

Автономная некоммерческая организация «Центральный научно-исследовательский институт трансфузионной медицины и медицинской техники»

Юридический адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д.6, корп.2
тел/факс 190-2241

Универсальные технологии генотестирования донорской крови и других клинических материалов на патогены

Москва 2005 г.

Аннотация

Для повышения инфекционной безопасности трансфузионной терапии в крови доноров определяют наличие нуклеиновых кислот, составляющих геном гемотрансмиссивных вирусов (ВИЧ, вирусы гепатитов В и С) и бактерий. С этой целью применяют технологию амплификации нуклеиновых кислот (NAT) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Так же возможно обнаружение и идентификация вирусов и бактерий в иных клинических материалах. Технологии предусматривают преодоление основных ограничений генодиагностики: ложноотрицательные результаты выявляются с помощью внутреннего контроля ПЦР, а ложноположительные могут быть устранены при переходе к флуориметрической детекции размноженных ПЦР-продуктов в закрытой системе. Технология предназначена для врачей-лаборантов, трансфузиологов, гематологов, акушеров-гинекологов, инфекционистов, вирусологов, бактериологов.

Заявитель: Российская ассоциация трансфузиологов

Авторы: д.б.н. Ёлов Андрей Александрович,
профессор, д.м.н. Федоров Николай Алексеевич,
профессор, д.м.н. Жибурт Евгений Борисович

Перечень рецензентов:

1. Блинов Михаил Николаевич, профессор, д.м.н., заведующий лабораторией биохимии Российского НИИ гематологии и переливания крови Росздрава.
2. Северин Евгений Сергеевич, член-корреспондент РАН, профессор, д.б.н., директор Центра молекулярной диагностики и лечения, заведующий кафедрой биохимии Московской медицинской академии имени И.М.Сеченова,
3. Шарыгин Сергей Леонидович, профессор, д.м.н., директор НИИ гематологии и переливания крови Росздрава.

Список сокращений и терминов

- NAT (nucleic acid amplification technologies) – методы и технологии анализа, основанные на размножении заданных фрагментов ДНК и РНК с помощью полимеразных цепных реакциях (ПЦР), а также на других методах размножения генетического материала *in vitro*.
- Донация – порция крови или плазмы, взятая однократно у одного донора.
- Минипул – смесь нескольких проб плазмы крови от разных донаций. Готовится для сокращения числа NAT-анализов при маловероятных положительных результатах.
- Производственный пул - смесь донаций плазмы крови большого объема (десятки и сотни литров), полученных от многих доноров. Готовится для промышленного получения белковых препаратов крови.
- Серонегативное окно – период в начале развития вирусной инфекции, когда в организме еще не появились антитела и потому инфекция не может быть определена обычными серологическими методами.

Введение

Генамплификационные (NAT) анализ основан на размножении заданного фрагмента ДНК- или РНК-генома в несколько миллионов раз, что обеспечивает обнаружение в клинических материалах возбудителей инфекций – вирусов и бактерий – с высокой чувствительностью и специфичностью. Эффективность этого метода при диагностике инфекций к настоящему времени полностью подтверждена и является общепризнанной. Необходимость его применения в службе крови связана с неизбежными ограничениями обязательных обследований крови доноров методом иммуноферментного анализа на серологические маркеры гемотрансмиссивных инфекций: антиген ВИЧ p24 и антитела к ВИЧ, HBs-антиген, антитела к вирусу гепатита С. Выработка антител и накопление концентрации антигена – продолжительный процесс. То есть, для появления в крови признака инфекции от момента инфицирования должно пройти определенное время – несколько недель, так называемый период «серонегативного окна». В этот период отсутствия клинико-лабораторной симптоматики болезни жизнеспособные вирусы циркулируют в крови, а в случае кроводачи – могут инфицировать реципиента. В этот период единственной возможностью установить наличие возбудителя в крови является определение его генома.

Как показывает мировой опыт, за 10 лет применение генамплификационных методов в службе крови развитых стран удалось значительно снизить риск трансфузионной передачи инфекций, прежде всего ВИЧ и вирусов гепатитов В и С [1-3]. Генотестирование образцов донорской крови и плазмы на вирусы гепатитов В, С и ВИЧ было введено в странах Европейского союза в 1998 году как обязательный этап обследования донора. Генотестирование донорской крови и ее компонентов на вирусы позволяет

получать результаты о вирусной безопасности до выдачи их в клиники без превышения сроков хранения в организации службы крови. Обобщение результатов применения генотестирования донорской крови показывает заметное, хотя и небольшое, наличие серонегативных донаций, содержащих вирусные ДНК и РНК (таблица 1)

Таблица 1: Результаты минипул-NAT-скринирования крови доноров в Германии с января 1997 г. по 2002 г. [1].

Вирус	Число только NAT-положительных	Протестировано донаций	Частота NAT-положительных донаций	В расчете на 1000000
HCV	13	18 345 372	1:1 411 183	0,71
HIV-1	3	16 367 514	1:5 455 838	0,18
HBV	38	16 372 434	1:430 854	2,32

Вывод об эффективности и целесообразности применения генотестирования донорской крови и ее компонентов делается во всех публикациях, освещающих результаты регулярного применения этого метода, начиная с 1997 года. В мире ежегодно выполняется 90 миллионов донаций крови и ее компонентов, из них в России – 3,7 млн. Методами амплификации нуклеиновых кислот обследуется около половины донаций на планете (Россия пока относится ко второй половине). NAT позволяет сократить серонегативное окно ВИЧ-инфекции – на 50 %, вирусного гепатита В – на 42% и вирусного гепатита С – на 72 % [4, 5]. Для гепатита В эффективность обнаружения вирусной ДНК в период «серонегативного окна» была показана на основе обобщения опыта генотестирования донорской крови Красного креста Японии [6]. Международный и российский опыт генотестирования донорской крови и других материалов на патогены и мутации опубликован в отечественном научно-методическом руководстве [7].

Применение генотестирования патогенов в России распространено в отношении инфекций, передаваемых половым путем. Предлагаемые технологии предназначены в первую очередь для внедрения в службе крови России с целью снижения риска инфицирования реципиентов компонентами и препаратами донорской крови. Вместе с тем данные технологии в достаточной мере универсальны и могут быть применены и для других клинических материалов, представляющих собой жидкость или суспензию. Таковыми являются, например, суспензии соскобов и смывы со слизистых, моча, мокрота и другие жидкости организма.

Все технологии основаны на доступных и воспроизводимых методах, приборах и реагентах отечественного производства. Разработанные NAT-технологии касаются всех этапов NAT-анализа. Они предполагают однопробирочную экстракцию ДНК и РНК, что исключает их потери,

ускоряет и удешевляет процесс подготовки биоматериала к ПЦР-анализу. Обратная транскрипция проводится без изоляции РНК путем инкубации осадка РНК+ДНК, что предотвращает потери РНК и ускоряет процесс. Внутренние стандарты в ПЦР-наборах позволяют выявлять ложноотрицательные результаты сразу же в ходе анализа. Детекция продукта ПЦР и регистрация результата может быть проведена как с помощью обычного электрофореза, так и на флуориметре - без вскрытия пробирки. В последнем случае при сохранении уровня чувствительности анализа и снижается трудоемкость и устраняется возможность получения ложноположительных результатов. Эффективность предлагаемой технологии и чувствительность анализа была подтверждена и на основе международного NAT-стандарта VQC на вирус гепатита В при использовании как флуориметрии после ПЦР, так и количественной ПЦР в реальном времени [8].

Другой перспективной областью применения генотестирования отмечается выявление бактериальной контаминации донорской крови и ее компонентов [9-11], которая по степени риска посттрансфузионных осложнений стоит на втором месте после несовместимости крови и встречается в сотни раз чаще всех вирусных контаминаций вместе взятых. Эта проблема выявлена и существует в развитых странах, практикующих современные технологии лечения гематологических и онкологических больных, широко применяющих трансфузии тромбоцитов и внедривших NAT-тестирование крови доноров на гемотрансмиссивные вирусы,.

Показания к использованию медицинской технологии

1. Контроль всех донаций плазмы и крови на наличие наиболее трансфузионно-опасных вирусов: ВИЧ, вирусов гепатитов В и С. Анализы проводятся на минипулах, объединяющих несколько образцов плазмы крови.
2. Контроль производственных пулов плазмы крови.
3. Обследование образцов и препаратов крови на любые вирусные и бактериальные патогены.

Противопоказания к использованию медицинской технологии

Абсолютным противопоказанием технологии является несоблюдение условий отбора, хранения и перевозки клинических материалов для обследования. Это может привести к потере определяемого генетического материала, особенно РНК, при длительном хранении образцов при повышенных температурах, приводящих к свертыванию крови и гемолизу, а также росту занесенной бактериальной микрофлоры. Противопоказанием является также внесение в образцы стабилизаторов, не отделяемых при обработке пробы и ингибирующих ПЦР (например, гепарина)..

Относительным противопоказанием к использованию заявляемой технологии является осложненный состав некоторых клинических проб,

содержащих избыток ингибиторов ПЦР. Технология предусматривает выявление таких проб непосредственно в ходе анализа.

Материально-техническое обеспечение медицинской технологии

Требования к лабораторным помещениям.

Работа по генотестированию донорской крови и других клинических материалов на патогены требует следующих лабораторных помещений:

1. Зона обработки проб – лаборатория, приспособленная для работы с инфекционными агентами второй группы патогенности. Допускается параллельная работа в том же помещении другими аналитическими методами с аналогичными клиническими пробами.

2. Чистая зона для приготовления реакционных смесей ПЦР – лабораторное помещение для работы с микрообъемами высокочистых и совершенно нетоксичных химических реактивов.

3. Зона для электрофореза продуктов ПЦР – лабораторное помещение, в котором размноженные фрагменты ДНК извлекаются из амплификационной пробирки и соответственно могут попасть в окружающую среду. Это является основным источником ложноположительных результатов ПЦР-анализа. В соответствии с требованиями к ПЦР-лабораториям, утвержденными Госсанэпиднадзором в 1995 году [12], это помещение должно быть полностью изолировано от указанных в пп. 1 и 2. Должно быть исключено перемещение из зоны для электрофореза в зону для обработки проб и чистую зону какого-либо персонала, оборудования, любых материалов и предметов, а также перенос воздуха через систему вентиляции или в результате сквозняков. Эта зона не требуется при флуориметрической детекции продуктов ПЦР.

Оборудование

1. Ламинарный бокс с циркуляцией воздуха, обеспечивающий изоляцию воздушным потоком обрабатываемые клинические пробы для устранения инфекционной опасности и защиты выделяемых РНК и ДНК от бактерий и нуклеаз внешней среды. Пример – БАВп-01- «Ламинар-С», рег. уд. МЗ № ФС 02262004/0542-04. Производитель – ЗАО «Ламинарные системы» (Россия).

2. Дозаторы пипеточные для жидкостей объемом от 0,5 до 1000 мкл и наконечники к ним. Пример – дозаторы серии ДПВ-1 ТУ 9452-001-33189998-95, рег.уд. МЗ № 29/07020402/4463-04, производитель – ЗАО «Лабсистемс СПб» (Россия).

3. Настольная микроцентрифуга для пробирок объемом 1,5 мл, обеспечивающая ускорение не менее 14000 g. Примеры: МЦН-12-01-«БФА», ТУ 9444-028-17214768-01, производитель – ОАО «Биофизическая аппаратура» (Россия); “Mini Spin”, производитель – “Eppendorf” (Германия), рег. уд. МЗ РФ № 2002/637; “СМ-50”, производитель :”Elmi” (Латвия), рег. уд. МЗМПП № 96/635.

4. Твердотельный настольный термостат для пробирок объемом 0,5 и 1,5 мл, поддерживающий заданную температуру в пределах от комнатной до 99⁰С. Пример – ТТ-2 «Термит», рег. уд. МЗ № 29/07050902/4635-02. Производитель – НПФ «ДНК-технология» (Россия).

5. Термостат программируемый для проведения ПЦР-анализа (амплификатор). Пример – ТП4-ПЦР-01 «Терцик». рег. уд. МЗ № 29/07020398/2001/01. Производитель – НПФ «ДНК-технология» (Россия).

6. ПЦР-детектор флуориметрический «Джин», рег. уд. МЗ № 29/07010203/5334-03. Производитель – НПФ «ДНК-технология» (Россия).

7. Устройство для электрофореза нуклеиновых кислот в агарозных и акриламидных гелях УЗФ-01-ДНК-Техн, рег.уд. МЗ № 29/07020402/4003-02. Производитель – НПФ «ДНК-технология» (Россия).

Наборы реагентов для обработки проб

1. Набор реагентов для однопробирочного способа подготовки биологического материала для ПЦР-генамплификационной диагностики «ГенТест-РНК/ДНК-экстракция», рег. удост МЗ № ФС 032a1926/0633-04. Производитель – АНО «ЦНИИТММТ» (Россия). Его аналог – Набор для выделения ДНК/РНК из сыворотки или плазмы крови, рег. уд. МЗ № 29/24111201/0016-02. Производитель – НПФ «Литех» (Россия).

2. Комплект реагентов для выделения ДНК «ДНК-экспресс» рег. уд. МЗ № 29/24030301/4041-02. Производитель - НПФ «Литех» (Россия).

Наборы реагентов для проведения ПЦР

1. Комплект реагентов для обратной транскрипции «Реверта-R», рег. уд. МЗ №001688/01-2002. Производитель – ЦНИИ эпидемиологии МЗ РФ.

2. Набор реагентов для выявления ДНК вируса гепатита В методом полимеразной цепной реакции "ВГБ-Ген". Рег. удост. № 29/24020203/3550-03. Производитель – НПФ «ДНК-технология» (Россия).

3. Набор реагентов для определения вируса гепатита С в плазме крови путем двукратной РНК-ПЦР «ГенТест-НС», рег. удост. МЗ № ФС 032a1927/0634-04. Производитель – АНО «ЦНИИТММТ», (Россия)

4. Набор реагентов для обнаружения РНК вируса гепатита С (*Hepatitis C virus*) в сыворотке или плазме крови методом полимеразной цепной реакции, рег. уд. МЗ № 29/24111201/0014-02. Производитель – НПФ «Литех», (Россия).

5. Набор реагентов для выявления цитомегаловируса «Цитопол», рег. уд. МЗ № 29/24080900/2200-01 (НПФ «Литех», Россия).

6. Набор реагентов для выявления ДНК Хламидия трахоматис методом полимеразной цепной реакции "Хлами-Ген". Рег. удост. № 29/24010103/5183-03. Производитель – НПФ «ДНК-технология», (Россия)

1. Этап 1 – сбор и подготовка жидких материалов, подвергаемых ПЦР-анализу на наличие вирусов и бактерий (плазма, сыворотка, кровь и другие материалы типа жидкости или суспензии)

1.1. Условия и длительность хранения исследуемых материалов должны гарантировать сохранность генома вирусов или бактерий к моменту исследования, они всегда указываются в инструкции к применяемой тест-системе. При генотестировании донорской крови и плазмы на вирусы используются аликвоты плазмы, отбираемые из проб, предназначенных для обязательного иммуноферментного анализа.

1.2. При анализах на вирусы больших количеств проб донорской крови для сокращения числа анализов рекомендуется объединять индивидуальные образцы плазмы в минипулы, которые и подвергаются генотестированию. на вирусы как один образец начиная с п.2.1. Рекомендуемый размер минипула – 8-12 образцов.

1.3. Объединение в минипул большего числа образцов допустимо, но приводит к снижению чувствительности анализа для каждого отдельного образца. В этом случае аликвоты минипулов первого порядка из 8-12 образцов объединяются в минипул второго порядка. Минипулы можно формировать вручную с помощью дозаторов или с использованием автоматических систем.

1.4. При генотестировании на вирусы в составе лейкоцитов (например, цитомегаловирус, провирус ВИЧ) или бактериальные патогены для анализа по п.2.1 используют цельную кровь, стабилизированную цитратом или ЭДТА. Стабилизация крови гепарином не допускается.

1.5. При анализе на бактериальные патогены или вирусы в составе клеток жидких клинических материалов, иных, чем кровь, проводится концентрирование клеток осаждением из большого объема центрифугированием при 14000 g на микроцентрифуге. Это позволяет получать из проб типа клеточной взвеси (мазки и соскобы со слизистых, моча, мокрота и другие жидкости организма, культуральные материалы) компактные осадки промытых клеток, для которых применимы самые простые методы получения препаратов ДНК для ПЦР, такие как термический лизис с сорбентом (см. раздел 3.4)

Этап 2 – обработка клинических проб для получения препаратов ДНК и РНК

2.1. Получение суммарных ДНК и РНК из сыворотки и плазмы крови или ДНК из цельной крови

Процесс проводится в зоне обработки проб для ПЦР - лабораторном помещении, оборудованном для работы с клиническим материалом второй группы патогенности. Для выделения вирусной ДНК и РНК можно (в качестве примера) использовать набор реактивов для однопробирочного метода «ГенТест-РНК/ДНК-экстракция». В состав этого набора входит лизирующий раствор, осадитель и промыватель.

Процесс проходит в пробирках объемом 1,5 мл и состоит из следующих операций:

2.1.1. Внесение образцов анализируемой плазмы крови в пронумерованные пробирки с лизирующим раствором.

2.1.2. Инкубация при 60⁰С в настольном термостате. При работе с цельной кровью далее проводится центрифугирование и удаление поверхностного белкового слоя наконечником дозатора.

2.1.3. Внесение осадителя, перемешивание, инкубация в штативе на столе.

2.1.4. Центрифугирование на настольной центрифуге, удаление супернатанта.

2.1.5. Внесение промывателя, обмыв внутренней поверхности пробирки плавным вращением в руке.

2.1.6. Центрифугирование на настольной центрифуге, удаление супернатанта.

2.1.7. Высушивание осадка в открытой пробирке, лежащей горизонтально на столе.

2.1.8. Растворение осадка в растворителе РНК из набора для ПЦР, используемого в дальнейшей работе, или проведение обратной транскрипции вирусных РНК одновременно с растворением осадка (раздел 3.1).

2.2. Обработка клинических материалов, иных, чем кровь.

2.2.1. Суммарные ДНК и РНК вирусов, не связанных с клетками, получают обработкой жидких клинических материалов аналогично обработке плазмы крови по п.2.1.

2.2.2. Суммарную ДНК бактерий и вирусов в составе клеток получают из компактного осадка после центрифугирования пробы по п.1.3. Далее суммарную ДНК (но не РНК) получают термическим лизисом с сорбентом с использованием набора «ДНК-экспресс» или его аналогов: «Проба ПК» (НПФ «ДНК-технология») или лизирующего буфера с сорбентом – ЛБС (АНО «ЦНИИТММТ»). Методика состоит только в добавлении суспензии сорбента к осадку клеток и прогреве смеси при 95⁰С 15 минут. Надосадочная жидкость может быть введена в ПЦР с использованием любой тест-системы.

Этап 3 – проведение ПЦР и регистрация результатов.

Основные стадии изложены ниже на примере комбинированного обнаружения трех наиболее опасных гемотрансмиссивных вирусов: ВИЧ,

вирусы гепатитов В и С. Для других возбудителей проводятся аналогичные или более простые операции.

3.1. Общая методика ПЦР-детекции ДНК вируса гепатита В и РНК вируса гепатита С и ВИЧ при электрофоретической регистрации результата

Для ПЦР-анализа на эти три вируса одновременно используют осадок, полученный по технологии однопробирочного метода (раздел 2.1). Анализ проводится для серий проб числом до 12 при работе на одной настольной центрифуге или до 24 - при работе на двух центрифугах. Обратную транскрипцию РНК ВИЧ и вируса гепатита С проводят одновременно с растворением сухого осадка. Используются реагенты для обратной транскрипции и ПЦР из состава набора «ГенТест-НС» или НПФ «ДНК-технология». В случае определения только ДНК-содержащего вируса гепатита В обратную транскрипцию не проводят, вместо этого растворяют осадки ДНК по п.2.1.8.

3.1.1. Приготовить в чистой зоне ПЦР-смеси для обратной транскрипции путем смешивания реагентов для числа проб, превышающего на 4 число анализируемых проб.

3.1.2. Следующие действия по пп. 3.1.2-3.1.4 проводятся в зоне обработки проб для ПЦР. Внести полученную по п.3.1.1 смесь в пробирки с сухими осадками по 20 мкл. Оставшиеся 80 мкл распределить по 20 мкл в чистые пробирки для контролей: положительных на гепатит В, гепатит С, ВИЧ и отрицательного контроля.

3.1.3. Внести растворы положительных контролей из тест-систем ПЦР в соответствующие пробирки.

3.1.4. Перемешать смеси в пробирках для растворения осадков, собрать жидкость на дне кратким центрифугированием и инкубировать пробирки 30 мин при 42⁰С в настольном термостате. Полученный раствор смеси ДНК и кДНК можно вводить в ПЦР.

3.1.5. В чистой зоне в соответствии с инструкцией тест-системы подготовить смеси для ПЦР в амплификационных пробирках на все определяемые патогены, добавить масло.

3.1.6. В зоне для обработки проб внести в амплификационные пробирки растворы ДНК или ДНК+кДНК после обратной транскрипции. Внести в заранее подготовленные пробирки для контролей растворитель ДНК и положительный ДНК-контроль, если это не было сделано перед обратной транскрипцией (п.3.1.3) или если последняя не проводилась.

3.1.7. Установить пробирки в амплификатор и запустить требуемую программу.

3.1.8. В зоне для электрофореза смесь после ПЦР проанализировать электрофорезом в 2%-ном агарозном геле.

3.1.9. Просмотреть гель и документировать результат. Отметить положительные пробы (сигнал в геле на уровне положительного контроля),

отрицательные (только один сигнал на уровне внутреннего стандарта) и недостоверные (отсутствуют сигналы возбудителя и внутреннего контроля)..

3.2. Общая методика ПЦР-анализа с флуориметрической регистрацией результата.

От изложенной в п.3.1 эта методика отличается только используемыми амплификационными реагентами, программой ПЦР и регистрацией результата на флуориметре «Джин».

При постановке ПЦР с детекцией продукта на флуориметре выполняются действия по пп.3.1.1-3.1.7 предыдущего раздела. По окончании ПЦР вместо электрофореза проводится установка пробирок в ячейки флуориметра и измерение относительно двух фоновых пробирок. В Приложении приведен пример такой регистрации результата (пример 1).

При флуориметрической детекции пробы идентифицируются компьютером автоматически. Результаты отражаются наглядно (см. пример 1) на диаграмме и в таблице – в колонке «Результат»:

знак «+» на красном поле – положительный результат;

знак «-» на зеленом поле – отрицательный результат.

Кроме того, программа флуориметра «Джин» выявляет еще два результата:

знак «?» на желтом поле – неопределенный результат, похожий на слабоположительный;

«нд» на оранжевом поле – недостоверный результат из-за ингибирования ПЦР.

3.3. Обнаружение бактериальных патогенов и вирусов в составе лейкоцитов крови

Материалом для всех анализов такого типа является препарат суммарной ДНК, полученный из цельной крови по п.2.1. или из других материалов по п.2.2. В частности, он может быть применен для определения ДНК цитомегаловируса с помощью набора «Цитопол», для определения хламидий и других конкретных бактерий методом обычной специфической ПЦР с помощью набора «Хлами-Ген» или для выявления других бактерий и вирусов с использованием соответствующих тест-систем.

Во всех случаях процесс состоит в проведении ПЦР-анализа препарата ДНК, полученного по пп. 2.1 или 2.2. Процесс состоит из стадий, аналогичных указанным в разделах 3.1.2 и 3.2.

3.4. Выявление вирусосодержащей донации в минипуле

3.4.1. В случае положительного результата на какой-либо вирус для небольшого (8-12 образцов, п.1.1) минипула проводятся анализы на этот вирус всех образцов, составляющих этот минипул, для выявления инфицированной донации.

3.4.2. При работе с большими минипулами (до 100 образцов, п.1.2) при положительном результате для минипула второго порядка анализируют составляющие его минипулы первого порядка. В выявленном вирусодержащем минипуле первого порядка определяют инфицированную донацию по п.3.4.1.

3.4.3. Вариантом работы с большими минипулами является работа в формате 96-луночного планшета. Минипулы первого порядка из 8 и 12 донаций формируются по «столбцам» и «строкам» планшета, которые далее объединяются в минипул второго порядка из 96 образцов. В случае положительного ПЦР-анализа этого минипула на какой-либо вирус проводят анализы на этот вирус всех 20 минипулов первого порядка и по результатам проводят идентификацию инфицированной донации перекрестным методом. Пример приведен в Приложении (пример 2).

3.4.4. Если при анализе образцов, составляющих минипул с положительным сигналом на какой-либо вирус, не выявится ни одной инфицированной донаций или минипула первого порядка, то результат первого анализа минипула следует считать ложноположительным.

Возможные осложнения при использовании медицинской технологии и способы их устранения

1. Ложноположительные результаты

Причина – заносы размноженных фрагментов ДНК в исходную смесь ПЦР. Особенно распространены при электрофоретической детекции, связанной с извлечением продуктов ПЦР из пробирки и неизбежным попаданием их в окружающую среду. Их вероятность сводится к минимуму (но не устраняются полностью) при строгом соблюдении правил организации и работы ПЦР-лаборатории, утвержденных ГСЭН в 1995 году [12]. Устраняются практически полностью при переходе к детекции в закрытой системе – флуориметрии после ПЦР (раздел 3.2) или ПЦР в реальном времени.

2. Ложноотрицательные результаты

Это наиболее распространенное осложнение, связанное с недостаточной очисткой ДНК и РНК, особенно в сложных пробах необычного состава. При данной технологии такие результаты сразу же выявляются по отсутствию или сильному ослаблению сигнала внутреннего стандарта, что предотвращает выдачу ошибочного ответа. Устраняются повторным анализом (по возможности, начиная со взятия пробы) и применением более сложных методов обработки проб.

Другой причиной ложноотрицательных результатов являются потери РНК и ДНК. Это случается относительно редко и главным образом при генотестировании РНК-вирусов из-за неустойчивости РНК к действию рибонуклеаз внешней среды. Связано с ошибками при работе. В данном варианте технологий могут быть выявлены только в случае их систематического характера. Предотвращаются строгим соблюдением

технологии, внутрилабораторным контролем и участием в программах внешней оценки качества лабораторных исследований (например, ФСВОК).

Эффективность использования медицинской технологии

Заявляемая технология опробовалась с 1997 года по настоящее время сначала на СПК Департамента здравоохранения города Москвы и затем на СПК ФУ МЗ «Медбиоэкстрем», преобразованной в Центр крови ФМБА России. ПЦР-анализ донорской крови проводили в минипулах, формируемых на СПК ДЗ г.Москвы вручную, а с 2000 года на СПК ФУ «Медбиоэкстрем» в минипулах по 8 или 16 образцов, формируемых автоматическим иммуноферментным анализатором фирмы «Гамильтон». Пробы от серопозитивных доноров и пациентов, проходящих курс лечения, анализировались отдельно. Основные результаты представлены в виде таблицы 2. Они были доложены на 4-й всероссийской конференции «Генодиагностика инфекционных заболеваний». [13].

Таблица 2

Результаты минипул-генотестирования донорской крови на вирусы гепатитов В, С и ВИЧ

Обследованные лица, время анализа	Кол- во проб	Число (%) ПЦР- положительных результатов для вирусов		
		HBV	HCV	HIV
Первичные доноры СПК ФУ «Медбиоэкстрем», 2000-2001 г.	3514	3 (0,09%)	12 (0,36%)	0
Серонегативные доноры СПК КЗ г.Москвы, 1998-99 гг.	8849	3 (0,023%)	0	0
HBV-серопозитивные доноры СПК КЗ г.Москвы, 1999 г.	20	9 (45%)	0	0
HCV- серопозитивные доноры СПК КЗ г.Москвы, 1999 г.	47	0	27 (57%)	0
Больные гемофилией Измайловской детской больницы, 1998 г.	64	10 (15,6%)	21 (32,8%)	0
Пациенты центра СПИД Белоруссии, 1998 г.	7	-	-	3

Выявленная инфицированность доноров вирусами гепатитов в общем соответствует среднемировой или чуть выше. Частота ПЦР-позитивных первичных доноров на ДНК HBV в несколько раз выше, а ПЦР-позитивных на РНК HCV, повидимому, в несколько десятков раз выше по сравнению с такой частотой среди серонегативных доноров. Очень высокой оказалась инфицированность гепатитами у больных гемофилией, многократно

получавших в начале и середине 90-х годов белковые препараты донорской крови. Тот факт, что не все серопозитивные по гепатитам лица имеют вирус в крови, позволяет отделить от серопозитивных доноров значительную группу людей, не содержащих вируса в крови (55% и 43% соответственно для вирусов гепатитов В и С), в то время как по усредненным литературным данным аналогичные величины составляют 65% и 35% для вирусов гепатитов В и С.

Вариант заявляемой технологии был применен к генотестированию бледной трепонемы [14]. При этом чувствительность метода была многократно повышена благодаря проведению РНК-ПЦР на 16S рРНК [14], которые присутствуют в количестве нескольких тысяч молекул на клетку. Обследование нескольких сотен образцов от серопозитивных на сифилис лиц дало строго отрицательный результат, в то время как метод позволял надежно обнаруживать единичные клетки (таблица 3). Необходимость таких исследований связана с сохранившейся до сих пор только в России и СНГ практикой уничтожения производственных пулов плазмы, если в них попала хотя бы одна донация от серопозитивного на сифилис донора.

Таблица 3

Результаты исследования серопозитивных на сифилис сывороток и плазм доноров методом РНК-ПЦР на 16S рРНК

№ п.п.	Учреждения и лаборатории	Материал	Кол-во образцов	Результат анализа
1	СПК ДЗ г.Москвы а) лаборатория иммунологических методов исследования б) производственный отдел	сыворотки крови доноров	290	отрицат.
		сомнительные производственные пулы плазмы	3	отрицат.
2	Станция переливания крови ФУ «Медбиоэкстрем», лаборатория иммуноферментных методов исследования	плазма доноров	115	отрицат.
3	Центральная медсанчасть г.Москвы №165, лаборатория иммунологии	сыворотки доноров	60	отрицат.
4	Институт скорой помощи им.Н.В.Склифосовского, отделение переливания крови	сыворотки доноров	60	отрицат.
5	Московский координационный центр органного донорства	почки	2	отрицат.
6	Центральный научно-исследовательский кожно-	Культуральный препарат бледной		

	венерологический институт МЗ РФ	трепонемы,		
		20 клеток на пробу	3	положит.
		2 клетки на пробу	3	положит.

Подтверждением достоверности полученных данных и соответственно эффективности заявляемой технологии являются аналогичные результаты, полученные в США [15].

Аналогичная ситуация складывается с применением другого обязательного в службе крови анализа – определением активности аланинаминотрансферазы (ALT) как маркера вирусных гепатитов. Выбраковка до 10% донаций от общего количества заготавливаемых только на основании повышенного уровня ALT представляется малообоснованным в связи с дефицитом донорской крови и плазмы. С помощью заявляемых технологий в Центре крови ФМБА России в 2003 году было обследовано 254 донации, выбракованных на основании теста на ALT. Ни в одной из них не было обнаружено генома вирусов гепатита В и С. Результаты были доложены на всероссийской конференции «Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии» [16]. Они позволяют сделать вывод о нецелесообразности применения в службе крови теста на ALT. Те же результаты с тем же выводом были получены и в Германии [17]. Это также является подтверждением эффективности заявляемой технологии.

Метод универсальной ПЦР на ДНК гена 16S рРНК бактерий (патент № 2208645) был успешно применен для определения бактериальной ДНК в крови доноров [10]. Было показано, что в цельной крови примерно у 2/3 доноров обнаруживается бактериальная ДНК, которая, по-видимому, содержится во фракции лейкоцитов.

Существующий порядок обследования донора оставляет возможность заготовки и переливания крови от инфицированных, но серонегативных лиц. Так, во время подготовки настоящего заявления на регистрацию медицинской технологии в 2005 году в Читинской области отмечен случай ВИЧ-инфицирования реципиента кровью, заготовленной от донора в период серонегативного окна [18]. Если бы кровь этого донора обследовали не только методом иммуноферментного анализа, но и методом ПЦР – плазма была бы забракована и реципиент был бы здоров.

Список цитируемых публикаций:

1. Seifried E., Roth W.K. Feasibility, efficacy and economy of NAT testing in Germany// VIII European congress of ISBT, Istanbul 2003, July 5-9. Перевод на русский язык: Вестник службы крови России.- 2004.- №2.- С.47-49
2. Pilonel J., Laperche S., Saura C., Decenclos J.-C., Couroucic A.-M. Trends in residual risk of transfusion-transmitted viral infections in France between 1992 and 2000// Transfusion.- 2002.- Vol.42.- P.980-988
3. Velati C., Romano L., Baruffi L., Pappalettera M., Carreri V., Zanetti A.R. Residual risk of transfusion-transmitted HCV and HIV infections by antibody-screened blood in Italy// Transfusion.- 2002.- Vol.42.- P.989-993

4. Жибурт Е.Б. Путь итальянских коллег.- Медицинская газета.- № 62 от 12.08.2005

5. Жибурт Е.Б. III Всемирный форум по гемофилии: вопросы трансфузиологии// Трансфузиология.- 2004.- Т.5, №3.- С. 104-131

6. Yoshikawa A., Itahashi M., Minegushi K., Kanemitsu K., Nishioka K. Hepatitis B NAT virus positive blood donors in the early and late stages of HBV infection: analysis of the window period and kinetics of HBV DNA// Vox Sang.- 2005.- Vol.88, №2.- P.77-86

7. Федоров Н.А., Ёлов А.А., Суханов Ю.С., Жибурт Е.Б. Генамплификационное (NAT) тестирование крови и других биоматериалов на патогены и мутации.- М.: Полиграфсервис, 2003.- 210 с.

8. Ёлов А.А., Федоров Н.А., Жибурт Е.Б., Кофиади И.В., Трофимов Д.Ю. Количественная ПЦР на основе отечественной аппаратуры и тест-систем// Здравоохранение и медицинская техника.- 2005.- №2.- С.10

9. . Vlachman M.A. Bacterial contamination of cellular blood components, risks, sources and control// Vox Sang.- 2004.- Vol.87, Suppl.- P. 98-103

10. Федоров Н.А., Ёлов А.А., Жибурт Е.Б., Суханов Ю.С., Круглов А.Н., Стоногин А.В., Голосова С.А., Черкасов Е.Г., Гришаев М.П., Федоров Е.Н., Тургиев А.С. Частота определения бактериальной ДНК в цельной крови доноров// Доклады академии наук. - 2005.- Т.402, №6.- С.841-843

11. Универсальная ПЦР на ДНК гена 16S рРНК или кДНК 16S рРНК (РТ-ПЦР) для быстрой детекции бактериальных патогенов в крови, жидкостях и тканях человека. Информационное письмо №2 Департамента здравоохранения правительства Москвы, 2005.- 9с.

12. Покровский В.В., Федоров Н.А., Шипулин Г.А., Безруков В.М. Методические рекомендации по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. Основные положения. – Утверждены Государственным комитетом санэпиднадзора Российской Федерации 22 июня 1995 г.

13. Черкасов Е.Г., Ёлов А.А., Суханов Ю.С., Суценко И.Б. . и Федоров Н.А. Частота NAT-детекции ДНК HBV, РНК HCV в плазме крови серонегативных, серопозитивных и первичных (ИФА-неисследованных) доноров// IV всероссийская научно-практическая конференция «Генодиагностика инфекционных заболеваний», Москва, 2002 г. Сборник тезисов, с.167-168.

14. Федоров Е.Н., Петухова И.И., Ёлов А.А., Федоров Н.А. РТ-ПЦР-тестирование 16S рРНК *Treponema pallidum* в серопозитивной на сифилис крови// Материалы VIII всероссийского съезда общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. Москва, 2002 г., т.3, С.355-356.

15. Orton S.L., Liu H., Dodd R.Y. and Williams A.E. Prevalence of circulating *Treponema pallidum* DNA and RNA in blood donors with confirmed-positive syphilis tests. // Transfusion 2002, v.42, p.94-99.

16. Голосова С.А., Черкасов Е.Г., Попова В.И., Ёлов А.А., Федоров Н.А. и Жибурт Е.Б. Кровь доноров с повышенной активностью АЛТ, но с отрицательными результатами ИФА на вирусные гепатиты, не содержит этих

вирусов.// Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии. Материалы Российской научно-практической конференции 8-10 июня 2004 г., С.118-119.

17. Roth W/K., Houfar K., Seifried E. and Schmidt M. No relevance of ALT testing in blood donor screening in Germany.// Vox Sanguinis 2004, v.87 (Suppl.3), p.91.

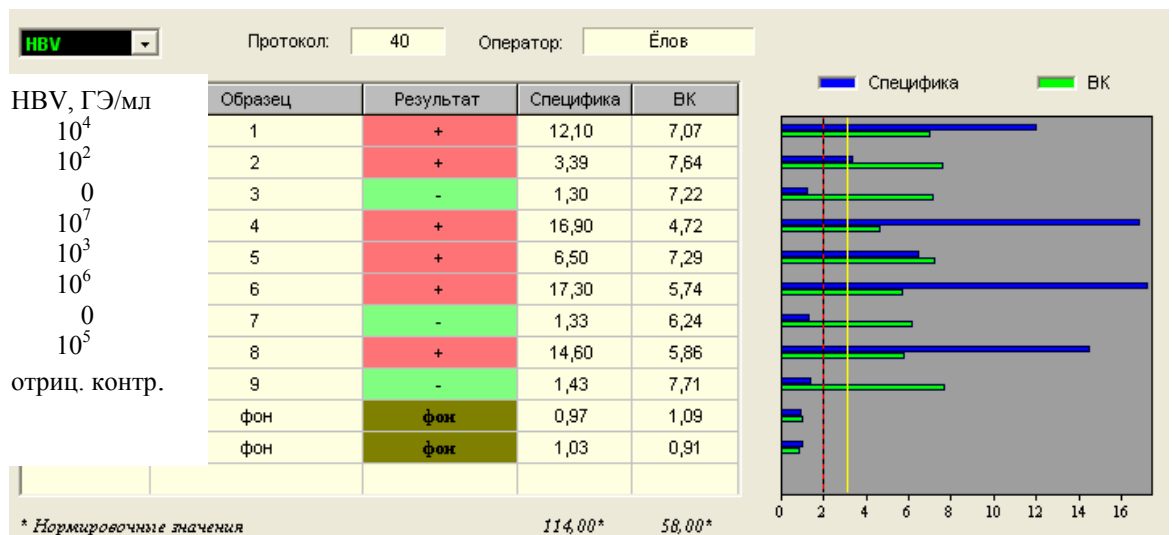
18. Приказ Комитета здравоохранения Читинской области от 15.08.2005 №288

Приложение

Патенты :

1. №2134871, «Способ подготовки биологического материала для ПЦР генамплификационной диагностики», Н.А. Федоров, А.А. Ёлов, Ю.С. Суханов, приоритет от 01.12.98
2. №2164532, «Способы и наборы реагентов для генамплификационной диагностики методом ПЦР и РНК-ПЦР» Н.А. Федоров, А.А. Ёлов, Ю.С. Суханов, приоритет от 11.07.2000
3. №2208645, «Способ определения бактериальной контаминации крови» А.Н. Круглов, Е.Г. Черкасов, Н.А. Федоров, А.А. Ёлов, Е.Н. Федоров, Ю.С. Суханов, приоритет от 28.08.2002

Пример 1. Результат анализа панели разведений контрольного образца плазмы носителя вируса гепатита В с флуориметрической детекцией результата.



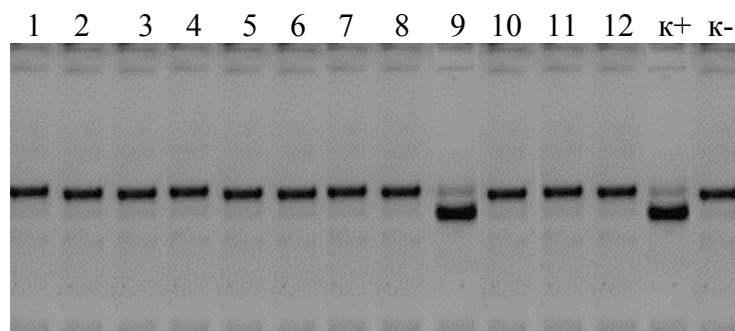
В таблице и на диаграмме вирусной ДНК соответствует сигнал «Специфика», внутреннему контролю – сигнал «ВК».

Пример 2. Идентификация вирусосодержащей донации в положительном на ДНК вируса гепатита В минипуле второго порядка из 96 образцов в микропланшетном формате.

На верхней гель-электрофореграмме приведен результат анализа минипулов первого порядка из 8 образцов, собранных по «столбцам» микропланшета (1-12). На нижней – анализы минипулов из 12 образцов (А-Н), собранные по «строкам» микропланшета, к- и к+ отрицательный и положительный контроли соответственно. Сигнал вируса гепатита В

расположен ниже сигнала внутреннего стандарта. По результатам определяется инфицированная донация как показано на схеме 1.

Пулы по 8:



Пулы по 12:

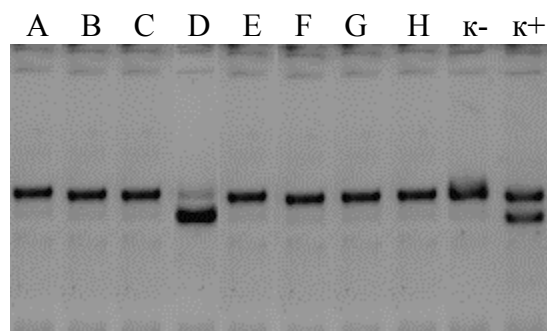


Рис.2. Пример идентификации донации, содержащей вирус гепатита В, в пуле из 96 образцов плазмы

Схема 1

Идентификация вирус-позитивных доноров методом перекрестных промежуточных пулов из 8 и 12 донаций

	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

Донация 9D выбраковывается.