

TRALI — patogeneza, metody diagnostyczne i metody ograniczania ryzyka

(w świetle doniesień prezentowanych na 21. Regionalnym Zjeździe Międzynarodowego Towarzystwa Przetaczania Krwi [ISBT] w Lizbonie 18–22 czerwca 2011 roku)

Ewa Brojer

Instytut Hematologii i Transfuzjologii

Podobnie jak na wszystkich ostatnich zjazdach *International Society on Blood Transfusion* (ISBT), tak i na zjeździe w Lizbonie w wielu wykładach i doniesieniach poruszane były zagadnienia odnoszące się do patogenezy, diagnostyki, częstości występowania ostrego poprzetoczeniowego uszkodzenia płuc (TRALI, *transfusion related acute lung injury*) oraz metod ograniczania ryzyka tego najgroźniejszego obecnie powikłania poprzetoczeniowego. Dane na ten temat przedstawiane były przez Smoleńską-Sym i Maślanę w sprawozdaniu ze zjazdu w Berlinie [1], jednak ze względu na to, że zagadnienie to jest nadal niewystarczająco poznane, w swoim sprawozdaniu przedstawię treść wysłuchanych w Lizbonie wykładów na ten temat.

Pierwszy z tych wykładów przedstawiła dr Fung z Australii, przewodnicząca Grupy Roboczej ds. Immunologii Granulocytów [2, 3]. Zagadnienia związane z TRALI poruszane były również przez Kjeldsen-Krach [4] i Husebekk [5] z Norwegii. Jak wiadomo TRALI jest rzadkim, lecz ciężkim powikłaniem poprzetoczeniowym, obarczonym wysokim ryzykiem śmierci pacjenta. Najczęściej występuje po podaniu składników krwi zawierających osocze — po świeżo mrożonym osoczu (FFP, *fresh frozen plasma*) i po koncentratkach krwinek płytkowych (KKP). Częstość występowania TRALI ocenia się na 1/432 000 do 1/88 000. Znaczne różnice w ocenie częstości występowania wynikają z różnych definicji TRALI oraz różnych sposobów diagnostyki tego powikłania. Według danych przedstawionych przez Fung, w latach 1996–2009 TRALI było przyczyną 30,4% śmiertelnych powikłań poprzetoczeniowych (42/138) zarejestrowanych w prowadzo-

nym w Wielkiej Brytanii programie *Serious Hazards of Transfusion* (SHOT).

Patogeneza tego powikłania nie jest do końca poznana, lecz wiadomo, że kluczową rolę w jego powstaniu odgrywają neutrofile. Znaczna część tych komórek (~28%) znajduje się w płucach, gdzie uczestniczą w obronie organizmu przed mikroorganizmami. Rolę tę pełnią poprzez fagocytozę mikroorganizmów oraz ich niszczenie w wyniku wydzielania enzymów oraz uwalniania aktywnych form tlenu. Granulocyty znajdujące się w płucach mają różny stopień aktywacji — od stanu spoczynkowego (*resting*), poprzez stan zainicjowanej aktywności (*primed*) i stan zaktywowania. Neutrofile, których aktywność została zainicjowana (*primed*), reagują bardzo silnie na kolejne bodźce; ich wybuch tlenowy jest 4–5-krotnie silniejszy niż granulocytów, które nie zostały pobudzone. Właśnie na tej obserwacji opiera się powszechnie obecnie uznawany model patogenezy TRALI. W wyniku zasadniczej choroby, na którą cierpi biorca krwi, jego neutrofile ulegają pobudzeniu do stanu gotowości („priming”) i następuje ich zwiększona sekwestracja w płucach. W wyniku transfuzji dochodzi do uwolnienia wielu czynników, tak zwanych *biological response modifiers* (BRM), które doprowadzają do aktywacji neutrofilii, a następnie do uszkodzenia endotelium i przesiąkania naczyń włosowatych. Wywołuje to objawy kliniczne ostrego uszkodzenia płuc (ALI, *acute lung injury*). Czynniki BRM mogą być przeciwciała skierowane do leukocytów (mówi się wtedy o TRALI o podłożu immunologicznym) lub inne czynniki, takie jak na przykład cytokiny, czy rozpuszczalne ligandy, na przykład sCD40L.

Adres do korespondencji: prof. dr hab. n. med. Ewa Brojer, Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. Indry Gandhi 14, 02–776 Warszawa, e-mail: ebrojer@ihit.waw.pl

Udział przeciwciał skierowanych do leukocytów w patogenezie TRALI nie budzi wątpliwości. Istnieje na to wiele dowodów. W około 80% przypadków TRALI badania diagnostyczne wykazują obecność przeciwciał do leukocytów w osoczu dawcy(-ów), od których pobrano składniki krwi przetoczone choremu. Opisywano też udział przeciwciał, które wykryto u chorych, a które reagują z leukocytami obecnymi w przetoczonym składniku krwi. Ten ostatni mechanizm jest obecnie rzadziej spotykany, ponieważ coraz częściej leukocyty są usuwane z krwi i jej składników (tzw. zubożenie w leukocyty) przed podaniem ich biorcom. Przeciwciała aglutynują komórki, które noszą odpowiednie antygeny lub przynajmniej się z nimi wiążą, co powoduje dalszą kaskadę zjawisk immunologicznych. Immunologiczny mechanizm TRALI, oparty na działaniu przeciwciał, został udowodniony w badaniach *in vitro* i na modelach zwierzęcych. Przeciwciała uczestniczące w tym procesie mogą być skierowane do antygenów HLA klasy I, jak i klasy II oraz do swoistych antygenów granulocytarnych (HNA). Nie do końca wiadomo, dlaczego przeciwciała o niektórych swoistościach, na przykład anty-HLA-A2, anty-HLA-B12 oraz anty-HNA-3a częściej niż inne są odpowiedzialne za TRALI. Przeciwciała skierowane do antygenów HLA klasy II nie reagują z granulocytami, ponieważ na tych komórkach nie ma antygenów klasy II. Mogą jednak być odpowiedzialne za TRALI, reagują bowiem z monocytami i aktywują je. Zaktywowane monocyty wydzielają pozapalne cytokiny, które z kolei działają aktywująco na granulocyty.

Fung omówiła szczegółowo zasady i metody badań diagnostycznych, jakie należy wykonać w przypadku podejrzenia TRALI. Grupa badawcza ds. Immunologii Granulocytów zaleca wykonywanie tych badań przy użyciu przynajmniej dwóch testów opartych na różnych zasadach, w tym testów z użyciem neutrofilii utrwalanych formaldehydem za pomocą technik immunofluorescencji (GIFT, *granulocyte immunofluorescent test*) oraz za pomocą testów z użyciem świeżych, nieutrwalanych komórek w teście opartym na badaniu aglutynacji granulocytów (GAT, *granulocyte agglutination test*). Ten ostatni test jest szczególnie istotny w diagnostyce TRALI, ponieważ jest on najlepszym testem do wykrywania przeciwciał o swoistości anty-HNA-3a, które mają charakter aglutynin i są często zaangażowane w patogenezie TRALI. Niezwykle istotne w procesie diagnostycznym jest ustalenie swoistości wykrytych przeciwciał. Badania muszą być wykonywane z użyciem zestawu komórek od tak zwanych dawców panelowych, u których swoistość antyge-

nów oznaczono metodami serologicznymi lub częściej metodami molekularnymi. Ustalanie swoistości przeciwciał często oparte jest również na wykorzystaniu testu MAIGA (*monoclonal antibody specific immobilisation of granulocyte antigens*). Ważnym etapem diagnostyki TRALI jest nie tylko wykrycie przeciwciał, ale również udowodnienie, że to właśnie przeciwciała leżały u podłoża odczynu. Należy w tym celu udowodnić, że u chorego występują antygeny/antygen, do którego skierowane są przeciwciała lub wykazać w drodze wykonania tak zwanej krzyżówki, że przeciwciała wiążą się z leukocytami chorego.

Autorka wykładu podkreślała trudności metodyczne, jakie wiążą się z użyciem granulocytów do testów diagnostycznych i do badań. Dla ich rozwiązywania polecała współpracę z 15 laboratoriami działającymi w obrębie Grupy Roboczej ds. Immunologii Granulocytów, do której należy również laboratorium w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii.

Metody badań diagnostycznych TRALI omówiła też Beckers i wsp. [6], przedstawiając wyniki dotyczące przypadków TRALI w Holandii. W Laboratorium Sanquin w każdym przypadku podejrzenia TRALI wykonuje się równolegle badania przy użyciu szeregu testów komórkowych: testu cytotoxyczności zależnej od komplementu (CDC, *complement dependent cytotoxicity*), LIFT (*lymphocyte immunofluorescence test*), GAT (*granulocyte agglutination test*), GIFT (*granulocyte immunofluorescence test*) oraz technik opartych na technice Luminex. W badaniach mających na celu ustalenie swoistości przeciwciał i obecności na komórkach chorego antygenów, do których są one skierowane, stosuje się genotypowanie i fenotypowanie antygenów.

Udowodnienie immunologicznego podłoża większości przypadków TRALI i udziału w jego patogenezie przeciwciał do leukocytów spowodowało, że wiele ośrodków i krajów wprowadziło rekomendacje mające na celu ograniczenie ryzyka tego powikłania. Sprowadzają się one przede wszystkim na odsunięciu od oddawania krwi do celów klinicznych dawców składników krwi, po których wystąpił TRALI i u których wykryto przeciwciała reagujące z komórkami chorego. Krwinki czerwone takich dawców można stosować po ich przemyciu, by usunąć osocze. Kjeldsen-Krach [4] przywoływał zapisy z Biuletynu *American Association of Blood Banks* (AABB) oraz z rekomendacji kanadyjskich, jako przykłady działań zapobiegających TRALI. Fung [2, 3] omówiła bardziej restrykcyjne strategie polegające na niestosowaniu do celów klinicznych osocza i płytek od kobiet, ponieważ u nich

najczęściej występują przeciwciała wywołane przez przebyte cięższe. Strategie te wydają się skuteczne, ponieważ zmniejszyła się częstość występowania TRALI w krajach, które zastosowały wymienione wyżej środki ograniczania ryzyka. Tendencje zmniejszania się częstości TRALI obserwuje się, mimo iż wiedza na temat TRALI poszerza się i klinicyści zwracają uwagę na potencjalny związek objawów ALI z transfuzją, a dodatkowo zdecydowanie poprawia się diagnostyka TRALI. Jednym z przykładów były obserwacje niemieckie zaprezentowane przez Funk i wsp. [7]. Autorzy przeanalizowali częstość przypadków TRALI zgłoszonych do Instytutu Paula Ehrlicha w Langen w latach 1996–2010. W tym okresie zasady diagnostyki TRALI były zgodne z zaleceniami Międzynarodowej Grupy Roboczej do spraw Immunologii Granulocytów i opierały się na badaniach przeciwciał do leukocytów, zarówno przeciwciał do antygenów HLA, jak tych skierowanych do antygenów HNA (*human neutrophil antigens*). W 2009 roku wprowadzono w Niemczech zalecenie, aby nie pobierać osocza od kobiet, które były w ciąży; rekomendacja ta nie dotyczyła pobierania krwi w celu przygotowania KKCz i płytek. Autorzy analizy porównali częstość zgłaszania TRALI, które wystąpiło po podaniu osocza w okresie przed wprowadzeniem rekomendacji (lata 1996–2007), w trakcie jej wprowadzania (lata 2007–2009) i po jej wprowadzeniu (rok 2010). Częstość TRALI o podłożu immunologicznym i nieimmunologicznym w kolejnych analizowanych okresach sukcesywnie spadała z 13/milion jednostek FFP, przez 8/milion aż do 0 w roku 2010. W roku 2010 rozpoznano 3 przypadki TRALI o podłożu nieimmunologicznym oraz jeden przypadek TRALI o charakterze immunologicznym, który wystąpił po podaniu KKCz, a w 2009 roku jeden przypadek TRALI zakończony śmiercią chorego po podaniu KKP pochodzącego od kobiety, która miała swoiste przeciwciała anty-HNA-3.

We wspomnianej wcześniej pracy holenderskiej Beckers i wsp. [6] przedstawiono podsumowanie obserwacji dotyczących TRALI w latach 2005–2009. Porównano wyniki badań za pomocą różnych testów i wykazano, że testy oparte na technologii Luminex są najbardziej skuteczne w potwierdzaniu immunologicznego podłoża TRALI. Analizie poddano 91 kolejnych przypadków tego powikłania. W 62 z nich wykryto przeciwciała w surowicy dawców, a w 44 przypadkach udowodniono niezgodność dawcy i biorcy krwi w zakresie antygenów, do których przeciwciała te były skierowane. Ogółem poddano analizie 451 dawców i przeciwciała wykryto u 118 z nich. Spośród tych 118

przypadków 43 składniki krwi były przygotowane z krwi pobranej od mężczyzn, a 75 od kobiet.

Przypadek TRALI po przetoczeniu FFP pochodzącego od kobiety, u której wykryto przeciwciała do antygenów HLA klasy I i HLA klasy II przedstawił zespół (Canals i wsp.) kierowany przez Muniz-Diaz z Hiszpanii [8]. Przeciwciała te miały silne właściwości aglutynujące. Ich swoistość określono jako anty-HLA-B35, DRB1*01 i DQB*05. Antygeny te wykryto na leukocytach chorego. Stosując testy MA-IGA i GIFT wykluczono, by wykryte przeciwciała swoiście reagowały z antygenami granulocytów.

Pinheiro i wsp. z Narrington w Stanach Zjednoczonych [9] przedstawili 2 przypadki TRALI zgłoszone jako powikłania poprzetoczeniowe i zdiagnozowane w ciągu ostatniego roku w 2 miejscowych szpitalach klinicznych, w których łącznie przeprowadza się 17 000 transfuzji rocznie. Oba powikłania wystąpiły po przetoczeniu KKCz. W obu przypadkach były to KKCz od dawców płci żeńskiej, u których wykryto przeciwciała anty-HLA klasy II. Ustalono swoistość tych przeciwciał i potwierdzono obecność odpowiednich antygenów u chorych, u których wystąpiły odczyny. Autorzy doniesienia podkreślali, że objętość osocza dawcy, która pozostaje w KKCz nie jest wystarczająco dokładnie monitorowana, a może być wystarczająca dla spowodowania TRALI.

Zespół badaczy holenderskich [10] porównał czas przechowywania 252 składników krwi, które były przyczyną TRALI u 60 chorych (grupa badana) z czasem przechowywania 116 567 składników krwi, po których nie obserwowano żadnego powikłania (grupa kontrolna). Do analizy porównawczej zastosowano odpowiednie narzędzia statystyczne. Dla FFP i dla KKCz nie wykazano różnic w „wieku” składników między grupami. Stwierdzono natomiast, że KKP, po których wystąpił TRALI były średnio 2,2 dnia starsze niż te, które odczynu nie spowodowały. Autorzy ustalili, że względne ryzyko TRALI po przetoczeniu płytek przechowywanych przez 3–4 dni w porównaniu z płytkami przechowywanymi 2 dni jest 3,5-krotnie wyższe. Ryzyko to jest ponad 20-krotnie wyższe dla płytek przechowywanych przez ponad 7 dni. We wnioskach autorzy stwierdzili, że obok stosowanych powszechnie środków przeciwdziałania TRALI (pobieranie osocza do użytku klinicznego wyłącznie od mężczyzn, co powoduje spadek częstości TRALI o połowę), należy zwracać uwagę na czas przechowywania KKP przed podaniem choremu. W dyskusji nad przedstawionymi wynikami podnoszono jednak pewne ograniczenia przeprowadzonych badań, między innymi brak analizy wykrywania przeciwciał

w badanej grupie i nieuwzględnienie sposobu przygotowywania składników krwi. Dyskutanci uważali, że wnioski autorów o wpływie czasu przechowywania KKP przed przetoczeniem na ryzyko wystąpienia TRALI są niewystarczająco udokumentowane.

Piśmiennictwo

1. Smoleńska-Sym G., Maślanka K. Potransfuzyjna ostra niewydolność oddechowa. *J. Trans. Med.* 2010; 3, 109–111.
2. Fung Y.L. TRALI Investigation Insights. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 66.
3. Fung Y.L. Transfusion-related acute lung injury investigation insights. *ISBT Science Series* 2011; 6 (1): 206–211.
4. Kjeldsen-Kragh J. Challenges in testing for platelet-related adverse events *ISBT Science Series* 2011; 6 (1): 124–128.
5. Husenbekk A. Complications of the transfusion of blood and blood components. *ISBT Science Series* 2011; 6 (1): 76–80.
6. Beckers E.A.M., Porcelijn L., van Stein D. i wsp. Detection of donor leukocyte-reactive antibodies 91 consecutive TRALI cases: Evaluation of Cellular-Based vs. Bead-Based Techniques. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 66.
7. Funk M.B., Guenay S., Lohmann A., Henseler O., Keller-Stanisławski B. Benefit of TRALI Risk Reducing Measures — German Haemovigilance Data. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 321, 121.
8. Canals C., Jimenez-Marco T., Udina M. i wsp. A fatal TRALI case induced by HLA class I and class II antibodies present in a FFP unit from a female donor. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 288.
9. Pinheiro L., Tavares M., Sweeney J.D. Two cases of TRALI from red cell concentrates containing anti HLA class II antibodies. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 67.
10. Middelburg R.A., Botkent B., Jansen M. i wsp. Old blood products and TRALI. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 67.