**Вирусная безопасность переливания крови**

Ф.П. Филатов, д.б.н., зав. лаб..вирусологической диагностики Ин-та переливания крови Гематологического научного центра РАМН.

На любые чрезвычайные ситуации (землетрясения, наводнения, террористические акты и т.п.), сопровождающиеся массовым травматизмом, наши сограждане, у которых сочувствие чужому страданию в крови, немедленно отзываются очередями в пункты приема этой самой крови. По медицинским показаниям донорская кровь требуется и во множестве других случаев, поэтому и существуют кадровые доноры, регулярно сдающие кровь, либо безвозмездно, либо за денежную компенсацию. В СССР до 90% крови заготовлялось благодаря безвозмездным донорам. Они пользуются определенными льготами, и Служба крови предпочитает иметь дело именно с ними, поскольку их здоровье и их кровь на протяжении многих лет тщательно проверяются. Кадровые доноры - золотой фонд любой национальной Службы крови еще и потому, что кровь требуется постоянно, а не только в дни катастроф.

Вместе с тем распространение СПИДа, вирусных гепатитов, а также экспоненциальный рост наркомании в нашей стране заставили специалистов обратить пристальное внимание на инфекции, которые могут передаваться с кровью. В свою очередь и у людей возникли вполне резонные опасения в отношении любого травмирующего вмешательства - от хирургических операций до банальной инъекции. На этом фоне во всем мире стала сокращаться сырьевая база Службы крови. В России, где со сменой общественного строя были разрушены совершенно необходимые институты прежнего государства, прекратилось массовое донорское движение, а Служба крови и Красный Крест тоже стали жертвами национальной традиции начинать все с нуля. Массовое обнищание, снижение культурного и образовательного уровня вместе с сокращением кадрового донорства отчасти компенсировалось у нас ростом разового донорства. Сегодня у платных разовых доноров (нередко это - солдаты, сдающие кровь в индивидуальном или в “организованном” порядке) мотивы донации (так называется акт сдачи крови) не обязательно совпадают с нуждами реципиентов (тех, кому переливают кровь). Вместе с разовыми добровольными донорами, сочувствие которых чужой беде превышает трезвую оценку качества того, чем они готовы поделиться, платные разовые доноры могут представлять серьезную инфекционную угрозу здоровью тех, кому переливание крови требуется по лечебным, а не по жизненным показаниям.

**Бактериальная инфицированность гемотрансфузий**

Попытаемся коротко рассказать об опасностях переливания крови и о возможных нежелательных последствиях гемотрансфузий. Речь пойдет об инфекционной опасности, причем лишь о той, которая вызывается вирусами, не рассматривая такие заболевания, как малярия, бруцеллез, болезнь Лайма, и проч. Для российской Службы крови вирусы представляют неизмеримо большую опасность, нежели клеточные инфекционные агенты. В определенной мере риск инфекции зависит от ареалов распространения патогенных микроорганизмов и от национальных правил. Так, в США предписывают сохранять эритроцитарную массу на холоде (+4°С) в течение почти полутора месяцев (у нас - половину этого срока, а на деле еще короче; для тромбоцитов до 5 дней). За это время могут развиться некоторые холодолюбивые патогенные микроорганизмы (например, Yersinia enterocolitica). Опасность этой бактерии связана с ее бессимптомным носительством. В Соединенных Штатах до 16% случаев гибели реципиентов в результате переливаний крови приходится на бактериальное заражение.

Несмотря на периодически распространяемые мифы о сифилисе, трансфузионный (т.е. передающийся с донорской кровью) путь заражения не отмечается многие десятилетия ни за рубежом, ни в России (Советском Союзе). Возбудитель этой инфекции очень нестоек и вне организма носителя живет несколько десятков секунд. Исторически сложилось, что только в нашей стране донорскую кровь именно на сифилис анализируют весьма скрупулезно, несколькими вполне чувствительными методами. Попытки вообще исключить исследования донорской крови на сифилис, например в США, наталкиваются на стойкое противодействие общественности. Сифилис может быть передан лишь при прямом переливании крови от донора реципиенту, из вены в вену. Но такой способ применяется сейчас очень редко, только по жизненным показаниям и при нехватке запасов проверенной донорской крови.

Другое дело - малярия и болезнь Лайма, приобретающие все большую известность в наших краях. Российские нормативные документы не предписывают анализ донорской крови на возбудителей этих инфекций, возможно, потому, что случаев заражения донорской кровью пока немного.

**Вирусная опасность трансфузий**

Вирусы ответственны более чем за 80% инфекционных заболеваний человека, и это число неуклонно растет. Вопрос, разовьется ли инфекция при переливании донорской крови, содержащей вирус, зависит от двух обстоятельств: дозы вируса и способности организма реципиента ему сопротивляться. Поскольку здоровому человеку, скорее всего, кровь не переливают, такая способность по определению ниже средней. В отношении вируса многое зависит от его вида. Так, для гепатита В заражающая доза составляет 10-100 вирусных частиц, которые могут содержаться в 0.5 мкл крови носителя (и даже то, что останется после высыхания этого объема, сохранит инфекционность для человека, поскольку этот вирус чрезвычайно устойчив во внешней среде), а переливают обычно литровые объемы плазмы (1 л = 106 мкл)! Для большинства других вирусов инфицирующие дозы, как правило, выше. Но и здесь есть неприятные исключения - вирусы, распространяющиеся с укусами комаров или клещей, когда в русло крови накануне совершенно здоровой жертвы попадают следовые количества вируса. К таким вирусам относится, например, вирус Западного Нила, совсем недавно еще экзотический в нашей стране, а теперь ставший реальной угрозой в трансфузиологии южных регионов России.

Если человек заболевает, он, естественно, не сдает кровь, но иногда люди остаются здоровыми носителями опасного возбудителя, и тогда их кровь становится небезопасной.

Инфекции, проходящие бессимптомно и сопровождающиеся вирусоносительством и следами пребывания патогенного вируса (так называемыми вирусными маркерами) в кровяном русле, наиболее опасны при переливаниях крови. Патогенность персистирующего вируса заключается в отдаленных последствиях инфекции, которая в случае ВИЧ-носительства приводит к СПИДу, а в случаях вирусных гепатитов - к циррозу и первичному раку печени.

**Портрет “врага”**

Вирусы сопутствуют клеточным формам жизни “с самого начала”, т.е. миллиарды лет. Длительный путь развития и сосуществование их с клеточной жизнью привели к равновесию, которое должно иметь не только недостатки для одной из сторон, но и преимущества для обеих. Это - отдельная тема. Здесь лишь напомним, что из известных сегодня науке почти 2 тыс. видов вирусов вообще патогенных - ничтожная доля, патогенных для человека и того меньше, а патогенных, способных передаваться с донорской кровью (а не с кровью вообще), еще меньше. Главная особенность таких вирусов - способность формировать бессимптомное носительство, которое можно обнаружить лишь специальными средствами.

Какие же вирусы и вызываемые ими инфекции наиболее опасны при переливании крови или ее компонентов?

Прежде всего, это вирус иммунодефицита человека 1-го и 2-го типов (ВИЧ-1, -2), и не надо пояснять, почему. Россия сегодня переживает пандемию СПИДа. С нашей точки зрения, очень важно знать время, прошедшее между заражением и появлением первых симптомов болезни, т.е. инкубационный период, в течение которого инфицированный человек может сдавать свою кровь, не осознавая ее опасности. При СПИДе он составляет от 6 мес до нескольких лет. Для Службы крови, проверяющей кровь каждого донора, еще большее значение имеет короткий период между заражением и возможностью выявления вируса современными методами, так называемое негативное окно. При использовании наиболее чувствительных тест-систем (ПЦР) оно составляет при СПИДе примерно 6 дней, а при стандартных методах в среднем - 3 недели. Поскольку инфицирующая доза ВИЧ не может быть настолько высокой, чтобы обеспечить его наличие в каждой пробе плазмы крови (от 200 до 500 мкл), поскольку самые современные методы (тестирование по нуклеиновым кислотам вирусов; Nucleic Acid Test - NAT) практически никогда не обнаруживают в ней меньше 50 частиц, и, наконец, поскольку стандартный объем сдаваемой крови - 350-400 мл, то негативное окно в принципе нельзя свести до нуля, и риск инфицирования реципиента донорской кровью всегда остается. В развитых странах регулярно публикуются данные по остаточным рискам вирусного инфицирования минимум за три года (у нас аналогичных сведений нет), в США - ~2 на 1 млн донаций в год; в Италии до NAT - ~1 на 450 тыс. в год; после введения метода - ~1 на 900 тыс. в год; в Австралии соответственно - 1 на 3 млн и 1 на 5 млн в год.

Для гепатита B инкубационный период - в среднем 90 дней (от 30 до 180). Заболевание опасно высокой вероятностью перехода в хроническую форму, цирроз и первичный рак печени; наиболее злокачественные формы (1% случаев) и присоединение гепатита “дельта” могут оказаться фатальными. Инфекционность на три порядка выше, чем у ВИЧ, длительность негативного окна - в среднем 59 дней (37-87). В США остаточный риск - ~15.8 на 1 млн донаций в год; в Испании - ~1 на 75 тыс.; в Австралии - ~1 на 520 тыс. В России эти показатели должны быть существенно выше еще и потому, что эпидемиологическая грамотность, в первую очередь тех, от кого может зависеть инфицирование за пределами станций переливания крови (парикмахеров, стоматологов, подчас даже хирургов), остается весьма невысокой. Соответственно стерилизация инструментария неадекватна, и число вирусоносителей растет.

Бич Службы крови - вирус гепатита С, поскольку до сих пор в основном его определяют по наличию специфических антител, которые появляются в среднем спустя почти три месяца (от 54 до 192 дней) после заражения. Все это время носитель (донор) может не знать о своем состоянии, а лаборатория не может выявить вирусные маркеры. Около 85% инфекций становятся хроническими и протекают бессимптомно; у трети инфицированных через 15-25 лет могут развиться цирроз и первичный рак печени. В США остаточный риск заражения с донорской кровью - 9.7 на 1 млн донаций в год, после введения NAT - до 2.72 на 1 млн донаций в год; в Австралии до введения NAT риск заражения составлял 1 на 120 тыс., после - 1 на 1 млн; во Франции - 1 на 800 тыс и 1 на 10 млн соответственно. В России использование NAT донорской крови на вирус гепатита С пока не обязательно (в отличие от Европы, где такой анализ введен с 1999 г.), поскольку требует серьезных вложений, специальных лабораторий и весьма грамотного, ответственного и аккуратного персонала. Там, где находятся средства и понимающая администрация, NAT применяется даже в масштабах региона. Основная проблема этого метода - его предельная чувствительность (теоретически до 1 целевой молекулы в пробе), что при несоблюдении требований к проведению чревато ненадежностью результатов (в частности, ложноположительными). В такой ситуации выходом может стать только введение карантина, т.е. использование для трансфузии крови, сохраняющейся в течение негативного окна, и только если кровь того же донора, взятая по истечении этого периода, свободна от вируса.

Вирус гепатита А, вызывающий инфекционную желтуху, может передаваться с кровью носителя бессимптомной инфекции. Очень устойчив во внешней среде; описаны случаи инфицирования препаратами крови, производство которых хотя и сопровождается инактивацией вирусов, но она может оказаться неэффективной в отношении безоболочечных вирусов - таких, как вирус гепатита А и парвовирусы. Российской Службой крови не тестируется; заражение реципиентов крови редко.

Вирус гепатита Е также может передаваться с кровью, но для России он неактуален. Эндемичен для стран Центральной Азии (например, Афганистана).

Вирус гепатита “дельта” ассоциирован с вирусом гепатита В; опасен при переливании инфицированной крови, если у реципиента обнаружен маркер гепатита В - поверхностный антиген вируса (HbsAg). В российской Службе крови широко не исследуется. Вирус эндемичен для стран Центральной Африки, Амазонии и Ближнего Востока.

Вирусы Т-клеточного лейкоза человека (HTLV-I, -II) считаются неактуальными для России, но внимательно изучаются отечественными специалистами. В США остаточный риск инфицирования с донорской кровью - 1.56 на 1 млн донаций в год.

Парвовирус В19 может передаваться с донорской кровью и вызывать патологическую симптоматику, например, аплазию эритроцитов. Актуален при переливании крови беременным, у которых может вызвать патологию плода. Очень устойчив во внешней среде. В нашей Службе крови не анализируется, в США обнаруживается с частотой 1 на 3300-40 000 доноров.

Герпесвирусы - большое семейство оболочечных возбудителей однотипной морфологии. Как правило, сопровождают человека с первых месяцев жизни; становятся опасными при поражении иммунной системы (СПИДе, заболеваниях крови и их химиотерапии). У человека описано восемь патогенных видов, из которых наиболее актуальны цитомегаловирус (ЦМВ) и вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ). На фоне иммунного дефицита при переливании свободной от цитомегаловируса крови может реактивироваться собственный ЦМВ, если реципиент оказался бессимптомным носителем. В Службе крови вирусы герпеса анализируют в донорской крови для специальных целей (например, перед трансплантацией органов и тканей). Инфекция цитомегаловируса опасна и при беременности.

Вирус Западного Нила - новый для нашей страны. Первая серьезная вспышка с множеством смертельных исходов зарегистрирована в Волгоградской области в 1999 г. Передается с укусом комара: в 90% случаев инфекция остается бессимптомной; в 10% случаев развивается тяжелый менингит, больных госпитализируют, но 10% из них спасти не удается. Вирус одновременно появился и на территории США, где его изучают как модель для разработки средств борьбы с неожиданными и неизвестными инфекциями (например, в случае биотерроризма). Исследуют его и российские специалисты, но Служба крови специальных мер пока не предпринимает и кровь на этот вирус не тестирует.

Мы не будем продолжать перечень вновь открываемых вирусов, актуальных для национальных Служб крови (в том числе российской), просто в силу журнальных рамок настоящего обзора; кроме того, они и изучены недостаточно.

Стоит упомянуть только о совершенно новом классе инфекционных агентов, о прионах, передающихся через донорскую кровь. Это возбудители печально известного “коровьего бешенства”, нейродегенеративной болезни Крейтцфельдта-Якоба, которая зарегистрирована на территории Европы, и болезни куру, для нас географически неактуальной. Прионы обнаруживаются в белых клетках крови (лейкоцитах), и ВОЗ рекомендует освобождать от них предназначенную для трансфузий плазму. Любое подозрение на симптоматику болезни Крейтцфельдта-Якоба (той или иной степени деменция, например), а также предшествующее лечение препаратами гипофиза (гонадотропином или гормоном роста) должно служить поводом для отвода донора.

**Меры по вирусной безопасности переливаний крови**

Чем же обеспечивается вирусная безопасность гемотрансфузий? Хотя список соответствующих мероприятий не слишком длинный, в исполнении он не так уж прост.

В первую очередь, это грамотная организация Службы крови и ее элементов (по существу - восстановление), будь то на основе слияния или взаимодействия возникших на ее обломках в России ведомственных и других служб крови, создание баз данных в составе ЕДС (Единой донорской системы), организация системы карантина для компонентов крови и т.п., т.е. соответствующие административные меры.

Вторая задача - адекватная оценка необходимости трансфузии со стороны лечащего врача.

И, наконец, вопросы, непосредственно связанные с переливанием крови: это, во-первых, эволюция трансфузионных сред; изучение вирусов, представляющих инфекционную угрозу при гемотрансфузиях, методами молекулярной биологии, наиболее адекватно описывающей сегодня биологические объекты, их функции и поведение; и, во-вторых, совершенствование средств детекции (идентификации вирусов в материалах от доноров и в препаратах крови) на основе данных молекулярной биологии этих вирусов.

В силу своей специальности я не буду касаться административных вопросов. Вирусологи могут и должны привлекаться лишь для экспертной оценки предлагаемых чиновниками мер. К тому же часто задачи производителей препаратов крови (расширение масштабов производства) и вирусологов (контроль и выбраковка сырья, фактически ведущие к сокращению и без того небогатой сырьевой базы Службы крови) противоречат друг другу. К административным мерам надо отнести и общее оздоровление нашей жизни, борьбу с наркоманией, нищетой и проч., поскольку чем меньше вирусоносительства в так называемых группах риска, тем меньше его и в популяции доноров.

По тем же причинам не буду рассуждать о медицинских показаниях к переливанию крови. Отмечу лишь, что, вопреки распространенному мнению, потеря крови в первую очередь требует восполнения не кислородоносителя, а объема жидкости и биологически активных белков, обычно растворенных в плазме крови.

И лишь три последних пункта приведенного выше перечня непосредственно касаются молекулярной вирусологии. Один из них (портрет врага) мы уже обсудили.

**Эволюция трансфузионых сред**

Трансфузионные среды, т.е. то, что переливают реципиенту (здесь речь идет только о донорской крови), менее чем за столетие претерпели весьма заметную эволюцию.

Цельная кровь - наиболее вирусоопасный продукт, поскольку чаще всего вирусы либо сорбируются на поверхности клеток, либо, инфицируя их, проникают внутрь. Она давно перестала быть основной трансфузионной средой. Ее прямое переливание - анахронизм, его делают, только если нет другого способа немедленно вернуть пострадавшего к жизни. Тем не менее в некоторых странах (например, Аргентине) этот способ практиковался до недавнего времени.

Сегодня основная трансфузионная среда - компоненты крови: плазма и клеточные элементы (эритроциты, лейкоциты и тромбоциты). Из плазмы холодовым осаждением получают белковый концентрат, так называемый криопреципитат, также использующийся для гемотрансфузий.

Наиболее безопасный продукт - проверенная на наличие целевых вирусов плазма. Кроме того, ее можно хранить без потери активности белков вплоть до того момента, когда донор придет вновь сдавать кровь. Если его плазма будет свободна от вирусов, ее оставляют на хранение, а используют сохраненную. Так обеспечивается дополнительная гарантия безопасности продукта. Сроки карантина зависят от длительности негативного окна.

Клеточные элементы крови сохраняются хуже: эритроциты (по российским правилам) - до восьми дней, тромбоциты - сутки. Об использовании лейкоцитов (наиболее вирусоопасного компонента крови) идет дискуссия. Основная проблема с тромбоцитами: они весьма нестабильны вне естественной среды, но как терапевтическое средство часто совершенно незаменимы.

Дальнейшая эволюция трансфузионных сред идет в направлении выделения и использования квинтэссенции, пятого элемента, действующего начала, ради которого плазма и переливается. Это белки крови, которые выделяются в ходе специального фракционирования. В результате холодового разделения с центрифугированием (при получении криопреципитата) концентрируются не только белки плазмы, но и вирусы, оболочка которых также имеет белковую природу.

Для получения белков, обладающих специфическими функциями, - так называемых факторов свертывания (VIII и IX), необходимых для лечения больных с нарушениями системы тромбообразования, - требуется еще более глубокое фракционирование плазмы.

Вирусную безопасность препаратов обеспечивает вирусологический контроль плазмы крови, предназначенной для переработки, - входной контроль. Методически он повторяет процедуру выбраковки донорской крови. Но из экономических соображений образцы плазмы объединяют в пулы по нескольку десятков. При объединении возможно разведение вируса, что в свою очередь предъявляет повышенные требования к чувствительности методов.

Следующий заслон на пути вероятного заражения препаратов крови - обработка промежуточных продуктов химическими (например, сольвент-детергентными и др.) и физическими (например, нагреванием, облучением, фильтрованием и др.) методами. Заключительный этап по обеспечению безопасности препаратов крови - выходной вирусологический контроль.

Генноинженерные белки. В настоящее время эволюция трансфузионных сред идет по пути синтеза действующего начала (белка) методами генной инженерии. Биологические системы (например, дрожжевая) экспрессии генов для производства белковых препаратов хорошо изучены, а вирусы, сопутствующие им, либо ограничены естественными хозяевами, либо непатогенны для человека. Мы не один год имеем на рынке (в том числе российском) продукты дрожжевой генной экспрессии, например вакцину против гепатита В, которая в ряде стран применяется и у новорожденных. Сегодня генноинженерным методом получены оба фактора свертываемости - VIII и IX. Пока они еще слишком дороги, но в перспективе должны стать существенно дешевле экстрагируемых.

Генная терапия. Генноинженерные белки, полученные в результате экспрессии генов в неестественном молекулярном контексте (например, белки человека в дрожжевой системе), могут оказаться не строгими аналогами “природных”. В первую очередь это касается их пространственной структуры и постсинтетических модификаций (гликозилирования и т.п.), которые в чужеродном окружении не всегда точно воспроизводятся. Кроме того, белковая природа таких препаратов делает их особо чувствительными к окружающим условиям (например, температурным) и ограничивает срок годности. Вот почему особое внимание привлекает прямая доставка генов целевых белков, способных к экспрессии в клетках человека для синтеза необходимых продуктов. Эта технология, разрабатываемая лишь около 10 лет, на практике пока не применяется. Наиболее интересные препараты такого класса - ДНК-вакцины (наша лаборатория участвует в соответствующих проектах). Производство ДНК-препаратов обещает быть намного дешевле белковых. Кроме того, они существенно менее чувствительны к колебаниям условий хранения. Но их использование, если и будет называться гемотрансфузиями, то только по традиции.

**Лабораторная диагностика вирусов**

В лабораториях Службы крови вирусные белки анализируют методами иммуноферментного анализа (ИФА). Его чувствительность измеряется в единицах массы, нг, и несравнима с NAT (в том числе с полимеразной цепной реакцией - ПЦР), чувствительность которого измеряется количеством молекул, или в геном-эквивалентах. Тем не менее в ряде случаев иммуноферментный анализ - вполне адекватный метод. Например, при гепатите B анализируется поверхностный белок вируса (HbsAg), а при репликации вируса его синтез значительно превышает потребности сборки вирусной частицы. Иммуноферментный анализ может быть прямым, когда регистрируется вирусный белок, или непрямым, когда определяются антитела, возникающие в ответ на вирусное инфицирование. NAT и методы ИФА не конкурируют, но взаимно обогащают друг друга. Оба они остаются основными в арсенале прикладной вирусологической лаборатории, но непрерывно совершенствуются.

При определении вирусных нуклеотидов стандартную ПЦР-диагностику начинают усиливать (пока не вытеснять - из-за весьма высокой стоимости оборудования). Этот вариант, названный ПЦР в реальном времени (реал-тайм), обладает тремя серьезными преимуществами: он существенно свободней от ложноположительных результатов (поскольку сама реакция и регистрация результата происходят в одной камере), может сократить время анализа до 2-3 ч (стандартный лабораторный ИФА также требует 2-3 ч, стандартная ПЦР - не менее 8-10 и более часов) и позволяет количественно оценивать целевой микроорганизм.

Следующий шаг в совершенствовании лабораторной вирусологической диагностики - технология микрочипов. Она интенсивно разрабатывается более 10 лет и используется в основном в экспериментальной науке, но сегодня постепенно выходит и в практику. Микрочипы позволяют одновременно проводить десятки, сотни, тысячи и сотни тысяч реакций - в микрокамерах, фиксированных на небольшой площадке - скажем, 44 мм. Если это микрочиповая модификация ПЦР, она объединяет преимущества метода реал-тайм (проведение реакции и регистрации результата в одной камере) с осуществлением множества анализов одновременно. Это, в свою очередь, делает результат более надежным и специфичным (идентифицируется несколько участков вирусного генома) и расширяет спектр одновременно анализируемых микроорганизмов до любого желаемого числа, сокращая время, материалы и проч. Первые отечественные диагностические чипы (биочипы) уже разработаны в Институте молекулярной биологии РАН, на очереди разработка вирусных биочипов для Службы крови. Наша лаборатория также участвует в этих проектах.

Существенный недостаток молекулярных методов идентификации вирусов заключается в том, что их результаты говорят о присутствии в образце белка или нуклеиновой кислоты, но не о наличии жизнеспособного вируса. Позитивные ИФА- и/или ПЦР-ответы свидетельствуют лишь о вероятности инфекционной опасности крови. Утверждать наличие вируса можно, лишь выделив его, а на это уйдет слишком много времени. Да и само выделение, требующее смены многих поколений вируса на клеточной культуре, может несколько изменить его, так что экстраполяции все равно неизбежны.

И еще одно важное обстоятельство: ни один из самых современных методов не может сегодня абсолютно точно указать на источник инфицирования реципиента. Ведь до развития первых регистрируемых признаков инфицирования проходит достаточно много времени, а разнообразия нуклеотидных последовательностей вирусов не всегда достаточно для их индивидуальной идентификации, которая всегда носит вероятностный характер.

Тем не менее резервы для совершенствования методов лабораторной диагностики вирусных инфекций существуют, а их реализация остается важнейшим инструментом в усилении вирусной безопасности гемотрансфузий.