



АКТУАЛЬНАЯ ТЕМА

Использование молекулярно-биологических методов для обнаружения парвовируса B19 в донорской крови

Э.А. Домонова

канд. биол. наук, науч. сотр.,

О.Ю. Сильвейстрова

мл. науч. сотр.,

О.Ю. Шипулина

*руководитель подразделения молекулярных методов диагностики
отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва*

Парвовирусная инфекция (парвовирусная инфекция B19, инфекционная эритема, “синдром отшлепанных щек”, “пятая болезнь”) – широко распространенное антропонозное инфекционное заболевание, вызываемое парвовирусом B19 (*Parvovirus B19*), характеризующееся широким спектром клинических проявлений, зависящих от иммунного и гематологического статуса человека. Регистрируется в виде эпидемических и спорадических вспышек, чаще в зимний и весенний периоды, преимущественно у детей в возрасте от 6 до 15 лет, хотя заболеванию подвержены абсолютно все возрастные группы. Эпидемические подъемы отмечаются с интервалом в 3–4 года, при котором два года с высоким уровнем заболеваемости сменяются двумя годами с пониженным уровнем [1, 2].

Первые упоминания о заболевании появились в XIX в., когда A. Tscharmer (1886) и впоследствии G. Sticker (1899) описали клиническую картину инфекционной эритемы [6]. Этиология заболевания оставалась неизвестной длительное время. В 1975 г. в Лондоне Y.E. Cossart с коллегами при исследовании с помощью электронной микроскопии крови доноров с ложноположительной реакцией на HBsAg обнаружили мелкие изометрические частицы диаметром 23 нм. Название вирусу было дано с учетом его размера (parvum – маленький) и номера образца сыворотки крови на панели, где он впервые был обнаружен, – B19 [6]. В 1981–1983 гг. J. Pattison с соавт. уста-

новили этиологическую роль *Parvovirus B19* в развитии преходящего апластического криза у детей с серповидноклеточной анемией. В 1985 г. во время вспышки в Великобритании была выявлена связь между парвовирусом B19 и развитием инфекционной эритемы у детей. В этом же году была подтверждена связь между *Parvovirus B19* и развитием артропатии. В 1995 г. *Parvovirus B19* был отнесен к роду *Erythrovirus*.

Парвовирус B19 – ДНК-содержащий вирус рода *Erythrovirus* семейства *Parvoviridae*. Вирион *Parvovirus B19* представляет собой икосаэдрический нуклеокапсид диаметром около 20–25 нм с линейной одноцепочечной геномной ДНК длиной 5,4 тыс. оснований положительной или отрицательной полярности. В состав вириона входят два структурных (VP1, VP2) и один неструктурный (NS1) полипептидных протеина. *Parvovirus B19* чувствителен к ультрафиолетовому излучению, однако высокоустойчив к действию физических и химических факторов: не разрушается в кислой среде, сохраняет инфекционность при температуре 60 °С до 12 ч. Парвовирус B19 обладает тропизмом к клеткам-предшественникам эритроцитов в красном костном мозге, селезенке и гепатоцитам плода, репродуцируется в них, вызывая лизис. Тропизм к клеткам данного ряда обусловлен специфическим связыванием *Parvovirus B19* с клеточным рецептором Р-антигеном, облегчающим проникновение вируса внутрь клеток. Лица, генетически не экспрессирующие Р-антиген, устойчивы к заражению.

Источником заболевания является человек как с острой, так и с хронической инфекцией. Наиболее контагиозны больные в период виремии (до момента появления сыпи), а также пациенты с периодическими апластическими кризами. Пути передачи: воздушно-капельный, трансплацентарный и парентеральный. Парентеральное заражение может произойти при передаче органов и тканей, при гемотрансфузии с донорской кровью, а также с очищенными продуктами крови – плазмой, тромбоцитами, концентратами факторов свертывания крови VIII, IX. Это представляет опасность в первую очередь для пациентов с гематологическими заболеваниями, получающих многочисленные трансфузии компонентов крови в процессе лечения, т. к. инфицирование парвовирусом B19 больных в состоянии иммуносупрессии может приводить к анемии вплоть до парциальной красноклеточной аплазии костного мозга [2, 7, 9, 12]. Также показано, что *Parvovirus B19* может приводить к фульминантному гепатиту у иммунокомпрометированных больных [7, 11] и развитию конгенитальной анемии, водянки плода у беременных женщин [2, 10, 12].

Активное изучение парвовируса B19 и его роли в посттрансфузионных осложнениях было начато в 1990-х гг. Проведенные исследования показали, что вирусоспецифические антитела класса IgG обнаруживаются у 29–65% доноров, класса IgM – у 1–3% доноров. При этом частота выявления ДНК *Parvovirus B19* в крови доноров в зарубежных странах составляет 0,03–1,3% [5, 7], в Российской Федерации – 1,0–1,9% [3, 4].

Диагностика парвовирусной инфекции основана на анализе клинико-эпидемиологических данных и проведении своевременных лабораторных исследований (таблица).

**Лабораторная диагностика парвовирусной инфекции
(инфекционной эритемы)**

Маркер	Используемые методы исследования
Вирусспецифические антитела класса IgM	Иммунологические (иммуноферментный анализ)
Вирусспецифические антитела класса IgG	
ДНК <i>Parvovirus B19</i>	Молекулярно-биологические (полимеразная цепная реакция)

Лабораторным подтверждением острой инфекции является выявление вирусспецифических антител класса IgM и/или сероконверсии и значительного увеличения уровня IgG при исследовании парных образцов сыворотки или плазмы периферической крови с интервалом 7–14 дней или идентификация ДНК *Parvovirus B19* в адекватном биологическом образце. Диагностическая значимость маркеров инфекции и корректная интерпретация результатов лабораторных исследований в значительной степени зависят от типа клинического материала и сроков его сбора. Выбор типа клинического материала определяется методом исследования и особенностями патогенеза заболевания. Достоверность полученных результатов во многом зависит от соблюдения условий транспортирования и хранения образца.

В последние годы основную роль в лабораторной диагностике заболевания отводят **косвенным методам**, направленным на обнаружение вирусспецифических антител к антигенам *Parvovirus B19*, с использованием иммунологических методик, преимущественно ИФА. К ограничениям к такого способа диагностики относятся:

- ~ возможность получения ложноотрицательных результатов при проведении исследования образцов сыворотки или плазмы периферической крови, полученных в инкубационный период заболевания, для которого характерно отсутствие вирусспецифических антител классов IgM, IgG или их выработка на низком недетектируемом для современных диагностических наборов реагентов уровне – период “серологического окна”;
- ~ возможность получения ложноположительных результатов, обусловленных наличием в тестируемых образцах сыворотки или плазмы периферической крови ревматоидного фактора, перекрестно реагирующих антител класса IgM к антигенам вируса Эпштейна – Барр, неспецифических антител класса IgM при поликлональной стимуляции В-клеток.

Для исключения представленных ограничений широко используются **прямые методы** диагностики – молекулярно-биологические методы, в част-

ности полимеразная цепная реакция (ПЦР), позволяющие выявлять ДНК *Parvovirus B19*, что существенно повышает чувствительность диагностики в целом. Рекомендуемым материалом для исследования являются образцы плазмы крови. Возможно проведение исследования других видов биологического материала. Однако при исследовании донорской крови тестирование образцов плазмы крови или их пулов более целесообразно.

В настоящее время в Российской Федерации согласно постановлению Правительства РФ от 31.12.2010 № 1230 "Об утверждении правил и методов исследований и правил отбора образцов донорской крови, необходимых для применения и исполнения технического регламента о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии" обязательным является скрининг, направленный на выявление маркеров вирусов иммунодефицита человека, гепатитов В и С, возбудителя сифилиса. Однако многочисленные научно-исследовательские работы свидетельствуют о необходимости тестирования донорской крови, переливаемой пациентам, находящимся в состоянии иммуносупрессии, на наличие *Parvovirus B19*. При исследовании донорской крови и ее компонентов на маркеры возбудителей гемотрансмиссивных инфекций (вирусы иммунодефицита человека, гепатитов В и С, возбудитель сифилиса) используют иммунологические и молекулярно-биологические методы. При этом молекулярно-биологические исследования проводятся дополнительно (до, после, одновременно) к обязательным иммунологическим. Данный подход недопустим при оценке вирусной безопасности гемотрансфузий относительно парвовируса В19. Это связано в первую очередь с тем, что при виремии, когда вирусоспецифические антитела еще отсутствуют или находятся на низком недетектируемом уровне, парвовирус В19 может присутствовать в крови в очень высокой концентрации – до 10^{12} МЕ/мл и при пулировании сотен тысяч плазм от различных доноров для промышленного изготовления факторов коагуляции и других продуктов достаточно одного положительного образца для заражения всего объема. Также необходимо учитывать, что, с одной стороны, выявление вирусоспецифических антител не подтверждает наличие *Parvovirus B19* в крови, с другой стороны, данный вирус может длительно (до года) сохраняться в крови на уровне 100–1000 МЕ/мл в отсутствие каких-либо клинических симптомов [8, 10].

Банки крови США, Германии, Австрии, Великобритании осуществляют исследование донорской крови на наличие *Parvovirus B19* [8, 9]. Согласно рекомендациям Управления по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (US Food and Drug Administration) и Европейской фармакопеи (European Pharmacopoeia) производственные пулы донорской плазмы для фракционирования не должны содержать ДНК *Parvovirus B19* в концентрации, превышающей установленный уровень инфекционности, равный 10^4 МЕ/мл [8, 10].

В Российской Федерации необходимость проведения скрининга донорской крови, направленного на выявление *Parvovirus B19*, была показана в исследованиях, проведенных ФБУН “Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной” Роспотребнадзора совместно с Нижегородским предприятием по производству бактериальных препаратов “ИмБио” Роспотребнадзора и Нижегородской областной станцией переливания крови в 2009 г. [3], и в дальнейшем подтверждена данными, полученными в результате совместной работы ФГБУ “Гематологический научный центр” Минздравсоцразвития России, ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора и Чеченской республиканской станцией переливания крови в 2010 г. [4]. Проведенные методом ПЦР исследования выявили от 0,3 до 0,5% образцов донорской крови, заготовленной для трансфузий и переработки, с потенциально опасной для инфицирования реципиентов вирусной нагрузкой ДНК *Parvovirus B19*/мл. Показано, что в период виремии выявить доноров, инфицированных парвовирусом B19, возможно только исключительно при помощи молекулярно-биологических методов, т. к. иммунологические методы в данный период неинформативны [4].

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о целесообразности проведения скрининга донорской крови для выявления ДНК *Parvovirus B19* с целью предотвращения гемотрансмиссивного инфицирования и снижения потенциального риска заражения.

Список использованной литературы

1. Оценка распространения парвовирусной инфекции в Москве: Информационное письмо (№ 11) / Тихонова Н.Т., Герасимова А.Г., Москалева Т.Н. и др. М.: Департамент здравоохранения г. Москвы, 2004. № 11.
2. Медицинская вирусология: Руководство / под ред. Д.К. Львова. М.: ООО “Медицинское информационное агентство”, 2008. 656 с.
3. Филатова Е.В., Зубкова Н.В., Новикова Н.А. и др. Выявление маркеров парвовируса B19 в образцах крови доноров // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2010. № 5. С. 67–70.
4. Элижбаева М.А., Февралева И.С., Глинщикова О.А. и др. Выявление парвовируса B19 в крови российских доноров // Гематология и трансфузиология. 2011. № 2. С. 10–13.
5. Candotti D., Etiz N., Parsyan A. et al. Identification and characterization of persistent human erythrovirus infection in blood donor samples. J. Virol. 2004. Vol. 78. P. 12169–12178.
6. Cossart Y.E., Field A.M., Cant B., Widdows D. Parvovirus-like particles in human sera. Lancet. 1975. Vol. 1. № 7898. P. 72–73.
7. Heegaard E.D., Brown K.E. Human Parvovirus B19. Clinical Microbiology Reviews. 2002. Vol. 15. № 3. P. 485–505.

Актуальная тема

8. Kleinman S.H., Glynn S.A., Lee T.H. et al. A linked donor-recipient study to evaluate parvovirus B19 transmission by blood component transfusion. *Blood*. 2009. Vol. 114. № 17. P. 3509–3511.

9. Nüling C.M., Daas A., Buchheit K.H. Collaborative study for establishment of European Pharmacopoeia Biological Reference Preparation (BRP) for B19 virus DNA testing of plasma pools by nucleic acid amplification technique. *Pharmeuropa Bio*. 2004. Vol. 203. № 2. P. 27–34.

10. US Food and Drug Administration. Rockville, MD: FDA Center for Biologics Evaluation and Research; 2008. [Accessed July 27, 2009]. Nucleic acid testing (NAT) to reduce the possible risk of parvovirus B19 transmission by plasma-derived products (ucm071592). FDA guidance for industry. <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm071592.htm>.

11. Wong S., Young N. S., Brown K. E. Prevalence of parvovirus B19 in liver tissue: no association with fulminant hepatitis or hepatitis-associated aplastic anemia // *J. Infect. Dis*. 2003. Vol. 187. № 10. P. 1581–1586.

12. Young N.S., Brown K.E. Mechanism of disease Parvovirus B19. *The New England Journal of Medicine*. 2004. Vol. 350. P. 586–597.

Библиотека руководителя медицинского учреждения

«Ведение деятельности, связанной с оборотом наркотических средств, психотропных веществ, их прекурсоров, сильнодействующих и ядовитых веществ»

- ✓ Получение лицензии
- ✓ Ведение документации
- ✓ Прохождение проверок

Сборник
Более 450 страниц + CD
Цена 5900 руб.



ДЛЯ ЗАКАЗА ИЛИ ПО ТЕЛЕ: (495) 937-9082
ИЛИ НА САЙТЕ www.shop.mcfrru