

УТВЕРЖДАЮ»
Директор НИИЭМИЗ МЗ РУз,
профессор _____ ТУЙЧИЕВ Л.Д.
_____ 2013 г.

ПРОТОКОЛ

ИФА исследований сыворотки и содержимого лимфоцитов крови доноров
на предмет зараженности HBV и HIV.

Согласно Договора между ООО «New Medical Technologies» (Генеральный директор – Арифбаев Р.С.) и лабораторией хронического инфекционного процесса (заведующий лабораторией – д.м.н. проф. Гулямов Н.Г.) НИИЭМИЗ МЗ РУз (Директор института – д.м.н., профессор Туйчиев Л.Н.) за №2 от 29 апреля 2013 года проведены ИФА исследования сыворотки и содержимого лимфоцитов крови 309 доноров на предмет зараженности HBV и HIV.

Цель проведения исследований:

Оценить функциональность «Способа обнаружения лимфотропных вирусов – вируса гепатита В (HBV) и вируса иммунодефицита человека (HIV) в биологических субстратах с низким содержанием вирусных частиц, оценки их жизнеспособности и исключения ложноотрицательных результатов при ИФА исследовании». Провести сравнительное изучение частоты обнаружения маркеров HBV и HIV в сыворотке и в содержимом лимфоцитов крови у доноров.

Предисловие.

По данным ученых стран СНГ и Республики Узбекистан от 30-40% до 60-80% случаев заражения людей, особенно детей, HBV- и HCV-инфекциями, нередко и ВИЧ- инфекцией происходит в результате трансфузии зараженной донорской крови или её препаратов, то есть при проведении медицинских манипуляций. Это является прямым свидетельством не совершенности используемых методов тестирования крови доноров на предмет зараженности HBV и HCV, а также HIV. Однако, исследования, направленные на выявление и устранение причин высокой частоты заражаемости людей HBV-, HCV- и ВИЧ-инфекциями через донорскую кровь или её производные не только не проводились, данный вопрос даже не выносился на обсуждение. (Гулямов Н.Г., Бабаходжаев С.Н., Ахмедова Х.Ю.//Диагностика вирусных инфекций у доноров: ИФА или ПЦР? Инфекции, иммунитет и фармакология, №3, 2005. С.113-115)

Кроме того, в донорских учреждениях около 4,5 % заготовленной крови бракуется по результатам скрининга маркеров гемотрансмиссивных инфекций. В структуре причин выбраковки донорской крови гепатит HBV

составляет 20-25 %, а HCV составляет 30-35%, что имеет и существенное экономическое значение (Онищенко Г.Г., Дементьева Л.А. Распространение вирусных гепатитов как угроза национальной безопасности Журн. микробиол., 2003, №4,с, 93-99)

Основными причинами потенциального риска инфицирования реципиентов компонентами и препаратами крови является ограниченность чувствительности и специфичности методов тестирования доноров на предмет зараженности HBV и HCV (Гулямов Н.Г., Бабаходжаев С.Н., Ахмедова Х.Ю.//Диагностика вирусных инфекций у доноров: ИФА или ПЦР? Инфекции, иммунитет и фармакология, №3, 2005. С.113-115)

Инфицированность населения HBV, HCV и HIV, как потенциального донорского контингента, остается высокой и может значительно различаться в отдельных регионах. Вирусные гепатиты с парентеральным путем передачи являются наиболее частой причиной посттрансфузионных инфекционных осложнений.

Имеются единичные сообщения о возможности персистенции HBV и HCV, как и HIV, в моноклеарных клетках крови, в частности в лимфоцитах и макрофагах. Однако оценке данного факта с позиций патогенеза и клиники вирусных гепатитов ни одним исследователем не уделено внимание.

Именно имеющие место одновременно гепатотропные и лимфотропные свойства вирусов послужили основанием для выполнения настоящего исследования.

Выполненные исследования.

В исследовании использована сыворотка и лимфоциты крови 309 доноров крови. Забор крови для исследований проводили у доноров на базе Дорожной станции переливания крови ГАЖК «Узбекистон темир йуллари», (глав, врач к.м.н. Бабаходжаев С.Н.)

ИФА сыворотки и содержимого лимфоцитов крови осуществляли с использованием тест-систем, предназначенных для специфической диагностики ВГВ путем определения HBsAg и ВИЧ. При ИФА содержимого лимфоцитов руководствовались «Способом обнаружения лимфотропных вирусов – вируса гепатита В (HBV) и вируса иммунодефицита человека (HIV) в биологических субстратах с низким содержанием вирусных частиц, оценки их жизнеспособности и исключения ложноотрицательных результатов при ИФА исследовании». Для проведения ИФА в содержимом лимфоцитов у доноров забиралась кровь в количестве 5-6 мл утром натощак из локтевой вены в пробирки, содержащие 2,0 мл изотонического раствора хлорида натрия и 2-3 капли гепарина. Выделение лимфоцитов проводили путем наслаивания цельной гепаринизированной крови на раствор фиколл-верографина с градиентом плотности $d=1,077$ г/мл в соотношении 3:1 с последующим центрифугированием при 1500 об/мин в течение 15 мин. Лимфоциты дважды отмывали в физиологическом растворе по 15 минут центрифугированием при 1500 об/мин. После последнего центрифугирования

удаляли надосадов. Осадок, содержащий лимфоциты, разбавляли в 500 мкл физиологического раствора и переносили в эпиндорф. Разрушение выделенных лимфоцитов достигалось размещением эпиндорфа с последующим замораживанием в морозильных шкафах с температурой -28°C в течение суток. Метод определения антигенов HBV и HIV в содержимом лимфоцитов идентичен с методом определения их в сыворотке крови.

Для выявления антигенов HBV и HIV методом ИФА в сыворотке и в содержимом лимфоцитов использовались тест-системы фирмы «ВЕКТОР – БЕСТ» и НПО диагностические системы (Нижний Новгород, Российская Федерация).

Проведен следующий объем исследований:

- 1) ИФА исследование сыворотки крови доноров на предмет зараженности HBV 309 исследований
- 2) ИФА исследование содержимого лимфоцитов крови доноров на предмет зараженности HBV 309 исследований
- 3) ИФА исследование сыворотки крови доноров на предмет зараженности HIV 309 исследований
- 4) ИФА исследование содержимого лимфоцитов крови доноров на предмет зараженности HIV 309 исследований

Всего проведено ИФА исследований 1236 исследований

Результаты проведенного сравнительного изучения частоты обнаружения маркеров HBV и HIV в сыворотке и в содержимом лимфоцитов крови у доноров позволили выявить следующее. Из обследованных 309 доноров результат ИФА на антиген HBV **в сыворотке** крови был положительным у **6 (1,94%)** доноров, тогда как ИФА на антиген HBV **в содержимом лимфоцитов** был положительным у **23 (7,44%)** доноров. При этом разница между положительными результатами ИФА сыворотки и содержимого лимфоцитов составила **17 (5,5%)** доноров. Из этого следует, что при ИФА сыворотки крови доноров частота ложноотрицательных результатов составила **5,5%** (Табл. 1).

Анализ частоты зараженности HBV доноров из различных регионов показал, что наиболее высокая частота выявления антигена HBV отмечается у доноров из г. **Андижан** - в **20%** и г. **Коканд** – в **17,5%** случаев. У доноров г. **Ташкента и Ташкентской области** эти показатели составили соответственно **3,58%** и **3%**.

При ИФА **сыворотки крови** на предмет зараженности **ВИЧ-инфекцией** из 309 доноров антиген HIV не был обнаружен (**0%**) ни у одного донора. Применение способа ИФА **содержимого лимфоцитов** на предмет зараженности HIV дало **положительный (!) результат** у **1 (0,32%)** донора.

Таблица
Сравнительный анализ результатов частоты выявления антигенов HBV и HIV в сыворотке и в содержимом цитоплазмы лимфоцитов у доноров крови методом ИФА

№	Местность	Число доноров	Частота выявления маркеров HBV и HIV					
			HBV			Сыворотка	Лимфоциты	Разница
			Сыворотка	Лимфоциты	Разница			
1	г. Андижан	40	2 (5%)	8 (20%)	6 (15,0%)			
2	г. Коканд	40	2 (5)	7 (17,5%)	5 (12,5%)			
3	г. Ташкент	195	2 (1,03%)	7 (3,58%)	5 (2,55%)			
4	Таш. область	34	0	1 (3,0%)	1 (3,0%)			
	Всего	309	6 (1,94%)	23 (7,44%)	17 (5,5%)	0	1 (0,32%)	1 (0,32%)

Примечание: * - $P < 0,05$ – достоверность различий в сравнении с показателями группы доноров с выявлением маркеров HBV в содержимом лимфоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Сравнительное исследование 309 доноров крови частоты выявления антигенов вируса гепатита В (HBV) и ВИЧ (HIV) в сыворотке и содержимом лимфоцитов крови позволило выявить:

1. При ИФА **сыворотки** крови 309 доноров на предмет зараженности HBV результат в **5,5% случаев** был ложноотрицательным. Применение «Способа обнаружения лимфотропных вирусов – вируса гепатита В (HBV) и вируса иммунодефицита человека (HIV) в биологических субстратах с низким содержанием вирусных частиц, оценки их жизнеспособности и исключения ложноотрицательных результатов при ИФА исследовании» позволило в содержимом лимфоцитов выявить дополнительно у этих **5,5%** доноров антиген HBV.
2. При ИФА **сыворотки крови** на предмет зараженности **ВИЧ-инфекцией** антиген HIV не был обнаружен (**0%**) ни у одного донора. Применение «Способа обнаружения лимфотропных вирусов – вируса гепатита В (HBV) и вируса иммунодефицита человека (HIV) в биологических субстратах с низким содержанием вирусных частиц, оценки их жизнеспособности и исключения ложноотрицательных результатов при ИФА исследовании» при ИФА **содержимого лимфоцитов** на предмет зараженности HIV дало **положительный (!) результат у 1 (0,32%)** донора.
3. Предлагаемый ООО «New Medical Technologies» «Способ обнаружения лимфотропных вирусов – вируса гепатита В (HBV) и вируса иммунодефицита человека (HIV) в биологических субстратах с низким содержанием вирусных частиц, оценки их жизнеспособности и исключения ложноотрицательных результатов при ИФА исследовании» позволяет исключить ложноотрицательные результаты при ИФА тестировании доноров крови на предмет зараженности вирусом гепатита В и ВИЧ, что имеет существенное значение для снижения заражения реципиентов через донорскую кровь и её компоненты в практике здравоохранения.

Заведующий лабораторией
хронического инфекционного
процесса НИИЭМИЗ,
д.м.н., профессор

Ведущий научный сотрудник,
д.м.н.



ГУЛЯМОВ Н. Г.

АХМЕДОВА Х. Ю.