

## ИССЛЕДОВАНИЕ ОБРАЗЦОВ ПУПОВИННОЙ КРОВИ ОБЩЕСТВЕННОГО РЕГИСТРА ДОНОРОВ НА НАЛИЧИЕ МАРКЕРОВ ИНФЕКЦИОННЫХ АГЕНТОВ

А.Б. Смолянинов<sup>1,2</sup>, О.Г. Хурцилава<sup>1</sup>, Д.А. Иволгин<sup>1,2</sup>, О.В. Супильникова<sup>1,2</sup>, А.С. Хрупина<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург;

<sup>2</sup> Покровский банк стволовых клеток, Санкт-Петербург

### Umbilical cord blood units for public storage donors screening for markers of infectious agents

A.B. Smolyaninov<sup>1,2</sup>, O.G. Hurcilava<sup>1</sup>, D.A. Ivolgin<sup>1,2</sup>, O.V. Supilnikova<sup>1,2</sup>, A.S. Khрупина<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>North-Western State Medical University named by I.I.Mechnikov, Saint-Petersburg;

<sup>2</sup>Pokrovskii Stem Cells Bank, Saint-Petersburg

**Резюме.** Проведено исследование 3515 образцов пуповинной крови, поступивших на хранение для общественного использования, на маркеры инфекционных агентов. Установлено, что большинство образцов пуповинной крови содержит маркеры цитомегаловируса и токсоплазмы (81%), что не является противопоказанием для хранения и последующего использования данных образцов. В 4,6% случаев пуповинная кровь подвергалась утилизации из-за содержания в ней маркеров вирусных гепатитов В и С, а также *Tr. pallidum*, причем наибольшую долю составлял HbscorAg – 71,3% от утилизированных. Для снижения процента утилизации образцов пуповинной крови для общественного регистра предложено в обязательный лабораторный скрининг включить анализ на Anti-HBcor у матерей доноров пуповинной крови.

**Ключевые слова:** пуповинная кровь, иммуноферментный анализ, маркеры инфекционных заболеваний.

### Введение

Трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в последние годы стала способом лечения различных гематологических заболеваний, врожденных нарушений иммунной системы, наследственных анемий, некоторых болезней обмена и злокачественных новообразований [1–3]. Стволовые гемопоэтические клетки получают из трех основных источников: костный мозг, периферическая кровь и пуповинная кровь (ПК). В последнее время возрастает количество трансплантаций ГСК из ПК, по состоянию на декабрь 2011 г. было проведено 8300 таких трансплантаций [4]. Создание банков пуповинной крови (БПК) в значительной степени облегчает поиск материала для трансплантации, что в сочетании с дешевизной получения и доступностью ПК позволит увеличить количество трансплантаций ГСК.

**Abstract.** The screening of 3515 cord blood samples which had entered bank for public use for presence of markers of infectious agents was carried out. It was established that majority of cord blood units contain markers of cytomegalovirus and *Toxoplasma* (81%) that is not a contraindication for storage and subsequent use of these samples. In 4.6% of cases umbilical cord blood units were subjected to disposal because of identification of viral hepatitis B and C, as well as *Tr. pallidum* markers, moreover, the largest share of the discarded units contained antibodies to HbscorAg – 71.3%. Inclusion of analysis on the presence of Anti-HBcor in the required laboratory screening of mothers-donors CB was proposed in order to reduce the percentage of discarded umbilical cord blood units for the public inventory.

**Key words:** umbilical cord blood, ELISA, markers of infectious diseases.

Эффективность трансплантации во многом зависит от количества ГСК, поэтому важно совершенствовать методы обработки клеток для обеспечения достаточного количества ГСК в трансплантате и разработать систему критериев отбраковки ПК перед началом ее обработки для помещения в хранилище. Использование современных технологий сбора и обработки ПК в соответствии с международными стандартами NETCORD и FACT позволяет сократить потери клеток при сборе и обработке ПК. Все практические аспекты банкирования ПК, такие как информированное согласие матери, методы сбора, маркировка и идентификация образца, микробиологическое и генетическое тестирование, типирование по системе антигенов HLA, методика обработки клеток, криоконсервация, транспортировка и поставка, публикуются на сайте Netcord, а также

подробно изложены в 4-й редакции Стандартов Netcord-FACT, вышедших в 2010 г.

Один из основных этапов после обработки ПК – проведение анализа ПК на наличие инфекций, что является одним из обязательных шагов в технологии банкирования и подготовки образцов к клиническому использованию. В работе Juliet N. Barker [5] стандартизация методов тестирования на наличие вирусов считается одним из вызовов, призванных улучшить исходы трансплантации ПК.

Нельзя недооценивать инфекционную опасность донорской крови. Основным документом, регламентирующим деятельность банков ПК в РФ, является Приказ Министерства здравоохранения РФ № 325 от 25.07.2003 г. «О развитии клеточных технологий в Российской Федерации». Согласно приложению 2 «Инструкция по выделению и хранению концентрата стволовых клеток пуповинной/плацентарной крови человека» приказа № 325, необходимо тестирование образцов пуповинной крови на наличие следующих серологических маркеров: Anti-HIV1 и 2, HIV1-Ag, Anti-HTLV-I и -II, Anti-HBcor-Ag, HBs-Ag, Anti-HCV, Anti-CMV, Anti-Toxoplasma gondii, Anti-Treponema pallidum.

Помимо указанных агентов, существует реальная угроза инфицирования реципиента ещё более чем 20 возбудителями, такими как малярия, бруцеллёз, туляремия, иерсиниоз, туберкулёз, сыпной тиф, лепра, гепатит D и G, различные формы вируса герпеса, Эпштейна – Барр, Крейтцфельда – Якоба, парвовирус В-19 [6–8]. При переливании крови могут быть переданы такие паразитарные болезни, как висцеральный лейшманиоз, эхинококкоз, филяриатоз, трипаносомоз, ришта. Практически любое инфекционное заболевание, в патогенезе которого есть период наличия возбудителя в крови, может быть передано через донорскую кровь.

Несмотря на обязательный контроль крови на наличие ВИЧ, в России и других странах отмечены случаи трансфузионного заражения ВИЧ. Учитывая рост заболеваемости ВИЧ-инфекцией (в России в 1997 г. зарегистрировано около 8000 инфицированных), можно прогнозировать дальнейшее увеличение трансфузионной ВИЧ-инфекции [9].

Развитие цитомегаловирусного мононуклеоза приводит к многомесячной инфекционной астении. У лиц с ослабленным иммунитетом вирус вызывает пневмонию, поражение желудочно-кишечного тракта, менингоэнцефалит, миокардит [10]. Вирус простого герпеса может вызывать пневмонию, поражение центральной и периферической нервной системы, печени, снижение иммунитета. Среди доноров лишь у 1–2% отсутствуют антитела к герпесу, цитомегаловирусу, токсоплазме.

Парвовирус В-19, особенно у больных с ослабленной иммунной системой, вызывает парциальную красно-клеточную аплазию, т.е. угнетает эритроциты, что особенно неблагоприятно в условиях кровопотери [11]. Заражение *Yersinia spp.* может привести к смерти пациента в ближайшие несколько суток. Донорская кровь, инфицируемая во время технической обработки и хранения, может привести к развитию экзотоксического шока, тяжелых септических состояний [12].

Даже самое тщательное медицинское обследование потенциальных доноров, строгое отстранение их по более чем тридцати противопоказаниям и тестирование на антигены и инфекционные агенты не может обеспечить полной иммунологической и инфекционной безопасности реципиента.

Существует большое количество методов клинической лабораторной диагностики, позволяющих проводить анализы на наличие инфекционных агентов в биологическом материале. Метод иммуноферментного анализа широко используется для клинического определения антигенов и антител в сыворотке крови человека [13]. Этот метод характеризуется скоростью и простотой выполнения процедур, высокой чувствительностью и специфичностью, а также отсутствием в составе наборов опасных для здоровья реактивов. В настоящее время на мировом рынке существуют различные наборы реагентов разных производителей для определения маркеров инфекционных заболеваний.

**Цель исследования** – выявление инфекционных агентов в образцах пуповинной крови, предназначенных для переноса в общественный регистр доноров.

Практическое значение выполненной работы заключается в возможности проведения более тщательного тестирования доноров пуповинной крови перед забором и заготовкой пуповинной крови для безвозмездного донорства, которые включены в относительный список противопоказаний, что позволяет оптимизировать процесс работы БПК и получать наиболее эффективный трансплантационный материал.

#### Материалы и методы

Материалом для исследования служила плазма ПК 3515 доношенных новорожденных, родившихся на 37–41-й неделе беременности в родильных домах г. Санкт-Петербурга за период с 2009 по 2011 г. Забор ПК осуществляли с учетом противопоказаний (табл. 1).

Таблица 1

## Противопоказания к сбору пуповинной крови

№	Противопоказания
	Наличие носительства и установленных инфекционных заболеваний, в том числе ВИЧ-инфекция, гепатиты, сифилис и заболевания, передающиеся половым или гемотрансмиссивным путем
	Генетические заболевания
	Наследственные и врожденные патологии, в том числе кроветворной и иммунной систем
	Психические заболевания
	Онкологические заболевания, в том числе в стадии ремиссии
	Применение цитостатических и тератогенных средств во время беременности
	Наркомания и токсикомания
	Переливание крови и ее компонентов в течение последних 12 мес.
	Лечение иглоукалыванием, выполнение пирсинга и татуировок за 12 мес. перед родами
0	Постоянное отстранение от донорства
1	Отказ матери

Плазму ПК получали в результате обработки ПК по методу двойного центрифугирования [14] или с использованием сепаратора Sерах S100 (Biosafe», Швейцария). До начала обработки образцов ПК производилось их взвешивание, визуальная оценка герметичности мешка с ПК и наличия в нем гемолиза или тромбов, маркировка каждого мешка для забора (Ф.И.О. роженицы, наименование родильного дома, вес крови) и соответствующей сопроводительной документации, контроль температурного режима при хранении и транспортировке. После этого в асептических условиях, в «чистом» помещении класса D приступали к процессу обработки ПК одним из указанных выше способов.

Выявление маркеров инфекционных агентов в плазме ПК производили методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-систем «ImmunoComb» (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Российская Федерация). Наборы реагентов ЗАО «ВекторБест» предназначены для проведения анализа вручную и основаны на использовании 96-луночных разборных микротитровальных планшетов в качестве твердой фазы, пероксидазы хрена в качестве фермента и ТМБ в качестве хромогена. Все процедуры проводились согласно инструкциям, прилагаемым к наборам. Используемые в работе наборы реагентов представлены в таблице 2.

Таблица 2

## Наборы реагентов, использованные в настоящем исследовании

Производитель	Наименование набора реагентов	Кат. №
ЗАО «ВекторБест»	«РекомбиБест антипаллидум – суммарные антитела» (комплект 2)	1856
	«КомбиБест ВИЧ-1,2 АГ/АТ» (комплект 2)	0152
	«НВsAg – ИФА – Бест» (комплект 3)	0544
	«ВектоНВсogAg-антитела»	0566
	«Бест анти – ВГС» (комплект 2)	0772
	«ВектоЦМВ – IgG»	1554
	«ВектоТоксо – IgG»	1752

## Результаты и обсуждение

Было показано, что выявленные маркеры инфекционных агентов в образцах ПК общественного регистра доноров ПК распределились следующим образом: 448 образцов (12,7%) из 3515 обследованных не содержали антител ни к одному из выше указанных агентов. Отсутствие положительных результатов по наличию антител к ВИЧ, антигену р24 ВИЧ-1 и НВs-антигену объясняется изоляцией матерей, инфицированных ВИЧ и ВГВ, по эпидемическим показаниям. Также в исследованных образцах не были выявлены антитела к НТЛV I и НТЛV II. Подавляющее большинство образцов ПК содержали антитела класса Ig G к цитомегаловирусу – 1958 образцов (55,7% от общего количества образцов) – и *Toxoplasma gondii* – 144 образца (4,0%). В 808 образцах (23,0%) были одновременно выявлены антитела к цитомегаловирусу и *Toxoplasma gondii* (табл. 3). Это свидетельствует о высокой встречаемости данных инфекций в популяции и не является показанием к утилизации образцов ПК, о том же говорят и зарубежные источники, по которым наличие в донорской ПК антигенов к ЦМВ не является противопоказанием к трансплантации [15] и не оказывает значимого влияния на исход трансплантации [16].

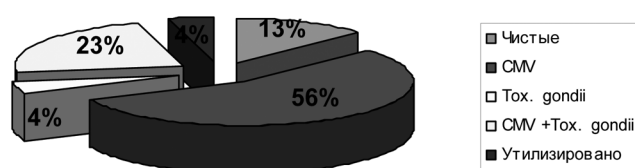
На остальные инфекции (антитела к HCV, антитела НВсogAg, антитела к *Treponema pallidum*) пришлось 4,6% – 157 образцов, которые, учитывая требования приказа Министерства здравоохранения РФ № 325, подверглись утилизации. Среди них антитела к НВсogAg выявлялись в 112 образцах (71,3%), антитела к HCV – в 10 образцах (6,0%), антитела к *Treponema pallidum* – в 24 образцах (15,3%) и сочетание маркеров инфекций – в 11 образцах (7,4%) (табл. 4). Высокий процент определения антител к ядерному антигену гепатита В связан с персистенцией вируса гепатита В в популяции и свидетельствует о перенесенном ранее матерью гепатите. Данный анализ является обязательным при тестировании ПК в связи с более высокими требованиями к безопасности концентрата клеток для предполагаемой трансплантации.

Таблица 3

**Распределение выявленных маркеров инфекционных агентов в пуповинной крови общественного регистра доноров**

Выявленный маркер	Абс. количество	Доля в%
Чистые	448	12,7
CMV	1958	55,7
Tox. gondii	144	4,0
CMV + Tox. gondii	808	23,0
Утилизировано	157	4,6
Всего	3515	100

В графическом представлении данное распределение будет иметь следующий вид:



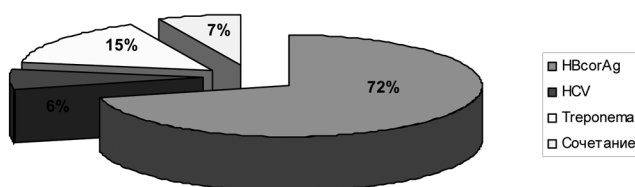
**Рис. 1.** Распределение выявленных маркеров инфекционных агентов в пуповинной крови общественного регистра доноров

Таблица 4

**Распределение выявленных маркеров инфекционных агентов в пуповинной крови утилизированных образцов**

Выявленный маркер	Абс. количество	Доля в%
HBsAg	112	71,3
HCV	10	6,0
Трепонема	24	15,3
Сочетание	11	11,0
Всего	157	100

В графическом представлении данное распределение будет иметь следующий вид:



**Рис. 2.** Распределение выявленных маркеров инфекционных агентов в пуповинной крови утилизированных образцов

## Заключение

Полученные нами результаты, в основном, соответствуют литературным источникам и распределению инфекционных агентов в плазме ПК при создании общественного регистра доноров СК ПК. Так, при скрининге доноров одного из БПК для общественного использования при обследовании 2880 доноров ПК антиген HBsAg был выявлен в 3,57% случаев (3,18% по нашим данным) [17].

Несмотря на тщательный отбор ПК для общественного регистра, имеется вероятность попадания в него инфицированных образцов, в связи с чем сохраняется необходимость определения маркеров инфекционных агентов согласно приказу МЗ РФ № 325 от 25.07.2003 г.

Результаты проведенного исследования показали, что для уменьшения процента утилизации образцов ПК для общественного регистра в обязательный лабораторный скрининг должен быть включен анализ на присутствие Anti-HBsAg у матерей доноров ПК.

## Литература:

- Афанасьев, Б.В. Роль трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в терапии взрослых больных острыми лейкозами / Б.В. Афанасьев, А.С. Зубаровская // Онкогематология. — 2006. — Т. 1, № 1–2. — С. 70–85.
- William, I. Bensinger et al. Transplantation of Bone Marrow as Compared with Peripheral-Blood Cells from HLA-Identical Relatives in Patients with Hematologic Cancers / I. William // N. Engl. J. Med. — 2001. — V. 344 (3). — P. 175–181.
- Rubinstein, P. Outcomes among 562 Recipients of Placental-Blood Transplants from Unrelated Donors / P. Rubinstein [et al.] // N. Engl. J. Med. — 1998. — V. 339 (22). — P. 1565–1577.
- Gluckman, E. Directed cord blood banking / E. Gluckman // World III Cord Blood Congress. — Roma, 2011. — P. 24.
- Barker, J.N. Umbilical cord blood transplantation for the treatment of cancer / J.N. Barker, J.E. Wagner // Nature Reviews Cancer. — 2003. — V. 3 (7). — P. 526–532.
- Bowden, R.A. Transfusion-transmitted cytomegalovirus infection / R.A. Bowden // Hematol. Oncol. Clin. North Am. — 1995. — V. 9. — P. 155–166.
- Figueroa, J.P. Risk factors for HTLV-I among heterosexual STD clinic attenders / J.P. Figueroa [et al.] // J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol. — 1995. — V. 9. — P. 81–88.
- Gunter, K.C. Transfusion-transmitted cytomegalovirus: the part-time pathogen / K.C. Gunter // Pediatr. Pathol. Lab. Med. — 1995. — V. 15. — P. 515–534.
- Бутина, Е.В. Иммунологическая безопасность трансфузионной терапии / Е.В. Бутина [и др.] // Науч.-практ. конференция «Трансфузиология и служба крови». — 1998. — С. 62.
- Инструкция по медицинскому освидетельствованию доноров крови, плазмы, клеток крови. — М.: МЗ РФ, 1998. — 14 с.

11. Ягужинская, О.Е. Диагностика парвовирус В-19 (PV-19) инфекции у пациентов при ряде гематологических заболеваний с апластическими кризами / О.Е. Ягужинская [и др.] // Научн.-практ. конференция «Трансфузиология и служба крови». — 1998. — С. 19.
12. Аграненко, В.А. Гемотрансфузионные реакции и осложнения / В.А. Аграненко Н.Н. Скачилова. — М.: Медицина, 1979. — 191 с.
13. Егоров, А.М. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М. Егоров [и др.]. — М.: Высшая школа, 1991. — 198 с.
14. Rubinstein, P. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution / P. Rubinstein [et al.] // Proc. Nati. Acad. Sci. USA. — 1995. — V. 92 (22). — P. 10119–10122.
15. Kollman, C. Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age / C. Kollman // Blood. — 2001. — V. 98 (7). — P. 2043–2051.
16. Albano, M.S. Umbilical cord blood transplantation and cytomegalovirus: posttransplantation infection and donor screening / M.S. Albano [et al.] // Blood. — 2006. — V. 108 (13). — P. 4275–4282.
17. Solves, P. Donor screening for hepatitis B virus infection in a cell and tissue bank / P. Solves [et al.] // Transpl. Infect. Dis. — 2008. — V. 10 (6). — P. 391–395.

---

*Авторский коллектив:*

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

*Хурцилава Отари Гивиевич* — ректор Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова, д.м.н, профессор; тел. (812)-303-50-01, e-mail: elena.biryukova@spbmaro.ru;

*Иволгин Дмитрий Александрович* — младший научный сотрудник НИЛ клеточных технологий Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова, заведующий лабораторией выделения стволовых клеток Покровского банка стволовых клеток; тел. (812)322-05-07, e-mail: stemcellbank@inbox.ru;

*Супильникова Ольга Владимировна* — лаборант-исследователь НИЛ клеточных технологий Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова, заведующий лабораторией ИФА Покровского банка стволовых клеток; тел. (812)322-05-07, e-mail: stemcellbank@inbox.ru;

*Хрупина Александрина Сергеевна* — младший научный сотрудник НИЛ клеточных технологий Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова, биотехнолог Покровского банка стволовых клеток; тел. (812)322-05-07, e-mail: stemcellbank@inbox.ru