

9. Lekovic D., Miljic P., Mihaljevic B. Increased risk of venous thromboembolism in patients with primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Thromb. Res.* 2010; 126(6): 477–480.
10. Negaard H. F., Iversen P. O., Østenstad B. et al. Hypercoagulability in patients with haematological neoplasia: no apparent initiation by tissue factor. *Thromb. Haemost.* 2008; 99(6): 1040–1048.
11. Ottinger H., Belka C., Kozole G. et al. Deep venous thrombosis and pulmonary artery embolism in high-grade non Hodgkin's lymphoma: incidence, causes and prognostic relevance. *Eur. J. Haematol.* 1995; 54(3): 186–194.

Поступила 10.03.11

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2011

УДК 615.38:578.822.2

ВЫЯВЛЕНИЕ ПАРВОВИРУСА В19 В КРОВИ РОССИЙСКИХ ДОНОРОВ

М. А. Элижбаева¹, И. С. Февралева¹, О. А. Глинщикова¹, О. Ю. Сильвейстрова²,
О. Ю. Шипулина², Э. А. Домонова², А. П. Сафонова², Е. Н. Овчинникова¹, З. М. Татаева³,
А. Б. Судариков¹

¹ФГБУ Гематологический научный центр Минздравсоцразвития РФ; ²ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора РФ, Москва; ³Чеченская республиканская станция переливания крови, Грозный

Резюме. Методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени были протестированы на наличие ДНК парвовируса (PV) В19 образцы донорских сывороток, полученных на станции переливания крови ФГБУ Гематологический научный центр Минздравсоцразвития РФ (1011 образцов) и Чеченской республиканской станции переливания крови (510 образцов). Из 1521 исследованных образцов ДНК PV В19 выявлена в 29 (1,9%), причем у 3 доноров концентрация ДНК вируса превышала 10^5 копий/мл (0,2%); 5 доноров имели концентрацию ДНК в диапазоне от 10^4 до 10^5 копий/мл (0,3%), а у 21 донора концентрация ДНК PV В19 оказалась менее 10^4 копий/мл (1,4%). Антитела IgM были обнаружены у 1 донора, у которого концентрация вируса была более 10^4 копий/мл, IgM- и IgG-антитела одновременно были обнаружены у 6 доноров с концентрацией вируса в крови более 10^4 копий/мл, а у 1 донора с высокой концентрацией ДНК в диапазоне от 10^4 до 10^5 копий/мл выявлялись только IgG-антитела к PV В19. Результаты исследования и анализ данных литературы показывают, что донорскую кровь следует тестировать на наличие ДНК PV В19 и выбраковывать с концентрацией вируса более 10^4 копий/мл.

Ключевые слова: доноры, парвовирус В19, ДНК, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

DETECTION OF B19 PARVIRUS IN THE BLOOD OF RUSSIAN DONORS

M. A. Elizhbayeva¹, I. S. Fevralyova¹, O. A. Glinshchikova¹, O. Yu. Silveistrova², O. Yu. Shipulina²,
E. A. Domonova², A. P. Safonova², E. N. Ovchinnikova¹, Z. M. Tatayeva³, A. B. Sudarikov¹

¹Hematology Research Center, Moscow; ²Central Institute of Epidemiology, Moscow; ³Chechen Republican Station for Blood Transfusions, Grozny

S u m m a r y. Parvovirus (PV) B19 DNA was tested by real time polymerase chain reaction in blood serum of the donors. The PV B19 DNA was detected in 29 (1.9%) of 1521 tested sera. In 3 donors the concentrations of the DNA were higher than 10^5 copy/ml (0.2%), in 5 donors DNA concentrations were 10^4 – 10^5 copy/ml (0.3%), and in 21 donors PV B19 DNA concentrations were below 10^4 copy/ml (1.4%). The IgM antibodies were found in 1 donor with the virus concentration higher than 10^4 copy/ml, while 1 donor with high concentration of the virus had neither IgM nor IgG antibodies. Only IgG antibodies to PV B19 were detected in 6 donors with the virus concentrations higher than 10^4 copy/ml, while 1 donor with high concentration of the virus had neither IgM nor IgG antibodies. Only IgG antibodies to PV B19 were detected in 21 donors with PV B19 DNA concentrations below 10^4 copy/ml. The results and analysis of published data indicate that donor blood should be tested for PV B19 DNA and blood of the donors with the virus concentrations higher than 10^4 copy/ml should not be used.

Key words: donors, B19 parvovirus, DNA, real time polymerase chain reaction

Парвовирус В19 (PV В19) передается воздушно-капельным, трансплацентарным и трансфузионным путем. Третий путь заражения представляет опасность для гематологических больных, получавших многочисленные трансфузии компонентов крови в процессе лечения. Инфицирование PV В19 больных на фоне иммуносупрессии приводит к

анемии вплоть до парциальной красноклеточной аплазии костного мозга. Имеются данные, что PV В19 может приводить к фульминантному гепатиту у иммунокомпрометированных больных [1–6].

Вирус термостабилен, поэтому инфицирование возможно также и при переливании препаратов, получаемых в результате переработки донорской крови. В острой фазе заболевания PV В19 может присутствовать в крови в очень высокой концентрации — до 10^{12} копий/мл. Таким образом, при пулировании плазмы от различных доноров в производстве компонентов для трансфузий может быть достаточно одного положительного образца для заражения всего объема [7].

Для корреспонденции:

Февралева Ирина Серафимовна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. молекулярной гематологии ФГБУ Гематологического научного центра Минздравсоцразвития РФ.
Адрес: 125167, Москва, Новый Зыковский пр., д. 4а.
Телефон: +7(495) 612-65-11
E-mail: irina_fevraleva@mail.ru

Многочисленные работы указывают на необходимость тестирования донорской крови, переливаемой больным, находящимся в состоянии иммуносупрессии, на наличие PV B19. Европейская фармакопея и Управление по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными препаратами США рекомендуют проверку донорской крови на наличие PV B19 наряду с другими особо опасными инфекциями, передающимися при трансфузиях компонентов крови, такими как СПИД и гепатиты В и С. Банки крови США, Германии, Австрии, Великобритании осуществляют тестирование донорской крови на наличие PV B19 [7, 8]. Показано, что частота встречаемости PV B19 среди доноров различных стран мира колеблется в пределах 0,5—1,3% [9—12]. Однако работ, посвященных изучению распространенности PV B19 в России, крайне мало [13].

Целью настоящего исследования — определение частоты встречаемости PV B19 среди российских доноров, в частности среди доноров московского и грозненского регионов. Кроме того, мы ставили задачей оценить долю образцов донорской крови, потенциально опасных в плане инфицирования PV B19 реципиентов при получении ими компонентов крови, поскольку, как показывают исследования, не всякая донорская кровь, в которой выявляется PV B19, может представлять вероятный риск инфицирования при трансфузиях компонентов крови [9—14].

Материалы и методы

Мы протестировали на наличие и количество ДНК PV B19 1521 образец сывороток крови российских доноров, сдававших кровь на двух станциях переливания крови (СПК). Из них 1011 образцов сыворотки доноров поступили в декабре 2008 г. со СПК Гематологического научного центра (Москва) и 510 образцов сыворотки доноров, поступивших в ноябре 2009 г. из Чеченской республиканской СПК (Грозный). Образцы, положительные на наличие ДНК PV B19, были дополнительно проанализированы на специфические антитела классов IgM и IgG к PV B19. Для обработки данных была использована описательная статистика.

Выделение ДНК PV B19 из сыворотки крови проводили по стандартной методике [15]. В пробирки типа эппендорф помещали 100 мкл сыворот-

Праймеры и флуоресцентные зонды для выявления ДНК PV B19 с помощью ПЦР в режиме реального времени

Мишень	5'—3' последовательности праймеров
PV B19	Прямой 5'-actatgaaactgggcaataaac-3' Обратный 5'-caccaccactgctgctgata-3' Зонд 5'-Cy5-aattaatgcagatgcccctccaccagac-BHQ3-3'
Внутренний контроль	Прямой 5'-ggaccctacacagittgaagag-3' Обратный 5'-acctgccagtggtgcct-3' Зонд 5'-FAM-agatgtgccgctatgaccctg-RTQ1-3'

Примечание. Максимальная длина волны флуоресценции зонда Cy5 655 нм; максимальная длина волны флуоресценции зонда FAM 520 нм.

ки крови. К сыворотке добавляли 450 мкл раствора, содержащего лизирующий буфер (50% 5,5 М раствора гуанидинизотиоцианата Na, 0,3 М Na ацетата, т-РНК в концентрации 25 мкг/мл и 50% фенола, насыщенного 0,1 М трис, pH 6,5). В качестве контроля за успешным прохождением всех стадий выделения ДНК и последующей полимеразной цепной реакции (ПЦР) в лизирующий раствор был добавлен в известной концентрации внутренний стандарт, являющийся фрагментом мышинной геномной ДНК, не имеющим гомологии с последовательностью ДНК PV B19, в концентрации $2 \cdot 10^3$ нг/мл. Смесь перемешивали на аппарате Вортекс, затем добавляли 100 мкл хлороформа. После встряхивания на аппарате Вортекс пробирки центрифугировали 6 мин при 8000 об/мин. После центрифугирования 300 мкл водной фазы переносили в чистую пробирку типа эппендорф и добавляли равный объем изопропанола. Пробирки встряхивали на аппарате Вортекс, центрифугировали 10 мин при 14 000 об/мин, образовавшийся осадок промывали 1 мл 70% этанола, далее осадок растворяли в 25 мкл деионизированной воды.

Чтобы выявить ДНК PV B19, использовали стандартный набор реактивов для проведения ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией результатов анализа в режиме реального времени ("Синтол"), дополненный праймерами и зондом для выявления ДНК PV B19. Последовательности праймеров и зондов приведены в таблице. Реакцию проводили в амплификаторе АНК-32 ("Синтол") при следующем температурном режиме: первоначальная денатурация 94°C в течение 5 мин и последующие 45 циклов — соответственно 60°C — 50 с и 94°C — 20 с.

Концентрацию вирусной ДНК в образцах сыворотки, положительных на ДНК PV B19, дополнительно определяли с помощью тест-системы для выявления и количественного определения ДНК PV B19 АмплиСенс®Parvovirus B19-FL [2]. Экстракцию ДНК выполняли с помощью набора РИБО-преп (ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Реакцию проводили на амплификаторе с детекцией флуоресцентного сигнала в режиме реального времени Rotor-Gene 6000 ("Corbett Research", Австралия).

Для выявления антител к PV B19 образцы сывороток, положительных на ДНК PV B19, мы исследовали на наличие специфических иммуноглобулинов классов IgM и IgG к PV B19 методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с применением коммерческой тест-системы ("Biotrin Inc.", Ирландия).

Для обработки данных была использована описательная статистика.

Результаты и обсуждение

1521 образец донорской сыворотки, взятой на двух российских станциях переливания крови, был протестирован на наличие PV B19. Образцы, в которых выявлена ДНК PV B19, были проанализированы на антитела классов IgM и IgG к PV B19. Из 1521 образца было выявлено 29 вирусположительных. Таким образом, частота встречаемости PV B19 среди обследованных доноров составила 1,9%. Для

количественного анализа вирусной нагрузки, диапазон концентрации ДНК PV B19 мы разбили на три части: диапазон А включал концентрацию вируса менее 10^4 копий/мл, диапазон Б — от 10^4 до 10^5 копий/мл, диапазон В — более 10^5 копий/мл. В диапазон А вошел 21 из 29 вирусологически положительных образцов (1,4% от общего числа), в диапазон Б — 5 образцов (0,3% от общего числа) и в диапазон В — 3 образца (0,2%).

Для верификации результатов все 29 образцов были вновь протестированы на наличие и количество ДНК PV B19 тест-системой АмплиСенс® Parvovirus B19-FL, показавшей высокую точность определения концентрации вирусной ДНК в Международном контроле качества ПЦР-исследований (Quality Control for Molecular Diagnostics, Scotland — QCMD) [2]. Результаты по измерению концентрации ДНК PV B19 в вирусологически положительных образцах, полученных с помощью этой референсной тест-системы, укладывались в соответствующие для этих образцов диапазоны А, Б и В.

В 21 образце сыворотки вирусологически положительных доноров с концентрацией вирусной ДНК менее 10^4 копий/мл (диапазон А) выявляли только антитела класса IgG к PV B19. У доноров с концентрацией вирусной ДНК от 10^4 до 10^5 копий/мл (диапазон Б) определялись одновременно антитела классов IgM и IgG (у 5 из 29 вирусологически положительных доноров). Более 10^5 копий/мл ДНК PV B19 (диапазон В) выявлено у 3 доноров, причем у 1 из этих доноров выявлены только IgM, у 1 донора — одновременно IgM и IgG, и у 1 донора — никаких антител к PV B19 не обнаружено. Концентрация ДНК PV B19 в последнем образце была самой высокой и составила $2 \cdot 10^9$ копий/мл.

Таким образом, результаты нашей работы показывают, что в России, как и за рубежом [9—12], в донорской крови выявляется ДНК PV B19. Необходимо отметить, что у доноров, у которых выявлены только IgG-антитела к PV B19 в крови либо обнаружены малые концентрации ДНК вируса (до 10^4 копий/мл), либо ДНК вируса не определялась вообще. Доноры же, у которых зафиксированы только IgM-антитела к PV B19 или одновременно антитела двух классов IgM и IgG, имеют более высокую вирусную нагрузку. Отсутствие антител к PV B19 не говорит об отсутствии самого вируса в крови донора. Напротив, в период сероконверсии вирусная нагрузка может быть очень высокой (до 10^{12} и выше), а антител может не быть вообще. В наше исследование вошел 1 донор, у которого не обнаружено ни IgM-антител к PV B19, ни IgG-антител к PV B19, однако, концентрация ДНК PV B19 была $2 \cdot 10^9$ копий/мл. Этот факт показывает, что выявить доноров, инфицированных PV B19 в период сероконверсии можно только с помощью методов для обнаружения ДНК вируса, а серологические методы для определения антител в этот период не информативны, поскольку антитела еще не выработались.

Итак, из 1521 образца донорской крови, заготовленной для трансфузий и переработки, выявлено 29 положительных на PV B19, причем в 8 образцах концентрация ДНК была более 10^4 копий/мл.

В работах было показано, что при переливании компонентов крови с малой концентрацией вируса (до 10^4 копий/мл) и наличием IgG-антител инфицирования реципиента не произошло [7, 8]. Если же концентрация ДНК вируса выше 10^4 копий/мл, то инфицирование возможно. В нашей работе в крови 8 доноров выявлена ДНК PV B19 в концентрации более 10^4 копий/мл. Как следует из данной литературы, такая кровь представляет потенциальную опасность для инфицирования реципиентов компонентов крови PV B19.

Таким образом, в нашей работе частота выявления PV B19 у доноров СПК ГНЦ (Москва) и Республиканской СПК (Грозный) составила 1,9%, а образцов с потенциально опасной для инфицирования вирусной нагрузкой (более 10^4 копий/мл) было 0,5% от общего числа.

Результаты по выявлению PV B19 в обследуемой популяции доноров показали, что встречаемость PV B19 у российских доноров в 1,5—2 раза выше, чем таковая, установленная многоцентровыми исследованиями за рубежом (0,5—1,3% в зарубежных исследованиях против 1,9% в нашей работе) [9, 8, 13, 14]. Подобная разница может быть объяснена следующими причинами. Во-первых, выборка доноров была невелика (1521 человек), поэтому появление каждого нового положительного образца существенно сказывалось на результате. Во-вторых, вероятно, влияют социальный статус и мотивация при рекрутировании доноров в разных странах [16—18]. В-третьих, возможно, что PV B19 — заболевание сезонное [19—20], а исследование проводили только у доноров, сдававших кровь в ноябре—декабре. Частота встречаемости PV B19 в России в зависимости сезонов пока еще не изучена, но можно предположить, что приведенный результат может быть связан с увеличением сезонной заболеваемости. Для получения статистически значимых результатов требуется существенное увеличение выборки доноров и анализ заболеваемости PV B19 по сезонам.

Полученные нами данные свидетельствуют о целесообразности тестирования донорской крови в Российской Федерации на наличие ДНК PV B19. Выбраковка донорской крови с концентрацией ДНК PV B19 более 10^4 копий/мл повысит вирусную безопасность гемотрансфузий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Февралева И. С., Глинщикова О. А., Макарик Т. В., Сударинов А. Б. Мультиплексная диагностика вирусов гепатитов В, С и парвовируса B19 у больных, получающих множественные гемотрансфузии. Гематол. и трансфузиол. 2008; 53(11): 54—56.
2. Шипулина О. Ю., Кузнецова Э. А., Шипулин Г. А. Разработка тест-системы на основе ПЦР в реальном времени для выявления ДНК парвовируса B19 и ее апробация на контрольной панели QCMD и клиническом материале. В кн.: Молекулярная диагностика инфекционных болезней: Материалы Международной науч.-практ. конф. Минск, 17—18 мая 2007 г. Минск; 2007: 30—31.
3. Abe K., Kiuchi T., Tanaka K. et al. Characterization of erythrovirus B19 genomes isolated in liver tissues from patients with fulminant hepatitis and biliary atresia who underwent liver transplantation. Int. J. Med. Sci. 2007; 4(2): 105—109.
4. Bernuau J., Durand F., Valla D. Parvovirus B19 infection and fulminant hepatitis. Lancet 1999; 353(9154):754—755.

5. 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; 187(10):1581—1586.
6. Heegaard E. D., Brown K. E. Human parvovirus B19. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15(3): 485—505.
7. Nüling C. M., Daas A., Buchheit K. H. Collaborative study for establishment of a European Pharmacopoeia Biological Reference Preparation (BRP) for B19 virus DNA testing of plasma pools by nucleic acid amplification technique. *Pharmeuropa Bio* 2004; 203(2): 27—34.
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; 114(17): 3509—3511.
9. Schmidt M., Themann A., Drexler C. et al. Blood donor screening for parvovirus B19 in Germany and Austria. *Transfusion* 2007; 47: 1775—1782.
10. Vyse A. J., Andrews N. J., Hesketh L. M., Pebody R. The burden of parvovirus B19 infection in women of childbearing age in England and Wales. *Epidemiol. Infect.* 2007; 135(8): 1354—1362.
11. Kleinman S. H., Glynn S. A., Lee T. H. et al. Prevalence and quantitation of parvovirus B19 DNA levels in blood donors with a sensitive polymerase chain reaction screening assay. *Transfusion* 2007; 47: 1756—1764.
12. Candotti D., Etiz N., Parsyan A., Allain J. P. Identification and characterization of persistent human erythrovirus infection in blood donor samples. *J. Virol.* 2004; 78(22): 12169—12178.
13. Филатова Е. В., Зубкова Н. В., Новикова Н. А. и др. Выявление маркеров парвовируса В19 в образцах крови доноров. *Журн. микробиол.* 2010; 5: 67—70.
14. Hourfar M. K., Mayr-Wohlfart U., Themann A. et al. Recipients potentially infected with parvovirus B19 by red blood cell products. *Transfusion* 2010; 51(1): 129—136.
15. Маниатис Т., Фрич Э., Самбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир; 1984: 248—251.
16. Wang J., Guo N., Guo X. et al. Who donates blood at five ethnically and geographically diverse blood centers in China in 2008. *Transfusion* 2010; 50(12): 2686—2694.
17. Carneiro-Proietti A. B., Sabino E. C., Sampaio D. et al. Demographic profile of blood donors at three major Brazilian blood centers: results from the International REDS-II study, 2007 to 2008. *Transfusion* 2010; 50(4):918—925.
18. Zago A., da Silveira M. F., Dumith S. C. Blood donation prevalence and associated factors in Pelotas, Southern Brazil. *Rev. Saude Publica* 2010; 44(1): 112—120.
19. Nicolay N., Cotter S. Clinical and epidemiological aspects of parvovirus b19 infections in Ireland, January 1996-june 2008. *Euro Surveillance* 2009; 14(25): 1—5.
20. Ramirez M. M., Mastrobattista J. M. Diagnosis and management of human parvovirus B19 infection. *Clin. Perinatol.* 2005; 32(3): 697—704.

Поступила 08.02.11

© А. А. ИЛЬИНСКИЙ, И. В. МОЛЧАНОВ, 2011
УДК 615.382.015.2:541.182.61.03:617-089.1631.015.4

СРАВНЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РАСТВОРОВ ГИДРОКСИЭТИЛИРОВАННОГО КРАХМАЛА РАЗНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ НА ГОМЕОСТАЗ В ПЕРИОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ

А. А. Ильинский, И. В. Молчанов

Федеральное государственное учреждение здравоохранения Клиническая больница № 83 Федерального медико-биологического агентства России, Государственное образовательное учреждение дополнительного последипломного образования Российская медицинская академия последипломного образования Росздрава, Москва

Резюме. В статье рассматривается несколько вариантов инфузионно-трансфузионной терапии с применением растворов гидроксиэтилированных крахмалов (ГЭК) 200/0,5 различных концентраций по результатам исследования, во время которого проводили динамическое наблюдение за коллоидно-осмотическим давлением (КОД) плазмы крови и осмоляльностью. Показано, что использование 10% ГЭК 200/0,5 может приводить к увеличению КОД выше нормальных значений, в результате чего возникает риск развития интерстициальной гипогидратации. При применении 6% ГЭК 200/0,5 изменения КОД не происходит. Осмоляльность не меняется ни при каких вариантах инфузии.

Ключевые слова: гидроксиэтилированные крахмалы, инфузионная терапия, коллоидно-осмотическое давление, осмоляльность, гемостаз

EFFECTS OF HYDROXYETHYLATED STARCH IN DIFFERENT CONCENTRATIONS ON HOMEOSTASIS DURING THE PERIOPERATIVE PERIOD

A. A. Ilyinsky, I. V. Molchanov

Clinical Hospital N 83; Russian Medical Academy of Continuous Education, Moscow

Summary. Several variants of infusion/transfusion therapy using hydroxyethylated starches (HES) 200/0.5 in different concentrations are discussed by the results of dynamic measurements of the plasma colloid osmotic pressure (COP) and osmolality. Use of 10% HES 200/0.5 can lead to elevation of COP above the normal level, which fraught with the risk of interstitial hypohydration. The COP is not changed after 6% HES 200/0.5. Osmolality does not change after any of the infusion variants.

Key words: hydroxyethylated starches, infusion therapy, colloid osmotic pressure, osmolality, hemostasis

Фармакодинамические характеристики гидроксиэтилированного крахмала (ГЭК) как коллоида зависят в большей степени от количества онкотиче-

чески активных молекул [1], а не от концентрации ГЭК в плазме крови, в то время как влияние на гемостаз, особенно на фактор свертывания крови VIII и фактор Виллебранда [2], зависят от концентрации крахмала в плазме крови и молекулярной массы *in vivo*. В литературе имеются разноречивые данные о механизмах и степени влияния производных ГЭК на отдельные гомеостатические показатели: гемодинамические [3, 4], гематологические, гемостатические параметры [5, 6], онкотическое давле-

Для корреспонденции:

Ильинский Алексей Анатольевич, аспирант каф. анестезиологии и реаниматологии Российской медицинской академии последипломного образования Росздрава.
Адрес базы кафедры (КБ № 83 ФМБА России): 115692, Москва, Ореховый бульвар, д. 28.
Телефон: +7(495)396-37-36.
E-mail: alexei_ilinskiy@mail.ru