

Федеральное медико-биологическое агентство

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии
Федерального медико-биологического агентства»**

**АЛГОРИТМ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ БЕЗОПАСНОСТИ
ГЕМОКОМПОНЕНТНОЙ ТЕРАПИИ У ИММУНОСУПРЕССИВНЫХ
РЕЦИПИЕНТОВ**

Санкт-Петербург

2015

Методические рекомендации посвящены обеспечению безопасности гемотрансфузий в отношении цитомегаловирусной инфекции у различных групп иммуносупрессивных пациентов. Предлагаемый метод может найти применение при проведении гемотрансфузионной терапии реципиентам, имеющим высокий риск развития гемотрансмиссивной цитомегаловирусной инфекции и нуждающимся в использовании ЦМВ-серонегативных продуктов. Определен перечень контингентов таких больных (онкогематологические больные, особенно при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, новорожденные дети, ВИЧ-инфицированные и другие иммуносупрессивные пациенты). Разработан оптимизированный алгоритм обследования доноров на серологические и молекулярно-биологические маркеры ЦМВ-инфекции и обследование на ЦМВ больных «группы риска».

Предназначены для трансфузиологов, врачей клинической лабораторной диагностики, гематологов, инфекционистов и врачей других специальностей, занимающихся лечением больных с иммуносупрессиями.

Область применения: трансфузиология, гематология.

Авторы: С.Д. Волкова, А.В. Чечеткин, С.С. Бессмельцев, В.Н. Чеботкевич, Г.Ю. Кирьянова, Е.И. Кайтанджан, В.В. Бурyleв, Т.А. Матвеева, М.В. Беркос

Рецензенты: доктор медицинских наук, профессор В.А. Исаков

доктор медицинских наук, профессор А.Б. Чухловин

Организация-разработчик: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»

Утверждены заместителем руководителя Федерального медико-биологического агентства Е.Ю. Хавкиной 27.02.2015, Рег.№12-2015

Содержание

Введение	4
Обозначения и сокращения	
Нормативные ссылки	6
Требования к помещениям и технике безопасности	6
Основные нормативные положения	7
1 Порядок проведения ПЦР исследования	7
1.1 Аппаратура, материалы и реактивы	7
1.2 Подготовка материала для исследований	7
1.3 Проведение анализа и учет результатов	7
2 Порядок проведения иммуноферментного анализа	8
2.1 Аппаратура, материалы и реактивы	8
2.2 Подготовка материала для исследований	8
2.3 Проведение анализа и учет результатов	8
3 Алгоритм обследования доноров на ЦМВ и пути реализации негативных гемокомпонентов	9
4 Алгоритм обследования на ЦМВ больных «группы риска» и особенности тактики проведения гемокомпонентной терапии	10
5 Эффективность использования метода	11
Библиография	12

Введение

Обеспечение инфекционной безопасности компонентов и препаратов крови является важнейшей задачей не только службы крови, но и здравоохранения в целом [1, 2, 3]. Использование скрининга на антитела к вирусам гепатитов В, С и ВИЧ в комплексе с применением NAT-технологий для индикации геномов этих вирусов позволило свести к минимуму риск гемотрансфузионной передачи этих инфекционных агентов [4].

Вместе с тем существуют группы больных, для которых представляют смертельную опасность инфекционные агенты, безвредные в большинстве случаев для иммунокомпетентных реципиентов. К ним, в частности, относятся вирусы группы герпеса и, в первую очередь, цитомегаловирус человека (ЦМВ). Этот инфекционный агент вызывает нетяжелые осложнения в 1,2-1,5% даже у иммунокомпетентных реципиентов. У иммунодефицитных пациентов риск развития инфекционных осложнений значительно выше. Так, у иммунокомпрометированных онкогематологических больных летальность при ЦМВ-ассоциированной интерстициальной пневмонии достигает 80-90% [5]. К группе риска относятся также новорожденные дети, беременные женщины, реципиенты аллогенных трансплантатов и другие группы иммуносупрессивных больных и, особенно, ВИЧ-инфицированные на стадии СПИДа [6, 7]. Такие пациенты должны получать гемокомпоненты, отобранные и/или обработанные с целью свести до минимума риск развития ЦМВ-инфекции.

Ввиду того, что ЦМВ персистирует в лейкоцитах крови, лейкофильтрация существенно снижает содержание вируса в гемокомпонентах. Однако риск заражения ЦМВ остается. Поэтому, по мнению ряда исследователей, более эффективным для предотвращения передачи вируса при трансфузиях является использование серонегативных гемокомпонентов. В России тестирование доноров на маркеры ЦМВ не предусмотрено. В то же время скрининг донорской крови на серологические маркеры ЦМВ инфекции в США, Канаде и странах Западной Европы внедрен в практику еще в конце прошлого века [2, 8].

В методических рекомендациях описан оптимизированный алгоритм обследования доноров на серологические и молекулярно-биологические маркеры ЦМВ инфекции и обследование на ЦМВ больных «группы риска». Для реализации предлагаемых методов скрининга используется стандартное оборудование для проведения ПЦР и ИФА, зарегистрированное и широко используемое в учреждениях службы крови нашей страны.

Обозначения и сокращения

АТ	– антитела
ВИЧ	– вирус иммунодефицита человека
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ИФА	– иммуноферментный анализ
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
ЦМВ	– цитомегаловирус
IgG, IgM	– иммуноглобулины классов G и M
NAT-тестирование	– генамплификационное тестирование

2 Нормативные ссылки

СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности и возбудителями паразитарных болезней».

СП 1.3.2518-09 Дополнения и изменения N 1 к СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности и возбудителями паразитарных болезней».

МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории».

МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I - IV групп патогенности».

СП 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

3 Требования к помещениям и технике безопасности

1. Планировка помещений лаборатории и организация работы по проведению ПЦР исследований осуществляют в соответствии с МУ 1.3.2569-09.

2. При контакте с исследуемым материалом необходимо соблюдать меры предосторожности, изложенные в СП 1.3.2322-08, СП 1.3.2518-09.

3. Утилизацию исходных субстратов и отходов ПЦР исследования проводят в соответствии с СанПиН 2.1.7.2527-09, МУ 1.3.2569-09.

Основные нормативные положения

1 Порядок проведения ПЦР исследования

1.1 Аппаратура, материалы и реактивы

Стандартное оборудование для ПЦР-лаборатории отечественного и зарубежного производства, зарегистрированное в Российской Федерации: амплификаторы, анализаторы нуклеиновых кислот.

Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером на 0,5-10 мкл, 1-200 мкл и 1-1000 мкл.

Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл.

Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР на 0,2 мл (плоская или куполообразная крышка в зависимости от типа используемого прибора).

Наборы реагентов для выделения ДНК из клинического материала (кровь, ликвор, моча и др.), основанные на лизисе клеток детергентами и сорбции нуклеиновых кислот типа «ДНК-сорб» (или эквивалент) и «Проба ГС» (или эквивалент), имеющие номера Государственной регистрации в Российской Федерации.

Набор реагентов для выявления ДНК цитомегаловируса (CMV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

1.2 Подготовка материала для исследований

Взятие крови осуществляется в одноразовые пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл, содержащие 100 мкл 6% раствора ЭДТА.

1.3 Проведение анализа и учет результатов

Анализ, включая выделение ДНК, и учет результатов реакции проводится в соответствии с инструкцией по применению набора реагентов для выявления ДНК цитомегаловируса человека. Чувствительность определения ДНК ЦМВ методом ПЦР в реальном времени составляет 50–100 вирусных геномов на пробу.

2 Порядок проведения иммуноферментного анализа

2.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Стандартное оборудование для выполнения ИФА, зарегистрированное в Российской Федерации.

Диагностические наборы реагентов для выявления иммуноглобулинов класса G и M к цитомегаловирусу, зарегистрированные и разрешенные МЗ РФ к применению на территории Российской Федерации [9, 10].

2.2 Подготовка материала для исследований

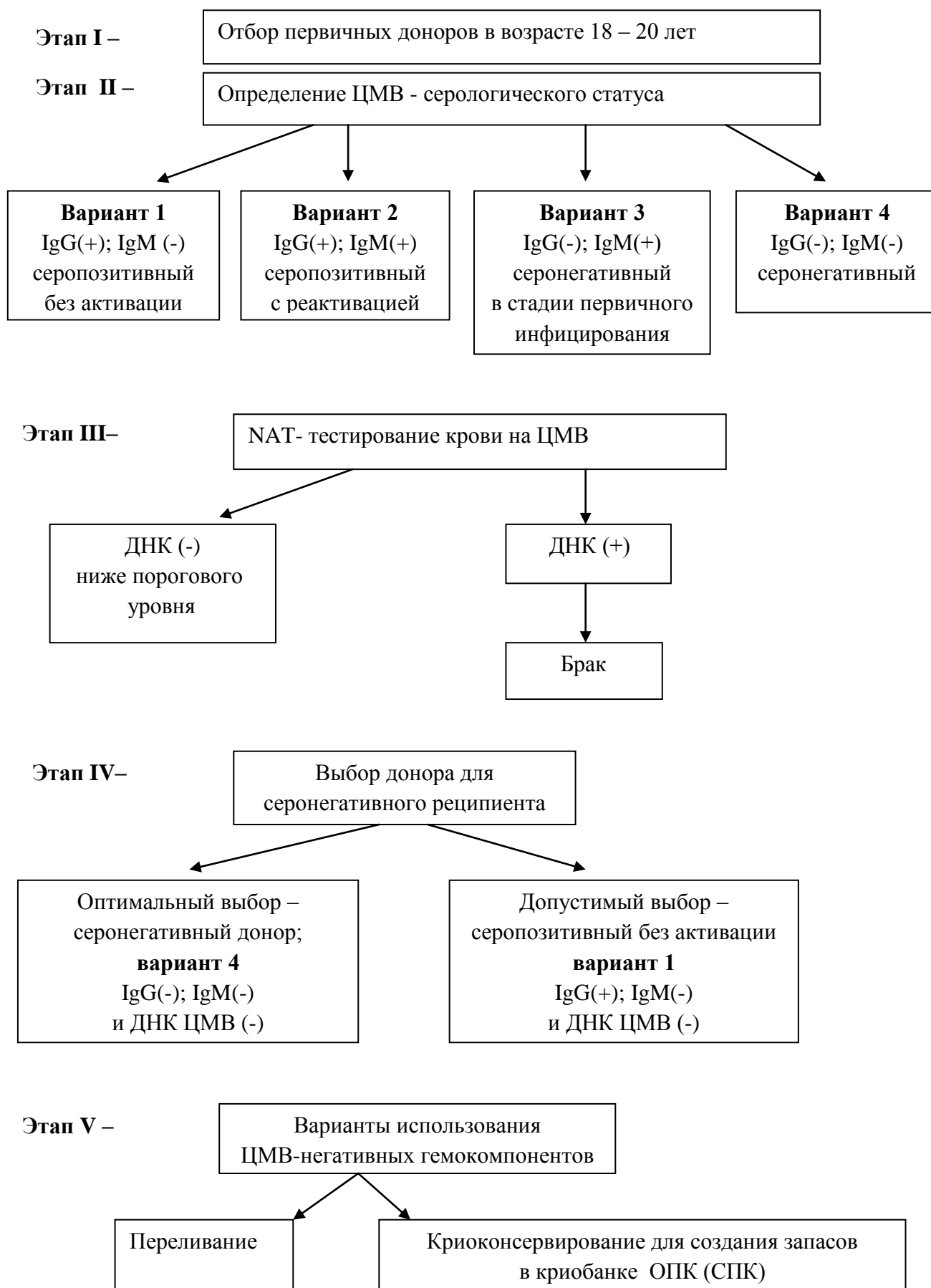
Взятие крови осуществляется при помощи вакуумных пробирок объемом 10 мл, не содержащих антикоагулянты.

2.3 Проведение анализа и учет результатов

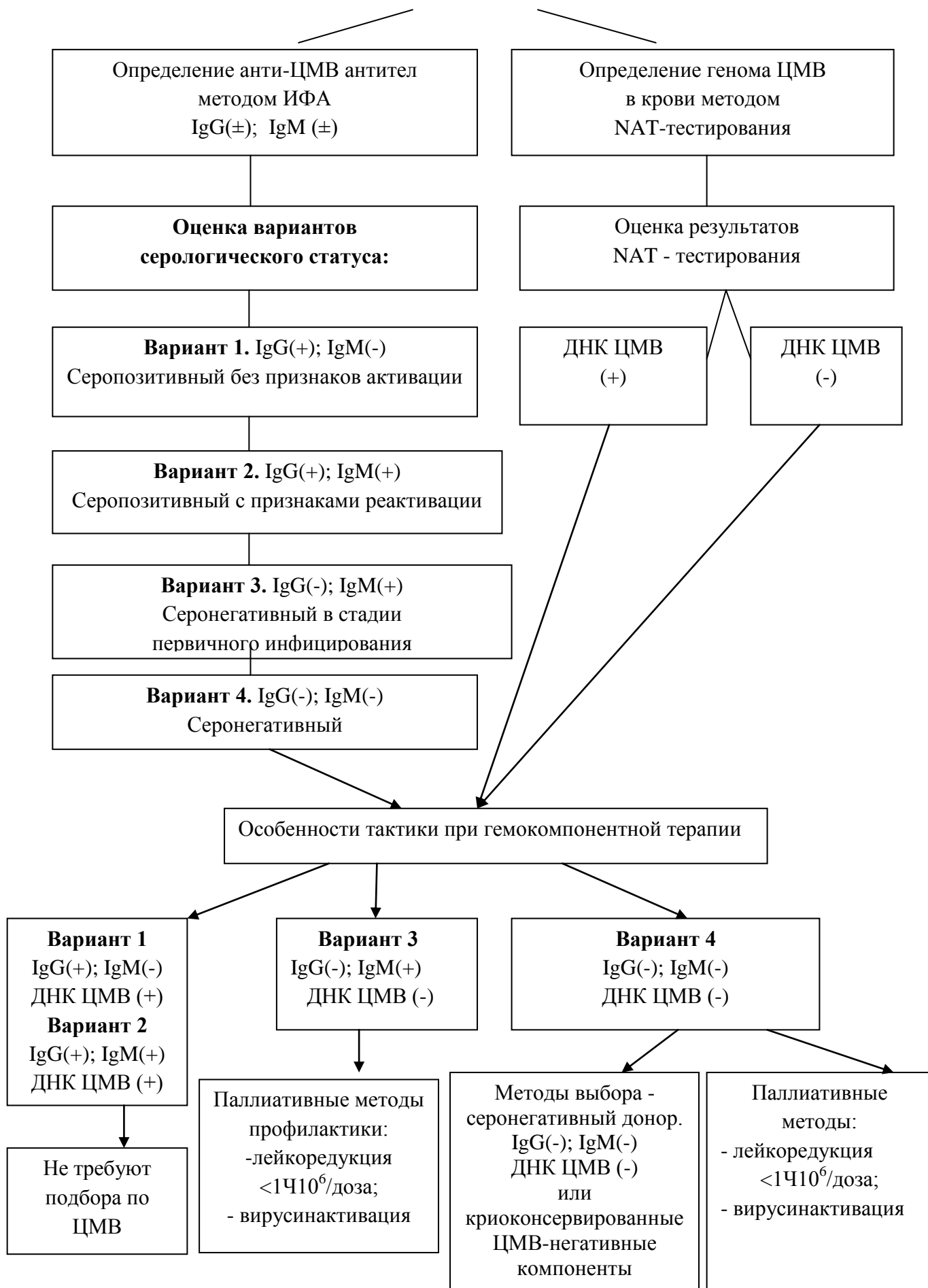
Анализ и учет результатов реакции проводится в соответствии с инструкцией по применению набора реагентов для выявления иммуноглобулинов классов G и M к цитомегаловирусу.

Серонегативной считается кровь донора (или больного) при отсутствии в ее сыворотке определяемых количеств IgGиIgM антител к цитомегаловирусу.

3 Алгоритм обследования доноров на ЦМВ и пути реализации негативных гемокомпонентов



4 Алгоритм обследования на ЦМВ больных «группы риска» и особенности тактики проведения гемокомпонентной терапии



5 Эффективность использования метода

Собственные результаты обследования 570 доноров с использованием разработанного алгоритма позволили выявить 11% ЦМВ-серонегативных доноров (IgG- и IgM-) по данным ИФА, а также доказать отсутствие генома ЦМВ в клетках крови (ПЦР real-time ниже порогового уровня) в 100% случаев на момент кроводачи, что позволило использовать гемокомпоненты без риска трансмиссии ЦМВ [7, 11].

Использование разработанного алгоритма при обследовании 580 онкогематологических больных позволило определить клиническую потребность в ЦМВ-негативных донорах, которая составила около 5% у больных гематологической клиники ФБГУ РосНИИГТ ФМБА России.

В целом внедрение в практику алгоритмов обследования донора и реципиента на ЦМВ, основанных на результатах ИФА и NAT-тестирования, позволит существенно уменьшить опасность трансмиссии ЦМВ при гемотрансфузиях и создаст предпосылки для организации банка криоконсервированных ЦМВ-негативных гемокомпонентов для больных «группы риска» и детей раннего возраста.

Библиография

- [1] Донор и реципиент в 21 веке: необходимость расширения спектра исследуемых вирусных маркеров / Т.А. Гаранжа, Д.С. Тихомиров, Т.А. Туполева и др. // Молекулярная диагностика. – сб. трудов VII Всеросс. конф. – М. – 2010. – Т. 1.– С. 56.
- [2] Руководство по приготовлению, использованию и обеспечению качества компонентов крови // Рекомендация №R (95)15. – Европейский комитет (частичное соглашение) по переливанию крови (CD-P-NS). – 2010. – Изд. 16. – С. 203-205.
- [3] Техническое руководство AABB. – 2000. – С. 30-47.
- [4] Генамплификационное (NAT) тестирование крови и других материалов на патогены и мутации / Н.А. Федоров, А.А. Ёлов, Ю.С. Суханов и др. // М., Полиграфсервис. – 2003. – С. 210.
- [5] Факторы риска цитомегаловирусной инфекции у пациентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток / Д.Н. Балашов, П.Е. Трахтман, Е.В. Скоробогатова и др. // Онкогематология. – 2010. – № 4. – С. 20-26.
- [6] Приказ МЗ РФ № 183 от 2 апреля 2013 г. «Об утверждении правил клинического использования донорской крови и ее компонентов».
- [7] Волкова С.Д., Кирьянова Г.Ю., Беркос М.В. Серологические маркеры ЦМВ и ВЭБ инфекций в донорской крови // Вестник Службы крови России. – 2014. – № 1. – С. 35-39.
- [8] Касьянов А.Д., Рыжкова Т.В. Частота выявления герпесвирусной инфекции у кадровых доноров гемокомпонентов // Трансфузиология. – 2007. – Т.8. – № 1-2. – С. 22-23.
- [9] Косова Е.Ю., Прасолова М.А. Цитомегаловирусная инфекция. Лабораторная диагностика ЦМВИ // Памятка врачу. – Новосибирск. ЗАО «Вектор-Бест». – 2010. – С. 1-11.
- [10] Тихомиров Д.С. Лабораторная диагностика герпесвирусных инфекций у гематологических больных // Автореф. дисс. к.б.н. – М. – 2009. – 22 с.
- [11] Герпесвирусные инфекции и проблемы инфекционной безопасности гемотрансфузий у иммуносупрессивных больных / В.Н. Чеботкевич, С.Д. Волкова, В.В. Бурылев и др. // Трансфузиология. – 2012. – Т.13. - № 1. – С. 22-41.