

УДК 578.72+571.27

*Вирусная безопасность препаратов крови*

Грегирчак Наталья Николаевна, Лыч Инна Валентиновна

*Аннотация:*

В работе рассматривается вопрос обеспечения вирусной безопасности препаратов крови. Определяли надежность и корректность использования метода полимеразной цепной реакции в ходе производства препаратов крови, оценивали качество сырья для их производства. Проведено определение контаминации сырья (плазмы и осадков) и промежуточных продуктов методом ПЦР на содержание нуклеиновой кислоты парвовируса В19, вируса гепатита В, вируса гепатита С с целью подтверждения возможности использования вышеприведенных методик для обеспечения качества препаратов крови.

*Ключевые слова:* полимеразная цепная реакция, гемотрансмиссионные инфекции, парвовирус В19, вирус гепатита С, вирусная иннактивация.

Данные литературы свидетельствуют, что с каждым годом возрастает потребность в компонентах и препаратах крови, которая связана с увеличением количества сложных оперативных вмешательств на жизненно важных органах, дорожно-транспортных и техногенных катастроф, военных конфликтов, природных катаклизмов. Однако, в отличие от других лекарственных средств, использование препаратов крови может привести к заражению пациентов вирусными инфекциями, передаваемыми при гемотрансфузиях, вред от которых для здоровья пациента может значительно превысить клинический эффект от их применения [2].

Проблема вирусной безопасности препаратов крови и методические подходы к ее решению – один из наиболее актуальных вопросов, который длительное время обсуждается учеными, клиницистами и производителями лекарственных средств [1, 3 – 6]. Вирусы являются причиной контаминации сырья для производства препаратов крови. К таким наиболее опасным возбудителям относятся HCV, вирус гепатита В (*Hepatitis B Virus – HBV*) и вирус иммунодефицита человека (*Human Immunodeficiency Virus – HIV*). Сырье также может быть контаминировано негемотрансмиссионными вирусами, такими как парвовирус В 19 (*Parvoviruses B 19*) и вирус гепатита А (*Hepatitis A Virus – HAV*).

В большинстве случаев названные вирусы приводят к развитию в организме человека персистирующей или латентной инфекции, которая сопровождается невысоким уровнем содержания серологических маркеров в плазме, и соответственно, длительным периодом иммунологического «окна». Протекание инфекции в серонегативном периоде не позволяет установить наличие возбудителя в плазме методом иммуноферментного анализа (ИФА). В связи с этим в Европейских странах введена обязательная карантинизация

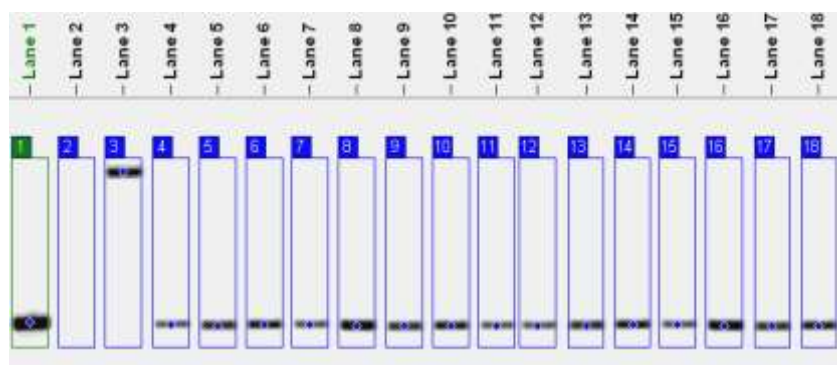
плазмы и анализ на содержание РНК HCV в первых производственных пулах донорской плазмы методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Относительно состояния отечественной заготовки сырья для производства препаратов крови, следует обратить внимание на недостаточность мер предупреждения контаминации плазмы. Основными мероприятиями остаются скрининг плазмы доноров методом ИФА, который имеет ряд технических и статистических ограничений, и ее карантинизация в течение 6 месяцев, которую центры крови не в состоянии обеспечить в полном объеме.

*Цель работы* – определить надежность и корректность использования метода полимеразной цепной реакции в производстве препаратов крови; оценить качество сырья для производства препаратов крови от отечественных и европейских станций переливания крови.

### *Результаты и обсуждение*

*ПЦР–анализ на содержание нуклеиновой кислоты парвовируса В19.* Для ПЦР анализа использовали следующие наборы: набор для выделения НК – "GenePak", набор для амплификации – "GenePакм В19. В ходе эксперимента исследовано 8 образцов сырья – фракции II+III и IV (осадков фракций плазмы). Результаты ПЦР регистрировали с помощью электрофореграммы полученных ампликонов (рис. 1).



*Рис. 1. Электрофореграмма результатов полученных ампликонов на содержание ДНК парвовируса В19:*

- 1-отрицательный контроль;
- 2- контроль на контаминацию амплификонамы;
- 3 - положительный контроль;
- 4 - 11-образцы сырья (осадков фракций плазмы).

Интерпретация полученных данных представлена в табл.1.

*Таблица 1*

### *Интерпретация полученных результатов*

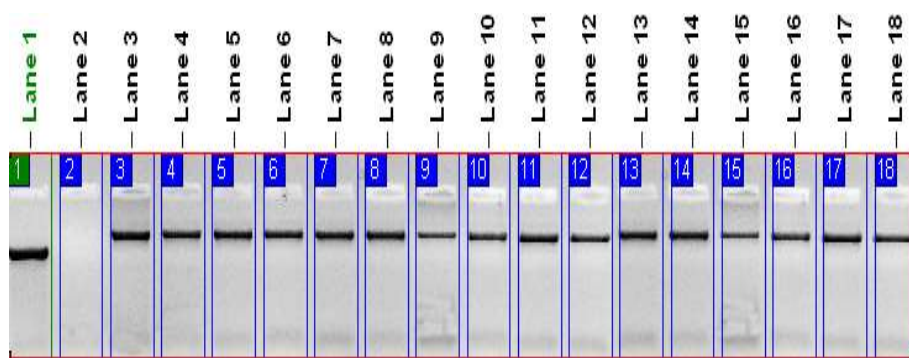
<b>№ дорожки</b>	<b>Исследуемый образец</b>	<b>Контрольные образцы</b>	<b>Результат</b>
------------------	----------------------------	----------------------------	------------------

1	-	K <sup>-</sup>	Отрицательный
2	-	Контроль на контаминацию	Ампликоны не обнаружено
3	-	K <sup>+</sup>	Положительный
4	1	-	Отрицательный
5	2	-	Отрицательный
6	3	-	Отрицательный
7	4	-	Отрицательный
8	5	-	Отрицательный
9	6	-	Отрицательный
10	7	-	Отрицательный
11	8	-	Отрицательный

Итак, по результатам данного исследования можно сделать вывод: сырье не контаминированное нуклеиновыми кислотами парвовируса В19 и его возможно использовать в производстве.

*ПЦР-анализ на содержание нуклеиновой кислоты вируса гепатита В.* Для ПЦР анализа использовали следующие наборы: набор для выделения НК "АмплиСенс"; набор для амплификации "АмплиСенстм HBV-470 / РКО-770". При проведении данного опыта было выделено ДНК из образцов, сделана амплификация ДНК по методике и осуществлен электрофорез контрольных образцов.

В ходе эксперимента исследовано 8 образцов сырья (осадков фракций плазмы). Результаты ПЦР регистрировали с помощью электрофореграммы полученных ампликонов (рис.2).



*Рис. 2 Электрофореграмма результатов полученных ампликонов на содержание ДНК вируса гепатита В*

- 1-положительный контроль;
- 2- контроль на контаминацию ампликонамы;
- 3- отрицательный контроль;
- 4 - 11 - образцы сырья (осадков фракций плазмы).

Интерпретация полученных данных представлена в табл. 2.

Таблица 2

*Интерпретация полученных данных*

№ дорожки	Исследованный образец	Контрольные образцы	Результат
1	-	К+	Положительный
2	-	Контроль на контаминацию	Ампликоны не обнаружены
3	-	К-	Отрицательный
4	1	-	Отрицательный
5	2	-	Отрицательный
6	3	-	Отрицательный
7	4	-	Отрицательный
8	5	-	Отрицательный
9	6	-	Отрицательный
10	7	-	Отрицательный
11	8	-	Отрицательный

Длина амплифицированных специфических фрагментов ДНК:

– вируса гепатита В (HBV) – 470 п.н.

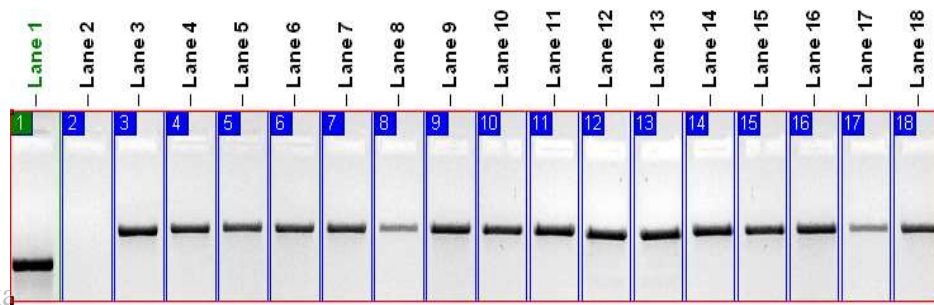
– внутреннего контрольного образца – 570 п.н.

Итак, по результатам данного исследования можно сделать вывод: сырье не контаминировано нуклеиновыми кислотами вируса гепатита В и разрешено для использования в производстве.

*ПЦР-анализ на содержание нуклеиновой кислоты вируса гепатита С.* Для ПЦР анализа использовали следующие наборы: "РИБО-сорб для выделения РНК/ДНК сорбцией на силикагеле", Реверта-L-100 для обратной транскрипции РНК, набор для амплификации "АмплиСенс HCV-240 / РКО-440 ". Тест-система "АмплиСенс HCV-240 / РКО-440" предназначена для выявления РНК вируса гепатита С (HCV) методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Принцип тестирования: выделение тотальной РНК из плазмы крови совместно с внутренним контрольным образцом (ВКС); проведение реакции обратной транскрипции с последующей амплификацией кДНК.

В ходе эксперимента исследовано 8 образцов сырья (осадков фракций плазмы). Результаты ПЦР регистрировали с помощью электрофореграммы полученных ампликонов (рис.3).



*Рис. 3. Электрофореграмма результатов полученных ампликонов на содержание вируса гепатита С:*

- 1–положительный контроль;
- 2– контроль на контаминацию ампликонамы;
- 3– отрицательный контроль;
- 4 – 11–образцы сырья (осадков фракций плазмы).

Интерпретация полученных данных представлена в табл.3.

*Таблица 3*

*Интерпретация полученных результатов*

<b>№ дорожки</b>	<b>Исследуемый образец</b>	<b>Контрольные образцы</b>	<b>Результат</b>
1	-	К+	Положительный
2	-	Контроль на контаминацию	Ампликоны не обнаружено
3	-	К <sup>-</sup>	Отрицательный
4	1	-	Отрицательный
5	2	-	Отрицательный
6	3	-	Отрицательный
7	4	-	Отрицательный
8	5	-	Отрицательный
9	6	-	Отрицательный
10	7	-	Отрицательный
11	8	-	Отрицательный

Длина амплифицированных специфических фрагментов РНК:

- вируса гепатита С – 240 п. н.
- внутреннего контрольного образца – 440 п. н.

Итак, по результатам данного исследования можно сделать вывод: сырье не контаминировано нуклеиновыми кислотами вируса гепатита С и может использоваться в производстве.

*Сравнительная оценка качества сырья по показателю контаминации вирусом гепатита С от отечественных и европейских СПК.* Обнаружение РНК вируса гепатита С проводили методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с использованием внутреннего контрольного образца РНК (ВКО РНК). Для проведения анализа использовали тест-систему "АмплиСенс HCV-240 / РКО-440".

Для анализа были взяты по 5 образцов различных поставок осадков иммуноглобулинов от отечественных и европейских СПК. В результате проведения анализа осадков плазмы методом ПЦР были получены следующие результаты (рис. 4, рис. 5). На рис. 4 показана

электрофореграмма продуктов ПЦР-реакции на содержание РНК ВГО, полученных от отечественных СПК.

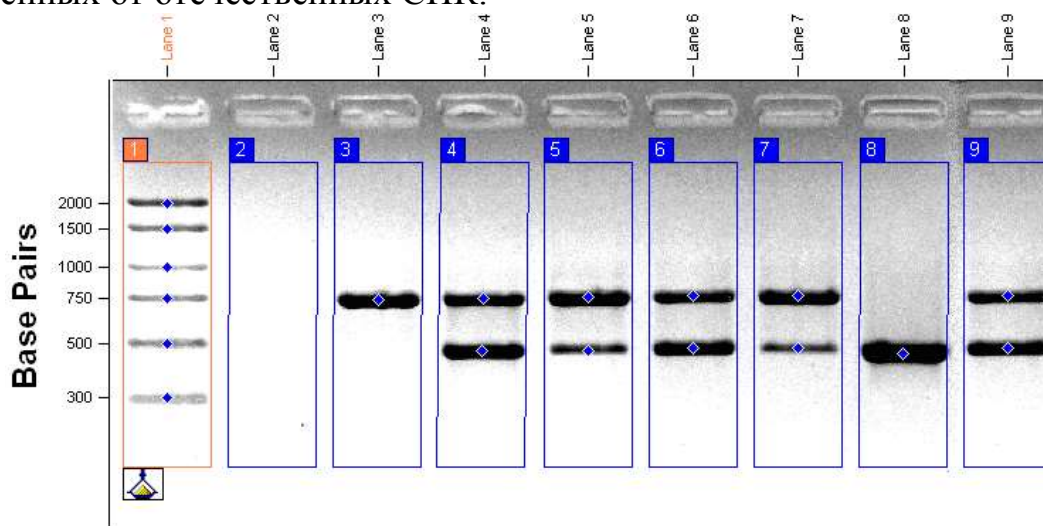
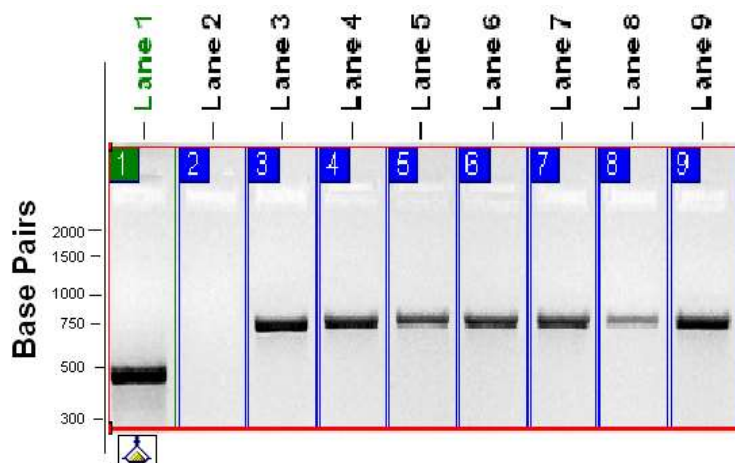


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов ПЦР-реакции на содержание РНК ВГО:

- 1–маркер количества пар нуклеотидов ДНК 2000 п.н., 1500 п.н., 1000 п.н., 750 п.н., 500 п.н., 300 п.н.);
- 2– контроль на контаминацию амплификонамы;
- 3– отрицательный контроль;
- 4– положительный контроль;
- 5–9 – положительные осадки иммуноглобулинов на содержание РНК, полученные от отечественных центров крови.

Полученные результаты следует считать корректными по следующим соображениям. Так, осадок II+III, весом 1 кг, получается примерно из 300 индивидуальных порций плазмы. Аналитическая чувствительность использованной ПЦР-тест-системы составляет не менее 5 тыс. копий вирусной РНК в 1 мл пробы (в нашем случае осадка разбавленного 1/5). Итак, вероятно, что одна из ста индивидуальных порций плазмы, использованных для получения осадка указанного веса, содержит в 1 мл не менее 300 тыс. копий РНК вируса гепатита С. Такое количество РНК вируса находится в высоком клинически значимом диапазоне, что может свидетельствовать об отборе плазмы у донора в период иммунологического "окна".

На рис. 5 представлена электрофореграмма продуктов ПЦР-реакции на содержание РНК ВГО, полученных из центра заготовки плазмы "Immuna" (Словакия). Это сырье соответствует требованиям Европейской Фармакопеи и прошло процедуру лабораторного контроля при регистрации на территории Украины. Забор такой плазмы проводится в пластиковую тару – гемоконы, которые маркируются в соответствии с международными требованиями. Соответствуют европейским требованиям также и контроль плазмы на гемотрансмиссионные инфекции, критерии ведения сопроводительной документации, условия транспортировки и т.п.



*Рис. 5. Электрофореграмма продуктов ПЦР-реакции на содержание РНК ВГО:*

- 1–положительный контроль;
- 2– контроль на контаминацию амплификонамы;
- 3 –отрицательный контроль;
- 4–9 – негативные осадки иммуноглобулинов на содержание РНК, полученные от европейского центра крови.

Итак, сырье от европейской СПК не контаминировано нуклеиновыми кислотами вируса гепатита С и разрешено для использования в производстве.

Таким образом, в данной работе мы попытались показать, что на данном этапе развития ПЦР является самым чувствительным и специфическим методом прямого обнаружения вирусов и может быть инструментом верификации результатов ИФА или дополнять его.

*Обеспечение вирусной безопасности препаратов крови на примере производства иммуноглобулина человека нормального.* Схема производства иммуноглобулина человека нормального представлена на рис. 6. Контрольные точки вирусной контаминации следующие:

- плазма;
- первые гомогенные загрузки;
- полуфабрикат иммуноглобулина;
- готовые формы.

Сначала из плазмы с помощью спиртового осаждения и фракционирования получают осадок иммуноглобулина II+III. Далее препарат иммуноглобулина получают путем концентрирования фракции II+III спиртовым методом по Кону, ультрафильтрацией при величине рН 3,5 – 5,0, отмыванием от этанола, заключительного концентрирования раствора.

Последующее восстановление гидратных оболочек иммуноглобулина проводят методом молекулярной фильтрации путем создания градиента концентрации за счет введения в раствор иммуноглобулина низкомолекулярного вещества в концентрации 0,1 – 2,5 масс. %, с использованием воды очищенной (рН от 3,8 до 4,5), затем добавляют

стабилизатор и устанавливают рН 3,5 – 5,0. В конце очистки проводят стерилизующую фильтрацию, и при необходимости полученный препарат сублимац

Плазма
Сохранение t= -30°C
Размораживание
I спиртовое осаждение
Центрифугирование
II спиртовое осаждение
Центрифугирование
Осадок А (II+III)
Разведение
Спиртовое осаждение
Центрифугирование
Осадок Б
Разведение
Спиртовое осаждение
Центрифугирование
Центрифугат
Титрование
Перемешивание/отстаивание
Центрифугирование
Титрование
Спиртовое осаждение
Центрифугирование
Осадок В
Разведение
С/D иннаktivация вирусов
Ультрафильтрация
Формуляция
Стерилизационная фильтрация
Наполнение и запаивание ампул
Проверка на герметичность



Рис. 6. Технологическая схема производства Ig G человека нормального

Полученный препарат иммуноглобулина для внутривенного введения имеет показатель прозрачности раствора менее 0,01 и содержит мономерный иммуноглобулин G более 97% при полном отсутствии полимерных форм, белок от 4,5 до 11% и хлорид натрия – не более 0,3%.

*Выводы.* 1. Показано, что качество препаратов крови должно обеспечиваться в течение всего технологического процесса благодаря тщательно разработанной системе контроля качества. Она состоит из входного контроля сырья, межоперационного контроля производственного процесса и контроля готовой продукции.

2. Установлено, что использование метода полимеразной цепной реакции при производстве препаратов крови является целесообразным и корректным путем предотвращения вирусной безопасности препаратов крови.

3. Представлено применение методик ПЦР в ходе производства препарата «иммуноглобулин человека нормальный». Дана схема получения препарата с контрольными точками определения вирусной контаминации.

#### Список литературы:

1. Курищук К. В., Куркіна О. В., Самойленко В. А., Скринник М. М. Деякі аспекти якості та вірусної безпеки препаратів крові, впроваджені на ЗАТ «Біофарма» // Укр. журн. клінічної та лабораторної медицини. – 2012. - № 2 (1). – С. 59 – 64.

2. Перехрестенко П.М., Назарчук Л.В. Служба крові України: підсумки та завдання // Український медичний часопис. – 2006. - № 4 (54). – С. 7 – 8.

3. Тимченко А.С. Вірусна безпека трансфузії крові, клітинних компонентів та білкових препаратів// Гематологія і трансфузіологія. – 2000. - №1. – С. 48 – 52.

4. Тимченко А.С., Сергутина С.Ю. Безопасность гемотрансфузий: проблемы карантинизации, вирусиактивации и донорства // Укр. журн. гематології та трансфузіології. – 2003. - № 5 (3). – С. 44 – 49.

5. Oubreak of hepatitis C associated with intravenous immunoglobulin administration – United States, 1. October 1993 – June 1994. - MMWR Morb Mortal Wkly Rep. – 1994. – 43. – С. 505 – 509.

6. Slade H.B. Human immunoglobulins for intravenous use and hepatitis C viral transmission // Clin. diagn. lab. immunol. – 2004. - № 1. – P. 613 – 619.

### Spisok literatury

1. Kuryshchuk K. V., Kurkina O. V., Samoylenko V. A., Skrynnyk M. M. Deyaki aspekty yakosti ta virusnoyi bezpeky preparativ krovi, vprovadzheni na ZAT «Biofarma» // Ukr. zhurn. klinichnoyi ta laboratornoyi medytsyny. – 2012. - № 2 (1). – S. 59 – 64.
2. Perekhrestenko P.M., Nazarchuk. L.V. Sluzhba krovi Ukrayiny: pidsumky ta zavdannya // Ukrayins'kyi medychnyy chasopys. – 2006. - № 4 (54). – S. 7 – 8.
3. Tymchenko A.S. Virusna bezpeka transfuziyi krovi, klitynnykh komponentiv ta bilkovykh preparativ// Hematolohiya i transfuziolohiya. – 2000. - № 1. – S. 48 – 52.
4. Tymchenko A.S., Serhutyna S.Yu. Bezopasnost' hemotransfuzyy: problemy karantynyzatsyy, virusynaktyvatsyy y donorstva // Ukr. zhurn. hematolohiyi ta transfuziolohiyi. – 2003. - № 5 (3). – S. 44 – 49.
5. Oubreak of hepatitis C associated with intravenous immunoglobulin administration – United States, 1. October 1993 – June 1994. - MMWR Morb Mortal Wkly Rep. – 1994. – 43. – C. 505 – 509.
6. Slade H.B. Human immunoglobulins for intravenous use and hepatitis C viral transmission // Clin. diagn. lab. immunol. – 2004. - № 1. – P. 613 – 619.