

# **Защита концентратов факторов коагуляции от вирусной инфекции**

*Джером Тейтел*

*директор всесторонней программы по гемофилии  
Торонто и Центрального Онтаро,  
Больница Св. Михаила, Торонто, Канада  
“FACTS AND FIGURES” December 1997 , No. 004*

## **Обзор проблемы вирусного заражения через концентраты факторов**

Главным барьером в безопасном переливании компонентов крови является передача патогенных микроорганизмов. С точки зрения заместительной терапии при гемофилии и подобных болезнях , вирусы – главный фактор, вызывающий беспокойство. Устранение или дезактивация частиц всякого вируса в концентратах факторов коагуляции – теоретически оправданная задача, но в практическом отношении это не всегда обязательно достижимо. В каждом конкретном случае абсолютное удаление вирусов недоказуемо, если исследованию подвергнут только пробный образец целого продукта. С практической точки зрения, целью является снижение зараженности патогенными вирусами до остаточного неинфицирующего уровня.

Устранение вирусов проблематично из-за их малого размера, благодаря чему, их выделение из компонентов крови более сложно по сравнению с другими патогенными микроорганизмами. Кроме того, некоторые вирусы относительно устойчивы к дезактивационным приемам . В конце концов, новые вирусы периодически проникают через специализированные барьеры незамеченными и поступают в банк человеческой крови. Как только это происходит, последующее глобальное распространение весьма вероятно, что обусловлено высоким уровнем передвижения населения в современном мире. Новые патогенные вирусы не будут определяться моноспецифическими тестами и могут быть относительно устойчивы к используемым методам вирусного устранения.

В последних публикациях был поднят вопрос озабоченности больных гемофилией в связи с возможной передачей с концентратами факторов коагуляции болезни Крейцфельда - Якоба, типичной человеческой формы трансмиссивной губчатой энцефалопатии. Инфекционный агент этого тяжелого заболевания не выглядит как известные ранее вирусы, и пока нет доказательств, что он может быть передан через компоненты крови. Тем не менее, признавая долгий инкубационный период болезни Крейцфельда-Якоба, возможность передачи этого заболевания с концентратами факторов коагуляции не может быть полностью исключена .

## **Передача вирусов через концентраты факторов коагуляции**

Некоторые передающиеся при трансфузии вирусы, особенно цитомегаловирус и HTLV- 1, являются исключительно внутриклеточными и таким образом невозможна их передача через концентраты факторов. Главные трансмиссивные вирусы, передающиеся через

плазму, которые являются причиной острых и/или хронических болезней, - вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), гепатита В (HBV), гепатита С (HCV). Другие вирусные инфекции, которые могут быть переданы с концентратами факторов, представляют меньшую опасность. Один из них, парвовирус В19, вызывает заболевание, которое не проявляется вообще или имеет доброкачественное самоизлечивающее течение. Концентрат VIII фактора был замечен как источник нескольких ограниченных инфекционных вспышек вирусного гепатита А (HAV), хотя доказательства этого лишь косвенные. HAV также вызывает мягкое или субклиническое течение и не связан с хроническим вирусоносительством. Кроме того, существуют эффективные вакцины, применяемые при подозрительных случаях. Оба вируса - парвовирус В19 и HAV характеризуются малыми размерами и отсутствием липидной оболочки, что создает сложности при их удалении из продуктов плазмы крови и устойчивость данных вирусов к химической дезактивации растворимыми дезинфицирующими средствами. В дальнейшем они могут рассматриваться как "вирусы-индикаторы" других неопределяемых, потенциально-патогенных агентов. Некоторые характеристики вирусов, передаваемых с концентратами факторов, указаны в Таблице 1.

**Таблица 1: Основные вирусы, передаваемые с концентратами факторов коагуляции**

ВИРУС	РАЗМЕР(nm)	ГЕНОМ	ОБОЛОЧКА
HIV-1	90-100	РНК	да
HBV	40-45	ДНК	да
HCV	40-60	РНК	да
HAV	25-30	РНК	нет
В 19	18-20	ДНК	нет

Среди других потенциально опасных вирусов, недавно установленный вирус гепатита G (HGV), возможно, передавался посредством концентратов факторов, хотя его патогенез, как и тропизм к гепатоцитам, остается недоказанным. HGV, похоже, является чувствительным к дезактивационным приемам, которые эффективны для других вирусов с оболочкой, хотя это остается неустановленным. Даже при подтверждении этого, эффективность данных процессов может быть скомпромитирована первоначальным высоким уровнем вирусных титров в неисследованном плазменном фонде.

Нечеловеческие вирусы представляют потенциальную опасность, но их патогенез в человеческом организме зачастую неясен. Например, свиной концентрат VIII фактора был заражен свиным парвовирусом (PPV), который высоко эндемичен для свиного поголовья. К счастью, PPV не передается человеку, и результаты лабораторных и клинических исследований на реципиентах свиного VIII фактора продемонстрировали, что он не представляет риск для здоровья человека. Попытки удалить или дезактивировать PPV осложнены его малыми размерами и фактом, что свиной VIII фактор - весьма хрупкая молекула, которая не выдерживает суровые процедуры, необходимые для дезактивации PPV.

## **Общие принципы оптимизации вирусной защиты**

Многоступенчатый последовательный подход необходим для сведения к минимуму риска вирусного заражения через продукты, замещающие факторы коагуляции. Данный подход позволяет достигнуть дополнительного или даже синергистического вирусного подавления и защищает против производственных ошибок или недосмотра на любой стадии. Направления этого подхода включают отбор доноров, тестирование донорской крови, отделение вирусов от терапевтических компонентов и вирусная дезактивация. Ответственность за выполнение этих стадий лежит на производителях. Регулирующие стороны ответственны за обнародование руководств по вирусной защите (таких как от Института Эрлиха или Общества Контроля за Медицинской Продукцией) и выпуск этих изданий для распространения. Врачи и пациенты несут совместную ответственность за обеспечение активной иммунизации реципиентов против HBV и HAV и правильное использование продуктов плазмы крови человека.

### **Ограничение использования потенциально зараженной продукции**

Риск вирусного заражения может быть ограничен путем использования продуктов, полученных из нечеловеческой плазмы, в случаях, когда это доступно и эффективно. К сожалению, большинство врачей-гематологов могут быть привлечены к ответственности за эпизоды, когда лечение было основано на ложно диагностированной коагулопатии, когда концентраты были назначены в агрессивно-высоких дозах или по сомнительным показаниям и были использованы относительно опасные, с истекшим сроком действия, продукты заместительной терапии. Использование факторных заместителей одновременно с такими фармакологическими препаратами как десмопрессин или антифибринолитики также зачастую встречается.

Использование рекомбинантных концентратов факторов коагуляции не устраняет полностью риск вирусного заражения. Некоторые рекомбинантные продукты содержат альбумины человеческой плазмы. Долгосрочный опыт использования альбуминов, как средств, увеличивающих объем общего белка в плазме крови, свидетельствует о их безвредности, хотя они не были подвержены тщательному исследованию в той же мере, что и концентраты факторов коагуляции. Рекомбинантные протеины, даже те, что не содержат альбумины, теоретически могут передавать нечеловеческие вирусы млекопитающих. Последние могут быть получены по линии родительских клеток, или с содержащимися в питательных средах животными белками, используемыми для хранения или роста подобных клеток.

### **Снижение изначальной вирусной зараженности**

Количество вирусов, поступающий в банк плазмы, может быть уменьшено путем тщательного отбора доноров и тестирования индивидуальных доз на присутствие анти-вирусных антител или вирусных антигенов (Таблица 2). Широко распространено мнение, что самый безопасный донорский фонд состоит из безвозмездных сдач крови добровольцами. Но фактически существуют доказательства, что кровь отобранных постоянных и оплачиваемых доноров имеет меньший риск вирусного заражения. Это является иллюстрацией принципа, что эпидемическая ситуация среди донорского населения служит источником вирусного заражения, а не оплата за сдачу крови. Процесс отбора должен сопровождаться строгими критериями для повторного входа в фонд отсроченных доноров и регистрацией, гарантирующей, что плазма отсроченных доноров не была выпущена бесконтрольно.

**Таблица 2 :Предотвращение поступления вирусов в плазменный фонд**

Отбор доноров	Самоотсроченные Отсроченные центром
Проверка групп индивидуальных доноров	Заместительный анализ Положительные антитела Антигенемия
Проверка фонда	Вирусный геном
Карантин донорских групп , повторное тестирование доноров	

Специфические вирусопределяющие тесты необходимы в производстве плазменных концентратов, так как последующее вирусное удаление или дезактивация могут быть безуспешными на фоне высокой зараженности фонда. Тем не менее, приведенные ниже ограничения свидетельствуют о их недостаточности для гарантии оптимальной вирусной защиты.

Наиболее эффективные определяющие тесты – моноспецифичные антитела, антигенопределяющие тесты для индивидуальных, предварительно выбранных вирусных мишеней. Эти тесты должны периодически обновляться в соответствии с технологическим прогрессом. Эти тесты высокочувствительны, поэтому отношение истинно позитивного к ложно позитивному результату должно быть низким среди выбранных (т.е. предпочтительных) донорских групп. Для исключения ложной позитивности все сывороточные реактивы должны быть подвергнуты повторным проверочным тестам с последующим подтверждающим тестированием. Несмотря на то, что клиническая значимость истинной антител-позитивности может считаться проблематичной, в некоторых случаях антитела представляют защиту от вирусов. Данный принцип отсрочил внедрение анти - HCV тестирования в США до 1991 года. Считалось действительно опасным использование анти - HCV реактивов, как веществ, повреждающих защитные антитела .

При отсутствии просчетов или недостатков контроля качества, причиной ложно негативных результатов является субпороговая вирусная зараженность. Это может произойти во время асимптоматического “оконного периода“ в самом начале инфекционного процесса или на поздних стадиях хронического носительства, когда вирусемия и серологический ответ снижаются. Избегнуть заражение на ранних стадиях можно путем использования замороженных плазменных концентратов не ранее, чем через три месяца - после повторного тестирования доноров, чьи тесты изначально были отрицательными. Хотя ложно отрицательные результаты довольно редки, их значимость неимоверно возрастает, учитывая, что достаточно одной вирусопозитивной дозы для тотального заражения фонда, производящего большой объем факторных концентратов. Данные о размерах плазменных фондов весьма противоречивы, так как они зависят от коммерческой эффективности. С течением времени, большие тяжелой формой гемофилии будут подвергнуты трансфузиям концентратов факторов из множества различных фондов. С одной стороны, вероятность вирусного заражения из банка плазмы прямо пропорциональна числу доноров, его составляющих. С другой стороны концентрация

вирусов, поступивших с зараженной дозой, обратно пропорциональна размерам этого банка. Разбавление низких вирусных титров может снизить риск заражения и увеличить эффективность вирусной дезактивации.

Тест на наличие вирусных антигенов существует для HBV и ВИЧ. Тест на наличие HBV поверхностного антигена (HBSAg) высокочувствителен, потому что на ранних стадиях HBV-инфекции синтезируется огромное количество вирусных протеинов. До сих пор, HBV-инфекция может передаваться в титрах меньших, чем HBSAg-анализ может определить на сегодняшний день. В дальнейшем, чувствительность анализа может быть снижена из-за присутствия антител. Напротив, только малые концентрации ВИЧ и HCV антигенов циркулируют на ранних стадиях инфекционного процесса, тем самым обуславливая малую значимость определяющих тестов. По результатам американских исследований, ни одного HIV-P24-антиген-положительного результата не было найдено в донорских группах с отрицательными тестами на наличие HIV-антител. Тем не менее, исключительно важно использовать антиген-тестирование для некоторых пациентов в антителоотрицательном оконном периоде на ранних стадиях развития HBV-инфекции.

Некоторые производители с недавнего времени стали внедрять способы определения вирусного генома с использованием цепной реакции полимераз (ПЦР) или родственных ей способов. Возможности ПЦР-теста можно проиллюстрировать на примере чувствительности к HBV, которая на шесть порядков выше, чем антигенный тест. Однако, ПЦР-тест в случае с концентратами факторов применяется для тестирования не индивидуальных доз, а целого пула плазмы, где вирусный геном может быть разбавлен до концентраций меньших, чем определяющая способность даже этого теста. В принципе, потенциальные возможности ПЦР-теста были продемонстрированы в ситуациях высокого распространения HBV, когда данный тест был способен определить положительных доноров (потенциально зараженных), чьи HBSAg-результаты были отрицательными, а антитела - положительными. Данные по определению ВИЧ-инфекции у доноров, протестированных посредством ПЦР позволяют предположить, что серологически неопределяемые доноры и доноры с отрицательным серологическим результатом - с высокой вероятностью незаразны. На практике, дополнительное преимущество ПЦР-тестирования концентратов факторов применимо в отношении ВИЧ-инфицированных. Меньше, чем 30 случаев ВИЧ-заражения через антителоотрицательные донорские дозы были зарегистрированы в США в первой декаде после внедрения в практику данного тестирования. Даже если данные цифры занижены, общее количество трансфузий близко к 150 000 000. Для концентратов факторов остаточный риск снижен на стадиях вирусной дезактивации. Таким образом, дополнительные преимущества ПЦР-теста похуже останутся незамеченными. Возвратно-транскриптазный-ПЦР-тест был бы очень полезен для определения HCV при условии отсутствия антигенного анализа. Парвовирус В19 - также реальный объект для ПЦР-тестирования, благодаря его относительной устойчивости к методам вирусной дезактивации.

#### Удаление и дезактивация вирусов

Методы удаления и дезактивации вирусов неспецифичны для различных инфекционных агентов, хотя их эффективность может быть частично или полностью ограничена применительно к определенным классам вирусов. Таким образом, в отличие от тестов,

описанных выше, нет необходимости выполнять специфические стадии вирусного удаления для уничтожения каждого известного патогенного агента. Помимо того, конкретно эти методы могут снизить риск заражения вирусами, чье присутствие в донорском фонде не подозревалося и/или не было известно. Тем не менее, эффективность вирусного удаления и дезактивации лимитирована, и каждый раз эти методы вирусного разрушения ограничены риском денатурации белков-факторов коагуляции. Поэтому данные методы должны сочетаться с донорским отбором и определяющими тестами, а не заменять их. Подходы удаления и дезактивации вирусов в концентратах факторов отражены в Таблице 3.

**Таблица 3: Удаление и дезактивация вирусов в плазменных фондах**

Случайное удаление во время выделения интересующих протеинов	
Специфическое удаление вирусов путем фильтрации	
Температурная дезактивация	60-80 С x 30-70ч. АБСОЛЮТНАЯ 80-100 С x 0,5-72ч. Пастеризация 60 С x 10 ч. Горячим паром
Химическая дезактивация	Растворимые дезинфицирующие средства тиоцианат натрия
Фотохимическая дезактивация	Бетта - прориолактон / УФ Ультрафиолет -С

Физическое отделение вирусов от концентратов факторов происходит непреднамеренно во время белкового выделения и формирования. Основное количество вирусов удаляется на стадиях криопреципитации, хроматографического разделения (особенно при иммунородственной хроматографии) и лиофилизации. Был возобновлен интерес к использованию фильтрационных методов для преднамеренного удаления вирусов. В частности, молекула фактора IX достаточно мала, чтобы пройти через ультрафильтрующие и нанофильтрующие мембраны, которые задерживают наименьшие вирусные частицы, HAV и парвовирус B19. Эти мембраны в настоящее время используются в производстве концентратов фактора IX.

Процессы дезактивации специфических вирусов применимы к получаемым из плазмы концентратам факторов коагуляции. Широко используется процесс температурной обработки, так как вирусы обладают различной чувствительностью к нагреванию. К сожалению, тоже самое можно сказать о белках, многие из которых (особенно фактор VIII) легко денатурируются в растворе с 80°C, температурой используемой для пастеризации. Неустойчивые белки частично могут быть защищены добавлением химических стабилизаторов, таких как аминокислоты, цитраты, сахара; но при этом обычно теряется 10-15% активности фактора VIII. Эффективность температурной дезактивации вирусов зависит от многих факторов, включая время, температуру, физическое состояние (жидкое или твердое), содержание солей, диапазон температурных изменений и природу и концентрацию стабилизатора. В дополнение к пастеризации, нагревание до высоких

температур зачастую используется в лиофильных концентратах (80-100°C) от 0,5 до 72 часов. Нагревание данных продуктов горячим паром до 80°C обеспечивает рекордную надежность. За исключением этого процесса, температура ниже 80°C относительно неэффективна для некоторых видов вирусов в замороженно-высушенных продуктах.

Вирусы, имеющие липидную оболочку (включая ВИЧ, HBV и HCV), могут быть эффективно разрушены при использовании органических растворителей (обычно три-*n*-бутилфосфат) в присутствии дезинфицирующих средств - или Твин-80, или хлорид натрия, или Тритон X-100. В случае воздействия температурой, эффективность растворимых детергентов (С/Д) зависит от времени и температуры. С/Д вызывают быструю и полную дезактивацию вирусов с липидной оболочкой и имеют рекордные показатели надежности в использовании вирусной очистки препаратов крови. В последнее время прошедшие С/Д обработку продукты были подвергнуты температурному воздействию на финальной стадии. Такой широкий спектр методов вирусной дезактивации воздействует на безоболочечные вирусы, и в тоже время сохраняет потенциальные преимущества С/Д. Современный опыт двойной обработки отлично зарекомендовал себя и свидетельствует, что добавочные манипуляции не увеличивают иммуногенность продуктов. Другой подход химической дезактивации вирусов состоит в использовании хаотропных агентов (разобщающих агентов, вызывающих диссоциацию комплексов), таких как тиоцианат натрия. Это с успехом применяется к концентрату фактора IX, который сравнительно устойчив к данным препаратам.

Фотохимические методы вирусной дезактивации менее применимы к концентратам факторов. Метилен синий + видимый свет были использованы для вирусной дезактивации в Европе в течение нескольких лет. Похожие методы использования ультрафиолетовой радиации различных световых волн с или без добавления химических светочувствительных агентов применимы к концентрату фактора IX. Большинство данных процедур неприменимы к столь неустойчивому белку как концентрат фактора VIII. Использование ультрафиолета-С является исключением, что делает его полезным, дополнительным методом.

### **Стоимость вирусной дезактивации**

Применение вирусосослабляющих методов повышают затраты на производство концентратов факторов - финансовые и иные. Эти процессы увеличивают сложность производства и снижают выход фактора коагуляции, что повышает его денежную стоимость. Кроме того, данные методы теоретически могут изменять белки, придавая им большую иммуногенность и/или меньшую эффективность. Химические агенты, добавляемые к концентратам с целью дезактивации, такие как С/Д, являются потенциально токсичными. Необходимо их тщательное удаление из конечного продукта.

### **Обсуждение данных вирусной защиты**

Врачи-гематологи должны клинически наблюдать результаты вирусной защиты. Неправильно предполагать, что стадии обеззараживания и индивидуального разделения всегда обладают пропускающей способностью, хотя в некоторых случаях это так. На практике, способность каждой стадии к удалению или дезактивации вирусов, "запущенных" в начальный продукт, проверяется индивидуально. Условием эксперимента

является значимая вирусная зараженность на каждой стадии, что позволяют оценить ее обезвреживающую способность. Хотя, результатом этого является неясность взаимодействия между различными методиками. Так например, различные стадии, возможно, не обладают пропускающей способностью, если они воздействуют на одну и ту же группу вирусных представителей. Кроме того, в эксперименте иногда используются "модельные" вирусы, которые могут иметь небольшую, но очень важную разницу по сравнению с теми агентами, которых они копируют. Даже если используются истинные вирусы, их лабораторно полученные клоны могут отличаться от природных аналогов. И наконец, опубликованные результаты вирусной защиты получены из экспериментов с небольшим объемом, что не может быть полностью перенесено на промышленные объемы.

### **Наблюдение за сбытой продукцией**

Все впечатляющие нововведения в производстве безопасных концентратов факторов коагуляции не должны вызывать жалобы со стороны клиник по лечению гемофилии. Безоговорочным доказательством вирусной защиты являются не результаты удаления вирусов "in vitro", а показатели незараженности пациентов патогенными вирусами. Таким образом, долгосрочное клиническое и лабораторное наблюдение за реципиентами крайне необходимо. Это касается не только главных известных вирусных инфекций, а также менее опасных, передающихся с кровью вирусов и вирусов с сомнительной патогенностью. Тщательное наблюдение и высокая настороженность помогут также в дальнейшем распознавании клинических проявлений заражения банков крови новыми видами вирусов.