

Экспериментальное изучение эффективности удаления вирусов гепатитов В, С и парвовируса В19 при фракционировании плазмы крови этиловым спиртом

Н. В. Зубкова, М. М. Кузнецова, С. В. Зубов, Е. В. Филатова, М. Ю. Опалева

Федеральное государственное унитарное предприятие
«Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Поступила 19.11.2016. Принята к публикации 17.02.2016.

Цель исследования заключалась в оценке эффективности удаления нуклеиновых кислот (НК) вирусов гепатитов В (ВГВ), С (ВГС) и парвовируса В19 (В19V) из фракций плазмы, полученных методом спиртового разделения. Исследования выполнены в модельном эксперименте путем фракционирования в лабораторных условиях нормального пула донорской плазмы, контаминированного вирусосодержащими образцами. Установлено, что многостадийный процесс выделения фракции II, предназначенной для получения иммуноглобулина G, обеспечивал элиминацию НК ВГВ и ВГС до неопределяемого методом ПЦР уровня, при этом суммарный фактор редукции по сравнению с исходной плазмой составил для ДНК ВГВ $>5,35 \lg$, РНК ВГС $>4,84 \lg$. Фактор редукции ДНК В19V был на уровне $4,56 \lg$ (CI 4,49–4,63). При получении фракции V (для альбумина) фактор редукции исследуемых вирусов был $>3,0 \lg$, что в совокупности с дополнительными стадиями очистки обеспечивает надежный уровень безопасности. При выделении фракции I эффективность элиминации ДНК ВГВ и ДНК В19V была менее 2, РНК ВГС – менее 3 порядков, что недостаточно, чтобы признать стадию надежной. Экспериментально подтверждено, что при высоком риске контаминации производственных пулов парвовирусом В19 дополнительные меры безопасности необходимы, включая обязательное исследование плазмы на ДНК В19V. В целом, при разработке полного цикла производства препаратов из плазмы крови доноров базовый процесс спиртового фракционирования необходимо дополнять валидованными стадиями инактивации и элиминации вирусов с учетом остаточного риска контаминации сырья патогенными агентами.

Ключевые слова: препараты из плазмы крови; фракции плазмы; вирусная безопасность; спиртовое фракционирование; инактивация вирусов; нуклеиновые кислоты; концентрация вирусов (C); вирусная нагрузка (VL); фактор редукции (RF).

Библиографическое описание: Зубкова НВ, Кузнецова ММ, Зубов СВ, Филатова ЕВ, Опалева МЮ. Экспериментальное изучение эффективности удаления вирусов гепатитов В, С и парвовируса В19 при фракционировании плазмы крови этиловым спиртом. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16 (1): 43–48.

Препараты из плазмы крови человека относятся к классу важнейших лекарственных средств, используемых часто как единственный способ профилактики и терапии опасных для жизни заболеваний, обусловленных травмами, врожденными патологиями, иммунологическими нарушениями и инфекциями. Многолетний опыт применения этих препаратов в клинической практике свидетельствует о высоком уровне их эффективности и безопасности. Однако риск передачи инфекций, особенно вирусных, является общей проблемой для всех биологических продуктов, изготовленных из сырья человеческого происхождения [1–3].

Вирусное загрязнение может возникнуть из-за нарушений в производственном процессе при использовании неэффективных технологий или несоблюдения правил надлежащей производственной практики (GMP). Вероятность контаминации сырья существенно увеличивается при формировании больших пулов плазмы, являющихся необходимым условием производства [3].

В Российской Федерации, как и в большинстве стран мира, с целью предупреждения передачи инфекций при гемотрансфузиях разработаны и действуют нормативные документы, регулирующие работу в области заготовки, контроля и переработки донорской плазмы. При производстве препаратов крови необходимо гарантировать не только сохранение структуры и функции белков крови, но также исключать контаминацию чужеродными агентами и

обеспечивать надежный уровень редукции патогенных агентов [4].

Метод фракционирования донорской плазмы этиловым спиртом считается основным при получении препаратов из плазмы крови и в сочетании с современными технологическими приемами очистки применяется большинством производителей [1–3].

Целью настоящей работы было в модельном эксперименте оценить эффективность удаления и распределения нуклеиновых кислот (НК) вирусов гепатита В (ВГВ), гепатита С (ВГС) и парвовируса В19 (В19V) в основных фракциях плазмы и определить вклад процесса спиртового фракционирования в суммарный уровень редукции патогенов и безопасность готовых лекарственных форм.

Материалы и методы

Исследования были выполнены на базе отделения НВ-диагностики цеха диагностических препаратов Нижегородского филиала ФГУП НПО «Микроген» (лицензия № 77.99.03.001.Л.000271.02.05).

Материалы. Объектом исследования была плазма для фракционирования, представляющая собой пул плазмы крови здоровых доноров, проверенных на отсутствие маркеров ВГВ, ВГС, В19V. Для контаминации использовались стандартные образцы (СО) ДНК ВГВ, ДНК парвовируса В19 и отраслевой стандартный образец (ОСО) РНК ВГС

42-28-366 (1)-11 П, представляющие собой лиофилизированную вирусосодержащую плазму, аттестованную по содержанию НК вирусов относительно стандартов В03 (WHO International Standard, 2nd Hepatitis B Virus (HBV) DNA International Standard, NIBSC code: 97/750; WHO International Standard, 3rd Hepatitis C Virus (HCV) RNA International Standard, NIBSC code: 60/100; 1st WHO International Reference Panel for Parvovirus B19 genotypes for NAT based assays», NIBSC code: 09/110).

Изготовлено 10 модельных пулов объемом 250 мл каждый путем объединения равных объемов плазмы крови здоровых доноров ($n = 999$), контаминированных реконструированными СО и ОСО в объемном соотношении 1/5–1/20.

Методы. Модельное фракционирование осуществляли по модифицированному методу Кона–Онклея в лабораторных условиях с использованием центрифуги с охлаждением Optima L-90K («Beckman Coulter», США). В контрольных точках модельного процесса измеряли объем полученных фракций и определяли концентрацию НК вирусов, используемых для контаминации.

На первом этапе выделяли фракцию I (осадок А8), предназначенную для получения фибриногена, при концентрации этилового спирта 8% и рН раствора 7,0–7,2. Затем при концентрации этилового спирта 26% и рН 7,0–7,2 выделяли фракцию II+III (осадок А) и фракцию V (центрифугат А). Фракция V была предназначена для дальнейшего получения альбумина.

Осадок А переосадили в тех же условиях и получали осадок А1. На следующем этапе при концентрации этилового спирта 17% и рН 5,3–5,4 получали фракцию III (осадок Б), содержащую иммуноглобулины классов G, А, М, β-глобулины.

После выделения осадка Б центрифугат доводили до рН 6,8 и осаждали 26% этиловым спиртом, получая осадок В (фракцию II/очищенный IgG). Схематично процесс спиртового фракционирования показан на рис. 1. Параметры процесса для лабораторного и производственного масштабов представлены в таблице 1.

Концентрацию ДНК ВГВ, РНК ВГС и ДНК В19В в исследуемых пробах определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией результатов в режиме

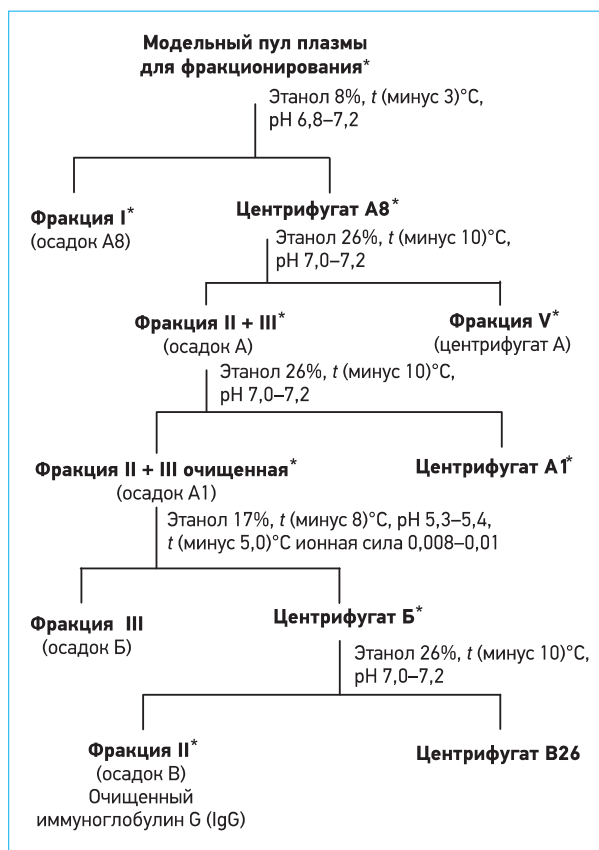


Рис. 1. Схема спиртового фракционирования донорской плазмы. Звездочкой (*) отмечены точки отбора проб.

реального времени с использованием коммерческих наборов производства ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора «АмплиСенс HCV/HBV/HIV-FL» (предел обнаружения РНК ВГС 100 МЕ/мл, ДНК ВГВ 50 МЕ/мл), «АмплиСенс HCV-Монитор-FL» (линейный диапазон измерения 300–1000000 МЕ/мл), «АмплиСенс HBV-Монитор-FL» (линейный диапазон измерения 150–1000000 МЕ/мл), «АмплиСенс Parvovirus B19-FL» (предел обнаружения 360 МЕ/мл; линейный диапазон измерения 720–9000000 МЕ/мл).

Таблица 1. Критические параметры процесса спиртового фракционирования для целевых фракций плазмы

№ п/п	Наименование фракции		Параметр процесса			
			рН	температура, °С	условия разделения	объем (масса) М + т
1	Осадок А8	П	6,5–8,0	минус (2,0–3,0)	Центрифугирование (30–70 л/ч) 15000 об/мин	3,03 кг
		М	6,8–7,2	минус (3,0–5,0)	Центрифугирование 6000 об/мин 30 мин	2,26 г
2	Осадок А / Центрифугат А	П	7,0–7,2	минус (2,0–10,0)	Выдерживание 1–5 ч Центрифугирование (30–70 л/ч) 15000 об/мин	13,5 кг / 465 л
		М	7,0–7,2	минус 10,0	Выдерживание 1 ч Центрифугирование 6000 об/мин 30 мин	11,85 г / 471,5 мл
3	Осадок А1	П	7,0–7,2	минус (9,5–10,5)	Выдерживание 1–2 ч Центрифугирование (30–70 л/ч) 15000 об/мин	12,0 кг
		М	7,0–7,2	минус 10,0	Выдерживание 0,5–1,0 ч Центрифугирование 6000 об/мин 30 мин	11,03 г
4	Осадок В (IgG)	П	6,6–6,8	минус (9,5–10,5)	Центрифугирование (18–25 л/ч) при 15000–25000 об/мин	3,7 кг
		М	6,6–6,7	минус 10,0	Центрифугирование 6000 об/мин 30 мин	3,94 г

Примечание. П — производственный процесс; М — модельный процесс.

Таблица 2. Характеристика вирусов для модельных опытов [5, 9, 10]

Вирус	Семейство	Геном	Оболочка	Размер, нм	Распространенность у доноров, %
Вирус гепатита В	Hepadnaviridae	dsДНК	Есть	40–45	0,15–1,16
Вирус гепатита С	Flaviviridae	ssРНК	Есть	40–50	0,33–2,45
Парвовирус В19	Parvoviridae	ssДНК	Нет	18–26	0,88–1,3

Вирусную нагрузку ($VL_{НК}$) определяли как произведение концентрации НК (C) на объем (массу) исследуемой фракции:

$$VL_{НК} = V(m) \cdot C,$$

где $VL_{НК}$ — уровень вирусной нагрузки, выраженный в МЕ; $V(m)$ — объем (мл) или масса (г) материала, исходного или полученного на стадиях модельного фракционирования; C — концентрация НК в исследуемом материале (МЕ/мл (г)) или аналитическая чувствительность тест-системы, в случае получения отрицательного результата тестирования.

Уровень (фактор) редуции (RF) оценивали по динамике изменения вирусной нагрузки ($VL_{НК}$) в целевых фракциях по отношению к исходному пулу. Для удобства статистической обработки результаты выражали в логарифмическом масштабе и рассчитывали по формуле [2]:

$$RF = \lg VL_{НК}(1) - \lg VL_{НК}(n),$$

где RF — фактор редуции; $VL_{НК}(1)$ — уровень вирусной нагрузки НК в исходном материале; $VL_{НК}(n)$ — уровень вирусной нагрузки НК в материале, полученном на исследуемой стадии.

Статистическую обработку данных проводили с применением программного обеспечения Microsoft Excel. Анализ данных по выборке проводили с помощью среднего значения при доверительном интервале (confidence interval, CI) 95%.

Результаты и обсуждение

В основе методологии настоящего исследования лежит добавление в пул плазмы здоровых доноров вирусосодержащего материала и оценка уровня редуции на каждой стадии при воспроизведении технологии в лабораторном масштабе.

Оптимально для контаминации использовать модельные вирусы, рекомендованные ВОЗ, и методы детекции, позволяющие оценивать инфекционность в опытах *in vitro* на культуре клеток или *in vivo* на лабораторных животных [2, 5, 6]. Однако вирусологические исследования являются трудоемкими и дорогостоящими. Учитывая механизм действия спиртового фракционирования, нам представлялось целесообразным применить для этой цели доступный метод полимеразной цепной реакции, позволяющий контролировать эффективность элиминации нуклеиновых кислот вирусов [5, 7].

Выбор вирусов для выполнения исследований был сделан, исходя из риска остаточного загрязнения производственных пулов, который для ВГВ и ВГС оцениваются как относительно высокий, а для В19V как очень высокий. Введение обязательного тестирования донорской плазмы на маркеры вирусов гепатитов В и С методом ПЦР позволило существенно снизить вероятность контаминации сырья данными патогенами, при этом возможный уровень

вирусной нагрузки в производственных пулах не может превышать 10^1 – 10^2 МЕ/мл [3]. В то же время отсутствие скрининга донаций на ДНК В19V приводит к тому, что вероятность загрязнения производственных пулов парвовирусом В19 достигает 60%, а концентрация НК в отдельных пулах может достигать 10^6 – 10^8 МЕ/мл [8].

Характеристика и свойства вирусов, используемых для модельных экспериментов, указаны в таблице 2.

Результаты распределения нуклеиновых кислот во фракциях плазмы, полученных на разных этапах спиртового фракционирования, представлены в таблице 3. В отдельных фракциях выявлено повышение концентрации вирусного генома в абсолютном значении. Однако эти данные не позволяют объективно судить о процессе, так как при фракционировании плазмы крови происходит изменение объема фракций за счет разбавления или концентрирования исходного материала. Поэтому результаты оценивали по уровню редуции (RF) с учетом суммарной вирусной нагрузки в исследуемых фракциях ($VL_{НК}$) (рис. 2).

Как видно из рисунка, при получении фракции I (осадка А8) уровень редуции, выраженный в десятичных логарифмах (\lg), для вирусов с липидной оболочкой (ВГВ и ВГС) составил 1,88 (CI 1,66–2,10) и 2,79 (CI 2,72–2,86) соответственно, а для парвовируса В19 (представителя вирусов без липидной оболочки) — 1,31 (CI 1,26–1,36).

На стадии получения центрифугата А, предназначенного для производства альбумина, редуцирующий фактор составил 3,07 \lg для ВГВ (CI 3,00–3,07), 3,09 \lg для ВГС (CI 3,04–3,14), 3,22 \lg (CI 3,14–3,30) для В19V.

Наиболее эффективное удаление вирусов наблюдалось при выделении осадка В, полученного путем многостадийного переосаждения осадка А. Редуцирующий фактор для ДНК ВГВ составил в этом случае более 5,35 \lg , для РНК ВГС более 4,84 \lg , для ДНК В19V 4,56 \lg (CI 4,49–4,63). Следует отметить, что вирусы удалялись главным образом на стадии получения осадка В из осадка А1, в то время как

Таблица 3. Средние значения концентрации нуклеиновых кислот ВГВ, ВГС, В19V в модельных пулах и фракциях плазмы, полученных при фракционировании этиловым спиртом

Наименование фракции	Среднее значение концентрации (C) НК вирусов, МЕ/мл (г)		
	ВГВ	ВГС	В19V
Пул плазмы	$(1,81 \pm 0,33) \cdot 10^5$	$(1,09 \pm 0,11) \cdot 10^5$	$(6,45 \pm 0,70) \cdot 10^6$
Осадок А8	$(2,76 \pm 0,92) \cdot 10^5$	$(1,97 \pm 0,16) \cdot 10^4$	$(3,50 \pm 0,27) \cdot 10^7$
Центрифугат А8	$(6,72 \pm 1,69) \cdot 10^4$	$(4,01 \pm 0,84) \cdot 10^3$	$(2,17 \pm 0,35) \cdot 10^6$
Центрифугат А	$(8,22 \pm 1,48) \cdot 10^1$	$(4,73 \pm 0,18) \cdot 10^1$	$(2,07 \pm 0,18) \cdot 10^3$
Осадок А	$(4,68 \pm 1,17) \cdot 10^5$	$(4,49 \pm 1,36) \cdot 10^5$	$(1,93 \pm 0,29) \cdot 10^7$
Осадок А1	$(2,88 \pm 1,22) \cdot 10^5$	$(4,00 \pm 1,03) \cdot 10^5$	$(8,59 \pm 0,60) \cdot 10^6$
Центрифугат Б	$5,00 \cdot 10^1$	$1,00 \cdot 10^2$	$(4,71 \pm 0,34) \cdot 10^2$
Осадок В/IgG	$5,00 \cdot 10^1$	$1,00 \cdot 10^2$	$(1,13 \pm 0,09) \cdot 10^4$

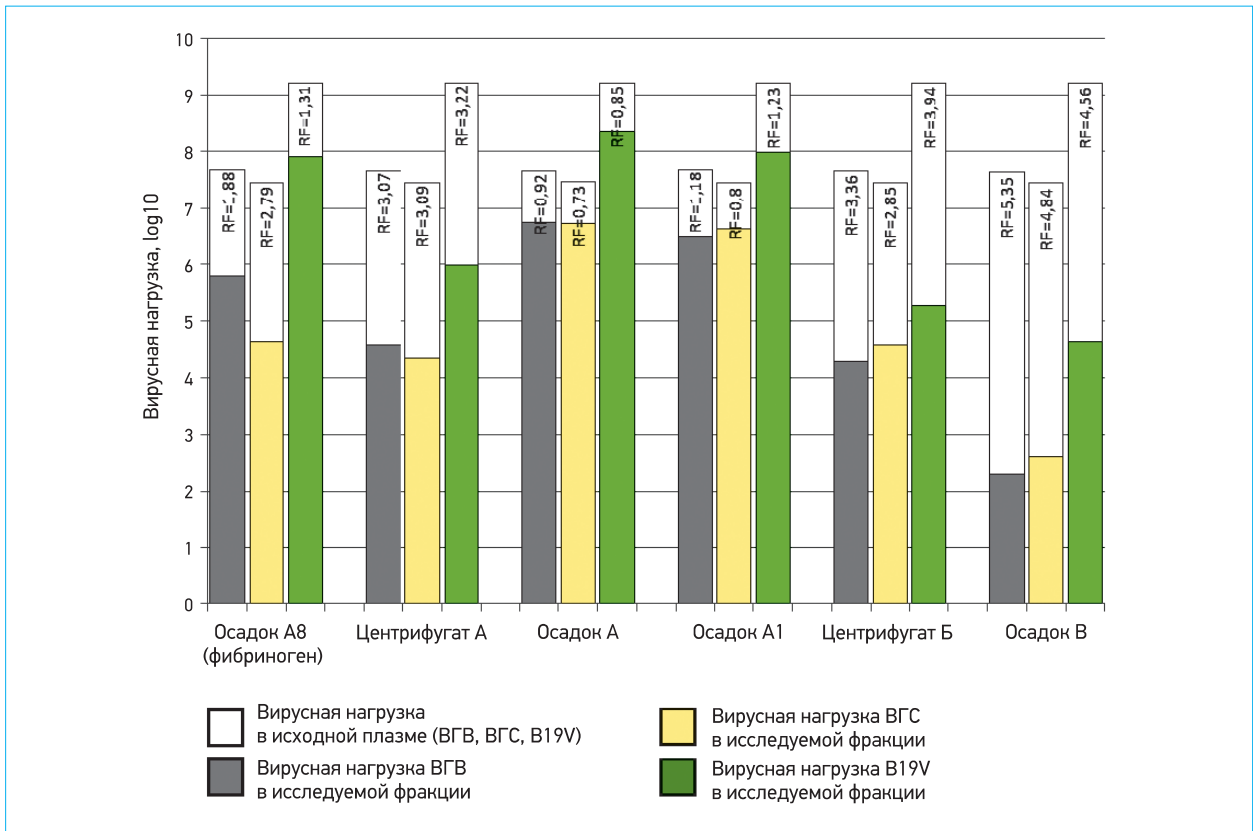


Рис. 2. Распределение НК вирусов гепатитов В, С, парвовируса В19 в основных фракциях плазмы при спиртовом фракционировании.

при получении осадков А и А1 не было выявлено значимого изменения вирусной нагрузки.

Таким образом, выполненные исследования позволили установить уровни редукции основных гемотрансмиссивных вирусов для целевых фракций плазмы и определить вклад соответствующих стадий в суммарный уровень безопасности препаратов, полученных из них.

Наиболее эффективным процесс спиртового фракционирования оказался для фракции II (осадка В), предназначенной для получения иммуноглобулина G. Достигнуто снижение концентрации НК более чем 10^4 – 10^5 раз как в отношении вирусов с липидной оболочкой, так и без нее, что в соответствии с критериями ВОЗ позволило считать стадию эффективной [5]. Более того, НК ВГВ и ВГС были удалены до неопределяемого методом ПЦР уровня, что позволило нам сделать заключение, что на стадии спиртового фракционирования обеспечивается надежное удаление ДНК ВГВ и РНК ВГС (с учетом имеющегося риска). Однако ситуация с парвовирусом В19 представляется неконтролируемой, поэтому уровень редукции В19V может быть недостаточным. По этой причине в Европейской фармакопее для производственных пулов плазмы для фракционирования установлен допустимый лимит содержания ДНК В19V, который не должен превышать 10^4 МЕ/мл [11].

Для фракции V установленный уровень редукции был немного ниже, рекомендованного ВОЗ (4 lg), однако роль спиртового фракционирования в безопасности альбумина, в целом, признана значительной. С учетом дополнительной очистки и пастеризации раствора с каприлатом натрия безопасность альбумина является доказанной, в

том числе опытом многолетнего клинического применения.

В отношении фракции I (осадка А8) процесс спиртового фракционирования признан был недостаточно эффективным. Уровень редукции исследуемых вирусов на этой стадии составил менее трех порядков, поэтому для использования этой фракции в производстве необходимы дополнительные меры безопасности.

В целом при разработке полного цикла производства препаратов из плазмы крови проблема безопасности должна рассматриваться как первоочередная задача. Необходимо учитывать все факторы риска, дополняя процесс валидированными стадиями инактивации и элиминации вирусов, а при необходимости дополнительными методами контроля сырья, исключая возможность формирования производственных пулов с высокой вирусной нагрузкой. В связи с этим, для гарантии безопасности компания «Микроген» при производстве препаратов крови, кроме спиртового фракционирования, применяет также дополнительные технологические приемы очистки и специальные методы инактивации вирусов, включая инкубацию при низком значении pH, сольвент-детергентную (СД) обработку и противовирусную фильтрацию, подтверждая каждую технологическую стадию в модельных опытах.

Выводы

1. В модельном эксперименте изучено распределение нуклеиновых кислот ВГВ, ВГС и В19V в основных фракциях плазмы, полученных при спиртовом фракционировании. Для фракций V и II, используемых в дальнейшем для производства альбумина и иммуноглобулина G, уровень

(фактор) редукции нуклеиновых кислот исследуемых вирусов составил 3–5 lg, что с учетом риска и в сочетании с дополнительными стадиями очистки и инактивации обеспечивает надежный уровень безопасности препаратов.

2. Полученные экспериментальные данные позволили косвенно оценить вклад процесса спиртового фракционирования в безопасность готовых препаратов из плазмы крови в отношении вирусов с различными свойствами, включая вирусы с РНК- и ДНК-геномом, а также с липидной оболочкой и без нее.

3. Для снижения остаточного риска вирусной трансмиссии базовый процесс спиртового фракционирования при производстве препаратов из плазмы крови необходимо дополнять специальными методами инактивации и элиминации вирусов, например, СД-обработкой, инкубацией при низком значении pH, тепловой обработкой, противовирусной фильтрацией, обработкой нуклеофильными агентами. Выбор методов инактивации в технологическом процессе должен осуществляться на основе анализа рисков и свойств продукта.

4. В отношении парвовируса В19 рекомендуется введение обязательного тестирования донорской плазмы, с целью исключения из процесса донаций с высокой концентрацией ДНК В19V.

Литература

1. Burnouf T. *Modern plasma fractionation*. *Transfus Med Rev.* 2007; **21**(2): 101–17.
2. CPMP/BWP/268/95 *Virus Validation Studies: the design contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses*. European Medicines Agency. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003684.pdf.

3. Зубкова НВ. Обеспечение инфекционной безопасности препаратов из плазмы крови доноров. *Гематология и трансфузиология* 2014; (2): 44–9.
4. *Общая фармакопейная статья «Лекарственные препараты из плазмы крови человека»*. Приказ Минздрава России № 768 от 21.11.2014. Available from: <http://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/11/materialy-po-deyatelnosti-deparatamenta/stranitsa-856/>.
5. WHO Guidance document on viral inactivation and removal procedure intended to assure the viral safety of blood plasma products. WHO Technical Report, Series № 924, Annex 4. 2004. Available from: http://www.who.int/bloodproducts/publications/WHO_TRS_924_A4.pdf?ua=1.
6. Dichtelmüller H, Flechsig E, Sananes F, Kretschmar M, Dougherty C. Effective virus inactivation and removal by steps of Biotest Pharmaceuticals IGIV production process. *Results in Immunology* 2012; (2): 19–24.
7. Jeong HS, Shin JH, Park YN, Choi JY, Kim YL, Kim BG et al. Development of real-time RT-PCR for evaluation of JEV clearance during purification of HPV type 16 L1 virus-like particles. *Biologicals* 2003; **31**(3): 223–9.
8. Blümel J, Burger R, Drosten C, Gröner A, Gürtler L, Heiden M et al. *Parvovirus B19-Revised*. *Transfus Med Hemother.* 2010; **37**(6): 339–50.
9. Филатова ЕВ, Зубкова НВ, Новикова НА, Голицына ЛН, Кузнецов КВ. Выявление маркеров парвовируса В19 в образцах крови доноров. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии* 2010; (5): 67–70.
10. Бельгесов НВ, Вильянинов ВН, Романенко СМ, Тухменева ИБ, Попова НН. Динамика выявления маркеров гемотрансмиссивных инфекций при обследовании первичных доноров в подразделении службы крови военно-медицинской академии в течение последних 13 лет. *Вестник гематологии* 2014; X(4): 6–7.
11. *Human Plasma (pooled and treated for virus inactivation)*. 2007: 1646. *European Pharmacopoeia. 6st ed.* 2007. Available from: <http://www.dandybooksellers.com/catalog/European-Pharmacopoeia-Supplement-6.1-Book.html>.

Об авторах

Федеральное государственное унитарное предприятие «НПО по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127473, Москва, 2-й Волконский пер., 10.

Зубкова Наталья Васильевна. Заместитель начальника управления науки, д-р фарм. наук.

Кузнецова М. М. Технолог цеха диагностических препаратов Нижегородского филиала.

Зубов С. В. Начальник отделения производства НВ-диагностикумов/диагностикумов гепатита В цеха диагностических препаратов Нижегородского филиала.

Филатова Е. В. Старший микробиолог отделения производства НВ-диагностикумов/диагностикумов гепатита В цеха диагностических препаратов Нижегородского филиала, канд. биол. наук.

Опалева М. Ю. Микробиолог отделения производства НВ-диагностикумов/диагностикумов гепатита В цеха диагностических препаратов Нижегородского филиала.

Адрес для переписки: Зубкова Наталья Васильевна; n.v.zubkova@microgen.ru

Experimental study of the effectiveness of the removal of virus hepatitis B, C and parvovirus B19 by the fractionation of blood plasma with ethanol

N. V. Zubkova, M. M. Kuznetsova, S. V. Zubov, E. V. Filatova, M. Yu. Opaleva

Federal State Unitary Company «Microgen Scientific Industrial Company for Immunobiological Medicines» of Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

The purpose of the study was to assess the effectiveness of the removal of nucleic acids (NA), Hepatitis B (HBV) and C (HCV) viruses and parvovirus B19 (B19V) from blood plasma fractions obtained by alcohol separation. The studies were performed in a model experiment by fractionation normal pool plasma donation contaminated with virus-containing samples in the laboratory. It was found that the multi-step process to extract a fraction II, designed to provide the immunoglobulin G, provided the elimination of NA HBV and HCV to undetectable levels by PCR, and the total reduction factor compared to the original composition of the plasma HBV DNA >5,35 log, HCV RNA >4,84 log. Factor DNA V19V reduction was at the

level of 4,56 log (CI 4,49–4,63). Upon receipt of the fraction V (for albumin) reduction factor of the test virus was >3,0 log which in combination with additional purification step provides a reliable level of safety. The selection fraction I resulted in effectiveness of the elimination of HBV DNA and V19V DNA less than 2 orders, HCV RNA — less than 3 orders of magnitude, it is not enough to recognize the stage reliable. Experiments confirmed that the high risk of contamination of production pools parvovirus B19 additional safety measures are necessary, including mandatory investigation of plasma DNA V19V. In general the development of a full cycle of drug from blood plasma from donors, basic process alcohol fractionation steps necessary to supplement validation virus elimination and inactivation considering residual risk of contamination with pathogenic agents feedstock.

Key words: drugs from blood plasma; plasma fractions; viral safety; alcohol fractionation; viral inactivation; nucleic acids; virus concentration (C); viral load (VL); the reduction factor (RF).

For citation: Zubkova NV, Kuznetsova MM, Zubov SV, Filatova EV, Opaleva MYu. Experimental study of the effectiveness of the removal of virus hepatitis B, C and parvovirus B19 by the fractionation of blood plasma with ethanol. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16 (1): 43–48.

References

1. Burnouf T. Modern plasma fractionation. *Transfus Med Rev.* 2007; **21**(2): 101–17.
2. CPMP/BWP/268/95 Virus Validation Studies: the design contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses. European Medicines Agency. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003684.pdf.
3. Zubkova NV. Ensuring of the infectious safety of plasma blood preparations. *Gematologiya i transfuziologiya* 2014; (2): 44–9 (in Russian).
4. State Standard. General Pharmacopeia article «Human blood plasma derived drugs». Ministry of health order № 768 dated 21.11.2014. Available from: <http://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/11/materialy-po-deyatelnosti-deparatamenta/stranitsa-856/> (in Russian).
5. WHO Guidance document on viral inactivation and removal procedure intended to assure the viral safety of blood plasma products. WHO Technical Report, Series № 924, Annex 4. 2004. Available from: http://www.who.int/bloodproducts/publications/WHO_TRS_924_A4.pdf?ua=1.
6. Dichtelmüller H, Flechsig E, Sananes F, Kretschmar M, Dougherty C. Effective virus inactivation and removal by steps of Biotest Pharmaceuticals IGIV production process. *Results in Immunology* 2012; (2): 19–24.
7. Jeong HS, Shin JH, Park YN, Choi JY, Kim YL, Kim BG et al. Development of real-time RT-PCR for evaluation of JEV clearance during purification of HPV type 16 L1 virus-like particles. *Biologicals* 2003; **31**(3): 223–9.
8. Blümel J, Burger R, Drosten C, Gröner A, Gürtler L, Heiden M et al. Parvovirus B19-Revised. *Transfus Med Hemother.* 2010; **37**(6): 339–50.
9. Filatova EV, Zubkova NV, Novikova NA, Golitsina LN, Kuznetsov KV. Detection of parvovirus B19 markers in blood samples of donors. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* 2010; (5): 67–70 (in Russian).
10. Belgesov NV, Vilyaninov VN, Romanenko SM, Tikhmenev IB, Popova NN Dynamics of identifying of bloodborne pathogen markers during testing of primary donor blood services division of the Military Medical Academy for the last 13 years. *Vestnik gematologii* 2014; X(4): 6–7 (in Russian).
11. Human Plasma (pooled and treated for virus inactivation). 2007:1646. European Pharmacopoeia. 6st ed. 2007. Available from: http://www.dandybooksellers.com/acatalog/European_Pharmacopoeia_Supplement_6.1_Book.html.

Authors

Federal State Unitary Company «Microgen Scientific Industrial Company for immunobiological medicines» of Ministry of Health of the Russian Federation, 10 2st Volkonskiy lane, Moscow, 127473, Russian Federation.

Zubkova NV. Deputy head of Science Department. Doctor of Pharmaceutical Sciences.

Kuznetsova MM. Technologist of diagnostic products department of Nizhny Novgorod branch.

Zubov SV. Head of compartment of HB diagnosticums and hepatitis B diagnosticums production of diagnostic products department of Nizhny Novgorod branch.

Filatova EV. Senior microbiologist of HB diagnosticums and hepatitis B diagnosticums production of diagnostic products department of Nizhny Novgorod branch. Candidate of Biological Sciences.

Opaleva MYu. Microbiologist of HB diagnosticums and hepatitis B diagnosticums production of diagnostic products department of Nizhny Novgorod branch.