

ДИАГНОСТИКА МАРКЕРОВ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ В ПЕРИКАРДИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ И КРОВИ ТРУПОВ-ДОНОРОВ ПРИ ЗАГОТОВКЕ ТКАНЕЙ ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ В ТРАВМАТОЛОГИИ И ОРТОПЕДИИ

Г.С. Борт, И.Н. Иванов, В.И. Савельев, А.Г. Резник, Ю.А. Рыков, А.Г. Афиногенова, В.В. Слепешева, А.В. Козлов

*ФГУ «Российский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена Росмедтехнологий»,
директор – д.м.н. профессор Р.М. Тихилов;
Санкт-Петербургская медицинская академия последипломного образования,
ректор – к.м.н. О.Г. Хурцилава
Санкт-Петербург*

Авторы изучили возможности диагностики маркеров инфекционных заболеваний – гепатита В и С, ВИЧ, сифилиса у 149 трупов-доноров в крови и перикардиальной жидкости с помощью тест-систем для экспресс и ИФА и установили, что появление сомнительных результатов зависит от концентрации свободного гемоглобина в биологических жидкостях. На его содержание влияет температура среды пребывания трупа-донора и время с момента наступления смерти – термотемп. Последовательность определения маркеров инфекционных заболеваний в крови и перикардиальной жидкости должна быть следующей: гепатит В, сифилис, ВИЧ-инфекция, гепатит С.

The authors studied the possibility of the diagnostics of the markers of infectious diseases – B and C hepatitis, HIV, syphilis in the pericardial fluid and blood of 149 cadavers-donors using test-systems for rapid analysis and IFA and determined that the occurrence of controversial results depends on the concentration of free hemoglobin in biologic fluids. The temperature of the environment of cadaver-donor's stay and the time from death moment – thermotempo – influence its content. The sequence of the determination of the markers of infectious diseases in the blood and pericardial fluid must be: B hepatitis, syphilis, HIV, C hepatitis.

Введение

Проблема донорства при трансплантации биологических тканей остается такой же актуальной, как и при трансплантации органов. По данным Американской ассоциации тканевых банков число пригодных доноров от общего числа для разных банков составляет в среднем 57%, остальные 43% были отвергнуты по разным причинам, в том числе из-за невозможности осуществить серологические анализы крови в связи с ее гемолизом. Потеря столь значительного количества доноров не может не волновать, поскольку потребности клиницистов в пластическом материале продолжают расти. Так, по данным «РНИИТО им. Р.Р.Вредена Росмедтехнологий» при лечении травм и патологий опорно-двигательного аппарата костные трансплантаты используются в 17,2%, сухожильные в 23,1 % оперативных пособий, проводимых в институте. В связи с этим у авторов статьи возникла мысль о необходимости совершенствования и разработки специальной технологии, пригодной для работы с гемолизированной кровью на предмет выявления у трупов-доноров инфекционных заболеваний, таких как гепатиты В и С, ВИЧ и сифилис [1, 2, 5–16].

Цель – выявить возможность использования трупных тканей для трансплантации у доноров с гемолизом.

В задачу работы входило: изучить результаты серологического исследования в биологических жидкостях на маркеры инфекционных заболеваний (гепатиты В и С, ВИЧ и сифилис) в зависимости от времени, прошедшего после смерти доноров, а также температуры их хранения.

Материал и методы

Работа выполнена на 149 трупах мужского пола в возрасте от 22 до 71 лет, скончавшихся от ишемической болезни сердца – 89 (59,7%), отравлений наркотиками – 14 (9,4%), этиловым алкоголем – 20 (13,4%), механической асфиксии – 21 (14,1%) и острой пневмонии – 5 (3,4%).

Кровь из правой половины сердца (149 проб) и перикардиальную жидкость (46 проб) центрифугировали в течение 20 мин при 2000 об/мин. Полученную сыворотку крови и центрифугированную перикардиальную жидкость исследовали на маркеры гепатита В и С, ВИЧ и сифилиса. Их наличие определяли, используя коммерческие наборы для экспресс – анализа: «Гепатит В

Гексагон, HUMAN», «Сифилис RPR тест, HUMAN», «ИммуноКомб II HCV», «Детермин ВИЧ S, Дайнабот Ко Лтд, Япония») и иммуноферментным методом: «Вектоген В HBs-антиген», «Рекомби-Бест анти-ВГС», «РекомбиБест антипаллидум-суммарные антитела» Вектор Бест, «ДЖЕНСКРИН® ПЛЮС ВИЧ АГ-АТ, Biorad».

В перикардиальной жидкости и сыворотке крови устанавливали концентрацию свободного гемоглобина гемиглобинцианидным методом. Для каждого анализируемого образца подбирали оптимальное соотношение между объемом исследуемого гемолизата и трансформирующего реактива.

У трупов 73 человек, скончавшихся от ишемической болезни сердца, для гистологического исследования изымали кусочки верхней трети передней стенки левого желудочка сердца, которые фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина и заливали в парафин, срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Статистическую обработку результатов проводили с помощью: дисперсионного анализа, t- критерия Стьюдента, углового преобразования Фишера, аргумента нормального распределения [3, 4].

Результаты и обсуждение

Поскольку труп является инерционной теплообменной средой, то при отборе его на пригодность, приходится учитывать не только время, но и температуру хранения, причем отделить эти факторы друг от друга в данном случае не представляется возможным. По этой причине в работе была использована специальная константа – термочас (ТЧ), характеризующая интенсивность аутолитических процессов при конкретной температуре (Т) внешней среды, а также продолжительности времени (Ч) хранения трупа и его тканей до выполнения лабораторных исследований. В процессе проведения последних было установлено, что от момента смерти донора до изъятия у него трансплантационного материала и крови, общее время складывается из четырех основных этапов.

Первоначально труп находится на месте его обнаружения (1 этап). Затем происходит его транспортировка в морг (2 этап), где он хранится до вскрытия и забора тканей (3 этап). После этого материал поступает в лабораторию для серологического исследования (4 этап). Каждый из этих этапов характеризуется своей продолжительностью и температурой. Так длительность 1 этапа варьировала от 1 до 71 ч, второго – от 1 до 20 ч, третьего – от 2 до 77 ч. Температура на первом этапе колебалась от – 8°С до +25°С, на вто-

ром – от -12°С до +23°С, на третьем – от +15°С до +18°С. Четвертый этап отличался стабильностью по времени (23 ч) и температуре (+ 4°С).

При подборе трупа-донора учет только времени или только температуры недостаточен. Поэтому мы предложили использовать сумму произведений температуры и времени каждого из выше упомянутых этапов – термочас (ТЧ), определяемых по формуле:

$$ТЧ = T_1 \times Ч_1 + T_2 \times Ч_2 + T_3 \times Ч_3 + T_4 \times Ч_4 \quad (1),$$

где $T_{1,2,3,4}$ – температура этапа (С°), $Ч_{1,2,3,4}$ – время этапа (часы). При нулевой температуре окружающего воздуха нужно время умножить на единицу. При отрицательной температуре окружающего воздуха время умножается на эту отрицательную температуру, и полученное отрицательное произведение вычитается из положительного.

Для удобства практического применения формула была преобразована (алгебраически) с целью выделения 2 этапа.

$$T_3 \times Ч_3 = ТЧ - (T_1 \times Ч_1 + T_2 \times Ч_2 + T_4 \times Ч_4) \quad (2).$$

Гистологическое изучение препаратов сердца от трупов 73 человек, скончавшихся от ИБС, выявило разрушение эритроцитов внутри сосудов эпикарда, где внутрисосудистый гемолиз был выражен максимально [7]. Также было установлено, что между разрушением эритроцитов и термочасом существует прямая зависимость, позволившая разбить весь исследуемый материал на 4 группы (табл.). В первую группу вошли 22 наблюдения с термочасом до 108 единиц и минимальным разрушением эритроцитов внутри сосудов, которое начиналось в венулах. Ко второй группе были отнесены 29 случаев с термочасом от 109 до 308 единиц, отличавшихся умеренным разрушением эритроцитов, как в венулах, так и в венах. В третьей группе, представленной 12 наблюдениями с термочасом от 309 до 1558 единиц, во всех сосудах наблюдалось выраженное разрушение эритроцитов. В оставшихся 10 случаях из 4 группы с термочасом от 1559 до 2880 единиц содержимое сосудов было заполнено бурыми массами полностью разрушенных эритроцитов.

Полученные на гистологическом материале данные по термочасу отражают внутрисосудистые изменения крови, формирующиеся в миокарде трупа – донора в течение трех этапов. Однако они не учитывают влияние времени и температуры последующей транспортировки крови в лабораторию, которая увеличивает термочас еще на 92 единицы.

Микроскопический рост гемолиза эритроцитов в зависимости от термочаса

Оцениваемые признаки	ТЧ до 108 n=22 (P ₁)	ТЧ 109 – 308 n=29 (P ₂)	ТЧ 309-1558 n=12 (P ₃)	ТЧ 1559- 3000 n=10 (P ₄)
Венула эритроцит процент гемолиза:				
Г ₀ (0 - 5)	0,35**	0,06	0,07	
Г ₁ (6 - 15)	0,00	0,17**	0,00	
Г ₂ (16 - 29)	0,15***	0,03	0,00	
Г ₃ (30 - 50)	0,05	0,03	0,00	
Г ₄ (51 - 90)	0,20	0,27	0,29	
Г ₅ (91 - 100)	0,25	0,44	0,64***	
Бурые массы	0,00	0,00	0,00	0,89 [†]
Вена эритроцит процент гемолиза:				
Г ₀ (0 - 5)	0,58 [†]	0,15***	0,00	
Г ₁ (6 - 15)	0,00	0,07	0,00	
Г ₂ (16 - 29)	0,05	0,11	0,07	
Г ₃ (30 - 50)	0,11	0,26	0,07	
Г ₄ (51 - 90)	0,21	0,22	0,50	
Г ₅ (91 - 100)	0,05	0,19	0,36***	
Бурые массы	0,00	0,00	0,00	0,77 [†]
Микробные тела - наличие в просвете сосудов	0,00	0,00	0,00	0,91 [†]

* p<0,001 ** p<0,01 *** p<0,05

При отмеченных выше условиях определение свободного гемоглобина в перикардиальной жидкости и крови из правой половины сердца показало, что при термочасе не превышающем 200 единиц (n=8) его концентрация в них была на уровне $0,69 \pm 0,1$ г/л и $8,49 \pm 3,28$ г/л соответственно (p<0,05). В диапазоне термочаса от 201 до 400 единиц (n = 20) эти показатели возрастали до $1,15 \pm 0,18$ г/л и $14,93 \pm 6,12$ г/л (p<0,05). С увеличением термотемпа свыше 400 единиц (n=18) уровень свободного гемоглобина достигал в перикардиальной жидкости $3,18 \pm 0,75$ г/л, а в крови – $39,97 \pm 10,05$ г/л (p<0,001).

Статистический анализ подтвердил, что с ростом термочаса концентрация свободного гемоглобина – P (г/л) – в перикардиальной жидкости нарастала линейно (рис. 1), а в крови из правого желудочка сердца – нелинейно по экспоненте (рис. 2). Эти особенности могут быть аппроксимированы соответствующими видами регрессии. Линейная регрессия изменения концентрации свободного гемоглобина в перикардиальной жидкости в зависимости от термочаса, отражена в формуле:

$$P = (0,00456 \pm 0,00135) \times \text{ТЧ}; (p = 0,05),$$

где коэффициент детерминации $R^2 = 0,26$ (p = 0,002 < 0,05) и коэффициент регрессии 0,00456 (p = $8,854 \times 10^{-8}$ < 0,05). Концентрация свободного гемоглобина в крови из правого желудочка определялась формулой:

$P = (1,0054 \pm 0,0004)^{\text{ТЧ}}$ (p = 0,05) с коэффициентом детерминации $R^2 = 0,54$ и значимостью для регрессии $p = 2,6510^{-5} < 0,05$. С помощью этих данных и формулы 2 были получены графики зависимости термочаса 3 этапа от остальных этапов при разных значениях концентраций свободного гемоглобина как в крови, так и в перикардиальной жидкости.

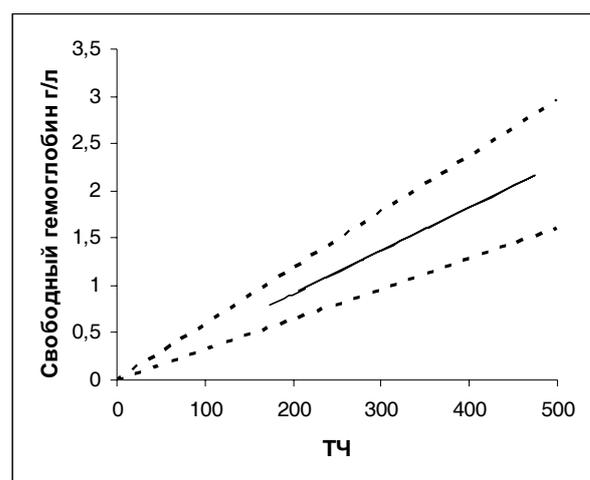


Рис. 1. График линейной зависимости концентрации свободного гемоглобина от термочаса (ТЧ) в перикардиальной жидкости.

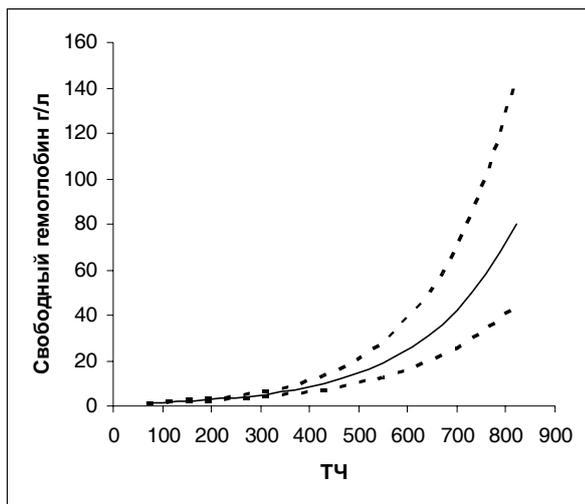


Рис. 2. График нелинейной зависимости концентрации свободного гемоглобина от термочаса (ТЧ) в крови правого желудочка сердца.

Сравнительное серологическое исследование перикардиальной жидкости и крови из правой половины сердца от 46 трупов на маркеры гепатита В и С, ВИЧ и сифилис с помощью экспресс-теста и иммуноферментного анализа показало, что наименьшее количество сомнительных реакций дает перикардиальная жидкость.

Исследование на маркеры гепатита В в 7 наблюдениях дало отрицательный результат при термочасе $247,4 \pm 35,0$ единиц, что соответствовало концентрации свободного гемоглобина в перикардиальной жидкости $1,1 \pm 0,31$ г/л и крови $20,49 \pm 12,78$ г/л. Положительную ($n = 5$) реакцию регистрировали на $566,4 \pm 251,9$ единицах и концентрации свободного гемоглобина в перикардиальной жидкости и крови до $3,06 \pm 1,28$ г/л и $25,8 \pm 13,74$ г/л соответственно. Появление сомнительной ($n = 34$) реакции было отмечено при термочасе $491,9 \pm 60,5$ единиц и свободном гемоглобине в биологических средах $1,84 \pm 0,41$ и $33,0 \pm 7,11$ г/л. На основании проведенного дисперсионного анализа статистически значимых различий между этими тремя группами по термочасу и свободному гемоглобину в перикардиальной жидкости и крови не установлено ($p > 0,05$).

Диагностика гепатита С сомнительных реакций не выявила. Отрицательный результат был зафиксирован в 25 случаях со средним термочасом $377,5 \pm 48,45$ единиц, свободным гемоглобином в перикардиальной жидкости – $1,59 \pm 0,30$ г/л и крови – $28,6 \pm 7,90$ г/л. Положительная реакция ($n=21$) наблюдалась при $564,3 \pm 101,0$ единиц, $2,19 \pm 0,67$ г/л и $17,51 \pm 6,60$ г/л соответственно ($p > 0,05$).

Другая картина была обнаружена при определении ВИЧ-инфекции. Количество отрицательных ($n=28$), сомнительных ($n= 11$) и положительных ($n=7$) результатов было статистически значимо связано с нарастанием термочаса ($p < 0,006$), составившего $380,9 \pm 50,7$; $575,0 \pm 127,4$ и $613,9 \pm 196,2$ единиц соответственно, а также концентрацией свободного гемоглобина в перикардиальной жидкости ($p < 0,05$), достигавшей $1,2 \pm 0,20$ г/л, $3,1 \pm 1,10$ г/л и $2,4 \pm 0,99$ г/л. Изменения концентрации свободного гемоглобина в крови были незначимы ($p > 0,05$).

Исследование на сифилис также показало статистически четкую связь между отрицательным ($n = 30$), сомнительным ($n= 15$) и положительным ($n = 1$) результатами. Изменения термочаса были на уровне $346,2 \pm 41,5$ ед., $696,7 \pm 121,6$ ед. и $452,0$ ед. ($p < 0,006$). Концентрация свободного гемоглобина в перикардиальной жидкости при этом составляла соответственно: $1,27 \pm 0,20$ г/л, $3,0 \pm 0,90$ г/л и $1,92$ г/л ($p < 0,05$). В крови изменения свободного гемоглобина были незначимы ($p > 0,05$). Таким образом, представленные выше сведения свидетельствуют о росте сомнительных и положительных реакций по мере увеличения термочаса и концентрации свободного гемоглобина в перикардиальной жидкости. В этой связи линейная регрессия при установлении нижней границы термочаса для перикардиальной жидкости выглядела следующим образом:

$$TЧ = P / 0,00456,$$

$$\text{где } P = (0,00456 - 0,00135) * TЧ_{\min} \quad (3).$$

Для крови нелинейные регрессии при определении нижней границы термочаса и концентрации свободного гемоглобина получили такой вид:

$$TЧ = \log((P(\text{г/л}))/\log(1,0054)),$$

$$\text{где } P(\text{г/л}) = (1,0054 - 0,0004) TЧ_{\min} \quad (4).$$

В цифрах для перикардиальной жидкости они составили для гепатита В 276 единиц и 1,26 г/л; сифилиса – 332 ед., и 1,50 г/л; для ВИЧ-инфекции – 439 ед. и 2,00 г/л; гепатита С 1558 ед. и 13,00 г/л. В крови нижние границы термочаса и свободного гемоглобина для гепатита В составили 116 единиц и 1,9 г/л; ВИЧ 220 ед. и 3,3 г/л; сифилиса 266 ед. и 4,2 г/л; гепатита С 1558 ед. и 150,00 г/л. В практическом плане, если отсутствуют другие противопоказания, можно полагать, что ниже этих цифр ткани трупа-донора следует считать пригодными для трансплантации, выше – нет.

Использование термочаса и уровня свободного гемоглобина выявило четкую очередность возникновения сомнительных реакций при использовании предложенных тест-систем. Для диагностики гепатита В появление таких тест-

систем в крови и перикардиальной жидкости отмечалось после наступления смерти соответственно через 6,4 ч и 15,3 ч; сифилиса через 14,7 ч и 18,4 ч; ВИЧ 12,2 ч и 24,3 ч. Определение гепатита С сомнительными реакциями в крови и перикардиальной жидкости не сопровождалось. На способ определения вышеперечисленных инфекций в перикардиальной жидкости получено положительное решение о выдаче патента РФ Регистрационный № 2006129734. Применение данной технологии в «РНИИТО им. Р.Р.Вредена Росмедтехнологий» позволило снизить с 35,2% до 11,4% выбраковки трансплантологического материала.

Выводы

1. Визуальный гемолиз крови не является абсолютным показателем непригодности тканей трупов-доноров для трансплантации, если проведенные у них исследования крови и перикардиальной жидкости не выявили маркеров инфекционных заболеваний гепатитами В и С, а также ВИЧ и сифилиса.

2. Предлагаемые тест – системы при гемолизе могут быть использованы для диагностики гепатита В, С, ВИЧ и сифилиса на трупном материале только с учетом термочаса и концентрации свободного гемоглобина.

3. По сравнению с кровью в перикардиальной жидкости уровень свободного гемоглобина ниже и он нарастает медленнее, что при серологических исследованиях проявляется меньшим количеством сомнительных реакций, которые появляются позже.

4. Алгоритм определения маркеров инфекционных заболеваний в крови и перикардиальной жидкости, учитывая установленные в работе время их появления, должен быть следующим: гепатит В, сифилис, ВИЧ, гепатит С.

5. Разработанная тест-система оказалась эффективной во всех случаях, когда результаты исследований крови у трупов-доноров традиционным способом оказались сомнительными из-за гемолиза.

Литература

- Борт, Г.С. Сложности при заготовке сухожильных биотрансплантатов / Г.С. Борт, И.Н. Иванов // Труды Петербургского научного общества судебных медиков. – СПб., 2007. – Вып. 9. – С. 185-187.
- Вялков, А.И. Инструкция по медицинскому освидетельствованию доноров крови, плазмы, клеток крови / А.И. Вялков. – М., 1998. – 14 с.
- Генкин, А.А. Новая информационная технология анализа медицинских данных (программный комплекс ОМИС) / А.А. Генкин. - СПб.: Политехника, 1999. – 319 с.
- Гублер, Е.В. Информатика в патологии, клинической медицине и педиатрии / Е.В. Гублер. – Л.: Медицина, 1990. – 175 с.
- Кононенко, В.И. Комплексное физико-химическое исследование трупных пятен: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Кононенко В.И. – Киев., 1971. – 31 с.
- Коровин, А.А. Комплексная оценка морфологических и биофизических изменений тканей и органов трупа при судебно-медицинской диагностике давности наступления смерти : автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Коровин А.А. – М., 2006. – 41 с.
- Лушников, Е.Ф. Аутолиз (Морфология и механизмы развития) / Е.Ф. Лушников, Н.А. Шапиро. - М., 1974. – 200 с.
- Масяго, А.В. Некоторые ошибки при постановке ИФА / А.В. Масяго // Информационно-методическое пособие. – Кольцово: ЗАО «Вектор-Бест», 2004. – 32 с.
- Покровский, В.В. ВИЧ-инфекция: клиника, диагностика и лечение / В.В. Покровский, Т.Н. Ермак, В.В. Беляева, О.Г. Юрин / под общ. ред. В.В. Покровского. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003. – 488 с.
- Резник, А.Г. Возможности микроскопический диагностики ишемической болезни сердца гнилостно измененных трупов / А.Г. Резник, И.Н. Иванов // Труды Петербургского научного общества судебных медиков. – СПб., 2007. – Вып. 9. – С. 164-166.
- Служба крови России на современном этапе / Е.А. Селиванов [и др.] // Трансфузиология. – 2005. – № 3. – С. 4-28.
- Challenges in the testing of non-heart-beating cadavers for viral markers: implications for the safety of tissue donors / D. Padley [et al.] // Cell. Tissue Bank. – 2005. – Vol. 6. – P. 171-179.
- Eastlund, D.T. Infectious disease transmission through cell, tissue and organ transplantation: reducing the risk through donor selection. Ell / D.T. Eastlund // Transplant. - 1995. – Vol. 4. – P 455-477.
- Suzutani, T. Studies on the estimation of the postmortem interval / T. Suzutani, H. Ishibashi, T. Takatori // Hokkaido Igaku Zasshi. – 1978. – Vol. 53. – P. 345-356.
- Stanworth, S.J. A UK Survey of virological testing of cadaver tissue donors / S.J. Stanworth, R.M. Warwick, M. Ferguson, J.A. Barbara // Vox Sanguinis. – 2000. – Vol. 79. – P. 227-230.
- The transmission of hepatitis C virus by tissue transplantation / E. Conrad [et al.] // J. Bone Joint Surg. – 1995. – Vol .77. – P. 214-224.