

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 615.381.03:616.15].06:616.9-022:578.891]-078.33

Туполева Т.А., Игнатова Е.Н., Гуляева А.А., Овчинникова Е.Н., Тихомиров Д.С., Абакаров Р.Р., Романова Т.Ю., Ярославцева Н.Г., Королева О.М., Гаранжа Т.А., Филатов Ф.П., Гапонова Т.В., Савченко В.Г.

СКРИНИНГ ДОНОРСКОЙ КРОВИ НА АНТИТЕЛА К ЯДЕРНОМУ АНТИГЕНУ ВИРУСА ГЕПАТИТА В КАК ИНСТРУМЕНТ ПОВЫШЕНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ ТРАНСФУЗИЙ ДЛЯ БОЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ СИСТЕМЫ КРОВИ

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 125167, Москва, Российская Федерация

Риск инфицирования реципиентов вирусом гепатита В (ВГВ) сохраняется, несмотря на использование декретированных способов лабораторного анализа компонентов донорской крови. Изолированное определение HBsAg не позволяет проконтролировать все категории ВГВ-инфицированных лиц. Анализ наличия антител к ядерному антигену ВГВ (анти-НВс), которые появляются первыми из противовирусных и сохраняются пожизненно, является целесообразным методом скринингового тестирования донорской крови, позволяющим проводить дополнительную селекцию доноров. За период с марта 2014 г. по март 2015 г. была создана когорта регулярных анти-НВс-негативных доноров крови и ее компонентов. Тестирование образцов крови на анти-НВс может быть рекомендовано в качестве рутинного теста, повышающего вирусную безопасность гемотрансфузий для больных заболеваниями системы крови.

Ключевые слова: донорская кровь; вирус гепатита В; антитела к ядерному антигену вируса гепатита В.

Для цитирования: Туполева Т.А., Игнатова Е.Н., Гуляева А.А., Овчинникова Е.Н., Тихомиров Д.С., Абакаров Р.Р., Романова Т.Ю., Ярославцева Н.Г., Королева О.М., Гаранжа Т.А., Филатов Ф.П., Гапонова Т.В., Савченко В.Г. Скрининг донорской крови на антитела к ядерному антигену вируса гепатита В как инструмент повышения безопасности трансфузий для больных заболеваниями системы крови. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(5): 311-316. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-5-311-316

Tupoleva T.A., Ignatova E.N., Gulyaeva A.A., Ovchinnikova E.N., Tikhomirov D.S., Abakarov R.R., Romanova T.Yu., Yaroslavtseva N.G., Koroleva O.M., Garanzha T.A., Filatov F.P., Gaponova T.V., Savchenko V.G.

THE SCREENING OF DONOR BLOOD ON ANTIBODIES TO NUCLEAR ANTIGEN OF HEPATITIS B VIRUS AS A TOOL OF INCREASING OF SAFETY OF TRANSFUSION FOR PATIENTS WITH DISEASES OF BLOOD SYSTEM

The hematological research center of Minzdrav of Russia, 125167 Moscow, Russia

Despite application of decreed modes of laboratory analysis of components of donors' blood, the risk of infection of recipients with hepatitis B virus continues to be actual. The isolated identification of HBsAg provides no control of all categories of persons infected with hepatitis B virus. The analysis of presence of antibodies to nuclear antigen of hepatitis B virus that are the first out of antiviral ones and are preserved for life, is an expedient technique of screening testing of donor's blood that permits implementing an additional selection of donors. During March 2014 - March 2015, cohort of regular anti-hepatitis B virus negative donors of blood and its components. The testing of blood samples for anti-hepatitis B virus can be recommended as a routine test increasing viral safety of blood transfusions for patients with diseases of blood system.

Key words: donor's blood; hepatitis B virus; antibodies to nuclear antigen of hepatitis B virus

For citation: Tupoleva T.A., Ignatova E.N., Gulyaeva A.A., Ovchinnikova E.N., Tikhomirov D.S., Abakarov R.R., Romanova T.Yu., Yaroslavtseva N.G., Koroleva O.M., Garanzha T.A., Filatov F.P., Gaponova T.V., Savchenko V.G. The screening of donor blood on antibodies to nuclear antigen of hepatitis B virus as a tool of increasing of safety of transfusion for patients with diseases of blood system. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2016; 61 (5): 311-316. (in Russ.)

DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-5-311-316

For correspondence: *Tupoleva T.A.*, candidate of medical sciences, head of the scientific clinical department of virological diagnostic. e-mail: ttupoleva@mail.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Financing. The study had no sponsor support

Received 10.12.2015
Accepted 15.12.2015

Риск инфицирования вирусом гепатита В (ВГВ) реципиентов донорской крови сохраняется, несмотря на применение системного подхода к обеспечению безопасности ком-

Для корреспонденции: *Туполева Татьяна Алексеевна*, канд. мед. наук, зав. научно-клиническим отделом вирусологической диагностики — врач-вирусолог ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 125167, Москва, E-mail: ttupoleva@mail.ru

понентов крови, включающего селекцию добровольных безвозмездных доноров; применение современных технологий в производстве, таких как лейкоредукция и патогенинактивация, а также ограничительную тактику трансфузий, предполагающую недопущение клинически необоснованного применения компонентов крови.

Существование риска инфицирования определяется ограниченным перечнем декретированных маркеров и тестируемых гемотрансмиссивных инфекций, наличием негативного

окна, не позволяющим выявить «свежие» случаи инфицирования, присутствием скрытых форм заболевания. С кровью могут передаваться любые инфекционные агенты, которые в ней находятся. Наиболее опасные среди них — вирусы гепатитов В и С (ВГВ и ВГС), вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), герпес-вирусы, Т-лимфотропные вирусы человека 1-го и 2-го типов, парвовирус В19, флавивирус Западного Нила, малярийный плазмодий и др. При переливании компонентов крови может происходить заражение вирусами гепатитов как с парентеральным (В, С, D), так и с обычно энтеральным (А, Е) механизмами передачи [1, 2]. Перечень гемотрансмиссивных вирусов всегда может быть расширен за счет тех, опасность которых сегодня неясна.

Для заражения реципиента необходимо сочетание ряда факторов, таких как наличие инфекционного агента в крови донора в момент кроводачи, невозможность выявить его имеющимися способами и сохранение его жизнеспособности в условиях получения и производства компонентов и препаратов крови.

По данным швейцарских ученых, до 1970 г. около 6% реципиентов трансфузий приобретали ВГВ-инфекцию. Вследствие реализации программы вакцинации против ВГВ, формирования когорты добровольных безвозмездных доноров, повышения чувствительности тестов для выявления HBsAg, введения исследования нуклеиновой кислоты ВГВ, а также расширения в отдельных странах Европы и США спектра определяемых маркеров, в частности суммарных антител к ядерному антигену ВГВ (анти-НВс), риск трансфузионного инфицирования ВГВ сократился с 1:1000 до 1:500 000 — 1:1 000 000 донаций [3]. В Российской Федерации заболеваемость острым вирусным гепатитом В снизилась с 43,8 на 100 тыс. населения в 1999 г. до 2,7 в 2011 г. В то же время заболеваемость хроническим гепатитом В за тот же период возросла с 9 до 14,4 на 100 тыс. населения [4].

Тестирование донорской крови на инфекционные маркеры в Российской Федерации регламентируется приказом Минздрава России № 364, в котором декретировано проведение исследования на наличие сифилиса, поверхностного антигена ВГВ (HBsAg), антител к ВГС, ВИЧ-1 и ВИЧ-2 [5]. В рекомендациях ВОЗ для минимизации риска инфицирования ВГВ предлагается скрининг с использованием высокочувствительного и специфичного анализа на HBsAg [6]. В обоих документах отмечено, что «в зависимости от эпидемиологических ситуаций могут проводиться дополнительные исследования». При скрытой форме хронического ВГВ ДНК вируса определяется в гепатоцитах, а в плазме крови она содержится в очень низкой концентрации, HBsAg может не выявляться, что не позволит осуществить полную выбраковку инфицированных компонентов донорской крови в тех случаях, когда исследование ограничивается декретированными маркерами. При серопозитивном варианте скрытой ВГВ-инфекции в крови циркулируют «изолированные» анти-НВс-антитела возможно в сочетании с антителами к HBsAg (анти-НВс); при серонегативном варианте заболевания антительные маркеры отсутствуют [7]. Распространенность скрытой HBsAg-негативной инфекции среди доноров на территории РФ достигает 2% [8].

Изолированное определение HBsAg у доноров крови и ее компонентов не позволяет определить 4 категории ВГВ-инфицированных лиц: 1) в ранней фазе инфекции; 2) в фазе выздоровления; 3) у больных с хроническим течением заболевания и низким титром HBsAg; 4) у инфицированных мутантным по S-гену вирусом. Исследование анти-НВс имеет диагностическое значение, поскольку эти антитела появляются первыми из противовирусных антител и долго сохраняются, позволяя выявлять ВГВ-инфицированных лиц категорий 2, 3, 4 [3]. Анти-НВс-класса IgM являются маркером активности

процесса и могут выявляться как при остром гепатите, так и при активации хронического гепатита В. Определение анти-НВс используют для оценки эффективности вакцинации против гепатита В и определения напряженности иммунитета в результате перенесенной ВГВ-инфекции [9].

Установлено, что ВГВ остается в организме после исчезновения симптомов заболевания. ДНК вируса способна встраиваться в геном клетки хозяина и сохраняться в ядрах инфицированных клеток печени на протяжении всей жизни, при этом HBsAg в крови может не определяться. В ткани печени одновременно с интегрированной формой ДНК ВГВ может существовать и невстроенный геном вируса либо в свободной ковалентно-замкнутой эписомальной форме, либо в виде стабилизированной хроматином кольцевой ДНК. Активность репликации ВГВ находится под контролем иммунной системой хозяина [10, 11].

Цель настоящей работы — оценить значение скринингового тестирования донорской крови на антитела к ядерному антигену ВГВ для выявления скрытых форм вирусного гепатита В среди доноров крови.

Материал и методы. В исследование были включены 12 474 образца крови доноров, пришедших на донацию в период с 21 марта 2014 г. по 20 марта 2015 г., из них 4769 первичные доноры, 7705 повторные. Продолжительность исследования — 1 год. Все образцы исследованы на наличие HBsAg, антител к ВГС, ВИЧ-1/2 и дополнительно — на анти-НВс. Отрицательные по декретированным маркерам образцы крови доноров были тестированы на наличие нуклеиновых кислот ВИЧ, HCV и HBV методом ПЦР в пулах из шести проб с помощью мультиплексного дискриминационного теста Cobas TaqScreen MPX Test, version 2.0.

Скрининговое тестирование крови доноров на анти-НВс проводили в соответствии с «Программой инфекционной безопасности компонентов донорской крови для иммунокомпromетированных больных», одобренной Этическим комитетом при ФГБУ ГНЦ РФ, в рамках утвержденной научно-исследовательской работы по теме: «Создание программы повышения инфекционной безопасности трансфузионной терапии онкогематологических больных». К донации допускались лица, подписавшие добровольное информированное согласие на проведение расширенного иммунологического тестирования на маркеры ВГВ. Исследование проводили без взятия дополнительного объема крови. Донору сообщали информацию о результатах проведенного исследования.

Иммунохимическое тестирование проводилось методами иммуноферментного (ИФА) ($n = 2893$) и иммунохемилюминесцентного (ИХЛА) ($n = 9581$) анализов. ИФА-диагностику осуществляли на приборе Evolis с использованием наборов реагентов производства фирмы "Bio-Rad — Джинскрин" ультра ВИЧ Ag/Ab, Monolisa HBsAg Ultra, Monolisa anti-HCV Plus, version 2, Monolisa anti-HBc Plus. ИХЛА-диагностику проводили на приборе Architect с помощью наборов реагентов HIV Ag/Ab Combo, HBsAg Qual II, anti-HCV, anti-HBc II производства фирмы "Abbott". Результат иммунохимического теста оценивали как положительный при коэффициенте позитивности образца более 0,9 для декретированных маркеров и более 1,0 для анти-НВс. Коэффициент позитивности — это отношение числа относительных световых единиц пробы к величине точки отсечения, измеряемое в условных единицах.

Все анти-НВс-положительные, не содержащие HBsAg, образцы крови доноров ($n = 433$) дополнительно были исследованы на анти-НВс класса IgM и анти-НВс с помощью коммерческих наборов реагентов производства фирм Abbott и ЗАО «Вектор-Бест».

При необходимости были дополнительно исследованы архивные образцы плазмы доноров, полученные в ходе преды-

дущих донаций. Эти образцы тестировали на наличие ДНК ВГВ в индивидуальной постановке с использованием коммерческих наборов реагентов производства ЦНИИЭ «Рибо-преп» и «АмплиСенс HBV-монитор-FL». В этих случаях экстракцию нуклеиновых кислот выполняли из двойного объема образца по модифицированному протоколу с целью повышения чувствительности.

При сравнительной оценке применявшихся иммунохимических методов воспроизводимость положительных результатов по анти-НВс при использовании ИФА-диагностикума составила 98,2% (167 из 170), при ИХЛА — 99,6% (262 из 263). Полученные данные позволили сделать вывод о сопоставимости результатов обеих методик ($p > 0,05$), вследствие чего дальнейший анализ данных проводили без учета применявшегося иммунологического метода.

Согласно разработанному и утвержденному в ФГБУ ГНЦ РФ порядку обследования донорской крови и выбраковки компонентов, в случае выявления анти-НВс при первоначальном определении проводили повторное тестирование. При повторном положительном результате компоненты крови с коротким сроком хранения подлежали выбраковке (тромбоциты, донорские эритроциты), компоненты с длительным сроком годности (плазма) не допускались к клиническому использованию. Анти-НВс-положительные образцы дополнительно исследовали на анти-НВс-IgM для уточнения активности инфекционного процесса и анти-НВс для определения напряженности иммунитета к ВГВ. При отрицательных результатах дополнительного иммунохимического и ПЦР-тестирования донору назначали контрольное обследование через 3 мес. При получении положительного результата дополнительного иммунохимического и ПЦР-тестирования все компоненты крови, заготовленные от данного донора, подлежали выбраковке, в том числе находящиеся на длительном хранении. По решению трансфузиологической комиссии ФГБУ ГНЦ составляли «Акт отстранения от донорства», соответствующие данные о доноре вносили в базу данных донорства. Пробу отрицательную в ИФА/ИХЛА при первой постановке или положительную при первой постановке и дважды отрицательную при повторном исследовании в том же тесте расценивали как отрицательную. До клинического применения допускались ИФА/ИХЛА и ПЦР-отрицательные компоненты крови, образцы плазмы от этих компонентов архивировали.

Для статистических расчетов критериев Пирсона (χ^2) или точного критерия Фишера использовали пакет программ EPI5 версии 5.0. Доверительный интервал статистически значимых различий составлял 5% ($p = 0,05$).

Результаты и обсуждение. По данным, представленным в табл. 1, количество первичных доноров составляло от 192 (24,2%) до 699 (54,3%) человек в месяц (медиана 38,2%), в то время как количество повторных доноров преобладало на протяжении всего периода наблюдения и составляло от 483 (55,3%) до 843 (70,4%) человек в месяц (медиана 61,8%). Статистически значимых различий числа повторных и первичных доноров в месяц отмечено не было ($p > 0,05$).

За весь период исследования из 12 474 образцов было выявлено 13 образцов, содержащих НВсAg. Полученный в данном исследовании показатель встречаемости НВсAg среди доноров ФГБУ ГНЦ РФ (0,1%) сопоставим с данными других авторов, изучавшими популяцию доноров Москвы и России [12, 13].

В соответствии с утвержденным в ФГБУ ГНЦ РФ порядком обследования доноров все 12 474 образца

донорской крови были исследованы на наличие анти-НВс. В 444 (3,5%) образцах этот маркер был обнаружен, причем в 11 случаях одновременно с НВсAg. Два образца донорской крови были позитивны только по НВсAg при отсутствии анти-НВс, что свидетельствует о ранней фазе инфекции. Согласно нормативным документам, до клинического применения не допускаются НВсAg-положительные компоненты крови, поэтому, исключив 13 позитивных по НВсAg образцов, в последующем анализировали 433 анти-НВс-положительные пробы.

Ранее коллективом авторов было отмечено, что в 2005 г. частота встречаемости анти-НВс среди НВсAg-негативных доноров ФГБУ ГНЦ РФ составляла 13,4% [14]. В настоящем исследовании частота выявления анти-НВс в образцах крови первичных доноров не имела статистически значимых колебаний (от 12 до 31 случая в месяц) и составляла 3,6—7,8% (медиана 5,3%; $p > 0,05$), что в 3 раза меньше значений 2005 г. Этот факт может являться результатом качественного отбора доноров, а также влиянием вакцинации, поскольку более четверти (27,2%) доноров ФГБУ ГНЦ РФ за период данного исследования — это молодые люди, рожденные после 1988 г. и вакцинированные против ВГВ в возрасте 13 лет.

При исследовании образцов крови повторных доноров отмечено статистически значимое снижение частоты встречаемости анти-НВс с 61 случая в апреле 2014 г. до 1 в марте 2015 г., что составило 8,8 и 0,2% соответственно. Данная динамика объясняется выявлением и отстранением от донорства лиц с анти-НВс-положительными результатами тестирования, что не повлияло на количество повторных доноров, число которых за время наблюдения статистически значимо не изменилось (от 483 до 831 человека в месяц, медиана 642; $p > 0,05$).

За время исследования среди повторных доноров, ранее обследованных и имевших отрицательные результаты тестирования на анти-НВс-антитела и ДНК ВГВ, было зафиксировано 3 случая обнаружения анти-НВс. В первом случае анти-НВс были выявлены спустя 3 мес после предыдущей донации с невысоким коэффициентом позитивности (1,77) и

Таблица 1

Динамика выявления маркеров ВГВ в образцах донорской крови в ФГБУ ГНЦ РФ в период с апреля 2014 г. по март 2015 г.

Месяц/год	Первичные доноры		Повторные доноры		НВсAg+	ДНК ВГВ+ ИХЛА-
	количество	Анти-НВс+	количество	анти-НВс+		
Апрель/2014	275	14 (5,1)	693	61 (8,8)	1	0
Май/2014	476	24 (5,0)	604	38 (6,3)	0	0
Июнь/2014	342	17 (5,0)	598	12 (2)	2	0
Июль/2014	323	23 (7,1)	623	9 (1,4)	1	0
Август/2014	428	24 (5,6)	649	14 (2,2)	1	0
Сентябрь/2014	355	31 (7,8)	843	22 (2,6)	2	0
Октябрь/2014	192	12 (6,3)	600	6 (1)	1	0
Ноябрь/2014	699	28 (4,0)	590	9 (1,5)	1	0
Декабрь/2014	439	21 (4,8)	544	3 (0,6)	1	0
Январь/2015	391	14 (3,6)	483	1 (0,2)	0	0
Февраль/2015	519	28 (5,4)	831	3 (0,4)	2	0
Март/2015	330	18 (5,5)	647	1 (0,2)	1	0
Всего...	4769	254 (5,3)	7705	179 (2,3)		
<i>p</i>	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05	—	—

Примечание. В скобках — проценты.

Таблица 2

Частота обнаружения маркера острой формы ВГВ-инфекции — анти-НВс-IgM при различных титрах анти-НВс в анти-НВс-положительных образцах крови доноров¹

Титр анти-НВс, мМЕ/мл	Количество	Из них анти-НВс-IgM- положительных образцов	
		абс.	%
<10	79	9	11,4
10—100	88	4	4,5
>100	266	25	9,4
$\chi^2 = 231,18,$ $p < 0,05$		$p > 0,05$	

являлись единственным маркером ВГВ-инфекции. При тестировании архивного материала в индивидуальной постановке на ДНК вируса также был получен отрицательный результат. Была заподозрена неспецифическая ложноположительная реакция при тестировании данного образца крови донора на анти-НВс. Согласно разработанному и утвержденному в ФГБУ ГНЦ РФ порядку обследования донорской крови и выбраковки компонентов крови донору назначили контрольное обследование через 3 мес, однако выполнить его не удалось из-за неявки донора.

Во втором случае в образце крови повторного донора через 2 мес после предыдущей донации помимо анти-НВс были выявлены анти-НВс класса IgM, а в архивном материале при индивидуальной постановке была обнаружена ДНК ВГВ в титре менее 150 МЕ/мл. От предыдущей донации была заготовлена и перелита в день заготовки эритроцитная взвесь. Исследование ДНК ВГВ и НВсAg реципиенту после трансфузии потенциально инфицированных эритроцитов выполнить не удалось, поскольку он умер от основного заболевания через 2 нед после трансфузии.

У третьего донора были выявлены анти-НВс в сочетании с анти-НВс в высоком титре 200 МЕ/мл. Предыдущая донация была 4 мес назад, когда был заготовлен концентрат тромбоцитов и перелит реципиенту, который скончался в реанимационном отделении от основного заболевания.

Таким образом, у повторных доноров случаи появления анти-НВс крайне редки (3 из 7529, или 0,04%). В ходе исследования не удалось проследить отдаленные последствия трансфузий потенциально инфицированных компонентов крови. Учитывая, что, по данным литературы, при заражении малым количеством вирусных частиц чаще формируется клинически бессимптомная ВГВ-инфекция и иммуносупрессия у пациентов с заболеваниями системы крови может существенно удлинять и видоизменять иммунный ответ, выявить факт инфицирования ВГВ рутинными методами лабораторного обследования не всегда представляется возможным [15].

Введение в ряде стран Западной Европы и США с 1980 г. тестирования всех кроводач на анти-НВс в качестве суррогатного маркера вирусного гепатита ни-А, ни-В позволило существенно снизить число посттрансфузионного гепатита В [3, 16]. С другой стороны, остается вопрос о некорректном отстранении большого числа доноров в странах с низкой распространенностью вирусного гепатита В за счет ложноположительных реакций на анти-НВс. Так, в Германии, Новой Зеландии и Швейцарии тестирование на анти-НВс привело к потере 2, 2,5 и 6—7% доноров соответственно. Для уменьшения потерь среди потенциальных доноров предложено дополнительно тестировать кровь анти-НВс-положительных доноров на анти-НВс. Дозы крови с титром анти-НВс выше 100 мМЕ/мл и негативные по ДНК ВГВ при индивидуальном тестиро-

вании с чувствительностью теста не менее 12 МЕ допускаются до клинического применения. В Японии применяют компоненты крови, отрицательные при индивидуальном тестировании на ДНК ВГВ, содержащие анти-НВс в высоком титре $> 2^5$ и защитным уровнем анти-НВс $> 2^4$ (~200 мМЕ/мл) [17, 18]. После введения указанного алгоритма в Японии не было зарегистрировано ни одного случая посттрансфузионного гепатита [17, 19—22]. Согласно рекомендациям ВОЗ, анти-НВс-положительные дозы крови с уровнем анти-НВс 100 мМЕ/мл и выше считаются пригодными для клинического применения [6, 23]. Остается неясным, насколько надежно высокий титр анти-НВс защищает реципиента от заболевания ВГВ и может ли иметь значение иммунный статус реципиента и объем переливаемых анти-НВс-положительных компонентов крови.

С целью определения напряженности специфического противовирусного иммунитета мы исследовали анти-НВс-положительные, но НВсAg-отрицательные образцы крови 433 доноров на наличие анти-НВс. Данный маркер был выявлен в 81,7% случаев, причем в 61,4% отмечены титры анти-НВс выше 100 мМЕ/мл. Согласно протоколу исследования, все анти-НВс-положительные образцы донорской крови были протестированы на наличие маркера активной ВГВ-инфекции — анти-НВс-IgM. Положительными оказались 39 (9%) проб. Как следует из данных, представленных в табл. 2, анти-НВс-IgM с одинаковой частотой выявлялись как в образцах с высоким титром анти-НВс, так и в анти-НВс-отрицательных пробах (9,4 и 11,4%; $p > 0,05$).

На основании полученных данных можно сделать предположение о потенциальной вирусной опасности анти-НВс-IgM-положительных компонентов даже при условии выявления высокого титра анти-НВс.

Несмотря на то что очевидна существенная роль определения анти-НВс для выявления лиц со скрытым гепатитом В и низкой вирусной нагрузкой [3, 16, 24], некоторые авторы полагают, что отвод анти-НВс-положительных доноров приведет к необоснованной потере большого числа доноров. Кроме того, существуют данные о том, что анализы на анти-НВс нередко демонстрируют высокий уровень неспецифичности [25]. Однако результатами исследования, проведенного в институте Paul Ehrlich, было установлено, что из 18 доказанных случаев трансфузионной передачи ВГВ как минимум 7 могли быть предотвращены благодаря анти-НВс-тестированию [26]. С. Niederhauser и соавт. [3] показали, что тестирование на анти-НВс донорской крови позволяет выявить большинство случаев скрытого гепатита В, но неэффективно при первичной инфекции и в редких случаях, вызванных мутантными штаммами вируса, ассоциированными с выявлением только анти-НВс. Австралийский ученый Р. Kiely и соавт. [27] в результате обследования 756 915 доноров показали, что лица со скрытым гепатитом встречаются существенно чаще, чем лица, находящиеся в ранней стадии ВГВ-инфекции (42 случая против 8 случаев). Также ими отмечена важность анти-НВс-тестирования в выявлении скрытых форм ВГВ, поскольку вирусная нагрузка при этом периодически снижается ниже детектируемого уровня.

Постоянный мониторинг вирусных маркеров у пациентов с заболеваниями системы крови в ходе лечения в ФГБУ ГНЦ РФ позволяет выявлять случаи первичной ВГВ-инфекции. В период с августа 2013 г. по сентябрь 2014 г. (за 13 мес наблюдения) было зафиксировано 5 подобных случаев. Введение скрининга донорской крови на анти-НВс изменило сложившуюся ситуацию. Начиная с октября 2014 г. (спустя 6 мес после начала исследования) на момент 01 июля 2015 г. (9 мес наблюдения) первичная ВГВ-инфекция зафиксирована только у 1 больного, причем эпидемиологическое расследование данного случая инфицирования не подтвердило трансфузионный путь передачи инфекции.

Такие характеристики пациентов с заболеваниями системы крови, как длительная, на протяжении всего времени лечения, иммуносупрессия и высокая потребность в гемокомпонентной терапии, особенно в концентратах тромбоцитов, диктуют особые требования к безопасности донорской крови. Проведенная работа указывает на необходимость создания специальной трансфузиологии для данной категории пациентов, что подтверждает мировой опыт [6].

Заключение. Введение дополнительного скринингового тестирования донорской крови на антитела к ядерному антигену ВГВ (анти-НВс) позволило проводить дополнительную селекцию доноров крови и ее компонентов без потери донорского контингента и объема заготавливаемой продукции ($p > 0,05$). В результате исследования за период с марта 2014 г. по март 2015 г. была создана когорта регулярных анти-НВс-негативных доноров крови и ее компонентов. Показано, что тестирование образцов крови на анти-НВс целесообразно для выявления скрыто инфицированных доноров и может быть рекомендовано в качестве рутинного теста, повышающего вирусную безопасность гемотрансфузий для больных с заболеваниями системы крови. Установлено, что использование анти-НВс-положительных компонентов крови с высоким титром анти-НВс небезопасно, поскольку почти в 10% этих компонентов обнаружен маркер острой ВГВ-инфекции (анти-НВс-IgM).

Исследование не имело спонсорской поддержки.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—3, 7, 10—11, 15—27 см.
REFERENCES)

4. Онищенко Г.Г., Жербун А.Б., ред. *Вирусные гепатиты в российской Федерации, 2010. Справочник*. СПб.: НИИЭМ им. Пастера; 2010.
5. Приказ Минздрава РФ от 14.09.01 № 364. Об утверждении порядка медицинского обследования донора крови и ее компонентов (в редакции приказов Минздравсоцразвития РФ от 16.04.08 № 175н, от 06.06.08 № 261н). Available at: <http://www.zdrav.ru/library/regulations/detail.php?ID=44797>.
6. Скрининг донорской крови на гемотрансмиссивные инфекции. Рекомендации. Женева: ВОЗ; 2010. Available at: <http://www.who.int/bloodsafety/publications/ScreeningblooddonationsRU.pdf>.
8. Кюрегян К.К. *Молекулярно-биологические основы контроля вирусных гепатитов*: Автореф. дисс. ... докт. биол. наук. М.; 2012.
9. Алан Г.Б. Ву. *Клиническое руководство Тица по лабораторным тестам*. Перевод с английского. 4-е издание. М.: Лабора; 2013: 215—6.
12. Белякова В.В. *Совершенствование лабораторного тестирования для обеспечения вирусной безопасности аллогенных гемокомпонентов*: Дисс. ... канд. биол. наук. М.; 2014.
13. Селиванов Е.А., Четчин А.В., Григорьев М.Ш., Макеев А.Б., Воробей Л.Г. Современное состояние донорства крови и ее компонентов в Российской Федерации. *Трансфузиология*. 2012; 13(3): 4—14.
14. Сомова А.В., Туполева Т.А., Грумбкова Л.О., Ярославцева Н.Г., Гуляева А.А., Багрянцева С.Ю. и др. Частота выявления маркеров ВИЧ и вирусов гепатитов у доноров и в компонентах и в препаратах плазмы (в ИФА и ПЦР). *Вестник службы крови России*. 2005; (2): 28—34.

Поступила 10.12.15

REFERENCES

1. Slot E., Hogema B.M., Riezebos-Brilman A., Kok T.M., Molier M., Zaaijer H.L. Silent hepatitis E virus infection in Dutch blood donors, 2011 to 2012. *Euro Surveill*. 2013; 18(31): pii: 20550. Available at: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20550>.
2. Crowcroft N.S., Walsh B., Davison K.L., Gungabissoon U.; PHLS Advisory Committee on Vaccination and Immunisation. Guidelines

- for the control of hepatitis. A virus infection. *Commun. Dis. Public Health*. 2001; 4(3): 213—27.
3. Niederhauser C. Reducing the risk of hepatitis B virus transfusion-transmitted infection. *J. Blood Med*. 2011; 2: 91—102.
4. Onishchenko G.G., Zherbun A.B., eds. *Viral Hepatitis in the Russian Federation, 2010. Directory [Virusnye gepatity v rossiyskoy Federatsii, 2010. Spravochnik]*. St. Petersburg: NIEM im. Pastera; 2010. (in Russian)
5. Order of the Ministry of Health № 364 dated 14.09.2001. On approval of the medical examination of blood donors and its components. (as amended by Order of the Ministry of Health of the Russian Federation from 16.04.08 № 175n, from 06.06.08 №261n). Available at: <http://www.zdrav.ru/library/regulations/detail.php?ID=44797>. (in Russian)
6. The screening of donated blood for transfusion infection. Recommendations. Geneva: WHO; 2010. Available at: <http://www.who.int/blood-safety/publications/ScreeningblooddonationsRU.pdf>. (in Russian)
7. Tupoleva T.A., Yaroslavtseva N.G., Ignatova E.N., Garanzha T.A., Gulyaeva A.A., Filatov F.P. Occult hepatitis B virus infection among blood donors. Abstracts of the 24th Regional Congress of the international society of blood transfusion In Conjunction with the 6th Malaysian National Transfusion Medicine Conference by Malaysian Blood Transfusion Society. Kuala-Lumpur, Malaysia, December 1—4, 2013. *Vox Sang*. 2013; 105(Issue s2): 93—4.
8. Kuregyan K.K. *Molecular Biological Basis of Control of Viral Hepatitis*: Diss. Moscow; 2012. (in Russian)
9. Alan H.B. Wu. *Tietz Clinical Guide to Laboratory Tests*. 4th ed. London: Elsevier Health Sciences; 2006.
10. Levrero M., Pollicino T., Petersen J., Belloni L., Raimondo G., Dandri M. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J. Hepatol*. 2009; 51(3): 581—92.
11. Zoulim F. New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA. *J. Hepatol*. 2005; 42(3): 302—8.
12. Belyakova V.V. *Donor Blood Viral Safety Ensuring through Laboratory Testing Improvement*: Diss. Moscow; 2014. (in Russian)
13. Selivanov E.A., Chechetkin A.V., Grigor'yan M.Sh., Makeev A.B., Vorobey L.G. Current status of blood donors service in the Russian Federation. *Transfuziologiya*. 2012; 13(3): 4—14. (in Russian)
14. Somova A.V., Tupoleva T.A., Grumbkova L.O., Yaroslavtseva N.G., Gulyaeva A.A., Bagryantseva S.Yu. et al. Frequency detecting markers of hepatitis viruses and HIV in donor and in components and in plasma preparations (ELISA and PCR). *Vestnik sluzhby krovi Rossii*. 2005; (2): 28—34. (in Russian)
15. Raimondo G., Caccamo G., Filomia R., Pollicino T. Occult HBV infection. *Semin. Immunopathol*. 2013; 35(1): 39—52.
16. Gerlich W.H. Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now. *Virology*. 2013; 10: 239. Available at: <http://www.virologyj.com/content/10/1/239>.
17. Sato S., Ohhashi W., Ihara H., Sakaya S., Kato T., Ikeda H. Comparison of the sensitivity of NAT using pooled donor samples for HBV and that of a serologic HBsAg assay. *Transfusion*. 2001; 41(9): 1107—13.
18. Yoshikawa A., Gotanda Y., Itabashi M., Minegishi K., Nishioka K.; Japanese Red Cross NAT Screening Research Group. HBV NAT positive [corrected] blood donors in the early and late stages of HBV infection: analyses of the window period and kinetics of HBV DNA. *Vox Sang*. 2005; 88(2): 77—86.
19. Matsumoto C., Tadokoro K., Fujimura K., Hirakawa S., Mitsunaga S., Juji T. Analysis of HBV infection after blood transfusion in Japan through investigation of a comprehensive donor specimen repository. *Transfusion*. 2001; 41(7): 878—84.
20. Dreier J., Kröger M., Diekmann J., Götting C., Kleesiek K. Low-level viraemia of hepatitis B virus in an anti-HBc- and anti-HBs-positive blood donor. *Transfus. Med*. 2004; 14(2): 97—103.
21. Gerlich W.H. Breakthrough of hepatitis B virus escape mutants after vaccination and virus reactivation. *J. Clin. Virol*. 2006; 36(Suppl. 1): S18—22.
22. Satake M., Taira R., Yugi H., Hino S., Kanemitsu K., Ikeda H. et al. Infectivity of blood components with low hepatitis B virus DNA levels identified in a lookback program. *Transfusion*. 2007; 47(7): 1197—205.
23. Grob P., Jilg W., Bornhak H., Gerken G., Gerlich W., Günther S. et al.

- Serological pattern «anti-HBc alone»: report on a workshop. *J. Med. Virol.* 2000; 62(4): 450—5.
24. Stramer S.L., Zou S., Notari E.P., Foster G.A., Krysstof D.E., Musavi F. et al. Blood donation screening for hepatitis B virus markers in the era of nucleic acid testing: are all tests of value? *Transfusion.* 2012; 52(2): 440—6.
25. Katz L., Strong D.M., Tegmeier G., Stramer S. Performance of an algorithm for the reentry of volunteer blood donors deferred due to false-positive test results for antibody to hepatitis B core antigen. *Transfusion.* 2008; 48(11): 2315—22.
26. Burger R., Offergeld R. Testing plasma donations for hepatitis B core antigen (anti-HBc) in order to improve safety of cellular blood components and of quarantined fresh frozen plasma. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2005; 48(6): 698—9.
27. Kiely P., Margaritis A.R., Seed C.R., Yang H.; Australian Red Cross Blood Service NAT Study Group. Hepatitis B virus nucleic acid amplification testing of Australian blood donors highlights the complexity of confirming occult hepatitis B virus infection. *Transfusion.* 2014; 54(8): 2084—91.

Received 10.12.15

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616-003.829.1-055.5/7-074:577.21.08

Аксельрод Э.В., Миронов К.О., Дунаева Е.А., Шипулин Г.А.

СРАВНЕНИЕ ТРЕХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДИК ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСНОВНЫХ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ HFE, СВЯЗАННЫХ С РАЗВИТИЕМ НАСЛЕДСТВЕННОГО ГЕМОХРОМАТОЗА

ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва, Российская Федерация

В 97% всех случаев наследственного гемохроматоза (НГХ) причиной заболевания являются три основные мутации в гене HFE: C282Y, H63D и S65C. Известно, что около 85% пациентов с НГХ являются либо гомозиготными носителями мутации C282Y, либо несут компаунд-гетерозиготу C282Y/H63D. Таким образом, важное место в диагностике НГХ занимает молекулярно-генетическое исследование, направленное на определения этих трех мутаций в гене HFE. Цель настоящего исследования заключается в разработке методик для выявления мутаций C282Y, H63D и S65C на основе двух молекулярно-генетических методов — ПЦР в режиме реального времени и пиросеквенирования. В качестве референсного метода использовали опубликованную методику (С.В. Моyses и соавт., 2008). С помощью этих методик было проанализировано 129 образцов ДНК, дискордантных результатов получено не было. Среди исследованных клинических образцов ДНК мутантные аллели гена HFE были найдены в 42 (32,5%) образцах. Мутация C282Y обнаружена в гетерозиготном состоянии в 4 (3,1%) образцах, мутация H63D встречалась в гетерозиготном состоянии в 31 (24%) образце и в гомозиготном в 4 образцах (3%). Мутация S65C встречалась в гетерозиготном состоянии в одном образце (0,8%) и в одном образце (0,8%) детектировалась компаунд-гетерозигота H63D/S65C. Проведена сравнительная характеристика этих 3 методик по следующим параметрам: время, количество этапов анализа и удобство интерпретации результатов. К основным достоинствам метода, основанного на ПЦР в режиме реального времени, можно отнести время проведения анализа. К основным достоинствам пиросеквенирования — автоматическое определение генотипа.

Ключевые слова: наследственный гемохроматоз; ген HFE; мутации C282Y, H63D, S65C; ПЦР в режиме реального времени; метод пиросеквенирования.

Для цитирования: Аксельрод Э.В., Миронов К.О., Дунаева Е.А., Шипулин Г.А. Сравнение Трех молекулярно-генетических методик для определения основных мутаций в гене HFE, связанных с развитием наследственного гемохроматоза. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2016; 61 (5)-316-320.

DOI 10.18821/0869-2084-2016-61-5-316-320

Axelrod E.V., Mironov K.O., Dunaeva E.A., Shipulin G.A.

THE COMPARISON OF THREE MOLECULAR GENETIC TECHNIQUES FOR IDENTIFYING MAJOR MUTATIONS IN GENE HFE RELATED TO DEVELOPMENT OF INHERENT HEMOCHROMATOSIS

The central research institute of epidemiology of Rospotrebnadzor, 111123 Moscow, Russia

The three main mutations in gene HFE (C282Y, H63D, S65C) are the cause of development of 97% of cases of inherent hemochromatosis. It is known that about 85% of patients with inherent hemochromatosis are either homo-zygotic agents of mutation C282Y or carry compound-heterozygote C282Y/H63D. Therefore, the molecular genetic study intended for detection of these three mutations in gene HFE takes important place in diagnostic of inherent hemochromatosis. The study was organized to develop methods for detection of mutations C282Y, H63D, S65C on the basis of two molecular genetic methods - polymerase chain reaction in real-time and