

УДК 577.112.083

**ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРОИЗВОДСТВА ПРЕПАРАТОВ АЛЬБУМИНА  
В ОТНОШЕНИИ ПАРВОВИРУСА В19**© 2012 г. *Е.В. Филатова, Н.В. Зубкова, Т.В. Короткова, С.А. Гальговская*Филиал НПО «Микроген»  
Нижегородское предприятие по производству бактериальных препаратов «ИмБио»

hbsantigen@yandex.ru

*Поступила в редакцию 22.11.2011*

Проведено модельное спиртовое фракционирование пулов плазмы, содержащих парвовирус В19. Показано распределение вирусной ДНК по стадиям получения альбумина. Определены уровни вирусной редукции для основных этапов производства. Доказана возможность получения из контаминированных пулов плазмы препарата, свободного от парвовируса В19, при условии использования дополнительных стадий вирусной инактивации/элиминации. Безопасность технологии получения альбумина подтверждена результатами исследования готовых препаратов, выпущенных на предприятии в период с 2008 по 2010 гг.

*Ключевые слова:* альбумин, фракционирование плазмы, вирусная безопасность, парвовирус В19, вирусная редукция.

**Введение**

Альбумин является одним из важнейших белков крови. Составляя основную часть плазменных белков (около 50%), альбумин обладает свойствами, благодаря которым он принимает значительное участие в обеспечении важнейших функций организма [1]. В связи с этим лечебные препараты альбумина нашли широкое применение в медицинской практике при заместительной терапии. Использование альбумина путем введения непосредственно в кровеносное русло предъявляет повышенные требования к обеспечению вирусной безопасности при производстве данного препарата с целью предотвращения гемотрансмиссивного инфицирования.

Существует несколько производственных способов выделения альбумина из плазмы крови: высаливание, фракционирование белков с помощью риванола, полиэтиленгликоля, этанола, а также хроматографическое разделение. Фракционирование этанолом используется как базисный метод при разделении белков крови. Модификации способа предусматривают только варьирование параметров процесса [1, 2]. Технологический процесс получения альбумина включает этапы, направленные на элиминацию/инактивацию патогенов, что обеспечивает определенный уровень вирусной редукции. Для вирусов гепатитов В, С и ВИЧ этот процесс хорошо изучен в модельных опытах и безопасность препаратов альбумина в отношении этих патогенов подтверждена многолетней практи-

кой клинического использования, в течение которой не было ни одного документально подтвержденного факта инфицирования реципиентов препарата [3, 4]. Однако в последнее время все большую озабоченность производителей вызывают так называемые «неактуальные» гемотрансмиссивные агенты, одним из которых является парвовирус В19 (PVB19).

Цель настоящей работы заключалась в оценке безопасности производства альбумина в отношении PVB19 и определении уровня редукции вирусной ДНК, обеспечиваемого отдельными стадиями технологического процесса.

**Экспериментальная часть**

Проводили модельное спиртовое фракционирование пулов плазмы ( $n = 20$ ), сформированных путем объединения равных объемов образцов плазмы крови здоровых доноров ( $n = 999$ ), не содержащих ДНК PVB19, и одного вируссодержащего образца с концентрацией ДНК PVB19 не менее  $10^{10}$  копий/мл.

Модельное фракционирование осуществляли по модифицированному методу Кона–Онкли в лабораторных условиях с использованием центрифуги с охлаждением «Optima L-90K» (производство «Beckman Coulter», США). На первой стадии проводили очистку плазмы от фибриногена. Для этого в модельные пулы вводили этанол до концентрации 8%, устанавливали температуру смеси  $-3^{\circ}\text{C}$  и  $\text{pH}$  6.8–7.2. Затем отделяли осадок фибриногена центрифугированием. На второй стадии при концентрации этанола 26%,

температуре  $-10^{\circ}\text{C}$  и  $pH$  7.0–7.2 проводили разделение глобулинов и альбумина. Полученный центрифугат А очищали от примесных белков. Использовали ультрафильтрацию для удаления этанола и концентрирования раствора. Препарат подвергали осветляющей и стерилизующей фильтрации и прогревали при температуре  $60^{\circ}\text{C}$  в течение 10 ч в присутствии каприлата натрия в качестве стабилизатора.

Образцы пулов плазмы, центрифугата А, растворов альбумина, полученных при модельном фракционировании и отобранных после стадии пастеризации, а также готовые препараты «Альбумин, раствор для инфузий 10%» ( $n = 82$ ), выпущенные на филиале ФГУП «НПО «Микроген» «Нижегородское предприятие по производству бактериальных препаратов «ИмБио» в период с 2008 по 2010 гг., тестировали на наличие ДНК РVВ19. Вирусную ДНК экстрагировали с использованием набора реагентов «Рибосорб» (производство ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, г. Москва). Очищенную ДНК амплифицировали с помощью комплекта реагентов для выявления и количественного определения ДНК РVВ19 методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией результатов в режиме реального времени «АмплиСенс *Parvovirus* В19-FL» с аналитической чувствительностью 400 копий/мл (производство ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, г. Москва).

Для оценки динамики изменения концентрации ДНК РVВ19 по стадиям процесса определяли уровень нагрузки вирусной ДНК ( $VL_{PVB19}$ ) в исходной плазме, полученных фракциях и готовых препаратах по формуле:

$$VL_{PVB19} = V \times C,$$

где  $VL_{PVB19}$  – уровень нагрузки вирусной ДНК, выраженный в копиях,  $V$  – объем исследуемого материала (мл),  $C$  – концентрация ДНК РVВ19 в исследуемом материале (копий/мл) или аналитическая чувствительность тест-системы, в случае получения отрицательного результата тестирования.

Для удобства статистической обработки все результаты выражали в логарифмическом масштабе.

Для основных стадий технологического процесса определяли фактор редукции вирусной ДНК ( $RF$ ) относительно предыдущего этапа по формуле:

$$RF = \lg \frac{VL_{PVB19}(1)}{VL_{PVB19}(2)},$$

где  $RF$  – фактор редукции,  $VL_{PVB19}(1)$  – уровень нагрузки вирусной ДНК в материале с предыдущей стадии,  $VL_{PVB19}(2)$  – уровень нагрузки

вирусной ДНК в материале, полученном на исследуемой стадии.

Статистическую обработку данных проводили с применением программного обеспечения *Microsoft Excel*.

### Результаты и их обсуждение

Фракционирование плазмы крови этиловым спиртом по Кону является основным способом, используемым для промышленного получения препаратов альбумина. Процесс предусматривает объединение плазмы от большого числа доноров в производственные пулы, что обуславливает потенциальный риск контаминации этих пулов РVВ19. Зарубежными исследователями было показано, что около 60% стартовых загрузок содержат ДНК РVВ19 [5, 6], что предполагает возможность попадания РVВ19 в готовые препараты. Современные технологии включают дополнительные стадии, позволяющие удалять и инактивировать вирусы в процессе производства. Для оценки роли отдельных технологических стадий получения альбумина проведено модельное фракционирование контаминированных пулов плазмы в лабораторных условиях по модифицированному методу Кона–Онкли, а также воспроизведены дополнительные стадии вирусной инактивации/элиминации с использованием каприлата натрия.

Концентрация ДНК РVВ19 в модельных пулах составляла в среднем  $\lg(8.31 \pm 0.17)$  копий/мл. В процессе спиртового фракционирования происходило изменение содержания ДНК РVВ19 относительно исходных пулов плазмы, и средняя концентрация вирусного генома в центрифугате А, содержащем альбуминовую фракцию, составила  $\lg(4.55 \pm 0.22)$  копий/мл.

Однако полученные данные не позволяли объективно судить об уровне редукции вирусной ДНК, так как при фракционировании плазмы крови происходило изменение объемов за счет разбавления или концентрирования исходного материала. Поэтому необходимо было учитывать нагрузку ДНК РVВ19 ( $VL_{PVB19}$ ) на исследуемых стадиях и оценить динамику её изменения в процессе получения альбумина. Результаты проведенных исследований представлены на рисунке.

Как видно из рисунка, уровни нагрузки вирусной ДНК для исходных пулов плазмы и фракций альбумина составили  $\lg(10.31 \pm 0.17)$  и  $\lg(6.80 \pm 0.23)$  копий соответственно. При получении центрифугата А наблюдалось снижение нагрузки ДНК РVВ19 относительно исходной плазмы, обусловленное фракционным отделением. Это связано с тем, что в результате пре-

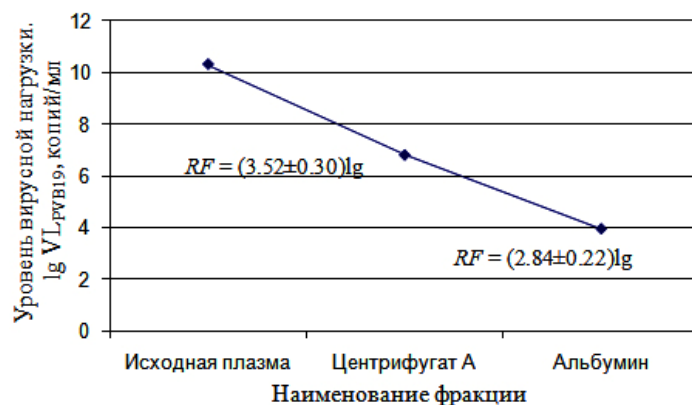


Рис. Динамика изменения уровня вирусной нагрузки PVB19 по стадиям получения альбумина

ципитации белков этанолом происходит распределение вирусных частиц между твердой и жидкой фазами, что приводит к редукации патогенов в целевом супернатанте [3]. Редуцирующий фактор на стадии формирования центрифугата А составил  $(3.52 \pm 0.30) \lg$ . Таким образом, полученные данные указывают, что спиртовое фракционирование вносит существенный вклад в снижение уровня вирусной нагрузки, но в отсутствие дополнительных стадий инактивации/элиминации не гарантирует безопасность препарата.

При исследовании образцов альбумина, полученных при модельном фракционировании, ДНК PVB19 не была выявлена. Фактор редукации на данном этапе по отношению к стадии образования центрифугата А составил  $(2.84 \pm 0.22) \lg$ . Несмотря на то, что данные зарубежных исследователей, полученные при валидации вирусинактивирующих методов с использованием парвовирусов животных в качестве модели PVB19, показали высокую резистентность вируса к физическим и химическим факторам воздействия [7], нами была доказана эффективность совокупности используемых в технологии производства альбумина стадий инактивации/элиминации в отношении PVB19.

Таким образом, на примере моделирования технологического процесса получения альбумина нами продемонстрировано, что снижение вирусной нагрузки происходило по двум основным механизмам: фракционному отделению и инактивации/элиминации. Суммарный уровень редукации ДНК PVB19 при производстве альбумина составил  $(6.36 \pm 0.17) \lg$ .

Для подтверждения безопасности технологии выделения альбумина из плазмы крови с помощью модифицированного метода спиртового фракционирования по Кону–Онкли в отношении PVB19 были протестированы 82 серии препарата «Альбумин, раствор для инфузий 10%», выпущенные на предприятии в период с

2008 по 2010 гг. Ни в одной из серий ДНК PVB19 не была выявлена. Аналогичные результаты были получены зарубежными исследователями при анализе 29 партий альбумина [8].

Однако, учитывая высокую частоту контаминации производственных пулов плазмы PVB19, возможность получения препарата, содержащего вирусный геном, остается. При этом важную роль могут сыграть различия в технологии получения альбумина, вариациях параметров процесса и составе композиционных материалов, используемых в качестве белковых протекторов, поскольку они могут оказывать существенное влияние на кинетику инактивации/элиминации [9, 10].

Сообщается о выявлении ДНК PVB19 в 4 из 51 и в 3 из 12 партий альбумина в диапазоне концентраций  $10^2$ – $10^3$  копий/мл [5, 11]. Несмотря на то, что содержание вирусного генома в исследованных препаратах не превышало установленный для PVB19 уровень инфекционности, равный  $10^4$  копий/мл [12], до сих пор нет объективной информации о величине инфицирующей дозы PVB19, которая зависит не только от концентрации вирусной ДНК, но и от объема вводимого препарата, а также иммунного статуса реципиента [13]. В связи с этим риск передачи PVB19 через препараты крови должен рассматриваться, особенно для потребителей из групп риска, таких как пациенты с гематологическими проблемами различной этиологии (серповидноклеточная анемия, талассемия, сфероцитоз и т.д.), иммунодефицитными состояниями и беременные [14].

### Заключение

На основании полученных данных можно сказать, что технология получения альбумина способна обеспечить вирусную редукацию, гарантирующую безопасность препарата в отношении PVB19. Однако из-за вариаций в спосо-

бах производства, в составе композиционных материалов и в используемых дополнительных стадиях вирусной инактивации/элиминации возможность получения препаратов, контаминированных PVV19, сохраняется. Для снижения остаточного риска вирусной трансмиссии необходима валидация каждой конкретной технологии получения альбумина, в ходе которой будут оценены эффективность элиминации и инактивации вирусов в процессе производства. Дополнительный уровень безопасности может быть обеспечен снижением концентрации вирусного генома в стартовых пулах путем введения количественного тестирования донорской плазмы на ДНК PVV19.

#### Список литературы

1. Русанов В.М., Левин И. Лечебные препараты крови. М.: ИД Медпрактика, 2004. 284 с.
2. Matejschuk P., Dash C.H., Gascoigne E.W. Production of human albumin solution: a continually developing colloid // Br. J. Anaesth. 2000. V. 85. P. 887–895.
3. Колюхов А.В., Астахов А.В., Бартновскис Э., Русанов В.М. Качество и безопасность – основа эффективности производства препаратов крови. М.: ИД Медпрактика-М, 2010. 256 с.
4. Левин И., Русанов В.М. Служба крови и препараты крови (Международный аналитический обзор). М.: ИД Медпрактика-М, 2007. 316 с.
5. Saldanha J., Minor P. Detection of human parvovirus B19 DNA in plasma pools and blood products derived from these pools: implication for efficiency and consistency of removal of B19 DNA during manufacture // Br. J. Haematol. 1996. V. 93. № 3. P. 714–719.
6. Blümel J., Burger R., Drosten C. et al. Parvovirus B19-Revised // Transfus. Med. Hemother. 2010. V. 37. № 6. P. 339–350.
7. Brown K.E., Young N.S., Alving B.M. et al. Parvovirus B19: implication for transfusion medicine. Summary of a workshop // Transfusion. 2001. V. 41. № 1. P. 130–135.
8. Lefrere J.-J., Mariotti M., de la Croix I. et al. Albumin batches and B19 parvovirus DNA // Transfusion. 1995. V. 35. № 5. P. 389–391.
9. Hattori S., Yunori M., Urayama I. et al. Variability of parvovirus B19 to inactivation by liquid heating in plasma products // Vox. Sang. 2007. V. 92. № 2. P. 121–124.
10. Mani B., Gerber M., Lieby P. et al. Molecular mechanism underlying B19 virus inactivation and comparison to other parvoviruses // Transfusion. 2007. V. 47. № 10. P. 1765–1774.
11. Schmidt I., Blümel J., Seitz H. et al. Parvovirus B19 DNA in plasma pools and plasma derivatives // Vox. Sang. 2001. V. 81. № 4. P. 228–235.
12. Guidance for industry. Nucleic acid testing (NAT) to reduce the possible risk of human parvovirus B19 transmission by plasma-derivative products. <http://www.fda.gov/BiologicBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm> (дата обращения: 22.10.2010).
13. Doyle S., Corcoran A. The immune response to parvovirus B19 exposure in previously seronegative and seropositive individuals // J. Infect. Dis. 2006. V. 194. P. 154–158.
14. Corcoran A., Doyle S. Advances in the biology, diagnosis and host-pathogen interaction of parvovirus B19 // J. Med. Microbiol. 2004. V. 53. P. 459–475.

#### SAFETY ASSESSMENT OF ALBUMIN PREPARATIONS MANUFACTURING WITH RESPECT TO PARVOVIRUS B19

*E.V. Filatova, N.V. Zubkova, T.V. Korotkova, S.A. Gal'govskaya*

We have carried out model ethanol fractionation of plasma pools containing parvovirus B19 to determine viral DNA distribution over albumin manufacturing stages. The purpose of the study was to evaluate the efficacy of ethanol fractionation at additional stages for the removal/inactivation of parvovirus B19 during the manufacturing of albumin. The safety of albumin production technology has been confirmed by the results of the study of albumin preparations manufactured during 2008-2010.

*Keywords:* albumin, plasma fractionation, viral safety, parvovirus B19, viral reduction.