

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«РОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ГЕМАТОЛОГИИ И ТРАНСФУЗИОЛОГИИ»  
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И  
СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

РАЗРЕШЕНИЕ  
НА ПРИМЕНЕНИЕ НОВОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ

ФС № 2011/177 ОТ 30 ИЮНЯ 2011

ТЕХНОЛОГИЯ ЗАГОТОВКИ И СОЗДАНИЯ ЗАПАСОВ  
ЛЕЙКОФИЛЬТРОВАННЫХ КАРАНТИНИЗИРОВАННЫХ ЭРИТРОЦИТОВ  
ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ И ИНФЕКЦИОННОЙ  
БЕЗОПАСНОСТИ ИХ ТРАНСФУЗИЙ

(МЕДИЦИНСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ)

Санкт-Петербург  
2010

## АННОТАЦИЯ

В медицинской технологии предлагается метод заготовки лейкофильтрованных эритроцитов, подвергнутых криоконсервированию при умеренно низких температурах, в целях их карантинизации. Повторное обследование доноров через 6 месяцев и подтверждение отрицательных результатов первичного тестирования позволят считать эритроциты безопасными в отношении декретированных гемотрансмиссивных инфекций. Лейкофльтрация эритроцитарной массы до хранения обеспечит надежную профилактику иммунологических и инфекционно-вирусных посттрансфузионных осложнений, связанных с присутствием в размороженных отмытых эритроцитах примесей донорских лейкоцитов.

Доказаны отсутствие отрицательного влияния лейкофльтрации на сохранность морфо-функциональных свойств эритроцитов в процессе их криоконсервирования и пригодность данной эритроцитарной среды для трансфузий.

Определены показания для клинического применения лейкофильтрованных карантинизированных эритроцитов.

Технология предназначена для специалистов службы крови. Уровень внедрения: СПК, ОПК ЛПУ, имеющие криобанки эритроцитов и осуществляющие карантинизацию плазмы.

### Авторы

Доктор медицинских наук, профессор В.Н. Мельникова  
Кандидат медицинских наук Г.Ю. Кирьянова  
Кандидат медицинских наук О.И. Филиппова

### Рецензенты

Профессор кафедры трансфузиологии и гематологии СПбМАПО,  
заслуженный врач РФ, чл.- корр. ПАНИ, доктор медицинских наук И.Г.Дуткевич

Ведущий научный сотрудник научно-исследовательского отдела крови и тканей  
научно-исследовательского центра Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова  
доктор медицинских наук, профессор А.В. Четкин

Заявитель: Федеральное государственное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» Федерального медико-биологического агентства.

### **Список сокращений и условных обозначений**

ВГВ – вирус гепатита В

ВГС - вирус гепатита С

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

HBsAg - поверхностный антиген гепатита В

ПЦР - полимеразная цепная реакция

ЭМ – эритроцитная масса

ЭВ – эритроцитная взвесь

РОЭ – размороженные отмытые эритроциты

ЛРОЭ – лейкофильтрованные размороженные отмытые эритроциты

МДС – миелодиспластический синдром

ХПН – хроническая почечная недостаточность

## СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
1. ВВЕДЕНИЕ.....	5
2. ПОКАЗАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ.....	6
3. ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ.....	7
4. МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ.....	7
5. ОПИСАНИЕ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ.....	8
6. ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ И СПОСОБЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ.....	11
7. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ.....	11
8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	14

## ВВЕДЕНИЕ

Совершенствование диагностики вирусных инфекций и тщательный отбор доноров, внедрение методов лейкофильтрации компонентов крови, вирусной инактивации и карантинизации плазмы позволили в настоящее время снизить опасность гемотерапии. Тем не менее, у трансфузионнозависимых пациентов, особенно онкогематологических больных, риск инфицирования гемотрансмиссивными инфекциями остается достаточно высоким [1]. Так, расчетная частота появления новых случаев инфицирования ВГС составляет 293 на 1000 таких больных в течение одного года пребывания в стационаре [2].

В нашей стране только в течение 2000-2003 г.г. зарегистрировано более 1,1 млн. впервые выявленных носителей ВГВ и ВГС [3]. По данным В.М. Русанова, 20-30% доноров-носителей вируса гепатита В не выявляется на ранних стадиях заболевания с применением теста на детекцию HBsAg [4]. Проблема усугубляется чрезвычайно высокой инфекционностью ВГВ: заражение человека происходит при попадании в организм 10-100 полноценных вирусных частиц (с  $10^{-6}$ - $10^{-7}$  мл трансфузионной среды). Известно, что удельный вес посттрансфузионного гепатита среди больных гепатитом В составляет по данным разных авторов от 2% до 18%, а среди детей первого года жизни – 77-89%. Передача вирусной инфекции возможна из-за наличия сероконверсионного окна, во время которого патоген уже находится в крови донора, а специфический иммунный ответ организма еще не проявляется.

Учитывая сложности диагностики этих опасных инфекций, дополнительной мерой их предупреждения у реципиента является карантинизация эритроцитных сред, наряду с уже широко применяемой в практике службы крови карантинизацией плазмы.

Поскольку продолжительность фазы «диагностического окна» при декретированных гемотрансмиссивных инфекциях, варьируя в широких пределах, не превышает 6-ти месяцев, в случае карантинизации эритроциты должны храниться в течение этого времени. По истечении срока 6-ти месяцев необходимо провести повторное обследование донора с подтверждением полученных ранее отрицательных результатов клинико- лабораторного тестирования (*HBs*-антиген, антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, к вирусу гепатита С, *Treponema pallidum* и биохимические показатели крови).

Единственным способом долгосрочного хранения эритроцитов, в том числе и для обеспечения возможности их карантинизации, является криоконсервирование. Размороженная и отмытая эритроцитная масса имеет, кроме того, преимущества перед другими эритроцитными средами, так как в процессе криоконсервирования разрушается большая часть лейкоцитов и тромбоцитов, а при отмывании от криопротектора удаляются белки плазмы, антитела, строма разрушенных клеток, продукты их метаболизма и цитокины, накопившиеся в среде до замораживания, микроагрегаты. Удаление белков плазмы очень важно для профилактики аллергических реакций (тяжелые аллергические реакции составляют до 22,2% среди посттрансфузионных осложнений), а элиминация анти-HLA и гранулоцитспецифичных аллоантител – для профилактики острого повреждения легких, ассоциированного с трансфузией, и синдрома аллогенной крови [5, 6, 7].

Тем не менее, взвесь размороженных и отмытых красных клеток способна вызвать аллоиммунизацию и другие иммунологические осложнения, т.к. не только оставшиеся в среде лейкоциты (от  $1 \times 10^8$  до  $1 \times 10^7$  в дозе), но и фрагменты разрушенных белых клеток (представляющие до 10% их исходного количества) несут антигенную информацию. Для профилактики этих осложнений представляется целесообразной лейкофильтрация ЭМ до процедуры криоконсервирования [8, 9, 10, 11].

Кроме того, лейкоциты, присутствующие в размороженных отмытых эритроцитах, могут стать вектором переноса герпес-вирусов (цитомегаловируса, Эпштейна-Барр,

герпеса человека 6 и 8 типов), Т-лимфотропного вируса человека 1 типа и риккетсий (*Orientia tsutsugamushi*), являющихся облигатными внутриклеточными паразитами, а также других патогенов [12, 13, 14, 15, 16]. Большинство этих вирусов пожизненно персистируют в организме, и у 8-20% инфицированных они реактивируются под влиянием различных экзо- и эндогенных провоцирующих факторов. Эти люди могут оказаться среди донорского контингента. Герпес-вирусная инфекция у реципиентов с иммуносупрессией может вызывать тяжелые, в том числе злокачественные заболевания. По данным ВОЗ, смертность от герпетической инфекции среди вирусных заболеваний находится на втором месте после гепатита.

В свете вышеизложенного, только сочетание предварительной лейкофильтрации, обеспечивающей снижение количества остаточных лейкоцитов ниже иммуногенного уровня и лейкоцитассоциированных вирусов ниже инфекционного уровня, и карантинизации в течение 6-ти месяцев даст возможность получить максимально на данный момент (пока не разработаны эффективные методы вирусинактивации красных клеток крови) безопасную эритроцитную среду для особой категории пациентов.

Медицинская технология «Технология заготовки и создания запасов лейкофильтрованных карантинизированных эритроцитов для обеспечения иммунологической и инфекционной безопасности их трансфузий» является новой, так как впервые в ней сочетаются методы лейкофильтрации, криоконсервирования и карантинизации красных клеток крови. Сведений о применении аналогичной медицинской технологии за рубежом в доступной нам литературе не найдено. Однако полученные нами данные об отсутствии отрицательного влияния лейкофильтрации на свойства эритроцитов в процессе криоконсервирования согласуются с данными американских исследователей [17], изучавших свойства лейкофильтрованных эритроцитов после хранения при  $-70\pm 5^{\circ}\text{C}$  (не в целях карантинизации).

Предложение использовать отечественный «Комплект устройств полимерных для удаления лейкоцитов и получения безлейкоцитных компонентов консервированной крови «Лейкосеп» даст возможность одновременной карантинизации эритроцитов и плазмы, заготовленных от одного донора (что обеспечивается одним вызовом его для обследования). Это является существенным организационным и экономическим преимуществом предлагаемого метода заготовки лейкофильтрованных карантинизированных эритроцитов.

Разработанная технология лейкофильтрации с последующим криоконсервированием эритроцитов при умеренно низких температурах в целях их карантинизации доступна для широкой практики.

## **ПОКАЗАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ**

Использование лейкофильтрованных карантинизированных эритроцитов, как и других эритроцитсодержащих средств, показано:

1. При хронических анемических состояниях различной природы, в том числе апластической анемии, талассемии, пароксизмальной ночной гемоглобинурии, гемолитической анемии, анемиях, сопутствующих онкогематологическим и гнойно-септическим заболеваниям.
2. При острой кровопотере, обширных травмах и оперативных вмешательствах.
3. При подготовке больных анемией к хирургическим операциям.

Среди вышеперечисленных категорий больных лейкофильтрованные карантинизированные эритроциты в первую очередь предназначены:

- 1) иммуносупрессивным пациентам (онкологическим больным, при трансплантациях органов и тканей, лицам старше 65 лет);

- 2) при предполагаемых многократных переливаниях клеточных компонентов крови;
- 3) в педиатрической практике;
- 4) при многократных беременностях, в родах и в послеродовом периоде;
- 5) больным с посттрансфузионными реакциями и осложнениями в анамнезе;
- 6) HLA-аллоиммунизированным и рефрактерным к трансфузиям тромбоцитов больным;
- 7) пациентам с отягощенным аллергологическим и иммунологическим анамнезом.

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ**

Абсолютные противопоказания к использованию лейкофильтрованных карантинизированных эритроцитов отсутствуют.

Относительными противопоказаниями для трансфузий лейкофильтрованных размороженных отмытых эритроцитов, как и любых других эритроцитных средств являются:

1. Острый септический эндокардит.
2. Прогрессирующее развитие диффузного гломерулонефрита.
3. Острая и хроническая печеночная недостаточность.
4. Декомпенсация кровообращения, пороки сердца в стадии декомпенсации.
5. Гипертоническая болезнь III стадии.
6. Выраженный атеросклероз сосудов головного мозга, тяжелое нарушение мозгового кровообращения.
7. Гипокоагуляционные состояния.
8. Тромбоэмболическая болезнь.
9. Нефросклероз, выраженный общий амилоидоз.
10. Отек легких.
11. Острый ревматизм.

### **МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ**

- «Комплект устройств полимерных для удаления лейкоцитов и получения безлейкоцитных компонентов консервированной крови, однократного применения, «Лейкосеп», №ФС 01262004/0574-04, №ФСР 2009/05579 (ЗАО «НПП «Интероко», Россия) или лейкофильтр для лейкодеплеции ЭМ зарубежного производства, разрешенный к применению в медицинской практике в России (например, Imugard III RC, Terumo corporation, рег. № 98/430 или др.).

- Плазмоекстрактор ПЭ-01 для перемещения компонентов крови из одного полимерного контейнера в другой и вытеснения остатков ЭМ из устройства «Лейкосеп». ТУ 64-1-3655-82. АО НИКИ МЛТ; рег. № 82/670-5.

- Контейнер полимерный для отмывания эритроцитов методом центрифугирования, стерильный, «Синтез», РУ №ФС 01260662/4387-06.

- Криоконсервирующий раствор ЦНИИГПК 11<sub>5</sub>М, растворы хлорида натрия 3,2%, 2,0%, 0,9% для отмывания эритроцитов, взвешивающий раствор ЦНИИГПК-8в готовят по правилам, предусмотренным для приготовления растворов для внутривенного введения согласно действующей Инструкции по криоконсервированию клеток крови, утвержденной Министерством Здравоохранения РФ от 29.05.95 (раздел 3 «Метод криоконсервирования эритроцитов при умеренно низких температурах (-38±2°С) со сниженной концентрацией глицерина») и «Перечню рецептов для консервирования крови

и ее компонентов, костного мозга, используемых в службе крови» МЗ СССР, 1986 г. Для приготовления растворов следует использовать следующие реактивы:

Глицерин - дистиллированный, высшего сорта, удельный вес-1,248; ГОСТ-6824-76.

Маннит – чда, ГОСТ - 8321-74.

Сахароза – чда, ГОСТ -5833 -75.

Глюкоза - кристаллическая, медицинская, ГФХ, ст.311, стр.334.

Хлорид натрия - ГФХ, ст. 426, стр. 442.

Двузамещенный фосфорнокислый натрий ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ , м.в.358,17) ГФХ, стр. 896.

Однозамещенный фосфорнокислый натрий ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , м.в.156,01) ГФХ, стр. 896.

- Биомедицинский холодильник MDF – U5411, SANYO Electric Biomedical Co., рег. № 97/1182 от 21.10.97 или аналогичные. (Температура охлаждения до  $-40^\circ\text{C}$ ).
- Центрифуга Cryofuge 5500i, Kendro Laboratory Products GmbH (Германия) Рег. № РК-МТ-5№002852 от 05.10.05 или аналогичные (не менее 2000 g).
- Процедура карантинизации лейкофильтрованных криоконсервированных эритроцитов проводится по аналогии с организацией карантинизации свежезамороженной плазмы (приказ Министерства Здравоохранения РФ № 193 от 07.05.2003).

## ОПИСАНИЕ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ

Суть данной медицинской технологии заключается в последовательном проведении двух широко используемых в практике службы крови процедур: лейкодеплеции эритроцитной массы и ее криоконсервирования при умеренно низких температурах в течение 6-ти месяцев с целью карантинизации.

Отбор и обследование доноров для заготовки лейкофильтрованных карантинизированных эритроцитов осуществляется в соответствии с «Порядком медицинского обследования донора крови и ее компонентов» (2001 г.). После осмотра терапевтом, проведения беседы о необходимости повторного обследования через 6 месяцев и при отсутствии противопоказаний донор направляется на кроводачу. На него заполняется «Карта донора банка лейкофильтрованных карантинизированных эритроцитов», которая подшивается к карте установленного образца. Целесообразно для заготовки ЛРОЭ привлекать доноров, регулярно сдающих кровь.

Для лейкоредукции заготовленной эритроцитной массы может использоваться отечественный «Комплект устройств полимерных для удаления лейкоцитов и получения безлейкоцитных компонентов консервированной крови, однократного применения, «Лейкосеп» или лейкофильтр зарубежного производства, разрешенный к применению в России.

### **1. Фильтрация ЭМ через «Комплект устройств полимерных для удаления лейкоцитов и получения безлейкоцитных компонентов консервированной крови «Лейкосеп»**

Лейкофильтрация через устройство «Лейкосеп» осуществляется согласно «Инструкции по применению безлейкоцитных компонентов консервированной крови», утвержденной МЗ РФ 11.01.2005 г. и «Руководству по эксплуатации комплекта устройств полимерных для удаления лейкоцитов и получения безлейкоцитных компонентов консервированной крови однократного применения, «Лейкосеп».

Устройство предназначено для последовательной фильтрации плазмы и эритроцитной массы, полученных путем фракционирования дозы консервированной крови одного донора (в соответствии с действующей «Инструкцией по фракционированию консервированной крови на клеточные компоненты и плазму» - МЗ СССР №06-14/24 от 11.06.87), заготовленной в сдвоенные контейнеры. Трубку между контейнерами с плазмой и эритроцитной массой пережимают, не разрезая. Согласно



действующей инструкции допустимо использование консервированной крови не позднее 48 часов после ее заготовки. Однако предпочтение следует отдавать свежезаготовленной крови. Для получения, наряду с безлейкоцитной эритро массой, свежзамороженной (антигемофильной) плазмы фильтрацию необходимо производить в первые 4-6 часов после заготовки крови. Оптимальный уровень гематокрита фильтруемой ЭМ - 65-70% (и не выше 75%).

Основной частью устройства является узел фильтрации, снабженный трубкой с коннектором для стерильного подсоединения к контейнеру с фильтруемой плазмой (а затем эритро массой) и соединенный полимерными магистралями с контейнерами для сбора профильтрованных компонентов крови. Устройство оснащено обходными трубками (шунтами) для вытеснения воздухом оставшейся в фильтровальном узле ЭМ. Коннектор, с помощью которого «Лейкосеп» присоединяется к полимерному контейнеру с плазмой, снабжен специальным устройством для обеспечения полной герметизации и создания закрытой системы фильтрации.

Устройство «Лейкосеп» изготавливается ЗАО «НПП Интероко» по ТУ 9398-073-17121966-2004.

При применении устройства коэффициент фильтрации лейкоцитов составляет не менее 99,95%, содержание остаточных лейкоцитов в дозе эритро массы - не более  $1 \times 10^6$ , содержание остаточных лейкоцитов в дозе плазмы - не более  $5 \times 10^4$ , что соответствует международным стандартам. Фильтрация не вызывает гемолиза эритроцитов.

### **Основные этапы технологии лейкофильтрации**

Закрывают все зажимы устройства. Иглу с коннектором для стерильного подсоединения, проколов мембрану штуцера, вводят в контейнер с плазмой, который подвешивают затем на высоте не более 70 см. Для вытеснения воздуха из узла фильтрации последний располагают выходом вверх. Открыв роликовый и желтый зажимы, заполняют узел фильтрации плазмой и, перевернув его выходом вниз, продолжают фильтрацию плазмы в контейнер для безлейкоцитной плазмы. Затем роликовый зажим закрывают, не допуская попадания воздуха из контейнера в трубку перед фильтром.

Для проведения фильтрации эритро массы ее переводят в контейнер, освободившийся после лейкофильтрации плазмы, который затем подвешивают на высоте 1,5 м. Открыв роликовый зажим, эритро массой вытесняют остатки плазмы из узла фильтрации в контейнер с безлейкоцитной плазмой, закрывают желтый зажим, открывают красный и фильтруют весь объем ЭМ в контейнер для безлейкоцитной ЭМ.

Для вытеснения остатков профильтрованной эритроцитной массы из магистралей и узла фильтрации контейнер с безлейкоцитной плазмой располагают в плазмоекстраторе и собранным в нем воздухом через обходные трубки вытесняют ЭМ сначала со стороны входа, а затем со стороны выхода из фильтровального узла в контейнер с безлейкоцитной ЭМ. Контейнеры с безлейкоцитными компонентами крови герметизируют и отсоединяют.

Технология лейкофильтрации компонентов крови подробно изложена в руководстве по эксплуатации устройства «Лейкосеп», прилагаемой к изделию.

При использовании лейкофильтра зарубежного производства лейкофильтрацию ЭМ осуществляют согласно руководству по эксплуатации данного изделия.

### **2. Криоконсервирование лейкофильтрованной (безлейкоцитной) эритроцитной массы при умеренно низких температурах.**

Криоконсервирование полученной в результате лейкофильтрации эритроцитной массы проводится в соответствии с действующей «Инструкцией по криоконсервированию клеток крови» 1995 г. (раздел 3. «Метод криоконсервирования эритроцитов при умеренно низких температурах ( $-38 \pm 2^\circ\text{C}$ ) со сниженной концентрацией глицерина»).

Этот метод, разработанный в РосНИИГТ, предусматривает использование криозащитного раствора ЦНИИГПК-11<sub>5</sub>М со сниженной в 1,5-2 раза (по сравнению с другими криоконсервантами, используемыми при умеренно низких температурах) концентрацией глицерина, дешевых отмывающих растворов на основе хлорида натрия и упрощенную методику деглицеринизации (с двумя циклами центрифугирования). Он характеризуется низким уровнем трудовых затрат, экономичностью и доступностью для службы крови.

2.1. Глицеринизация. Объем полученной безлейкоцитной ЭМ делится на две равные части с использованием второго контейнера. Удобно для этих целей использовать два «Контейнера для отмывания эритроцитов методом центрифугирования». В каждый из них после переведения ЭМ струйно, но медленно (в течение 5 минут) при постоянном помешивании добавляют равный объем раствора ЦНИИГПК-11<sub>5</sub>М. Полученную взвесь выдерживают при комнатной температуре в течение 15 минут.

2.2. Подготовленную к замораживанию взвесь лейкофильтрованных эритроцитов в полимерных контейнерах помещают в электрохолодильник с маркировкой «Карантинизация» при температуре  $-38\pm 2^{\circ}\text{C}$ , где осуществляется ее нерегулируемое медленное замораживание и последующее хранение в течение 6-7 месяцев (при необходимости – до 9 месяцев).

Лейкофильтрованные эритроциты считаются карантинизованными в случае, если по прошествии 6-ти месяцев со дня сдачи крови донор был признан здоровым (по данным анамнеза, осмотра терапевтом, общеклинического исследования крови, отрицательным тестам на специфические маркеры гемотрансмиссивных инфекций, содержанию АЛТ).

Данные о доноре должны быть проверены по электронной базе единого донорского центра.

На контейнер с эритроцитами наклеивается дополнительная этикетка с информацией о выполненной карантинизации.

2.3. Оттаивание карантинизованных криоконсервированных эритроцитов производят на водяной бане при температуре  $42-44^{\circ}\text{C}$  при постоянном ручном покачивании (60 циклов в одну минуту). Длительность оттаивания зависит от объема взвеси (около 10 минут).

2.4. Отмывание размороженных эритроцитов производят с использованием двух циклов центрифугирования и трех отмывающих растворов натрия хлорида в понижающейся концентрации. В качестве емкости для отмывания эритроцитов целесообразно использовать специальный полимерный контейнер – «Контейнер для отмывания эритроцитов методом центрифугирования» (ТУ 64-2-419-90, АО медицинских препаратов и изделий «Синтез», г. Курган).

Техника деглицеринизации заключается в следующем:

- к оттаянным эритроцитам добавляют отмывающий раствор №1 (3,2% раствор NaCl) в соотношении 1:1, после тщательного перемешивания взвесь центрифугируют при факторе разделения 1250 g и температуре  $20^{\circ}\text{C}$  в течение 15 минут, супернатант удаляют;

- к оставшимся эритроцитам добавляют отмывающий раствор №2 (2,0% раствор натрия хлорида) в соотношении 1:1; после тщательного перемешивания и пятиминутной экспозиции к полученной взвеси добавляют отмывающий раствор №3 (0,9% раствор NaCl) в соотношении 1:1, после перемешивания взвесь центрифугируют в режиме первого отмывания, супернатант удаляют.

2.5. К размороженным отмытым лейкофильтрованным эритроцитам добавляют равный объем ресуспендирующего раствора ЦНИИГПК-8в и перемешивают. Две части разделенной перед замораживанием дозы эритроцитов одного донора на данном этапе (после хранения, размораживания и отмывания) объединяются в одну.

При отсутствии возможности отмывания размороженных эритроцитов в абсолютно функционально закрытой системе (которую обеспечивает использование аппарата для стерильного соединения магистралей), эта процедура должна осуществляться в асептических условиях в боксе для заготовки компонентов крови.

Размороженные отмытые лейкофильтрованные эритроциты должны храниться в электрохолодильнике при температуре  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$  и быть использованы для переливания в течение 24 часов после заготовки. Транспортируют ЭВ в термоизоляционной таре, поддерживающей вышеуказанную температуру.

При определении годности данного трансфузионного средства следует обращать внимание на герметичность контейнера, правильность паспортизации. Критерием годности ЛРОЭ служит прозрачность надстоя с незначительным розовым окрашиванием, равномерность эритроцитного слоя, отсутствие видимых сгустков. Выборочную оценку качества взвеси отмытых лейкофильтрованных эритроцитов производят на основании содержания свободного гемоглобина и показателя гематокрита на микроцентрифуге. Содержание свободного гемоглобина перед трансфузией не должно превышать 2,0 г/л, показатель гематокрита - не ниже 27%.

Бактериологический контроль осуществляется согласно «Инструкции по контролю стерильности консервированной крови, ее компонентов, препаратов, консервированного костного мозга, кровезаменителей и консервирующих растворов» (М., 1995).

Учитывая, что две процедуры (лейкофильтрация и криоконсервирование) приводят к снижению в дозе содержания эритроцитов и гемоглобина по сравнению с нативной ЭМ за счет неизбежных потерь, целесообразно для взрослых реципиентов использовать не менее 2-х доз средства или заготавливать в целях карантинизации эритроциты, полученные методом двойного эритроцитафереза.

## **ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ И СПОСОБЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

При тщательном соблюдении всех пунктов «Инструкции по фракционированию консервированной крови на клеточные компоненты и плазму», «Руководства по эксплуатации комплекта устройств полимерных для удаления лейкоцитов и получения безлейкоцитных компонентов консервированной крови однократного применения, «Лейкосеп» или другого лейкофильтрующего устройства, «Инструкции по криоконсервированию клеток крови» и «Порядка медицинского обследования донора крови и ее компонентов» осложнений при использовании предлагаемой медицинской технологии не наблюдается.

## **ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ**

В настоящее время лейкофильтрованные карантинизированные эритроциты представляются наиболее безопасным для реципиента эритроцитсодержащим средством, так как за счет обеднения лейкоцитами ниже иммуногенного уровня снижается риск развития посттрансфузионных осложнений (аллоиммунизации, рефрактерности к трансфузиям тромбоцитов, пирогенных реакций) и переноса лейкоцитассоциированных вирусов (цитомегаловируса, Эпштейна-Барр, герпеса человека 6 и 8 типов, Т-лимфотропного вируса человека и др.), а повторное обследование донора через 6 месяцев после донации обеспечит более надежную профилактику гепатитов В, С, сифилиса и СПИДа.

Метод криоконсервирования эритроцитов при умеренно низких температурах, примененный в данной технологии для обеспечения карантинизации

лейкофильтрованных эритроцитов, успешно используется в практике службы крови более 15 лет. Проведенное сравнительное изучение сохранности морфо-функциональных свойств эритроцитов, предварительно лейкофильтрованных и нефильтранных, после их низкотемпературного хранения в течение 3-9 месяцев показало отсутствие отрицательного влияния лейкофильтрации (а по ряду показателей ее положительное влияние) на основные параметры РОЭ (табл. 1 и 2).

Таблица 1 – Характеристика взвесей размороженных отмытых эритроцитов (РОЭ) в растворе 8в после хранения при  $-38\pm 2^\circ\text{C}$  в течение 6-ти месяцев

Показатели	РОЭ (контроль) n=14	Лейкофильтрованные РОЭ	
		Лейкосеп (n=20)	Imugard III RC (n=18)
Гематокрит, %	38,4±1,59	33,8±4,51*	39,0±0,79
Свободный гемоглобин, г/л	1,05±0,066	0,67±0,052*	0,74±0,109*
Процент гемолиза	0,42±0,049	0,28±0,021*	0,30±0,053*
ОНЭ, %	1,4±0,16	1,2±0,09	1,0±0,12
Морфологический индекс	92,5±2,01	95,7±0,77	95,8±0,86
Содержание АТФ, мкМ/г Нб	4,04±0,134	4,37±0,109	4,43±0,142
Содержание АТФ, % от исходного	84,3±2,80	90,3±2,27	90,8±2,91
Содержание остаточных лейкоцитов в дозе взвеси	8,3±1,71×10 <sup>6</sup>	0,7 ±0,14×10 <sup>6</sup> *	0,6±0,10×10 <sup>6</sup> *

Примечание: знаком \* обозначено статистически достоверное различие ( $p<0,01$ ) по сравнению с контрольной серией опытов; знаком • обозначено статистически достоверное различие ( $p<0,05$ ) по сравнению с контрольной серией опытов.

Таблица 2 – Характеристика взвесей размороженных отмытых эритроцитов (РОЭ) в растворе 8в после хранения при  $-38\pm 2^\circ\text{C}$  в течение 7 месяцев

Показатели	РОЭ (контроль) n=14	Лейкофильтрованные РОЭ	
		Лейкосеп (n=17)	Imugard III RC (n=16)
Гематокрит, %	37,3±1,12	37,9±1,54	32,1±1,41*
Свободный гемоглобин, г/л	0,94±0,078	0,62±0,080*	0,64±0,077*
Процент гемолиза	0,42±0,056	0,28±0,021*	0,34±0,064
ОНЭ, %	1,4±0,14	1,2±0,14	1,4±0,08
Морфологический индекс	90,9±0,98	94,8±1,08	94,8±1,31
Содержание АТФ, мкМ/г Нб	3,98±0,102	4,21±0,155	4,29±0,085
Содержание АТФ, % от исходного	83,1±2,13	87,0±3,23	87,9±1,74

Содержание остаточных лейкоцитов в дозе взвеси	$10,0 \pm 1,63 \times 10^6$	$0,5 \pm 0,07 \times 10^{6*}$	$0,7 \pm 0,13 \times 10^{6*}$
--	-----------------------------	-------------------------------	-------------------------------

Примечание: знаком \* обозначено статистически достоверное различие ( $p < 0,01$ ) по сравнению с контрольной серией опытов; знаком • обозначено статистически достоверное различие ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольной серией опытов..

Всего после различных сроков хранения (от 3-х до 12-ти месяцев) при  $-38 \pm 2^\circ\text{C}$  исследовано 157 образцов ЛРОЭ (опытные серии) и РОЭ (контрольные серии). По ряду показателей сохранности свойств эритроцитов (морфологический индекс, уровень АТФ, степень гемолиза) отмечено положительное влияние лейкоредукции перед криоконсервированием (в том числе, статистически достоверное).

По нашим данным, при осуществлении описанной выше технологии содержание свободного гемоглобина в готовой к трансфузии взвеси составляет в среднем  $0,68 \pm 0,194$  г/л; показатель гематокрита -  $35,7 \pm 3,03\%$ . Содержание АТФ во взвеси лейкофильтрованных с помощью устройства «Лейкосеп» размороженных отмытых эритроцитов после хранения в течение 6-ти месяцев составляет  $4,37 \pm 0,109$  мкМ/г Нв, морфологический индекс -  $95,7 \pm 0,77$ , содержание осмотически неустойчивых эритроцитов -  $1,2 \pm 0,09\%$ , что в положительную сторону отличается от соответствующих показателей нефильтрованных размороженных отмытых красных клеток. Уровень остаточных лейкоцитов в конечной взвеси лейкофильтрованных эритроцитов ниже иммуногенного (в среднем от  $0,7 \times 10^6$  до  $0,5 \times 10^6$  в дозе при разных сроках хранения) и более чем на порядок ниже, чем в нефильтрованных.

Таблица 3 – Объем взвесей размороженных отмытых эритроцитов в растворе 8в и содержание гемоглобина после хранения при  $-38 \pm 2^\circ\text{C}$  в течение 6-7 месяцев

Показатели	РОЭ (контроль) n=28	Лейкофильтрованные РОЭ		
		В среднем (n=71)	«Лейкосеп» (n=37)	Imugard III RC (n=34)
Объем дозы эритроц. взвеси, мл	$288,3 \pm 7,31$	$271,6 \pm 5,99$	$273,1 \pm 9,80$	$269,7 \pm 4,92$
Содержание гемоглобина в дозе, г	$43,6 \pm 0,74$	$40,7 \pm 0,87$	$40,3 \pm 0,83$	$41,1 \pm 1,68$

Средний объем взвеси лейкофильтрованных с помощью 2-х видов устройств декриоконсервированных эритроцитов составляет  $271,6 \pm 5,99$  мл, содержание гемоглобина в дозе -  $40,7 \pm 0,87$  г, что соответствует стандартам для размороженных отмытых эритроцитов (табл. 3).

Достаточное содержание гемоглобина в дозе, сохранность морфо-функциональных свойств красных клеток крови свидетельствуют о пригодности данной эритроцитной среды для переливания, а эффективная «очистка» от лейкоцитов и карантинизация гарантируют ее максимальную инфекционную и иммунологическую безопасность.

Возможность одновременной карантинизации эритроцитов и плазмы, заготовленных от одного донора при использовании устройства «Лейкосеп» (что обеспечивает один вызов его для обследования), является существенным организационным и экономическим преимуществом предлагаемой технологии заготовки лейкофильтрованных карантинизированных эритроцитов.

В режиме пилотного исследования было проведено первоначальное изучение безвредности и клинической эффективности лейкофильтрованных криоконсервированных эритроцитов. Было перелито 25 доз эритроцитов реципиентам с анемией различного

генеза, в том числе пациентам с МДС и больным ХПН, находящимся на гемодиализе. Реципиентам переливалось по 1-2 дозы ЛРОЭ. Ни в одном случае не было отмечено каких-либо посттрансфузионных реакций и осложнений. Средний прирост гемоглобина через 1 сутки после трансфузии двух доз ЛРОЭ составил  $19,3 \pm 2,73$  г/л.

Таким образом, лейкофилтрованные карантинизированные размороженные отмытые эритроциты, практически лишенные примесей лейкоцитов и плазмы, являются эффективной гемотрансфузионной средой и их практическое применение по показаниям обеспечит надежную профилактику не только иммунологических осложнений и переноса декретированных гемотрансмиссивных инфекций, но и лейкоцитассоциированных инфекций, на наличие которых не проводится обязательное обследование доноров в России. Экономическая эффективность применения этих трансфузионных сред определяется снижением частоты развития посттрансфузионных реакций, осложнений, гемотрансмиссивных заболеваний и, соответственно, уменьшением стоимости и длительности лечения больных.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васкина Е.А., Демьянова В.Т., Загоскина Т.П. Частота вирусных гепатитов у детей с онкогематологическими заболеваниями // Вестник гематологии – 2007– Т.3, №2– С.11.
2. Куликов С.М., Гармаева Т.Ц., Зингерман Б.В. и др. Вирусная безопасность гемотрансфузий и методы ее оценки // Гематол. и трансфузиол. – 2008.– Т. 53, № 4 – С.3-5.
3. Ярославцева Н.Г., Грумбкова Л.О., Туполева Т.А и др. Вирусная безопасность гемотрансфузий: обеспечивают ли ее принятые лабораторные методы выбраковки донорской крови по гепатитам В и С // Гематол. и трансфузиол. – 2006. – Т. 51, №2 – С. 22-26.
4. Русанов В.М. Вирусная безопасность донорской плазмы // Вестник службы крови России – 2008. - №2 – С. 34-37.
5. Лазаренко М.И., Чечеткин А.В., Слащев В.В. и др. Некоторые вопросы безопасности доноров и реципиентов // Гематол. и трансфузиол. – 2007. – Т. 52, №3 – С. 52-54.
6. Chapman C.E., Stainsby D., Jones H. et al. Ten years of hemovigilance reports of transfusion-related acute lung injury in the United Kingdom and the impact of preferential use of male donor plasma. // Transfusion. –2009. – V49, №3 – P. 440-452.
7. Muniz M., Sheldon S., Schuller R.M. et al. Patient-specific transfusion-related acute lung injury // Vox Sanquinis – 2008. – 94 – P.70-73.
8. Connery C.P., Toumpoulis I.K., Anagnostopoulos C.E. Does leukofiltration reduce pulmonary infections in CABG patients? A prospective, randomized study with early results and mid-term survival // Acta Cardiol. – 2005. – V.60, №3 – P. 285-293.
9. Drakos S.G., Stringham J.C., Long J.W. et al. Prevalence and risks of allosensitization in HeartMate left ventricular assist device recipients: the impact of leukofiltered cellular blood product transfusions // Thorac. Cardiovasc. Surg. – 2007. – V.133, №6. – P. 1612-1619.
10. Pruss A., Kalus U., Radtke H. et al. Universal leukodepletion of blood components results in a significant reduction of febrile nonhemolytic but not allergic transfusion reactions // Transfus. Apher. Sci. – 2004. – 30, №1. – P. 41-46
11. Дуткевич И.Г., Андожская И.В., Гольшев А.Я. Актуальные проблемы трансфузиологической помощи в педиатрической практике // Трансфузиология. – 2005. – Т.6, №4 – С. 4-16.
12. Cardo L.J., Salata J., Harman R. et al. Leukodepletion filters reduce *Leishmania* in blood products when used at collection or at the bedside //Transfusion –2006. – V46, №6 – P. 896-902.
13. Cardo L.J., Asher L. Electron micrographic study of the removal of *Trypanosoma cruzi* from

- blood products by leukoreduction filters // *Transfusion* –2006. – V46, №7 – P.1067-1068
14. Visconti M.R., Pennington J., Garner S.F. et al. Assessment of removal of human cytomegalovirus from blood components by leukocyte depletion filters using real-time quantitative PCR // *Blood* – 2004. – V.103 – P. 1137-1139.
  15. Wu Y., Zou S., Cable R. et al. Direct assessment of cytomegalovirus transfusion-transmitted risks after universal leukoreduction // *Transfusion* – 2010. – V.50, №4 – P. 776-786.
  16. Yamaguchi H., Yamada M., Uruma T. et al. Prevalence of viable *Chlamydia pneumoniae* in peripheral blood mononuclear cells of healthy blood donors // *Transfusion* – 2004. – V.44, №7 – P. 1072-1078.
  17. Bandarenko N., Cancelas J., Snyder E.L. Successful in vivo recovery and extended storage of additive solution (AS)-5 red blood cells after deglycerolization and resuspension in AS-3 for 15 days with an automated closed system // *Transfusion* –2007. – V47, №4 – P. 680-686.