

МАРКЕРЫ ИНФЕКЦИОННЫХ АГЕНТОВ В ОБРАЗЦАХ ПУПОВИННОЙ КРОВИ ОБЩЕСТВЕННОГО РЕГИСТРА ДОНОРОВ

А.Б. Смолянинов^{1,2}, Д.А. Иволгин^{1,2}, И.И. Масленникова^{1,2}, О.В. Супильникова^{1,2},
И.А. Пирожков², А.Д. Крючкова²

¹ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

² Покровский банк стволовых клеток, Санкт-Петербург, Россия

Markers infectious agent in the cord blood samples public register of donors

A.B. Smoljaninov^{1,2}, D.A. Ivolgin^{1,2}, I.I. Maslennikova^{1,2}, O.V. Supil'nikova^{1,2}, I.A. Pirozhkov², A.D. Krjuchkova²

¹ North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia

² Pokrovskij Stem Cell Bank, Saint-Petersburg, Russia

Резюме

Цель. Оценить распределение маркеров инфекционных агентов в образцах пуповинной крови общественного регистра доноров Покровского банка стволовых клеток за пять лет (2009–2013 гг.).

Материалы и методы. Всего было изучено 3533 образца плазмы, отобранной после процедуры обработки пуповинной крови для аллогенного использования в Покровском банке стволовых клеток. Все образцы плазмы исследовались в соответствии с Приказом МЗ РФ № 325 от 25 июля 2003 г. методом иммуноферментного анализа. Кроме того, в период с ноября 2011 г. по декабрь 2013 г. на наличие РНК вируса гепатита С, РНК вируса иммунодефицита человека и ДНК вируса гепатита В обследовано 1030 образцов плазмы пуповинной крови.

Результаты. Маркеров выше указанных агентов не было обнаружено в 481 образце плазмы (13,6%). В течение описанного периода не наблюдалось значительных изменений доли образцов, содержащих антитела к цитомегаловирусу и токсоплазме (цитомегаловирус – 1978 образцов (56%), *Toxoplasma gondii* – 112 образцов (3,2%), в 825 образцах (23,4%) были одновременно выявлены антитела к цитомегаловирусу и *Toxoplasma gondii*). 137 образцов (3,9%) подверглись утилизации в связи с выявлением в них антител к HbcorAg – 116 образцов (3,3%), антител к HCV – 5 образцов (0,14%) и антител к *Treponema pallidum* – 16 образцов (0,45%).

Заключение. Введение дополнительно метода полимеразной цепной реакции для обнаружения нуклеиновых кислот вирусов гепатитов В, С, вируса иммунодефицита человека, наряду с исследованием образцов пуповинной крови методом иммуноферментного анализа, повысит качество контроля за передачей гемотрансмиссивных инфекций.

Ключевые слова: пуповинная кровь, иммуноферментный анализ, маркеры инфекционных агентов, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.

Введение

Трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) успешно применяют уже в течение 30 лет для лечения пациентов с гематологическими и негематологическими заболеваниями. Использование пуповинной крови в качестве источника

Abstract

Objective. To evaluate the distribution of markers of infectious agents in umbilical cord blood samples Pokrovskij public stem cell bank donor registry for five years (2009 – 2013).

Materials and Methods. 3533 plasma samples were investigated after selection during cord blood processing procedure for allogeneic use in Pokrovskij stem cell bank. All plasma samples were investigated in accordance with the Order of the Ministry of Health № 325 – 2003 by enzyme-linked immunoassay method. In addition, during the period from November 2011 to December 2013 1030 plasma samples of umbilical cord blood were examined for the presence of HCV RNA, the RNA of HIV and HBV DNA.

Results. Markers of the agents above have not been found in the plasma of 481 samples (13.6%). During the described period, no significant change in the share of samples containing antibodies to cytomegalovirus and toxoplasmosis (cytomegalovirus – 1978 samples (56%), *Toxoplasma gondii* – 112 samples (3.2%), 825 samples (23.4%) cytomegalovirus and *Toxoplasma gondii* simultaneously) were registered. 137 samples (3.9%) were subjected to utilization in connection with detection of antibodies to HbcorAg – 116 samples (3.3%), antibodies to HCV – five samples (0.14%), and antibodies to *Treponema pallidum* – 16 samples (0.45%).

Conclusion. The introduction of an additional method of polymerase chain reaction for the detection of nucleic acids of hepatitis viruses B, C, human immunodeficiency virus, along with study of cord blood samples by enzyme-linked immunoassay improve the quality of the control of the transmission of blood-borne infections.

Key words: umbilical cord blood, ELISA, markers of infectious agents, Real-Time PCR.

ГСК для трансплантаций получило значительное распространение в последние 10 лет [1].

Процедура подготовки пуповинной крови для банкирования включает в себя несколько этапов, одним из которых является тестирование образцов на стерильность и серологические исследования

на наличие маркеров инфекционных агентов. Проверка инфекционной безопасности проводится в установленном порядке, который определен требованиями приказа МЗ Российской Федерации № 325 от 25 июля 2003 г. «О развитии клеточных технологий в РФ» и включает определение следующих показателей: Anti-HIV1 и 2, HIV1-Ag, Anti-HTLV-I и -II, Anti-HBcor-Ag, HBs-Ag, Anti-HCV, Anti-CMV, Anti-Toxoplasma gondii, RW [2]. При условии отрицательных результатов тестирования (Анти-HIV-1 и -2, HIV-1Ag, Анти-HTLV-I и -II, Анти-HbcorAg, HBs-Ag, Анти-HCV) образец пуповинной крови следует считать пригодным к дальнейшему хранению.

Этап подтверждения инфекционной безопасности клеточных продуктов является важной стадией заготовки образцов пуповинной крови. Технология заготовки, обработки и хранения пуповинной крови является новой для здравоохранения РФ и хорошо отработанной в других странах. Поэтому для инфекционной безопасности пуповинной/плацентарной крови мы руководствовались не только требованиями законодательства РФ [2, 3], но и международными стандартами NetCord-FACT [4].

Основной опасностью компонентов крови является, как известно, передача гемотрансмиссивных микроорганизмов, ведущее место среди которых занимают вирусы. К наиболее опасным гемоконтактными инфекциям (ГКИ) относят ВИЧ, вирусные гепатиты В и С [5].

Использование высокочувствительных серологических методов (ИФА) обеспечивает достаточно высокий уровень безопасности донорской крови. Однако встречаются случаи заражения реципиентов компонентами крови с отрицательными результатами серологических тестов [6].

Совершенствование методов тестирования донорской крови на маркеры ГКИ и внедрение новых высокотехнологичных методов лабораторной диагностики в службу крови позволяет уменьшить вероятность инфицирования реципиента ГКИ при гемотрансфузии. Тем не менее, риск посттрансфузионной передачи ГКИ существует. Необходимость сведения к минимуму опасности контаминации реципиента компонентами крови привела к использованию в лабораторной практике службы крови РФ, начиная с 2010 г., молекулярно-биологических методов тестирования нуклеиновых кислот, основанных на обнаружении специфического участка генома возбудителя инфекции с помощью многократного увеличения числа копий фрагмента нуклеиновых кислот [7]. Этот метод используется для определения нуклеиновых кислот вирусов иммунодефицита человека, гепатитов В и С в плазме крови доноров, что позволяет выявить вирусоносителей с ранней стадией инфицирования [8].

Поэтому, помимо требований Приказа МЗ РФ № 325 от 25 июля 2003 г., было принято решение

ввести дополнительное лабораторное обследование образцов пуповинной крови на наличие нуклеиновых кислот вирусов иммунодефицита человека 1 и 2 типа, вирусов гепатитов С и В.

Цель исследования — оценить наличие маркеров инфекционных агентов в образцах пуповинной крови общественного регистра доноров Покровского банка стволовых клеток за пять лет (2009 – 2013 гг.), используя методы ИФА и ПЦР.

Материалы и методы

В исследование были включены образцы плазмы, отобранные в период с апреля 2009 г. по декабрь 2013 г. в Покровском банке стволовых клеток. Перечень исследованных показателей представлен в таблице 1. В качестве исследуемого материала использовали плазму пуповинной крови, собранную стандартным способом в контейнер для сбора пуповинной крови и полученную методом двойного центрифугирования. Отбор образцов осуществляли в одноразовые нестерильные пробирки типа «Эппендорф».

Таблица 1

Перечень исследованных показателей в образцах пуповинной крови общественного регистра доноров Покровского банка стволовых клеток

Исследованный материал	Исследованный показатель	Количество обследованных, абс. ч.
Плазма пуповинной крови	Антиген р24 ВИЧ1	3533
	Антитела к ВИЧ 1,2	
	Антиген гепатита В (HbsAg)	
	Антитела к гепатиту В (антиHBcorAg)	
	Антитела к гепатиту С (антиHCV)	
	Антитела к сифилису (антиTreponema pallidum)	
	Антитела к цитомегаловирусу (антиCMV)	
	Антитела к токсоплазме (антиToxoplasma gondii)	
	Антитела к Т-лимфотропному вирусу человека 1 и 2 типа (антиHTLV-1,2)	
	НК HIV1,2	
НК HCV		
НК HBV		

Изучены результаты скрининга и динамика показателей выявления маркеров инфекционных агентов в образцах пуповинной крови. Проведен анализ причин утилизации образцов пуповинной крови в процессе карантинного хранения.

В исследовании применяли метод иммуноферментного анализа и метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Иммуноферментный анализ проводили с помощью коммерческих наборов реагентов ЗАО «ВекторБест», предназначенных для качественного определения антител и антигенов (см. табл. 1). ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием коммерческого набора реагентов «АмплиСенс HCV/HBV/HIV-FL» (ЦНИИ эпидемиологии РФ), предназначенного для одновременного выявления РНК вируса гепатита С, ДНК вируса гепатита В и РНК вируса иммунодефицита человека, согласно инструкции производителя. Аналитическая чувствительность составила 50 МЕ/мл для гепатита С, 25 МЕ/мл для гепатита В, 100 копий/мл для ВИЧ-1 и 300 копий/мл для ВИЧ-2. Выделение нуклеиновых кислот проводили по стандартной методике с помощью набора реагентов «Магно-Сорб» (ЦНИИ эпидемиологии РФ). Для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени использовали термоциклер с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия). В каждой постановке использовались положительные и отрицательные контроли этапов выделения и амплификации, а также внутренний контроль выделения нуклеиновых кислот.

Результаты и обсуждение

Всего было исследовано 3533 образца плазмы, отобранной после процедуры обработки пуповинной крови в Покровском банке стволовых клеток. В 481 образце плазмы (13,6%) не было обнаружено антигенов и антител ни к одному из выше указанных агентов. Также среди 3533 образцов плазмы не было выявлено образцов, содержащих антитела к ВИЧ, антигену р24 ВИЧ-1 и HBsAg, что объясняется предварительным обследованием рожениц на эти маркеры в период беременности. Антитела к HTLV I и HTLV II в исследованных образцах также не выявлены. Подавляющее большинство образцов пуповинной крови содержало антитела

класса IgG к цитомегаловирусу (1978 образцов – 56% от общего количества образцов) и *Toxoplasma gondii* (112 образцов – 3,2%). В 825 образцах (23,4%) были одновременно выявлены антитела к цитомегаловирусу и *Toxoplasma gondii* (табл. 2, рис. 1). Это свидетельствует о высокой встречаемости данных инфекций в популяции и не является показанием к утилизации образцов ПК.

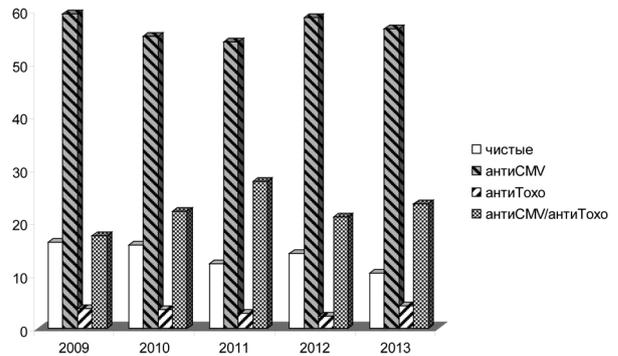


Рис. 1. Процент образцов (от общего числа всех образцов в год), поступивших в Покровский банк стволовых клеток с 2009 по 2013 г. и прошедших в регистр доноров образцов пуповинной крови

В течение описанного периода не наблюдалось значительных изменений доли образцов, содержащих антитела к цитомегаловирусу и токсоплазме.

На остальные маркеры (анти-HCV, антиHBsAg, антитела к *Treponema pallidum*) пришлось 3,9% – 137 образцов, которые, учитывая требования приказа Министерства здравоохранения РФ № 325, подверглись утилизации. Среди них антитела к HBsAg выявлялись в 116 образцах (3,3%), антитела к HCV – в 5 образцах (0,14%), антитела к *Treponema pallidum* – в 16 образцах (0,45%). Высокий процент определения антител к ядерному антигену гепатита В связан с персистенцией вируса гепатита В в популяции и свидетельствует о перенесенном ранее матерью гепатите.

Таблица 2

Результаты скрининга образцов пуповинной крови прошедших в регистр доноров методом ИФА в 2009–2013 гг.

Год	Общее количество образцов	Чистые образцы		Распределение маркеров среди образцов, прошедших в регистр доноров					
		абс.	%	АнтиCMV		АнтиТохо		АнтиCMV/АнтиТохо	
				абс.	%	абс.	%	абс.	%
2009	303	49	16,2	180	59,4	11	3,6	53	17,5
2010	1046	163	15,6	576	55,1	37	3,5	230	22,0
2011	1088	132	12,1	589	54,1	30	2,8	301	27,7
2012	640	90	14,1	375	58,6	15	2,3	134	20,9
2013	456	47	10,3	258	56,6	19	4,2	107	23,5
Итого:	3533	481	13,6	1978	56	112	3,2	825	23,4

Как известно, при контакте с вирусом гепатита В в крови пациентов первыми появляются анти-НВс. Их, как правило, выявляют независимо от фазы инфекции (острой или хронической). Антитела класса IgM к НВсAg считают ранними диагностическими антителами, т.к. они появляются первыми при острой фазе инфекции или при обострении хронической инфекции [9]. Присутствие IgM антител в крови свидетельствует об активной репликации вируса. В ходе инфекции IgM антитела к НВсAg сменяются антителами класса IgG, следовательно, наличие в сыворотке IgG антител подтверждает факт ранее перенесенной инфекции [10, 11]. Выявление суммарных антител к НВсAg в образцах крови с недетектируемой нуклеиновой кислотой свидетельствует об имевшем ранее место контакте донора с HBV. Это позволяет считать, что в крови донора присутствует ДНК HBV в концентрации ниже предела чувствительности теста [12].

Определение анти-НВс является обязательным при тестировании ПК в связи с более высокими требованиями к безопасности концентрата клеток для предполагаемой трансплантации.

По результатам распределения маркеров инфекционных агентов среди отбракованных образцов за пять лет можно проследить тенденцию к увеличению образцов, содержащих антитела к вирусу гепатита В. Высокая доля таких образцов среди брака связана с тем, что у матерей, доноров пуповинной крови, не проводится анализ на наличие антиНВсAg в период беременности (рис. 2, табл. 3).

За период с ноября 2011 г. по декабрь 2013 г. на наличие РНК ВГС, РНК ВИЧ и ДНК ВГВ обследовано 1030 образцов плазмы пуповинной крови. Ни в одном образце РНК ВГС, РНК ВИЧ и ДНК ВГВ обнаружены не были.

Заключение

Таким образом, за исследованный период времени не наблюдается значительных изменений в распределении маркеров инфекционных агентов в образцах пуповинной крови. Тем не менее,

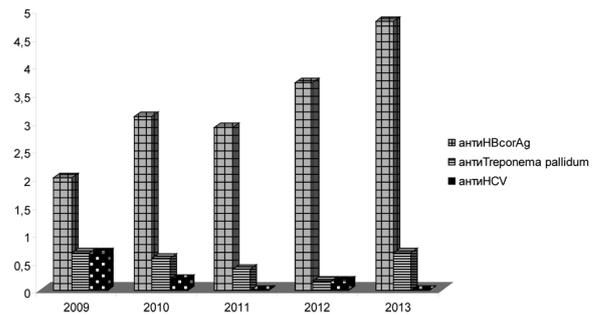


Рис. 2. Процент образцов (от общего числа всех образцов в год), поступивших в Покровский банк стволовых клеток с 2009 по 2013 г. и не прошедших в регистр доноров образцов пуповинной крови

отмечена тенденция к повышению доли образцов, содержащих антитела к вирусу гепатита В. Для повышения качества контроля заготавливаемых образцов ПК, наряду с методом ИФА, мы ввели метод ПЦР в режиме реального времени для предотвращения передачи гемотрансмиссивных инфекций.

Используемый нами набор реагентов «Ампли-Сенс HCV/HBV/HIV-FL» имеет возможность повышения чувствительности до 10 МЕ/мл для гепатита С, 5 МЕ/мл — для гепатита В, 20 копий/мл — для ВИЧ-1 и 60 копий/мл — для ВИЧ-2 за счет увеличения объема плазмы при выделении НК. Планируемое повышение чувствительности метода ПЦР в дальнейшем скрининге образцов плазмы пуповинной крови может позволить снизить риск передачи гемотрансмиссивных инфекций.

Литература

1. Тюмина, О.В. Пуповинная кровь: заготовка, хранение, трансплантация и регенеративная медицина / О.В. Тюмина, О.Г. Хурцилава, А.Б. Смолянинов. — СПб.: Наука, 2012. — 352 с.
2. О развитии клеточных технологий в Российской Федерации : Приказ М-ва здравоохранения РФ от 25 июля 2003 г. № 325 // Рос. газ. — 2003. — 12 авг.
3. О донорстве крови и ее компонентов : Закон Российской Федерации от 09.06.1993 г. № 5142-1 // Ведомости СНД и ВС РФ. — 1993. — № 28. — Ст. 1064.

Таблица 3

Результаты скрининга образцов пуповинной крови, не прошедших в регистр доноров (отбракованных) методом ИФА в 2009–2013 гг.

Анализируемый год	Общее количество образцов, абс.	Количество отбракованных образцов		Распределение маркеров среди отбракованных образцов					
				антиНВсAg		антиTr pallidum		анти HCV	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
2009	303	10	3,3	6	2,0	2	0,66	2	0,66
2010	1046	40	3,8	32	3,1	6	0,57	2	0,19
2011	1088	36	3,3	32	2,9	4	0,37	0	0
2012	640	26	4,1	24	3,7	1	0,16	1	0,16
2013	456	25	5,5	22	4,8	3	0,66	0	0
Итого	3533	137	3,9	116	3,3	16	0,45	5	0,14

4. NetCord-FACT International Cord Blood Standards for Cord Blood Collection, Banking, and Release for Administration. — Fourth Edition. — January, 2010. — 87 p.

5. Коденев, А.Т., Скрининг маркеров инфекций у доноров крови / А.Т. Коденев, М.Н. Губанова, Е.Б. Жибурт // Вестник службы крови России. — 2010. — № 2. — С. 13–16.

6. Tabor, E. NAT screening of blood and plasma donations: evolution of technology and regulatory policy / E. Tabor, J.C. Epstein // Transfusion. — 2002. — V. 42 (9). — P. 1230–1236.

7. Об утверждении правил и методов исследований и правил отбора образцов донорской крови, необходимых для применения и исполнения технического регламента о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии : Постановление Правительства РФ от 31 дек. 2010 № 1230 // Собр. законодательства РФ. — 2011. — № 3. — С. 553.

8. Белякова, В.В. Генотестирование доноров на гемотрансмиссивные инфекции / В.В. Белякова [и др.] // Вестник службы крови России. — 2012. — № 1. — С. 9–12.

9. HBV NAT и анти-НВс-тестирование повышают безопасность крови / В. Курт Рос [и др.] // NAT-мини-пул-геноскринирование крови на основе международных стандартов ВОЗ- гарантия вирусной и бактериальной безопасности реципиентов : научно-методический сборник / под ред. Н.А. Федорова — М., Новосибирск, Франкфурт-на-Майне, 2004. — С. 38–55.

10. Stramer, S.L. Nucleic Acid Testing to Detect HBV Infection in Blood Donors / S.L. Stramer [et al.] // NEJM. — 2011. — V. 364 (3). — P. 236–247.

11. Аммосов, А.Д. Гепатит В / А. Д. Аммосов. — Новосибирск, 2006. — 132 с.

12. Gerlich, W.H. Hepatitis B virus variants HbSAg negative, anti-Hbc positive blood donors: infectivity, pathogenicity and variability / W.H. Gerlich. — Vox Sang. — 2010. — V. 99 (Suppl. 1). — P. 22.

References

1. Tjumina O.V. Umbilical cord blood: processing, storage, transplantation and regenerative medicine / Tjumina O.V., Hurcilava O.G., Smoljaninov A.B. — SPb.: Science, 2012 (in Russian).

2. About the development of cells technologies in Russian Federation: Order of Ministry of Health RF 25 June 2003. № 325 // Ros. gaz. -2003. — 12 aug. (in Russian).

3. About blood and its components donation: The Law of Russian Federation 09.06.1993 № 5142-1 // Vedomosti SND i VS RF. 1993. — № 28. — St. 1064 (in Russian).

4. NetCord-FACT International Cord Blood Standards for Cord Blood Collection, Banking, and Release for Administration. — Fourth Edition. — January, 2010. — 87 p. (in English).

5. Kodenev A.T., Gubanova M.N., Zhiburt E.B Vestnik sluzhby krovi Rossii. 2010; 2:13-6 (in Russian).

6. Tabor E, Epstein JC. NAT screening of blood and plasma donations: evolution of technology and regulatory policy. Transfusion 2002 Sep;42(9): 1230-6 (in English).

7. Ob utverzhdenii pravil i metodov issledovaniy i pravil otbora obrazcov donorskoj krovi, neobhodimyh dlja primeneniya i ispolneniya tehničeskogo reglamenta o trebovaniyah bezopasnosti krovi, ee produktov, krovzameshchajushhih rastvorov i tehničeskikh sredstv, ispol'zuemyh v transfuzionno-infuzionnoj terapii: Postanovlenie Pravitel'stva RF 31 dec. 2010 № 1230 // Sobr. zakonodatel'stva RF. — 2011. — №3. — S. 553. (in Russian).

8. Beljakova V.V., Gukasjan I.A., Momotjuk K.S., Majorova O.A., Kuznecov O.E. Vestnik sluzhby krovi Rossii. 2012; 1: 9–12 (in Russian).

9. HBV NAT and anti-NVs-testing increases blood safety / Kurt Ros V, Veber M, Petersen D, Drosten K, Bur S, Sirajs V, Vajhert V, Hedzhes D, Zajfrid J// NAT-minipul-geneskrining of blood based on international standarts of WHO- guarantee of viral and bacterial safety of recipients. Methodological collected book edited by N.A. Fedorov — M. — Novosibirsk — Frankfurt-na-Majne, 2004 (in Russian).

10. Stramer SL, Wend U, Candotti D, Foster GA, Hollinger FB, Dodd RY, Allain JP, Gerlich W. Nucleic Acid Testing to Detect HBV Infection in Blood Donors. NEJM. 2011 Jan; 364(3): 236-47. (in English).

11. Ammosov A.D. Hepatitis B. : Novosibirsk; 2006 (in Russian).

12. Gerlich WH, Wienzek S, Wend UC, Dickmeiss E, Saniewski M, Chudy M, Glebe D, Lattermann A, Schittler CG, Harritshoj L, Ullum H, Willems WR. Hepatitis B virus variants HbSAg negative, anti-Hbc positive blood donors: infectivity, pathogenicity and variability. Vox Sang. 2010 Jul; 99(Suppl.1):22. (in English).

Авторский коллектив:

Смолянинов Александр Борисович — заведующий научно-исследовательской лабораторией клеточных технологий Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова, генеральный директор Покровского банка стволовых клеток, д.м.н.; тел.: +7-964-376-05-06, e-mail: doctorssmolvma@inbox.ru

Иволгин Дмитрий Александрович — старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова, заведующий лабораторией выделения стволовых клеток Покровского банка стволовых клеток, к.м.н.; тел.: +7-965-063-23-03, e-mail: ida59m@mail.ru

Масленникова Ирина Ивановна — старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова, заведующий лабораторным клинико-диагностическим отделением Покровского банка стволовых клеток, к.б.н.; тел.: 8(812)322-04-02, e-mail: irka204@mail.ru

Супильникова Ольга Владимировна — младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова, заведующий лабораторией иммунологических исследований Покровского банка стволовых клеток; тел.: 8(812)322-04-02, e-mail: supfam2@mail.ru

Пирожков Иван Александрович — врач-генетик Покровского банка стволовых клеток; тел.: +7-911-709-90-14, e-mail: ipir@mail.ru

Крючкова Александра Дмитриевна — биотехнолог Покровского банка стволовых клеток; тел.: +7-952-203-38-68, e-mail: dr.kryuchkova@mail.ru