

Закрытое акционерное общество «Вектор-Бест»

**СЕГОДНЯ И ЗАВТРА
ГЕНАМПЛИФИКАЦИОННОГО
ТЕСТИРОВАНИЯ ДОНОРСКОЙ КРОВИ
НА ПАТОГЕНЫ**

Сборник информационных материалов

Новосибирск
2005

Сегодня и завтра генамплификационного тестирования донорской крови на патогены: Сборник информационных материалов. Новосибирск: Издательство ЗАО «Вектор-Бест», 2005. 59 с.

В последнее время в хорошо оснащенных лабораториях для тестирования донорской крови на наличие вирусных и бактериальных патогенов все шире используется генодиагностика в минипул-вариантах. В настоящем сборнике представлен перевод недавно опубликованных статей, посвященных NAT-скринированию донорской крови, проблеме бактериальной контаминации компонентов крови, а также краткая информация о Втором ежегодном семинаре «Методы генамплификации в службе крови, медицине и биологии», прошедшем 17–18 ноября 2004 года в Центре крови Минздрава России в Москве.

Для специалистов лабораторной диагностики, работающих над решением проблемы повышения безопасности донорской крови и ее компонентов.

ПРЕДИСЛОВИЕ

В последние годы благодаря внедрению иммуноферментного анализа (ИФА) и методов молекулярной диагностики, основанной на применении технологий нуклеиновых кислот (НАТ) для тестирования донорской крови на наличие вирусов, удалось существенно повысить посттрансфузионную вирусную безопасность. Величина остаточного риска составляет менее одного случая на 2 000 000 донаций. В настоящее время в качестве основного метода скрининга крови на ВИЧ и гепатит С используется ИФА, а для подтверждения полученных при этом положительных результатов – метод иммуноблота. Однако нередко при его использовании в качестве подтверждающего теста наблюдается большой процент неопределенных результатов. Более надежные и достоверные результаты дает применение НАТ-тестирования, как это было убедительно показано в США при контроле 25 600 000 донаций.

Бактериальная контаминация донорских компонентов крови в десятки и сотни раз превышает частоту вирусной контаминации. Бактериальный сепсис является второй по значимости причиной посттрансфузионной смертности (уступает только ошибкам определения групп крови АВ0). Однако в большинстве случаев бактериальные посттрансфузионные инфекции остаются нераспознанными, составляя основную часть так называемых фебрильных негемолитических трансфузионных реакций, или протекают без клинических проявлений на фоне основного заболевания реципиента. Так, анализ образцов фракции мононуклеарных лейкоцитов крови, проведенный с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР), показал, что 18,5% клинически здоровых доноров крови инфицировано *Chlamydia pneumoniae* – микроорганизмом, обуславливающим развитие атеросклероза, бронхиальной астмы, пневмоний и артритов (Yamaguchi H. et. al. Transfusion, 2004, v. 44, № 7, p. 1072–1078).

Во всех известных зубактериях молекулы 16S рРНК имеют консервативные последовательности нуклеотидов, что позволяет использовать их для ПЦР-детекции большинства бактериальных инфекций. В последние годы ведется активная разработка универсального метода для ПЦР-тестирования крови на наличие бактериальной контаминации. Такая задача является одной из целей работы международной рабочей группы ВОЗ по стандартизации методов геномной амплификации (So GAT WHO), а также совместной работы Центра крови МЗ РФ и НИИ средств диагностики ЗАО «Вектор-Бест».

В настоящем сборнике представлен перевод недавно опубликованных статей, посвященных NAT-скринированию донорской крови, проблеме бактериальной контаминации компонентов крови, а также краткая информация проф. Н. А. Федорова о Втором ежегодном семинаре «Методы генамплификации в службе крови, медицине и биологии», прошедшем 17–18 ноября 2004 года в Центре крови Минздрава России в Москве.

Перевод статей сделан проф. Н. А. Федоровым, научная редакция – проф. Е. Б. Жибурта (Центр крови МЗ РФ, Москва) и д. б. н. В. И. Офицерова (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск).

МЕТОДЫ ГЕНАМПЛИФИКАЦИИ В СЛУЖБЕ КРОВИ, МЕДИЦИНЕ И БИОЛОГИИ

Второй ежегодный семинар, Центр крови Минздрава России,
Москва, 17–18 ноября 2004 года

(Краткая информация)

В лекции директора Центра крови Минздрава России профессора Е. Б. Жибурта был обобщен двадцатилетний опыт использования ПЦР в медицине и десятилетний опыт NAT-тестирования донорской крови на вирусные патогены в странах Европы, США, Канады, Японии и Австралии. Утверждение международных стандартов или их национальных аналогов, установивших лимит детекции вирусов в геном/экв./мл, позволило исключить субъективизм в определении результатов NAT-тестирования донорской крови. Во всех развитых странах уже произошло внедрение NAT в трансфузиологию и медицину, а административные препятствия к использованию новых тест-систем и приборов устранены.

Международная рабочая группа ВОЗ по стандартизации технологии геномной амплификации для обеспечения вирусной безопасности донорской крови, ее компонентов и препаратов (SoGAT WHO,

Standardization of qualitative and quantitative nucleic acid test to contribute to the safety of blood, tissues and organs with regard to blood borne pathogens), организованная в 1994 году Национальным институтом биологической стандартизации Англии (NIBSC) и Европейской ассоциацией по фракционированию плазмы (EPFA), стала постоянно действующим международным форумом для всех организаций службы крови: контролирующих лабораторий, производителей наборов, производств по фракционированию и референс-лабораторий при спонсорстве ВОЗ.

Генотестирование донорской крови и ее компонентов на вирусы позволяет получить результаты о вирусной безопасности препаратов до выдачи их в клиники без превышения допустимых сроков хранения на станциях или в отделениях переливания крови. После введения NAT такой интегральный показатель, как остаточный риск вирусной инфекции у реципиентов, получивших трансфузии, во многих странах Европы, США, Канады, Японии и Австралии удалось значительно снизить до одного случая инфекции на несколько миллионов трансфузий.

В двух методических лекциях д. б. н. А. А. Елова акцент был сделан на первой и третьей стадиях NAT-тестирования: подготовке биологической пробы (экстракция ДНК и РНК), а также методах качественной и количественной флуоресцентной детекции продукта генной амплификации. Контроль этих стадий может быть осуществлен только на основе стандартов, вводимых в биологические пробы.

С появлением ПЦР в реальном времени весь процесс NAT-диагностики может быть размещен на одном столе без риска получения ложноположительных результатов. ИФА и NAT – два метода, взаимно дополняющих друг друга. На некоторых стадиях инфекции и при определенных состояниях организма патогены не выявляются методами ИФА, и, напротив, наличие специфических антител не сопровождается прямым обнаружением самих патогенов.

Уже пришло время сказать, что ПЦР – это один из методов лабораторной диагностики и он может и должен быть представлен в любой большой клинико-диагностической лаборатории наряду с ИФА, биохимическими, цитологическими, культуральными и различными физико-химическими методами. Следует подчеркнуть, что ни сертификаты, ни инструкции не дают оснований считать, что чувствительность NAT-тестов будет соответствовать указанной в этих документах, даже при полном исключении ошибок при их

производстве и хранении. Эффективность генной амплификации (ПЦР) практически никогда не достигает 100%. Она зависит от самого материала, содержащего различные ингибиторы; метода экстракции нуклеиновых кислот, температурного режима ПЦР, который может отличаться в разное время и в разных лабораториях; и поэтому лимит детекции патогена может различаться в десятки раз. В связи с этим единственным и объективным критерием оценки каждой NAT-тест-системы является результат, полученный при тестировании внешнего стандарта с известной концентрацией в геном/экв./мл, калиброванным по международному стандарту. При наличии таких стандартов in-house NAT-тест-системы (т. е. тесты, изготовленные непосредственно в лаборатории) стали использоваться во многих странах мира наравне с коммерческими.

В лекции профессора Н. А. Федорова были приведены данные по риску бактериальных инфекций у реципиентов и частоте бактериальной контаминации компонентов донорской крови, которая в десятки и сотни раз превышает частоту вирусной контаминации, но донорская кровь в обязательном порядке тестируется только на сифилис. В США получены убедительные данные об отсутствии *Treponema pallidum* в крови серопозитивных на сифилис доноров, за более чем 30-летний период наблюдения не было выявлено ни одного случая посттрансфузионного сифилиса.

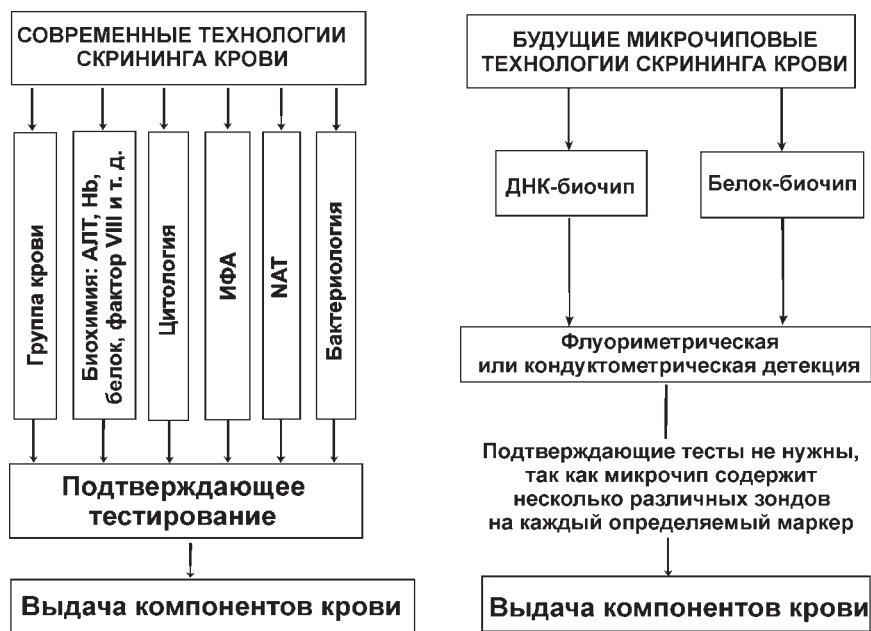
Хотя бактериальный сепсис является второй по значимости причиной посттрансфузионной смертности (уступает только ошибкам определения групп крови АВ0), в большинстве случаев бактериальные посттрансфузионные инфекции остаются нераспознанными, составляя основную часть так называемых фибриллярных негемолитических трансфузионных реакций (FNHR), или протекают без клинических проявлений на фоне основного заболевания реципиента.

Во всех известных эубактериях молекулы 16S рРНК имеют консервативные последовательности нуклеотидов, что позволяет использовать их для ПЦР-детекции большинства бактериальных инфекций. В последние годы ведется активная разработка универсальной ПЦР для тестирования крови на бактериальную контаминацию. Такая задача является одной из целей работы международной рабочей группы ВОЗ по стандартизации методов геномной амплификации (So GAT WHO) и Центра крови Минздрава России совместно с НИИ средств диагностики ЗАО «Вектор-Бест» и ММА им. И. М. Сеченова.

Перспективам применения биологических микрочипов в медицине была посвящена лекция к. б. н. Д. А. Грядунова из Центра биочипов НИИ молекулярной биологии РАН им. В. А. Энгельгардта, имеющего международное признание в области разработки оригинальных технологий и внедрения их в медицинскую практику. Благодаря биочиповой технологии появилась реальная возможность все иммунологические, биохимические, цитологические и бактериологические исследования донорской крови проводить не в отдельных лабораториях на специальной аппаратуре в течение 1–2 суток, а осуществлять их на двух биочипах за 2 ч на все маркеры.

При обсуждении лекции профессор Н. А. Федоров представил схему, из которой видно, что 6 различных лабораторий со специальной аппаратурой и соответствующими специалистами может заменить одна биочип-лаборатория, имеющая одно скринирующее и регистрирующее устройство.

Схема современной и будущей микрочиповой технологии скрининга крови на все маркеры



В программу Второго семинара были включены 4 доклада представителей компаний, два из которых были посвящены отечественным термоциклерам для проведения ПЦР в реальном времени: к. б. н. Д. В. Ребриков («ДНК-Технология», Москва); к. б. н. Я. И. Алексеев («Синтол», Москва, НИИ аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург); В. Е. Колупаев («Био-Рад», США); В. В. Гусев («Сейдж», США).

Все участвующие в семинаре откликнулись на предложение Центра крови провести сравнительные испытания на международных стандартах по количественной детекции вируса гепатита В в реальных образцах плазмы крови. Материалы Второго, так же, как и Первого, совещания представлены на сайте Центра крови www.gen-hem-test.narod.ru.

Литература

1. Федоров Н.А., Елов А.А., Суханов Ю.С., Жибурт Е.Б. Генамплификационное (NAT) тестирование крови и других материалов на патогены и мутации. М.: ООО «Полиграфсервис», 2003. 210 с.
2. Федоров Н.А., Черкасов Е.Г., Елов А.А., Жибурт Е.Б. и др. Российско-немецкий научно-методический сборник «NAT-миникул-геноскринирование крови на основе международных стандартов ВОЗ – гарантия вирусной и бактериальной безопасности реципиентов». Москва–Новосибирск–Франкфурт-на Майне, 2003.
3. Вирусная и бактериальная безопасность в Германии и США в постгемное время. Интернет-сайт: www.transfusion.ru / Под ред. Е.Б. Жибурта, 2004.
4. Федоров Н.А. Информационное письмо «Необязательные и обязательные требования к генамплификационному (NAT) тестированию крови и других клинических материалов на вирусные и бактериальные патогены» // Вестник службы крови России. 2003. № 2. С. 33.
5. Федоров Н.А., Черкасов Е.Г., Елов А.А., Жибурт Е.Б. Взаимодействие лабораторий ИФА и ПЦР в службе крови // Трансфузиология. 2003. № 3. С. 102–106.
6. Рейзман П.В. Геномика в трансфузиологии, медицине и биологии // Трансфузиология. 2004. Т. 5. № 1. С. 98–101.
7. Федоров Н.А., Елов А.А. ПЦР: 20 лет в медицине и 10 лет в службе крови // Здоровоохранение и медицинская техника. 2004. № 8 (12). С. 13.
8. NIBSC, www.nibsc.ac.uk
9. VQC Laboratory CLB, www.vqc.nl

NAT-СКРИНИРОВАНИЕ ДОНАЦИЙ КРОВИ И ПЛАЗМЫ В США: ЭВОЛЮЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ И РЕГУЛИРУЮЩЕЙ ПОЛИТИКИ

E. Tabor, J. C. Epstein

Office of Blood Research and Review, Food and Drug Administration,
Rockville, Maryland, USA

*(NAT screening of blood and plasma donations: evolution of technology
and regulatory policy. Transfusion 2002, v. 42, p. 1230–1236)*

Появившиеся методы NAT незамедлительно стали использоваться в лабораториях для обнаружения HCV и HIV-1 в крови и ее компонентах. Задачей FDA США была выработка регулирующей политики в небывалых прежде условиях: появляющиеся с беспрецедентной быстротой новые технологии тестирования развивались, совершенствовались и внедрялись в практику. В это время почти все донации крови и плазмы тестировались с помощью методов, еще только проходящих клинические испытания. Такой темп развития и внедрения NAT-скринирования крови и ее компонентов сохраняется и в настоящее время, когда NAT начинает использоваться для обнаружения других вирусов, а также совершенствуются уже применяемые методы NAT-скринирования с целью увеличения их чувствительности и скорости выявления различных патогенов.

Несколько лет назад стало ясно, что повышение чувствительности обнаружения ВГС и ВИЧ-1 с помощью методов NAT может обеспечить более высокий уровень безопасности национальных запасов крови и плазмы и что было бы желательно их широкое распространение в кратчайшие сроки, даже если анализы до соответствующего лицензирования будут использоваться как исследовательские. Такой подход к тестированию крови в США в конце 1990-х годов был обусловлен ожиданием того, что европейские регулирующие службы сделают обязательным NAT-скринирование плазмы на ВГС; а также тем, что в европейские страны осуществлялся экспорт больших количеств американской плазмы. Наконец, с 1 июля 1999 года NAT-скринирование на ВГС стало обязательным в Европе для всей плазмы крови, используемой для фракционирования.

Собранная в США кровь и плазма проходит скрининг на антитела и антигены ВГС, ВИЧ-1 и ВГВ с применением высокочувствительных методов ИФА. Такие тесты использовались в течение многих лет еще до появления NAT, и, в целом, их применение обеспечивало высокий уровень безопасности. Тем не менее в ряде

случаев при проведении ИФА инфицированные донации давали ложноотрицательный результат (Препараты плазмы, однако, подвергались обработке, инактивирующей при ее правильном проведении эти вирусы [1]).

Развитие концепции «минипулов» сделало NAT-тестирование доступным для широкого применения: для цельной крови в такие минипулы объединяли от 16 до 24 донаций, а плазмы – от 512 до 1 200 донаций. Использование минипулов и последующей идентификации инфицированного образца в минипуле с положительным результатом NAT-теста с помощью разработанного алгоритма сделали трудоемкую процедуру NAT-скринирования прежде всего доступной по цене.

Методом NAT может быть выявлено и исключено из трансфузионного использования большинство инфицированных донаций. В настоящее время NAT-скринирование в минипулах позволяет выявлять 5–6 копий вирусного генома в 1 мл пула, это равнозначно 80–7 200 копий вируса в 1 мл донорской крови или плазмы [2]. Большая часть инфицированной крови поступает от доноров в «период серологического окна», когда у инфицированного человека еще нет маркеров, детектируемых в плазме крови с помощью иммунологических методов. NAT-скрининг может идентифицировать не только большинство из зараженных доноров, но и позволяет выявить наличие вирусов у лиц с инфекцией, протекающей нетипично. Например, NAT может обнаружить РНК вируса гепатита С в хранимых образцах анти-НСV-негативных, NAT-позитивных доноров, которые ранее передавали ВГС реципиентам в течение длительного периода времени, что характеризует этих доноров как нетипичных носителей ВГС [3]. Аналогичным образом NAT могут обнаруживать РНК ВИЧ-1 в хранимых образцах от лиц, негативных по антителам к ВИЧ и антигену p24, которые ранее передавали ВИЧ-1 [1].

С 1997 года идет дискуссия между FDA и представителями организаций, занимающихся фракционированием плазмы, о развитии NAT-скрининга для обнаружения ВИЧ-1 и ВГС. Риск передачи данных вирусов через донации плазмы может быть устранен в ходе правильно проведенных процессов инактивации, предусмотренных технологией ее переработки [1]. Тем не менее считается, что применение NAT-скрининга повышает вирусную безопасность плазмы, поскольку снижается вирусная нагрузка производственных пулов, что способствует эффективности проведения процедур инактивации вируса. Хотя первоначальная дискуссия касалась

плазмы крови, предназначенной для фракционирования, NAT может дать реальное преимущество также и при использовании для скрининга цельной крови. Это обусловлено тем, что безопасные и эффективные методы инактивации вирусов в компонентах крови, предназначенных для трансфузий, пока еще не разработаны. NAT-скрининг донаций цельной крови в манипулах может быть проведен с использованием соответствующих алгоритмов.

В результате соглашения FDA и организаций, занимающихся фракционированием и тестированием крови, было принято решение о применении NAT-скрининга для плазмы и цельной крови в манипулах на основе временных разрешений, пока ведутся широкие клинические и лабораторные испытания этих методов. Эти регулируемые исключения из правил получили официальное название «исследовательское применение новых препаратов» (investigational new drug applications, или IND). Для получения разрешения на применение в клинической практике нелицензированного скринингового тестирования крови исследователи или компании подавали соответствующие документы FDA на получение IND. На рассмотрение FDA направлялись данные по характеристике теста, планируемого для применения, детальный план предстоящей работы и проводимых исследований. После этого клинические испытания и применение NAT в лабораториях проводилось под контролем FDA. Полученные при этом результаты могли стать основой для выдачи FDA биологической лицензии на использование теста (biologics license application – BLA), а также разрешения на его коммерческое применение. Первые BLA на манипул-NAT-анализ ВГС и ВИЧ-1 в донациях плазмы и цельной крови были получены в США в 2001 и 2002 годах соответственно (см. далее).

Получение BLA на проведение манипул-NAT-тестирования для обнаружения ВГС и ВИЧ-1 также включало разрешение на применение NAT для анализа индивидуальных донаций цельной крови (единичное NAT-тестирование). Однако применение этого метода в массовом скрининге было весьма ограниченным из-за его недостаточной автоматизации. В настоящее время продолжают разрабатываться системы для проведения единичного NAT-тестирования ВГС, ВГВ и ВИЧ-1. Такие тесты принципиально должны быть более чувствительны, чем манипул-NAT, однако соотношение показателей их чувствительности будет изменяться в зависимости от их дальнейшего совершенствования, при этом для разных вирусов оно может отличаться.

Относительную чувствительность тестов можно оценить в центрах тестирования при сравнительном исследовании образцов реальной крови и плазмы. Однако чувствительный, специфичный и доступный скрининг с использованием единичных NAT-тестов в ближайшие несколько лет вряд ли будет широко доступен.

Применение NAT для ВГС и ВИЧ-1

Лицензия на систему NAT для скринирования плазмы крови на ВГС и ВИЧ-1 в минипулах по 512 донаций была одобрена FDA 18 сентября 2001 года. Эта лицензия была выдана Национальному генетическому институту (Лос-Анжелес, Калифорния), который является большим национальным коммерческим аналитическим учреждением. Одновременно использование этой же NAT-системы было закреплено в дополнении к лицензии продукта за одним из основных предприятий по фракционированию плазмы – Alpha Therapeutic Corporation (Лос-Анжелес, Калифорния). В это время три других предприятия, фракционирующие плазму, продолжали проводить ее NAT-скрининг на ВГС и ВИЧ-1 на основе условий IND. Однако 4 декабря 2001 года FDA поместила на своем веб-сайте проект нормативного документа (опубликованного как 67 FR4719 31 января 2002 года), который устанавливает, что все сборщики плазмы должны представить на рассмотрение FDA поправки к лицензиям на использование лицензированного NAT на ВГС и ВИЧ-1 в течение 6 месяцев после публикации принятого нормативного документа (который пока не принят). В настоящее время все основные учреждения, занимающиеся фракционированием плазмы, разрабатывают стратегии по использованию для ее скринирования лицензированных NAT-систем.

В США проводится NAT-скрининг почти всех донаций цельной крови. Лицензия на NAT-систему для скринирования цельной крови на ВГС и ВИЧ-1 в минипулах по 16 донаций была одобрена FDA 27 февраля 2002 года. Лицензия была выдана GenProbe Inc. (Сан-Диего, Калифорния) – производителю тест-систем, разработавшему метод тестирования при поддержке National Heart Lung and Blood Institute, National Institute of Health (Бетезда, Мэрилэнд). В отличие от лицензий NAT для анализа плазмы, которая выдается лаборатории, проводящей анализ, лицензия по NAT-скринингу цельной крови распространяется на тест-набор, который может быть использован банками крови во всей стране. Предполагается, что более половины заготовителей крови в США получит такие ли-

цензии к июню 2002 года. FDA 13 марта 2002 года поместила на своем веб-сайте проект нормативного документа (опубликованного как 67 FR17077 9 апреля 2002 года), который утверждал, что все заготовители крови должны проводить ее лицензированное NAT-тестирование на ВГС и ВИЧ-1 в течение 6 месяцев после публикации принятого нормативного документа (который пока не принят).

NAT-скрининг на ВГС

NAT-скрининг на ВГС развивался быстрее, чем скрининг на другие вирусы, так как ВГС-инфекция имеет продолжительный серонегативный период (70–80 дней) [4], когда вирус может находиться в крови в высоких концентрациях и остаточный риск его передачи с плазмой значителен [1]. Эти же факторы, как можно было ожидать, обеспечивают эффективное обнаружение ВГС в минипулах. Хотя процесс переработки плазмы включает специальные процедуры по удалению и инактивации вирусов, которые при правильном их исполнении устраняют риск передачи ВГС, NAT-скрининг рассматривается как дополнительное средство обеспечения безопасности. В США такой скрининг стал рутинным тестом к концу 1998 года, а к концу 1999 года он применялся для более 99% заготавливаемой плазмы.

NAT-скрининг цельной крови на ВГС на основе IND стал широко распространенным в США к концу 1999 года, а к середине 2000 года применялся уже для 99% заготавливаемой крови. Его использование рационально для компонентов крови, поскольку срок хранения до выдачи составляет для эритроконцентрата 42 дня, а для тромбоконцентрата – 5 дней. NAT-скрининг на ВГС не применяется только в небольших банках крови больниц, где собирается не более 1% заготавливаемой в США крови. Однако и эти банки крови планируют в ближайшем будущем проводить миниул-NAT-тестирование ВГС с использованием лицензированных тестов.

Принятый FDA международный стандарт ВОЗ РНК ВГС используется как контрольная панель для установления минимального уровня чувствительности при всех NAT-анализах, включая скринирование минипулов независимо от их размеров. Точная величина требуемого уровня чувствительности в МЕ еще не установлена, но она примерно соответствует 100 вирусным копиям на 1 мл минипула (В последние годы ВОЗ выработала стандарт, по которому результаты NAT-анализов для ВГС, ВГВ и ВИЧ должны представляться в МЕ/мл, но в данной публикации, как и в ориги-

нальных работах по NAT, используется число вирусных копий на 1 мл. Коэффициент пересчета этой величины в МЕ варьирует между лабораториями в пределах от 0,6 до 8 копий = 1 МЕ и зависит от определяемого вируса и используемого метода – *Примечание переводчика*). Минимальная чувствительность для детекции ВГС в плазме индивидуального донора составляет в некоторых странах Европы 5 000 МЕ/мл и является нынешним лицензионным критерием для NAT-систем в США.

Консультативный комитет FDA по продуктам крови [5] рекомендовал после лицензирования соответствующих тест-систем использовать результаты NAT-детекции ВГС для возвращения в группу доноров тех лиц, которые были отведены по сомнительному результату RIBA 3.0 теста на анти-ВГС. Порядок, которого следует придерживаться при возвращении таких доноров, обсуждался на собрании консультативного комитета, в настоящее время FDA разрабатывает соответствующий нормативный документ.

NAT-скрининг на ВИЧ-1

Развитие и внедрение NAT для обнаружения ВИЧ-1 проходило параллельно с аналогичным процессом NAT-скрининга ВГС (Развитие NAT для обнаружения ВИЧ-2 находится на стадии разработки, но риск получения ВИЧ-2 при трансфузии в США очень низок. Данные о распространении ВИЧ-2 в США отсутствуют, но известно, что при серологическом обследовании 26 миллионов донаций в период 1987–1991 годов не было выявлено ни одного донора, инфицированного этим вирусом [6]). К концу 1999 года NAT-скрининг на ВИЧ-1 в США проводилось более чем для 99% донаций плазмы, аналогичный показатель для цельной крови был достигнут к середине 2000 года. Результаты скринингирования донаций крови на ВИЧ-1 становятся известны до выдачи тромбоконцентратов. Как и в случае ВГС, скрининг на ВИЧ-1 не проводится только в нескольких небольших банках крови при больницах, но и там использование лицензированных тестов с этой целью будет организовано в ближайшем будущем.

Международный стандарт ВОЗ для ВИЧ-1 был разработан на основе плазмы, предоставленной FDA, которая создала также и свою собственную тест-панель. Как и для ВГС, минимальный уровень чувствительности NAT-обнаружения ВИЧ-1 в МЕ еще не установлен, но примерно соответствует 100 вирусным копиям в 1 мл NAT-минипула. Минимальная чувствительность для обнаружения

ВИЧ-1 в индивидуальной донации была принята, по крайней мере в одной европейской стране, равной 5 000 МЕ/мл и является нынешним лицензионным критерием для тест-систем в США. Руководство для применения NAT-тестирования на ВИЧ-1 разработано FDA одновременно с руководством по NAT-скринингу ВГС. Консультативный комитет FDA по продуктам крови рекомендовал после лицензирования соответствующих тест-систем использовать результаты NAT-детекции ВИЧ-1 для возвращения в строй доноров, отведенных по сомнительному результату анализа Western blot [5]. Как и в случае ВГС, FDA готовит для этой цели соответствующий нормативный документ.

Внедрение NAT-скрининга для выявления ВИЧ-1 позволяет отменить скрининговый тест по определению его антигена p24, рекомендованный как временная мера в 1996 году, данные в поддержку такой отмены будут рассмотрены FDA. На последнем семинаре FDA по применению NAT было заявлено, что с 1996 года тест на антиген p24 выявил как инфицированные только 6 донаций в Американском Красном Кресте и 3 донации в других центрах крови США (все они были негативны в отношении антител к ВИЧ-1) [3]. Это соответствует менее чем одной на 6 миллионов протестированных донаций. По данным, представленным на этом семинаре, скрининг ВИЧ-1 в минипулах более чувствителен, чем тестирование антигена p24 в индивидуальных донациях; не было ни одной донации, которая была бы негативна по ВИЧ-антителам, позитивна по антигену p24 и не выявлялась с помощью NAT-тестирования. NAT-анализ ВИЧ-1 обнаруживает все образцы, позитивные по p24 в минипуле, состоящем из 512 единиц плазмы. Тестирование в минипулах, содержащих 128 или 16 образцов плазмы, позволяет выявить наличие ВИЧ-1 в p24-негативных донациях, что нельзя сделать без применения NAT [3]. Эти данные показывают, что лицензированный NAT-скрининг мог бы в будущем заменить скрининг по p24 как для плазмы, так и для крови.

В настоящее время FDA разрешает применять NAT вместо скрининга по антигену p24 каждому производителю, который представит данные о том, что используемая NAT-система обеспечивает равную или более высокую чувствительность, чем тест на p24. Иначе говоря, рекомендация FDA 1996 года по скринингу на антиген p24 может быть отозвана, если это условие выполняется всеми лицензированными NAT-тестами. Обе нынешние лицензированные NAT-системы на ВИЧ-1 обеспечивают равную или более высокую чувствитель-

ность по сравнению с тестом на антиген р24, и этот факт подтвержден дополнительным сертификатом FDA. Учреждения службы крови и плазмы, использующие такие NAT-системы, могут внести в свои лицензии поправки, предусматривающие отмену тестирования р24. Такая поправка была принята для одного из фракционирующих плазму предприятий 18 сентября 2001 года, после чего на нем был прекращен скрининг донаций на антиген р24 ВИЧ-1 [7].

Результаты минипул-NAT-скрининга на ВГС и ВИЧ-1

Минипул-NAT-скринирование плазмы на ВГС и ВИЧ-1 уменьшило число остаточных инфекций, передаваемых при трансфузии (табл. 1). Было подсчитано, что до введения NAT-скринирования распространенность остаточного ВГС в плазме составляла 30–36 инфицированных донаций на миллион [8], а в цельной крови – 10 инфицированных донаций на миллион [9]. После введения NAT этот показатель для цельной крови снизился с 0,86 до 3,2 единиц на миллион (Jackson B.R., Bush M.P., Stramer S.L. et al., направлено в печать) [4]. Для плазмы аналогичные данные не сообщались. До введения NAT остаточное распространение ВИЧ-1 после скрининга на антитела и антигены составляло для плазмы примерно 1,5 донаций на миллион [8], для крови – 2 донации на миллион [9]. После введения NAT аналогичные показатели для цельной крови оцениваются в интервале от 0,73 до 1,4 донаций на миллион [4], для плазмы аналогичные оценки не публиковались.

Таблица 1

Остаточный риск (число инфицированных донаций на миллион) трансфузионной передачи ВГС, ВИЧ-1 и ВГВ после скринирования крови или плазмы

Вирус	Остаточный риск			
	До введения NAT		После введения NAT	
	плазма	цельная кровь	плазма	цельная кровь
ВГС	33–36 [8]	10 [9]	не определялось	1,6–3,2 [4]
ВИЧ-1	1–5 [8]	2 [9]	не определялось	1,3–1,4 [4]
ВГВ	19–256 [2]	6,3–15 [4]	не определялось	6,7*

* *Примечание.*

Jackson B.R., Bush M.P., Stramer S.L. et al., направлено в печать

НАТ-скринирование на ВГВ

С 2000 года минипул-скринирование на ВГВ на основе IND проводится почти для всей собранной в США плазмы, что считается необходимым в связи с тем, что регулирующие органы других стран скоро введут этот метод в качестве обязательного контроля плазмы. Установлено, что после скрининга на наличие HbsAg инфицировано 54 донации из миллиона [8]. Остаточная инфицированность плазмы ВГВ должна полностью устраняться при правильном проведении ее соответствующей обработки в процессе изготовления препаратов плазмы. Снижение содержания ВГВ в производственном пуле повышает эффективность инактивации вируса. Даже при ошибках персонала при проведении процесса инактивации небольшое количество вируса может быть удалено в процессе фракционирования плазмы или за счет связывания антителами к ВГВ, присутствующими в производственном пуле.

Как изначально предполагалось, НАТ-скринирование ВГВ в минипулах может оказаться недостаточно эффективным из-за низких концентраций вируса в плазме в период серонегативного окна (1–2 400 геном/экв./мл [4]), что обусловлено более продолжительным временем удвоения ВГВ, составляющим 2,8 дня, по сравнению с 17 ч для ВГС и 22 ч для ВИЧ-1 [4]. Однако первые результаты НАТ-скринирования минипулов плазмы на ВГВ показали, что после контроля на HbsAg лицензированными тестами количество инфицированных этим вирусом донаций выше, чем ожидалось. Причины этого до сих пор неясны. Одна из компаний, проводивших такой скрининг, сообщила об обнаружении ДНК ВГВ в 11 донациях из 43 000, другая – в 56 из 3 000 000 [2]. Иллюстрацией эффективности применения нового высокочувствительного анализа, каким является НАТ, может служить недавно проведенное тестирование, результаты ретроспективных исследований которого привели к запрету применения 236 донаций.

В отличие от плазмы минипул-НАТ на ВГВ для цельной крови в США до сих пор не применяется. Без минипул-НАТ-скрининга до 15 донаций крови из миллиона содержат ВГВ, который не детектируется скринированием на HbsAg и анти-Hbc (Jackson B.R., Bush M.P., Stramer S.L. et al., направлено в печать) [4]. Введение НАТ-минипул-теста на ВГВ снизило бы остаточный риск передачи этого вируса только до 6,7 донаций на миллион. Такой низкий уровень НАТ-минипул детекции ВГВ в цельной крови и является причиной того, что НАТ-скринирование до сих пор не введено в США.

Введение в США NAT-скринирования цельной крови на ВГВ затягивается также потому, что ожидается появление новых тестов для обнаружения HBsAg, которые будут иметь сравнимую с мини-пул-NAT или более высокую чувствительность обнаружения ВГВ. Такие ИФА-тесты с повышенной чувствительностью уже проходят лицензирование в США [10–12]. Более подробная информация представлена в документе, помещенном на веб-сайте FDA 10 апреля 2002 года (67 FR17704, April 11, 2002). Данные тесты способны обнаруживать HBsAg в донациях, содержащих 400 МЕ и ниже ДНК ВГВ [11]. Для аналогичной по чувствительности детекции ВГВ с помощью NAT необходима чувствительность обнаружения ДНК ВГВ в концентрации менее 20 МЕ/мл и использование небольших минипулов, содержащих не более 20 образцов. В настоящее время оба метода продолжают совершенствоваться и минипул-NAT имеет лишь минимальное преимущество по сравнению с новыми HBsAg-ИФА-тестами [10, 12]. Однако NAT индивидуальных образцов обеспечивает обнаружение ВГВ на 25–36 дней раньше и с более высокой чувствительностью, чем эти ИФА-тесты. К сожалению, NAT-анализ индивидуальных образцов для обнаружения как ВГВ, так и любого другого вируса, пока еще малодоступен для практического применения.

FDA намерена в ближайшее время подготовить документ, по которому вопрос о преимуществе того или иного метода решается с помощью панели стандартов. С помощью такого подхода, в частности, было показано, что чувствительность новых HBsAg-ИФА-тестов составляет 0,09–0,18 нг/мл, что примерно равнозначно обнаружению 88–359 МЕ/мл ДНК ВГВ [11, 12]. Для оценки чувствительности NAT-анализа ВГВ разработан международный стандарт ВОЗ [13]. Кроме того, с этой же целью в настоящее время ведется модификация панели, предназначенной для контроля ИФА-тестов FDA «HbsAg Lot Release Panel».

Как было отмечено на последнем семинаре FDA [3], минипул-NAT-анализ ВГВ не дает оснований для отмены недавно рекомендованного скрининга донаций цельной крови на антитела к core-белку вируса (анти-HBc) или замены этими тестами ИФА-тестов по определению HBsAg в плазме или цельной крови. Опубликовано много данных о том, что имеются немногочисленные донации, которые негативны по HBsAg, позитивны по анти-HBc и содержат ДНК ВГВ в очень низких концентрациях – 100 вирусных копий или менее на 1 мл. Такие донации предположительно инфициро-

ваны ВГВ, но это не выявляется с помощью миниупл-НАТ-тестирования, особенно при применении больших миниуплов. Следовательно, только развитие очень чувствительного НАТ-анализа индивидуальных донаций могло бы позволить отказаться от скрининга донаций цельной крови по анти-НВс. Отмена тестирования на наличие НВsAg в настоящее время представляется небезопасной с учетом нынешнего уровня чувствительности миниупл-НАТ-скринирования; данных о том, что НВsAg-позитивные НАТ-негативные донации оказывались все же НАТ-позитивными при использовании для анализа увеличенного объема плазмы [3]; а также с учетом длительной истории эффективного скринирования донаций на наличие НВsAg. Дальнейшее рассмотрение этого вопроса должно быть основано на данных анализа широкого круга образцов с использованием чувствительных методов обнаружения ДНК ВГВ, обеспечивающих количественное определение величины вирусной нагрузки.

НАТ-скринирование донорской крови обеспечивает как увеличение вирусной безопасности реципиентов, так и медицинскую и социальную безопасность донора и населения. Идентификация донаций, реактивных на вирусы в миниуплах, гарантирует не только более высокое качество компонентов и препаратов крови, но и позволяет выявить и отвести от последующих донаций доноров-вирусоносителей, провести с ними соответствующую профилактическую работу с целью предупреждения тесных контактов со здоровыми людьми. В некоторых случаях удастся выявить и отбраковать также и предыдущие донации этих доноров, а также провести ретроспективную (look-back) идентификацию тех реципиентов, которые уже получили компоненты крови от них.

НАТ-тестирование плазмы на парвовирус В19 и ВГА

Оба этих вируса являются безоболочечными и термостабильными, поэтому в отличие от ВГС, ВГВ и ВИЧ в процессе производства препараты плазмы полностью не инактивируются.

FDA дало разрешение на НАТ-тестирование этих вирусов в плазме крови, поскольку выявление и регистрация инфицированных доноров в большинстве случаев происходит значительно позже их заражения В19 и ВГА. Однако НАТ-тестирование этих вирусов во всех трансфузионных донациях практически бесполезно, поскольку парвовирус В19 широко распространен среди здорового населения, а ВГА имеет короткий, приблизительно двухнедельный, инкубационный период, после которого появляются характерные

клинические признаки заболевания. FDA вводит NAT-тестирование на В19 и ВГА только с целью контроля технологии производства, а не для идентификации инфицированных донаций.

Ежегодно эпидемия парвовируса В19 поражает 1,5% населения США [14]. К сожалению, многие способы инактивации вирусов для парвовируса В19 малоэффективны, поскольку он не имеет оболочки. Проведение NAT-детекции парвовируса В19 в плазме начато в инициативном порядке с целью снижения его концентрации в производственных пулах плазмы до уровня ниже 10 000 МЕ/мл [3]. Такое содержание парвовируса В19 в производственном пуле нейтрализуется антителами, содержащимися в нем, поэтому препараты плазмы, включая часто вводимый беременным женщинам Rho(D)-иммуноглобулин, считают инфекционно безопасными. NAT-тестирование на парвовирус В19 с чувствительностью 105–107 копий вируса в 1 мл позволяет выявить одну положительную из 1 000–5 000 донаций плазмы [3].

Метод NAT-минибулов для обнаружения ВГА используется некоторыми производителями препаратов плазмы [3]. Число ВГА-контаминированных донаций, обнаруженных с помощью этого метода, составляет 1/400 000–1/1 000 000 донаций плазмы [3].

NAT-тестирование парвовируса В19 и ВГА в донациях цельной крови

Несмотря на то, что в ближайшем будущем донации цельной крови будут тестироваться методом NAT-минибулов на парвовирус В19 и ВГА, официальной регламентации для такого контроля в США пока еще нет. Центр крови США и Американский Красный Крест заявили, что они планируют ввести такое тестирование в ближайшее время [3]. Ожидается, что парвовирус В19 будет обнаруживаться в высоких титрах в одной донации цельной крови из 20 000–50 000 до их выдачи в клиники [14]. До выдачи FDA официальной лицензии такое диагностическое NAT-тестирование может проводиться на основе специального временного разрешения FDA.

FDA не считает необходимым вводить минибул-NAT-тестирование ВГА для донаций цельной крови, поскольку клинически значимые случаи трансфузионной передачи этого вируса наблюдаются весьма редко. Ожидается, что NAT-минибул ВГА-скринирование цельной крови будет обнаруживать одну положительную донацию на миллион [3]. С учетом того, что только около 0,2% ВГА-инфицированных доноров может быть распространителями инфекции [15] и что примерно 40% реципиентов имеет иммунитет к ВГА [16],

NAT-тестирование будет выявлять одну инфекционно опасную донацию в 100 лет.

Тем не менее минипул-NAT-тестирование на ВГА индивидуальных донаций цельной крови, по мнению FDA, позволит выявлять среди них контаминированные ВГА донации до их реализации, что предупредит контакт таких доноров с окружающими людьми.

Будущее NAT

Внедрение тестирования на биочипах

Использование многоточечных биочипов позволит одновременно идентифицировать большое число генов в одной пробе. Рутинное использование такой технологии станет возможным через 5–10 лет [3].

NAT-скринирование крови в единичных образцах

Сравнение NAT-минипул-тестирования ВГС и NAT-тестирования в единичных образцах на одном из предприятий США позволило FDA одобрить дальнейшее распространение последнего метода. В армии и флоте США NAT-тестирование крови в единичных образцах проводится уже два года, его дальнейшее распространение сдерживает недостаточная автоматизация теста [3].

NAT в скринировании цельной крови и совершенствование методов инактивации патогенов

Методы инактивации патогенов постоянно совершенствуются, однако это не позволяет отменить NAT-скринирование плазмы на ВГС и ВИЧ-1. Инактивация патогенов в компонентах донорской крови касается только безопасности реципиента, а NAT-скринирование позволяет не только выявлять доноров-вирусоносителей и решать их судьбу, но и осуществлять профилактику инфицирования здоровых людей.

Литература

1. Tabor E. The epidemiology of virus transmission by plasma derivatives: clinical studies verifying the lack of transmission of hepatitis B and C viruses and HIV type 1. – Transfusion 1999, 39:1160–8.
2. Tabor E, Yu MY, Hewlett I, Epstein IS. Summary of a workshop on the implementation of NAT to screen donors of blood and plasma for viruses. – Transfusion 2000; 40:1273–5.
3. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Application of nucleic acids testing to blood borne pathogens and emer-

- ging technologies. OBRR/CBER/FDA workshop; 2001 Dec 4–5; Bethesda, MD. Transcript available at: URL: <http://www.fda.gov/cber/minutes/workshop-min.htm>.
4. Busch MP. Closing the windows on viral transmission by blood transfusion. In: Stramer SL, editor. Blood safety in the new millenium. Bethesda, MD: American Assosiation of Blood Banks; 2001:33–54.
 5. Blood Products Advisory Committee. 69th meeting; open session. FDA advisory committee meeting; 2001 Jun 14–15; Gaithersburg, MD. Transcript available at: URL: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/acmenu.htm>.
 6. O'Brien TR, George TR, Epstein ES et al. Testing for antibodies to human immunodeficiency virus type 2 in the United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1992; 41: 1–9.
 7. Blood Products Advisory Committee. 70th meeting; 2001 Dec 13–14; Silver Spring, MD. Transcript available at: URL: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/acmenu.htm>.
 8. General Accounting Office (GAO). Blood plasma safety: plasma product risks are low if good manufacturing practices are followed. Washington, DC: GAO; 1998:21.
 9. Schreiber GB, Busch MP, Kleinmann SH, Korelitz JJ. The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study *N Engl J Med* 1996; 334: 1685–90.
 10. Stramer SL, Brodsky JP, Preston SB, et al. Comparative sensitivity of HbsAg and HBV NAT. *Transfusion* 2001; 41: 8S.
 11. Biswas R, Hsia CC, Busch M, et al. Early detection of hepatitis B virus infection: comparative sensitivity of HBV DNA detection by PCR and HbsAg detection by a new generation of assays. *Hepatology* 2001; 34: 610A.
 12. Biswas R, Busch M, Hsia C, et al. Comparative sensitivity of HBV NAT and. HbsAg donor testing. *Transfusion* 2001; 41: 8S.
 13. Saldanha J, Gerlich W, Lelie N, et al. An international collaborative study to establish a World Health Organization international standard foe hepatitis B virus DNA nucleic acids amplification techniques. *Vox Sang* 2001; 80: 63-71.
 14. Brown KE, Young NS, Alving BM, Barbosa LH. Parvovirus B19 implications for transfusion medicine. Summary of a workshop. *Transfusion* 2001; 41:130-5.
 15. O'Grady JG, Portmann B, Williams R. Fulminant hepatic failure. In: Schiff L, Schiff ER, editors. *Diseases of liver*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott; 1993: 1077.
 16. Thomas HC. Immunologic aspects of liver disease. In: Schiff L, Schiff ER, editors. *Diseases of liver*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott; 1993: 638.

ВИРУСНАЯ ДИАГНОСТИКА В ПРОЦЕССЕ СКРИНИНГА ДОНОРОВ КРОВИ

S. L. Stramer

American Red Cross, Gaithersburg MD, USA

(Viral diagnostics in the arena of blood donor screening, Vox Sanguinis, 2004, v. 87, Suppl. 2, p. 180–183)

Главная цель Центров переливания крови – эффективное обеспечение медицинских учреждений полноценной и безопасной кровью и ее компонентами. В настоящее время высокий уровень безопасности крови достигнут благодаря внедрению ИФА- и NAT-тестов последних поколений. В США с внедрением NAT-тестирования остаточный риск HIV- и HCV-инфицирования уменьшился приблизительно до 1:2 000 000 донаций [1]. Доноры, инфицированные HIV-1, выявляются с частотой 1:3 100 000, а инфицированные HCV – с частотой 1:270 000 [2]. По данным Американского Красного Креста (ARC), частота ложноположительных результатов NAT-тестирования HIV-1 и HCV во много раз ниже, чем при любом серологическом тестировании доноров (1:40 000).

Помимо безопасности реципиентов NAT-тестирование донорской крови вносит вклад в охрану здоровья населения, поскольку выявление бессимптомных носителей предупреждает распространение инфекций. Выявление инфекции на ранних стадиях, когда она может быть обнаружена только NAT-тестированием, чрезвычайно важно также и в интересах здоровья самих доноров [2].

Подтверждающее тестирование до сих пор основано, главным образом, на методе иммуноблотинга, недостатком которого являются не только ложноположительные или ложноотрицательные результаты, но и так называемые неопределенные результаты, не позволяющие дать необходимые четкие рекомендации донорам [3].

ВИЧ

В системе ARC США с сентября 1999 по июль 2003 года при ИФА-скиринговании 25,6 миллионов донаций крови была выявлена 17 791 проба, сероположительная по отношению к HIV в двух различных ИФА-тестах. С целью подтверждения и сопоставления результатов этих двух анализов 17 090 из них (96,1%) были исследованы в NAT-тесте и иммуноблоте (табл. 1). Как видно из табл. 1, только 4,8% (818) ИФА-позитивных образцов были подтверждены

в иммуноблоте, при этом 759 из них оказались NAT-положительны, что соответствует 89,1% от всех NAT-реактивных донаций. Относительно 59 образцов, положительных в иммуноблоте, но отрицательных в NAT, можно сделать два предположения: 1) уровень вирусемии у них ниже предела чувствительности NAT-анализа, что обуславливает его ложноотрицательные результаты; 2) результаты иммуноблота являются ложноположительными. Косвенные данные могут свидетельствовать о том, что второе предположение верно для 37 доноров из этой группы (59 человек), поскольку частота ложноположительных результатов в подтверждающем иммуноблоте среди доноров Американского Красного Креста составляет 1:692 000 [4]. Остальные 22 образца можно отнести к NAT-ложноотрицательным, у которых уровень вирусемии был ниже предела чувствительности метода (<100–200 копий/мл). Сделанное предположение частично подтверждается анализом численных данных ИФА. Все образцы крови «NAT-ложноотрицательной группы» (22 донора) имели средние или высокие показатели оптической плотности при анализе в ИФА и антитела к трем антигенам в иммуноблоте. Образцы крови «иммуноблот-ложноположительной группы» (37 доноров) имели низкие значения коэффициента серопозитивности в ИФА (отношение величины оптической плотности к величине «cut off») и слабую интенсивность окрашивания полос белков в иммуноблоте.

Таблица 1

Сопоставление результатов NAT- и иммуноблот-анализов на выявление маркеров HIV

Результаты иммуноблот-анализа 17090 донаций повторно ИФА-реактивных на антитела к HIV				
	положительн.	неопределен.	отрицательн.	Всего
NAT-положительные	759 (89,1%)	56*	37**	852
NAT-отрицательные	59 (0,4%)	8 654	7 525	16 238
Всего	818 (4,8%)	8 710	7 562	17 090

Примечание.

* при повторном количественном NAT-тестировании данных образцов только 6 из 56 подтвердили наличие РНК HIV (9 500–800 000 копий/мл)

** при повторном NAT-тестировании ни в одном из 37 образцов не подтвердилось наличие РНК HIV.

Около 50% (8 710) из всего числа доноров, повторно ИФА-реактивных на HIV, дали в иммуноблоте неопределенный результат, и несколько меньшее количество (7 562) – отрицательный результат. NAT-тестирование образцов этих групп проводили дважды для получения достоверных результатов. Результаты первичного анализа представлены в соответствующих графах табл. 1, повторного количественного NAT-анализа – в примечании к табл. В соответствии с результатами повторного анализа только у 6 из 8 710 доноров с неопределенным результатом иммуноблота была обнаружена РНК HIV, а у всех 7 562 доноров с негативным результатом иммуноблота NAT-анализ был отрицательным. Средняя частота обнаружения РНК HIV в этих группах составила 1:4,27 миллиона. Выявленные шесть NAT-положительных доноров имели вирусную нагрузку 95 000–800 000 копий/мл. Таким образом, дополнительное NAT-тестирование проб из этих двух больших групп выявляет менее чем 0,05% истинно инфицированных доноров. Коэффициент серопозитивности в ИФА был равен 15 или выше в 99,6% NAT- и иммуноблот-положительных образцов, и, напротив, его величина была меньше 15 в 98% NAT- и иммуноблот-негативных сывороток.

Из представленных данных следует, что в диагностике ВИЧ-инфекции предпочтительнее полагаться на результаты NAT-тестирования. На практике в лабораториях Американского Красного Креста при анализе донорской крови используется двойное ИФА-тестирование в комбинации с NAT [5]. Такая схема была отработана в квалификационном исследовании, в котором использовали два различных ИФА-метода, имеющих лицензию FDA, в разных комбинациях для первичного и повторного анализа. Из 7 884 образцов, показавших положительные результаты в обеих ИФА-системах (при первичном и повторном скрининге), все были положительны в иммуноблот- и NAT-анализе (317/317). Таким образом, дублирование ИФА в двух разных системах достаточно для достоверного серологического анализа образцов крови и в большинстве случаев позволяет исключить неопределенность результатов, возникающую вследствие использования иммуноблота как подтверждающего теста.

HCV

Тестирование вышеописанной выборки (25,6 миллионов донаций) в системе ARC с сентября 1999 по 30 июня 2003 года) на маркеры HCV выявило 34 656 доноров, повторно-реактивных в ИФА-тестах на антитела к белкам HCV (табл. 2). Около половины из этого чис-

ла (16 502 – 48%) были положительны в RIBA – подтверждающем иммуноблоте на HCV. В эту же группу следует отнести еще 15 проб, показавших в RIBA положительный результат с рекомбинантным антигеном HCV – белком hSOD (см. примеч. к табл. 2), поскольку инструкция производителя ошибочно относит такой результат к неопределенному [6]. Среди RIBA-положительных доноров 80% были NAT-реактивными, однако проведение иммуноблота для NAT-реактивных донаций не требуется, поскольку известно, что 98% из них RIBA-положительны [7]. Наличие RIBA-положительных, не содержащих HCV РНК образцов может быть объяснено аналогично тому, как это сделано в предыдущем разделе для HIV. Эта группа включала доноров с низким уровнем анти-HCV и RIBA-ложноположительным результатом, а также тех доноров, которые выздоровели и избавились от HCV. Повторное NAT-тестирование было произведено для 2 255 из 3 319 RIBA-положительных, но NAT-негативных образцов. Независимо от того, были ли образцы исходно тестированы в минипуле из 16 образцов или индивидуально, 2,1% образцов дали повторно NAT-положительный результат. Половина

Таблица 2

Сопоставление результатов NAT- и иммуноблот-анализов (RIBA) на выявление маркеров HС

Результаты RIBA 34 656 донаций, повторно ИФА-реактивных на антитела к HCV				
	положительн.	неопределен.	отрицательн.	Всего
NAT-реактивных	13 182 (80%) (13 198***)	174* (159***)	50**	13 406
NAT-нереактивных	3 319	5 967	11 963	21 249
Всего	16 502 (48%) (16 517***)	6 141 (6 126***)	12 013	34 656

Примечание.

- * при повторном количественном NAT-тестировании данных образцов только 140 из 174 подтвердили наличие РНК HCV в количестве 100–48 000 000 копий/мл.
- ** при повторном количественном NAT-тестировании только 16 из 50 подтвердили наличие РНК HCV в количестве 100–24 000 000 копий/мл.
- *** 15 образцов следует вычесть из RIBA-неопределенных и суммировать с RIBA-положительными вследствие того, что они показали связывание с hSOD белком в иммуноблоте и титр анти-HCV в повторном ИФА составлял 1:2 310.

из них имела вирусную нагрузку выше 100 копий/мл, а другая – от 1 500 до 34 000 копий/мл, за исключением одного образца, с концентрацией HCV $5,2 \times 10^6$ копий/мл.

RIBA-неопределенные и RIBA-негативные результаты составили 18% (6 141) и 35% (12 013) соответственно. При повторном NAT-тестировании положительный результат был подтвержден для 140 из 174 (80%) образцов, RIBA-неопределенных, но РНК-положительных в первичном анализе; и для 16 из 50 (32%) RIBA-негативных, NAT-положительных образцов; вирусная нагрузка в них составила $100 \leftrightarrow 24-48 \times 10^6$ копий/мл (табл. 2). Повторно реактивные образцы на анти-HCV, 98,9% из которых были RIBA-положительные, имели коэффициент серопозитивности в ИФА равный 3,8 и выше (величина, рекомендованная CDC) [7]. И, наоборот, среди 87,8% NAT-нереактивных RIBA-негативных или RIBA-неопределенных образцов коэффициент серопозитивности имел величину менее 3,8. Следовательно, NAT-результаты дают более точную информацию о наличии у донора активной HCV-инфекции.

HBV

Выявление ДНК HBV методом NAT для рутинного скринирования доноров пока не используется. Применение чувствительной тест-системы на HbsAg в сочетании с анти-HBc тестированием обеспечивает необходимый низкий уровень остаточного риска – 1:205 000 [1]. Работа по дальнейшему уменьшению риска HBV-трансмиссии ведется в направлении повышения чувствительности ИФА и внедрении тест-систем, выявляющих менее 0,1 ng/ml HBsAg [8]. По данным двух исследований в период 1991–1995 и 2001 годов, частота выявления ДНК HBV составила 0,24–0,63% [9], во всех случаях уровень вирусной нагрузки был очень низкий (по данным исследования 2001 года, в 68% случаев она была менее 100 копий/мл). Целесообразно использовать сочетание HBV ДНК-тестирования и ИФА по определению антител к HBscore-Ag (анти-HBc). Анти-HBc, относящиеся к классу IgM, могут быть использованы для ранней диагностики, однако они появляются через неделю и более после инфицирования. В период между инфицированием организма и появлением антител в диагностическом титре, так называемое «серологическое окно», инфекция может быть обнаружена только ПЦР-анализом вирусной ДНК. Аналогичная ситуация с анти HBc-негативным и HBV ДНК-положительным результатом возможна и в случаях наличия у доноров иммунодефицитов различной природы. Опре-

деление антител к HBs-Ag – анти-HBs-скрининг доноров весьма проблематичен, поскольку в некоторых контингентах доля вакцинированных против гепатита В может составлять 30% или более. Использование только анти-HBs-скрининга еще более проблематично в регионах, в которых HBV является эндемичным заболеванием и доля иммунной прослойки населения высока. В этом случае высокий титр анти-HBs и анти-HBc может указывать на перенесенную инфекцию, особенно если результаты HBV ДНК-тестирования негативны. Среди HBsAg-негативных доноров в США частота выявления HBV ДНК составляет 1:269 000 [10], однако в этих исследованиях использовали HbsAg-тест-системы не самой высокой чувствительности.

Вирус Западного Нила (WNV)

В США рутинное скринирование крови на WNV началось в июне 2003 года в связи с регистрацией случаев заражения пациентов в результате трансфузий в 2002 году [11, 12]. При тестировании в 2003 году на WNV было выявлено около 1 000 инфицированных доноров, а, по данным CDC, клинических случаев WNV всего было более 9 100. В течение 2003 года, несмотря на NAT-минибул-скринирование доноров на РНК WNV в пулах из 6–16 донаций, было зарегистрировано 6 случаев заражения WNV в результате трансфузий компонентов крови от протестированных доноров [13–15]. Повторный анализ этих 6 донаций показал, что они имели очень низкую вирусную нагрузку, а кроме того в них отсутствовали IgM к белкам WNV. В соответствии с программой WNV-скринирования NAT-реактивные доноры были проинформированы о результатах тестирования и отведены от донорства до исчезновения вируса и наступления сероконверсии. В случае WNV антитела обладают вируснейтрализующей функцией, и поэтому при их появлении трансфузионная трансмиссия вируса исключается. Серонегативный период длится около 7,5–8,5 дней, далее следует уменьшение концентрации вируса и нарастание количества антител (IgM, а затем IgG) приблизительно в течение 12 дней.

Программа по наблюдению за донорами ARC охватила приблизительно 80% участвующих с целью возвращения их к донорству. Доноры с подтвержденной WNV РНК в 96% имели сероконверсию и элиминацию вируса в среднем через 27 дней. Небольшое число доноров выявляли перемежающуюся вирусемию в течение 1 месяца.

Парвовирус В19 и вирус гепатита А (HAV)

Эти два вируса могут контаминировать препараты иммуноглобулинов, факторы свертывания, альбумин и др. Производители препаратов заявляют, что их безопасность может быть снижена в результате инактивации данных вирусов в исходном производственном пуле. Однако оба вируса не имеют оболочки, поэтому инактивировать их чрезвычайно трудно. По данным ARC, ДНК парвовируса В19 в концентрации более чем 1 миллион копий/мл выявляется с частотой 1:7 000–1:10 000 донаций. Обычно период с высоким уровнем виремии составляет 7–10 дней, низкие уровни (10 000–100 000) могут присутствовать в течение нескольких месяцев [16].

Ситуация с HAV аналогична, за исключением уровня виремии, который составляет 100 000–1 000 000 копий/мл. Однако в ряде случаев у HAV наблюдается более длительная виремия, сохраняющаяся на фоне специфической сероконверсии. В частности, в исследовании, проведенном в CDC (Атланта, США) [17], средняя продолжительность виремии HAV у 13 инфицированных лиц составляла 95 дней (36–391 день). Для передачи сведений этим донорам об их заболевании во время консультаций необходимо более точно определить такие термины, как «высокий уровень вирусной инфекции», «потенциально-трансмиссивные уровни», «сроки освобождения организма от вируса». Выдаваемая справка должна снижать возможность передачи инфекции от клинически здорового донора. Описанная ситуация существенно отличается от той, которая рассмотрена выше в отношении инфекций с высоким уровнем хронизации: HIV-1, HCV и HBV.

Выводы

Несмотря на то, что современные методы диагностики позволяют получать компоненты крови с высоким уровнем безопасности, интерпретация полученных результатов диагностики и проведение консультаций серореактивных доноров в ряде случаев представляют проблему. Тем не менее при правильном применении NAT-скринирования и творческом использовании алгоритмов подтверждающего тестирования можно значительно улучшить точность всего процесса анализа донорской крови. Введение скрининга на новые патогены требует валидации диагностических алгоритмов, а также внимания ко всем аспектам консультационных справок для доноров.

Литература

1. Dodd R.Y., Notari E.P., Stramer S.L.: Current prevalence and incidence of infectious disease markers and estimated window-period risk in the American Red Cross blood donor population. *Transfusion* 2002; 42:975–979
2. Stramer S.L., Kleinman S.H., Strong D.M. et al: Detection of HIV-1 and HCV infections among antibody-negative V5 blood donors by nucleic acid amplification testing. *N Engl J Med* 2004; in press
3. Dodd R.Y., Stramer S.L.: Indeterminate results in blood donor testing: what you don't know can hurt you/ *Trans Med Rev* 2000; 14:151–160
4. Kleinman S., Busch M.P., Hall L. et al: False-positive HIV-1 test results in a low-risk screening setting of voluntary blood donation. *JAMA* 1998; 280:1080–1085
5. Cyrus S., Robertson G., Caglioti S., et al: Evaluation of an alternate HIV confirmatory testing algorithm. *Transfusion* 2002; 43:S131-S040K
6. Tobler L.H., Stramer S.L., Kleinman S. et al: Misclassification of HCV viremic blood donors as indeterminate by RIBA 3.0 because of human superoxide dismutase activity. *Transfusion* 2001; 41:1625–1626
7. Centers for Disease Control and Prevention: Guidelines for Laboratory Testing and Result Reporting of Antibody to Hepatitis C Virus. *MMWR* 2003 52 (RR-3): 1–16
8. Biswas R., Tabor E., Hsia C.C. et al: Comparative sensitivity of HBV NATs and HbsAg assays for detection of acute HBV infection. *Transfusion* 2003; 43:788–798
9. Kleinman S.H., Kohns M., Todd D.S. et al: Frequency of HBV DNA detection in US blood donors testing positive for the presence of anti-HBC: implications for transfusion transmission and donor screening. *Transfusion* 2003; 43:696–704
10. Pietrelli L., Gorlin J., Holland P. et al: A prospective study to evaluate the screening of plasma pools from volunteer blood donation for the presence of HBV DNA
11. Pealer L.N., Martin A.A., Petersen L.R. et al: Transmission of West Nile Virus through blood transfusion in the United States 2002. *N Engl J Med* 2003; 349:1236–1245
12. Dodd R.Y.: Emerging infections, transfusion safety, and epidemiology. *N Engl J Med* 2003; 349:1205–1206
13. Centers for Disease Control and Prevention: Update. Detection West Nile Virus Blood Donations-United State, 2003. *MMWR* 2003; 52:916–919
14. Centers for Disease Control and Prevention: Erratum. Detection West Nile Virus Blood Donations-United State, 2003. *MMWR* 2003; 52:1160

15. Centers for Disease Control and Prevention: Update. West Nile Virus screening of blood donations and transfusion-associated transmission-United State, 2003. MMWR 2004; 53:281–4
16. Young N.S., Brown K.E.: Parovirus B 19. N Engl J Med 2004; 350:586–597
17. Bower W.A., Nainan O.V., Han X., Margolis H.S.: Duration of viremia in hepatitis A infection/ J Infect Dis 2000; 182:12–17

ВОЗМОЖНОСТЬ, ЭФФЕКТИВНОСТЬ И СЕБЕСТОИМОСТЬ NAT-ТЕСТИРОВАНИЯ В ГЕРМАНИИ

E. Seifried, W. K. Roth

Institute of Transfusion Medicine and Immunohaematology, Red Cross
Blood Donor Service, Frankfurt, Germany

*(Feasibility, Efficacy and Economy of NAT Testing in Germany. Plenary
lecture on VIII European congress of ISBT, Istanbul, 2003, July 5–9)*

Цель работы

Настоящее исследование было инициировано Исследовательским Советом службы крови Красного Креста Германии с целью оценки перспективности технологии амплификации нуклеиновых кислот (NAT) для предотвращения остаточного риска инфицирования при гемотрансфузиях. NAT-скринирование донорской крови проводили в 12 центрах службы крови Красного Креста Германии на наличие вирусов гепатита С (HCV), гепатита В (HBV) и иммунодефицита человека 1 (HIV-1).

Введение

Остаточный риск трансфузии вирусной инфекции существует из-за наличия сероконверсионного окна, во время которого патоген уже находится в организме донора, а специфический иммунный ответ организма еще не проявляется. В Центре службы крови Красного Креста Германии в 1997 году была сделана попытка уменьшить остаточный риск трансфузионных вирусных инфекций путем рутинного скринирования каждой порции донорской крови высокочувствительным NAT-тестированием на наличие HCV, HBV и HIV-1. В то время метод NAT-скринирования находился на начальной стадии разработки, мешали технические проблемы, длительность анализа, которая не позволяла получить результат до окончания срока реализации компонентов крови, плохая воспроизводимость результатов вследствие использования

разных технологий выделения и анализа нуклеиновых кислот в образцах донорской крови [1–4].

Для получения объективной информации Научный Совет Красного Креста Германии инициировал многоцентровое NAT-тестирование донорской крови, задача которого состояла в отработке единой стратегии анализа, оценки частоты получения NAT-положительных результатов, эффективности NAT-тестирования и его стоимости в расчете на одну донацию крови.

Методы

Работу проводили на базе 12 Центров службы крови Красного Креста Германии. Во все Центры были разосланы специально подготовленные анкеты, содержащие вопросы по характеристике лабораторий, выполнявших NAT-тестирование донорской крови; методов выделения и анализа нуклеиновых кислот HCV, HBV и HIV-1; полученных результатов и их оценки. В анализ включали только аллогенные цельные порции донорской крови или ее компонентов, полученных аферезом в период с января 1997 по июнь 2002 года.

На первом этапе анализа аликвоты крови от отдельных донаций объединяли в пулы, состоящие из 96 или 48 образцов. На втором этапе NAT-положительные пулы разбивали на более мелкие пулы, состоящие из 8–12 образцов. Для заключительного этапа NAT-скринирования использовали индивидуальные образцы из пулов, показавших положительный результат на втором этапе. Для повышения чувствительности NAT-тестирования проводили предварительное концентрирование вирусов в анализируемых пулах. С этой целью образцы крови центрифугировали в течение 30 мин при 30 000–42 000 g.

Предварительный серологический анализ донаций с последующим исключением из пулов серопозитивных образцов проводили в 4 из 12 Центров – участников исследования. В двух Центрах серопозитивные образцы исключали только в группе первичных доноров. В остальных Центрах NAT-тестирование проводили параллельно с серологическим тестированием и серопозитивные образцы были включены в пулы.

NAT-скринирование донорской крови на HCV, HBV и HIV-1 проводили с использованием коммерческих тест-систем Hoffmann-La Roche Cobas Amplicor System, TaqMan и IQ-PCR (Baxter/Immuno AG). В ряде случаев использовали также некоммерческие in house тесты, характеристики которых (чувствительность, специфичность) не уступали аттестованным аналогам.

**Результаты минипул-NAT-скринирования крови доноров
в Германии с января 1997 по 2002 год**

Вирус	Число NAT-положительных донаций	Протестировано донаций	Частота NAT-положительных донаций	В расчете на 1 000 000
HCV	13	18 345 372	1:1 411 183	0,71
HIV	3	16 367 514	1:5 455 838	0,18
HBV	38	16 372 434	1:430 854	2,32

Результаты тестирования

С января 1997 по июнь 2002 года в 12 германских Центрах переливания крови было проведено три крупномасштабных NAT-скринирования плазмы на HCV, HBV и HIV-1. Объем выборок – 18 345 372, 16 367 514 и 16 372 434 донаций соответственно. Забраковано от 0,7 до 1,3% пулов. Были выявлены 54 NAT-положительные донации (13 HCV, 38 HBV и 3 HIV-1), показавшие отрицательные результаты при соответствующих серологических анализах. Суммарная частота NAT-позитивных образцов во всех 12 Центрах, участниках исследования, за 5 лет составила для HCV – 1:1 411 183, для HBV – 1:430 854 и для HIV-1 – 1:5 455 831 (табл. 1).

Оценка затрат

Расчет стоимости включал затраты на пулирование, концентрирование, экстракцию нуклеиновых кислот, амплификацию и детекцию, была включена также стоимость работ на разработку проекта исследования и логистику. Суммарная стоимость NAT-тестирования одной донации на HCV, HBV и HIV-1 составила около 5 Euro, при этом основной вклад вносил анализ на HCV и HIV-1 – 4,5 Euro. Суммарная стоимость 18,4 млн. донаций составила 92 млн. Euro. Стоимость предупреждения трансмиссии одного вируса посредством NAT-скринирования подсчитана на основе следующих допущений. Из одной донации крови в среднем получают 1,4 компонентов: 1,0 эритроконцентрата, 0,3 свежзамороженной плазмы и 0,1 дозы тромбоконцентрата. Общее число реализованных компонентов из 18,4 млн. донаций донорской крови должно составить 25,8 млн. доз ($18,4 \times 1,4 = 25,8$). Возможность передачи HCV и HIV-1 инфекций при трансфузии свежзамороженной плазмы (FFP) не учитывалась, так как инфицированные доноры выявляются в результате

обязательного повторного серотестирования на HCV и HIV-1 через 6 месяцев карантинизации плазмы. Возможное HBV-инфицирование при трансфузии FFP учитывалось, поскольку при обязательном повторном HbsAg-тестировании с большой вероятностью маркер не выявляется. С учетом этих допущений 54 серонегативные NAT-положительные донации можно разделить на 54 дозы эритроконцентрата, 5,4 дозы тромбоконцентрата и 11,4 дозы FFP (табл. 2).

Стоимость предупреждения трансмиссии одного вида вируса составит 1,3 млн. Euro ($92 : 70,8 = 1,3$). Если рассматривать только HCV и HIV-1, стоимость в расчете на одну донацию уменьшается до 4,5 Euro, и тогда стоимость предупреждения одной вирусной инфекции поднимется до 4,7 млн. Euro [$(18,4 \text{ млн. донаций} \times 4,5 \text{ Euro})/17,6 \text{ предотвращенных инфекций}$].

Дискуссия

Результаты настоящего исследования совпадают с данными, полученными при ранее проведенных в Германии NAT-тестированиях [5, 6], однако несколько отличаются от результатов, полученных в США [7]. После введения NAT-скринирования в США к 2000 году было проанализировано 16,3 млн. донаций на HCV и частота NAT-положительных/антитело-негативных донаций для HCV на 1 000 000 составила 3,8; на наличие HIV-1 было проанализировано 12,6 млн. донаций и частота NAT-положительных/антитело-негативных донаций для HIV-1 составила 0,32 на 1 000 000. Возможной причиной таких различий (см. табл. 1) может быть как более высокое распространение HCV и HIV-1 инфекций в США по сравнению с Германией, так и более строгий отбор добровольных безвозмездных доноров в Красном Кресте Германии (частота повторных доноров составляет 90%), большинство из которых представлено сельскими жителями с низким остаточным риском трансфузионных инфекций. Стоимость NAT-тестирования на HCV и HIV-1 в США выше и составляет 8 \$US на донацию (в Германии – 4,5 Euro), однако для предупреждения трансмиссии одного вируса требуется 1,7 млн. \$US [8, 9, 10], что существенно ниже аналогичного показателя для Германии – 4,7 млн. Euro. Стоимость NAT-тестирования одной донации в Германии ниже, возможно, потому что первичные пулы состоят из большего количества образцов – 48 или 96, в то время как в США и Канаде – из 24 образцов. Проводимое в Германии концентрирование вирусов путем центрифугирования также уменьшает стоимость и не допускает снижения чувствительности

NAT-тестирования [11]. Однако стоимость предупреждения одной трансмиссии в Германии в 2,8 раза выше. Главным объяснением этого является более низкое распространение NAT-положительных на HCV и HIV-1 доноров в Германии.

В результате проведенного в Германии NAT-скринирования за 5 лет было выявлено 38 донаций, позитивных на наличие ДНК HBV. Все эти образцы при серологическом анализе показали отрицательные результаты на HbsAg. Среди NAT-позитивных образцов 27 были получены из одного банка крови, в котором NAT-скринированию было подвергнуто 4 165 406 донаций. По данным Института Красного Креста во Франкфурте-на-Майне, значительная часть HbsAg-негативных, но HBV NAT-позитивных донаций была получена от хронических носителей с анти-HBscore-позитивным результатом [12].

Полученные данные свидетельствуют о необходимости и возможности проведения NAT-скринирования донорской крови. По заявлению директора Института Пауля Эрлиха Johannes Loewer, с момента обязательного NAT-тестирования на HCV и HIV-1 среди 16 млн. донаций в Красном Кресте Германии не было выявлено ни одного инфицирования HCV и только одна трансмиссия HIV-1. Это наглядно демонстрирует, что NAT-тестирование увеличивает безопасность донорской крови, однако, учитывая редкое выявление вирусов в донациях крови в Германии, для дальнейшего уменьшения остаточного риска нет необходимости вместо анализа пулов вводить индивидуальный скрининг донаций, который приведет к существенному увеличению стоимости без какого-либо значительного увеличения безопасности.

Литература

1. Hewlett IK. Epstein JS. Food and drug administration conference on the feasibility of genetic technology to close the HIV-1 window in donor screening. *Transfusion* 1997; 37; 346–51.
2. Roth WK. Weber M. Seifried E. Feasibility and efficacy of routine PCR screening of blood donations for hepatitis B virus, and HIV-1 in blood-bank setting. *Lancet* 1999; 353; 359–63.
3. Cardoso MS. Koerner K. Kubanek B. Mini-pool screening by nucleic acid testing for hepatitis B virus, hepatitis C virus, and HIV-1 preliminary result. *Transfusion* 1998; 38; 905–907.
4. Schottstedt V. Tuma W. Bunger G. Lefevre H. PCR for HBV, HCV and HIV-1 experiences and first results from a routine screening programme in a large blood transfusion service. *Biologicals* 1998; 26 101–4.

5. Schreiber GB. Busch MP. Kleinmann JJ. For the Retrovirus Epidemiology Donor Study. The risk of transfusion-transmitted viral infections. *N Engl J Med* 1996; 334; 1685–90.
6. Gluck D. Maurer C. Kubanek B. for the study group Berufsverband. Deutscher Transfusionsmediziner. V. HIV-1, HCV and HBV in blood donors. *Infusionsther Transfusionsmed* 1997; 24; 176–70.
7. Stramer SI. Caglioti S. Strong DM. NAT of United States and Canadian blood supply. *Transfusion* 2000 Oct.; 40; 1165–8.
8. Busch MP. Dodd RY. NAT and blood safety, what is the problem? *Transfusion* 2000 Oct.; 40; 1175–60.
9. AuBuchon JP. Birkmeyer JD. Busch MP. Cost-effectiveness of expanded human immunodeficiency virus-testing protocols for donated blood. *Transfusion* 1997 Jan.; 37; 45–51.
10. Jackson B. AuBuchon JP. Busch MP. Cost-effectiveness of nucleic acid testing for HIV-1 and HCV in donated blood (abstract.) *Transfusion* 2000; 40; (Suppl); 1328–9S
11. Roth WK. Weber M. Buhr S. Drosten C. Weichert W. Sireis W. Hedges D. Seifried E. Yield of HCV and HIV-1 NAT- after screening of 3.6 million blood donations in Central Europe. *Transfusion* 2002; 42; 862–68.
12. Roth WK. Weber M. Drosten C. Buhr S. Sireis W. Weichert W. Hedges D. Seifried E. NAT for HBV and anti-HBc testing increase blood safety. *Transfusion* 2002; 42; 869–75.

ТРАНСФУЗИОННО-ПЕРЕДАВАЕМЫЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ИНФЕКЦИИ: РИСКИ, ИСТОЧНИКИ И ПУТИ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ

S. J. WAGNER

**Biomedical Research and Development, American Red Cross,
Rockville MD, USA**

(Transfusion-transmitted bacterial infection: risks, sources and interventions. Vox Sanguinis, 2004, v. 86, № 3, p. 157–163)

Трансфузионно-передаваемые бактериальные инфекции регистрируются с начала организации банков крови. Несмотря на огромные успехи в предупреждении посттрансфузионных вирусных инфекций, связанные с разработкой тест-систем нового поколения и NAT-скринингом доноров, для уменьшения риска бактериального сепсиса сделано пока еще очень мало. Результаты наблюдения за трансфузиями во Франции (French Haemo-vigilance), системы учета опасных для жизни трансфузионных осложнений в

Англии (British Serious Hazards of Transmission – SHOT) и отчеты о фатальных случаях Американского Агентства по контролю за пищевыми и лекарственными продуктами (United States Food and Drug Administration) свидетельствуют о том, что риск клинически очевидных случаев сепсиса превышает риск трансфузионного инфицирования ВИЧ и вирусами гепатитов В и С. Источниками контаминации являются кожа донора, кровь донора в период бактериемии различного генеза, системы забора, хранения, транспортировки крови и подготовки ее компонентов, окружающие предметы и воздух. Способами и средствами профилактики трансфузионно-трансмиссивного сепсиса являются: 1) улучшение дезинфекции кожи донора в участке венопункции, 2) отбрасывание первых 20–30 мл аликвоты крови, 3) введение бактериального тестирования и/или 4) внедрение методов инактивации патогенов.

Историческая перспектива

Риск бактериальных инфекций стал очевиден сразу же после начала трансфузии крови, а первые сообщения относятся к тому времени, когда донорскую кровь еще хранили в стеклянных флаконах [1]. С началом использования закрытых пластиковых стерильных систем для заготовки и хранения крови частота бактериально инфицированных донаций значительно уменьшилась [2], но дальнейшего снижения контаминации достигнуть не удалось, в то время как трансфузионное инфицирование ВИЧ и вирусами гепатитов В и С за последние 18–20 лет уменьшилось радикально [3, 4]. В настоящее время клинически диагностируемый бактериальный сепсис представляет бóльшую угрозу, чем трансфузионно-трансмиссивные вирусные инфекции (данные SHOT, Haemovigilance и FDA) [5–7]. Наиболее часто бактериальной контаминации подвержены тромбоциты. Это связано с тем, что в отличие от других компонентов крови (в частности, эритроцитов), которые хранятся в холодильнике, препараты тромбоцитов выдерживают при комнатной температуре, способствующей быстрому росту бактерий.

Оценка частоты посттрансфузионного сепсиса

Для выявления бактериальной контаминации крови обычно используют ручное или автоматическое культивирование образцов крови, которое методически способствует получению ложноположительных результатов за счет контаминации в процессе проведения

анализа. При доставке образцов крови также трудно сохранить асептические условия. Применение повторного культивирования для исключения ложноположительных результатов показало, что частота контаминирования тромбоконцентратов составляет 1/1 500 доз, полученных от индивидуальных доноров [8, 9]. В отношении эритроконцентратов таких повторных культивирований не проводилось, но, по данным однократных культивирований, частота бактериальной контаминации данных препаратов варьировала от 0 до 0,6% [10, 11]. Некоторые из контаминированных доз эритроконцентратов содержали микроорганизмы, способные расти в холодильнике. Клинические признаки сепсиса, такие как лихорадка, изменение кровяного давления и/или озноб, подтверждаемые выделением при культивировании одного и того же микроорганизма из крови донора и реципиента, показывают меньшую частоту контаминации тромбоцитов, которая находится в пределах 1/10 000–100 000 доз, в среднем один случай на 15 000 доз [12–15]. Клинически выявленные случаи сепсиса от трансфузий эритроцитов, подтвержденные культивированием, чрезвычайно редки и составляют один случай на 5 000 000 доз [13].

Частота клинически выявленного посттрансфузионного сепсиса зависит от состояния реципиентов. У пациентов, получающих тромбоконцентраты после трансплантации костного мозга, клинический сепсис, подтвержденный выделением при культивировании одного и того же микроорганизма из крови донора и реципиента, имеет частоту 1 случай на 358 доз тромбоконцентрата [16]. Бактериальный сепсис является наиболее частой причиной посттрансфузионной смерти и составляет 17–22% всех летальных случаев, уступая только ошибкам определения групповой (ABO) принадлежности крови [7, 17]. Частота смертельных случаев составляет 1/50 000–500 000 доз тромбоцитов и 1/8 000 000 доз эритроцитов [12, 13]. Очевидно, что эти показатели существенно занижены, поскольку многие случаи посттрансфузионного сепсиса не распознаются и поэтому не регистрируются.

Бактериальная контаминация эритроцитов

Инфицирование *Yersinia enterocolitica*, как следствие асимптоматической бактериемии донора, составляет около 46% зарегистрированных случаев клинического сепсиса от трансфузии эритроцитов [18–22].

Yersinia хорошо растет в концентратах эритроцитов, поскольку она использует цитрат и нуждается в источнике железа. В ряде исследований *in vitro* показано, что удаление примесей лейкоцитов

или лейкоцитарной пленки предупреждает рост *Yersinia* в процессе хранения препаратов эритроцитов при 1–6°C [23–27]. Патогенез иерсиниоза изучен слабо, механизмы персистенции *Yersinia* неизвестны, не ясно, находится ли микроорганизм внутри или вне клеток крови пациента с бактериемией [28]. Влияние лейкоцитов крови донора на инфицирование реципиента *Yersinia enterocolica* еще также предстоит изучить.

На втором месте после *Yersinia* по частоте случаев сепсиса при трансфузии эритроцитов находится *Pseudomonas spp.* (25%), далее следует *Serratia spp.* (11%) и другие микроорганизмы (18%) [5, 13, 18]. Приблизительно 80% случаев сепсиса от трансфузий эритроцитов обусловлены психрофильными микроорганизмами, способными расти при температуре холодильника. Данные бактерии, обуславливающие лихорадку, изменение кровяного давления и озноб, в ряде случаев служили причиной смерти реципиента.

Бактериальная контаминация тромбоцитов

Из препаратов тромбоцитов наиболее часто выделяют следующие микроорганизмы, вызывающие клинические случаи сепсиса: *Staphylococcus spp.* (42%), *Escherichia coli* (9%), *Bacillus spp.* (9%), *Salmonella spp.* (9%), *Streptococcus spp.* (12%), *Serratia spp.* (8%), *Enterobacter spp.* (7,0%) и другие (4%) [5, 13, 18]. Приблизительно 56% из них являются грамположительными и большинство – аэробы.

Анализ клинических случаев сепсиса, в том числе и фатальных, показал, что тяжесть заболевания зависит от вида бактерий, содержащихся в контаминированном тромбоконцентрате [5, 7, 13, 18]. Так, *Staph. epidermidis* индуцирует только слабые септические реакции, фатальные случаи сепсиса не зарегистрированы, и, напротив, 17,3% смертей от посттрансфузионного сепсиса обусловлены инфекцией *Klebsiella spp.*, не выделяемой при обычных септических реакциях. В целом, грамотрицательные микроорганизмы вызывают большее число смертельных исходов при инфекции (60%), чем грамположительные (40%).

Источники контаминации

Происхождение бактериальной контаминации крови не всегда легко идентифицировать. В ряде хорошо документированных случаев сепсиса было показано, что источником заражения явилась кожа донора как за счет инфицирования ее внутренних слоев, в частности *Staphylococcus spp.* [29], так и при попадании наружных

кожных чешуек в контейнер при флеботомии [30, 31]. Дальнейшие исследования показали, что отбрасывание при заборе первых 10–40 мл крови в 95–98% случаев предотвращает попадание кожных бактерий донора в коллекционный контейнер [32–34]. Причем удаление первых 10 мл уже снижает общую бактериальную контаминацию с 0,35 до 0,21% ($P = 0,05$), а в случае поверхностных бактерий *Staph. epidermidis* эффект еще более значительный – с 0,14 до 0,03% ($P < 0,02$) [35]. Отброшенная порция крови может быть использована для тестирования на наличие вирусов.

Дезинфекция кожи снижает концентрацию бактерий в месте флеботомии, однако полная стерилизация невозможна. Кроме того, дезинфектанты существенно различаются по эффективности взаимодействия с кожей доноров [36, 37], большое значение имеет также способ обработки кожи (движения аппликатора вверх-вниз предпочтительнее, чем круговые) и даже форма аппликатора (ватная палочка лучше, чем тампон) [38]. Некоторые бактерии способны выживать в растворах дезинфектантов, особенно в «мягких» дезинфектантах нового поколения. Так, показано, что 1% провидон (*providone iodine*) может быть контаминирован бактерией *P. septicus*, которая способна сохраняться в нем в течение 68 недель [39].

Источником контаминации может быть асимптоматическая или слабовыраженная бактериемия донора. Описан случай заражения семи реципиентов тромбоцитарным концентратом, полученным от донора, у которого впоследствии был выявлен *Salmonella* индуцированный остеомиелит большой берцовой кости. При этом на момент тромбоцитозфереза у донора отсутствовала какая-либо симптоматика заболевания. Два из семи случаев сепсиса, индуцированного *Sal. choleraesuis*, оказались смертельными [40]. Однако случаи посттрансфузионного сепсиса, вызванные хронической бактериемией донора, происходят достаточно редко. Большинство случаев индуцируется временной бактериемией, наиболее часто возникающей в результате проведения стоматологических процедур. В ряде стран запрещено использовать кровь доноров, лечившихся у стоматолога в течение 24 ч перед донацией крови [41, 42].

Ряд случаев сепсиса был связан с бактериальной контаминацией одноразовых систем для забора крови, в частности переносных контейнеров [43, 44]. Проведенный в Германии анализ 1 515 контейнеров для забора крови выявил присутствие микроорганизмов (*Ser. Marcescens* и др.) в 11 из них (0,73%).

Окружающая среда – еще один источник контаминации препаратов донорской крови. Присутствующие в почве и на поверхности предметов споры бактерий могут стать причиной загрязнения крови, а также самого донора в процессе флеботомии [45].

Методы детекции бактерий

Рассмотрим методы определения бактерий в крови в порядке возрастания их чувствительности и времени, требуемого для получения результата.

Самый простой метод – «Swirling», визуальный анализ тромбоконцентрата, его чувствительность составляет 10^7 КОЕ/мл [46]. Суть метода состоит в следующем: при переворачивании контейнера с тромбоцитами появляются «жемчужины» – локальное увеличение мутности вследствие выравнивания асимметричных тромбоцитов в возникающем потоке жидкости. «Жемчужины» не образуются при контаминации тромбоцитов бактериями в высоких концентрациях, поскольку при этом происходит понижение pH среды и сферизация тромбоцитов. Очевидным преимуществом данного визуального анализа является то, что его проведение не требует вскрытия контейнера. Быстрые методы определения pH и/или глюкозы позволяют обнаружить $< 10^7$ КОЕ/мл, но требуют вскрытия контейнера [47].

Методы полуавтоматической флуоресцентной микроскопии и цитометрии выявляют 10^2 – 10^4 КОЕ/мл бактерий в тромбоконцентрате в течение нескольких минут (48–50 мин). В основе анализа лежит лизис лейкоцитов и тромбоцитов под влиянием детергентов и окрашивание находящихся в препарате интактных бактерий флуорофором, связывающимся с их нуклеиновыми кислотами. Окрашенные бактерии отделяют фильтрацией и подсчитывают с помощью флуоресцентного микроскопа или с этой целью применяют сканирование на проточном цитофлуориметре. Ручные варианты метода позволяют детектировать 10^5 КОЕ/мл (акридиновый оранжевый) или более 10^6 КОЕ/мл (окрашивание по Граму), имея сопоставимое время с полуавтоматическим методом.

В стадии разработки находятся два иммунологических метода обнаружения бактерий в тромбоконцентратах непосредственно перед трансфузией. В одном методе используются конъюгированные с золотом антитела против липотехоевой кислоты для детекции грамположительных бактерий или против липополисахаридов для обнаружения грамотрицательных бактерий (Verax Biomedical, Worcester, MA) [51]. Анализ проводится на нитроцеллюлозных

стрипах методом твердофазного ИФА, чувствительность составляет 10^3 – 10^4 КОЕ/мл, время – 20 мин. В другом методе (Immunetics Inc., Cambridge, MA) применяют антитела против пептидогликана и детектирует одновременно грамположительные и грамотрицательные бактерии: чувствительность – 10^3 КОЕ/мл, время – 1 ч [52].

Молекулярно-биологические методы основаны на детекции рибосомальной РНК бактерий (рРНК). Гибридизационный метод использует ДНК-зонд к консервативной последовательности 16S рРНК, которая присутствует в количестве 5 000 копий на клетку любой бактерии (Gene Probe, San Diego, CA). Метод позволяет детектировать $>10^4$ КОЕ/мл в тромбоконцентратах в течение 60–90 мин [53]. Метод ПЦР, основанный на амплификации консервативных 16S рРНК последовательностей, отличается высокой чувствительностью и способностью выявлять 1–10 КОЕ/мл в тромбоконцентратах [54–55]. Однако его проведение требует существенно больше времени, чем гибридизационная детекция аналогичных последовательностей 16S рРНК. Кроме того, амплификационный метод зачастую дает ложноположительные результаты за счет контаминации рекомбинантной Taq-полимеразы бактериальной рРНК.

Для детекции бактерий в тромбоконцентратах разработаны два автоматических метода культивирования: система BioMerieux VacT/Alert (Durham, NC) и система фирмы Pall (Pall BDS; Pall Medical, East Hills, NY), которые имеют высокую чувствительность (1–10 КОЕ/мл) и уже нашли применение в некоторых странах [9, 56–63]. Однако широкое клиническое использование культуральных методов детекции бактерий в тромбоконцентратах требует хорошо спланированных исследований и точной оценки их вклада в повышение трансфузионной безопасности.

Бактериальная детекция системой VacT/Alert основана на продукции CO_2 пролиферирующими бактериями. В культуральные сосуды, содержащие аэробные или анаэробные среды, в соответствии с инструкцией асептически вносится определенный объем тромбоконцентрата и инкубируется при 34–37°C. Продукруемый бактериями CO_2 вызывает снижение pH культуральной среды, что приводит к изменению спектральной отражательной способности pH чувствительного диска на дне сосуда и детектируется по изменению его цвета. Поскольку концентрация бактерий в свежемороженой крови очень низкая (<1 – 10 КОЕ/мл), то фирма рекомендует отбирать пробы для культивирования через ≥ 1 день хранения тромбоконцентратов. Сосуды инкубируют

24 ч или более длительное время, определяемое сроком годности тромбоцитов. Изменение цвета рН чувствительного диска на дне сосуда регистрируется непрерывно.

Бактериальная детекция системой Pall BDS основана на измерении уровня кислорода, который уменьшается при культивировании контаминированного тромбоконцентрата вследствие его утилизации пролиферирующими бактериями. В закрытой системе малый объем тромбоконцентрата пропускают через фильтр, который задерживает лейкоциты и тромбоциты, но пропускает бактерии, если они есть, в емкость, содержащую таблетку Sodium polyanethol sulphonate (SPS) для инактивации естественных ингибиторов бактериального роста, обычно присутствующих в крови. Как и в предыдущем случае, с целью увеличения исходной концентрации контаминирующих бактерий анализ следует проводить не ранее чем через 1 день хранения тромбоконцентрата. После инкубации при 35°C в течение 24 ч или более производится однократное измерение содержания кислорода, уменьшение которого ниже значения «cut off» указывает на присутствие в препарате пролиферирующих бактерий.

Инактивация патогенов

Ряд методов инактивации патогенов в препаратах крови в настоящее время проходит клинические испытания по снижению концентрации или инактивации бактерий, оболочечных и некоторых безоболочечных вирусов, а также некоторых паразитов [64]. Однако многие инактивирующие агенты, помимо уменьшения содержания патогенов, могут снижать количество клеток крови в препарате, их функциональную активность и время циркуляции после трансфузии, а также являться токсичными для реципиентов, персонала банков крови или окружающей среды. Очевидно, что потребуется еще достаточно много времени для завершения клинических испытаний этих методов, а бактериальный сепсис в настоящее время – наиболее распространенное и наиболее опасное осложнение трансфузий тромбоцитов. Кроме того, стоимость методов инактивации во много раз превышает стоимость методов бактериальной детекции.

Поскольку степень риска инфекционных заболеваний значительно различается в разных странах, выбор предупреждающих мер должен соответствовать особенностям региона.

Литература

1. EcEntegart MG: Dangerous contaminants in stored blood. *Lancet* 1956; 271:909–911
2. Pittman M: A study of bacteria implicated in transfusion reactions and bacteria isolated from blood products. *J Lab ClinMed* 1953; 42:273–288
3. Jacobs MR, Palavecino E, Yomtovian R: Don't bug me: the problem of bacterial contamination of blood components – challenges and solutions. *Transfusion* 2001;41:1331–1334
4. Busch MP, Kleinman SH, Nemo GJ: Current and emerging infectious risks of blood transfusion. *JAMA* 2003; 289:952–962
5. <http://www.shot.demon.co.uk/toc.htm>, Gozzard D, Serious hazards of transfusion (SHOT)
6. Debeir J, Noel L, Aullen J, Frette C, Sari F, Mai MP, Cosson A: The French haemovigilance system. *Vox. Sang* 1999; 77:77–81
7. Lee J: Review of Heidelberg Symposium and FDA fatality reports. Presented at the FDA/CBER Bacterial Contamination of Platelets Workshop, MD, Bethesda, United States Food and Drug Administration, September 1999 (<http://www.fda.gov/cber/minutes/bact092499.pdf>)
8. Leiby DA, Kerr KL, Campos JM, Dodd RY: A retrospective analysis of microbial contaminants in outdated random-donor platelets from multiple sites. *Transfusion* 1997; 37:259–263
9. Macauley A, Chandrasekar A, Geddis G, Morris KG, McClelland WM: Operational feasibility of routine bacterial monitoring of platelets. *Transfus Med* 2003; 13:189–195
10. Alvarez FE, Rogge KJ, Tarrard JB, Lichtiger B: Bacterial contamination of cellular blood components. A retrospective review at a large cancer center. *Ann Clin Lab Sci* 1995; 25:283–290
11. Radcliffe JH, Denham MA, Gaydos C, Simpson MB: Bacteriological sterility of washed red blood cells after 72 hours storage. *Transfusion* 1978; 18:365–366
12. Ness P, Braine H, King K, Barrasso C, Kickler T, Fuller A, Blades N: Single-donor platelets reduce the risk of septic platelet transfusion reactions. *Transfusion* 2001; 41:857–861
13. Kuehnert MJ, Roth VR, Haley NR, Gregory KR, Elder KV, Schreiber GB, Arduino MJ, Holt SC, Carson LA, Banerjee SN, Jarvis WR: Transfusion-transmitted bacterial infection in the United States 1998 through 2000. *Transfusion* 2001; 41:1493–1499
14. Morrow JF, Braine HG, Kickler TS, Ness PM, Dick JD, Fuller AK: Septic reactions to platelet transfusions. A persistent problem. *JAMA* 1991; 266:555–558

15. Barrett BB, Andersen JW, Anderson KC: Strategies for the avoidance of bacterial contamination of blood components. *Transfusion* 1993; 33:228–233
16. Chiu EK, Yuen KY, Lie AK, Liang R, Lau YL, Lee AC, Kwong YL, Wong S, Ng MH, Chan TK: A prospective study of symptomatic bacteremia following platelet transfusion and of its management. *Transfusion* 1994; 34:950–954
17. Andreu G, Morel P, Forestier F, Debeir J, Rebibo D, Janvier G, Herve P: Hemovigilance network in France: organization and analysis of immediate transfusion incident reports from 1994 to 1998. *Transfusion* 2002; 42:1356–1364
18. Wagner SJ, Friedman LI, Dodd RY: Transfusion-associated bacterial sepsis. *Clin Microb Rev* 1994; 7:290–302
19. Wust T, Saade C: Fatal endotoxic shock after administration of autologous erythrocyte concentrate. *Chirurg* 2001; 72:215–217
20. Haditsch M, Binder L, Gabriel C, Muller-Uri P, Watschinger R, Mittermayer H: *Yersinia enterocolitica* septicemia in autologous blood transfusion. *Transfusion* 1994; 34:907–909
21. Sire JM, Michelet C, Mesnard R, Tardivel R, Minet J, Bracq H, Avril JL: Septic shock due to *Yersinia enterocolitica* after autologous transfusion. *Clin Infect Dis* 1993; 17:954–955
22. Richards C, Kolins J, Trindade CD: Autologous transfusion-transmitted *Yersinia enterocolitica*. *JAMA* 1992; 268:154–162
23. Pietersz RN, Reesink HW, Pauw W, Dekker WJ, Buisman L: Prevention of *Yersinia enterocolitica* growth in red-blood-cell concentrates. *Lancet* 1992; 340:755–756
24. Hogman CF, Gong J, Hambræus A, Johansson CS, Eriksson L: The role of white cells in the transmission of *Yersinia enterocolitica* in blood components. *Transfusion* 1992; 32:654–657
25. Kim DM, Brecher ME, Bland LA, Estes TJ, McAllister SK, Aguero SM, Carmen RA, Nelson EJ: Prestorage removal of *Yersinia enterocolitica* from red cells with white cell-reduction filters. *Transfusion* 1992; 32:658–662
26. Wenz B, Burns ER, Freundlich LF: Prevention of growth of *Yersinia enterocolitica* in blood by polyester fiber filtration. *Transfusion* 1992; 32:663–666
27. Buchholz DH, AuBuchon JP, Snyder EL, Kandler R, Edberg S, Piscitelli V, Pickard C, Napychank P: Removal of *Yersinia enterocolitica* from AS-1 red cells. *Transfusion* 1992; 32:667–672
28. Wagner SJ, Robinette D, Dodd R: Factors affecting *Yersinia enterocolitica* (serotype 0:8) viability in deliberately inoculated blood. *Transfusion* 1993; 33:713–716

29. Anderson KC, Lew MA, Gorgone BC, Martel J, Leamy CB, Sullivan B: Transfusion-related sepsis after prolonged platelet storage. *Am J Med* 1986; 81:405–411
30. Gibson T, Norris W: Skin fragments removed by injection needles. *Lancet* 1958; 2:983–985
31. Kojima K, Togashi T, Hasegawa K, Kawasaki H: Subcutaneous fatty tissue can stray into a blood bag. *Vox Sang* 1998; 74 (Suppl. 1): Abstr. 1205
32. Wagner SJ, Robinette D, Friedman LI, Miripol J: Diversion of initial blood flow to prevent whole blood contamination by «skin» surface bacteria: an in vitro model. *Transfusion* 2000;40:335–338
33. Figueroa PI, Yoshimori R, Torrance CA, Nelson E, Macabasco G, Carmen R: Distribution of bacteria in fluid passing through an inoculated collection needle. *Transfusion* 1995; 35 (Suppl): (Abstr. S42)
34. Chassaigne M, Vassort-Bruneau C, Allouch P, Audurier A, Boulard G, Grosdhomme F, Noel L, Gulian C, Janus G, Perez P: Reduction of bacterial load by pre-donation sampling. *Transfus Apheresis Sci* 2001; 24:253
35. de Korte D, Marcelis JH, Verhoeven AJ, Soeterboek AM: Diversion of first blood volume results in a reduction of bacterial contamination for whole-blood collections. *Vox Sang* 2002; 83:13–16
36. Goldman M, Roy G, Frechette N, Decary F, Massicotte L, Delage G: Evaluation of donor skin disinfection methods. *Transfusion* 1997; 37:309–312
37. McDonald CP, Lowe P, Roy A, Robbins S, Hartley S, Harrison JF, Slopecki A, Verlander N, Barbara JA: Evaluation of donor arm disinfection techniques. *Vox Sang* 2001; 80:135–141
38. Lee J: Skin preparation of phlebotomy. United States Food and Drug Administration, Washington D.C., Blood Products Advisory Committee, December 2002 (<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/02/transcripts/3913tl.rtf>)
39. Anderson RL, Vess RW, Carr JH, Bond WW, Panlilio AL, Favero MS: Investigations of intrinsic *Pseudomonas cepacia* contamination in commercially manufactured povidone-iodine. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1991, 2002; 12:297–302
40. Rhame FS, Root RK, MacLowry JD, Dadisman TA, Bennett JV: Salmonella septicemia from platelet transfusions. Study of an outbreak traced to a hematogenous carrier of *Salmonella cholerae-suis*. *Ann Intern Med* 1973; 78:633–641
41. Peterson LJ, Peacock R: The incidence of bacteremia in pediatric patients following tooth extraction. *Circulation* 1976; 53:676–679
42. Bhanji S, Williams B, Sheller B, Elwood T, Mancl L: Transient bacteremia induced by toothbrushing: a comparison of the Sonicare toothbrush with a conventional toothbrush. *Pediatr Dent* 2002; 24:295–299

43. Heltberg O, Skov F, Gerner-Smidt P, Kolmos HJ, Dybkjaer E, Gutschik E, Jerne D, Jepsen OB, Weischer M, Frederiksen W, Sorensen H: Nosocomial epidemic of *Serratia marcescens* septicemia ascribed to contaminated blood transfusion bags. *Transfusion* 1993; 33:221–227
44. Hogman CF, Fritz H, Sandberg L: Posttransfusion *Serratia marcescens* septicemia. *Transfusion* 1993; 33:189–191
45. McDonald CP, Hartley S, Orchard K, Hughes G, Brett MM, Hewitt PE, Barbara JA: Fatal *Clostridium perfringens* sepsis from a pooled platelet transfusion. *Transfus Med* 1998; 8:19–22
46. Wagner SJ, Robbinette D: Evaluation of swirling, pH, and glucose for the detection of bacterial contamination in platelet concentrates. *Transfusion* 1996; 36:989–993
47. Burstain JM, Brecher ME, Workman K, Foster M, Faber GH, Mair D: Rapid identification of bacterially contaminated platelets using reagent strips: glucose and pH analysis as markers of bacterial metabolism. *Transfusion* 1997; 37:255–258
48. Seaver M, Crookston JC, Roselle DC, Wagner SJ: First results using automated epifluorescence microscopy to detect *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis* in leukoreduced platelet concentrates. *Transfusion* 2001; 41:1351–1355
49. Morel P, Deschaseaux M, Bertrand X, Naegelen C, Naegelen C, Talon D: Detection of bacterial contamination in platelet concentrates using Scansystem: first results. *Transfusion* 2002; 42S:40S (Abstr. SP37)
50. Morel P, Deschaseaux M, Bertrand X, Naegelen C, Talon D: Detection of bacterial contamination in platelet concentrates: results with Scansystem. *Transfusion* 2003; 43S:47A (Abstr.SP13)
51. Kenny F, Woodbury C, Pelak M, Weinberg J, Hall JA: Development of a rapid test for detection of bacterial contamination in platelet units. *Transfusion* 2003; 43S:48A (Abstr. SP17)
52. Beausang LA, Levin A: Development of a rapid assay for the detection of bacteria in platelet units. *Transfusion* 2003; 43S:20A (Abstr. S65-030K)
53. Hogan JJ, Kaplan S, Kuramoto K: Detection of bacteria in components from spiked whole blood. *Transfusion* 2003; 43S:49A (Abstr. SP21)
54. Petershofen DK, Fislage R, Faber R, Schmidt H, Roth WK, Seifried E: Detection of bacterial 16S-RNA gene sequences using quantitative real-time PCR. *Transfusion* 1999; 39S:116S (Abstr.S532-040J)
55. Mohammadi T, Savelkoul P, Cuyppers T, van der Meer P, Pietersz R, Reesink H: Sensitive detection of bacterial DNA in platelet concentrates by real-time Taqman PCR with two different DNA isolation methods. *Transfusion* 2002; 42S: 41S (Abstr. SP42)

56. Gong J, Hogman CF, Lundholm M, Gustafsson I: Novel automated microbial screening of platelet concentrates. *APMIS* 1994; 102:72–78
57. Wagner SJ, Robinette D: Evaluation of an automated microbiologic blood culture device for detection of bacteria in platelet components. *Transfusion* 1998; 38:674–679
58. Liu HW, Yuen KY, Cheng TS, Lee KB, Chua EK, Ho PL, Lin CK: Reduction of platelet transfusion-associated sepsis by short-term bacterial culture. *Vox Sang* 1999; 77:1–5
59. Brecher ME, Means N, Jere CS, Heath D, Rothenberg S, Stutzman LC: Evaluation of an automated culture system for detecting bacterial contamination of platelets: an analysis with 15 contaminating organisms. *Transfusion* 2001; 41:477–482
60. McDonald CP, Roy A, Lowe P, Robbins S, Hartley S, Barbara JA: Evaluation of the BACT/Alert automated blood culture system for detecting bacteria and measuring their growth kinetics in leucodepleted and non-leucodepleted platelet concentrates. *Vox Sang* 2001; 81:154–160
61. AuBuchon JP, Cooper LK, Leach MF, Zuaro DE, Schwartzman JD: Experience with universal bacterial culturing to detect contamination of apheresis platelet units in a hospital transfusion service. *Transfusion* 2002; 42:855–861
62. Brecher ME, Hay SN, Rothenberg SJ: Monitoring of apheresis platelet bacterial contamination with an automated liquid culture system: a University experience. *Transfusion* 2003; 43:974–978
63. Ortolano GA, Freundlich LF, Holme S, Russell RL, Cortur MA, Wilkins K, Nomura H, Chong C, Carmen R, Capetandes A, Wenz B: Detection of bacteria in WBC-reduced PLT concentrates using percent oxygen as a marker for bacteria growth. *Transfusion* 2003; 43:1276–1284
64. Wagner SJ: Pathogen reduction in cellular blood components; in Simon TL, Dzik WH, Snyder EL, Stowell CP, Strauss RG (eds): *Rossi's Principles of Transfusion Medicine*. Lippincott Williams ft Wilkens, Philadelphia, PA, 2002:806–814

БАКТЕРИАЛЬНАЯ КОНТАМИНАЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ КОМПОНЕНТОВ КРОВИ: РИСКИ, ИСТОЧНИКИ И КОНТРОЛЬ

M. A. BLAJCHMAN, MCMASTER

University, Ontario, Canada

(Bacterial contamination of cellular blood components, risks, sources and control. Vox Sanguinis, 2004, v. 87, Suppl. 1, p. 98–103)

Введение

Среди клеточных элементов донорской крови наиболее частой контаминации подвергаются тромбоциты, именно их трансфузия представляет наибольший риск инфицирования. Приблизительно каждые 2 из 2 000 доз тромбоцитов, полученных из порции цельной крови донора или методом афереза, контаминированы бактериями. Бактериальный сепсис является второй после несовместимости по группам крови причиной посттрансфузионной смерти, частота которой составляет 1–4 случая на 85 000 переливаний.

В настоящем сообщении анализируются потенциальные источники и частота бактериальной контаминации клеточных компонентов крови, признаки и симптомы трансфузионного сепсиса, возможные пути уменьшения посттрансфузионных осложнений и смертности, обусловленных бактериальной контаминацией компонентов донорской крови.

Частота бактериальной контаминации клеточных компонентов

Контаминация эритроцитов и тромбоцитов широко известна и описана в ряде работ [1–7], в различных исследованиях ее показатели значительно варьируют (табл. 1). Средняя частота бактериальной контаминации тромбоцитов, полученных из порции цельной крови, составляет 33,9 на 100 000 доз; для тромбоцитов, полученных методом афереза – 51,0 на 100 000 доз, а для эритроцитов – 2,6 на 100 000 доз. В целом, средняя частота контаминации (табл. 1) составляет 32,4 на 100 000 доз клеточных компонентов, что соответствует приблизительно одному случаю на 3 000 трансфузий.

В табл. 2 представлена сводка имеющихся в литературе данных по частоте клинически зарегистрированных случаев посттрансфузионных септических реакций. Важно отметить, что в расчет принимались только острые, угрожающие жизни и строго подтвержденные случаи сепсиса. В связи с этим, очевидно, что дан-

Таблица 1

**Частота бактериальной контаминации тромбоцитов,
полученных из цельной крови (WB-plts) или аферезом (A-plts),
и донорских эритроцитов (RBCs)**

Клеточный компонент крови	Авторы публикаций	Число контаминаций/ число протестированных доз	Число контаминаций на 100 000 доз
WB-plts	Morrow et al. [8]	6/74 598	8
	Barrett et al. [9]	¼ 272	23
	Yomtovian et al. [10]	6/15 705	38
	Chui et al. [11]	10/21 503	46
	Blajchman et al. [12]	16/31 610	51
	Leiby et al. [13]	4/4 995	80
	Blajchman et al. [14]	7/10 065	70
A-plts	Morrow et al. [8]	1/9 519	5
	Blajchman et al. [6]	14/6 055	230
	Barrett et al. [9]	5/17 928	28
	Yomtovian et al. [10]	0/2 476	0
	Dziedzowski [15]	1/5 197	19
	Aubuchon et al. [16]	½ 678	37
RBCs	Barrett et al. [9]	1/31 385	3
	Dziedzowski [15]	1/7 080	10
Сумма, n=15		89/274 379	32,4*

* *Примечание.*

95% доверительный интервал – 25,6–39,1.

ные табл. 2 не отражают реальную картину посттрансфузионных осложнений, поскольку многие, даже фатальные, септические реакции остаются нераспознанными.

Несмотря на то, что истинную частоту бактериальных осложнений и смертности, обусловленную бактериальной контаминацией клеточных компонентов крови, определить чрезвычайно трудно, имеющиеся данные по уже зарегистрированным случаям свидетельствуют о том, что она существенно выше трансфузионных инфекций вирусами гепатитов и ВИЧ, частота которых в развитых странах составляет менее 1 случая на миллион трансфузий [20, 21].

Во многих случаях трудности диагностики посттрансфузионного сепсиса, обусловленного бактериальной контаминацией клеточных компонентов, связаны с высокой частотой фебрильных негемолитических трансфузионных реакций (FNHR), которые имеют

Таблица 2

Посттрансфузионные септические реакции на 1 млн. трансфузий аферезных тромбоцитов (A-plts), тромбоцитов из порции цельной крови (WB-plts) и трансфузий эритроцитов (RBCs)

Авторы публикаций	A-plts	WB-plts	RBCs	% летальных случаев
Perez et al. [17]	31,8	71,8	5,8	16,0
Kuehnert et al. [18]	9,9	10,6	0,2	26,5
Ness et al. [19]	74,5	67,0	ND	17,4

* *Примечание.*

ND – не исследовали.

аналогичные симптомы. Особенно высока частота FNHR при введении тромбоцитов, в этом случае она достигает 15% (для сравнения, в случае эритроцитов – менее 1%).

Несовпадение данных по частоте бактериальной контаминации клеточных компонентов крови (табл. 1) и частоте посттрансфузионных септических реакций (табл. 2) обусловлено тем, что большинство микроорганизмов, выделяемых из контаминированных доз тромбоцитов и эритроцитов, например грамположительные кокки, не имеет отношения к септическим реакциям при трансфузии. Бактерии попадают в пробу, используемую для постановки культивирования, с кожи доноров и дают при культивировании ложноположительный результат.

Признаки и симптомы трансфузионного бактериального сепсиса

Клиническая тяжесть трансфузионных септических реакций значительно варьирует в зависимости от: 1) вида бактерий, а именно: грамотрицательные бактерии дают более тяжелые реакции в связи с продукцией ими эндотоксинов; 2) количества бактерий, содержащихся в контаминированных клеточных компонентах; 3) скорости роста присутствующих в контаминате бактерий и 4) состояния реципиента – тяжести его заболевания, числа лейкоцитов, статуса иммунной системы и получаемой антибиотикотерапии.

Острые септические реакции начинаются в течение 2 ч после начала трансфузии и сопровождаются появлением лихорадки и озноба [2]. Последующими признаками могут быть гипертензия,

тошнота, рвота, диарея, олигоурия и шок. Потенциальными симптомами также являются респираторные (диспноэ, хрипы и/или кашель), кровотечения, обусловленные развитием диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови под влиянием бактериальных эндотоксинов. Важно отметить, что септические трансфузионные реакции, связанные с контаминированными эритроцитами, обычно происходят при использовании эритроцитов, хранившихся более чем 21 день, в то время как септические реакции, связанные с контаминированными тромбоцитами, обычно наблюдаются при использовании доз, хранимых более трех дней.

Источники бактериальной контаминации клеточных компонентов крови

А. Бактериемия донора

В этом случае источник контаминации – непосредственно кровь донора, являющегося асимптоматическим носителем или находящегося в стадии выздоровления от бактериальной инфекции, но имеющего нормальные показатели лабораторного тестирования крови. Бактериемия короткой продолжительности может наблюдаться после удаления зуба, при раздражающих воздействиях и даже после чистки зубов [25].

В литературе описано около 30 случаев посттрансфузионного сепсиса, вызванного *Y. enterocolitica*. Эта грамотрицательная бактерия вызывает энтероколит, сопровождающийся диареей, низкотемпературной лихорадкой и болями в животе. По данным Центра по контролю за заболеваниями (Centre Diseases Control and Prevention, CDC, Атланта, США), 75% септических реакций, вызванных *Y. Enterocolitica*, обусловлены трансфузией компонентов крови доноров, признавших в том, что донации крови предшествовала диарея [22]. Трансфузионный сепсис *Y. enterocolitica* заметно варьирует от страны к стране: частота в Новой Зеландии составляет 1/65 000, а для США – 1/500 000 [23, 24].

Б. Бактериальная контаминация в процессе забора крови

Это наиболее частая причина контаминации компонентов крови, поскольку полностью стерилизовать кожу донора во время флеботомии невозможно. Частота положительных результатов при бактериальном анализе смывов кожи после дезинфекции составляет 2–6% [26]. Однако контаминация донорской крови возможна и

при отрицательных результатах бактериального анализа, что обусловлено наличием бактерий в глубоких слоях кожи, недоступных при подготовке поверхностных смывов, но контактирующих с иглой в процессе забора крови [27, 28]. Кожа донора может быть контаминирована и нехарактерными для нее бактериями. Известен случай фатальной септической реакции, вызванной контаминацией кожи донора *Clostridium perfringens* [29].

В. Бактериальная контаминация систем для забора и хранения крови (контейнеров и трубок)

Микрповреждения в контейнерах или некачественные спайки трубок служат частой причиной бактериальной контаминации клеточных компонентов крови и посттрансфузионного сепсиса [2, 30]. Описаны случаи контаминации крови при отсутствии каких-либо дефектов в материале, вызванные загрязнением наружной поверхности контейнера. Так, в 1999 году был зарегистрирован случай группового сепсиса, индуцированного *Serratia marcescens*, у 6 пациентов после трансфузии эритроцитов и тромбоцитов [31].

Стратегии уменьшения риска посттрансфузионного бактериального инфицирования реципиентов

А. Улучшение дезинфекции кожи донора

При анализе донорской крови выделяются те же бактерии, которые содержатся на коже, поэтому тщательная дезинфекция локтевого сгиба может значительно уменьшить бактериальную контаминацию компонентов крови.

Б. Удаление первой аликвоты донорской крови

В последние годы показано, что отбрасывание первых 15–30 мл донорской крови существенно снижает частоту ее бактериальной контаминации [34–36]. В связи с этим были разработаны контейнеры с дополнительной емкостью на 30–50 мл, которые рекомендованы для забора крови в настоящее время.

В. Претрансфузионная детекция бактерий

До сих пор отсутствует удовлетворительный метод детекции бактерий в донорской крови [7]. Претрансфузионная детекция бактерий является более сложной, чем традиционное тестирование трансмиссивных заболеваний, потому что число бактерий, присутствующих в клеточных компонентах крови, обычно очень незна-

чительно (менее чем 10 микроорганизмов/мл) и в ряде случаев не детектируется даже высокочувствительными инструментальными методами анализа [7]. Широко применяемое окрашивание по Граму является относительно быстрым методом бактериальной детекции, однако его чувствительность невысока, что зачастую приводит к ложноотрицательным результатам [7].

Г. Уменьшение числа трансфузий

Поскольку трансфузия клеточных элементов крови является достаточно травматичной и небезопасной операцией, рекомендуется применять ее только в действительно необходимых случаях.

Д. Инактивация патогенов

За последние 10 лет показано, что при помощи фотодинамических и фотохимических методов обработки можно уменьшить концентрацию вирусов, бактерий и простейших в клеточных компонентах крови [7]. Эти методы основаны на комбинированном действии псоралена, ультрафиолетового излучения диапазона В и метиленового синего или фталоцианинов [37–40].

Для инактивации бактерий в тромбоконцентратах предложено новое производное псоралена – amotosalen (S-59) в комбинации с ультрафиолетовым облучением: 150 мк S-59 и 3 J/cm² УФ [41]. Данные методы широко применяются для подготовки трансфузионных компонентов в США, Канаде и Европе.

Заключение

Септические реакции до настоящего времени остаются серьезными осложнениями, возникающими в результате трансфузии клеточных элементов крови. Для их уменьшения предложен целый ряд мер (см. ниже), многие из которых, хотя и находятся в стадии исследования, тем не менее уже внедрены в практику гемотрансфузии в целом ряде стран [7, 42, 43].

Стратегия уменьшения риска посттрансфузионного бактериального сепсиса

I. Уменьшение контаминации компонентов крови

1. Улучшение эффективности скрининга доноров
2. Улучшение дезинфекции кожи в участке венопункции
3. Удаление первой аликвоты донорской крови

- II. Улучшение процесса получения и хранения компонентов крови
 - 1. Оптимизация температуры хранения
 - 2. Ограничение времени хранения
 - 3. Удаление лейкоцитов
- III. Уменьшение трансфузий реципиентам
 - 1. Сокращение до возможного минимума показаний к трансфузиям компонентов крови
 - 2. Уменьшение трансфузий эритроцитов и тромбоцитов, полученных из цельной крови доноров
 - 3. Увеличение использования аферезных компонентов
- IV. Проведение претрансфузионной детекции бактерий
 - 1. Визуальный контроль компонентов перед трансфузией
 - 2. Прямое специфическое окрашивание проб на выявление бактериальной контаминации
 - 3. Специфический тест на выявление бактериальных хромосом
 - 4. Исследование на бактериальные эндотоксины
 - 5. NAT-тестирование бактериальной ДНК
 - 6. Измерение продукции CO₂, выделяемого бактериями
 - 7. Измерение потребления O₂ бактериями
 - 8. Культивирование проб в питательных средах с их последующим высокочувствительным инструментальным анализом
- V. Инактивация патогенов

Литература

- 1. Borden C.W., Hall M.F.: Fatal transfusion reactions from massive bacterial contamination of blood. *N Engl J Med* 1951; 245:760–765
- 2. Goldman M., Blajchman M.A.: Bacterial contamination; in Popovsky M. (ed): *Transfusion Reactions*, 2nd edn. Bethesda, MD, AABB, 2001:133–159
- 3. Blajchman M.A.: Bacterial contamination and proliferation during the storage of cellular blood products. *Vox Sang* 1998; 74:155–159
- 4. Sazama K.: Reports of 355 transfusion associated deaths: 1976 through 1985. *Transfusion* 1990; 30:583–590
- 5. Honig C.L., Bove J.R.: Transfusion-associated fatalities: Review of Bureau of Biologics reports 1976–1978. *Transfusion* 1980; 20:653–661
- 6. Blajchman M.A., Ali A.M.: Bacteria in the blood supply: An overlooked issue in transfusion medicine; in: *Blood Safety: Current Challenges*. Nance, SJ (ed): Bethesda, MD, AABB, 1992:213–228

7. Blajchman M.A.: Incidence and significance of the bacterial contamination of blood components. *Dev Biol Stand* 2002; 108:59–67
8. Morrow J.F., Brane H.G., Kickler T.S. et al.: Septic reactions to platelet transfusions. *JAMA* 1991; 266:555–558
9. Barrett B.B., Anderson J.W., Anderson K.C.: Strategies for the avoidance of bacterial contamination of blood components. *Transfusion* 1993; 33:228–233
10. Yomtovian R., Lazarus H.M., Goodnough L.T. et al.: A prospective microbiologic surveillance program to detect and prevent the transfusion of bacterially contaminated platelets. *Transfusion* 1993; 33:902–909
11. Chui E.K.W., Yuen K.Y., Lie A.K. et al.: A prospective study on symptomatic bacteremia from platelet transfusion and its management. *Transfusion* 1994; 34:950–965
12. Blajchman M.A., Ali A., Lin P. et al.: A prospective study to determine the frequency of bacterial contamination in random donor platelet concentrates (Abstract). *Blood* 1994; 84:529
13. Leiby D.A., Kerr K.L. et al.: A prospective analysis of microbial contaminated random-donor platelets from multiple sites. *Transfusion* 1997; 37:259–263
14. Blajchman M.A., Ali A., Lin p. et al.: Bacterial surveillance of platelet concentrates: Quantitation of bacterial load (Abstract). *Transfusion* 1997; 37:74S
15. Dzieczkowski J.S., Barrey B.B., Nester D. et al.: Characterization of reactions after exclusive transfusion of white cell-reduced cellular blood components. *Transfusion* 1995; 35:20–25
16. AuBuchon J.P., Cooper L.K., Leach M.F. et al.: Experience with universal bacterial culturing to detect contamination of apheresis platelet units in a hospital transfusion service. *Transfusion* 2002; 42:855–861
17. Perez P., Salmi L.R., Folley G. et al.: Determinants of transfusion associated bacterial contamination: Result of the French BACTEM case-Control Study. *Transfusion* 2001; 41:862–872
18. Kuchnert M.J., Roth V.R., Haley R. et al.: Transfusion-transmitted bacterial infection in the United States, 1998 through 2000. *Transfusion* 2001; 41:1493–1499
19. Ness P., Braine H., King K. et al.: Single-donor platelets reduce the risk of septic platelet transfusion reactions. *Transfusion* 2001; 41:857–861
20. Dodd R.Y., Notary I.V., Stramer S.L.: Current prevalence and incidence of infectious disease markers and estimated window-period risk in the American Red Cross blood donor population. *Transfusion* 2002; 42:975–979
21. Kleinman S., Chan P., Robillard P.: Risk associated with transfusion of cellular blood components in Canada. *Tranfus Med Rev* 2003; 17:120–162

22. Grossman B.J., Kollins P., Lau P.M. et al.: Screening blood donors for gastrointestinal illness: A strategy to eliminate carriers of *Yersinia enterocolitica*. *Transfusion* 1991; 31:500–501
23. Theakston E.P., Morris A.J., Streat S.J. et al.: Transfusion-transmitted *Yersinia enterocolitica* infection in New Zealand. *Aust N Z J Med*. 1997; 5:73–83
24. Beresford A.M.: Transfusion reaction due to *Yersinia enterocolitica* and review of other reported cases. *Pathology* 1995; 27:133–135
25. Goldman M., Blajchman M.A.: Blood product associated bacterial sepsis. *Transfusion Vtd Rev* 1991; 5:73–83
26. Shifman R.B., Pindur A.: The effect of skin disinfection materials of reducing blood culture contamination. *Am J Clin Pathol* 1993; 99:536–538
27. Gibson T., Norris W.: Skin fragments removed by injection needles. *Lancet* 1958; 2:983–985
28. Anderson K.C., Lew M.A., Gordone B.C. et al.: Transfusion-related sepsis after prolonged platelet storage. *Am J Med* 1986; 81:405–411
29. McDonald C.P., Hartley S., Orchard K. et al.: Fatal *Clostridium perfringens* sepsis from a pooled platelet transfusion. *Transfusion Med* 1998; 8:19–22
30. Hogman C.F., Engstrand L.: Serious bacterial complications from blood components-how do they occur? *Transfusion Med* 1998; 8:1–3
31. Hogman C.F., Fritz H., Sandberg L.: Posttransfusion *Serratia marcescens* septicemia . *Transfusion* 1993; 33:189–191
32. Goldman M., Roy G., Frechette N. et al.: Evaluation of donor skin disinfection methods. *Transfusion* 1997; 37:309–312
33. McDonald C.P., Lowe P., Roy A. et al.: Evaluation of donor arm disinfection techniques. *Vox Sang* 2001; 80:135–141
34. Bruneau C., Perez P., Chassaigne M. et al.: Efficacy of new collection procedure for preventing bacterial contamination of whole-blood donations. *Transfusion* 2001; 41:74–81
35. de Korte D., Marcelis J.H., Soeterboek A.M.: Determination of the degree of bacterial contamination of whole-blood collections using an automated microbe-detection system. *Transfusion* 2001; 41:815–818
36. Wagner S.J., Robinette D., Friedman L.I. et al.: Diversion of initial blood flow to prevent whole-blood contamination by skin surface bacteria: An in vitro model. *Transfusion* 2000; 40:335–338
37. Ben-Hur E., Moor A.C.E., Margolis Nunno H. et al.: The photodecontamination of cellular blood components: Mechanisms and use of photosensitization in transfusion medicine. *Transfusion Med* 1997; 10:15–22
38. Corash L.: Inactivation of viruses, bacteria, protozoa, and leukocytes in platelet concentrates: Current research perspectives. *Transfusion Med Rev* 1999; 13:18–30

39. Chapman J: Progress in improving the pathogen safety of red cell concentrates/ *Vox Sang* 2000; 78:203–204
40. Goodrich R.P.: The use of riboflavin for inactivation of pathogens in blood products. *Vox Sang* 2000; 78:211–215
41. Lin I., Cook D.N., Wieseahn G.P et al.: Photochemical inactivation of viruses and bacteria in platelet concentrates by use of a novel psoralen and long-wavelength ultraviolet light. *Transfusion* 1997; 37:423–435
42. Engelfiet C.P., Reesink H.W., Blajchman M.A. et al.: International Forum: Bacterial contamination of blood components. *Vox Sang* 2000; 78:59–67
43. Hillyer C.D., Josephson C.D., Blajchman M.A. et al.: Bacterial contamination of blood components: risk, Strategies and regulation/ *Hematology (American Society of Hematology Education Program)* 2003; 575–589.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	3
МЕТОДЫ ГЕНАМПЛИФИКАЦИИ В СЛУЖБЕ КРОВИ, МЕДИЦИНЕ И БИОЛОГИИ (Краткая информация)	4
NAT-СКРИНИРОВАНИЕ ДОНАЦИЙ КРОВИ И ПЛАЗМЫ В США: ЭВОЛЮЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ И РЕГУЛИРУЮЩЕЙ ПОЛИТИКИ. <i>E. Tabor, J. C. Epstein</i>	9
ВИРУСНАЯ ДИАГНОСТИКА В ПРОЦЕССЕ СКРИНИНГА ДОНОРОВ КРОВИ. <i>S. L. Stramer</i>	23
ВОЗМОЖНОСТЬ, ЭФФЕКТИВНОСТЬ И СЕБЕСТОИМОСТЬ NAT-ТЕСТИРОВАНИЯ В ГЕРМАНИИ. <i>E. Seifried, W. K. Roth</i>	31
ТРАНСФУЗИОННО-ПЕРЕДАВАЕМЫЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ИНФЕКЦИИ: РИСКИ, ИСТОЧНИКИ И ПУТИ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ. <i>S. J. Wagner</i>	37
БАКТЕРИАЛЬНАЯ КОНТАМИНАЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ КОМПОНЕНТОВ КРОВИ: РИСКИ, ИСТОЧНИКИ И КОНТРОЛЬ. <i>M. A. Blajchman</i>	49

Сборник информационных материалов

**СЕГОДНЯ И ЗАВТРА
ГЕНАМПЛИФИКАЦИОННОГО
ТЕСТИРОВАНИЯ ДОНОРСКОЙ КРОВИ
НА ПАТОГЕНЫ**

Редактор
Оригинал-макет

*В.И. Офицеров
О.Н. Савватеева*

Подписано в печать 15.02.2005. Формат 60×84¹/₁₆.
Гарнитура Century SchoolBook.
Бумага офсетная. Усл. печ. л. 3,75.
Тираж 300 экз. Заказ № 10

Типография ЗАО «Вектор-Бест» 630559, Новосибирская область, п. Кольцово,
а/я 121, тел. (3832) 27-67-68, 36-60-60