

Bankowanie. Mikrobiologiczne bezpieczeństwo przeszczepienia krwiotwórczych komórek macierzystych

Banking. Microbial safety of haematopoietic stem cells transplantation

Streszczenie

W procesie przygotowania komórek krwiotwórczych (k.k.) do transplantacji istotne jest wdrożenie oraz utrzymanie procedur pozwalających na zachowanie mikrobiologicznego bezpieczeństwa przeszczepu. Do głównych źródeł zanieczyszczenia przeszczepu należy: powietrze, personel, woda oraz materiał. Kontaminacja przeszczepu może mieć miejsce na etapie pozyskania, przetwarzania oraz dystrybucji k.k. Jakość materiału transplantacyjnego powinna być kontrolowana na wszystkich kluczowych etapach jego przetwarzania. Bankowanie k.k. może odbywać się w systemie otwartym lub zamkniętym. System przetwarzania k.k., otwarty lub zamknięty, znacząco wpływa m.in. na kryteria kwalifikacji pomieszczeń oraz przygotowania pracowników do pracy. Jednak niezależnie od systemu przetwarzania k.k., kontrola mikrobiologiczna powinna obejmować zarówno materiał transplantacyjny, jak i środowisko jego przetwarzania. Formalne wymogi dla banków komórek zawarte są w Rozporządzeniach Unii Europejskiej, Ustawie Transplantacyjnej oraz Rozporządzeniach Ministra Zdrowia. Wdrożenie oraz utrzymanie procedur odpowiedniego przygotowania pracowników, sprzętów oraz pomieszczeń do pracy w znaczący sposób wpływają na zmniejszenie ryzyka kontaminacji przeszczepu, a tym samym na kliniczne parametry leczenia transplantacyjnego.

Abstract

It is important to implement and maintain procedures to preserve the microbiological safety of the transplant in banking of haematopoietic stem cell (h.s.c.) products. There are four major source of microbial contamination in controlled areas: air, water, material and people. Each process: harvest, processing and distribution of cells may cause contamination of h.s.c. products. Quality of graft should be controlled on each crucial steps of stem cells processing. H.s.c. processing steps can be performed in a closed or open system. System of stem cells preparing – open or closed have an impact on lab and processing facility personel qualification. Regardless of the h.s.c. processing system, microbial control should include graft and processing environment. The activity of cell banks is regulated by national formal requirements and is linked with United Union standards. Introduction and maintenance of procedures of suitable preparing of personell, equipments and lab have diminishing effect of h.s.c. contamination risk and, on the same way, have an impact on clinical results of transplant procedures.

© 2018 Polish Society of Hematology and Transfusion Medicine, Insitute of Hematology and Transfusion Medicine. All rights reserved.

Słowa kluczowe: bankowanie, testowanie mikrobiologiczne, regulacje prawne

Keywords: banking, microbial testing, current legislation

Przeszczepienie komórek krwiotwórczych (k.k.) to jedna z metod leczenia chorób hematologicznych. Pozwala na odnowę krwiotworzenia u pacjentów, u których zastosowano terapię mieloablacyjną. W wyniku tej terapii, niszczącej komórki szpiku, pacjent traci naturalną zdolność obronną przeciw drobnoustrojom. Pierwsze transplantacje k.k. opierały się na przeszczepach pozyskanych ze szpiku [1]. Od dłuższego czasu większość przeszczepień wykonanych na całym świecie opiera się na k.k. pozyskanych w wyniku aferezy komórkowej [2]. Dzięki zawartości w materiale transplantacyjnym pozyskanym z mobilizowanej krwi obwodowej nie tylko bardzo młodych k.k., ale również komórek różnicujących się, odnowa krwiotworzenia u tych pacjentów jest możliwa po około 10 dniach od przeszczepienia [3]. Ryzyko infekcji u tych chorych jest niższe niż po transplantacji komórek pozyskanych ze szpiku, ale nadal wysokie. W celu minimalizacji ryzyka infekcji, chorzy w okresie okołotransplantacyjnym przebywają w pomieszczeniach o zaostrożonym reżimie sanitarnym. Każda wysokospecjalistyczna procedura przeszczepienia k.k. wymaga

wdrożenia i utrzymania systemu zapewnienia jakości (SZJ) w jednostkach, które zajmują się pobieraniem, przetwarzaniem oraz dystrybucją przeszczepu. Wymóg ten dotyczy również banków komórek. Istotnym aspektem wpływającym na wynik leczenia transplantacyjnego jest mikrobiologiczne bezpieczeństwo przeszczepu k.k. [4, 5, 6]. Zagadnienie to jest szeroko dyskutowane w literaturze [7, 8]. Ponadto jest regulowane przez krajowe wymogi prawne i przez międzynarodowe standardy.

Dane literaturowe dotyczące mikrobiologicznej oceny materiału transplantacyjnego oraz środowiska jego przetwarzania

Zanieczyszczenie preparatów k.k. jest od dawna omawiane w literaturze, zgodnie z którą nadal stanowi istotny problem procedury przeszczepienia k.k. Jedne z pierwszych badań i obserwacji opublikowane zostały przez Rowley i wsp. w 1988 roku [9]. Autorzy pracy badali czystość mikrobiologiczną 100 donacji k.k. pozyskanych ze szpiku. Zgodnie z ich opracowaniem zanieczyszczenie

Article history:

Received: 05.06.2017

Accepted: 07.05.2018

Ewa Bembnista,
Agnieszka Kubiak,
Paula Matuszak,
Maria Kozłowska-Skrzypczak

Katedra i Klinika Hematologii
i Transplantacji Szpiku, Uniwersytet
Medyczny w Poznaniu

* Adres do korespondencji: Ewa Bembnista, Katedra i Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku, Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Szamarzewskiego 84, Poznań 60-569, e-mail: ewa.bembnista@skpp.edu.pl

zostało zidentyfikowane na poziomie 17%. Autorzy wskazują na konieczność przeprowadzania procesów pozyskania oraz preparatyki k.k. w sposób wykluczający jego klinicznie istotną kontaminację.

Dane literaturowe wskazują, że źródło pozyskania k.k. ma związek z ryzykiem zanieczyszczenia donacji. Zgodnie z pracą Kamble i wsp. [10] pobranie komórek krwiotwórczych ze szpiku niesie ze sobą większe ryzyko mikrobiologicznej kontaminacji (4,5%), niż w przypadku, gdy materiał transplantacyjny pozyskany jest w wyniku aferezy mobilizowanej krwi obwodowej (3,9%). Od przełomu lat 80. i 90. XX wieku źródłem k.k. stała się afereza mobilizowanej krwi obwodowej.

Według Leemhuis i wsp. [7] oznaczenie czystości mikrobiologicznej materiału transplantacyjnego należy wykonać przed preparatyką komórek oraz po jej zakończeniu, tj. przed zamrożeniem lub przed przetoczeniem komórek. Autorzy pracy zwracają uwagę na konieczność przeprowadzenia badania w sposób umożliwiający identyfikację bakterii beztlenowych, tlenowych oraz grzybów. Zgodnie z badaniami Richter i zespołu [11] obecność dimetylosulfotlenku (DMSO) w krioprezerwowanym preparacie nie przeszkadza w oznaczaniu statusu mikrobiologicznego preparatu k.k. Przeprowadzona przez autorów analiza próbek zawiesiny komórek, każda o objętości 1 ml, do której dodano bakterie *Haemophilus influenzae* (szczep ATCC10211) w liczbie 10-100 jednostek tworzących kolonie bakteryjne, wykazała wzrost drobnoustrojów po 1-3 dniach inkubacji. W badaniach tych jako kontrolę stosowano posiewy, do których nie dodano bakterii [11, 12]. Autorzy licznych badań wskazują jednak, że odsetek zanieczyszczeń materiału transplantacyjnego, zidentyfikowany na etapie pozyskania komórek jest wyższy w porównaniu z wynikami oceny uzyskanymi na etapie krioprezerwacji komórek. Fakt ten łączony jest z antybakteryjnym działaniem DMSO – środkiem krioochronnym, wykorzystywanym w procesie mrożenia komórek [13].

Nieprzestrzeganie procedur pozyskania oraz preparatyki k.k. może skutkować mikrobiologiczną kontaminacją przeszczepu, która jest potencjalnie śmiertelnym zagrożeniem dla pacjenta. Ocena materiału bezpośrednio po przyjęciu do banku oraz ponownie po przetworzeniu pozwala na identyfikację możliwego źródła zanieczyszczenia oraz na jego eliminację [7, 8].

Procedury przetwarzania k.k. mogą odbywać się w systemie otwartym i zamkniętym. Przetwarzanie k.k. w systemie otwartym wymaga posiadania tzw. pomieszczeń czystych. Czynności preparatywne wykonywane są wtedy w komorze z laminarnym przepływem sterylnego powietrza, w klasie czystości A, która znajduje się w otoczeniu klasy czystości B. Innym modelem pracy jest system zamknięty. Przetwarzanie k.k. w tym systemie możliwe jest dzięki połączeniom drenów za pomocą zgrzewarki do sterylnego ich łączenia. System ten uniemożliwia kontakt materiału transplantacyjnego ze środowiskiem zewnętrznym. Mimo że przetwarzanie przeszczepu w systemie zamkniętym wyklucza jego ekspozycję na środowisko zewnętrzne, to jednak k.k. mają kontakt z różnymi materiałami (np. z workami preparatywnymi), które mogą być źródłem drobnoustrojów. Przetwarzając k.k. w systemie zamkniętym, bardzo ważne jest pobranie próby na posiew w komorze z laminarnym przepływem sterylnego powietrza. Ten etap jest bardzo istotny dla zachowania zasady wiarygodności oceny, jak również wykluczenia fałszywie dodatnich wyników oceny [8]. Zgodnie z doniesieniem Cassens i wsp.

[14] przetwarzanie k.k. w systemie o większym reżimie czystości nie wpływa na zmniejszenie liczby zanieczyszczenia materiału transplantacyjnego, oznaczonych w materiale po przetworzeniu. Analiza obejmująca 783 donacji k.k. przetwarzanych tylko w komorze laminarnej oraz 695 donacji k.k. przetwarzanych w komorze laminarnej znajdującej się w pomieszczeniach czystych wskazuje na nieistotne statystycznie różnice w zakresie liczby pozytywnych oznaczeń mikrobiologicznych w obu grupach. Autorzy pracy wskazują na bardzo niski poziom dodatnich wyników oznaczeń, dla obu grup wynoszący niewiele ponad 1%.

W analizie czystości mikrobiologicznej środowiska przetwarzania komórek należy również zwrócić uwagę na powiązanie wyników oznaczeń mikrobiologicznych preparatów oraz środowiska ich przetwarzania, stanowiącego otoczenie komórek. U schyłku lat 80. XX wieku ukazała się praca Arleta i wsp. [15], w której porównano poziom zanieczyszczenia powietrza zarówno bakteriami, jak i grzybami w konwencjonalnych pomieszczeniach oraz w komorach z laminarnym przepływem sterylnego powietrza i pomieszczeniach czystych. Autorzy wskazują na redukcję badanych zanieczyszczeń w oznaczeniach wykonanych w środowisku o większym reżimie czystości.

Istnieje wiele metod kontroli czystości mikrobiologicznej powietrza. Wśród technik pomiarowych powszechnie stosowanych w procedurach hodowli, ze względu na sposób pozyskania materiału wyróżnia się metody sedymentacyjne oraz polegające na mechanicznym oddzieleniu zanieczyszczeń z powietrza. W metodzie sedymentacyjnej Kocha otwarte płytki Petriego z podłożem stałym poddawane są ekspozycji na badane powietrze. Zasada metody pobrania próbki polega na samoistnej sedymentacji zanieczyszczeń występujących w powietrzu. Wśród technik bazujących na mechanicznym oddzieleniu drobnoustrojów wyróżnia się metody filtracyjne, zderzeniowe i odśrodkowe [16]. Istotny krok analizy to interpretacja uzyskanych kolonii. Z uwagi na fakt, że kolonia może powstać z jednej komórki lub z wielu połączonych komórek drobnoustrojów, wynik wyrażony w CFU/m³ oznacza, że w powietrzu może znajdować się więcej drobnoustrojów.

Metoda sedymentacji pomiaru zanieczyszczeń posiada wiele zalet, ale i wad. O jej częstym wyborze decyduje łatwość wykonania, szybkość oraz niski koszt badania. Wadą metody sedymentacji jest możliwość wykrywania komórek zdolnych do wzrostu tylko na danej pożywce. Należy zwrócić uwagę, że za jej pomocą nie można wykryć najdrobniejszych cząstek bioaerozolu, ponieważ sedymentują one bardzo wolno lub wcale. Szybkość osadzania cząstek zależy od wielu czynników, m.in. ich wielkości, wagi, ładunku elektrostatycznego, wilgotności czy ruchu powietrza. Z uwagi na niedoskonałości metody sedymentacji, w celu pobrania próbki powietrza wprowadzono urządzenia pozwalające na mechaniczne oddzielenie cząstek zanieczyszczeń. Tym samym możliwe stało się zatrzymanie zanieczyszczeń niezależnie od ich właściwości fizykochemicznych, jak również od warunków panujących podczas prowadzenia pomiarów. Jednak metody pomiaru czystości powietrza wykorzystujące urządzenia do oddzielenia zanieczyszczeń nie są również pozbawione wad. Mechaniczne oddzielenie zanieczyszczeń może powodować m.in. zmniejszenie żywotności zanieczyszczających drobnoustrojów [15].

Zgodnie z danymi z literatury, głównym źródłem czynników chorobotwórczych w pomieszczeniach czystych jest personel. Poza personelem potencjalnym źródłem zanieczyszczenia preparatów przetwarzanych w systemie otwartym jest powietrze oraz materiały mające bezpośredni kontakt z przeszczepem. Według Cobo [17] w pomieszczeniach czystych najczęściej identyfikowane są drobnoustroje, których źródłem jest ludzka skóra, m.in. *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Corynebacterium* spp. Równie często spotykane są bakterie, m.in. *Bacillus* spp., które mogą przetrwać w środowisku dzięki zdolności do wytwarzania spor. W powietrzu rzadko występują spory grzybów, m.in. *Aspergillus niger* oraz *Penicillium* spp. W pomieszczeniach czystych bardzo rzadko identyfikowane są Gram-ujemne bakterie, m.in. *Enterobacter cloacae*, *Burkholderia cepaci*. Głównym zadaniem kontroli środowiska przetwarzanych k.k. jest wyznaczenie tzw. linii trendu identyfikowanych drobnoustrojów oraz interpretacja zjawisk powiązanych z pojawieniem się czynników chorobotwórczych spoza jej obszaru. Kontrola czystości mikrobiologicznej środowiska przetwarzania pozwala również na przeprowadzenie analizy przygotowania pracownika do procedur preparatyki k.k. oraz sposobu przetwarzania przez niego materiału transplantacyjnego [17, 18]. Ponadto, dzięki identyfikacji źródła zanieczyszczenia, przeprowadzenie czynności, które pozwolą na zmniejszenie ryzyka powtórnego pojawienia się w przyszłości drobnoustrojów spoza linii trendu, czyli działań korygujących, zapobiegawczych oraz naprawczych, jest w praktyce dużo łatwiejsze.

Wiedza na temat statusu mikrobiologicznego preparatów k.k. przed ich podaniem pacjentowi zwiększa bezpieczeństwo procedury transplantacji oraz pozwala w razie potrzeby na wprowadzenie przez lekarza odpowiedniej antybiotykoterapii. W przypadkach wątpliwych zawsze należy przeprowadzić analizę potencjalnych korzyści dla pacjenta i reakcji niepożądanych wynikających z przeszczepienia i rodzaju leczenia [19, 20]. W niektórych przypadkach skłania ona do wycofania preparatu przez jego zutilizowanie. Zdaniem Namdaroglu i wsp. [21] kliniczne niekorzystne następstwa wynikające z podania pacjentowi zanieczyszczonego mikrobiologicznie materiału transplantacyjnego są niezwykle rzadkie, a stosowanie u pacjenta wyprzedzającej antybiotykoterapii w większości przypadków nie jest konieczne. Wnioski oparto o dane dotyczące m.in. czasu hospitalizacji oraz czasu odnowy krwiotworzenia w układzie granulocytarnym przeprowadzonej u 46 pacjentów, którym ze względów koniecznych podano zanieczyszczony mikrobiologicznie materiał transplantacyjny. Poznanie statusu mikrobiologicznego przeszczepu k.k. oraz wyników oceny mikrobiologicznej środowiska przetwarzania nie jest możliwe natychmiast. Informacja o statusie mikrobiologicznym przeszczepu uzyskiwana jest najczęściej po kilku dniach od pobrania próbki do jego oznaczenia. W przeszczepieniu autologicznych k.k. procedura pozyskania przeszczepu oraz jego kliniczne zastosowanie są znacznie oddalone w czasie, stąd też w momencie transplantacji znany jest status mikrobiologiczny materiału transplantacyjnego. Natomiast w przypadku przeszczepienia allogenicznych k.k. pozyskanie oraz przygotowanie komórek do transplantacji i ich przetoczenie choremu wyklucza możliwość uzyskania pełnych informacji dotyczących czystości mikrobiologicznej przeszczepu w momencie jego klinicznego zastosowania. Dlatego tak ważne jest bezwzględne przestrzeganie wszystkich procedur w miejscu pobrania

k.k. oraz w banku komórek podczas procesów przetwarzania, testowania, magazynowania i transportu.

Zgodnie z ostatnimi opracowaniami, kontaminacja materiału przeszczepowego dotyczy 1,6-4,5% donacji, najczęściej identyfikowanym drobnoustrojem jest koagulazo-ujemny *Staphylococcus*. Dane literaturowe wskazują na obecność w przeszczepie również innych drobnoustrojów, w tym *Bacillus* spp. czy *Pseudomonas aeruginosa* [8]. Do zanieczyszczenia materiału transplantacyjnego może dojść na każdym etapie bankowania – w tym podczas pozyskiwania k.k., przeprowadzania procesów preparatyki, a także rozmrażania krioprezerwowanych preparatów i podawania ich biorcy przeszczepu [5]. Dlatego też ocena czystości mikrobiologicznej donacji powinna obejmować wszystkie etapy przetwarzania komórek. Według Leemhuis i wsp. głównymi źródłami kontaminacji k.k. pozyskanych z mobilizowanej krwi obwodowej są zakażenie cewnika naczyniowego oraz bakteriemia w czasie pobrania [7]. Zgodnie z doniesieniem Romejko-Jarosińskiej i wsp. [22], spośród powikłań związanych z centralnym dostępem żylnym u chorych w trakcie mobilizacji komórek CD34+ do autotransplantacji infekcje stanowią 24%.

Krajowe prawne wytyczne przetwarzania komórek krwiotwórczych

Implementacja unijnych przepisów, tj. Dyrektywy 2004/23/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 31 marca 2004 r. oraz wprowadzających ją w życie Dyrektyw Komisji 2006/17/WE z dnia 8 lutego 2006 roku i 2008/86/WE z dnia 24 października 2006 roku w przepisy państw członkowskich, ujednoliciła zagadnienia związane z transplantacją k.k. W Polsce obecnie obowiązuje Ustawa Transplantacyjna (UT) z dnia 1 lipca 2005 roku z późniejszymi zmianami, ostatnio z 23 marca 2017 roku oraz liczne rozporządzenia Ministra Zdrowia. Zgodnie z powyższymi regulacjami powołano banki komórek, których zadaniem jest przetwarzanie k.k. Organizacja banku komórek wymaga wdrożenia oraz utrzymania SZJ, czyli zgodnie z definicją z UT – struktury organizacyjnej, procedur, procesów i zasobów wpływających w sposób pośredni lub bezpośredni na osiągnięcie i utrzymanie wysokiej jakości. Przetwarzanie k.k. obejmuje wszystkie czynności związane z przygotowaniem, transportowaniem, konserwowaniem i pakowaniem komórek przeznaczonych do stosowania u ludzi. Jednym z istotnych elementów SZJ jest kwalifikacja sprzętu i pomieszczeń oraz walidacja procesów, czyli udokumentowane działanie mające na celu wykazanie, że proces przebiega skutecznie i w sposób powtarzalny oraz spełnia ustalone kryteria akceptacji. Zgodnie z art. 37d UT bank komórek zobowiązany jest do prowadzenia walidacji wszystkich procesów, powinien określić ich krytyczne momenty. Procesy te powinny być kontrolowane w oparciu o wyznaczone kryteria akceptacji. Na banki komórek nałożony jest obowiązek kwalifikacji nie tylko sprzętu i urządzeń technicznych, ale również środowiska procesu.

Punkt 7 art. 27 UT zawiera odwołanie do aktu wykonawczego Ministra Zdrowia, który w drodze rozporządzenia określa wymagania specjalistyczne i sanitarne dla banków tkanek i komórek. Obecnie obowiązujące rozporządzenie datowane jest na 20 listopada 2006 roku. Zgodnie z jego treścią, bank komórek powinien stanowić samodzielny budynek lub zespół budynków. Dopuszcza się lokalizowanie banku

tkanek i komórek w budynku o innym przeznaczeniu, pod warunkiem oddzielenia jego pomieszczeń od pomieszczeń innych użytkowników budynku. Istotne jest organizacyjne wyodrębnienie jednostki przetwarzającej komórki. W rozporządzeniu tym określone są również konkretne wymagania dotyczące praktycznego rozkładu pomieszczeń oraz urządzeń w pomieszczeniach. Warunkiem koniecznym dla rozpoczęcia pracy w pomieszczeniach jest m.in. uzyskanie pozytywnej opinii Sanepidu. W pomieszczeniach, w których przetwarzane są komórki, wszystkie powierzchnie płaskie, tj. ściany, sufity oraz podłogi, powinny być wykonane z gładkich oraz zmywalnych materiałów. Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia w sprawie wymagań fachowych i sanitarnych dla banków tkanek i komórek, k.k. przeznaczone do przeszczepienia, niepoddawane końcowej sterylizacji, a pakowane w kontakcie ze środowiskiem zewnętrznym, muszą być przetwarzane i pakowane w czystości bakteriologicznej powietrza klasy A. Te oraz inne szczegółowe wymagania pozwalają na przeprowadzenie preparatyki komórek w warunkach bezpiecznych dla materiału transplantacyjnego.

Kolejnym aktem prawnym, istotnym dla zachowania mikrobiologicznego bezpieczeństwa przeszczepu jest Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 9 października 2008 roku w sprawie wymagań, jakie powinien spełniać system zapewnienia jakości w bankach tkanek i komórek. Spełnienie wymogów rozporządzenia nakłada na bank komórek obowiązek wdrożenia oraz utrzymania m.in. instrukcji obejmujących sposób dezynfekcji, czyszczenia i konserwacji pomieszczeń banku komórek, jak również instrukcji opisujących sposób konserwacji, przeglądów, czyszczenia i dezynfekcji sprzętu.

Międzynarodowe standardy akredytacji pobierania, przetwarzania oraz podawania komórek krwiotwórczych – Foundation For The Accreditation of Cellular Therapy-Join Accreditation Committee ISCT-EBMT (FACT-JACIE) oraz standardy National Marrow Donor Program (NMDP)

Międzynarodowe standardy akredytacji FACT-JACIE dla jednostek przetwarzających k.k. ujęte są w części D 6 edycji wytycznych. Zgodnie z nimi jednostki, które zajmują się przetwarzaniem komórek, muszą podlegać akredytacji rządowych organów nadzorujących ich aktywność. Jednostki przetwarzające k.k. muszą spełniać wymogi odnośnie do ich lokalizacji oraz układu przestrzennego dla prowadzonej działalności. Wskazuje się na utrzymanie odpowiedniej wymiany powietrza w pomieszczeniach. Układ przestrzenny w banku komórek powinien chronić materiał transplantacyjny przed kontaminacją. W przypadku gdy w jednostce wykonywane są procedury wykraczające poza minimalne manipulacje lub praca z materiałem transplantacyjnym wymaga otwarcia systemu, czyli narażenia na kontakt z powietrzem, wówczas jednostka musi spełnić standardy

ISO-14644. Norma ta została zaakceptowana przez Europejski Komitet ds. Normalizacji (CEN) i uznana jest również przez Polski Komitet Normalizacyjny [23]. Na uwagę zasługuje fakt braku w normie szczegółowych wytycznych, które jednoznacznie regulowałyby miejsca kontroli czystości mikrobiologicznej powietrza. Tym samym każdy ośrodek sam musi wypracować własne procedury. W kwestii pracy w systemie otwartym europejskie standardy są bardziej szczegółowo określone. Zgodnie z Unijną Dyrektywą 2006/86/EC ujmującą standardy GMP, otwarcie systemu przetwarzania komórek wymaga spełnienia warunków charakterystycznych dla klasy czystości A – zarówno w zakresie pomiaru cząstek, jak i oceny czystości mikrobiologicznej powietrza. Regulacje w odniesieniu do pracy w systemie zamkniętym zawarte są również w standardach FACT-JACIE ujmując konieczność kontroli metod sanizacji. Istotne jest usystematyzowanie stosowanych w tym celu metod, w odpowiednich standardowych procedurach operacyjnych (*standard operating procedures – SOP*). Zgodnie z wytycznymi, podczas gdy blaty stołów laboratoryjnych, komory z laminarnym przepływem sterylnego powietrza oraz urządzenia, najczęściej czyszczone mogą być przez personel jednostki przetwarzającej komórki, dbanie o czystość sufitu, ścian oraz podłóg można zlecić jednostkom zewnętrznym. Co istotne, wszystkie osoby zaangażowane w prace porządkowe muszą przestrzegać obowiązujących w jednostce SOP odnośnie do prac porządkowych, a ich aktywność należy dokumentować.

Zgodnie z 23. edycją standardów NMDA (*23rd Edition Standards and Glossary*), ośrodek przeszczepiający powinien przeprowadzić testy identyfikujące mikrobiologiczną, z wyszczególnieniem bakterijną lub grzybiczą, kontaminację materiału transplantacyjnego. W praktyce zalecenie to oznacza konieczność wykonania posiewów beztlenowych oraz tlenowych. Standardy te nie zawierają treści odnoszących się do utrzymania czystości w pomieszczeniach, w których przetwarzane są komórki przeznaczone do transplantacji, jak również do badania czystości mikrobiologicznej powietrza.

Podsumowując, wymogi względem jednostek zajmujących się pobieraniem, przetwarzaniem oraz dystrybucją k.k. w kontekście mikrobiologicznego bezpieczeństwa przeszczepu k.k. ujęte są zarówno w krajowych przepisach prawnych, jak i w międzynarodowych standardach. Zawierają one podstawowe wytyczne dla banków tkanek i komórek, jednostek pobierających oraz ośrodków dawców. Szczegółowe regulacje dotyczące postępowania z materiałem k.k. w banku powinny być zaakceptowane przez Krajowe Centrum Bankowania Tkanek i Komórek. Dla bezpieczeństwa transplantacji i uzyskania pomyślnych wyników leczenia ważne jest przestrzeganie wdrożonych przez bank procedur, instrukcji oraz wytycznych opracowanych przez jednostkę. Nie mniej ważna jest bieżąca analiza doniesień naukowych oraz praktyka ośrodka.

Piśmiennictwo/References

- [1] Hequet O. Hematopoietic stem and progenitor cell harvesting: technical advances and clinical utility. *J Blood Med* 2015;6:55–67.
- [2] Demiriz IS, Tekgunduz E, Altuntas F. What is the most appropriate source for hematopoietic stem cell transplantation? Peripheral stem cell/bone marrow/cord blood. *Bone Marrow Research* 2012;1–5.
- [3] Borowska H, Klimek P, Cioch M. Otrzymywanie obwodowych komórek krwiotwórczych oraz badanie ich żywotności w produkcji aferezy przed i po krioprezerwacji. *Diagn Lab* 2014;50(3):249–254.
- [4] Humpe A, Buwitt-Beckemann U, Gramatzk M. When do I (not) release cellular products? *ISBT Science Series*, 2010;141–147.
- [5] Larrea L, de la Rubia J, Soler MA, et al. Quality control of bacterial contamination in autologous peripheral blood stem cells for transplantation. *Haematologica* 2004; 89(10):1232–1237.
- [6] Farrington M, Matthews I, Marcus R, Scott MA, Caffey E, Hunt CJ. Contamination of bone marrow transplants from peripheral blood. *Br Med J* 1994;309:958.
- [7] Leemhuis T, Padley D, Keever-Taylor C, Niederwieser D, Teshima T, Lanya F, et al. Essential requirements for setting up a stem cell processing laboratory. *Bone Marrow Transplantation* 2014;49:1098–1105.
- [8] Kozłowska-Skrzypczak M, Bembnista E, Kubiak A, Matuszak P, Schneider A, Komarnicki M. Microbial contamination of peripheral blood and bone marrow hematopoietic cell products and environmental contamination in a stem cell bank: a single-center report. *Transplant Proc* 2014;46(8):2873–2876.
- [9] Rowley SD, Davis J, Dick J, Braine HG, Charache P, Saral R, et al. Bacterial contamination of bone marrow grafts intended for autologous and allogeneic bone marrow transplantation. *Transfusion* 1988;28:109–12.
- [10] Kamble R, Pant S, Selby GB, et al. Microbial contamination of hematopoietic progenitor cell graft-incidence, clinical outcome, and cost effectiveness: an analysis of 735 grafts. *Transfusion* 2005;45(6):874–878.
- [11] Richter E, Tapernon K, Friedrich AW, Sibrowski W, Schmitz G. Sterility testing of blood stem cell products is possible in the presence of 1 ml of a DMSO containing stem cell product. *Vox Sanguinis* 2010; 99(1):1068.
- [12] Antoniewicz-Papis J, Poglód R, Lachert E. Terapia komórkowa ze szczególnym uwzględnieniem mobilizacji i pobierania komórek macierzystych do przeszczepienia. *Journal of Transfusion Medicine* 2010;3(3):99–105.
- [13] Almeida D, Schmalfluss T, Röhsig LM, Goldani LZ. Autologous transplant: microbial contamination of hematopoietic stem cell products. *Braz J Infect Dis* 2012;16(4):345–350.
- [14] Cassens U, Ahlke C, Garritsen H, et al. Processing of peripheral blood progenitor cell components in improved clean areas does not reduce the rate of microbial contamination. *Transfusion* 2002;42:10–17.
- [15] Arlet G, Gluckman E, Gerber F, Perol Y, Hirsch A. Measurement of bacterial and fungal air counts in two bone marrow transplant units. *J Hosp Infect* 1989;13:63–69.
- [16] Kaiser K, Wolski A. Kontrola czystości mikrobiologicznej powietrza. *Technika chłodnicza i klimatyzacyjna* 2007;4:158–162.
- [17] Cobo F, Concha Á. Environmental microbial contamination in a stem cell bank. *Lett Appl Microbiol* 2007;44(4):379–386.
- [18] Bitkover CY, Marcusson E, Ransjö U. Speed of coagulase-negative Staphylococci during cardiac operations in a modern operating room. *Ann Thorac Surg* 2000;69:1110–1115.
- [19] Attarian H, Bensinger WI, Buckner CD, McDonald DL, Rowley SD. Microbial contamination of peripheral blood stem cell collections. *Bone Marrow Transplant* 1996;17(5):699–702.
- [20] Stroncek DF, Fautsch SK, Lasky LC, Hurd DD, Ramsay NK, McCullough J. Adverse reactions in patients transfused with cryopreserved marrow. *Transfusion* 1991;31(6):521–526.
- [21] Namdaroglu S, Tekgunduz E, Bozdogan SC, et al. Microbial contamination of hematopoietic progenitor cell products. *Transfusion and Apheresis Science* 2013;48:403–406.
- [22] Romejko-Jarosińska J, Paszkiewicz-Kozik E, Szymczak M, Walewski J. Częstość powikłań związanych z centralnym dostępem żylnym u chorych w trakcie mobilizacji komórek CD34 do autotransplantacji. XII Kongres Polskiego Towarzystwa Transplantacyjnego, Gdańsk 2015.
- [23] http://drug.fda.moph.go.th/drug/zone_gmp/files/GMP2549_2/Aug2106/7.ISO14644.pdf