

ДОСТОИНСТВА ТЕСТ-СИСТЕМ ИММУНОКОМБ (IMMUNOCOMB)

- полная комплектация наборов (мини-лаборатория);
- для постановки реакции и ее учета не требуется приборное обеспечение;
- практичность (позволяет исследовать любое число проб – от 1 до 36);
- быстрота получения результатов (40 минут);
- стабильность (срок хранения 9 месяцев);
- простота в работе (не требует специальной квалификации);
- надежность (наличие внутреннего контроля);
- возможность исследования не только сыворотки или плазмы, но и цельной крови.

Тест системы IMMUNOCOMB проверены ГИСКом им. Тарасевича, разрешены Министерством Здравоохранения России и используются во многих клиниках с 1992 года. С тест-системами Иммунокомб разрешено работать в полевых условиях, а также в экстренных ситуациях у койки больного.

Стоимость одного набора на 36 анализов – 57 у.е.

К ВНЕДРЕНИЮ ЛЕЙКОЦИТАРНЫХ ФИЛЬТРОВ

ABOUT THE INTRODUCTION OF LEUKOCYTIC FILTERS

Е.Б. Жибурт

Центр крови и тканей Военно-медицинской академии, Санкт-Петербург

Министр здравоохранения Российской Федерации 4 августа 2000 года издал приказ №311 «О мерах по повышению безопасности гемотрансфузий», в котором предписывается обеспечить внедрение в практику лечебно-профилактических учреждений и учреждений службы крови методов фильтрации трансфузионных сред.

Задача настоящей работы – представить современные данные об эффективности фильтрационной элиминации лейкоцитов.

Побочные эффекты гемотрансфузий, обусловленные примесью лейкоцитов в гемокомпоненте, в обобщенном виде представлены в таблице 1.

Аллоиммунизация

В последние годы установлено, что наряду с

хорошо известными антигенами HLA, аллоиммунизацию могут вызывать специфичные антигены гранулоцитов (нейтрофилов) NA1 (HNA-1a по новой международной номенклатуре) и NA2 (HNA-1b) – продукты аллелей NA-локуса (хромосома 1), который формирует биаллельную систему. В последнее время к этой группе относят антиген SH (HNA-1c). Другая серия гранулоцит-специфичных антигенов – NB1; NC1; ND1; NE1 и HGA-3 a, b, c, d, e; а также менее успешно дифференцируемые антигены GA, GB, GC и GR.

Гранулоцит-специфичные антитела могут отвечать за различные клинические синдромы, в частности аутоиммунную нейтропению новорожденных, фебрильные реакции при переливании крови, связанное с транс-

Таблица 1

Возможные реакции и осложнения после переливания гемотрансфузионных сред, содержащих лейкоциты

Неблагоприятные эффекты	Методы профилактики, снижение риска
Иммунологические эффекты	
Аллоиммунизация (HLA и лейкоцитарные антигены)	Лейкоцитарные фильтры III поколения
Фебрильные реакции	Лейкоцитарные фильтры III поколения
Рефрактерность к трансфузиям тромбоцитной массы	Лейкоцитарные фильтры III поколения
Отторжение трансплантата	Лейкоцитарные фильтры III поколения
Острое поражение легких	Лейкоцитарные фильтры III поколения
Болезнь «трансплантат против хозяина»	Гамма облучение 15–25 Гр
Иммуномодуляция	Лейкоцитарные фильтры III поколения
Гемотрансмиссивные инфекции	
Вирусы герпеса (цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр) Ретровирусы Бактерии и простейшие	Лейкоцитарные фильтры III поколения или тщательное обследование доноров на ЦМВ, HTLV и т.д.

фузией поражение легких, аутоиммунную нейтропению.

Многие аллоантигены, ранее считавшиеся специфичными только для тромбоцитов (HPA, human platelet antigens), найдены на других клетках, в том числе и лейкоцитах. При участии аллоантител к тромбоцитам развиваются тромбоцитопеническая пурпура новорожденных (анти-HPA-1a – более 70%), посттрансфузионная пурпура (анти-HPA-

1a – более 80%) и рефрактерность к трансфузиям тромбоцитов (анти-HPA-1b – 55%, анти-HPA-5b – 30% и анти-HLA). Также существуют два редких синдрома аллоиммунной тромбоцитопении: пассивная аллоиммунная тромбоцитопения и тромбоцитопения, ассоциированная с трансплантацией – в качестве причин описаны только анти-HPA-1a и анти-HPA-5b.

В качестве примера мож-

но привести результаты исследования, в котором оценивали развитие аллоиммунизации по появлению HLA-антител, либо по клиническим признакам рефрактерности к трансфузиям тромбоцитов у двух групп детей, больных острым лейкозом, солидными опухолями и тяжелой апластической анемией, получающих множественные гемотрансфузии. В лечении 50 пациентов использовали только гемокомпоненты, очищенные от лейкоцитов методом фильтрации, а у 10 детей по аналогичным показаниям применяли нефильтрованные гемокомпоненты. В обследуемой группе рефрактерность к тромбоцитам не зарегистрирована. Средняя величина скорректированного прироста тромбоцитов в начале лечения составила $11,1 \times 10^9/\text{л}$ и $10,4 \times 10^9/\text{л}$ во время обследования 8 месяцев спустя. В контрольной группе у 3 из 10 пациентов обнаружены HLA-антитела в сыворотке, а у 1 – выраженная рефрактерность к пулированным тромбоцитам. Сделано заключение,

что систематическое использование свободных от лейкоцитов гемокомпонентов предупреждает аллоиммунизацию у получающих множественные гемотрансфузии детей с онкологическими заболеваниями. Для этого полагают достаточным, чтобы остаточное содержание лейкоцитов не превышало 1×10^6 в дозе.

Иммуносупрессия

Проникновение в периферическую кровь большого количества антигенного материала, одновременно обладающего аллогенными, подобными и идентичными организму реципиента детерминантами, вызывает многообразные изменения в иммунной системе. Эволюционно организм не подготовлен к такой ситуации, т. к. обычно небольшие дозы антигенного материала поступают через барьер кожи или слизистых оболочек. Значительное повышение количества даже аутологических антигенных детерминант приводит к снижению активности многих иммунных реакций, как это происходит при аутоиммунных процессах.

В процессе хранения крови или ее клеточных компонентов происходит частичное разрушение лейкоцитов. Образующиеся фрагменты, как и целые лейкоциты, могут вызывать HLA-аллоиммунизацию, а освободившиеся из клеток цитокины и другие биологические вещества – фебрильные и нефебрильные посттрансфузионные реакции. Установлено, что интерлейкин-1, интерлейкин-6 и ФНО являются основной причиной посттрансфузионных фебрильных реакций.

С инфузией продуктов распада лейкоцитов связывают иммуномодуляцию при трансфузиях не только аллогенной, но и аутологичной крови (неблагоприятный прогноз развития опухолей, риск послеоперационных бактериальных инфекций).

При разрушении лейкоцитов в гемоконтейнер высвобождаются растворимые антигены HLA I класса и лиганды Fas-антигена (рецептора апоптоза). Эти вещества, попадая в кровь реципиента, приводят к снижению ответа Т-лимфоцитов на аллоантигены,

уменьшению активности цитотоксических лимфоцитов, индуцируют апоптоз Fas-позитивных клеток. Соответственно, логичным выглядит предложение использовать содержащую лейкоциты эритроцитную массу (взвесь) длительных (более 30 суток) сроков хранения для индукции иммунной толерантности у реципиентов трансплантатов. Однако для основной доли пациентов, получающих гемотрансфузии, иммуносупрессия является неблагоприятным фактором, нуждающимся в особой профилактике.

Цитомегаловирус

В ряду гемотрансмиссивных инфекций, передающихся с донорскими лейкоцитами, ведущее место принадлежит цитомегаловирусу (ЦМВ). Считается, что ЦМВ инфицированы от 1 до 12% гемоконпонентов.

Цитомегаловирус распространен по всему миру и редко вызывает симптоматические болезни у иммунокомпетентных лиц. В Европе и Северной Америке антитела к цитомегаловирусу обнаруживаются в среднем у 40–60% лиц старше 35 лет, а

в некоторых регионах Африки и Азии – практически у 100%.

Цитомегаловирус может передаваться через биологические жидкости (слюна, сперма, моча, кровь) при различных контактах, переливании гемоконпонентов, аллотрансплантациях. Первичная инфекция, вероятно, генерализована. Тот факт, что зависимости между источником инфицирования и клиническими проявлениями инфекции не установлено, свидетельствует об определяющей роли иммунорезистентности макроорганизма в развитии и течении цитомегаловирусной инфекции.

Реактивация цитомегаловируса часто встречается в течение беременности, после перфузии, пересадки органов и при других состояниях, сопровождающихся иммунодепрессией. Данные молекулярной биологии цитомегаловируса указывают на его потенциальную онкогенность.

Поскольку иммуносупрессия – важнейший этап трансплантации аллогенных органов, цитомегаловирус стал угрозой для реци-

пиентов трансплантатов. Индуцированная цитомегаловирусом интерстициальная пневмония встречается у 35–90% реципиентов трансплантатов.

Клиническая симптоматика и результаты инструментальных исследований позволяют сделать лишь предварительное заключение о цитомегаловирусной инфекции. Определяющее значение имеют результаты клинико-лабораторных исследований, среди которых по методическому подходу можно выделить 5 типов: 1) изоляция вируса; 2) серологическое исследование и определение вирусных антигенов (ИФА, иммунофлюоресценция, иммуноблотинг); 3) гибридизация нуклеиновых кислот; 4) полимеразная цепная реакция; 5) цитомегаловирусные включения в гистологических препаратах.

Выбор оптимального метода зависит от задач исследования, клинических проявлений и исследуемого материала. Синдром мононуклеоза, чаще встречающийся у лиц пожилого возраста, идентифицируется

серологически. Антитела к цитомегаловирусу (IgM, IgG и IgA) появляются при первичной и возвратной инфекции в различном титре. Несмотря на гуморальный иммунный ответ, при симптоматической инфекции клеточный иммунитет угнетен, продукция интерферона снижена. Соотношение Т-хелперы/Т-супрессоры при остром мононуклеозе – порядка 0,1–0,5 за счет уменьшения содержания Т-хелперов и увеличения содержания Т-супрессоров. Классические проявления цитомегаловирусного мононуклеоза: слабость, боли в мышцах, продолжительная лихорадка, нарушения функции печени, гепатоспленомегалия и атипичный лимфоцитоз. В тяжелых случаях: интерстициальная пневмония, миокардит, перикардит, поражение центральной и периферической нервной системы, острый и хронический энцефалит, асептический менингит, тромбоцитопеническая пурпура, гемолитическая анемия, гастроэнтерит, гепатит, ретинит и эпидермолиз.

Маркером цитомегаловирусной инфекции,

используемым при скрининге донорской крови, являются антивирусные антитела. Аналогичный подход достаточно эффективен при профилактике других гемотрансмиссивных инфекций (ВИЧ, сифилис, гепатит С). При углубленном обследовании у большинства (но не у всех) серопозитивных лиц удается обнаружить вирусную ДНК. В то же время есть данные, что ДНК вируса в некоторых случаях удается выделить несмотря на отсутствие специфических антител.

Наибольшей антицитомегаловирусной активностью *in vitro* и *in vivo* обладают ганцикловир и фоскарнет, применяемые по различным схемам. В профилактике цитомегаловирусной инфекции используют комбинации ганцикловира, ацикловира и иммуноглобулинов для внутривенного введения. Разработка специфических вакцин остается перспективным направлением.

Цитомегаловирусная инфекция у реципиентов гемоконпонентов может иметь следующие неблагоприятные последствия: 1) мононуклеоз; 2) повышение чувствительности к оппортунисти-

ческим инфекционным агентам как результат вирусиндуцированной иммунодепрессии; 3) отторжение трансплантата; 4) риск развития онкологических заболеваний; 5) риск развития атеросклероза; 6) нарушение процессов репарации и регенерации.

Вышеизложенное позволяет сделать простое заключение: несмотря на распространенность цитомегаловирусной инфекции, ее сложно диагностировать и еще сложнее лечить. Антицитомегаловирусные препараты очень дороги и в ряде случаев обладают серьезным побочным действием. Соответственно, наиболее эффективной терапевтической стратегией является профилактика передачи ЦМВ с донорскими лейкоцитами.

Кроме цитомегаловируса иммуноциты могут быть инфицированы другими герпесвирусами, аденовирусами, вирусами гриппа, кори, паротита, краснухи, гепатитов В и С, ретровирусами и прионами.

Лейкоциты выступают в качестве своеобразного резервуара не только для

вирусов. Изучение в эксперименте механизма передачи *Yersinia enterocolitica* с компонентами крови, показало, что эти бактерии фагоцитируются, но не погибают, а сохраняют жизнеспособность внутри лейкоцита. При распаде лейкоцитов происходит контаминация трансфузионной среды (организма реципиента).

Эффект элиминации лейкоцитов

Удаление лейкоцитов из гемоконпонента обеспечивает профилактику при остаточном содержании клеток:

- менее 2×10^8 лейкоцитов – профилактика формирования макроагрегатов эритроцитов, которые могут вызвать острый респираторный дистресс-синдром;

- менее 1×10^7 лейкоцитов – профилактика передачи цитомегаловируса;

- менее 5×10^6 лейкоцитов – профилактика первичной HLA-иммунизации.

Для традиционных технологий производства эритроцитсодержащих донорских

сред характерно следующее количество остаточных лейкоцитов (клеток в дозе):

- эритроцитная масса – менее $1,2 \times 10^9$;
- эритроцитная масса, обедненная лейкоцитами и тромбоцитами – менее $0,7 \times 10^8$;
- эритроцитный концентрат – менее $1,2 \times 10^9$;
- эритроцитная взвесь – менее $1,2 \times 10^9$;
- размороженные эритроциты – менее $0,1 \times 10^9$.

Таким образом, рутинные технологии элиминации лейкоцитов из гемотрансфузионных сред позволяют лишь несколько уменьшить вероятность и выраженность развития лейкоцитобусловленных побочных эффектов гемотрансфузии, в первую очередь, фебрильные негемолитические реакции (отмывание, криоконсервирование). Следует учесть трудо- и материалоемкость вышеуказанных методов, а также небольшой (до 24 ч) срок хранения отмытых и размороженных эритроцитов. Еще менее эффективны центрифугирование и криоконсервирование для повышения иммунологической безопас-

ности концентратов тромбоцитов.

Качественного изменения в технологии удаления «балластных» лейкоцитов из донорской крови и ее компонентов удаётся добиться с внедрением специальных лейкоцитарных фильтров (табл. 2–4).

Учитывая достаточно четкую зависимость развития посттрансфузионных осложнений от количества лейкоцитов (рис. 1), Европейский Совет по трансфузионной медицине рекомендует снижать примесь лейкоцитов в дозе клеточных компонентов крови менее чем $1,0 \times 10^6$. Традиционные методы удаления лейкоцитов (центрифугирование, криоконсервирование, отмывание, использование фильтров первого и второго поколения) не дают подобной чистоты. Лейкоцитарные фильтры третьего поколения позволяют выполнить эти рекомендации – удалить из клеточных компонентов крови микроагрегаты и до 99–99,9% лейкоцитов, снижая их уровень менее чем $2,0 \times 10^5$.

Выполняя процедуру фильтрации до начала процесса дезинтеграции гра-

Таблица 2

Применение фильтров при переливании компонентов крови

Поколение	Размер пор	Механизм фильтрации	Примечание
Первое	170–260 мкм	Просеивающий фильтр	<ul style="list-style-type: none"> • удаляет только большие фрагменты • вообще рекомендуется как "стандартный" фильтр крови • применяется для всех компонентов крови
Второе	20–40 мкм	Микропористый просеивающий фильтр	<ul style="list-style-type: none"> • удаляет 75–90% лейкоцитов • рекомендуется как микроагрегатный и микропористый фильтр • применяется только для эритроцитов, вместе со 170-микронным фильтром
Третье	Не применяется	Адгезивный фильтр	<ul style="list-style-type: none"> • удаляет 99–99,9% лейкоцитов • рекомендуется как адсорбционный фильтр • применяется как для эритроцитов, так и для тромбоцитов, вместе со 170-микронным фильтром

Таблица 3

Примесь лейкоцитов в эритроцитсодержащих средах, полученных различными методами

Показатели	ЭМ через лейкоцитарный фильтр	ЭМОЛТ	РОЭ	Эритроцитные			Цельная кровь
				взвесь	концентрат	масса	
Кол-во лейкоцитов в дозе (1)	$<2 \times 10^5$	$<0,7 \times 10^8$	$<0,1 \times 10^9$	$<1,2 \times 10^9$	$<1,2 \times 10^9$	$<3 \times 10^9$	100%
Объем дозы, мл	250	140	130	300	225	280	500
Анемия с наличием антител:							
- к белкам плазмы	-	+	++	-	-	-	-
- к эритроцитам	(+)	(++)	(++)	(+)	(+)	(+)	-
- к HLA	++++	++	++	+	+	-	-

Примечание: +/++/+++ – показана; - – не показана; (+) – по индивидуальному подбору; (1) – доза приготовлена из 500 мл консервированной крови; ЭМОЛТ – эритроцитная масса, обедненная лейкоцитами и тромбоцитами; РОЭ – размороженные отмытые эритроциты.

Таблица 4

Примесь лейкоцитов в концентратах тромбоцитов, полученных различными методами

Показатели	Методы выделения концентрата тромбоцитов (КТ)		
	Аферез (один донор)	Из обогащенной тромбоцитами плазмы одного донора	Из лейкоцитотромбоцитарного слоя крови одного донора
Кол-во тромбоцитов	$\geq 3,0 \times 10^{11}$	$0,78 \pm 0,13 \times 10^{11}$	$0,67 \pm 0,16 \times 10^{11}$
Объем КТ, мл	350	55 ± 5	64 ± 10
Примесь лейкоцитов в КТ до фильтрации	$4,45 \times 10^7$ (в среднем)	$1,20 \pm 0,30 \times 10^8$	$0,22 \pm 0,15 \times 10^8$
Примесь лейкоцитов в КТ после пропускания через лейкоцитарный фильтр Imugard III-PL	$< 0,1 \times 10^5$	$< 2,0 \times 10^5$ в пуле	Из 10 одиночных КТ
Потери тромбоцитов при фильтрации	$< 10\%$		

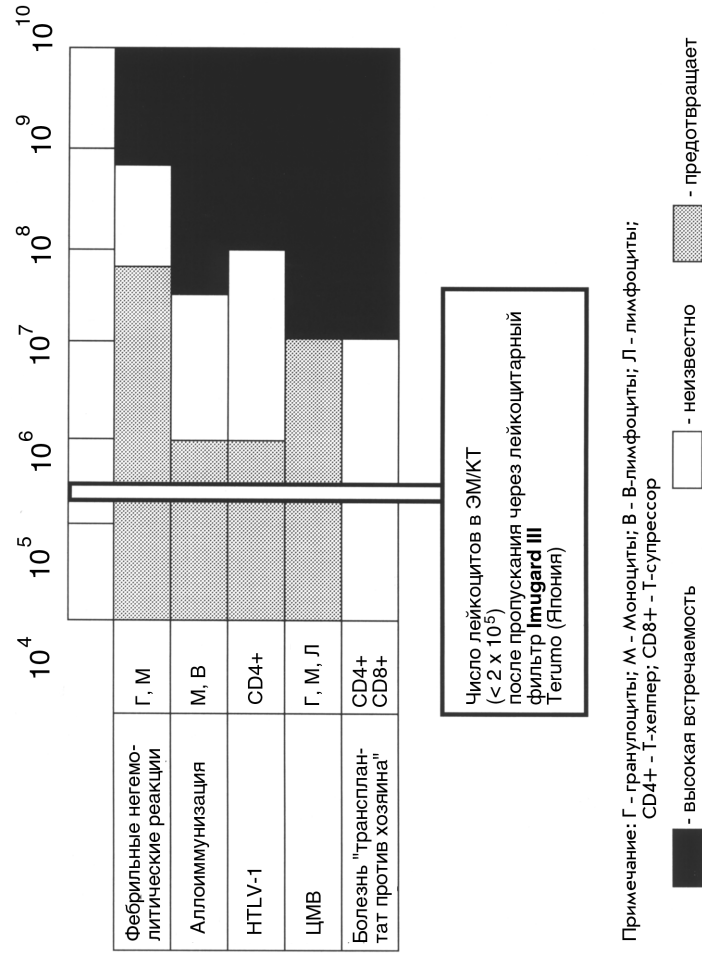


Рис. 1. Посттрансфузионные реакции и осложнения, обусловленные примесью лейкоцитов в клеточных компонентах крови

нулоцитов, т.е. в первые 6–24 часа (если кровь хранилась при температуре не выше 22°C), можно предотвратить гемотрансмиссивные инфекции ЦМВ, ВЭБ, и HTLV-1/2, а также передачу *Yersinia enterocolitisa*. Конечное содержание лейкоцитов в дозе должно быть не более 10^6 клеток в дозе гемокомпонента.

Вследствие распада лейкоцитов интервал между их элиминацией и подсчетом количества оставшихся клеток должен быть минимален. Для контроля качества элиминации лейкоцитов используется гемоцитометр большого объема (камера Nageotte).

Наряду с контролем качества фильтрации важной проблемой остается определение показаний к назначению обедненных лейкоцитами гемотрансфузионных сред, их клинической эффективности и экономической целесообразности.

Клиническая и экономическая эффективность лейкоцитарных фильтров

Интересны результаты сравнительного исследования, в котором сопоставили

экономическую эффективность трех режимов гемотрансфузионной терапии пациентов с острым миелолойкозом: 1) использование нефилтрованных пулированных тромбоцитов до наступления аллоиммунизации с переходом на кросс-матч-совместимые тромбоциты одного донора; 2) использование фильтрованных компонентов крови до наступления аллоиммунизации с переходом на кросс-матч-совместимые тромбоциты одного донора; 3) использование тромбоцитов одного донора с самого начала. Установлено, что стоимость этих тактик составляет, соответственно, \$12,557.14, \$11,406.17, \$13,016.16 для пациентов без миелотрансплантации и \$14,002.72, \$12,281.89, \$13,727.48 для реципиентов костного мозга. Сделан вывод об экономической эффективности фильтрации гемокомпонентов.

Помимо общеизвестных неблагоприятных эффектов переливаемых лейкоцитов, у кардиохирургических пациентов они участвуют в патогенезе реперфузионных повреждений. В одном из

рандомизированных исследований сформировали группы кардиохирургических пациентов: получающих концентрат эритроцитов (после удаления buffy coat; ЭК, n = 306), эритроциты, приготовленные из свежесфильтрованной крови (СЭ, n = 305), или эритроциты, фильтрованные после определенного хранения (ХЭ, n = 303). Оценивали срок госпитализации, время пребывания в отделении интенсивной терапии, развитие послеоперационных осложнений в течение 60 дней после операции. Средний срок госпитализации – 10,7 дней, из которых 3,2 дня – в отделении интенсивной терапии (без значительной разницы между группами). Частота развития послеоперационных инфекционных осложнений в группе ЭК – 23,0% против 16,9% и 17,9% среди пациентов в группах с удаленными лейкоцитами. В течение 60 дней скончались 45 пациентов: 24 – в группе ЭК (7,8%), против 11 (3,6%) и 10 (3,3%) – в группах СЭ и ХЭ, соответственно (P=0,015). Сделано заключение о том, что у кардиохирургических пациентов,

особенно получающих более трех гемотрансфузий, элиминация лейкоцитов из трансфузионных сред методом фильтрации приводит к значительному снижению послеоперационной летальности, которое отчасти может быть объяснено более высокой частотой послеоперационных инфекций в группе ЭК.

В другом исследовании оценивали экономическую эффективность внедрения трансфузий АВ0-совместимых КТ и очищения гемокомпонентов от лейкоцитов в лечение 120 гематологических пациентов. Зарегистрировано сокращение потребности в КТ с 143 до 71 единиц при миелотрансплантации и со 146 до 83 единиц при остром лейкозе. Общие затраты на лечение пациента с острым лейкозом сократились приблизительно на \$14,000, а лимфомой – на \$26,000. Стоимость фильтров для одного пациента (\$643 при трансплантации у больных лимфомами и \$875 у пациентов с лейкозом) компенсируется снижением затрат на приобретение компонентов крови (\$4127 у больных лимфомами и \$3283 у пациентов с лейкозом).

Таким образом, применение АВ0-идентичных тромбоцитов и очистки гемокомпонентов от лейкоцитов методом фильтрации снижает стоимость лечения гематологических пациентов.

Очевидно, что вскоре увидят свет результаты аналогичных отечественных исследований.

На этапе внедрения фильтрационной элиминации лейкоцитов важно определить приоритеты в ее использовании (очевидно, что вопрос о фильтрации всех доз крови в отечественной службе крови – дело будущего).

Существуют две разновидности лейкоцитарных фильтров:

- * для фильтрования клеточных компонентов крови сразу после их изготовления в учреждениях службы крови;

- * для фильтрования клеточных компонентов крови у постели больного в процессе их переливания.

Использование лейкоцитарных фильтров третьего поколения при переливании эритроцитсодержащих сред в первую очередь рекомендуется:

- * при повторных фебрильных негемолитических посттрансфузионных реакциях;

- * при предполагаемом длительном, повторном переливании эритроцитсодержащих сред;

- * у потенциальных кандидатов на трансплантацию костного мозга;

- * у HLA-аллоиммунизированных и рефрактерных больных с анемиями.

Использование лейкоцитарных фильтров третьего поколения при переливании концентратов тромбоцитов рекомендуется:

- * при повторных фебрильных негемолитических посттрансфузионных реакциях;

- * при предполагаемой длительной, повторной тромбоцитотерапии;

- * у потенциальных кандидатов на трансплантацию костного мозга;

- * у аллоиммунизированных и рефрактерных больных с кровотечениями.

Во многих странах решен или рассматривается вопрос об обязательном удалении лейкоцитов из всех трансфузионных сред. Это вектор развития трансфузионной медицины в ближайшие годы.