

*На правах рукописи*

ТУПОЛЕВА ТАТЬЯНА АЛЕКСЕЕВНА

СТРАТЕГИЯ ПОВЫШЕНИЯ ВИРУСНОЙ БЕЗОПАСНОСТИ  
КОМПОНЕНТОВ ДОНОРСКОЙ КРОВИ

14.01.21 – гематология и переливание крови

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Москва – 2019

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении  
«Национальный медицинский исследовательский центр гематологии»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный консультант:**

Академик РАН, доктор медицинских наук, профессор **Савченко Валерий Григорьевич**

**Официальные оппоненты:**

**Парамонов Игорь Владимирович** – доктор медицинских наук, директор ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства»

**Дерябин Петр Григорьевич** – доктор медицинских наук, заместитель директора по научной работе Института вирусологии им. Д.И. Ивановского, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

**Купряшов Алексей Анатольевич** – доктор медицинских наук, руководитель отделения переливания крови ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева» Минздрава России

**Ведущая организация:**

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Защита состоится «...» \_\_\_\_\_ 2019 года в \_\_\_\_\_ часов

на заседании диссертационного совета Д 208.135.01.01 при федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 125167, г. Москва, Новый Зыковский проезд, дом 4

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации и на сайте [www.blood.ru](http://www.blood.ru)

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2019 года

Ученый секретарь диссертационного совета,  
Кандидат медицинских наук

Сысоева Е.П.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Актуальность проблемы вирусных гепатитов у реципиентов компонентов крови определяется полиэтиологичностью, высокой заболеваемостью, трудностью дифференциальной диагностики, недостаточностью профилактических мер. Вирус гепатита В (ВГВ) является наиболее распространенной причиной цирроза и первичного рака печени. ВГВ чрезвычайно контагиозен. При вирусном гепатите С хронизация наблюдается в 85% случаев [EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B, 2012, 2014; El-Serag H.B., 2012; World Health Organization. Hepatitis B Fact sheet, July 2012]. Хотя заражающая доза у вируса гепатита С (ВГС) намного выше, чем у ВГВ, а средства этиотропной терапии разрабатываются в последнее время довольно успешно, вирусный гепатит С остается серьезной гемотрансфузионной проблемой.

Благодаря национальному проекту в сфере здравоохранения, в рамках которого проводится массовая вакцинация против ВГВ в России, заболеваемость острыми формами гепатита заметно снизилась и в 2011 г. составляла 2,7 на 100 000 населения по сравнению со значениями 1999 г. (43,8 на 100 000 населения), однако заболеваемость хроническим гепатитом В выросла с 1999 по 2010 гг. с 9 до 14,4 на 100 000 населения [Вирусные гепатиты в Российской Федерации, 2010]. На фоне снижения заболеваемости в Российской Федерации острыми формами гепатита С продолжает нарастать заболеваемость хроническим гепатитом С, при этом наблюдаются значительные колебания этого показателя по федеральным округам и отдельным субъектам Федерации. Регистрируемый в Российской Федерации показатель заболеваемости хроническим гепатитом С не отражает истинной картины, поскольку диагностика вирусного гепатита С основана на выявлении антител к вирусу. Необходимо внедрение прямых методов диагностики заболевания – выявление РНК вируса [Пименов Н.Н., 2012].

Высокая распространенность вирусных гепатитов в гематологическом стационаре обусловлена спецификой контингента больных [Гармаева Т.Ц., 2012]. Характер течения болезни, длительность процесса, многократные госпитализации с применением инструментальных методов обследования, тактика и лечения с использованием иммуносупрессивных и гепатотоксических препаратов, многочисленные трансфузии компонентов и препаратов крови, – всё это позволяет отнести гематологических больных к группе высокого риска заболевания вирусными гепатитами. Риск трансфузионного инфицирования ВГВ и ВГС сохраняется, несмотря на системный подход к обеспечению

безопасности компонентов крови, включающий: селекцию безвозмездных добровольных доноров; применение современных технологий в производстве, таких как лейкоредукция и инактивация патогенов; ограничительную тактику трансфузий, предполагающую недопущение клинически необоснованного применения компонентов крови. Риск трансфузионного инфицирования определяется, очевидно, недостаточным количеством детектируемых маркеров при лабораторном обследовании крови доноров, наличием негативного окна в ранние фазы заболевания, присутствием латентных форм вирусных гепатитов. Для диагностики инфекций, вызванных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) и ВГС, открытых в конце XX века, используются комбинированные тесты, выявляющие одновременно как вирусные антигены, так и противовирусные антитела. Почему в XXI веке, несмотря на фундаментальные открытия в области вирусологии, рутинная диагностика ВГВ-инфекции традиционно базируется только на определении вирусного антигена (HBsAg), открытого еще в 1965 г., и не включает определение противовирусных антител?

#### **Степень разработанности темы исследования**

С кровью донора могут передаваться все инфекционные агенты, которые в ней находятся. ВГВ и ВГС являются наиболее изученными из них. Доказана опасность их трансфузионной передачи, разработаны и непрерывно совершенствуются тесты, предназначенные для их идентификации. Все образцы крови доноров при каждой донации подлежат обязательному контролю на наличие маркеров ВГВ и ВГС, но, несмотря на все меры безопасности, риск инфицирования реципиентов компонентов крови сохраняется.

В Российской Федерации обследование доноров крови на инфекционные маркеры регламентировано Приказом Минздрава РФ №364, согласно которому обязательным является проведения исследования на наличие сифилиса, поверхностного антигена ВГВ (HBsAg), антител к ВГС (анти-ВГС), ВИЧ-1 и ВИЧ-2. При латентной форме хронического вирусного гепатита В геном вируса находится в гепатоцитах, в плазме крови он содержится в очень низкой концентрации, а HBsAg не выявляется, что не позволяет осуществлять полную выбраковку инфицированных компонентов донорской крови тех случаях, если исследование ограничено регламентированными маркерами [Raimondo G., 2013]. При серопозитивном варианте латентной формы ВГВ-инфекции в крови циркулируют только антитела к ядерному белку вируса (анти-НВс), возможно, в сочетании с антителами к поверхностному антигену ВГВ (анти-НВs); при серонегативном варианте заболевания все антитела отсутствуют. Распространенность латентной ВГВ-инфекции среди доноров крови и ее компонентов на

территории Российской Федерации достигает 2% [Кюрегян К.К., 2012]. Таким образом, для максимального выявления инфицированных ВГВ лиц среди доноров крови и ее компонентов необходимо дополнительное исследование образцов их крови на наличие антител к ядерному белку вируса.

Терапия заболеваний системы крови может приводить к глубокому угнетению гуморального и клеточного иммунитета, что обуславливает снижение минимальной заражающей дозы вируса и увеличение числа латентных форм вирусных инфекций. Реактивация латентных форм вирусных инфекций у таких пациентов в отдаленные сроки – не редкость и может приводить к летальному исходу. Для пациентов с заболеваниями системы крови характерны, как длительная, на протяжении всего времени лечения, иммуносупрессия, так и высокая потребность в гемокомпонентной терапии (в особенности в концентратах тромбоцитов), что диктует особые требования к безопасности донорской крови, предназначенной для этих пациентов. Таким образом, распространенность вирусных гепатитов В и С среди доноров, в том числе и латентных форм инфекции, вышеперечисленные особенности больных заболеваниями системы крови и недостаточный набор маркеров вирусов гепатита В и С, на наличие которых исследуют образцы крови доноров, и, следовательно, возможность неполного выявления компонентов крови доноров, представляющих инфекционную опасность, определяют необходимость использования адекватного современного лабораторного инструментария для повышения вирусной безопасности гемотрансфузий.

### **Цель исследования**

Разработать стратегию повышения вирусной безопасности трансфузий компонентов крови.

### **Задачи исследования**

1. Разработка порядка обследования донорской крови и выбраковки компонентов крови по результатам лабораторного исследования на инфекционные маркеры.
2. Анализ динамики выявления регламентированных маркеров ВГВ и ВГС в образцах крови доноров с 1999 по 2016 гг. и пациентов гематологического стационара с 2003 по 2016 гг.
3. Обоснование введения тестирования на наличие антител к ядерному антигену ВГВ образцов крови доноров.

4. Оценка частоты встречаемости маркера острой ВГВ-инфекции в образцах крови доноров, в которых выявлены антитела к ядерному и поверхностному антигенам ВГВ.
5. Определение критериев пулирования образцов крови доноров для проведения тестирования на наличие вирусных нуклеиновых кислот с точки зрения риска пропуска образцов с низкими концентрациями.
6. Анализ случаев обнаружения маркеров активной ВГВ- и ВГС-инфекции у ранее неинфицированных пациентов и проведение эпидемиологических исследований.
7. Разработка процедур и временных регламентов обследования больных при поступлении в гематологический стационар и во время лечения с целью выявления латентных форм заболевания и возможных новых случаев инфицирования.

### **Научная новизна**

В работе впервые представлено решение актуальной проблемы - создание специальной трансфузиологии для больных заболеваниями системы крови за счет оптимизации лабораторного обследования доноров крови и ее компонентов на маркеры ВГВ и ВГС с применением современных высокочувствительных методов.

В результате выполнения настоящих исследований получены новые результаты, имеющие важное теоретическое и практическое значение. Оценена динамика частоты обнаружения регламентированных маркеров вирусов гепатитов В и С в образцах крови доноров и пациентов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России за последнее 16-18 лет. Разработан новый порядок обследования доноров крови и ее компонентов на наличие инфекционных маркеров. Показано, что компоненты крови доноров, содержащие анти-НВс и анти-НВс в защитном титре (более 10 мМЕ/мл), в том числе и в высоком (более 100 мМЕ/мл), могут быть небезопасны. Выявлено, что концентрация ДНК ВГВ в образцах крови доноров в 66,67% случаев находится в диапазоне низких значений, а в 20% – на уровне чувствительности тест-систем. При внедрении в практику рутинного скрининга образцов крови доноров на наличие анти-НВс возможно проводить тестирование на ДНК в пулах из шести проб без угрозы неполного выявления инфицированных компонентов крови. Данное положение подтверждено отсутствием случаев появления маркеров вирусов гепатитов В и С у ранее неинфицированных реципиентов, ассоциированных с гемотрансфузиями, после введения нового порядка обследования доноров. Для уточнения наличия ВГВ-инфекции у пациентов при первичном обращении необходимо исследовать кроме ДНК ВГВ также наличие антител к ядерному и поверхностному антигенам вируса, поскольку отсутствие

данной информации не позволяет отличить реактивацию от свежего инфицирования и усложняет проведение расследования случаев возможного трансфузионного инфицирования реципиентов компонентов крови. Впервые разработана карта инициации эпидемиологического расследования и карта проведения эпидемиологического расследования в рамках функционирования лабораторной информационной системы.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Разработанная тактика лабораторного исследования донорской крови и, следовательно, производства вирусбезопасных компонентов крови способствует снижению риска возникновения посттрансфузионных вирусных инфекций у реципиентов, что приведет к увеличению эффективности лечения, продолжительности жизни и сокращению сроков пребывания в стационаре.

Основные положения диссертационной работы внедрены в практику лабораторного скрининга образцов крови доноров и пациентов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России.

Создан новый порядок обследования донорской крови и выбраковки компонентов по результатам лабораторного исследования на инфекционные маркеры, введенный с 01.03.2014 года Приказом №61 от 03.04.2014 по ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России.

С ноября 2013 г. в практику ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России внедрено расследование случаев вероятного трансфузионного инфицирования вирусами гепатитов В и С, разработаны и внедрены в практику стандартная операционная процедура «Проведение эпидемиологического расследования случая возможного трансфузионного инфицирования реципиента компонентов донорской крови вирусом гепатита В и/или С» и регистрационная карта расследования таких случаев.

Разработана схема обследования пациентов при поступлении в гематологический стационар и во время лечения с целью выявления латентных форм заболевания и возможных новых случаев инфицирования.

В ходе проведения исследования после внедрения в рутинную практику нового порядка обследования донорской крови не было зарегистрировано случаев доказанного трансфузионного заражения ВГВ и ВГС ранее неинфицированных пациентов.

Материалы диссертационной работы используются для научных консультаций, при обучении ординаторов, аспирантов, медицинского персонала на семинарах, рабочих местах, циклах повышения квалификации.

## **Методология и методы исследования**

Проведено аналитическое обсервационное эпидемиологическое исследование, включающее когортное ретроспективное и проспективное исследование. В работе были использованы методы иммуноферментного и иммунохемилюминисцентного анализа, полимеразной цепной реакции. Статистическая обработка данных произведена методами описательной и индуктивной статистики.

## **Положения, выносимые на защиту**

1. Скрининговое тестирование на наличие антител к ядерному антигену вируса гепатита В образцов крови доноров рекомендовано в качестве рутинного теста, повышающего вирусную безопасность гемотрансфузий, поскольку обеспечивает дополнительное выявление инфицированных вирусом гепатита В лиц, а их отстранение не отражается на числе донаций.
2. Использование компонентов крови, содержащих антитела к ядерному антигену вируса гепатита В небезопасно даже при наличии антител к поверхностному ядерному антигену вируса в высоком титре, поскольку в них обнаруживается маркер острой ВГВ-инфекции.
3. В комплексе с исследованием образцов крови на наличие антител к ядерному антигену вируса гепатита В показано проведение тестирования вирусных нуклеиновых кислот в пулах из 6 проб, поскольку это не приводит к снижению эффективности выявления инфицированных ВГВ компонентов крови.
4. Создан двухэтапный порядок проведения эпидемиологического расследования случаев вероятного трансфузионного инфицирования пациентов вирусами гепатитов В и С в рамках функционирования лабораторной информационной системы путем прослеживания пар «донор-реципиент».
5. При поступлении пациентов в гематологический стационар с целью выявления латентных форм вирусного гепатита, кроме регламентированных маркеров (HBsAg, анти-ВГС, ДНК ВГВ, РНК ВГС), необходимо исследование на наличие антител к ядерному и поверхностному антигенам вируса гепатита В.

## **Степень достоверности и апробация результатов**

Материалы, вошедшие в диссертацию, доложены на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы трансфузиологии и клинической медицины», посвященной 55-летию ФГБУН «Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА России» 6-7 октября 2015 г.; 23, 24, 25, 27



Региональных и 34 Международном Конгрессах международного общества по переливанию крови (International Society of Blood Transfusion - ISBT), Амстердам 2-5 июня 2013 г., Кулала Лумпур 1-4 декабря 2013, Лондон 27 июня - 1 июля 2015 г., Дубаи 3-8 сентября 2016 г., Копенгаген 17 - 21 июня 2017 г.; на 3 - 5 Всероссийских научно-практических конференциях с международным участием «Инфекции и инфекционная безопасность в гематологии и Службе крови» Санкт-Петербург, 13-14 ноября 2014 г.; 20-21 октября 2016 г., 29-30 ноября 2018 г.; VI съезде гематологов и трансфузиологов республики Беларусь «Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии» Минск 24-25 мая 2007 г.; на гематологической школе «Инфекции при гемобластозах. Вирусные инфекции на фоне программной терапии гемобластозов и ТКМ», 13-14 февраля 2014 г.; 6-9 Всероссийских научно-практических конференциях с международным участием «Молекулярная диагностика», Москва 28-30 ноября 2007 г, 24-26 ноября 2010 г., 18-20 марта 2014 г., 18-20 апреля 2017 г.; 12-ой и 13-ой Российской конференциях «Гепатология сегодня», Москва, 19-21 марта 2007 г., 17-19 марта 2008 г.; III и IV Конгрессах гематологов России 14-16 апреля 2016 г. и 12-14 апреля 2018 г.; конференции «Организация трансфузиологической помощи в многопрофильном стационаре», Ярославль, 27 апреля 2016 г.; 20 научно-практической конференции «Новое в трансфузиологии: нормативные документы и технологии» 18-20 мая 2016 г. Алушта; Научно-практической конференции в рамках II Совещания Экспертного Совета Национального гематологического общества по трансфузиологии, Москва, 24 апреля 2017 г.; Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии», посвященная 85-летию Российского научно-исследовательского института гематологии и трансфузиологии, Санкт-Петербург, 6-7 июня 2017 г.; 1 Конгрессе трансфузиологов России, Владивосток, 1-2 октября 2018 г.

### **Публикации**

Результаты исследований опубликованы в 18 печатных работах, из них 12 – включенных в текущий перечень ВАК (рецензируемых научных журналах).

### **Объем и структура работы**

Диссертация изложена на 218 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 6-ти глав результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений, указателя литературы (71 отечественный и 349 зарубежных источников). Диссертация иллюстрирована 21 рисунком, 21 таблицей и содержит 3 приложения.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

На первом этапе настоящего исследования была разработана система управления качеством молекулярно-биологических исследований. Проведено аналитическое эпидемиологическое исследование, включающее наблюдательное когортное ретроспективное и контролируемое проспективное когортное исследования.

Проанализированы данные тестирования на декретированные маркеры ВГВ и ВГС (HBsAg и анти-ВГС) 315191 образцов крови, из них: 58 455 проб от пациентов, находящихся на лечении в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России в период с 2003 по 2016 гг.; 256 736 проб, взятых от доноров крови ее компонентов в период с 1999 по 2016 гг. Данные анализировали по материалам ежегодных отчетов и журналам отделения контроля крови на вирусные гепатиты, СПИД, сифилис (данные хранятся в программе Excel и на бумажных носителях, с 6 октября 2014 г. результаты исследования крови доноров доступны в лабораторной информационной системе).

В период с 2006 по 2007 гг. 277 пациентов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России различных нозологических групп были обследованы однократно при поступлении в стационар на расширенный спектр маркеров ВГВ и ВГС. Доля мужчин составляла 51%, доля женщин – 49%. Медиана возраста – 46 лет (от 16 до 90 лет).

Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) исследовано 32462 образца крови доноров в период с 2006 по 2016 гг. В формате индивидуального тестирования исследованы 558 образцов крови доноров в период с апреля по июнь 2006 г. В пулах из 6 проб на ДНК ВГВ, РНК ВИЧ и РНК ВГС протестировано 31 914 серонегативных образца в 2009 и 2012 - 2016 гг. Количественно охарактеризованы 72 ПЦР-положительных образца крови доноров, собранные в период с 2006 по 2014 годы (21 по ДНК ВГВ и 51 по РНК ВГС).

Исследовано 17 экспериментально приготовленных пулов плазмы доноров крови, содержащих позитивный образец: 13 пулов из 6 образцов и 4 пула – из 12 образцов. В пробирку помещали по одному образцу, содержащему ДНК ВГВ с концентрацией от не менее  $1,5 \times 10^2$  до  $1 \times 10^3$  МЕ/мл ( $n=12$ ), или РНК ВГС – от  $1 \times 10^4$  до  $1 \times 10^7$  МЕ/мл ( $n=5$ ), и отрицательные по маркерам ВГВ, ВГС, ВИЧ образцы плазмы доноров в равных объемах.

Использованы две коммерческие панели контрольных образцов ДНК ВГВ и РНК ВГС Acrometrix OptiQuant HBV DNA Lot715006B и Acrometrix OptiQuant HCV RNA Lot721201D.

Проведены эпидемиологические расследования ( $n=4$ ), исследовано 35 архивных образцов плазмы: от 7 пациентов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России и 28

доноров крови и ее компонентов. ПЦР-исследование образцов плазмы доноров выполняли в индивидуальной постановке на наличие ДНК ВГВ ( $n=16$ ) и РНК ВГС ( $n=12$ ). С целью повышения чувствительности теста экстракцию нуклеиновых кислот проводили из двойного объема (200 мкл).

Образцы крови доноров ( $n=26113$ ), пришедших на донацию в период с 21 марта 2014 г. по 20 апреля 2016 г., были включены в проспективное исследование. Из них: 8134 – от первичных доноров, 17979 – от повторных. Продолжительность исследования – 25 месяцев. Доля мужчин составляла 59%, доля женщин – 41%. Возраст доноров варьировал от 18 до 70 лет, медиана возраста – 33 года.

В соответствии с «Программой инфекционной безопасности компонентов донорской крови для иммунокомпрометированных больных», одобренной локальным этическим комитетом при ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, проводимой в рамках утвержденной научно-исследовательской работы по теме: «Создание программы повышения инфекционной безопасности трансфузионной терапии онкогематологических больных», зарегистрированной под номером НИОКТР – АААА-А16116011810125-5, было проведено скрининговое исследование образцов крови доноров на наличие анти-НВс. Селекция доноров не проводилась. Допуск потенциальных доноров к донации осуществлялся только после подписания добровольного информированного согласия на проведение расширенного тестирования на маркеры ВГВ. Дополнительный объем крови для исследования не брали. Донору было сообщено о результатах проведенного исследования.

В соответствии с разработанным и утвержденным в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России порядком обследования донорской крови и выбраковки компонентов, если были обнаружены анти-НВс в образце крови донора, проводили повторное тестирование. Если положительный результат повторялся, то компоненты крови с коротким сроком хранения (тромбоконцентрат, тромбовзвесь, эритроузвесь, эритромакса) подлежали выбраковке, компоненты с длительным сроком хранения (плазма) не допускались к применению в клинике. Дополнительно образцы крови, содержащие анти-НВс, исследовали на наличие анти-НВс класса IgM и анти-НВс. В случае получения отрицательных результатов дополнительного иммунохимического и ПЦР-исследования донору назначали контрольное обследование через 3 месяца. В случае получения положительных результатов дополнительного иммунохимического и ПЦР-исследования все заготовленные от данного донора компоненты крови подлежали выбраковке и уничтожению, включая компоненты крови с длительным сроком хранения. По полученным результатам анализов составлялся «Акт отстранения от донорства», который рассматривался на заседании

трансфузиологической комиссии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. После принятия решения трансфузиологической комиссией, соответствующие данные о доноре вносились в базу данных и передавались в Единый донорский центр. Образцы крови доноров, отрицательные при первом исследовании в ИФА/ИХЛА или положительные при первой постановке и показавшие дважды отрицательный результат при повторном тестировании в том же наборе реагентов, расценивались как отрицательные. Были допущены к клиническому применению компоненты крови доноров, образцы крови которых, показали отрицательные результаты исследования методами ИФА/ИХЛА и ПЦР, при этом образцы плазмы от этих компонентов подлежали архивированию.

Результаты исследований образцов крови хранятся на бумажных носителях (распечатанные протоколы и журналы фиксации положительных проб), в электронном виде (Word и Excel), с 6 октября 2014 года результаты – в лабораторной информационной системе.

Иммунохимическое исследование было проведено методами иммуноферментного (ИФА) и иммунохемилюминесцентного (ИХЛА).

Для проведения ИХЛА использовали прибор ARCHITECT i2000 RS и следующие наборы реагентов: HIV Ag/Ab Combo, anti-HCV, HBsAg Qual II, anti-HBc II, anti-HBc IgM, anti-HBs производства фирмы «Abbott». Положительные результаты тестирования образцов крови доноров подтверждали с помощью ИХЛА в подтверждающей тест-системе HBsAg Architect и иммуноблота Inno-LIA HCV Score Innogenetics (с 2015 г. – Fujirebio).

Для проведения ИФА использовали следующие приборы: автоматический анализатор Evolis (фирмы «Bio-Rad»), спектрофотометры и отмывающие устройства производства «Tecan» и «Bio-Rad». Были использованы следующие наборы реагентов: Джинскрин ультра ВИЧ Ag/At, Monolisa HBsAg Ultra, Monolisa anti-HCV Plus, Monolisa anti-HBc Plus, подтверждающий тест с нейтрализацией Monolisa HBsAg – производства фирмы «Bio-Rad»; HBsAg-ИФА-БЕСТ, HBsAg-подтверждающий-ИФА-БЕСТ, Векто HBsAg-антитела, Векто HBcAg-антитела, Векто HBcAg- IgM, Бест анти-ВГС (комплект3), Бест анти-ВГС (комплект4) производства – ЗАО «Вектор-Бест»; Мюрекс анти-HCV производства – «Abbott-Мюрекс»; Иммуноблот РИБА-ИБ – «Орто-Кайрон»; ИФА-HBsAg-0,01, ИФА-ВГС – ЗАО «Эколаб»; Гепастрип – «Ниармедик»; ДС-ИФА-HBsAg - 0,01, ИФА-АНТИ-HCV – производства ООО НПО «Диагностические системы».

Как «положительный», расценивался результат иммунохимического теста, если коэффициент позитивности образца для регламентированных маркеров был более 0,9 и более 1,0 – для анти-HBc. Коэффициент позитивности является расчетным показателем и

измеряется в условных единицах – это число относительных световых единиц пробы, деленное на величину точки отсечения.

Скрининговое исследование образцов крови доноров на наличие молекулярных маркеров ВИЧ, ВГВ, и ВГС проводилось в пулах из 6 проб. Были использованы: автоматические анализаторы Cobas Ampliprep и Cobas Tagman; мультиплексный дискриминационный тест Cobas Taqscreen MPX Test, Version 2.0 – производства фирмы Roche. Аналитическая чувствительность теста Cobas Taqscreen MPX Test, Version 2.0 при исследовании образцов крови в формате минипулов из 6 шт., согласно прилагаемой инструкции, составляет для ДНК ВГВ – 13,8 МЕ/мл и для РНК ВГС – 40,8МЕ/мл.

Для индивидуального ПЦР-исследования выделение нуклеиновых кислот проводили из 100/200/500 мкл плазмы крови, используя коммерческие тест-системы производства ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора: «РИБО-золь», «Рибо-преп», «ДНК-сорб-В» и «Магно-сорб». Выделение нуклеиновых кислот проводили согласно инструкциям к наборам реагентов. Для амплификации использовали реагенты АмплиСенс HCV-FRT и -FL, АмплиСенс HBV-FRT и -FL, АмплиСенс HBV-470/770-ВКО, АмплиСенс HCV-240/440-ВКО, АмплиСенс HCV- Монитор FRT и -FL, АмплиСенс HBV-Монитор-FRT и –FL. Амплификация с регистрацией флуоресцентного сигнала в режиме реального времени проводилась на приборах производства фирмы «Corbett research»: Rotor Gene Q и RG 3000. Амплификация с последующей детекцией продуктов методом электрофореза в агарозном геле проводили на приборах производства фирмы «Applied Biosystems»: Gene Amp PCR System 2400 и 9700. Заявленная аналитическая чувствительность наборов реагентов АмплиСенс HCV-FRT и -FL, АмплиСенс HBV-FRT и –FL составляла для ДНК ВГВ и РНК ВГС при экстракции из 100 мкл – 100 МЕ/мл.

Статистическая обработка данных произведена методами описательной и индуктивной статистики. Проверка значимости гипотез по выборкам проводилась с использованием методов Пирсона и точного критерия Фишера. Статистические вычисления и выявление временного тренда различных величин проводились с помощью средств программы Microsoft Excel 10. В качестве значений моментов времени использовались номера месяцев за период наблюдения. Для анализа достоверности различных математических моделей и оценки степени приближения данных модельными кривыми выводились значения показателя качества приближения  $R^2$  ( $R$  – квадрат).  $R^2$  является квадратом коэффициента корреляции измеренных и модельных значений, чем ближе эта величина к 1, тем точнее математическая модель описывает поведение соответствующего показателя). Достоверность

отличия коэффициента корреляции от нуля ( $P$  – значение) рассчитывалась с помощью формулы  $t$ -критерия для коэффициента корреляции и распределения Стьюдента.

## Результаты

### 1. Разработка требований к обеспечению качества ПЦР-исследований

Согласно разработанной системе управления качеством молекулярно-биологических исследований, кроме внимания к приборной базе и расходному материалу, особые требования были предъявлены к используемым тест-системам, в первую очередь, к их аналитическим характеристикам. Проводился внутренний контроль с использованием стандартных панелей контрольных образцов. В таблицах 1 и 2 представлены результаты постановки коммерческих панелей контрольных образцов ДНК ВГВ и РНК ВГС.

Таблица 1. Результаты тестирования панели контрольных образцов ДНК ВГВ Acrometrix OptiQuant HBV DNA Lot715006B (срок годности до 28 мая 2010года).

Образец	АмплиСенс HBV-Монитор-FRT серия 130	АмплиСенс HBV-FRT серия 14.05.08
отрицательный	-	-
200 МЕ/мл	244 МЕ/мл	+
2000 МЕ/мл	4800 МЕ/мл	+
20000 МЕ/мл	31300 МЕ/мл	+
200000 МЕ/мл	208000 МЕ/мл	+
2000000 МЕ/мл	714000 МЕ/мл	+
20000000 МЕ/мл	5650000 МЕ/мл	+

При анализе результатов ПЦР-исследования выявлены ключевые условия, при которых могли быть получены ложные результаты. Благодаря введению стандартов качества для метода ПЦР, удалось снизить количество контаминаций. Был разработан и введен в практику лаборатории порядок ПЦР-исследования и учетов результатов реакции. При наличии в эксперименте образца с высокой концентрацией нуклеиновой кислоты заново анализировали все положительные пробы данной постановки, если их позитивность вызывала сомнение. Для исключения возможности получения ложноотрицательных результатов ПЦР в образцах с высокой концентрацией нуклеиновых кислот кривые накопления продуктов амплификации подлежали визуальному контролю с целью оценки их формы и расположения на графике вне

зависимости от результатов автоматической интерпретации результатов реакции. Результаты анализов, приведенные в работе, соответствуют стандартам качества.

Таблица 2. Результаты тестирования панели контрольных образцов РНК ВГС Acrometrix OptiQuant HCV RNA Lot721201D (срок годности до 20 июля 2010 года)

Образец	АмплиСенс HCV-Монитор-FRT серия 205	АмплиСенс HCV-FRT серия 17.07.08
отрицательный	-	-
50 МЕ/мл	30 МЕ/мл	-
500 МЕ/мл	132 МЕ/мл	+
5000 МЕ/мл	1240 МЕ/мл	+
50000 МЕ/мл	9110 МЕ/мл	+
500000 МЕ/мл	63900 МЕ/мл	+
5000000 МЕ/мл	1490000 МЕ/мл	+

## 2. Лабораторные факторы риска неполного выявления инфицированных вирусами гепатитов В и С компонентов крови доноров

Для исследования причин возможного трансфузионного инфицирования ВГВ и ВГС был выполнен анализ результатов лабораторного скрининга 256 736 образцов крови доноров ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, пришедших на донацию за 18 лет наблюдения с 1999 по 2016 гг. Динамика выявления маркеров вирусных гепатитов В (HBsAg) и С (анти-ВГС) представлена на рисунке 1. В анализируемый период амплитуда колебаний частоты выявления этих маркеров по годам находилась в пределах от 0,06 до 0,45% - для HBsAg, а для анти-ВГС - от 0,21 до 1,08%. Встречаемость декретированных маркеров ВГВ и ВГС в образцах крови доноров за анализируемый период статистически значимо снизилась: с 0,38% до 0,06% ( $\chi^2=28,81$ ,  $p<0,00001$ ) и с 0,71% до 0,21% ( $\chi^2=35,23$ ,  $p<0,00001$ ), соответственно.

С 2002 по 2010 гг. обследование донорской крови на декретированные маркеры (анти-ВГС и HBsAg) проводили с использованием наборов фирмы «Bio-Rad», а с 2010 года – тест-систем фирм «Вектор-Бест» (Новосибирск), «Ниармедик» (Москва), «Диагностические системы» (Нижний Новгород). С 2014 г. диагностика осуществлялась с помощью наборов фирмы «Bio-Rad» с последующим переходом в мае 2014 г. на ИХЛА-тесты. Проведенный анализ результатов лабораторного тестирования, полученных с 2002 по 2013 гг., показал, что

воспроизводимость положительных реакций была недопустимо низкой и составляла от 77 до 95% при выявлении анти-ВГС, и от 54,6% до 89% для HBsAg, вне зависимости от используемого диагностикума. В 2014 г. в исследовании при использовании наборов реагентов «Bio-Rad» воспроизводимость положительных результатов составила уже 100% для анти-ВГС и 75% для HBsAg. Однако в подтверждающих тестах положительными оказались только 50% образцов по HBsAg и 87,5% - по анти-ВГС. Воспроизводимость положительных результатов в методе ИХЛА составила 100% - как для HBsAg, так и для анти-ВГС. Сравнительная оценка иммунохимических методов (ИФА и ИХЛА) показала, что воспроизводимость положительных результатов по анти-НВс при использовании иммуноферментных тест-систем составляла 98,2% (167 из 170), при использовании иммунохемилюминесцентного диагностикума – 99,6% (266 из 267). Эти данные позволили сделать вывод о сопоставимости полученных результатов при использовании обеих методик ( $p>0,05$ ).

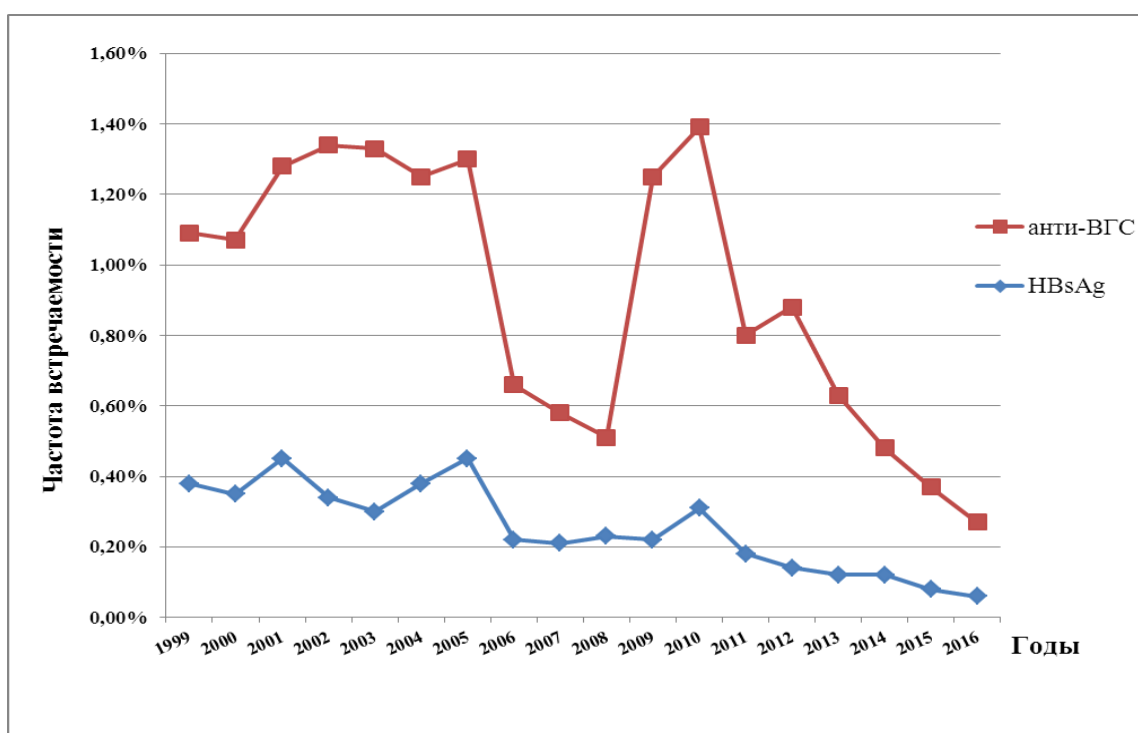


Рисунок 1. Динамика выявления HBsAg и анти-ВГС в образцах крови доноров

Анализируя результаты многолетней динамики выявления HBsAg и анти-ВГС в образцах крови доноров, установлено, что колебания превалентности серологических маркеров ВГВ и ВГС зависели не только от использованных тест-систем, но и определялись организационными мероприятиями по селекции доноров. Увеличение доли положительных образцов крови доноров по HBsAg и анти-ВГС в 2009-2010 гг. (рисунок 1) связано с тем, что



с 2008 г. заготовка крови и её компонентов в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России стала осуществляться не только от жителей Москвы и Московской области, но и от граждан всех субъектов РФ. В качестве доноров в этот период были привлечены в первую очередь лица из социально неблагоприятных слоев общества, заинтересованные в оплате за донацию. К положительным примерам организационных решений повышения безопасности донорской крови и ее компонентов можно отнести прекращение практики заготовки крови выездными бригадами в воинских частях с ноября 2010 г. в связи с высокой частотой встречаемости у данного контингента доноров маркеров инфекционных заболеваний и с 2013 г. развитие добровольного безвозмездного донорства.

Таким образом, в последние годы компоненты крови доноров стали более безопасны, что обусловлено комплексом факторов, в том числе, повышением качества используемых иммунологических диагностикумов и применением автоматических анализаторов. Однако исследование HBsAg и анти-ВГС не позволяет в полной мере выявить все инфицированные компоненты крови, поскольку в ранние фазы заболевания возможно детектировать в крови только нуклеиновые кислоты этих вирусов. Поэтому, для полного выявления инфицированных образцов крови доноров в дополнение к обязательным иммунохимическим, используют молекулярные методы диагностики, которые выполняются в классическом варианте с электрофоретической детекцией продуктов ПЦР и с регистрацией флуоресцентного сигнала в реальном времени. С целью изучения вклада этого метода в обеспечение вирусной безопасности трансфузий компонентов крови проведено исследование 558 образцов плазмы доноров, пришедших на донацию с апреля по июнь 2006 г., на наличие молекулярных маркеров ВГВ и ВГС с использованием отечественных ПЦР-тест-систем.

Образцы плазмы доноров ( $n=441$ ) после обязательного скрининга HBsAg с использованием набора реагентов фирмы «Bio-Rad» были исследованы на наличие молекулярного маркера ВГВ (ДНК ВГВ) с помощью диагностикума со стандартным вариантом электрофоретической детекции продуктов ПЦР «АмплиСенс HBV-EPh» и в формате реального времени «АмплиСенс HBV-FRT». Данные представлены в таблице 3.

Из двух проб, содержащих HBsAg, в одной была выявлена ДНК ВГВ, причем при использовании двух видов ПЦР-наборов. В 9 из 439 (2,0%) образцов крови доноров, HBsAg-негативных при скрининговом ИФА-тестировании, методом ПЦР получен положительный сигнал при исследовании на наличие ДНК ВГВ.

При использовании ПЦР-теста с учетом продуктов амплификации в реальном времени в 9 (2%) из 439 случаев была дополнительно диагностирована ВГВ-инфекция, в отличие от стандартного варианта ПЦР, в котором был позитивен только один (0,2%) из 439 образцов.

Таблица 3. Результаты тестирования образцов крови доноров на маркеры ВГВ

ИФА (HBsAg)	Число образцов	ПЦР- положительные (ДНК ВГВ)	
		Стандартный вариант	Детекция в реальном времени
Положительные	2	1	1
Отрицательные	439	1	9
Всего	441	2	10

При исследовании образцов крови доноров, негативных по HBsAg, но содержащих ДНК ВГВ, на широкий спектр маркеров ВГВ-инфекции в двух случаях отмечено наличие изолированных анти-HBs и анти-HBs в сочетании с анти-HBc, что свидетельствует о латентной форме вирусного гепатита В. Данные представлены в таблице 4.

Таблица 4. Результаты тестирования образцов крови доноров на наличие маркеров ВГВ

№	HBsAg	Серологический профиль	Стандартный вариант ПЦР	Детекция в реальном времени	Количественная характеристика
1	+	не определяли	+	+	$1,7 \times 10^3$ МЕ/мл
2	+	анти-HBs/анти-HBc	-	-	не определяли
3	-	-	-	+	не определяли
4	-	-	-	+	не определяли
5	-	-	-	+	не определяли
6	-	-	-	+	не определяли
7	-	-	-	+	не определяли
8	-	анти-HBs	-	+	не определяли
9	-	анти-HBs/анти-HBc	+	+	не определяли
10	-	-	-	+	не определяли
11	-	-	-	+	не определяли

Вопрос о дальнейшем обследовании доноров, у которых ДНК была единственным маркером ВГВ-инфекции, с целью выявления возможной последующей сероконверсии

остался открытым. Эти доноры являлись военнослужащими и сдавали компоненты крови только один раз.

Образцы плазмы доноров ( $n = 558$ ) после обязательного скрининга анти-ВГС с использованием набора реагентов фирмы «Bio-Rad» были исследованы на наличие молекулярного маркера ВГС (РНК ВГС) с помощью диагностикума со стандартным вариантом электрофоретической детекции продуктов ПЦР «АмплиСенс HCV-EPh» и в формате реального времени «АмплиСенс HCV-FRT». Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5. Результаты тестирования образцов крови доноров на маркеры ВГС

ИФА (анти-ВГС)	Число образцов	ПЦР-положительные (РНК ВГС)	
		Стандартный вариант	Детекция в реальном времени
Положительные	5	3	3
Отрицательные	553	1	1
Всего	558	4	4

По результатам ИФА-исследования 5 проб содержали анти-ВГС, в трех из них была выявлена РНК ВГС. В 1 (0,2%) из 553 случаев анти-ВГС-негативных образцов крови доноров зарегистрирован положительный сигнал на РНК ВГС. Анализ показал полное совпадение результатов, полученных в ПЦР-тестах с детекцией продуктов амплификации в реальном времени и с электрофоретической детекцией. Характеристика образцов плазмы доноров по выявленным маркерам ВГС представлена в таблице 6.

Таблица 6. Характеристика образцов плазмы доноров по выявленным маркерам ВГС

№	анти-ВГС	Стандартный вариант ПЦР	Детекция в реальном времени	Генотип ВГС	Количественная характеристика
1	+	+	+	3а	$1 \times 10^4$ МЕ/мл
2	+	+	+	3а	$1 \times 10^7$ МЕ/мл
3	+	+	+	3а	$7,7 \times 10^6$ МЕ/мл
4	+	-	-	не определяли	не определяли
5	+	-	-	не определяли	не определяли
6	-	+	+	-	-

В трех образцах, в которых были обнаружены и серологический (анти-ВГС) и молекулярный маркер ВГС, была определена концентрация РНК ВГС и идентифицирован генотип вируса. Концентрация РНК ВГС в этих образцах составила  $1 \times 10^4$ ,  $7,7 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  МЕ/мл и во всех трех случаях имел место генотип 3а. В образце крови донора, позитивном при тестировании на наличие РНК ВГС и негативном при тестировании на наличие анти-ВГС, не удалось определить уровень виремии и генотип ВГС, вероятно, за счет низкой концентрации РНК вируса. Контрольное обследование донора с целью прослеживания возможной в дальнейшем сероконверсии было недоступно, поскольку он был снят с донорства и отказался от контрольного обследования.

Таким образом, проведенное исследование показало целесообразность использования метода ПЦР с целью наиболее полного выявления образцов крови доноров, инфицированных ВГВ и ВГС, причем тесты с регистрацией продуктов амплификации в реальном времени предпочтительнее в отношении чувствительности, особенно для детекции ДНК ВГВ.

В 2009 г. в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России были исследованы 1200 серонегативных образцов крови доноров на наличие ДНК ВГВ, РНК ВИЧ и ВГС в пулах из 6 проб, используя мультиплексный дискриминационный тест Cobas TaqScreen MPX Test, version 2. Был обнаружен один образец крови донора, положительный по РНК ВГС (0,08%). В тех же условиях в 2013 г. было протестировано 4736 образцов крови доноров, что составляло 36,3% от общего числа донаций (13 047). В двух случаях была выявлена ДНК ВГВ (0,04%) в низкой концентрации – менее  $1,5 \times 10^2$  МЕ/мл. Анализ серологических маркеров ВГВ в этих образцах показал наличие анти-НВс. В 2014 г. и 2015 г. не было зарегистрировано положительных реакций по молекулярным вирусным маркерам, хотя было исследовано 77,5% (9 128 из 11 781) и 100% (12 677), образцов крови доноров от общего числа кроводач, соответственно. В 2016 г. за первые четыре месяца было исследовано 4 173 серонегативных образца крови доноров на наличие вирусных нуклеиновых кислот, и в 1 случае в пуле из шести проб была выявлена ДНК ВГВ, причем в очень низкой концентрации. При попытке количественной оценки виремии в данном образце, был получен отрицательный результат, кроме того отсутствовали все серологические маркеры ВГВ (НВsAg, анти-НВs, НВeAg, анти-НВe, суммарные анти-НВс, анти-НВс IgM). АЛТ была 14 единиц как в момент последней донации, так и 16 дней спустя, при этом концентрация ДНК ВГВ уже составила  $1,4 \times 10^3$  МЕ/мл при выделении из 500 миллилитров плазмы. Через 60 дней этот донор отметил появление тошноты, темной мочи, жидкого стула, сывороточная концентрация АЛТ составляла 2100 ед/мл с последующим постепенным

снижением этого показателя в течение 30 дней до значений 1600 и 400 ед/мл. Через четыре месяца в сыворотке крови были обнаружены следующие серологические маркеры: HBsAg, суммарные анти-HBc, анти-HBc IgM, анти-HBe; HBeAg и анти-HBs – отсутствовали. При этом, сывороточная концентрация АЛТ составляла 24 ед/мл. У данного донора по данным лабораторной информационной системы, зафиксировано 8 донаций: 3 аппаратных тромбоцитозфераза, 3 кроводачи и 2 – аппаратных плазмафереза. Суммируя все выше изложенное, можно заключить, что на момент последней донации у донора была начальная стадия острой ВГВ-инфекции – фаза «негативного окна», он представлял инфекционную опасность для реципиентов компонентов его крови, и только благодаря исследованию на наличие молекулярных вирусных маркеров, используя высокочувствительный тест, тромбоцитный концентрат, заготовленный от этого донора, не был допущен для клинического применения.

Принимая во внимание существующие данные о преимуществе выполнения ПЦР-тестирования в индивидуальной постановке [Vermeulen M., 2008], позволяющего выявлять единичные вирусные частицы в миллилитре биоматериала, выполнен сравнительный анализ результатов исследования на наличие ДНК ВГВ и РНК ВГС в пулах из 6 и более образцов плазмы крови с индивидуальной постановкой образцов плазмы крови. Из образцов плазмы крови доноров, предварительно охарактеризованных на наличие ДНК ВГВ и РНК ВГС, было приготовлено 17 экспериментальных пулов из 5 или 11 образцов, отрицательных по всем инфекционным маркерам, и одного положительного образца, содержащего ДНК ВГВ в концентрации  $1,7 \times 10^3$  копий/мл, или РНК ВГС в концентрации  $1 \times 10^4$  МЕ/мл. Результаты тестирования представлены в таблице 7. Все пять пулов, состоящих из шести и двенадцати образцов плазмы крови доноров и содержащих один РНК ВГС-положительный образец плазмы, были положительными.

Таким образом, разбавление инфицированного образца в 6, и даже в 12 раз, не привело к значительному снижению чувствительности и отрицательному результату при детекции РНК ВГС. ДНК ВГВ была выявлена в семи из десяти пулов, состоящих из шести образцов плазмы, а два пула, состоящие из двенадцати образцов плазмы, оказались отрицательными. Установлено, что разведение в 6 и 12 раз привело к недоявлению 41,7% (5 из 12 случаев) образцов крови, содержащих ДНК ВГВ, но не повлияло на выявление молекулярного маркера ВГС – выявлено 100% инфицированных образцов крови доноров. Объяснить этот факт можно недостаточной чувствительностью использованных наборов реагентов, особенно, при экстракции из 100 мкл анализируемой биопробы.

Таблица 7. Результаты ПЦР-тестирования пулированных образцов плазмы доноров

N	Величина пула	Содержание нуклеиновой кислоты	Результат ПЦР-тестирования
1	6 образцов плазмы	ДНК ВГВ	Положительный
2	6 образцов плазмы	ДНК ВГВ	Отрицательный
3	6 образцов плазмы	ДНК ВГВ	Положительный
4	6 образцов плазмы	ДНК ВГВ	Положительный
5	6 образцов плазмы	ДНК ВГВ	Отрицательный
6	6 образцов плазмы	ДНК ВГВ	Положительный
7	6 образцов плазмы	ДНК ВГВ	Положительный
8	6 образцов плазмы	ДНК ВГВ	Положительный
9	6 образцов плазмы	ДНК ВГВ	Положительный
10	6 образцов плазмы	ДНК ВГВ	Отрицательный
11	12 образцов плазмы	ДНК ВГВ	Отрицательный
12	12 образцов плазмы	ДНК ВГВ	Отрицательный
13	6 образцов плазмы	РНК ВГС	Положительный
14	6 образцов плазмы	РНК ВГС	Положительный
15	6 образцов плазмы	РНК ВГС	Положительный
16	12 образцов плазмы	РНК ВГС	Положительный
17	12 образцов плазмы	РНК ВГС	Положительный

Для количественной характеристики вирусной нагрузки ПЦР-позитивных проб донорской крови, полученных от донаций с 2006 по 2013 гг., были исследованы 72 образца, 21 из которых содержали ДНК ВГВ и 51 – РНК ВГС (таблицы 8 и 9). В образцах крови, содержащих ДНК ВГВ, в большинстве случаев (66,67%) определена низкая вирусная нагрузка. Концентрация ДНК ВГВ была менее  $1,5 \times 10^2$  МЕ/мл в 4 образцах (19,05%), также в 4 образцах она выявлена в диапазоне от  $1,5 \times 10^2$  МЕ/мл до  $1 \times 10^3$  МЕ/мл (19,05%), и в 6 образцах – от  $1 \times 10^3$  до  $1 \times 10^4$  МЕ/мл (28,57%).

Таким образом, в 2/3 исследованных образцов крови доноров концентрация ДНК ВГВ содержалась в низких значениях, причем в 19,05% этот маркер зарегистрирован на

пороговом уровне чувствительности тест-системы (менее  $1,5 \times 10^2$  МЕ/мл). Высокие концентрации ДНК ВГВ в диапазоне  $1 \times 10^4 - 1 \times 10^5$  МЕ/мл отмечены в 4 случаях, в диапазоне  $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$  МЕ/мл – в 1 образце крови донора и более  $1 \times 10^6$  МЕ/мл – в 2 случаях.

Таблица 8. Количественная характеристика ДНК ВГВ-положительных образцов крови доноров

Концентрация ДНК ВГВ (в МЕ/мл)	Число образцов	Доля образцов	Уровень виремии
Менее $1,5 \times 10^2$	4	19,05 %	Низкий 66,67%
$1,5 \times 10^2 - 1 \times 10^3$	4	19,05 %	
$1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$	6	28,57%	
$1 \times 10^4 - 1 \times 10^5$	4	19,05 %	Высокий 33,33%
$1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$	1	4,76%	
Более $1 \times 10^6$	2	9,52%	
Всего	21	100%	100%

Противоположная закономерность наблюдается в отношении РНК ВГС. Данные представлены в таблице 9. Только в 27,45% случаев определены низкие концентрации молекулярного маркера ВГС: менее  $3 \times 10^2$  МЕ/мл в 1 образце, в диапазоне  $3 \times 10^2 - 1 \times 10^4$  МЕ/мл – 2 случая, в диапазоне  $1 \times 10^4 - 1 \times 10^5$  МЕ/мл – 11 случаев. Высокие значения концентрации РНК ВГС выявлены в подавляющем большинстве образцов крови доноров: в диапазоне  $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$  МЕ/мл – 17 случаев (33,33%) и более  $1 \times 10^6$  МЕ/мл – 20 случаев (39,22%).

Таким образом, разведение положительного образца в 6 раз при пулировании не приводило к недовыявлению РНК ВГС, поскольку в большей части образцов отмечается высокая концентрация РНК ВГС, в отличие от низких уровней ДНК ВГВ, зарегистрированных в большинстве исследованных образцов крови доноров. Разведение исследуемого образца плазмы крови донора может приводить к пропуску компонентов крови, содержащих ДНК ВГВ, при тестировании в формате минипулов и использовании набора реагентов с чувствительностью 100 МЕ/мл, что и подтверждено экспериментально (недовыявление специфического сигнала ВГВ в более 40% пулированных образцов). Данное наблюдение необходимо учитывать при выборе тактики лабораторного обследования.

Таблица 9. Количественная характеристика РНК ВГС-положительных образцов крови доноров

Концентрация РНК ВГС (в МЕ/мл)	Число образцов	Доля образцов	Уровень виремии
Менее 300	1	1,96%	Низкая концентрация 27,45%
от 10 <sup>3</sup> до 10 <sup>4</sup>	2	3,92%	
от 10 <sup>4</sup> до 10 <sup>5</sup>	11	21,57%	
от 10 <sup>5</sup> до 10 <sup>6</sup>	17	33,33%	Высокая концентрация 72,55%
Более 10 <sup>6</sup>	20	39,22%	
Всего	51	100%	100%

Представленные данные демонстрируют необходимость введения обязательного ПЦР-исследования маркеров ВГВ и ВГС, являющегося дополнением к серологическим методам, в практику лабораторного обследования крови доноров на наличие вирусных инфекций, причем предпочтительнее в формате индивидуальной постановки, особенно в отношении индикации ВГВ. Однако ПЦР-тестирование в формате минипулов значительно снижает экономические затраты на исследование и в ряде случаев может быть оправдано. Если компоненты донорской крови в последующем подлежат карантинизации, инаktivации или предназначены для фракционирования, допустимо пулирование. В случае заготовки концентрата тромбоцитов данный формат исследования может явиться фактором, затрудняющим полную выбраковку инфекционных образцов донорской крови, и в связи с большим объемом донорской плазмы, переливаемым реципиенту, может привести к заражению ВГВ. Кроме того, при выборе тактики исследования образцов крови доноров на молекулярные маркеры ВГВ и ВГС важно учитывать и чувствительность используемых тест-наборов.

### **3. Скрининг образцов крови доноров на анти-НВс как инструмент повышения безопасности трансфузий**

Разработаны порядок обследования крови доноров и выбраковки компонентов крови по результатам лабораторного исследования на инфекционные маркеры, приведенный ниже, форма акта отстранения от донорства по результатам лабораторного тестирования и согласие донора на проведение расширенного исследования образцов его крови на анти-НВс



## **Порядок обследования донорской крови и выбраковки компонентов по результатам лабораторного исследования на маркеры инфекций.**

Взятие образцов крови доноров для лабораторного исследования выполняется непосредственно после венепункции с помощью специального контейнера, являющегося частью системы и снабженного коннектором для подсоединения пробирок - вакутейнеров.

Все образцы донорской крови подлежат обязательному исследованию иммуноферментным/иммунохемилюминисцентным методом (ИФА/ИХЛА) на наличие:

- 1) антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 и антигена р24 ВИЧ-1;
- 2) поверхностного антигена ВГВ;
- 3) антител к ядерному антигену ВГВ;
- 4) антител к ВГС;
- 5) наличие антител к *tr.palidum*(+реакция микропреципитации с кардиолипидным антигеном).

Исследование проводится в день заготовки донорской крови и (или) ее компонентов.

При получении положительной реакции ИФА/ИХЛА проводят повторное исследование.

В случае получения повторного положительного результата ИФА/ИХЛА компоненты крови с коротким сроком годности (тромбоконцентрат, донорские эритроциты) подлежат выбраковке. Компоненты крови с длительным сроком хранения (плазма, криоконсервированные эритроциты) переносят в холодильник с маркировкой «Задержано лабораторией. Не для клинического применения» до получения результатов подтверждающих тестов.

Пробы с выявленными поверхностным антигеном ВГВ и/или антителами к ВГС исследуют в подтверждающих тестах – нейтрализация и иммуноблот (соответственно).

Пробы, с выявленными антителами к вирусу иммунодефицита человека направляются в МГЦ СПИД для дальнейшего исследования.

При положительном результате подтверждающих тестов на регламентированные маркеры, а также при выявлении анти-НВс с уровнем реактивности более 3 условных единиц методами ИФА/ИХЛА (в связи с отсутствием подтверждающего теста):

- все компоненты крови, заготовленные от данного донора, подлежат выбраковке;
- составляют Акт отстранения от донорства, утверждают акт на заседании специальной комиссии, данные о доноре вносят в базу данных донорства. Донору предоставляется

полная информация о результатах его обследования и принятии решения об отстранении от донорства.

Анти-НВс положительные образцы с уровнем реактивности менее 3 условных единиц дополнительно, для уточнения специфичности положительной реакции, могут быть исследованы на анти-НВс IgM, анти-НВс и анти-НВе.

При отрицательных результатах дополнительного тестирования и отрицательном результате подтверждающих тестов на декретированные маркеры донора временно отстраняют от донорства:

- компоненты крови, находящиеся на длительном хранении, откладываются в промаркированный холодильник «Задержано лабораторией. Не для клинического использования»;
- донору назначается контрольное обследование через 1-6 месяцев.

При повторном ИФА/ИХЛА обследовании донора:

- в случае положительного результата ИФА/ИХЛА, находящиеся на длительном хранении задержанные компоненты крови подлежат выбраковке, составляют Акт отстранения от донорства, утверждают акт на заседании специальной комиссии, данные о доноре вносят в базу данных донорства. Донору предоставляется полная информация о результатах его обследования и принятии решения об отстранении от донорства;
- в случае отрицательного результата ИФА/ИХЛА компоненты крови считаются пригодными для клинического применения, донора допускают к донации.

Как «ИФА/ИХЛА отрицательную» расценивают пробу:

- отрицательную в первой постановке;
- положительную в первой постановке и дважды отрицательную при повторном исследовании в той же тест-системе.

Постановка ПЦР осуществляется для всех образцов крови, негативных по антителам к ВГС, ВИЧ-1 и ВИЧ-2, антигену р24 ВИЧ-1, поверхностному антигену ВГВ и антителам к ядерному антигену ВГВ, с целью выявления РНК ВИЧ, ВГС и ДНК ВГВ.

Если ПЦР исследование проводилось в пулах, в случае положительной реакции выполняют индивидуальные постановки. Затем положительные образцы передают для определения вирусной нагрузки, отрицательные образцы тестируют повторно.

При получении положительного результата ПЦР-исследования:

- все заготовленные от данного донора компоненты крови подлежат выбраковке;

- составляют Акт отстранения от донорства, утверждают акт на заседании специальной комиссии, данные о доноре вносят в базу данных донорства. Донору предоставляется полная информация о результатах его обследования и принятии решения об отстранении от донорства.

Компоненты крови, отрицательные по молекулярным вирусным маркерам, считают пригодными для клинического применения.

Для того, чтобы оценить значение рутинного тестирования образцов донорской крови на наличие анти-НВс (с целью выявления латентных форм вирусного гепатита В среди доноров крови и ее компонентов), было проведено в период с марта 2014 г. по апрель 2016 г. проспективное исследование 26 113 образцов крови доноров (таблица 10).

Таблица 10. Маркеры ВГВ, выявленные в образцах донорской крови в период проспективного исследования.

Месяц/год	Кол-во кроводач	Образцы крови первичных доноров		Образцы крови повторных доноров		НВсAg +	ДНК ВГВ+ НВсAg- анти-НВс-
		Кол-во	Анти-НВс+	Кол-во	Анти-НВс+		
Апрель/2014	968	275	14 (5,1%)	693	59 (8,5%)	1	0
Май/2014	1080	476	30 (6,3%)	604	36 (5,9%)	0	0
Июнь/2014	940	342	20 (5,8%)	598	12 (2%)	2	0
Июль/2014	946	323	24 (7,4%)	623	9 (1,4%)	1	0
Август/2014	1077	428	23 (5,4%)	649	14 (2,2%)	1	0
Сентябрь/2014	1198	355	31 (7,8%)	843	22*(2,6%)	2	0
Октябрь/2014	792	192	12 (6,3%)	600	6 (1%)	1	0
Ноябрь/2014	1289	699	30 (4,3%)	590	9* (1,5%)	1	0
Декабрь/2014	983	439	20 (4,6%)	544	3 (0,6%)	0	0
Январь/2015	874	391	14 (3,6%)	483	1* (0,2%)	2	0
Февраль/2015	1350	519	29 (5,6%)	831	3 (0,4%)	2	0

Март/2015	977	330	18 (5,5%)	647	1 (0,2%)	0	0
Апрель/2015	1050	340	14 (4,1%)	710	5 (0,7%)	0	0
Май/2015	987	346	20 (5,8%)	641	4 (0,6%)	2	0
Июнь/2015	1325	428	18 (4,2%)	897	9 (1,0%)	0	0
Июль/2015	871	209	6 (2,9%)	662	5 (0,7%)	0	0
Август/2015	1032	277	16 (5,8%)	755	3 (0,4%)	1	0
Сентябрь/2015	977	290	15 (5,2%)	687	2* (0,3%)	0	0
Октябрь/2015	1122	311	8 (2,6%)	811	3 (0,4%)	0	0
Ноябрь/2015	1054	246	10 (4,1%)	808	2* (0,2%)	0	0
Декабрь/2015	1048	234	9 (3,8%)	814	1 (0,1%)	0	0
Январь/2016	866	112	6 (5,4%)	754	2 (0,3%)	2	0
Февраль/2016	1179	208	6 (2,9%)	971	1 (0,1%)	0	1
Март/2016	924	122	6 (4,9%)	802	2* (0,2%)	0	0
Апрель/2016	1204	242	7 (2,9%)	962	1 (0,1%)	2	0
Всего	26113	8134	406 (5,0%)	17979	215 (1,2%)	20 (0,1%)	1

Примечание: \* - в одном случае анти-НВс выявлены в образце крови донора, ранее обследованного на этот маркер.

От 792 до 1350 (медиана 1032) доноров в месяц осуществляли донации крови и ее компонентов. Соотношение числа первичных и повторных доноров, ежемесячно приходивших в отдел заготовки крови и ее компонентов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, существенно не различалось за 25 месяцев наблюдения. За данный период число кроводач первичных доноров было в диапазоне от 112 (12,9%) до 699 (54,3%) в месяц (медиана 323, 34,1%). Число кроводач повторных доноров преобладало на протяжении

всего периода исследования и составляло от 483 (55,3%) до 971 (82,4%) в месяц (медиана 693, 71,6%).

В 2015 г. доноры в возрасте 18-29 лет составляли 47% от общего числа, а в 2016 г. – 48%, из них доноров в возрасте 18 лет было 1,4%.

Была проанализирована частота выявления следующих маркеров ВГВ в образцах крови доноров: HBsAg, ДНК ВГВ и дополнительно – анти-НВс. Наличие других инфекционных маркеров (антител к ВИЧ, ВГС и возбудителю сифилиса) оценивали только в пробах, положительных по антителам к ядерному антигену ВГВ.

За весь период исследования из 26 113 образцов донорской крови было выявлено лишь 20 (0,1%) образцов, содержащих HBsAg и только один положительный по ДНК образец крови при отсутствии других маркеров ВГВ (случай ранней фазы инфекции, описан в предыдущей главе). Все 26 113 образцов донорской крови, в соответствии с утвержденным в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России порядком обследования доноров, были исследованы на наличие анти-НВс. Этот маркер был обнаружен в 621 (2,4%) образце, причем в 15 случаях – параллельно с HBsAg, 3 – с анти-ВГС, 1 – с анти-ВИЧ и 4 – с антителами к возбудителю сифилиса. При исследовании образцов крови доноров на наличие инфекционных маркеров 598 были положительны только по анти-НВс. В 5 образцах донорской крови был выявлен только HBsAg, при отсутствии анти-НВс, что может свидетельствовать о ранней фазе инфекции. За 25 месяцев наблюдения частота выявления анти-НВс в образцах крови первичных доноров значимо не изменилась и составляла от 6 до 31 случая в месяц. Данные представлены в таблице 10. Доля образцов крови, взятых от повторных доноров и содержащих анти-НВс, среди всех проб крови составляла от 2,6% до 7,8% (медиана 5,1%). В тоже время, отмечено статистически значимое снижение частоты встречаемости анти-НВс в образцах крови повторных доноров с 59 случаев в апреле 2014 г. до 1 случая в апреле 2016 г., что составило от 8,5% до 0,1% от всех обследованных ежемесячно проб повторных доноров ( $\chi^2=79,5$ ,  $p<0,05$ ). Данную динамику можно объяснить тем, что лица, в образцах крови которых были выявлены анти-НВс, отстранялись от донорства. Однако за время наблюдения отстранение от донорства таких лиц не повлияло на общее число донаций, регулярно осуществляемых повторными донорами, которое составляло от 483 до 971 в месяц (медиана – 693). Как следует из данных, представленных в таблице 10, уже за восемь месяцев (к декабрю 2014 г.) удалось сформировать когорту регулярных повторных, не инфицированных ВГВ (отрицательных по анти-НВс) доноров. Встречаемость в образцах их крови анти-НВс составила ниже 1%. В дальнейшем исследовании (с декабря 2014 г. по апрель 2016 г.) этот показатель существенно не менялся.

В то же время в начале исследования частота встречаемости антител к ядерному белку ВГВ была достоверно выше в образцах крови повторных доноров по сравнению с образцами крови первичных доноров – 8,5% и 5,1%, соответственно ( $\chi^2=45,15$ ,  $p<0,05$ ). В апреле 2016 г. доля положительных результатов тестирования на наличие анти-НВс образцов крови от повторных доноров была статистически значимо ниже по сравнению долей таких результатов в образцах крови от первичных доноров – 0,1% и 2,9%, соответственно ( $\chi^2=18,75$ ,  $p<0,05$ ), что произошло за счет отстранения от донорства лиц, у которых в крови был обнаружен этот маркер ВГВ.

За 25 месяцев обследования повторных доноров, образцы крови которых были ранее исследованы на наличие серологических и молекулярных вирусных маркеров и были получены отрицательные результаты, в 6 случаях в образцах от последующих донаций были выявлены анти-НВс.

У одного донора анти-НВс с невысоким коэффициентом позитивности (1,77) появились спустя 3 месяца после предыдущей донации. Анти-НВс были единственным выявленным маркером ВГВ. На наличие ДНК ВГВ в индивидуальной постановке был исследован архивный материал от предыдущей донации и получен отрицательный результат. Для исключения неспецифической реакции на анти-НВс донору было назначено контрольное обследование через 3 месяца, согласно разработанному и утвержденному порядку обследования донорской крови и выбраковки компонентов крови в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. Выполнить контрольное обследование донора не удалось по причине неявки донора.

У второго донора анти-НВс появились уже через 2 месяца после предыдущей донации. Кроме анти-НВс суммарных были обнаружены анти-НВс IgM. Исследование архивного материала от предыдущей донации в индивидуальной постановке показало наличие ДНК ВГВ в низкой концентрации (менее  $1,5 \times 10^2$  МЕ/мл). От этой донации была заготовлена эритроцитарная взвесь и перелита пациенту центра в день заготовки. Пациент умер от основного заболевания через две недели после трансфузии, поэтому не удалось выполнить исследование его крови на наличие маркеров ВГВ.

В третьем случае в образце крови донора были выявлены анти-НВс методом ИХЛА с низким показателем позитивности (1,2), при этом, с помощью ИФА-метода выявлены анти-НВс в титре 200 мМЕ/мл, а анти-НВс этим методом не определялись. Остальные маркеры ВГВ (ДНК, НВсAg, анти-НВс IgM, анти-НВе) не выявлены. Предыдущая донация была 4 месяца назад, и донор был обследован на наличие инфекционных маркеров. Был заготовлен

концентрат тромбоцитов и перелит реципиенту, который не был обследован на маркеры ВГВ после трансфузии из-за смерти в реанимационном отделении от основного заболевания.

В образце крови четвертого донора при скрининге на инфекционные маркеры методом ИХЛА была зафиксирована положительная реакция по анти-НВс с показателем позитивности 1,9, присутствовали анти-НВс IgM, анти-НВс в титре 97 мМЕ/мл, остальные маркеры ВГВ не выявлены (НВсAg, ДНК и анти-НВе). От предыдущей донации двумя месяцами ранее была заготовлена эритроцитная взвесь и перелита пациенту, ранее не обследованному на широкий спектр маркеров ВГВ, который умер от основного заболевания через два месяца после трансфузии.

В пятом случае анти-НВс были выявлены вместе с антителами к ВИЧ в образце крови донора, титр анти-НВс составлял 122 мМЕ/мл. Эритроцитная взвесь с ресуспендирующим раствором, фильтрованная, была заготовлена три месяца назад и перелита реципиенту, у которого были анти-НВс в защитном титре на момент трансфузии. В течении полугода наблюдения у этого пациента не появились ни маркеры активной ВГВ-инфекции, ни антитела к ВИЧ.

В шестом случае образец крови донора содержал анти-НВс (коэффициент позитивности – 8,29), анти-НВс в титре 20 мМЕ/мл, анти-НВе, при отсутствии анти-НВс IgM и ДНК ВГВ. Заготовленный от данного донора 15 дней назад концентрат тромбоцитов был и перелит двум реципиентам. Один реципиент на момент трансфузии уже был инфицирован ВГВ (присутствовали анти-НВс) и в течение трех месяцев наблюдения у него не появились лабораторные маркеры активации ВГВ-инфекции. Второй реципиент на момент трансфузии не был обследован на весь спектр маркеров ВГВ, а через четыре месяца у него не были выявлены НВсAg, анти-НВс, а анти-НВс были в титре 39 мМЕ/мл.

Таким образом, согласно полученным данным, у повторных доноров случаи появления анти-НВс в качестве нового маркера крайне редки. Не выявлены случаи инфицирования реципиентов потенциально опасными в отношении ВГВ компонентами крови доноров, заготовленными от предыдущих донаций. Только в образце крови одного донора удалось обнаружить ДНК ВГВ в низком титре, что характерно для латентной формы ВГВ-инфекции. В остальных 5 случаях анти-НВс изолированные или в сочетании с антителами к другим антигенам вируса свидетельствовали об инфицированности ВГВ, при невыявлении ДНК вируса, концентрация которой могла быть ниже чувствительности используемого набора реагентов.

С целью определения напряженности специфического противовирусного иммунитета было выполнено исследование на наличие анти-НВс 495 из 606 образцов донорской крови,

содержащих анти-НВс, но в отсутствии НВсAg. Обнаружено (таблица 11), что данный маркер имел место в 79,6% случаях ( $n=394$ ), причем достоверно чаще анти-НВс выявлялся в высоком защитном титре – более 100 мМЕ/мл (283, 57,2%,  $\chi^2=190,33$ ,  $p<0,05$ ).

Таблица 11. Титр анти-НВс в положительных по анти-НВс образцах крови доноров и зависимость от обнаружения маркера острой инфекции (анти-НВс IgM)

Титр анти-НВс	Количество	Из них анти-НВс IgM+	
		Количество	Процент
>10 мМЕ/мл	101	7	6,9
10-100 мМЕ\мл	111	9	8,1
>100 мМЕ/мл	283	22	7,8
Всего	495	38	7,7
$p$	$\chi^2=190,33$ , $p<0,05$	$\chi^2=0,11$ , $p=0,945$	

Согласно протоколу исследования, все образцы крови доноров, положительные по анти-НВс, были протестированы на наличие анти-НВс IgM. Из 495 следованных проб положительными по анти-НВс IgM оказались 38, что составило 7,7%. Согласно данным, представленным в таблице 11, доля образцов крови доноров, содержащих маркер острой ВГВ-инфекции (анти-НВс IgM) была сопоставима как в образцах с высоким титром анти-НВс, так в образцах крови, отрицательных по этому маркеру (7,8% и 6,9%,  $p=0,945$ ).

Следовательно, не представляется возможным исключение потенциальной вирусной опасности переливания компонентов донорской крови, содержащих анти-НВс, даже при условии обнаружения в них анти-НВс в высоких титрах. Особенно сомнительна безопасность таких компонентов крови, предназначенных для пациентов с заболеваниями системы крови. В данном исследовании при лабораторном тестировании на наличие инфекционных маркеров были выявлены и не допущены до клинического применения 598 образцов крови доноров положительные только по анти-НВс.

#### **4. Построение математических моделей и расчет эпидемиологических показателей по результатам проспективного исследования**

Процедура построения математической модели заключалась в подборе такого уравнения математической модели линии тренда, которое будет иметь максимальное значение показателя  $R^2$  и наилучшее визуальное соответствие поведения модели и данных.

Использовались модели: линейная, полиномиальные (степени от 2 до 4) и экспоненциальная. Экспоненциальные модели использовались в случаях, когда линейное снижение соответствующего показателя могло при экстраполяции привести к



отрицательным значениям. По данным, представленным в таблице 10, построены графики (рисунок 2).

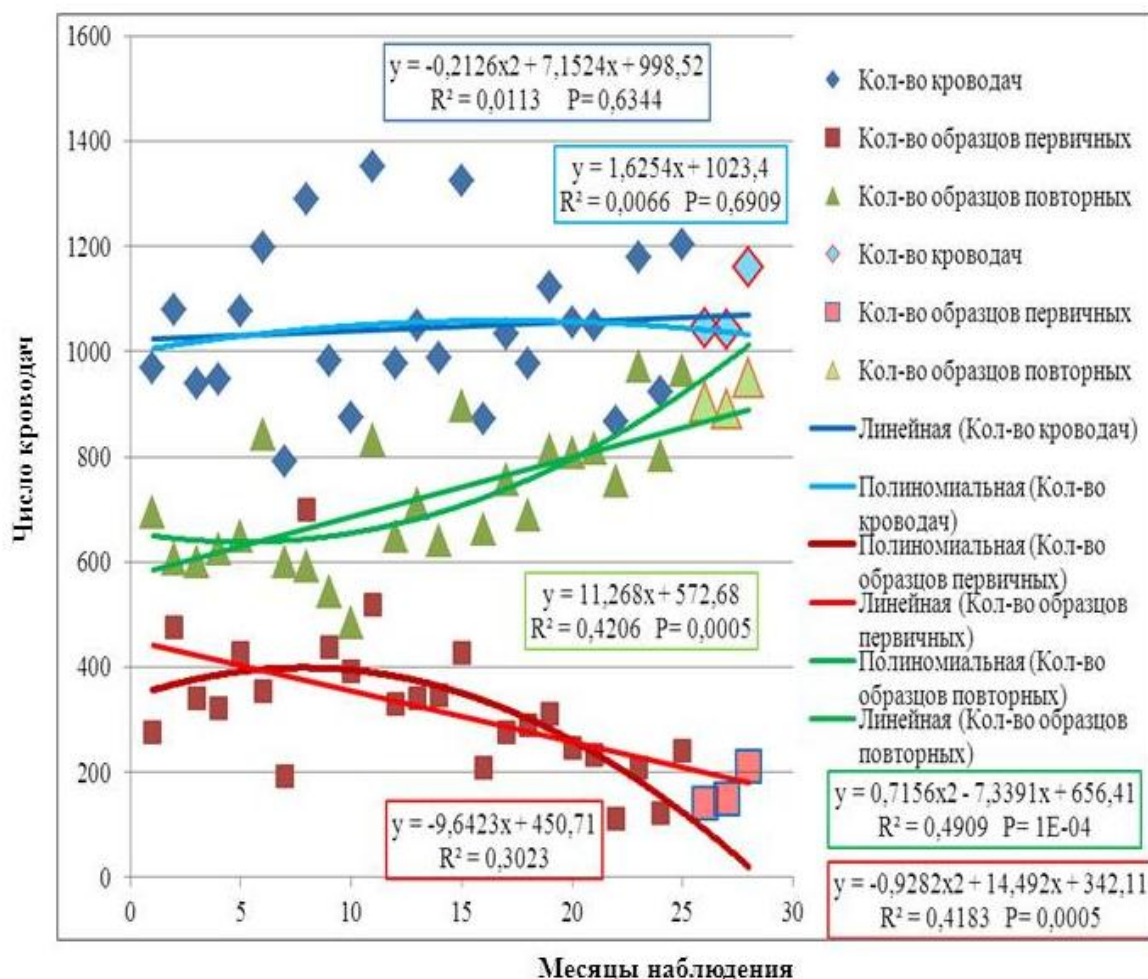


Рисунок 2. Тенденции изменения количества образцов первичных и повторных доноров в период проспективного исследования

За 25 месяцев не отмечено значимого изменения общего числа донаций ( $p=0,6909$ ). В период проспективного исследования наблюдалось достоверное увеличение числа кроводач повторных доноров ( $p =0,0005$ ) на фоне снижения числа кроводач первичных доноров ( $p =0,0046$ ). Этот феномен является прямым следствием процедуры вычислений: число кроводач повторных доноров получается вычитанием числа кроводач первичных доноров из общего числа кроводач. Так как моделирование не выявило достоверных временных тенденций общего числа кроводач, то для прогнозирования достаточно вычислять процент числа кроводач повторных доноров от общего числа кроводач (процент кроводач первичных доноров будет дополнением до 100%).

С целью выбора оптимальных моделей для прогнозирования были добавлены данные за последующие 3 месяца исследования с мая по июль 2016г. В этот период общее число

кроводач составило 3246, ежемесячно: 1045, 1041 и 1160. Количество кроводач повторных доноров ( $n=2744$ ) также преобладало по сравнению с количеством кроводач первичных доноров ( $n=502$ ). Полиномиальные модели оказались неудачными для прогнозирования и были заменены линейными. Тенденции, выявленные линейными моделями на данных до апреля 2016 (таблица 10), сохранялись и в следующие 3 месяца. Таким образом, сохранение общего числа донаций происходит за счет увеличения числа донаций повторных доноров на фоне снижения числа донаций первичных доноров.

Таким образом, математическое моделирование позволило спрогнозировать на последующие три месяца снижение числа анти-НВс-положительных образцов крови как повторных, так и первичных доноров. Отстранение доноров, образцы крови которых были положительны по анти-НВс, не привело к изменению общего числа донаций. Зафиксировано достоверное снижение числа донаций первичных доноров и увеличение числа донаций повторных доноров.

#### **Расчет эпидемиологических показателей, определяющих безопасность трансфузий компонентов крови доноров.**

Были использованы следующие эпидемиологические показатели, определяющие безопасность:

1. Выявляемость – количество событий за определенный период времени на 100 000 донаций;
2. Инцидентность – количество положительных реакций на 100 000 человеко-лет;
3. Остаточный риск трансфузионного инфицирования – равный инцидентности умноженной на период негативного окна инфекции в годах на 1 млн. донаций.

#### **Выявляемость маркеров ВГВ у первичных и повторных доноров.**

Выявляемость маркеров ВГВ у первичных и повторных доноров рассчитывали по данным, представленным в таблице 10. Выявляемость анти-НВс в образцах крови первичных доноров была в 4 раза выше по сравнению с повторными донорами ( $4991,39/10^5$  донаций и  $1195,84/10^5$  донаций). Данные представлены в таблице 12.

Таблица 12. Выявляемость маркеров ВГВ у первичных и повторных доноров

Маркер	Выявляемость/ $10^5$ донаций	
	Образцы крови первичных доноров	Образцы крови повторных доноров
Анти-НВс	4991,39	1195,84
НВsAg	135,23	-
ДНК ВГВ	-	5,56

Все положительные по HBsAg образцы крови принадлежали первичным донорам крови и ее компонентов, в то время как, единственный образец, положительный по ДНК ВГВ, – повторному донору, поэтому для первичных доноров была рассчитана только выявляемость HBsAg, а для повторных – ДНК ВГВ.

Остаточный риск трансфузионного инфицирования ВГВ, рассчитанный на основе анализа данных обследования повторных доноров с учетом результатов ПЦР-тестирования, составил 0,79 на 1 млн. донаций. Для расчетов была использована маленькая выборка, поскольку данные, необходимые для расчета остаточного риска трансфузионного инфицирования, доступны в лабораторной информационной системе с конца 2014 г. и, учитывая, что ПЦР-скрининг образцов крови от всех донаций осуществлялся только с 2015 г., следовательно, учитывать его мы считаем преждевременным. Необходимы дополнительные исследования.

#### **5. Лабораторные маркеры вирусов гепатитов у пациентов с заболеваниями системы крови**

У пациентов с заболеваниями системы крови поражение печени является одним из наиболее частых осложнений в ходе проведения программной химиотерапии. Характерной особенностью данного осложнения у гематологических больных является его сложный генез: инфильтрация печени опухолевыми клетками, гепатотоксичность химиопрепаратов, а также воздействие инфекционных агентов. Дифференциальная диагностика вирусного гепатита начинается с рутинного исследования крови пациента на HBsAg и анти-ВГС, и, в большинстве случаев, на этом и заканчивается. Лишь в некоторых клиниках и гематологических отделениях проводят более глубокое исследование на широкий спектр маркеров вирусного гепатита В (анти-HBs, анти-HBc, анти-HBe, HBeAg) и используют молекулярные методы диагностики вирусных инфекций, в частности, определение ДНК ВГВ и РНК ВГС методом ПЦР.

Проанализирована динамика выявления регламентированных маркеров ВГВ и ВГС (HBsAg и анти-ВГС) в период с 2003 по 2016 гг. в образцах крови пациентов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России ( $n = 58\ 455$ ) (рисунок 3). За указанный 14 летний период наблюдалось статистически достоверное снижение частоты встречаемости HBsAg и анти-ВГС в образцах крови пациентов с заболеваниями системы крови ВГС с 5,0% до 2,8% ( $\chi^2=29,56$ ,  $p<0,00001$ ) и с 19,8% до 9,8% ( $\chi^2=183,23$ ,  $p<0,00001$ ), соответственно. Исследование на HBsAg и анти-ВГС не в полной мере отражают уровень инфицированности ВГВ и ВГС больных заболеваниями системы крови. С целью определения данного

показателя используют другие лабораторные маркеры этих вирусов, появляющиеся на разных этапах заболевания.

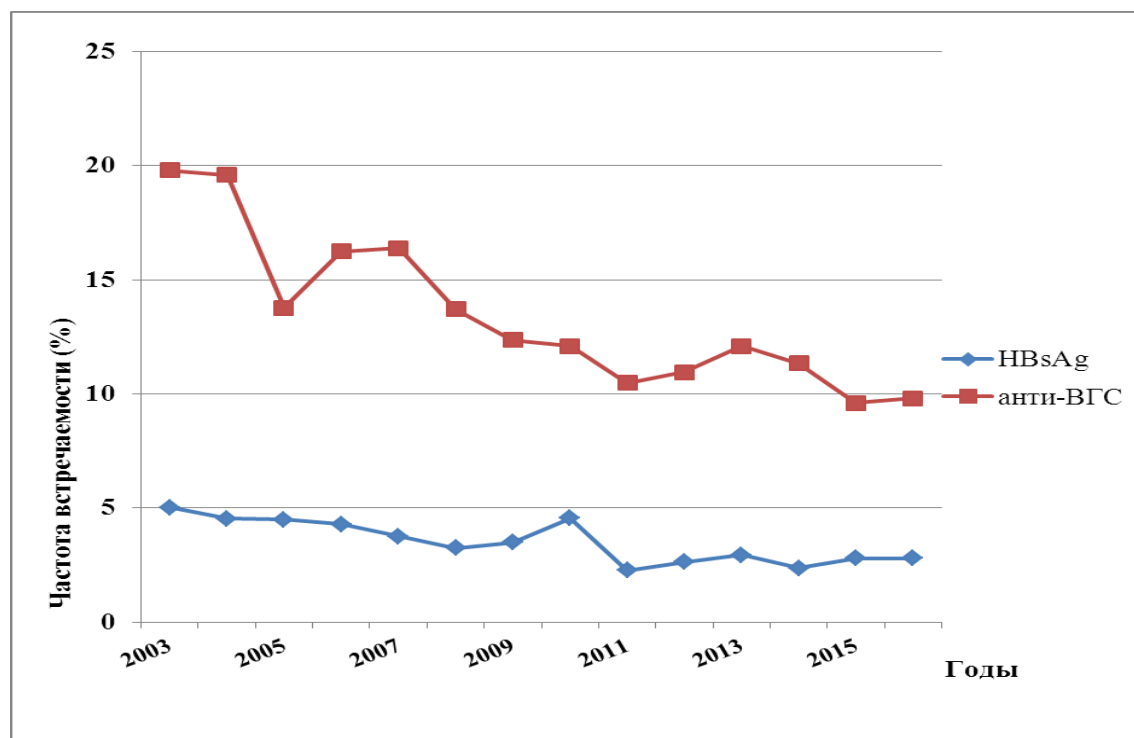


Рисунок 3. Динамика частоты выявления маркеров вирусов гепатитов В и С в образцах крови пациентов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России за период с 2003 по 2016 гг.

Пациенты ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России из различных нозологических групп были обследованы однократно при поступлении в стационар на расширенный спектр маркеров вирусов гепатитов В и С: больные апластической анемией (АА) - 69 человек, острыми лейкозами (ОЛ) – 93 человек, хроническим миелолейкозом (ХМЛ) – 45 человек, хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) – 19 человек, множественной миеломой (ММ) – 31 человек. В качестве контрольной группы пациентов с высокой трансфузионной нагрузкой были выбраны 20 больных гемофилией А и В, поскольку до 2006 г. заместительная терапия факторов свертывания проводилась только компонентами донорской крови. Суммарная частота обнаружения серологических маркеров ВГВ и ВГС при первичном скрининге колебалась в разных группах пациентов от 51,6% до 73,7%; при этом статистически достоверных различий между группами найдено не было ( $p > 0,05$ ). HBsAg был выявлен в 14 из 257 (5,4%) образцов крови пациентов. Доли HBsAg-положительных образцов крови пациентов достоверно различались в зависимости от нозологии ( $\chi^2 = 12,21$ ,  $p = 0,016$ ), минимальные значения были выявлены у пациентов с ХМЛ (0%) и АА (1,4%), а максимальные у пациентов с ХЛЛ (15,8%). Анти-HBs были выявлены в 89 из 257 (34,6%)

образцов крови пациентов. Отмечены статистически значимые различия по частоте встречаемости анти-НВс среди пациентов с разными заболеваниями: минимальные значения были получены у больных ММ (19,3%), максимальные - у больных АА (44,9%) ( $\chi^2= 16,89$ ,  $p=0,002$ ). Суммарные анти-НВс были зарегистрированы у 76 из 257 (29,6%) пациентов, причем частота выявления данного маркера значимо не различалась среди пациентов пяти анализируемых групп ( $\chi^2= 2,77$ ,  $p=0,598$ ). Маркеры ВГВ, свидетельствующие об активной фазе инфекции (анти-НВс IgM и НВсAg), были выявлены у небольшого числа больных: у 4 (1,6%) и 5 (1,9%) из 257 обследованных, соответственно, также без статистически значимых различий ( $p>0,05$ ). В то же время, анти-НВе зарегистрированы у 36 из 257 обследованных (14,0%), причем ни в одном случае эти антитела не являлись единственным маркером ВГВ-инфекции, сопровождая анти-НВс и/или анти-НВс. Анти-ВГС были выявлены в 13 из 257 (5,1%) образцов крови больных, со статистически значимыми колебаниями по группам пациентов от 0 при ХЛЛ, 6,6% при ХМЛ, до 10,1% при АА ( $\chi^2= 11,3$ ,  $p=0,023$ ). Последний показатель в исследуемых группах был ниже, чем в когорте всех пациентов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (16,3% в те же годы - 2006-2007 гг.), куда входили и больные гемофилией. Больные гемофилией были тотально инфицированы ВГС (20 из 20 обследованных, 100%) и частота встречаемости серологических и молекулярных маркёров ВГВ и ВГС достоверно выше в этой группе по сравнению с образцами крови от пациентов с другими заболеваниями системы крови – АА, ОЛ, ХМЛ, ХЛЛ и ММ ( $p<0,05$ ). В образцах крови больных гемофилией отсутствовали серологические маркеры активной ВГВ-инфекции. Профиль серологических маркеров у данного контингента пациентов характерен для латентной формы ВГВ-инфекции: 13 из 20 (65%) образцов содержали анти-НВс и 16 (80%) - анти-НВс. В 3 из 20 случаев (15%) выявлена ДНК ВГВ и в 5 (25%) – РНК ВГС. Таким образом, суммарная выявляемость молекулярных маркеров ВГВ и ВГС среди больных гемофилией составляла 35%, что значительно выше, чем среди пациентов с другими заболеваниями системы крови (от 12,9 до 26,2%, в среднем 14,8%). Суммарная выявляемость молекулярных маркеров ВГВ и ВГС (ДНК ВГВ и РНК ВГС) наиболее велика у больных ХЛЛ (26,2%) и ММ (19,3%); в других группах (АА, ОЛ, ХМЛ) она ниже и практически одинакова ( $\approx 13\%$ ,  $p>0,05$ ). У подавляющего большинства обследованных частота обнаружения ДНК ВГВ и РНК ВГС превышала соответствующие показатели для НВсAg и анти-ВГС на 1-2%. У 5,4% больных ОЛ, негативных по всем серологическим маркерам, наличие ДНК ВГВ или РНК ВГС было единственным свидетельством инфицированности ВГВ и ВГС.

## **6. Проведение эпидемиологического расследования случаев возможного инфицирования реципиента компонентов донорской крови вирусом гепатита В и/или С**

С целью выявления случаев вероятного трансфузионного инфицирования, с августа 2013 г. проводилась регистрация случаев первичного выявления лабораторных маркеров ВГВ и ВГС (HBsAg, ДНК ВГВ, анти-ВГС, РНК ВГС) у ранее обследованных пациентов, а с ноября 2013 года инициировано расследование таких случаев. Был разработан двухэтапный порядок проведения расследования случаев вероятного трансфузионного инфицирования ВГВ и ВГС пациентов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, ранее отрицательных по маркерам этих вирусов. После выявления маркера в образце крови пациента проверяли имеющиеся данные в лабораторной информационной системе, анализировали спектр сделанных ранее лабораторных исследований. При отсутствии/недостаточности данных дополнительно исследовали панель маркеров ВГВ или ВГС. Для вируса гепатита В панель состояла из: HBsAg, ДНК ВГВ, анти-HBs, анти-HBc, HBeAg, анти-HBe. Если были выявлены анти-HBc, то дополнительно исследовали на наличие анти-HBc IgM с целью определения активности вирусного процесса. Для вируса гепатита С панель состояла из анти-ВГС и РНК ВГС. После получения полной панели маркеров определяли даты первого положительного результата и предшествующего отрицательного результата по этому маркеру. По базе данных научной лаборатории вирусной безопасности трансфузий крови и её компонентов проводили поиск архивных образцов плазмы/сыворотки крови пациента, присланных на исследование ДНК герпесвирусов, в период между положительным результатом и предыдущим отрицательным результатом.

На первом этапе расследования определялась дата вероятного инфицирования (ДВИ). ДВИ определяется как наиболее ранняя точка отсчета, после которой вероятное инфицирование могло проявиться выявлением лабораторных вирусных маркеров. ДВИ вычисляли по формуле с учетом даты первичного выявления (ДПВ) лабораторных маркеров вирусов гепатитов. В случае первичного выявления HBsAg или молекулярных маркеров ВГВ и ВГС, поскольку ДНК ВГВ и РНК ВГС достигают обнаруживаемых концентраций через 10-15 дней, а поверхностный антиген ВГВ можно выявить только через 1 месяц от момента инфицирования, «негативное окно» может составлять 3 месяца. В случае первичного выявления анти-ВГС, так как антитела появляются в определяемом титре от 7-8 недель до 6 месяцев от момента инфицирования, для вычисления ДВИ отнимали 180 дней от ДПВ.

Если были доступны архивные образцы крови пациентов, то проводили их исследование на наличие молекулярных маркеров ВГВ и ВГС. Для данных маркеров негативное окно минимальное и составляет 15-30 дней для ДНК ВГВ, 11-15 дней – для РНК ВГС. В случае регистрации положительного результата рассчитывалась скорректированная дата вероятного инфицирования: дата взятия образца крови пациента, в котором впервые был получен положительный сигнал, минус 30 дней.

Далее, на втором этапе расследования, проводился поиск вероятного источника инфекции. Анализировали трансфузионный анамнез реципиента в период от ДВИ до даты ДПВ. Подбирали данные о компонентах, перелитых реципиенту за этот период, составляли список доноров, от которых были заготовлены данные компоненты, проверяли, были ли от этих доноров последующие донации с отрицательными результатами вирусологического скрининга, спустя 90 и более дней, от даты трансфузии, если донор не совершал последующих донаций крови и ее компонентов, то его вызывали для прохождения обследования.

Образцы донорской крови исследовали на панель маркеров того вируса гепатита, который был выявлен у реципиента. ПЦР-исследование проводили в индивидуальной постановке. Материалом для исследований служили архивные образцы от данной и последующих донаций; плазма донора, находящаяся на карантинном хранении, а также образцы крови доноров, вызванных с целью обследования. Учитывали результаты лабораторного тестирования последующих донаций и проводили анализ данных находящихся в лабораторной информационной системе.

За 33 месяца исследования (на 1.05.2016) было зарегистрировано 6 случаев первичного выявления маркеров ВГВ и 2 случая первичного выявления ВГС, 4 из них, выявленные после ноября 2013 г., было расследовано (2 – первичного выявления маркеров ВГВ и 2 – ВГС в образцах крови пациентов, негативных по всем маркерам этих вирусов при предыдущих исследованиях).

В первом случае 14 ноября 2013 г. был выявлен HBsAg у ранее неинфицированного ВГВ больного 32 лет с диагнозом острый миелоидный лейкоз (M4-вариант), диагностированный в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России в мае 2013 г. Первоначально определенная дата вероятного инфицирования – 14 августа 2013 г, была подвергнута корректировке после исследования на наличие ДНК ВГВ доступных архивных образцов плазмы данного пациента, поступивших в лабораторию для ПЦР-исследования. Было показано, что ДНК ВГВ имела место уже 16 октября 2013 г. в концентрации  $4,1 \times 10^3$

МЕ/мл. после получения результатов исследования дата вероятного инфицирования была определена 16 июля 2013 г.

В дальнейшем у данного пациента при количественном определении ДНК ВГВ отмечалось повышение концентрации до  $4,6 \times 10^6$  МЕ/мл. В образце крови, в котором впервые был выявлен HBsAg, помимо этого антигена ВГВ, присутствовал еще и HBeAg, который свидетельствовал об активной репликации вируса. Через три месяца в крови у этого пациента появились анти-HBc суммарные и IgM, что является характерным для классического течения вирусного гепатита В.

Данному пациенту в период вероятного инфицирования были проведены трансфузии эритроцитной массы и концентратов тромбоцитов от 23 доноров. Поскольку рутинное исследование образцов крови доноров на тот момент включало лишь определение регламентированного HBsAg, было проведено исследование на наличие ДНК ВГВ и анти-HBc доступных архивных образцов плазмы доноров ( $n=16$ ) от соответствующих донаций и получены отрицательные результаты. Четыре донора пришли на последующую донацию, образцы их крови были протестированы на наличие HBsAg, анти-HBc, ДНК ВГВ и также получены отрицательные результаты. Еще три донора, у кого не было последующих донаций, и чьи архивные образцы были недоступны, были вызваны в отдел заготовки компонентов крови, но отказались от обследования. Таким образом, эпидемиологическое расследование в данном случае не было завершено, поэтому не представилось возможным исключить трансфузионный путь инфицирования.

У второго пациента 66 лет; находящегося в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России с диагнозом - В-хронический лимфолейкоз, мезангиокапиллярный гломерулонефрит; первично HBsAg был выявлен 27.01.2015. Исследование архивных образцов крови данного пациента не привели к корректировке даты вероятного инфицирования, поскольку результат исследования на ДНК ВГВ оказался отрицательным.

Согласно разработанному порядку проведения расследования случаев вероятного трансфузионного инфицирования вирусами гепатитов В и С, была установлена дата вероятного инфицирования ВГВ - 27 октября 2014 г. Данному пациенту, согласно трансфузиологическому анамнезу, была произведена единственная трансфузия концентрата тромбоцитов 22 ноября 2014 г. от донора, который четыре раза сдавал кровь в последующем, последний раз 26 января 2015 г., был планово обследован на наличие HBsAg, анти-HBc и



ДНК ВГВ, и получены отрицательные результаты лабораторных исследований. Следовательно, трансфузионный путь инфицирования в данном случае был исключен.

Следующие два случая связаны с первичным выявлением маркеров ВГС у ранее неинфицированных пациентов.

У третьего пациента 23 лет с диагнозом апластическая анемия 3 апреля 2014 г. была обнаружена РНК ВГС в концентрации более  $10^8$  МЕ/мл, в то время, как при обследовании 27 февраля 2014 г. маркеры ВГС у него отсутствовали. Установлена дата вероятного инфицирования, что позволило рассчитать период для поиска доноров – с 4 января 2014 г. по 4 апреля 2014 г. В указанный период времени пациенту проведено 12 трансфузий, из них: 8 трансфузий концентратов тромбоцитов и 4 дозы эритроцитной массы. Поскольку в тот период времени донорская кровь не была исследована на наличие молекулярных вирусных маркеров, для расследования источника инфицирования был проведен анализ архивных образцов от выполненных 12 донаций. Все образцы были исследованы в индивидуальной постановке и РНК ВГС не выявлена. Проведенное расследование позволило исключить трансфузионный путь инфицирования.

У четвертого пациента 20 лет с диагнозом острый промиелоцитарный лейкоз, установленным в декабре 2013 г., 6 марта 2015 г. была обнаружена РНК ВГС в концентрации  $5,4 \times 10^6$  МЕ/мл. При этом, анти-ВГС отсутствовали. Через 18 дней при повторном обследовании были выявлены антитела к вирусным белкам, что не является характерным для классического течения острого вирусного гепатита С. У данного пациента были доступны архивные образцы плазмы крови, ранее поступившие в лабораторию для ПЦР-исследования.

В результате молекулярного исследования архивных образцов РНК ВГС выявлена в образце крови 3 декабря 2013 г. Была скорректирована дата вероятного инфицирования - 3 сентября 2013 г. До этого момента пациенту было проведено 5 трансфузий. У трех доноров были повторные донации с отрицательными результатами исследования образцов их крови на наличие анти-ВГС и РНК ВГС в период с марта по октябрь 2014 г. Два из пяти доноров отказались от повторного контрольного обследования. В данном случае расследование не закончено, поэтому не представляется возможным исключить вероятность трансфузионного инфицирования.

Таким образом, в двух случаях трансфузионный путь инфицирования был исключен. Еще в двух случаях трансфузионный путь инфицирования исключить не удалось, в связи с тем, что доноры отказались от контрольного обследования. В ходе данного наблюдения,

наиболее информативным материалом для проведения эпидемиологического расследования оказались результаты повторного обследования доноров и архивные образцы крови пациентов центра, поступавшие в лабораторию для других исследований. Архивный материал от доноров являлся неинформативным, поскольку не позволил установить причину инфицирования пациентов, что, вероятно, обусловлено как повышением качества лабораторных исследований, так и дополнительным обследованием доноров на наличие анти-НВс и молекулярных маркеров ВГВ и ВГС.

Кроме того, в процессе проведения эпидемиологических расследований и регистрации случаев впервые обнаруженных лабораторных маркеров ВГВ и ВГС у ранее обследованных пациентов, выяснилось, что нет первичной достаточной информации вирусологического обследования пациентов при поступлении в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. Согласно нормативным документам, поступающие в гематологический стационар больные были обследованы на наличие HBsAg и анти-ВГС. В тоже время, анализ результатов обследования на анти-НВс пациентов центра показал, что 2016 г. из 3548 проб от поступивших в стационар лиц, на исследование анти-НВс был направлен только 1131 образец (31,9%), причем в 233 из них (20,6%) были выявлены анти-НВс.

По результатам проведенных эпидемиологических расследований были разработаны и внедрены в практику ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России стандартная операционная процедура и карта расследования случая вероятного трансфузионного инфицирования ВГВ или ВГС пациентов, которая заполняется по результатам эпидемиологического расследования. Кроме того, в связи с недостаточностью информации, получаемой только по результатам стандартного скрининга, был разработан и внедрен в практику протокол обследования пациентов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России на инфекционные маркеры, приведенный ниже.

**Протокол обследования образцов крови пациентов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России на инфекционные маркеры (ВИЧ, ВГВ, ВГС, возбудителя сифилиса)**

1. Необходимо проводить обследование всех пациентов при поступлении в стационар на наличие анти-НВс и анти-НВs в дополнение к регламентированным маркерам (анти-ВИЧ, HBsAg, анти-ВГС, ДНКВГВ, РНК ВГС, серологические реакции на сифилис).
2. В случае обнаружения HBsAg - дополнительное исследование HBeAg, анти-HBe.
3. В случае обнаружения анти-НВс – дополнительное исследование анти-НВс IgM.
4. В спорных случаях – исследование на анти-HBe для подтверждения инфицированности ВГВ.

5. Обследование на наличие HBsAg, анти-ВГС, ДНК ВГВ, РНК ВГС проводится ежемесячно для реципиентов крови и ее компонентов, органов и тканей, пациентов отделений гемодиализа и гематологии, пребывающих в медицинской организации более 1 месяца (согласно нормативным документам – санитарным правилам).
6. Остальные контингенты пациентов вне зависимости от результатов тестирования при поступлении обследуются на инфекционные маркеры только по клиническим показаниям.

### **Заключение**

Заготовка компонентов крови для реципиентов, находящихся в состоянии иммунодепрессии, в частности для пациентов гематологических стационаров, должна осуществляться с повышенными требованиями, предъявляемыми к вирусной безопасности компонентов крови. Разработанный порядок скрининга донорской крови прошел проверку в условиях гематологического стационара, показавшую, что он эффективно обеспечивает вирусную безопасность трансфузий, поскольку не зафиксировано случаев возможного трансфузионного инфицирования ВГВ реципиентов компонентов крови после его внедрения в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. Данный порядок может быть рекомендован в качестве рутинного скрининга в службе крови, поскольку обеспечивает выявление доноров с латентной формой ВГВ-инфекции, что позволяет сэкономить средства и проводить ПЦР-тестирование высокочувствительными наборами реагентов в пулах из 6 проб без риска пропуска образцов с низкими концентрациями ДНК ВГВ. Данные, полученные после введения скрининга на наличие анти-НВс в рутинную практику, показали его диагностическую значимость при первичном обследовании доноров крови и ее компонентов. Сформирована группа повторных доноров крови и ее компонентов, не инфицированных ВГВ, в крови которых отсутствуют анти-НВс.

Создан и апробирован двухэтапный порядок расследования случаев вероятного трансфузионного инфицирования ВГВ и ВГС пациентов, ранее отрицательных по маркерам этих вирусов. Внедрение лабораторной информационной системы позволяет оперативно и достоверно проводить такие расследования.

Разработан алгоритм обследования больных при поступлении в гематологический стационар, включающий исследование на анти-НВс и анти-НВс помимо тестирования на HBsAg, анти-ВГС, ДНК ВГВ, РНК ВГС. Алгоритм позволяет уже при поступлении в лечебное учреждение фиксировать наличие ВГВ- и/или ВГС-инфекции у пациентов. Данная

информация важна для оценки возможности проведения противовирусной терапии или вакцинопрофилактики больным до начала лечения иммуносупрессивными препаратами.

### **Выводы**

1. Разработаны порядок обследования донорской крови, включающий скрининг на антитела к ядерному антигену ВГВ, и порядок выбраковки компонентов по наличию инфекционных маркеров, эффективно обеспечивающие вирусную безопасность гемотрансфузий.

2. Установлено статистически значимое снижение встречаемости регламентированных маркеров ВГВ и ВГС в образцах крови доноров в период с 1999 по 2016 гг. с 0,38% до 0,06% ( $\chi^2=28,81$ ,  $p<0,05$ ) и с 0,71% до 0,21% ( $\chi^2=35,23$ ,  $p<0,05$ ), соответственно; в образцах крови пациентов гематологического стационара в период 2003 - 2016 гг. с 5,0% до 2,8% ( $\chi^2=29,56$ ,  $p<0,00001$ ) и с 19,8% до 9,8% ( $\chi^2=183,23$ ,  $p<0,00001$ ), соответственно; что обусловлено комплексом мероприятий, проведенных в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России.

3. Тестирование на наличие антител к ядерному антигену ВГВ позволило выявить 598 (2,3%) потенциально инфицированных образцов крови доноров, что привело к выбраковке и недопущению до клинического применения заготовленных от данных доноров компонентов крови.

4. Допускать к клиническому применению компонентов крови доноров, содержащих антитела к ядерному антигену ВГВ и в высоком титре антитела к поверхностному антигену ВГВ, небезопасно, поскольку в 8% таких образцов обнаружен маркер острой ВГВ-инфекции.

5. Исследование образцов крови доноров на наличие антител к ядерному антигену ВГВ обеспечивает максимальное выявление лиц с латентной формой ВГВ-инфекции, что позволяет проводить ПЦР-тестирование в пулах из 6 проб без риска пропуска образцов с низкими концентрациями ДНК ВГВ.

6. Двухэтапный порядок проведения расследования случаев вероятного трансфузионного инфицирования вирусами гепатитов В и С пациентов гематологического стационара, ранее отрицательных по маркерам этих вирусов, в рамках функционирования лабораторной информационной системы позволяет эффективно и достоверно проводить расследование, прослеживая пары донор-реципиент.

7. С целью выявления латентных форм заболевания алгоритм обследования больных при поступлении в стационар должен включать помимо тестирования на HBsAg, ДНК ВГВ, анти-ВГС, РНК ВГС, обязательное исследование на антитела к ядерному и поверхностному антигенам ВГВ.

## **Практические рекомендации**

1. С целью повышения вирусной безопасности трансфузий компонентов крови, целесообразно обследовать доноров на наличие анти-НВс, а в случае выявления этих антител – отстранять таких доноров от донорства.
2. Необходимо обследовать на наличие антител к ядерному, поверхностному антигенам и ДНК ВГВ, кроме регламентированного HBsAg, всех поступающих в стационар пациентов для диагностики латентных форм вирусного гепатита В, особенно это актуально для больных, которым планируется проведение химио- и иммуносупрессивной терапии, что может способствовать активации ВГВ-инфекции.

## **Список работ, опубликованных по теме диссертации:**

1. Голосова, Т.В. Тестирование доноров и эволюция посттрансфузионного гепатита/ Т.В.Голосова, А.В.Сомова, Т.А.Туполева, Ф.П.Филатов // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 1999. № 1. с. 32-36.
2. Ярославцева, Н.Г. Вирусная безопасность гемотрансфузий: обеспечивают ли её принятые лабораторные методы выбраковки донорской крови по гепатитам В и С/ Н.Г.Ярославцева, Л.О.Грумбкова, Т.А.Туполева, Е.Н.Игнатова, А.В.Сомова, А.А.Гуляева, С.Ю.Багрянцева, Е.Н.Овчинникова, Л.Л.Шумилова, Ф.П.Филатов // Гематология и трансфузиология. 2006. т. 51. № 2. с. 22-26.
3. Туполева, Т.А. Контаминация при ПЦР-исследованиях: проблемы и решения/ Т.А.Туполева, Д.С.Тихомиров, Л.О. Грумбкова, Е.Н.Игнатова, Т.Ю.Романова, Ф.П.Филатов, Т.А.Гаранжа // Клиническая лабораторная диагностика. 2015. т. 60. № 1. с. 26-42.
4. Ярош, Л.В. Вирусные гепатиты с паретеральным путём передачи у пациентов гематологического центра/ Л.В.Ярош, Т.А.Семенов, Ф.П.Филатов, Т.А.Гаража, Т.А.Туполева, Д.А.Эльгорт, М.В.Коноплева, А.П.Сулов // Инфекционные болезни. 2015. т. 13. № 4. с. 5-9.
5. Туполева, Т.А. Скрининг донорской крови на антитела к ядерному антигену вируса гепатита В как инструмент повышения безопасности трансфузий для больных заболеваниями системы крови/ Т.А.Туполева, Е.Н.Игнатова, А.А.Гуляева, Е.Н.Овчинникова, Т. Д.С.ихомиров, Р.Р.Абакаров, Т.Ю.Романова, Н.Г.Ярославцева, О.М.Королёва, Т.А.Гаранжа, Ф.П.Филатов, Т.В.Гапонова, С. В.Гавченко // Клиническая лабораторная диагностика. 2016. Т. 61. №5. с.311-316.
6. Ярославцева, Н.Г. Интерференция вирусов гепатитов В и С при сочетанном инфицировании реципиентов множественных трансфузий/ Н.Г.Ярославцева, Е.Н.Игнатова,

Т.Ю.Романова, Д.С.Тихомиров, Т.А.Туполева // Вопросы вирусологии. 2016. т. 61. № 6. с. 280-284.

7. Туполева, Т.А. Опасность передачи вирусов гепатитов В и С с кровью доноров/ Т.А. Туполева, Т.Ю.Романова, А.А.Гуляева, Д.С.Тихомиров, Е.Н.Игнатова, Е.Н.Овчинникова, Н.Г.Ярославцева, А.Р.Р.бакаров, О.Н.Мисько, Т.В.Гапонова, В.Г.Савченко // Гематология и трансфузиология. 2017. т. 62. № 1. с. 32-36.

8. Николаева, Л.И. Частота выявления маркеров инфицирования вирусом гепатита С у пациентов и медицинских сотрудников крупных клинических центров Москвы/ Л.И.Николаева, Т.А. Семененко, Г.Ю.Никитина, Я.Л.В.рош, К.Д.В.орнеев, П.И.Махновский, Г.В. Сапронов, Е.В.Гусева, Н.Г.Ярославцева, О.Н.Мисько, Д.С.Тихомиров, Е.Н.Игнатова, Т.Ю.Романова, Т.А.Туполева // Инфекционные болезни. 2017. т. 15. № 2. с. 6-13.

9. Романова, Т.Ю. Проведение эпидемиологического расследования случаев возможного инфицирования реципиента трансфузий компонентов донорской крови вирусом гепатита В и/или С/ Т.Ю.Романова, Т.А. Туполева, Д.С.Тихомиров, Н.Г.Ярославцева, Е.Н.Игнатова, А.А.Гуляева, О.Г.Старкова, Т.В.Гапонова // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2017. № 5. т. 22. с. 228-238.

10. Игнатова, Е.Н. Влияние современных подходов к лабораторному обследованию доноров крови и её компонентов на инфицированность вирусом гепатита В у больных заболеваниями системы крови/ Е.Н.Игнатова, Т.А.Туполева, Е.Н.Овчинникова, Т.Ю.Романова, Н.Г.Ярославцева, Ф.П.Филатов, В.В.Троицкая, Л.А.Кузьмина, Е.Н.Паровичникова, Т.В.Гапонова, В.Г.Савченко // Терапевтический архив. 2017. №11. с.27-34.

11. Тихомиров Д.С. Место ПЦР в лабораторной диагностике вирусных инфекций в рутинной практике/ Д.С.Тихомиров, Т.Ю.Романова, Е.Н.Игнатова, Н.Г.Ярославцева, Т.А.Туполева, Т.В.Гапонова // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2017. № 4. с. 32-39.

12. Туполева, Т.А. Латентная форма инфекции, вызванная вирусом гепатита В/ Т.А.Туполева // Гематология и трансфузиология. 2018. т. 63. № 2. с. 166-173.

13. Туполева Т.А., Гармаева Т.Ц., Куликов С.М. Протокол мониторинга вирусологического статуса больных заболеваниями системы крови с целью реализации стратегии повышения вирусной безопасности трансфузий. Алгоритмы диагностики и протоколы лечения заболеваний системы крови. Под ред. В.Г. Савченко. в двух томах. т. 1. – М. Практика, 2018. – 1008 с. с.143-158.

14. Tupoleva, T.A. Mini-pooling of the donor plasma samples can not provide the hepatitis B and C safety of blood transfusion/ T.A.Tupoleva, E.N.Ignatova, D.S.Tikhomirov, T.A.Garanzha, E.N.Ovchinnikova, F.P.Filatov // Vox Sanguinis. 2013. V. 105. № S1. p. 175-176.
15. Tupoleva, T.A. Occult hepatitis B virus infection among blood donors/ T.A.Tupoleva, N.G.Yaroslavtseva, E.N.Ignatova, T.A.Garanzha, A.A.Gulaeva, F.P.Filatov // Vox Sanguinis. 2013. V. 105. № S2. p. 93-94.
16. Tupoleva, T.A. The selection of hepatitis B core antigen antibodies free donor's cohort/ T.A.Tupoleva, D.S.Tikhomirov, T.V.Gaponova // Vox Sanguinis. 2015. V. 109. № S1. p. 217.
17. Туполева, Т.А. Динамика инфицированности вирусами гепатитов В и С больных заболеваниями системы крови/ Т.А.Туполева, Е.Н.Игнатова, Д.С.Тихомиров, Т.Ю.Романова, Н.Г.Ярославцева, А.А.Гуляева, Т.В.Гапонова // Гематология и трансфузиология. 2016. т. 61. № S1(1). с. 75.
18. Tupoleva, T. Results of routine screening all donations for hepatitis B core antigen antibodies/ T.Tupoleva, T.Romanova, D.Tikhomirov, A.Gulyaeva, T.Gaponova, V.Savchenko // Vox Sanguinis. 2017. V. 112. № S1. p. 173-174.