проф. Фёдоров Н.А.

### РЕФЕРАТ

Рутинное HBV ПЦР-скринирование донаций крови в нашем институте было введено в январе 1997 г. с целью исполнения программы NAT-скринирования передающихся с трансфузиями вирусов. Тестированием были успешно охвачены также другие учреждения службы крови с общим числом тестов 1 300 000 образцов в год.

**Методы:** Минипулы из 96 донаций формировали с использованием автоматических дозаторов. В минипулы включались также HBsAg-реактивные донации. Вирус гепатита В концентрировали в минипулах путем центрифугирования. Для амплификации ДНК HBV использовали «in-house» ПЦР и TaqMan ПЦР в реальном времени.

Чувствительность детекции достигала 1 000 геномэквивалентов ДНК HBV/мл (ГЭ/мл) для каждой индивидуальной донорской плазмы. Были внедрены подтверждающие ПЦР-тесты индивидуальных образцов и ПЦР-тесты индивидуальных образцов с предварительным концентрированием вируса с чувствительностью 300 и 5–10 ГЭ/мл, соответственно.

**Результаты:** После завершения скринирования 3,6 миллиона донорских образцов было идентифицировано 6 HBV ПЦР-положительных, HBsAg-негативных донаций. Двое из этих доноров были в состоянии пресероконверсии, а четверо-хроническими носителями HBV в низких концентрациях с положительными результатами ИФА на наличие антител (АТ) к *core*-антигену HBV. Ретестирование ПЦР индивидуальных донаций 432 HBsAg-положительных образцов идентифицировало 37 донаций, кото-

рые были отрицательны в минипул-ПЦР. Ретроспективное обследование доноров (look-back procedures) показало, что минипул-ПЦР-тестирование не пропустило ни одного инфицированного HBV донора, находящегося в стадии «пресероконверсии». Однако ретроспективное исследование реципиентов выявило 2 анти-HBсog-положительных реципиента, которые получили HBsAg- и минипул-ПЦР-негативную плазму от анти-HBсog-положительных доноров, положительных в ПЦР с индивидуальными образцами донаций. Тестирование случайно выбранных 729 HBsAg и минипул-ПЦР-негативных, но положительных по анти-HBсog доноров методом ПЦР с индивидуальными образцами с концентрированием, идентифицировало 7 доноров как носителей HBV с концентрацией около 10 вирусных частиц/мл донорской плазмы.

**Заключение:** Минипул-ПЦР-тестирование после концентрирования вирусных частиц является достаточно чувствительным, чтобы идентифицировать HBsAg-негативных вирусоносителей, находящихся в стадии пресероконверсии, и HBsAg-негативных, но анти-HBсog-положительных хронических носителей HBV. HBV NAT-тестирование совместно с анти-HBсog-скринированием способно значительно снизить остаточный риск трансфузионного HBV инфицирования.

**Ключевые слова:** HBV, NAT, анти-HBсog, доноры крови, донация, тестирование, негативность, чувствительность.

### ВВЕДЕНИЕ

Наиболее часто рассматриваемые в свете трансфузионной безопасности вирусы, которые тестируются в настоящее время, – это вирус гепатита С, ВИЧ-1/2 и вирус гепатита В. Для обеспечения безопасности препаратов крови по HBV используют ИФА для выявления HBsAg HBV. Посттрансфузионный гепатит В стал достаточно редким после введения тестирования на HBsAg в начале 70-х. Последние статистические расчеты, основанные на выборке среди американских кадровых доноров, выявили остаточный риск, варьирующий в пределах от 1 на 30 000 и до 1 на 147 000 [1]. Аналогичные данные были опубликованы для Германских кадровых доноров [2].

Рутинное NAT-тестирование (nucleic acid testing – NAT) ДНК HBV в крови в нашей Службе Крови было введено в январе 1997 года [3]. NAT-тестирование на HBV не было еще обязательным в Европе и США, хотя значительное число HBV ДНК-

положительных, HBsAg-негативных доноров уже было описано [4, 7, 11, 15, 17, 18, 22]. Было показано, что плазма от этих доноров передает HBV реципиентам и экспериментально инфицированным обезьянам шимпанзе. Большинство из этих трансмиссий происходит при использовании препаратов крови хронических HBV-носителей с низкой концентрацией вируса. Анти-HBc-тестирование может выявить этих носителей в популяции доноров, и оно было введено в некоторых странах, например, в США [15, 23], но не в Германии. Однако с помощью анти-HBc-тестирования невозможно выявить инфицированных HBV HBsAg-негативных доноров в пресероконверсионной фазе диагностического окна. Вследствие медленного нарастания концентрации вируса и небольшого диагностического окна ожидалось, что от NAT потребуется очень высокая чувствительность, чтобы выявлять этих доноров [24]. Вследствие этого ставилось под сомнение необходимость минипул-ПЦР-тестирования HBV в добавление к HBsAg-скринингу [25].

В настоящем сообщении мы излагаем данные по чувствительности минипул-ПЦР-тестирования и итоги обследования HBsAg-негативных индивидуумов, находящихся в фазе «пресероконверсии», и анти-HBc-позитивных хронических носителей HBV, полученные после рутинного скринирования 3,6 млн донаций в условиях банка крови Центральной Европы.

## МЕТОДЫ

### *Минипул-ПЦР*

Формирование пулов из 96 образцов производили как это было описано ранее [3]. HBsAg-позитивные образцы включали в пулы. С целью снижения риска контаминации пулов HBV образцы от доноров, сдававших кровь первый раз, формировали в отдельные пулы. Концентрирование вирусных частиц в минипулах проводили центрифугированием при 48 000 g в течение одного часа. Вирусную ДНК экстрагировали с использованием набора Qiagen (Qiagen, Hilden, Germany). Нуклеиновую кислоту элюировали с колонок Qiagen в конечном объеме 75 мкл. Аликвоту 20 мкл (что соответствует 26,7 мкл индивидуальной плазмы) вносили в амплификационную смесь для проведения ПЦР-анализа.

Для амплификации ДНК HBV мы создали однораундовую «in-house» ПЦР с детекцией полученных ампликонов методом агарозного гель-электрофореза (до апреля 1998 г.) [3]. Позже была использована TaqMan® ПЦР в реальном времени на установке ABI Prism® 7700 (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) с детекцией в планшетном варианте [26]. Праймеры и зонды описаны в работе [27]. Лимит детекции при воспроизводимости 95% составлял 1000 ГЭ/мл для каждой индивидуальной плазмы [3, 27]. Достоверность и чувствительность каждой индивидуальной ПЦР контролировали внутренним стандартом, представляющим собой ампликон ДНК HBV, модифицированный посредством вставки в плазмидный вектор участка для связывания зонда. Этот внутренний стандарт экстрагировался и амплифицировался совместно с вирусной ДНК при концентрации, позволяющей проводить контроль чувствительности каждой индивидуальной ПЦР в пределах лимита детекции.

### *ПЦР-тестирование индивидуальных образцов и обогащенных индивидуальных образцов*

Для ПЦР-анализа индивидуальных образцов на наличие HBV мы разработали более чувствительный метод экстракции с применением гидролиза протеиназой K до стадии стандартной экстракции набором реактивов Qiagen. 100 мкл плазмы инкубировали со 100 мкл лизирующего буфера (100 mM TRIS pH 7,0; 75 mM EDTA pH 8,0; 10 mM NaCl; 1% SDS) и 20 мг/мл протеиназы K в течение 10 мин при 56°C. Далее лизаты обрабатывали по стандартному протоколу Qiagen. Выделенную ДНК растворяли в 30 мкл воды, из которых 20 мкл брали в TaqMan® ПЦР. С достоверностью 95% лимит детекции достигал 300 геноэквивалентов в 1 мл донорской плазмы. Для дальнейшего повышения чувствительности мы центрифугировали образцы индивидуальной донорской плазмы (9,6 мл) при 48 000 g в течение 1 часа с последующей экстракцией вирусной ДНК из полученного осадка (ПЦР-тестирование индивидуальных обогащенных образцов).

### *Серологическое тестирование*

Для выявления HBsAg использовали технологию АВОТТ PRISM® (Abbott Laboratories Delkenheim, Germany). Для повторного тестирования образцов, имевших реактивность, и для скринирования малого числа образцов использовали технологию АВОТТ AXSYM®. Для подтверждения результатов скринирова-

ния один из следующих анализов должен был быть положительным: HBeAg, антитела к HBc или подтверждающий тест на HBsAg (все Abbott). Тестирование аланинаминотрансферазы проводили в соответствии с протоколом на приборе Bayer OPERA® (Bayer Ag, Wuppertal, Germany) и на установке Epos® (Eppendorf, Hamburg, Germany). Все данные, основанные на серологическом тестировании, получены в службе крови Красного Креста Hesse и Баварии.

#### **Количественная ПЦР**

Вирусную нагрузку в образцах плазмы измеряли в триплетах с использованием TaqMan® ПЦР в индивидуальных образцах согласно инструкциям для системы ABI Prism® 7700. Калибровочную кривую строили с использованием 10-кратных разведений стандарта HBV Euroher 2. Лимит детекции ДНК HBV составлял 300 ГЭ/мл для каждой индивидуальной донорской плазмы.

#### **Секвенирование и филогенетический анализ**

Специфические праймеры на s-ген HBV, core-ген и x-ген (нуклеотидные позиции согласно Galbiert et al. [28]: 254–273 и 412–433; 2268–2286 и 2421–2438; 1426–1449 и 1652–1675) использовали для секвенирования положительной и отрицательной цепей соответственно. Продукты амплификации секвенировали с использованием набора для секвенирования Applied Biosystems. Последовательность нуклеотидов определяли на секвенаторе ABI Prism® 310.

Филогенетический анализ проводили, используя программу *Treecon for Windows* (Vs. 1.3b) [29]. Матрикс рассчитывался с использованием коррекции Кимуры [30], в то время как филогенетическое дерево рассчитывалось методом ближайшего соседа [31]. Bootstrap-анализ повторных образцов использовался как псевдоэмпирический тест надежности филогенетической топологии [32].

#### **Ретроспективные исследования**

Ретроспективные исследования проводились согласно правилам, принятым в Германии. Ретроспективные исследования доноров инициировались после появления положительной донорской, подтвержденной в повторном исследовании в подтверждающих тестах. По нашей базе данных получали информацию о соответствующих донорах и их предыдущих донациях. Архиви-

рованные образцы, начиная с тех, которые были получены за 6 месяцев до последней негативной донорской, размораживали и повторно исследовали методами ИФА и ПЦР. Реципиенты этих образцов плазмы исследовались на наличие вирусных маркеров.

Ретроспективные исследования реципиентов начинались, когда мы получали уведомление о подозрении на вирусную трансмиссию реципиенту через наш продукт крови. Среди доноров этих реципиентов процедуре ретроспективного исследования подвергались доноры, имевшие положительные результаты анализа какой-либо из последующих донаций.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ**

#### **Выполнение ПЦР ДНК HBV**

Служба крови Красного Креста Hesse, Франкфурт-на-Майне (Германия) начала NAT-тестирование всех донаций области Hesse в январе 1997 г., служба крови Красного Креста Баварии – в январе 1999 г. в институте Wiesentheid (Германия). Применяемые методы были идентичны на обеих базах. Всего к сентябрю 2000 г. было протестировано 3,6 млн донаций. Уровень ложноположительных результатов тестирования минипулов значительно снизился (с 1,4% до 0,1%) после внедрения TaqMan® технологии и использования пипеток с поршневыми наконечниками вместо обычных пипеток и наконечников с фильтрами.

#### **Результаты HBV минипул-ПЦР-тестирования HBsAg-позитивных подтвержденных образцов**

195 из 292 (66,8%) и 103 из 140 (73,6%) HBsAg-позитивных подтвержденных образцов были положительны в ПЦР-минипул-тестировании в институтах Франкфурта и Wiesentheid соответственно. Подтверждающее ПЦР-тестирование индивидуальных HBsAg-позитивных образцов, которые были отрицательны в минипул-ПЦР-тестировании, начали в июле 1998 г. во Франкфурте и в январе 1999 г. в Wiesentheid. Оно выявило 37 минипул-ПЦР-негативных образцов, но позитивных в индивидуальном ПЦР тестировании (во Франкфурте – 20, в Wiesentheid – 17). Совместно минипул-ПЦР- и ПЦР-тестирование индивидуальных образцов выявило 335 HBV-ДНК-положительных образцов из 432 HBsAg подтвержденно-позитивных (77,5%).

**Результаты HBV минипул-ПЦР-тестирования HBsAg-негативных образцов**

В результате анализа 3,6 млн донаций мы идентифицировали 6 HBsAg-негативных донаций, положительных в минипул-ПЦР-тестировании ДНК HBV. Средний результат: 1 инфекционная донация на 600 000 в Центральной Европе (Германия, Австрия, Люксембург), которая была бы пропущена без применения ПЦР-тестирования. Частота ПЦР-положительных HBsAg-отрицательных донаций составила 1:390 000 для земли Hesse, 1:820 000 для всей Германии (включая Hesse) и 1:530 000 для Австрии.

Все эти HBV ПЦР-положительные доноры имели нормальный уровень АЛТ – ниже 22 Ед/л. Два донора находились в пресеро-конверсионной фазе и четыре были хроническими анти-HBc-положительными, анти-HBs-негативными носителями HBV в низкой концентрации. Для одного HBV-носителя мы смогли показать, что виремия была транзиторной и длилась, по крайней мере, 6 месяцев со снижением концентрации вируса в плазме (табл. 1). Реципиенты, получившие донации от этого донора, негативные в минипул-ПЦР-тестировании, были HBV-негативными.

Один донор, находящийся в пресероконверсионной стадии, демонстрировал транзиторную виремию постоянно ниже лимита детекции АБВОТТ PRISM® и АХСЫМ® HBsAg-тестирования (рис. 1а, 1б). Сероконверсия по анти-HBs и анти-HBc произошла через 3 и 6 месяцев соответственно после первого положительного ПЦР-результата (рис. 1с). Донор был инфицирован при сексуальном контакте со своей невестой, хронически инфицированной тайкой с высоким уровнем виремии. Его тромбоциты были переданы в лечебную сеть без результата ПЦР-анализа по причине их нехватки и одновременно случившейся контаминации ПЦР-лаборатории ампликонами HBV, что отсрочило получение результатов теста. Эритроциты и карантинизированная плазма были изъяты и уничтожены. Реципиент тромбоцитов стал транзиторно HBsAg- и ПЦР-положительным и у него произошла сероконверсия по анти-HBc- и анти-HBs-антителам без клинических симптомов. Было проведено секвенирование и филогенетический анализ изолятов реципиента, донора и инфицированной женщины. Все три изолята показали 100% идентичность нуклеотидной последовательности HBs-, core- и x-генов, что можно считать доказательством трансмиссии.

Таблица 1

**Динамическое обследование анти-HBc-положительного хронического HBV-носителя с низким уровнем виремии**

Дни после донации	Минипул-ПЦР-тестирование	ПЦР индивидуального образца, 0,1мл	ПЦР обогащённого образца, 9,6 мл	HBsAg	АЛТ Ед/л
0 (донация)	+	нт	нт	–	15
(СЗП)	+	нт	+	нт	Нт
13	+	нт	нт	–	14
20	–	–	+	–	13
34	–	+	нт	–	16
48	–	+	нт	–	15
62	–	+	нт	–	12
90	–	– +	нт	–	15
131	–	–	+	–	нт

Архивные образцы предыдущих донаций были при ПЦР в индивидуальных образцах негативными.

СЗП = свежзамороженная плазма;

АЛТ = аланинаминотрансфераза;

+ = положительный;

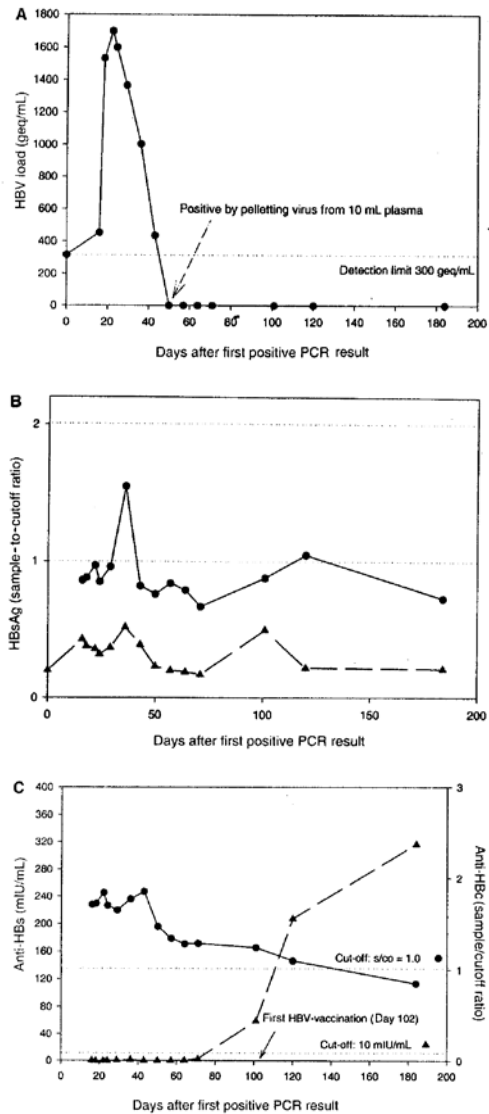
– = отрицательный;

– + = отрицательный, отрицательный, положительный в трёх последовательных экстракциях и амплификациях;

нт = не тестировался.

**Чувствительность минипул-ПЦР-тестирования на HBV**

Перед нами встала задача – выяснить, достаточно ли высока чувствительность минипул-ПЦР-тестирования для выявления всех инфицированных, находящихся в периоде диагностического окна, которые были бы пропущены существующим HBsAg-скринингом. Для этого мы провели ретроспективное исследование всех доноров института Франкфурта, у которых наблюдали сероконверсию с момента внедрения минипул-ПЦР-тестирования с января 1997 г. Всего было проведено 15 ретроспективных исследований доноров и исследовано 16 архивированных образцов пресероконверсионных донаций. Все они оказались негативными при повторном ПЦР-тестировании индивиду-



**Рис.1.** Динамика результатов ПЦР-анализа и ИФА-анализа на HBs-антиген и антитела к HBs-антигенам у донора в стадии пресероконверсии и последующее время.

**а)** Количественные ПЦР-измерения HBV в геноэквивалентах/мл в последующие дни после первого ПЦР-положительного результата (ось X). Лимит детекции показан пунктирной линией (ось Y). Стрелка указывает на дату донации, определенную как HBV-положительную при проведении индивидуальной ПЦР с обогащением.

**в)** Величина HBsAg как отношение ОП образец/катофф (ось Y) в последующие дни после первого ПЦР-положительного результата (ось X). Измерения HBsAg производились на установке ABBOTT PRISM® (прерывистая линия с треугольниками) и на установке Abbott AxSYM® (сплошная линия с кружками). Значения катофф для каждого измерения показаны пунктирными горизонтальными линиями (верхняя – AxSYM, нижняя – PRISM).

**с)** Концентрации анти-HBs (левая ось Y, прерывистая линия с треугольниками) и анти-HBc (правая ось Y, сплошная линия с кружками), измерения после первого ПЦР-положительного результата (ось X). Катофф обозначены пунктирными горизонтальными линиями (верхняя – анти-HBc, нижняя – анти-HBs). Анти- HBs  $\geq 10$  мМЕ/мл и анти-HBc  $\leq 1,0$  образец /катофф(с/ко) = положительное значение. День после первой вакцинации HBV указан стрелкой.

альных образцов. 13 исследуемых образцов удалось повторно тестировать на анти-HBc, 8 из них оказались положительными. Компоненты крови этих восьми анти-HBc-положительных донаций были перелиты 10 реципиентам. Один реципиент оказался анти-HBc-негативным, один был анти-HBc-положительным до трансфузии и восемь реципиентов умерло из-за основной причины заболевания.

С момента внедрения NAT в 1997 г. мы протестировали методом ПЦР и серологическим методом при ретроспективных исследованиях 276 доноров в связи с 27 случаями подозрения в трансмиссии HBV реципиентам. Тринадцать доноров оказались анти-HBc-положительными. Только пять из них сдавали кровь после введения ПЦР-тестирования. Для 11 из 13 доноров у нас имелись архивные образцы, и все они оказались анти-HBc-положительными. Только один образец, датированный 1996 г., был позитивен на HBV в ПЦР-тестировании индивидуальных образцов. Последовательность ДНК HBV оказалась идентичной последовательности ДНК HBV реципиента, что указывает на трансмиссию. Что же касается негативных при ПЦР-тестировании архивных образцов, трансмиссия HBV-реципиентам не может быть установлена.



**Доноры с низким уровнем носительства HBV, выявленные методом ПЦР в индивидуальных образцах, обогащенных центрифугированием**

Донор	Минипул-ПЦР, 0,1 мл	Обогащен. ПЦР, 9,6 мл	HBsAg, s/co	Анти-HBc IgM, s/co	Анти-HBc, s/co	Анти-HBs, мМЕ/мл
1	–	++++	0,17	0,027	0,29	93,7
2	–	+++ –	0,25	0,756	0,05	213,1
3	–	+++ –	0,22	0,066	0,08	>1000,0
4	–	+++	0,13	1,148	0,15	>1000,0
5	–	+++	0,17	0,044	0,17	23
6	–	+++	отр.	н/д	положит.	положит.
7	–	+++	0,19	0,034	0,05	отр.

Тестированные доноры как HBsAg и минипул-ПЦР-негативные, но анти-HBc и анти-HBs позитивные = 446;  
 HBsAg, анти-HBs и минипул-ПЦР-негативные, но анти-HBc позитивные = 283;  
 Обогащен. ПЦР = ПЦР индивидуальных образцов после обогащения центрифугированием, объем образца 9,6 мл;  
 s/co = образец/катофл;  
 HBsAg s/co  $\geq$  1,0 – положит.;  
 анти-HBc IgM s/co  $\leq$  1,0 – положит.;  
 анти-HBs  $\geq$  10 мМЕ/мл – положит.;  
 + = положит.;  
 Н/д = недоступна информация.

достаточного для того, чтобы донория показала положительный результат при HBsAg-тестировании. Сероконверсия по антителам к HBc- и HBs-антигенам выявлялась только через несколько месяцев. Обычно антитела к HBc появляются раньше антител к HBs [33], однако в данном случае раньше выявились антитела к HBs-антигену. Впервые последовательность передачи HBV от женщины – хронического носителя – мужчине половым путем и от мужчины через трансфузию тромбоцитов реципиенту была подтверждена ретроспективным исследованием и секвенированием соответствующих изолятов HBV. Было показано, что концентрация HBV 300 геном-эквивалентов/мл плазмы являет-

Мы проводили минипул-ПЦР-тестирование ПЦР-позитивного при индивидуальном тестировании образца после внесения его в негативный минипул. Минипул-ПЦР-тестирование дало положительный результат, что указывает на возможность обнаружения таких позитивных донаций и при минипул-тестировании. Донор сдавал кровь 6 раз после введения ПЦР-тестирования. Все 6 архивных образцов, негативных в минипул-ПЦР-тестировании и HBsAg-тестировании, были анти-HBc-позитивными. При ПЦР-тестировании индивидуальных образцов 4 образца были негативными и 2 были переменными или негативными, как могло бы ожидать для образцов с вирусной концентрацией, близкой к лимиту детекции (распределение Пуассона). Реципиенты соответствующих продуктов крови были анти-HBc-позитивными, HBsAg-негативными и негативными при ПЦР-тестировании индивидуальных образцов. Соответственно, трансмиссия не могла быть подтверждена секвенированием.

После того как мы идентифицировали 4 HBsAg-негативных, анти-HBc-позитивных хронических носителей с низким уровнем HBV методом минипул-ПЦР-тестирования и повторным ПЦР-тестированием индивидуальных архивных образцов во время ретроспективного исследования, мы заинтересовались, удастся ли найти с помощью более чувствительной ПЦР дополнительных HBsAg-негативных HBV-носителей с низкой концентрацией среди анти-HBc-позитивных. 7 из 729 случайно отобранных анти-HBc-позитивных донаций были идентифицированы как положительные при их исследовании методом индивидуальной ПЦР с предварительным концентрированием вируса центрифугированием из 9,6 мл плазмы (табл. 2). Рассчитанная концентрация вирусных частиц в этих образцах была ниже 10 ГЭ/мл донорской плазмы.

### Обсуждение

HBV ПЦР-тестирование было начато одновременно с HCV и HIV-1 ПЦР-тестированием в 1997 г. Количество положительных результатов после минипул-ПЦР-тестирования 3,6 млн донаций крови из Центральной Европы (Германия, Австрия, Люксембург) оказалось ниже теоретически рассчитанного [1, 2], и только 2 из 6 HBV ПЦР-позитивных донаций были от доноров, находящихся в периоде пресероконверсионного окна. У одного донора была выявлена транзитная вирусемия очень низкого уровня, не-

ся достаточной для передачи HBV инфекции, и что доноры могут быть заразными даже без симптомов инфекции или детектируемой HBs-антигемии. Возможно, этим путем HBV незаметно распространяется в значительную часть анти-HBc-положительных доноров крови, которые не могут припомнить рискованного поведения или клинических симптомов. Они могут быть выявлены только ретроспективно методом анти-HBc-тестирования.

Обнаружение с помощью минипул-ПЦР-тестирования четырех HBV ПЦР-положительных, HBsAg-негативных, но анти-HBc-положительных донаций свидетельствует в пользу введения анти-HBc и/или NAT-скринирования. Более того, мы показали, что у HBsAg-негативных, анти-HBc-положительных доноров вирусемия может транзиторно возникать и длиться в течение нескольких месяцев, оставаясь на уровне ниже лимита детекции минипул-ПЦР-тестирования и даже ПЦР-тестирования индивидуальных образцов. Такое течение гепатита В было описано ранее также в работах [9, 14, 15, 19, 33]. Только ПЦР-тестирование с применением концентрирования вируса из больших объемов позволяет детектировать ДНК HBV в таких донациях длительное время после того, как ПЦР-тестирование индивидуальных образцов становится негативным. Даже рутинное ПЦР-тестирование индивидуальных образцов недостаточно чувствительно для того, чтобы идентифицировать носителей с низким уровнем вирусемии. Необходимость анти-HBc-тестирования еще больше подтверждается тем, что мы обнаружили 7 из 729 HBsAg-негативных, анти-HBc-положительных донаций только ПЦР-тестированием с применением концентрирования из больших объемов. Тот факт, что 6 из них были анти-HBs-положительными, находится в согласии с предыдущими работами, в которых использовались высокочувствительные методы ПЦР [5–7, 10, 12–14, 20]. Однако 3 из этих доноров имели концентрацию антител к HBsAg выше 100 мЕ/мл, что, как полагалось, является достаточным для иммунологической защиты и ингибирует трансмиссию [34]. Вероятно ли это, остается под вопросом и может быть доказано только ретроспективными исследованиями, рассматриваемыми ниже, и экспериментами по инфицированию чувствительных животных (шимпанзе).

Превосходство ПЦР-тестирования индивидуальных образцов над минипул-ПЦР-тестированием в чувствительности было продемонстрировано на примере наличия 37 HBsAg-положительных

донаций, которые были пропущены минипул-ПЦР-тестированием. Основная причина повышенной чувствительности ПЦР-тестирования индивидуальных образцов заключается в дополнительном лизировании протеиназой К образца плазмы перед экстракцией нуклеиновых кислот, что способствует освобождению ДНК HBV.

Однако повторное тестирование архивных образцов показало, что ни одна положительная в ПЦР-тестировании индивидуальных образцов донация не прошла минипул-ПЦР-тестирование. Это не обязательно указывает на недостаточную чувствительность для всех пресероконверсионных донаций.

При ретроспективном исследовании реципиента, получавшего препараты крови в 1996 г. до введения минипул-ПЦР-тестирования, мы обнаружили трансмиссию HBV через донацию, ретроспективно протестированную минипул-ПЦР как положительную. Однако донор продолжал сдавать кровь и после введения минипул-ПЦР-тестирования, и 2 из 6 архивных образцов были переменны по положительности или отрицательности при ПЦР-тестировании индивидуальных образцов. Хотя реципиенты этих двух донаций были анти-HBc-положительными, трансмиссия не могла быть подтверждена секвенированием, потому что они были HBV-негативными при ПЦР-тестировании. Однако реципиенты донаций этого донора, которые были негативны в ПЦР-тестировании индивидуальных образцов, были анти-HBc-негативными.

Наши данные показывают, что минипул-ПЦР-тестирование снижает остаточный риск передачи HBV от лиц, находящихся в пресероконверсионном периоде, и лиц, являющихся хроническими носителями с низким титром вируса. Хотя мы показали, что минипул-ПЦР-тестирование надежно выявляет лиц, находящихся в стадии пресероконверсии, есть свидетельства того, что значительная доля хронических носителей с низким титром вируса пропускается. Более того, наши данные показывают, что частота лиц находящихся в стадии пресероконверсии, низка среди популяции доноров Центральной Европы в сравнении с частотой анти-HBc-положительных лиц, хронических носителей HBVc низкой концентрацией вируса, и что анти-HBc-скринирование смогло бы значительно снизить остаточный риск. Минипул-ПЦР-тестирование и даже ПЦР-тестирование индивидуальных образцов не могут быть достаточно чувствительными, чтобы обеспечить аналогичное снижение уровня риска по отношению к хро-

ническим носителям с низким титром вируса в той степени, в которой это может сделать анти-НВс-скринирование. Однако трансмиссию HBV через пресероконверсионные донации можно уменьшить только с помощью NAT. Иными словами, скринирование на анти-НВс и чувствительные NAT-технологии (с лимитом детекции менее 300 геномэквивалентов/мл донорской плазмы; см. рис.1а) могут обеспечить самый высокий уровень безопасности, возможный на настоящий момент. Достоинства АЛТ и НВсAg-тестирования в этом случае должны быть переоценены.

*Мы очень высоко оцениваем экспертную техническую поддержку Caroline Weis, Silke Schmidt, Iris Sommer и Beate Kempf. Мы благодарим Mike Busch из Blood Centers of the Pacific, San Francisco, California, за плодотворное обсуждение и критическое прочтение рукописи. Участвовали следующие службы крови: Bad Kreuznach, Rheinland-Pfalz, Germany; Gera, Thüringen, Germany; Klagenfurt, Kärnten, Austria; Feldkirch, Vorarlberg Austria; Innsbruck, Tirol, Austria; Salzburg, Salzburg, Austria; Luxembourg, Luxembourg и институты Koblenz и вооруженных сил Германии.*

## Литература

1. Schreiber G.B., Busch M.P., Kleinman S.H., Koreliz J.J. The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. N. Engl. J. Med. 1996; 334:1685-90.
2. Głьск D., Maurer C., Kubanek B. HIV, HCV and HBV in blood donors. The study group Berufsverband Deutscher Transfusionsmediziner e. V. Infusionsther Transfusionsmed 1997; 24:167-70.
3. Roth W.K., Weber M., Seifried E. Feasibility and efficacy of routine PCR screening of blood donations for hepatitis C virus, hepatitis B virus, and HIV-1 in a blood-bank setting. Lancet 1999; 353:359-63.
4. Thicrs V., Nakajima E., Kremsdorf D. et al. Transmission of hepatitis B from hepatitis-B-seronegative subjects. Lancet 1988; 2:1273-6.
5. Paterlini P., Gerken G., Nakajima E. et al. Polymerase chain reaction to detect hepatitis B virus DNA and UNA sequences in primary liver cancers from patients negative for hepatitis B surface antigen. N. Engl. J. Med. 1990; 323:80-5.
6. Marcellin P., Martinot-Peignoux M., Lorient M.A., et al. Persistence of hepatitis B virus DNA demonstrated by polymerase chain reaction

in serum and liver after loss of HBsAg induced by antiviral therapy. Ann. Intern. Med. 1990; 112:227-8.

7. Liang T.J., Blum H.E., Wands J.R. Characterization and biological properties of a hepatitis B virus isolated from a patient without hepatitis B virus serologic markers. Hepatology 1990; 12:204-12.
8. Shih L.N., Sheu J.C., Wang J.T. et al. Serum hepalilis B virus DNA in healthy HBsAg-negative Chinese adults evaluated by polymerase chain reaction. J. Med. Virol. 1990; 32:257-60.
9. Luo K.X., Zhou R., He C. et al. Hepatitis B virus DNA in sera of virus carriers positive exclusively for antibodies lo the hepatitis B core antigen. J. Med. Virol. 1991; 35:55-9.
10. Pao C.C., Yao D.S., Lin C.Y. et al. Serum hepatitis B virus DNA in hepatitis B virus seropositive and seronegative patients with normal liver function. Am. J. Clin. Pathol. 1991; 95:591-6.
11. Wang J.T., Wang T.H., Sheu J.C. et al. Detection of hepatitis B virus DNA by polymerase chain reaction in plasma of volunteer blood donors negative for hepatitis B surface antigen. J. Infect. Dis. 1991; 163:397-9.
12. Adachi H., Kaneko S., Matsushita E. et al. Clearance of HBsAg in seven patients with chronic hepatitis B. Hepatology 1992; 16:1334-7.
13. Paterlini P., Driss F., Nalpas B. et al. Persistence of hepatitis B and hepatitis C viral genomes in primary liver cancers from HBsAg-negative patients: a study of low-endemic area. Hepatology 1993; 17:20-9.
14. Liang T.J., Bodenheimer H.C. Jr., Yankee R. et al. Presence of hepatitis B and C viral genomes in US blood donors as detected by polymerase chain reaction amplification. J. Med. Virol. 1994; 42:151-7.
15. Mosley J.W., Stevens C.E., Aach R.D. et al. Donor screening for antibody to hepatitis B core antigen and hepatitis B virus infection in transfusion recipients. Transfusion 1995; 35:5-12.
16. Paterlini P., Poussin K., Kew M. et al. Selective accumulation of the X transcript of hepatitis B virus in patients negative for hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma. Hepatology 1995; 21:313-21.
17. Rasenack J.W., Schlayer H.J., Hettler F. et al. Hepatitis B virus infection without immunological markers after open-heart surgery. Lancet 1995; 345:355-7.
18. Saraswat S., Banerjee K., Chaudhury N. et al. Post-transfusion hepatitis type B following multiple transfusions of HBsAg-negative blood. J. Hepatol. 1996; 25:639-43.

19. Hennig H., Dennin R.H., Haase D., Kirchner H. HBV-DNA positive findings in HBsAg negative blood donors and patients. *Beitr Infusionsther Transfusionsmed* 1997; 34:26-30.
20. Bahn A., Gerner P., Marline U. et al. Detection of different viral strains of hepatitis B virus in chronically infected children after seroconversion from HBsAg to anti-HBs indicating viral persistence. *J. Hepatol.* 1997; 27:973-8.
21. Attallah A.M., Hussein M., Tabll A. et al. High prevalence of hepatitis B viral DNA in cirrhotic patients without surface antigen. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1998; 2:516-7.
22. Jongerius J.M., Wester M., Cuypers H.T.M. et al. New hepatitis B virus mutant form in a blood donor that is undetectable in several hepatitis B surface antigen screening assays. *Transfusion* 1998; 38:56-9.
23. Infectious disease testing for blood transfusions. Mill Consensus Statement 1995; 13:1-27.
24. Peddada L., Heldebrant C., Smith R. et al. HBV viremia preceding HBsAg positivity: implications for minipool (MP) and individual donation (ID) HBV nucleic acid testing (NAT). *Transfusion* 2000; 40(Suppl): S. 49-301.
25. Tabor H., Yu M.Y., Hewlett I., Epstein I.S. Summary of a workshop on the implementation of NAT to screen donors of blood and plasma for viruses. *Transfusion* 2000; 40:1273-5.
26. Heid C.A., Stevens J, Livak K.J., Williams P.M. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996; 6:986-94.
27. Urosten C., Weber M., Seifried E., Roth W.K. Evaluation of a new PCR assay with competitive internal control sequence for blood donor screening. *Transfusion* 2000; 40:718-24.
28. Galibert F., Mandart E., Fitoussi F. et al. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature* 1979; 281:646-50.
29. Van de Peer Y., De Wachter R. Treecon for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Applic. Biosci.* 1994; 10:569-70.
30. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 1980; 16:111-20.
31. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987; 4:406-25.
32. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985; 39:783-91.
33. Grob P., Jilg W., Bornhak H. et al. Serological pattern «anti-HBc alone». Report on a workshop. *J. Med. Virol.* 2000; 62:450-5.
34. Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., editors. *Fields virology*. 3rd ed. Philadelphia/New York: Lippincott-Raven; 1996.

## РЕЗУЛЬТАТЫ HCV И HIV-1 NAT-СКРИНИРОВАНИЯ 3,6 МЛН ДОНАЦИЙ КРОВИ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ ЕВРОПЕ

*В. Курт Рос, Марийке Вебер, Силвия Бур,  
Кристиан Дростен, Вольфганг Вайхерт, Валид Сирайс,  
Дорис Хеджес, Эрхард Зайфрид*

Институт Трансфузионной медицины и иммуногематологии  
Германского Красного Креста, Гессе, Зандхофштрассе 1, 60528  
Франкфурт, Германия  
Институт Виесентхайд Баварского Красного Креста, Николаус-  
Фей-Штрассе 32, 97353 Виесентхайд, Германия

Перевод: Фёдоров Е.Н.  
Научная редакция: проф. Фёдоров Н.А.

### Реферат

HCV и HIV-1 NAT-тестирование всех донаций крови началось в наших институтах с января 1997 года с целью снижения остаточного риска инфицирования реципиентов препаратов крови. Мы сообщаем о результатах NAT-тестирования более чем 3,6 млн донаций в Центральной Европе.

**Методы:** Минипулы из 96 донорских образцов формировали с использованием дозирующих автоматов, включая ИФА-положительные образцы. Для компенсации разведения индивидуальных донорских образцов, происходящего при пулировании, вирусы концентрировали из пулов центрифугированием при 48000 g. Для тестирования РНК HCV использовали тест-систему Roche Cobas Amplicor®, а для РНК HIV-1 – «in house-PCR» тест-систему.

**Результаты:** Мы идентифицировали 6 HCV и 2 HIV-1 ПЦР-положительных среди ИФА-негативных донаций (частота 1:600 000 и 1:1 800 000, соответственно). ИФА-положительные образцы были независимо ретестированы ПЦР в индивидуальных образцах и различия в результатах по сравнению с минипул-ПЦР-тестированием не было. Всесторонний ретроспективный анализ архивированных образцов кадровых доноров, находившихся в пресероконверсионной фазе (39 по HCV, 11 по HIV), показал, что реципиенты введенных компонентов крови из NAT-негативных

пресероконверсионных донаций оставались серонегативными при анализе на HCV и HIV.

**Заключение:** Частота положительных результатов NAT-тестирования для доноров Центральной Европы оказалась меньше ожидаемых теоретических расчетов, проведенных для американских и немецких кадровых доноров. Ретроспективные процедуры на HCV и HIV показали, что ни один донор в стадии пресероконверсии не был пропущен при минипул-ПЦР-тестировании. Чувствительность минипул-ПЦР-тестирования после концентрирования вирусов является достаточно высокой, чтобы обеспечить детекцию вирусов в период «диагностического окна».

### ВВЕДЕНИЕ

Вирусная безопасность лечебных компонентов крови наипервейшим образом основывается на высокочувствительном ИФА-скринировании важных вирусов, передающихся с трансфузиями. Однако сохраняется остаточный риск инфицирования для донаций, проводившихся в период диагностического окна в пресероконверсионной фазе инфекции [8, 9], который составляет, по расчетам Schreiber et al, 1 на 500 000 и 1 на 103 000 для HIV и HCV, соответственно [1].

Несколько меньший риск для остаточного инфицирования HIV рассчитан Kleinmann et al. (1:677 000) и Gluck et al. [2, 3] для германских кадровых доноров.

Мы были первыми, кто ввел NAT-тестирование HCV и HIV-1 в нестойких продуктах крови, таких как эритромаасса и тромбоконцентрат, в январе 1997 г. [4]. В нашем институте заготавливается 270 000 донаций в год, что составляет более 90% потребляемых продуктов крови области Hesse. В дальнейшем мы расширили наше NAT-тестирование с целью обслуживания других учреждений службы крови. В результате в институте во Франкфурте на Майне стали тестировать 640 000 донаций в год или 4 000 образцов в день. В сентябре 1998 г. полный вариант нашей минипул-ПЦР-тест-технологии был полностью идентично воспроизведен в Баварском Институте Красного Креста в Wiesentheid, который тестирует сейчас 660 000 донаций в год, включая 100 000 образцов других учреждений службы крови. Наша NAT-система является наиболее обычной для Центральной Европы и тестирует 1,2 млн донаций в год.

В апреле 1999 г. NAT-тестирование эритроцитов и тромбоцитов на HCV было введено в качестве обязательного Институтом Пауля-Эрлиха, руководящим учреждением службы крови Германии [5]. Лимит чувствительности был установлен равным 5000 МЕ/мл по отношению к индивидуальной донации. С июля 1999 г. стало обязательным NAT-тестирование источника плазмы. NAT-тестирование на HIV-1 стало обязательным с 1 января 2001 г.

В этой работе мы представляем результаты HCV и HIV-1 NAT скринирования более чем 3,6 миллиона донаций в Центральной Европе. Кроме того, мы представляем данные о чувствительности NAT и об уровне NAT-положительных среди ИФА-положительных донаций.

## МЕТОДЫ

### Забор образцов

Для ПЦР-тестирования от каждого донора забирали по 6 мл крови в пробирки, содержащие ЭДТА. Образцы транспортировались при комнатной температуре и хранились при +4°C до окончания тестирования. Плазма отделялась и пулировалась в течение 48 ч после забора образцов. Аликвоты по 800 мкл плазмы каждого индивидуального образца и по 800 мкл каждого пула помещали в лунки планшет и хранили при 4°C до разрешения ПЦР-положительных пулов (до 7 дней), а затем замораживали и хранили при -30°C до 3 лет.

### Формирование минипулов

До 96 образцов (по 100 мкл каждого) объединяли с помощью автоматических пипетирующих автоматов TECAN GENESIS (TECAN, Hombrechtikon, Switzerland). Пулирование проводили в течение ночи, включая ИФА-положительные образцы. Донации от первичных доноров пулировались отдельно, так как у них процент серопозитивности по HCV в 8,3 раза выше, чем у наших кадровых доноров (неопубликованные данные).

### Концентрирование вирусов и экстракция нуклеиновых кислот

Вирусы концентрировали в минипулах путем центрифугирования при 48 000 g в течение 1 часа. Супернатанты декантировали и вирусные осадки растворяли в лизирующем буфере (AVL, Qiagen, Hilden, Germany). Использовали набор для выделения

вирусной РНК Qiagen, чтобы очистить нуклеиновые кислоты из HCV и HIV-1 в едином процессе экстракции. Нуклеиновые кислоты элюировали водой в конечном объеме 75 мкл и аликвоты по 10 мкл и 15 мкл вводили в ПЦР-амплификацию HIV-1 и HCV РНК, соответственно. Оставшиеся растворы РНК хранили при -20°C для повторного проведения ПЦР в случае получения положительных или недостоверных результатов. Окончательный объем каждой индивидуальной плазмы, вводившийся в ПЦР, был 13,3 мкл для HIV-1 и 20 мкл для HCV.

### Минипул-ПЦР

Для амплификации РНК HCV мы использовали коммерческий набор Cobas Amplicor® версии 1.0 до июля 1999 г., а затем версию 2.0. Для HIV-1 до сентября 1998 г. мы применяли одно-раундовую «in-house»-ПЦР с использованием гель-электрофореза для детекции ампликонов до сентября 1998 г. В дальнейшем для выявления РНК HIV-1 использовали TaqMan® ПЦР с детекцией в режиме реального времени [6]. Праймеры и зонды перечислены в таблице 1 [7]. Лимит детекции для индивидуальной донации с вероятностью 95% составил 800 МЕ/мл для HCV и 2000 геном-эквивалентов(гэкв)/мл для HIV-1 [7]. Достоверность и чувствительность каждой индивидуальной ПЦР контро-

Таблица 1

### Последовательности праймеров и зондов для HIV-1 TaqMan® ПЦР

#### Смысловые праймеры

HI 1a	ACC AGG CAG CTA TGC AAA TGT T
62s	ATC AAG CAG CCA TGC AAA TGT T

#### Антисмысловые праймеры

730	TGA AGG GTA CTA GTA GTT CCT GCT ATG TC
730M2	CTG AAG GGT ACT AGT AGT TCC TGC TAT ATC

#### Зонды

Wildtype HIV-1	FAM-ACC ATC AAT GAG GAA GCT GCA GAA TGG GA-TAMRA
Armored RNA	TET-ACG TCG AAG GAG TAA CTA CCA GAG AGA TTG C-TAMRA

лировалась с помощью ко-амплифицируемого внутреннего стандарта. Внутренним стандартом для HCV являлся *in vitro* РНК-транскрипт (COBAS IC, Roche), а для HIV – упакованный в фаг *in vitro* РНК-транскрипт, полученный из нашего HIV-1 ампликона введением сайта связывания зонда с ампликоном внутреннего стандарта HIV-1 (Armored RNA, Ambion, USA) (табл. 1). Стандарты экстрагировались и амплифицировались совместно с вирусными последовательностями при концентрации, позволяющей обеспечивать 95% достоверности лимита детекции каждой индивидуальной ПЦР для каждого вируса так, как это было указано выше. Образцы, дающие положительный результат на внутренний стандарт и отрицательный результат на вирусную последовательность, рассматривались как отрицательные. Образцы, отрицательные как по внутреннему стандарту, так и по вирусной последовательности, подвергались ретестированию. Менее 0,1% таких образцов были повторно отрицательны по внутреннему стандарту (вследствие наличия в выделенном материале ингибиторов ПЦР). Образцы, положительные по вирусной последовательности и положительные или отрицательные по внутреннему стандарту, полагались положительными.

### **ПЦР-тестирование индивидуальных образцов**

Для экстракции HCV и HIV-1 из индивидуальных образцов отбирали по 100 мкл и 200 мкл плазмы соответственно, ПЦР-протоколы соответствовали указанным выше. Чувствительность ПЦР-тестирования индивидуальных образцов была выше в 2 раза по сравнению с минибул-ПЦР-тестированием.

### **Определение вирусной нагрузки**

Количественное определение HCV и HIV-1 в плазме проводили с использованием TaqMan PCR в соответствии с инструкцией к детектирующей системе ABI Prizm 7700 (Applied Biosystems). Для получения калибровочной кривой использовали разведения стандартов WHO для HCV и NIBSC для HIV-1 с шагом разведения 1:10.

### **Серологическое тестирование**

Для HCV и HIV-1/2 ИФА-скринирования была использована технология ABBOTT PRISM® (Abbott Laboratories Delkenheim, Germany). Для повторного тестирования образцов, имевших реактивность, и для скринирования малого числа образцов исполь-

зовали технологию ABBOTT AXSYM®. Для подтверждения результата ИФА-тестирования на HCV использовали систему ABBOTT MATRIX®, а для HIV-1/2 – Sanofi Pasteur Blot I and II. Для выявления p24 антигена использовали тест-систему HIV-1 Antigen MoAb (Murex, Abbott Lab.) Тестирование аланинаминотрансферазы проводили в соответствии с инструкциями на анализаторах Bayer OPERA® (Bayer Ag, Wuppertal, Germany) и Epos® (Eppendorf, Hamburg, Germany). Представленные нами результаты ИФА-тестирования были получены только из Службы Крови Красного Креста Hesse и Bavaria.

### **Ретроспективные исследования**

Согласно правилам Германии ретроспективные исследования донаций кадрового донора начинали после появления повторно реактивных донаций при скрининге и при позитивных подтверждающих анализах. Поиск начинался в нашей базе данных с целью извлечения информации о соответствующих донорах и их предыдущих донациях. Архивированные образцы, начиная с тех, которые были получены за 6 месяцев до последней негативной донации, размораживались и исследовались в ИФА и ПЦР индивидуальных образцов. Реципиенты положительных донаций разыскивались и обследовались на наличие вирусных маркёров.

Ретроспективные исследования реципиентов начинались, когда мы получали уведомление о подозрении на вирусную трансмиссию реципиенту через наш продукт крови. Устанавливались доноры таких донаций, и те, кто дали положительные результаты исследования донаций, последующих за установленной, исследовались в соответствии с установленными правилами.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ**

### **Минибул-ПЦР-скринирование**

С момента внедрения NAT в январе 1997 г. было протестировано 3,6 млн донаций на двух базах. Изначально уровень ложноположительных пулов был значительно выше для HIV-1 (1,1%), чем для HCV (0,2%), последний анализировался на полуавтоматическом Cobas-аппарате. После введения TaqMan® ПЦР с детекцией в режиме реального времени (совмещенная амплификация/детекция в закрытой пробирке) для HIV-1 уровень получения ложноположительных результатов снизился до 0,4%, а в регионе Wiesentheid, в котором тестирование сразу было начато с исполь-

**Общее число донаций, произведенных службой крови и число HCV и HIV-1 только ПЦР-положительных, соответственно**

Служба крови	Число тестов	HCV	HIV-1
Hesse	1 173 700	2	1
Rheinland-Pfalz	409 386		1
Thüringen	306 254		
German Armed Forces	67 025		
Austria	306 175	4	
Luxembourg	41 915		
Bavaria	1 311 090		
ИТОГО	3 615 545	6	2

HCV, но отрицательные или неопределенные в подтверждающем тесте, были отрицательны и при минипул-ПЦР-тестировании и ПЦР-тестировании индивидуальных образцов. Из 462 анти-HCV ИФА-положительных донаций, положительных в подтверждающем тесте, 271 (58,7%) были минипул-ПЦР-положительными и положительными в ПЦР-тестировании индивидуальных образцов (табл. 3). Остальные образцы (191) были отрицательны как в минипул-ПЦР, так и в ПЦР индивидуальных образцов. Распределение ПЦР-положительных образцов среди ИФА-положительных для доноров Hesse и Bavaria составляет 187 из 268 (69,8%) и 84 из 194 (43,3%), соответственно.

Чтобы иметь независимый параметр для проверки того, действительно ли различное число ПЦР-положительных среди ИФА-положительных подтвержденных образцов для Hesse и Bavaria отражает различие в донорской популяции и не опосредовано техническими факторами, мы сравнили уровни АЛТ у HCV ИФА-положительных подтвержденных доноров, которые были HCV ПЦР-положительными, с HCV ПЦР-негативными. ИФА-положительные, ПЦР-отрицательные доноры имели сравнимые средние значения АЛТ (12,4 и 13,9 Ед/л для Hesse и Bavaria, соответственно). Среднее значение уровня АЛТ у ПЦР-положительных доноров было значительно выше (45,5 и 37,8 Ед/л для Hesse и Bavaria, соответственно,  $p < 0,000$ ;  $p < 0,000$ ).

зованием TaqMan ПЦР, уровень ложноположительных пулов составил 0,0% и 0,1% для HCV и HIV-1 соответственно. Доля испорченных постановок составила 0,6% на обеих базах.

#### **Результаты NAT-тестирования ИФА-негативных донаций**

Мы идентифицировали среди ИФА-негативных донаций 6 HCV и 2 HIV-1 ПЦР-положительных. Это составляет 1 инфицированную HCV донацию на 600 000 и 1 инфицированную HIV-1 на 1,8 млн донаций в Центральной Европе, которые не были бы выявлены без применения NAT-тестирования. Два HCV только ПЦР-положительных донора сдавали кровь в институте Франкфурта. Один из них имел повышенный уровень АЛТ (100 Ед/л), отрицательный результат в скринирующем тестировании AXSYM, но имел результат, граничащий с положительным при исследовании PRISM. Другая донация была негативной по всем коммерческим ИФА-тестам и имела нормальный уровень АЛТ. У обоих доноров произошла подтвержденная в системе Matrix сероконверсия через 12 и 25 дней, соответственно, после времени забора ИФА-отрицательных, ПЦР-положительных донаций. Четыре другие донора были из Австрии, они имели нормальный уровень АЛТ, и трое стали ИФА-положительными при последующем наблюдении.

Для HCV частота инфекционных донаций от доноров, находившихся в диагностическом окне, составила 1 на 590 000, 1 на 1,63 млн и 1 на 77 000, соответственно, для Красного Креста в Hesse, Германии (включая Hesse) и в Австрии (табл. 2).

Два HIV-1 донора в стадии пресероконверсии были выявлены в институте во Франкфурте. Один из них имел вирусную нагрузку более 4400 ГЭ/мл и был положительным при тестировании p24 антигена ВИЧ, которое не является обязательным для доноров Германии. Мы подтвердили наличие p24 антигена и ПЦР-результаты тестированием компонентов плазмы, а также тестированием в других лабораториях. Второй донор был p24 антиген-негативный и имел вирусную нагрузку 1300 ГЭ/мл. Девять дней спустя после донации он стал p24 антиген-положительным, и еще через шесть дней произошла сероконверсия.

#### **Результаты NAT-тестирования ИФА-реактивных и подтвержденных на позитивность донаций**

Все 3 072 образца плазмы, давшие положительный результат при первом и повторном тестировании на наличие антител к



Все 1543 образца плазмы, давшие положительный результат при первом и повторном тестировании наличия антител к HIV-1/2, но не подтвержденные Вестернблотом, были минипул-ПЦР-негативными и негативными при ПЦР-тестировании индивидуальных образцов. Все 11 HIV-1 ИФА-позитивных подтвержденных донаций были минипул-ПЦР-позитивными (табл.3).

### **Чувствительность минипул-ПЦР-тестирования**

Для того, чтобы проверить является ли чувствительность минипул-ПЦР-тестирования достаточно высокой, чтобы выявлять все инфекции периода диагностического окна, которые пропускаются при ИФА-тестировании, мы провели ретроспективное исследование всех доноров института Франкфурта, у которых была выявлена сероконверсия с момента введения ПЦР-тестирования в январе 1997 г. У 39 доноров произошла доказанная подтверждающим тестом сероконверсия по наличию антител к HCV. При этом 13 из них были HCV минипул-ПЦР-позитивными, 26 – негативными. Все 26 негативных были также негативными при ПЦР-тестировании индивидуальных образцов. 24 из них были ретестированы после повторной кроводачи и остались негативными при ПЦР-тестировании индивидуальных образцов. Мы идентифицировали всего 34 архивных образцов из предыдущих (пресероконверсионных) донаций и подвергли их ИФА- и минипул-ПЦР-тестированиям. Они все остались негативными в ПЦР-тестировании.

Таблица 3

### **Число образцов, положительных в ПЦР, среди повторно\* ИФА-положительных, отрицательных или положительных в подтверждающих тестах**

Образцы	HCV		HIV	
	Отрицательные или неопределенные в подтверждающем тесте	Положительные в подтверждающем тесте	Отрицательные или неопределенные в подтверждающем тесте	Положительные в подтверждающем тесте
Число	3072	462	1543	11
Из них положительные в ПЦР	0 (0%)	271 (58,7%)	0 (0%)	11 (100%)

\* – включают и образцы с неопределенными результатами в скрининговых тестах

тировании индивидуальных образцов, которое является подтверждающим для минипул-ПЦР-тестирования. Мы установили 47 реципиентов, которые получили компоненты этих пресероконверсионных донаций после внедрения минипул-ПЦР-тестирования в январе 1997 г. 25 из них умерли от основной причины заболевания, а 21 были живы и HCV ИФА-негативными.

52 ретроспективных расследования в отношении реципиентов были начаты в институте во Франкфурте с 1997 г. на основании возможного заражения вирусными инфекциями с трансфузиями. 2 из 379 исследованных по этой процедуре доноров были анти-HCV-позитивными, 9 умерли, а все остальные – негативными. Компоненты 2 позитивных доноров были перелиты до внедрения ПЦР тестирования. Подтверждение путем генетического тестирования не могло быть произведено из-за отсутствия вiremии у реципиентов.

Всего было выявлено 11 HIV-1 ИФА-подтвержденных позитивных доноров, которые все были минипул-ПЦР-позитивными. Все 10 архивных образцов предыдущих донаций позитивных доноров, которые могли быть получены, являлись негативными при повторном ПЦР-тестировании индивидуальных образцов. Идентифицировано 8 реципиентов пресероконверсионных донаций. 5 из них умерло и 3 были HIV-негативными. Мы получили пять уведомлений о пациентах, получивших трансфузии компонентов крови из Франкфуртского института после января 1997 г. и ставших HIV-позитивными. Все 25 вовлеченных в процедуру исследования доноров были HIV ИФА- и ПЦР-негативными, что исключало возможность трансмиссии инфекции с трансфузиями наших продуктов.

### **ОБСУЖДЕНИЕ**

Минипул-ПЦР-скринирование 3,6 млн донаций крови из Центральной Европы на HCV и HIV-1 имело своим результатом выявление 6 HCV и 2 HIV-1 ПЦР-позитивных, ИФА-негативных доноров. Это намного ниже расчетного результата для американских кадровых доноров [1]: 1 из 103 000 и 1 из 500 000 для HCV и HIV-1, соответственно. Аналогичные расчеты остаточного риска инфицирования были опубликованы для Германских кадровых доноров [2]. Причиной этого несоответствия может быть недостаточная чувствительность минипул-тестирования для идентификации дополнительных доноров, находящихся в периоде

диагностического окна, имеющих низкую вирусную нагрузку, или наличие мутантных вирусов, или же неверные расчёты остаточного риска вследствие выбора неправильной математической модели.

В начале 1997 г. в нашем распоряжении не было технологии, позволяющей достаточно быстро обрабатывать до 4 000 образцов в день методом ПЦР-тестирования индивидуальных образцов на два вируса, чтобы выпускать нестойкие продукты крови своевременно. Введенное нами минипул-ПЦР-тестирование значительно снизило затраты труда и времени и позволило добиться разумной стоимости скринирования донорских донаций [4]. Микропланшетный формат минипула из 96 образцов был выбран потому, что позволял быстро идентифицировать позитивную (вирусодержащую) донацию в течение 2–3 дней. Для компенсации разведений позитивных образцов 1:96 мы ввели концентрирование вирусов путем центрифугирования. Это привело к такому уровню чувствительности, который близок к ПЦР-тестированию индивидуальной донации, что было подтверждено всесторонними проверками [4, 7]. ИФА-реактивные образцы были включены в минипулы для того, чтобы ПЦР-тестирование могло проводиться параллельно с ИФА-тестированием, тем самым не увеличивая сроков выдачи продукции. Это особенно важно для ПЦР-тестирования тромбоцитов, со сроком хранения 5 дней. Однако включение положительных образцов в таком большом количестве, по нашим ожиданиям, должно было привести к увеличению ложноположительных результатов из-за контаминации. Поэтому, как только стало возможно, мы применили закрытые ПЦР пробирки и технологию детекции TaqMan® PCR в качестве эффективной превентивной меры опасности переносов.

Процент HCV ПЦР-позитивных от ИФА-подтвержденно-позитивных был значительно ниже, чем это ожидалось в предыдущих исследованиях [11, 12, 19]. Чтобы проверить, могло ли это быть вызвано недостаточной чувствительностью минипул-ПЦР-тестирования несмотря на концентрирование вирусов посредством центрифугирования, мы ввели ПЦР-тестирование индивидуальных ИФА-реактивных образцов. Ни один из HCV ИФА-реактивных образцов, которые были минипул-ПЦР-негативными, не были позитивными при ПЦР-тестировании индивидуальных образцов. Это показывает сопоставимую чувствительность минипул-ПЦР-тестирования и ПЦР-тестирования индивидуальных образцов.

Мы можем только строить предположения о причинах низкого процента (58,7%) HCV ПЦР позитивных среди ИФА-подтвержденных по сравнению с предыдущими сообщениями. Среди RIBA-позитивных французских доноров выявлялось 77% ПЦР-позитивных [12]. M.J. Alter et al. сообщает, что 74% ИФА-положительных американцев были HCV ПЦР-позитивными [11]. Различие становится еще большим, если мы будем рассматривать отдельно данные, полученные для Франкфурта и Wiesentheid. В настоящий момент у нас нет научно-здорового объяснения различия для только 43,3% HCV ПЦР-позитивных из ИФА-положительных в Баварии против 69,8% в Hesse. В связи с тем, что минипул-ПЦР-отрицательные результаты были подтверждены ПЦР-тестированием индивидуальных образцов и чувствительность метода была доказано одинаковой на обеих базах, остаются возможными для объяснения только популяционно-специфические эпидемиологические причины. Виремия в Ирландии была обнаружена у 52% женщин, инфицированных HCV через трансфузии анти-D иммуноглобулина. Уровень увеличился на 18% при исследовании только образцов, положительных в подтверждающем тесте RIBA. Следует заметить, что это было ретроспективное исследование инфицирования, произошедшего 20 лет назад, и его результаты указывают на возможность элиминации антител к некоторым индивидуальным антигенам с течением времени [13]. Об аналогичном уровне виремии было сообщено в Германии для ИФА-положительных женщин, получивших HCV с анти-D-иммуноглобулином, и для молодых людей, инфицированных в детстве через ИФА-нескринированную кровь в Германии до 1991 г. [14, 15]. Можно строить предположения, что трансмиссия HCV баварским донорам произошла раньше в их жизни, чем это случилось у доноров Hesse, что привело к более высокой доле элиминации HCV вируса. Однако, более низкий средний возраст HCV-позитивных доноров Баварии (38,3 г.), по сравнению с донорами Hesse (45,6 г.) идет вразрез с этой интерпретацией. Различное распределение HLA класса II, которое, по некоторым сообщениям, отвечает за различный клиренс HCV во времени, или наличие различных штаммов HCV могли бы объяснить данное наблюдение [16, 17]. Однако необходимая информация об этом отсутствует.

Высокая доля вирусосодержащих донаций, пропущенных ПЦР-тестированием, должна была бы приводить к увеличению

среднего уровня АЛТ, коррелирующего с вирусемией, у ПЦР-негативных доноров (в действительности ложноотрицательных), по сравнению с истинно-негативными, которые не являются вирус-содержащими. Повышенный средний уровень АЛТ у HCV ПЦР-позитивных по сравнению с ПЦР-негативными и примерно одинаковый уровень АЛТ у ИФА-позитивных ПЦР-негативных доноров на обеих базах указывает на то, что более низкий процент HCV ПЦР-позитивных среди ИФА-позитивных баварских доноров, наиболее вероятно, не связан с более низкой чувствительностью ПЦР в институте Wiesentheid. Таким образом, примерно одинаковый уровень АЛТ у ПЦР-негативных доноров в комбинации с более низким средним возрастом доноров Баварии свидетельствует в пользу популяционно-специфических и/или генетических вариаций. Средний возраст ПЦР – негативных идентичен среднему возрасту позитивных для каждого места тестирования, и соотношение мужчин и женщин не отличается значительно.

Полученные нами данные свидетельствуют, что низкая частота NAT-положительных ИФА-отрицательных донаций, наиболее вероятно, связана с более низкой, по сравнению с рассчитанной, частотой доноров, находящихся в стадии пресероконверсии в Централно-Европейской популяции доноров, а не с недостаточной чувствительностью NAT. Наиболее убедительный аргумент в пользу нашей точки зрения состоит в том, что по результатам анализа всех наших архивных данных по HCV и HIV-1 с января 1997 г., не было ни одного случая трансмиссии этих инфекций после внедрения NAT. Для HCV и HIV-1 не было ни одной доказанной трансмиссии ни прямым исследованием доноров с сероконверсией, ни по материалам исследований, вызванных подозрением в получении реципиентами инфицированных продуктов крови. Эти данные согласуются с негативными результатами ПЦР-исследований индивидуальных образцов размороженных архивных пресероконверсионных донаций, которые прошли мини-пул-ПЦР и ИФА-тестирование с негативными результатами.

Хотя в Германии не существует всесторонней официальной системы оповещения о фактах использования инфицированных препаратов крови, и сообщения об инфицировании реципиентов не требуется, наши данные ретроспективных исследований доноров показывают, что ни одной оставшейся бы незамеченной инфекционной трансмиссии не могло произойти. Более 95% доноров Красного Креста – это повторные доноры, и трансмиссии были

бы идентифицированы ретроспективными исследованиями благодаря сероконверсии, даже если о высоком проценте инфицированных реципиентов не было бы сообщено. Только компоненты крови от доноров, сдававших кровь один раз в своей жизни, что случается очень редко в нашей популяции, оказывают свой вклад в число не сообщенных случаев. В дополнение к этому, пропускается очень малое число повторных доноров без или с замедленной сероконверсией и уровнем вирусемии менее лимита детекции NAT. Следовательно, теоретические расчеты остаточного риска инфицирования для Германских кадровых доноров, основанные на данных о всех потенциальных донорах, вполне вероятно, не подходят для доноров Красного креста. Данные о различной частоте инфицирования безвозмездных (Красный Крест) и платных доноров могут быть подходящим объяснением для этих различий, тем более, что расчеты для американских кадровых доноров были подтверждены последними NAT-исследованиями [1, 2, 10].

Мы полагаем, что наши данные ретроспективного исследования доноров являются полными и достаточно достоверными, чтобы подтвердить близкий к нулю риск трансмиссий после HCV и HIV мини-пул-ПЦР-скринирования. Тестирование индивидуальных донаций не даст дополнительного положительного вклада в безопасность трансфузий, но значительно увеличит стоимость. Ставший в результате использования NAT-технологий низким риск пост-трансфузионных гепатитов требует пересмотра соотношения цены и пользы АЛТ скринирования [18].

---

*Мы чрезвычайно признательны за экспертно-техническую помощь Caroline Weis, Silke Schmidt, Iris Sommer u Beate Kempf. Мы благодарны Dr. Mike Busch, Blood Centers of the Pacific, San Francisco, California, за плодотворное обсуждение и критическое прочтение этой рукописи. Мы благодарим Dr. Hammer, blood transfusion service (BTS) Rheinland-Pfalz, Dr. G. Neuman, BTS Thuringen, Dr. Lechner, BTS Klagefurt, Dr. Moll, BTS Feldkirch, Dr. Schunitzer BTS Innsbruck, Dr. Muhlbacher, BTS Salzburg, Dr. Faber, BTS Luxembourg and Dr. Putzker, Sanitätsinstitut der Bundeswehr за предоставленные образцы.*

## Литература

1. Schreiber G.B., Busch M.P., Weinman S.H., Koreliz J.J. The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *N. Engl. J. Med.* 1996; 334:1685-90.
2. Kleinmann S., Busch M.P., Korelitz J.J., Schreiber G.B. The incidence/window period model and its use to assess the risk of transfusion-transmitted human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infection. *Transfus. Med. Rev.* 1997; 11:155-72.
3. Cluck D., Maurer C., Kubanck B. HIV, HCV and HBV in blood donors. The study group Beuifverband Deutscher Transfusionsmediziner e. V. *Infusionsther Transfusionsmed* 1997; 24:167-70.
4. Roth W.K., Weber M., Seifried E. Feasibility and efficacy of routine PCR screening of blood donations for hepatitis C virus, hepatitis B virus and HIV-1 in a blood bank setting. *Lancet* 1999; 353:359-63.
5. Paul-Ehrlich-Institut, Bundesamt für Sera und Impfstoffe Germany. Results of the phased plan to reduce the infection risk in hepatitis B, C, and HIV in recipients of packed red cell transfusions [in German]. *Bundesanzeiger* 1998; 53:3835-6.
6. Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996; 6:986-94.
7. Drosten C., Seifried E., Roth W.K. TaqMan 5'-nuclease human immunodeficiency virus type 1 PCR assay with page-packaged competitive internal control for high-throughput blood donor screening. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39:4302-8.
8. Legler T.J., Riggert J., Simson G. et al. Testing of individual blood donations for HCV RNA reduces the residual risk of transfusion-transmitted HCV infection. *Transfusion* 2000; 40:1192-7.
9. Hitzler W.E., Runkel S. Routine HCV PCR screening of blood donations to identify early HCV infection in blood donors lacking antibodies to HCV. *Transfusion* 2001; 41:333-7.
10. Stramer S.L., Cagliotti S., Strong M.D. NAT of the United States and Canadian blood supply. *Transfusion* 2000; 40:1165-8.
11. Alter M.J., Kruszon-Moran D., Naindan O.V. et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States 1988 through 1994. *N. Engl. J. Med.* 1999; 341:556-62.
12. Elghouzzi M.H., Bouchardeau F., Pillonel J. et al. Hepatitis C virus: routes of infection and genotypes in a cohort of anti-HCV-positive French blood donors. *Vox. Sang.* 2000; 79:138-44.
13. Lawlor E., Power J., Garson J.A. et al. Transmission rates hepatitis C virus by different batches of a contaminated anti-immunoglobulin preparation. *Vox. Sang.* 1999; 76:138-3.
14. Wiese M., Berr F., Lafrenz M. et al. Low frequency of cirrhosis in a hepatitis C (genotype 1b) single-source outbreak in Germany: a 20-year multicenter study. *Hepatology* 2000; 32:91-6.
15. Vogt M., Lang T., Frosner G. et al. Prevalence and clinical outcome of hepatitis C infection in children who nuclei went cardiac surgery before the implementation of blood donor screening. *N. Engl. J. Med.* 1999; 341:866-70.
16. Barrett S., Ryan E., Crowe I. Association of HLA-DRb1\*01 allele with spontaneous viral clearance in an Irish cohort infected with hepatitis C virus via contaminated anti-D immunoglobulin. *J. Hepatol.* 1999; 30:979-83.
17. Fanning L.J., Levis J., Kenny-Walsh E. et al. Viral clearance in hepatitis C (1b) infection: relationship with human leucocyte antigen class II in a homogenous population. *Hepatology* 2000; 31:1334-7.
18. Seifried E., Roth W.K. Optimal blood donation screening; annotation. *Br. J. Haematol.* 2000; 109:694-8.
19. Conry-Cantilena C., VanRaden M., Gible J., Melpolder J., Shakil A.O., Viladomiu L., Cheung L., DiBisceglie A., Hoofnagle J., Shih J.W., Kaslow R., Ness P., Alter H.J.: Routes of infection, viremia, and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* 334:1691-6, 1996.

# ПЕРВЫЙ РОССИЙСКИЙ ОПЫТ РУЧНОГО И ПОЛУАВТОМАТИЧЕСКОГО МИНИПУЛ-НАТ-ТЕСТИРОВАНИЯ ДОНОРСКОЙ КРОВИ НА HIV, HCV, HBV

*Е.Г. Черкасов, Н.А. Федоров, А.А. Елов,  
Ю.С. Суханов, И.Б. Сущенко*

Риск инфицирования ВИЧ, вирусными гепатитами В и С в результате трансфузий компонентов или препаратов крови от серонегативных доноров на эти вирусы остается и составляет соответственно  $1:3 \times 10^6$ ,  $1:2-5 \times 10^4$ , и  $1:1-3 \times 10^4$  для Германии, в которой до 80% составляют безвозмездные доноры [1], что хорошо коррелирует с риском инфицирования, рассчитанным G. Schreiber, M.P. Bush [2] и D. Gluck [3].

Для снижения такого остаточного риска трансфузионных вирусных инфекций в 1994 году в Германии и ряде других стран была введена карантинизация свежесамозамороженной плазмы (Q-FFP). Тем не менее при ежегодных трансфузиях Q-FFP в Германии около 800 000 единиц и в США около 2 500 000 единиц риск трансфузионных заражений HCV и ВИЧ, хотя и снижается в несколько раз, но не ликвидируется совсем и, соответственно, составляет  $1:100\ 000$  (HCV) и  $1:680\ 000 - 1\ 000\ 000$  (HIV) [4, 5].

Обычно карантинизованная плазма допускается к применению при повторном отрицательном ИФА-тестировании доноров через 6 месяцев. Но известны случаи с длительным периодом серонегативности в присутствии РНК HCV, например, у пациентов с иммуносупрессией и наркоманов [6]. Такой период может продолжаться до 40,8 месяцев [7]. Описаны также случаи спонтанного исчезновения антител к HCV или «сероинверсии» как у иммунокомпетентных, так и иммунодефицитных пациентов, инфицированных HCV [5, 8]. Как следствие таких явлений остается риск заражения вирусными инфекциями даже после трансфузий Q-FFP или препаратов, полученных из нее. Например, Humre A. et al. [9] описали 8 подтвержденных случаев инфицирования HCV после трансфузии Q-FFP от донора с частыми плазмафорезами, который имел неполный профиль сероконверсии в течение 400 дней после наступления вирусемии. Эта неполная сероконверсия не была обнаружена ИФА при плазмафорезах и ин-

фицированная Q-FFP была реализована и трансфузирована 12 пациентам.

Для исключения серонегативных донаций, содержащих эти вирусы, была проведена большая работа по внедрению прямого генамплификационного тестирования донорской крови методами ПЦР, бранч-DNA, NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification), ТМА (Transcription-mediated Amplification) и другими методами детекции нуклеиновых кислот, сокращенно обозначаемыми NAT (Nucleic Amplification Techniques).

Международная рабочая группа ВОЗ по стандартизации методов генной амплификации для тестирования донорской крови и ее компонентов на ВИЧ, вирусы гепатитов В и С (WHO SoGAT: WHO International working group on the standardisation of genomic amplification techniques for the virological safety testing of blood and blood products) разработала международные стандарты на основе натуральных материалов (сыворотка, плазма) для контроля чувствительности NAT-тестирования донорской крови, ее компонентов и препаратов.

За последние 3 года в странах Европы, США, Канаде, Японии, Австралии получены результаты по дополнительному NAT-тестированию многих миллионов единиц донорской крови, которое позволяет выявлять вирусосодержащие серонегативные донации. Такое массовое NAT-скринирование стало возможным благодаря технологии NAT-миниупул-тестирования, которая сокращает в десятки раз материальные затраты и ускоряет процесс, позволяет получать результаты NAT-тестирования к моменту реализации компонентов крови. В качестве примера (табл. 1) приведем результаты NAT-тестирования в Центрах службы крови Красного Креста Германии, полученные к августу 1999 г. и

*Таблица 1*

**Результаты скрининга донорской крови на август 1999 г. [10]**

	Только NAT-положительные	Количество донаций	Распространенность на 100 000
HCV	8	5 590 726	0,143
HIV-1	1	4 306 671	0,023
HBV	5	4 379 414	0,114

Колонка 2 – ИФА-отрицательные, NAT-положительные донации.

представленные Seifried E. и Roth W.K. (Институт трансфузионной медицины и иммуногематологии, Франкфурт на Майне) на ежегодной конференции Американской ассоциации банков крови (AABB) в ноябре 2000 г.

С 1 июля 1999 г. Европейский Союз разрешил использовать в клиниках только плазму и ее препараты, имеющие негативный результат при тестировании их на наличие РНК HCV NAT-технологиями [11].

### Методы и результаты

Первый опыт ручного минипул-ПЦР-тестирования донорской крови на HIV, HCV и HBV нами был получен на остатках плазмы, заключенной в трубочках одноразовой системы аппарата Геманетик, удаляемой в отходы после проведения плазмафореза. Концы таких трубочек отрезали отдельными ножницами, обработанными раствором соляной кислоты, и выдавливали 1 каплю объемом около 100 мкл в пробирку типа Эппендорф для получения минипула от 10 доноров. Как показано на схеме (рис. 1), далее из этих пулов первого порядка путем объединения 100 мкл аликвот формировали пулы второго порядка из нескольких десятков, но не более чем от 100 доноров.

Если пулы второго порядка были ПЦР-отрицательны, то архивированные в холодильнике при 4°C образцы индивидуальных донаций в трубочках, минипулы из десятков и ПЦР-отрицательные пулы второго порядка из нескольких десятков образцов удаляли в отходы. Если пул второго порядка давал ПЦР-поло-

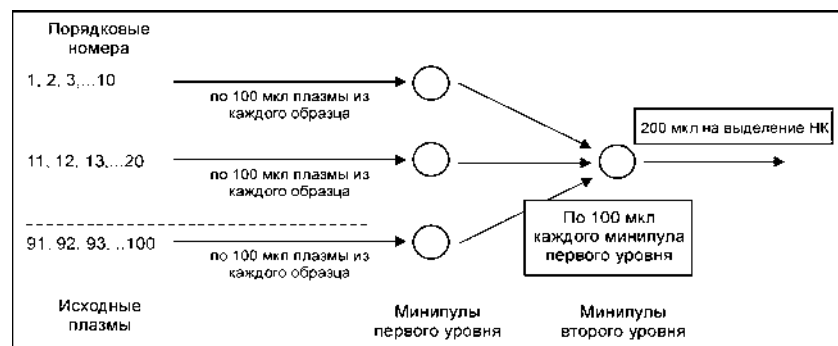


Рис. 1. Схема приготовления минипулов.

жительный сигнал на один, два или три исследуемых вируса, ПЦР-тестированию подвергали архивированные пулы-десятки и после идентификации ПЦР-положительного пула-десятки, подвергали ПЦР-тестированию все 10 архивных индивидуальных плазм, входящих в этот ПЦР-положительный пул-десятку. После идентификации индивидуальных ПЦР-положительных образцов и их ретестирования, они архивировались в морозильнике при -20°C, а соответствующие контейнеры с плазмой выбраковывались. По такой ручной технологии минипул-ПЦР-тестирования были исследованы 8 849 донаций серонегативной плазмы, полученной методом плазмафореза в период с сентября 1998 года по апрель 1999 года (табл. 2).

Если даже исходить из того, что инфицированность вирусами гепатитов В и С российских доноров на порядок выше, чем в странах Западной Европы, то все равно вероятность выявления методом ПЦР хотя бы одной донации является очень малой для 8849 донаций. 7 пулов-десятков РНК HCV-позитивных не были подтверждены при ПЦР-тестировании индивидуальных донаций плазмы, входящих в них, т.е. это так называемые ложноположительные результаты ПЦР-анализа. Однако из положительных 5 пулов-десятков на ДНК HBV 2 были подтверждены при ретестировании индивидуальных донаций. Значительное число ложноположительных минипулов плазм донорской крови до недавнего времени имели и более оснащенные лаборатории на Западе [12]. В статье [13], переведенной нами на русский язык, сообщается, что из 4 500 минипулов по 96 донаций 332 (7,4%) изначально являлись ПЦР-положительными, но при ретестировании индивидуальных донаций подтверждены только 109 пу-

Таблица 2

### ПЦР анализы серонегативных донаций

Вирус	Положительные сигналы в пулах	Из них не подтвердилось при ретестировании	Выявлено ПЦР-положительных донаций
HBV	5	3	2 (0,023%)
HCV	7	7	0
HIV	0	0	0

Общее число вовлеченных в ПЦР серонегативных донаций – 8849. Анализы проводились в составе пулов по 10 донаций.

лов (2,4%). К настоящему времени процент таких ложноположительных пулов авторы свели к минимуму, устранив потенциальные источники контаминаций.

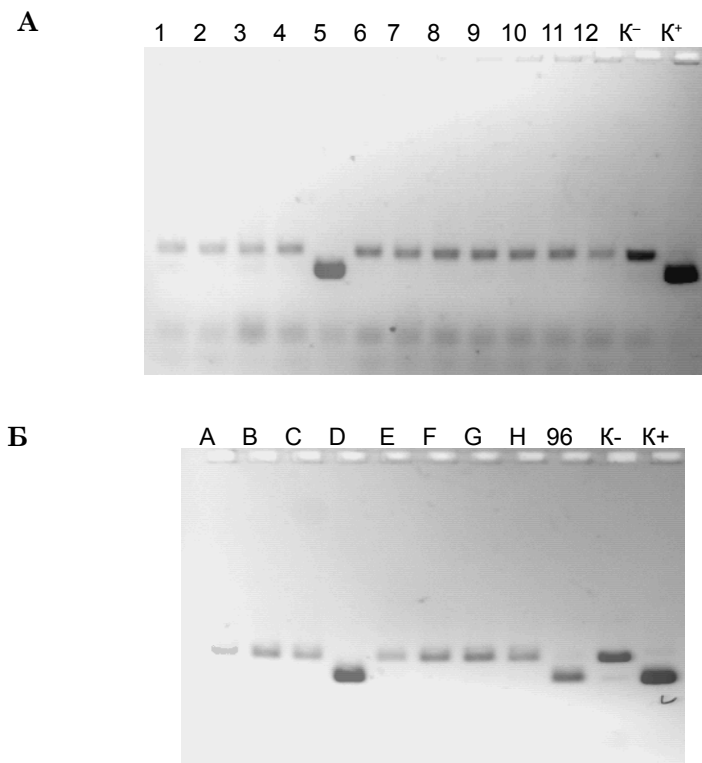
Далее мы получили возможность готовить минипулы из 8 и 12 донаций плазмы автоматически на дозаторе фирмы «Гамильтон» с использованием разработанной нами компьютерной программы формирования пулов с применением штрих-кодовой регистрации минипулов и индивидуальных донаций. Этот автомат работает с сериями из 96 проб в формате иммунологического 96-луночного планшета. Пулы из 8 и 12 донаций соответствуют столбцам и строкам микропланшета (рис. 2), а путем объединения аликвот этих минипулов можно создавать пул второго порядка, объединяющий все 96 образцов. Если последний при ПЦР-анализе дает положительный результат, то идентификация вирусосодержащих донаций осуществляется путем ретестирования минипулов из 8 и 12 донаций, как это показано на рисунках 2 и

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
C	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
D	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
E	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
F	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
G	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
H	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96

**Рис.2.** Идентификация вирусоположительных донаций методом перекрестных промежуточных пулов из 8 и 12 донаций. Образцы плазмы, обозначенные цифрами 1-96, объединяются по 8 в промежуточные минипулы 1-12 (по столбцам планшета) и по 12 в минипулы A-H (по строкам планшета); далее получают общий минипул из 96 образцов. На рисунке показан пример идентификации вирусосодержащей донации по результатам ПЦР-анализа, приведенных далее на рис. 3. На пересечении столбца 5 и строки D, минипулы которых дали положительные сигналы, выявилась донация 41, подлежащая выбраковке. Если будут две ПЦР-позитивные донации, то они дадут два ПЦР-положительных промежуточных пула из 8 донаций и два ПЦР-положительных промежуточных пула из 12 донаций

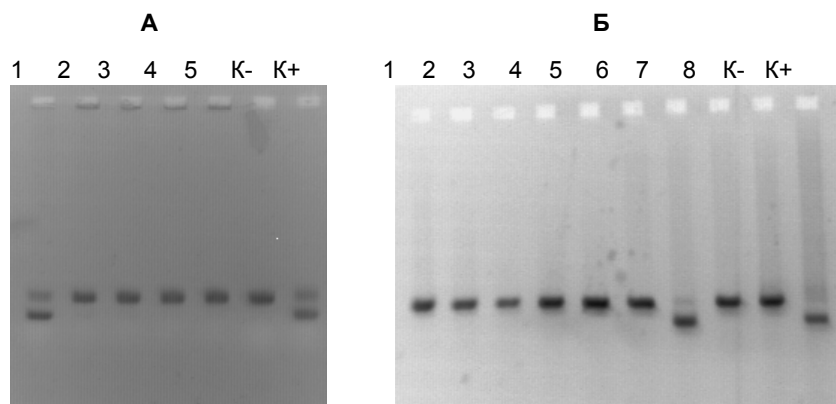
3. Эта донация соответствует пересечению строки и столбца, минипулы которых дают ПЦР-положительные сигналы.

Однако на данном этапе при регулярном генотестировании донорской крови мы ограничивались только минипулами из



**Рис.3.** Результаты ПЦР-анализа при идентификации донации, содержащей вирус гепатита В, в ПЦР-положительном пуле из 96 образцов. При этом были проанализированы минипулы 1-12, собранные по столбцам планшета (А), и минипулы A-H, собранные по строкам планшета (Б). Положительные сигналы минипулов 5 и D позволяют точно определить инфицированную донацию 5D, как показано на рис. 2. Проба 96 – повтор анализа общего пула из 96 образцов, K и K<sup>+</sup> – соответственно отрицательный и положительный контроли, во всех отрицательных образцах и K присутствует полоса внутреннего стандарта.

8 донаций и идентифицировали положительные донации путем ретестирования архивных донаций из 8, как показано на рисунке 4. Такое минибул-НАТ-тестирование плазмы на основе полуавтоматической технологии нами проводилось в отношении первичных доноров Станции переливания крови ФУ «Медбиоэкстрем», которые еще не прошли ИФА-скринирование, т.е. не были отведены доноры с ИФА-положительными результатами. В таблице № 3 приведены суммированные данные этих исследований.



**Рис.4.** Пример идентификации донации, содержащий вирус гепатита В, путем ПЦР-анализа 5 минибулов по 8 проб (А) и последующего разложения минибула, давшего положительный сигнал (Б). В данном примере HBV-положительной оказалась донация 7 первого минибула.

*Таблица 3*

**ПЦР-анализы первичных доноров на СПК ФУ «Медбиоэкстрем» с 25.10.2000 г. по 18.06.2001 г.**

Вирус	Положительные сигналы в пулах	Из них не подтвердилось при идентификации	Выявлено ПЦР-положительных донаций	Из них в составе:	
				ИФА <sup>+</sup>	ИФА <sup>-</sup>
HBV	4	2	3 (0,085%)	3	0
HCV	26	14	12 (0,34%)	10	2
HIV	2	2	0 (0%)	0	0

Общее число вовлеченных в ПЦР донаций – 3514.  
Анализы проводились в составе пулов по 8 донаций.

Прежде всего обращаем внимание на факт большей частоты HBV и HCV NAT-положительных донаций как в минибулах, так и при ретестировании индивидуальных донаций по сравнению с группой серонегативных доноров (таблица 2): в группе серонегативных доноров частота выявления HBV 0,023%, а у первичных доноров – 0,085%, для HCV – 0% и 0,34%, соответственно. Важно провести сопоставление наших данных по первичным донорам (табл. 3) с данными аналогичного уровня исследованиями 4 231 донаций на РНК HCV в Банке Крови Сан-Пауло (Бразилия) [14], представленными в таблице 4, и 2 578 донаций в Гане [15].

*Таблица 4*

**Результаты ПЦР-тестирования 4231 донаций на РНК HCV в Банке крови г. Сан-Пауло (Бразилия, 1998 год) в минибулах из 8 и 12 образцов**

Метод	Число положительных результатов
ИФА	42 (1,1%)
Иммуноблот	22 (0,52%)
ПЦР	19 (0,45%)

Соответственно, выявляемость NAT-позитивных донаций для РНК-HCV составляет 0,34% (СПК ФУ «Медбиоэкстрем»), 0,45% (Банк Крови г. Сан-Пауло, Бразилия) и 0,12% (Гана), эти цифры одного порядка.

Для перехода к NAT-тестированию пулов из 96 донаций, в соответствии с опытом Германии [12] и других стран Европы, необходимо применять центрифугирование пулов при 40 000 g в течение одного часа для концентрирования вирусов, а также определять лимит детекции HIV, HCV и HBV на основе международных стандартов с известной концентрацией этих вирусов.

Технология NAT-тестирования донорской крови позволила выявлять вирусосодержащие донации, серонегативные по антителам к HCV или по наличию HBsAg HBV, и тем самым повысить вирусную безопасность трансфузий. Кроме того, NAT-тестирование серопозитивных донаций по антителам к HCV и по HBsAg HBV позволяет отделить группу людей, не содержащих РНК и ДНК этих вирусов. Доля таких серопозитивных, но не содержащих вируса в крови, доноров составляет около 30% и 70% соот-



ветственно, по усредненным литературным данным. Весьма близки к ним наши данные, суммированные в таблице 5, которые показывают, что процент таких доноров, не содержащих РНК HCV и ДНК HBV, составляет около 42% и 55% соответственно. Скорее всего, эти результаты отражают иную частоту инфицированности населения России по сравнению с другими странами. Разумеется, эти исследования прежде всего важны для серопозитивных по HCV и HBV доноров, т.к. имеют отношение к прогнозу и к возможности их реабилитации [16]. Но эти данные не менее важны и для санитарно-эпидемиологической службы, поскольку распространителями вирусов гепатитов являются только лица, содержащие эти вирусы. Необходимо многолетнее клинико-лабораторное наблюдение таких серопозитивных доноров, как отрицательных по наличию РНК и ДНК в NAT-анализе, так и серонегативных, но положительных в NAT-анализе. На СПК ФУ «Медбиоэкстрем» в инициативном плане совместно с Гепатологическим консультативным центром КЗ г. Москвы (руководитель – д.м.н., проф. Н.П. Блохина) создана программа «Клинико-лабораторные исследования доноров с положительными результатами ИФА- и ПЦР-анализов на вирусные гепатиты В и С», имеющая целью изучить возможности реабилитации доноров с положительными реакциями ИФА- и ПЦР-анализа на вирусы гепатитов В и С путем комплексного изучения динамики специфических антител, антигенов, вирусных РНК и ДНК в крови и биоптатах печени, биохимических показателей, функционального состояния печени и клинического статуса. В настоящее время начато формирование трех регистров доноров: с высокими значениями оптической плотности ИФА на антитела к HCV и HBsAg; серонегативные в ИФА, но положительные по РНК HCV и ДНК HBV; положительные как по результатам ИФА, так и по результатам ПЦР.

Таблица 5

**ПЦР-анализы серопозитивных донаций**

Вирус	Обследовано серопозитивных донаций	Полученные результаты ПЦР	
		Положительные	Отрицательные
HBV	20	9 (45%)	11 (55%)
HCV	47	27 (57,5%)	20 (42,5%)

По-видимому, как мы уже об этом писали [17], серопозитивные лица, не содержащие самих вирусов, имеют большую вероятность благоприятных исходов инфекций HCV и HBV.

**Литература**

1. Seifried E. Optimal blood donation screening // *British Journal of Haematology*, 2000, v.19, p. 694–698.
2. Schreiber G., Busch M.P., Kleinman S.H. & Korelitz J.J. The risk of transfusion-transmitted viral infections. // *New England Journal of Medicine*, 1996, v. 334, p. 1685–1690.
3. Gluck D., Maurer C. & Kubanek B. Infektionsmarker bei Blutspenden. // *Infusionstherapie und Transfusionsmedizin*, 1997, v. 24, p. 167–170.
4. Gluck D., Maurer C., Kubanek B., Petersen N. Seroconversion of HIV, HCV, and HBV in blood donors in 1996-risk of virus transmission by blood products in Germany. // *Infusionsther Transfusionsmed*, 1998, v. 25, p. 82–84.
5. AuBuchon J.P., Birkmeyer J.D., Busch M.R. Safety of the blood supply in the United States: opportunities and controversies. // *Ann Intern Med* 1997, v. 127, p. 904–909.
6. Maple P.A., McKee T., Desselberger U., Wreghitt T.G. Hepatitis C virus infections in transplant patients: serological and virological investigations. // *J. Med. Virol.*, 1994, v. 44, p. 43–48.
7. Beld M., Penning M., van Putten M., van den Hoek A., Damen M., Klein M.R., Goudsmit J. Low levels of hepatitis C virus RNA in serum, plasma, and peripheral blood mononuclear cells of injecting drug users during long antibody-undetectable periods before seroconversion, // *Blood*, 1999, v. 94, p. 1183–1191.
8. Lefrere J.J., Guiramand S., Lefrere F., Mariotti M., Aumont P., Lerable J., Petit J.C., Girot R., Morand J.L. Full or partial seroreversion in patients infected by hepatitis C virus. // *J. Infect. Dis.*, 1997, v. 175, p. 316–322.
9. Humpe A., Legler T.J., Nubling C.M., Riggert J., Unger G., Wolf C., Heermann K.-H., Kohler M. Hepatitis C Virus Transmission through Quarantine Fresh-frozen Plasma. // *Thromb. Haemost.*, 2000, v. 84, p. 784–788.
10. Seifried E., Roth W.K. First statistical survey of HCV, HBV, HIV-1 Nucleic Acid Amplification Technology screening of blood donors in the Red Cross Blood Service Centers in Germany. // *Transfusion*, 2000, v. 40, Supplement, S29-030E.

## МИНИПУЛ-РТ-ПЦР-ДЕТЕКЦИЯ 16S рРНК TREPONEMA PALLIDUM В БИОМАТЕРИАЛАХ

Е.Н. Фёдоров, И.И. Петухова, А.А. Ёлов,  
Н.А. Фёдоров, О.Н. Гришаева

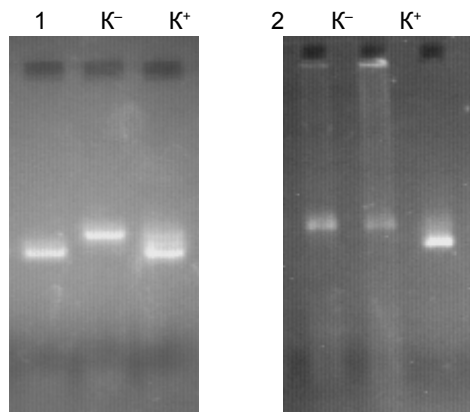
Минипул-НАТ-детекция ВИЧ, вирусов гепатита В и С уже широко применяется для дополнительного скринирования донорской крови. Эти методы могут быть эффективно использованы и для обеспечения бактериальной безопасности крови, в частности, для контроля наличия в крови возбудителя сифилиса *Treponema pallidum*.

При выборе мишени для связывания специфических олигонуклеотидов-праймеров и метода амплификации следует иметь в виду, что бактериальные гены 16S рРНК являются многокопийными, а рибосомы 16S рРНК, как правило, присутствуют в количестве несколько тысяч на 1 микроорганизм, поэтому лимит детекции при использовании метода РТ-ПЦР по 16S рРНК может быть на несколько порядков выше, чем метода ПЦР на ДНК гена 16S рРНК. Контрольные эксперименты с разведениями культуры *Treponema pallidum* (после предварительного лизиса бактериальных клеток) с известной концентрацией показали, что лимит детекции *Treponema pallidum* по ДНК гена 16S рРНК находится в пределах от 1 до 10 микроорганизмов на пробу, в то время как лимит детекции по 16S рРНК достигал  $10^{-3}$  трепонем-эквивалентов на пробу, то есть был выше как минимум в 1000 раз. Следовательно, образец выделенной из биоматериала нуклеиновой кислоты можно развести как минимум в 100 раз, тем самым снизив концентрацию содержащихся в нем ингибиторов Таq-полимеразы. Чувствительность созданного в нашем институте набора «Ген-Тест-ТР», использующего в качестве мишени рибосомальную 16S рРНК, составляет, как минимум, одну частицу *Treponema pallidum* в анализируемом образце. Образовавшаяся при обратной транскрипции комплементарная ДНК (кДНК) выявляется методом ПЦР в присутствии 100 молекул внутреннего стандарта – ДНК-копий амплифицированного участка к ДНК, содержащего вставку. Наличие этого стандарта, дающего ПЦР-сигнал, отличный от сигнала трепонемы, обеспечивает достоверность отрицательных результатов и полуколичественную оценку микроорганизмов в пробе (способ выявления *Treponema pallidum*

11. Flanagan P. Genomic Screening of Blood Donation-The New Dawn Arives. // Vox Sanquinis, 1999, v. 76:3, p. 135–137.
12. Roth W.K., Weber M., Seifried E. Feasibility and efficacy of routine PCR screening of blood donations for hepatitis C virus, hepatitis B virus, and HIV-1 in a blood-bank setting. // The Lancet, 1999, v. 353, p. 359–363.
13. Федоров Е.Н., Федоров Н.А. Возможность и эффективность рутинного ПЦР-скринирования донорской крови на вирусы гепатитов С и В, и ВИЧ-1 в банках крови. // Вестник службы крови России, 2000, № 4, с. 3–9 (перевод и комментарии к статье Roth W.K., Weber M., Seifried E. Feasibility and efficacy of routine PCR screening of blood donations for hepatitis C virus, hepatitis B virus, and HIV-1 in a blood-bank setting. // The Lancet, 1999, v. 353, p. 359–363).
14. Levi J.E., Contri D.G., Takaoka D.T., Fachini R., Wendel S. PCR as a tool for primary screening of blood donors. // Transfusion, 1998, v. 38, Supplement, S207, p. 57S.
15. Allain J., Reddy R., Candotti D., Sarcodie F., Nel T. Genomic detection of HIV & HCV by TMA in high prevalence areas of Sub Saharian Africa. // Transfusion, 2000, v. 40, Supplement, S26-030E, p. 9S.
16. Федоров Н.А., Федоров Е.Н., Елов А.А., Черкасов Е.Г., Блохина Н.П., Суханов Ю.С., Сущенко И.Б. Новые факты об отсутствии клинических симптомов заболевания у молодых людей, инфицированными вирусами гепатита С. // Вестник службы крови России, 2001, № 2, май, с. 37–38.
17. Федоров Н.А., Федоров Е.Н., Елов А.А., Черкасов Е.Г., Блохина Н.П., Суханов Ю.С., Сущенко И.Б. Новые данные об отсутствии прогрессирования инфицирования вирусами гепатита С у здоровых молодых людей. // Российские медицинские вести, 2001, № 2, том VI.

у больных сифилисом, решение о выдаче патента ФИПС от 29.08.01 г.).

Тестирование объединенных в минипулы клинических образцов в КВД, СПК и больницах может в десятки раз снизить затраты реагентов, труда и времени по сравнению с тестированием индивидуальных образцов. В соответствии с наиболее апробированной технологией приготовления минипулов в формате 96-луночного микропланшета, аликвоты сывороток (плазм) по 100 мкл объединяют в промежуточные минипулы из 8 (по вертикали) и 12 (по горизонтали) сывороток (плазм), а затем в минипул второго порядка из 96 образцов. Аналогичным образом можно сформировать минипулы из гомогенатов, клеточных взвесей и других жидкостей (спинномозговая жидкость, моча, лимфа). Как показывает наш опыт и опыт других исследователей [1], центрифугирование жидких проб 10 мин. при 14 000 об/мин осаждает *Treponema pallidum* (рис.1), и поэтому эффект разведения при формировании минипулов полностью устраняется. В случае получения положительного ПЦР-сигнала от пула 2-го порядка (из 96 образцов), идентификацию ПЦР-положительных образцов проводят путем тестирования промежуточных пулов из 8 и 12 образцов.



**Рис.1.** Результаты РТ-ПЦР плазмы с добавлением культуры *Tr. pallidum*:  
1 – до центрифугирования;  
2 – после центрифугирования при 14 000 об/мин 10 мин;  
K<sup>-</sup> – отрицательный контроль;  
K<sup>+</sup> – положительный контроль.

В данной работе мы готовили минипулы в объеме 1,5 мл, включающие по 50 мкл индивидуальных сывороток, число которых составляло 30. Центрифугирование проводили на микроцентрифуге в пробирке типа Эппендорф.

Шестьсот сероположительных на сифилис сывороток от больных с различными формами сифилиса, полученными из Астраханского КВД от доктора О.К. Лосевой, были проанализированы на наличие 16S рРНК *Treponema pallidum* методом РТ-ПЦР в минипулах по 30 сывороток. Во всех 20 минипулах 16S рРНК *Treponema pallidum* не была выявлена.

Величина количества исследуемых клинических образцов в минипулах может быть увеличена многократно, но с обязательным проведением центрифугирования перед анализом для концентрирования частиц *Treponema pallidum*.

Что касается отсутствия *Treponema pallidum* в крови 600 серопозитивных на сифилис лиц, то такой факт не должен вызывать удивления, поскольку серопозитивность не обязательно предполагает присутствие в крови самого возбудителя [2, 3]. Например, в случае лиц, позитивных по HBsAg HBV, только в 25–30% может быть обнаружена ДНК самого вируса. В случае же серопозитивных на сифилис лиц, циркуляция *Treponema pallidum* в крови явление, по-видимому, чрезвычайно редкое [3], что находится в соответствии с отсутствием доказанных случаев посттрансфузионного сифилиса как в США [4, 5], так и в России [6].-

## Литература

1. Grabnitz F., Halperin E., Resnick L., Bieger W.P. Sensitiver und spezifischer Nachweis von *Treponema pallidum* mit der Polymerase-Kettenreaktionen. *Klin. Lab.*, 1992, v. 38, p. 537–543.
2. Федоров Е.Н., Петухова И.И., Суханов Ю.С., Елов А.А., Федоров Н.А. ПЦР-детекция ДНК и РНК *Treponema pallidum* в крови серопозитивных доноров. *Вестник службы крови России*, № 3, сентябрь 2001, с. 42–46.
3. Orton S.L., Cable R.G., Grindon A.J., Williams A.E., Liu H. Prevalence of circulating *T. pallidum* DNA and RNA in PKTP+/FTA\*ABS + blood donors. Presentation for AABB Transfusion Transmitted Diseases Committee, September 15, 2000. Source: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/00/backgrd/3649b2e.pdf>

4. Фёдоров Н.А., Фёдоров Е.Н., Суханов Ю.С., Кубанова А.А. Существование посттрансфузионного сифилиса не доказано. Вестник службы крови России, № 1, февраль, 2001, с. 29–30.
5. Herrera G.A., Lackritz E.M., Jansen R.S., Raimondi V.P., Dodd R.Y., Aberle-Grasse and Petersen L.R. Serologic test for syphilis as a surrogate marker for human immunodeficiency virus infection among United States blood donors. Transfusion 2001, v.37. Серологический тест на сифилис как суррогатный маркер на инфицирование вирусом иммунодефицита доноров крови в США. Перевел с английского Е.Н. Фёдоров. Вестник службы крови России, 2001, № 1, с. 24–28.
6. Бродская А.П., Шувалова Т.М., Афонин Н.И. Ещё раз к вопросу о спорных и нерешенных проблемах трансфузионного сифилиса. Вестник службы крови России, № 2, апрель, 1999, с. 21–24.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Состояние проблемы NAT-миниупул-тестирования донорской крови на наличие HIV, HCV и HBV .....	3
Международные стандарты ВОЗ для NAT-тестирования вирусов в крови человека – гарантия надежного выявления вирусемии.....	26
HBV NAT и анти-НВс-тестирование повышают безопасность крови .....	38
Результаты HCV и HIV-1 NAT-скринирования 3,6 млн донаций крови в Центральной Европе .....	56
Первый российский опыт ручного и полуавтоматического миниупул-NAT-тестирования донорской крови на HIV, HCV, HBV .....	72
Миниупул-РТ-ПЦР-детекция 16S рРНК Treponema pallidum в биоматериалах .....	83

