

Metody inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi

Elżbieta Lachert¹, Jolanta Antoniewicz-Papis²

¹Zakład Zapewnienia Jakości i Organizacji Służby Krwi Instytutu Hematologii i Transfuzjologii

²Zakład Diagnostyki Hematologicznej i Transfuzjologicznej Instytutu Hematologii i Transfuzjologii

Wprowadzenie nowoczesnych metod pobierania i preparatyki krwi, rygorystyczne zasady kwalifikacji dawców oraz opracowanie i wdrażanie czułych testów oznaczania czynników chorobotwórczych znacznie ogranicza ryzyko związane z przetoczeniem składników krwi, chociaż całkowicie go nie eliminuje. Należy nadal liczyć się z zagrożeniami związanymi z przeniesieniem bakterii, szczególnie w przypadku koncentratu krwinek płytkowych (KKP) przechowywanych w temperaturze pokojowej, pojawianiem się nowych czynników chorobotwórczych, dla których nie opracowano jeszcze skutecznych testów lub czynników chorobotwórczych nie oznaczanych rutynowo. Z tych względów ośrodki naukowe od wielu lat opracowują metody inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi, na podstawie doświadczeń zdobytych podczas opracowywania metod inaktywacji czynników chorobotwórczych w procesie frakcjonowania produktów krwiopochodnych. Zjazdy ISBT stanowią doskonałą okazję do wymiany doświadczeń na temat wdrażania metod inaktywacji oraz oceny jakości inaktywowanych składników krwi.

Inaktywacja czynników chorobotwórczych w składnikach krwi

Metody inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi szeroko omówiono podczas sesji plakatowej oraz sesji plenarnych (w sprawozdaniu przedstawiono wybrane prace dotyczące inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi z uwzględnieniem najnowszych doniesień na temat metod inaktywacji). Podczas sesji

dotyczących Systemu Zarządzania Jakością przedstawiono pracę, w której na podstawie wstępnych wyników badań żywotności i aktywacji leukocytów w KKP, porównywano zastosowanie Systemu Mirasol jako rozwiązania alternatywnego w stosunku do napromieniania [1]. Podobnie jak w latach poprzednich, podczas sympozjum satelitarnego przedstawiono możliwości zastosowania Systemu Intercept do inaktywacji czynników chorobotwórczych w osoczu i KKP.

W ramach sesji plakatowej przedstawiono 51 oryginalnych prac z zakresu inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi za pomocą czterech rutynowo stosowanych metod: z błękitem metylenowym (Macotronic Theraflex), chlorodorkiem amotosalenu (System Intercept), ryboflawiną (System Mirasol) i SD (OctaplasLG®). Porównanie tych metod przedstawiono w tabeli 1.

Inaktywacja czynników chorobotwórczych z zastosowaniem błękitu metylenowego (Macotronic Theraflex System)

Metodzie inaktywacji z zastosowaniem błękitu metylenowego, opracowanej przez niemieckich naukowców i unowocześnionej przez firmę Maco-Pharma, poświęcono kilka prac. Przede wszystkim oceniano jakość osocza lub krioprecypitatu, otrzymanego z osocza poddanego inaktywacji. Oceniano podstawowe parametry, takie jak czynnik VIII i fibrynogen, jak również organizację pracy w centrum krwiodawstwa po wdrożeniu metody inaktywacji do rutynowej pracy [2–4]. W pracy Knuever-Hopfa

Tabela 1. Porównanie czterech metod inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi**Table 1.** Comparison of four pathogen inactivation methods in blood components

	Ryboflawina	Chlorowodorek amotosalenu (S-59)	Błękit metylenowy (BM)	Solvent/Detergent (SD)
Aktywny związek	Ryboflawina i UV	Psoralen (S-59) i UVA	Błękit metylenowy i światło widzialne	Rozpuszczalnik i detergent
Pierwotny cel	Kwasy nukleinowe	Kwasy nukleinowe	Kwasy nukleinowe	Błony lipidowe
Wtórny cel	Białka i tłuszcze (?)	Białka i tłuszcze (?)	Białka i tłuszcze (?)	Brak
Toksyczność związku	Brak	Wysoka	Mała	Mała
Usuwanie związku	Nie usuwa się	TAK (CAD, <i>compound absorbing device</i>)	TAK Specjalne filtry	TAK (ekstrakcja olejowa i chromatografia hydrofobowa)
Ilość aktywnego związku	Małe ilości ryboflawiny i jej fotoproduktów — fizjologicznie obecne we krwi	Małe ilości wolnego S-59* oraz jego fotoproduktów	Małe ilości wolnego BM* oraz jego fotoproduktów	Nieoznaczalne lub poniżej poziomu toksycznego
Trwałe łączenie z tłuszczami i/lub białkami w osoczu	Nie stwierdzono	13% łączy się z tłuszczami i 1–2% z białkami	Białka łączą się barwnikami fenotiazynowymi	Nie łączą się z białkami ani lipidami
Tworzenie się nowych antygenów lub autoprzeciwciał	Nie stwierdzono	Nie stwierdzono	Nie stwierdzono	Nie stwierdzono

*Właściwości mutagenne, mało prawdopodobne, ale niewykluczone

i wsp. udowodniono, że metoda z zastosowaniem błękitu metylenowego skutecznie inaktywuje ludzki Parwovirus B19, chociaż we wcześniejszych badaniach, z zastosowaniem modelowego świńskiego parwovirusa (PPV, *porcine parvovirus*), wykazano oporność bezotoczkowych wirusów na tę metodę inaktywacji [5]. Próby inaktywacji czynników chorobotwórczych w KKP metodą z błękitem metylenowym okazały się niezadowolające, w związku z czym firma MacoPharma opracowała procedurę inaktywacji KKP, w której zastosowano tylko naświetlanie UVC (Theraflex UV System). Procedurę opisano w 2 pracach. W jednej z nich przedstawiono doświadczenia z przetaczania autologicznych krwinek płytkowych inaktywowanych metodą z UVC. Obserwowano dobrą tolerancję inaktywowanych płytek po przetoczeniu, nie stwierdzono tworzenia nowych antygenów (niewielkie zmiany aktywności białek płytkowych po zastosowaniu UV nie wzbudziły humoralnej odpowiedzi immunologicznej) [6]. W drugiej pracy skoncentrowano się na jakości KKP otrzymywanych metodą aferezy, poddanych inaktywacji z zastosowaniem metody UV i przechowywanych przez okres 7 dni. W porównaniu z grupą kontrolną stwierdzono tylko nieznaczne obniżenie pH,

większe zużycie glukozy i większe stężenie mleczanu w 7. dniu przechowywania [7].

Inaktywacja czynników chorobotwórczych przy zastosowaniu chlorowodoru amotosalenu (System Intercept)

System Intercept zaprezentowano w 20 pracach sesji plakatowej (13 — KKP, 7 — osocze).

W jednej z 13 prac dotyczących KKP, przedstawionej przez pracowników banku krwi szwedzkiego szpitala uniwersyteckiego w Uppsali, porównywano liczbę niepożądanych zdarzeń w następstwie przetoczenia nieinaktywowanych i inaktywowanych KKP. Analiza danych wykazała, że liczba powikłań poprzetoczeniowych zmniejszyła się z 1,1% (KKP bez inaktywacji) do 0,37% po zastosowaniu KKP inaktywowanych przy użyciu systemu Intercept. Żadnych powikłań nie zaobserwowano po przetoczeniu pediatrycznych dawek inaktywowanych KKP [8].

W ramach oceny jakości osocza po inaktywacji w Systemie Intercept oznaczano: straty czynników krzepnięcia VIII, IX, V oraz straty objętości osocza. Straty w stężeniu lub aktywności najczęściej ozna-

czanych czynników krzepnięcia VIII i IX były różne w zależności od procedury preparatyki osocza oraz obowiązującej w danym ośrodku procedury badawczej. Średnia strata czynnika VIII po inaktywacji osocza wynosiła 23,4%, a w przypadku strat czynnika IX — 14% [9, 10].

Inaktywacja czynników chorobotwórczych przy zastosowaniu ryboflawiny (System Mirasol)

Metodę inaktywacji czynników chorobotwórczych w Systemie Mirasol przedstawiono na 23 plakatach; 4 prace dotyczyły wyłącznie osocza, 14 prac — inaktywacji czynników chorobotwórczych w KKP (przechowywanych w osoczu i roztworach wzbogacających), 2 prace dotyczyły inaktywacji leukocytów, 1 przedstawiała dane dotyczące inaktywacji krwi pełnej, a w 2 pracach przedstawiono wyniki inaktywacji limfocytów.

Inaktywacja czynników chorobotwórczych w osoczu

Zastosowanie Systemu Mirasol do inaktywacji czynników chorobotwórczych w osoczu omówili:

- Stanojkovic i Maia, na podstawie parametrów jakości inaktywowanego osocza świeżo mrożonego [11–13];
- Ettinger, na podstawie parametrów jakości inaktywowanego osocza, po roku przechowywania w temp. -18°C [14];
- Lachert, na podstawie porównania parametrów jakości osocza inaktywowanego przed zamrożeniem i po rozmrożeniu. Niezależnie od zastosowanej procedury, osocze spełniało wymogi kontroli jakości. Jednak straty w stężeniu czynników VIII i IX były mniejsze przy inaktywacji przed zamrożeniem, dlatego zaleca się rutynowe wdrożenie tej procedury [15].

Inaktywacja czynników chorobotwórczych w krwi pełnej

Przy masowych krwotokach, nagłych urazach czy innych przypadkach wymagających przetoczenia składników krwi, konieczne może okazać się przetoczenie dużych ilości świeżej krwi pełnej (KP). Ze względu na to, że metoda inaktywacji czynników chorobotwórczych w KP jest w trakcie badań, publikacje na temat skuteczności tej metody są nieliczne. W pracy Reddy i wsp. oceniano jakość krwi pełnej po inaktywacji w systemie Mirasol, przechowywanej w temperaturze pokojowej do 7 dni. Oceniając parametry charakterystyczne dla KKCz (hemoliza, ATP, sól, potas) i dla osocza (APTT, PT)

stwierdzono, że KP poddana inaktywacji w systemie Mirasol (80 J/ml KKCz) wykazuje jedynie niewielką, ale utrzymującą się w zakresie normy, hemolizę w 7. dniu przechowywania [16].

Inaktywacja krwinek białych

Naukowcy reprezentujący Australijski Czerwony Krzyż oraz laboratorium Caridian BCT przedstawili pracę na temat inaktywacji wyizolowanych granulocytów i komórek jednojądrzastych w Systemie Mirasol. Stwierdzili, że metoda ta nie zmienia proporcji subpopulacji leukocytów, nie stwierdzono też zmian w ekspresji markerów powierzchniowych: CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD54, CD86, CD56 i CD11b. Wyniki badań *in vitro* wykazały jednak ograniczenie funkcjonalnych zdolności zarówno komórek jednojądrzastych, jak i granulocytów po zastosowaniu tego systemu inaktywacji. Co więcej, proliferacja limfocytów w odpowiedzi na stymulację fitohemaglutyniną (anty CD3/anty CD28) była znacząco mniejsza w komórkach inaktywowanych w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Ekspresja antygeny CD69 została całkowicie zahamowana po zastosowaniu Systemu Mirasol. Odnotowano także wpływ inaktywacji na żywotność komórek. Po 24 godzinach tylko 30% komórek było żywych w porównaniu z grupą kontrolną (75% komórek żywych). Po zastosowaniu metody inaktywacji 80% komórek ulegało apoptozie (aneksyna V) po 24 godzinach, natomiast w przypadku grupy kontrolnej tylko 6%. Ocena żywotności i inaktywacji limfocytów po zastosowaniu Systemu Mirasol była także przedmiotem badań Antoniewicz-Papis i wsp. [1]. W badaniach wykonanych w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie wykazano statystycznie znamienne wzrost martwych limfocytów po 6 dniach przechowywania KKP po inaktywacji (dwukrotnie wyższy wzrost niż w przypadku KKP napromienianych). Stwierdzono ponadto statystycznie znamienne mniejszą aktywację limfocytów (ekspresja CD 69) w KKP inaktywowanych w Systemie Mirasol niż w grupie KKP kontrolnych i napromienianych w radiatorze Gammacell 3000 Elan. Na podstawie wyników prac można sądzić, że w przyszłości system Mirasol będzie można stosować jako metodę alternatywną do napromieniania. Konieczne są jednak dalsze badania.

Inaktywacja czynników chorobotwórczych w osoczu metodą rozpuszczalnik/detergent

Podczas sesji plenarnej AuBuchon [17] przypomniano zasady działania metody rozpuszczalnik/

/detergent (SD, *solvent/detergent*) wprowadzonej na początku lat 90. do inaktywacji czynników chorobotwórczych w osoczu przeznaczonym do klinicznego stosowania. Od tamtej pory przetoczono ponad 6 mln jednostek osocza SD i nie stwierdzono żadnych powikłań związanych z przeniesieniem wirusów otoczkowych. Co więcej, w następstwie pulowania osocza i jego rozcieńczania prawie do zera zmniejszyło się ryzyko związane z wystąpieniem TRALI. Odnotowano wprawdzie reakcje alergiczne po zastosowaniu osocza SD, ale przypadków takich było 40-krotnie mniej (1/50 000). Z obawy przed zakażeniem wirusami bezotoczkowymi coraz szerzej wdrażano procedury badania osocza metodami biologii molekularnej (HAV; parwovirus B19). W ostatnich latach metoda opracowana przez firmę Octapharma (Octaplas[®]) została zmodyfikowana w formułę OctaplasLG[®]. Inkubacja z ligandem żelowym wiążącym priony przyczyniła się do zmniejszenia liczby patologicznych prionów o ponad 5 log₁₀ – PrP^{Sc} (Sc = Scrapie). Obecnie trwają badania nad inaktywowanym, uniwersalnym osoczem (bez aktywności przeciwciał anty-A i anty-B). Dodatkową korzyścią wynikającą z zastosowania SD do inaktywacji osocza jest standaryzacja, chociaż należy pamiętać, że stężenie czynników krzepnięcia jest o 10–20% niższe niż w przypadku osocza niepoddawanego procedurze SD. W badaniach klinicznych udowodniono, że prawdopodobnie dzięki dobrze zachowanej aktywności ADAMTS-13 osocze inaktywowane metodą SD skutecznie leczy płamicę zakrzepową małopłytkową (TTP, *thrombotic thrombocytopenic purpura*).

Inaktywacja osocza metodą SD stosowana w Europie różni się nieco od metody SD stosowanej w Stanach Zjednoczonych. Stwierdzono, że po przetoczeniu większych ilości osocza SD wytworzonego w Stanach Zjednoczonych pacjenci, szczególnie po przeszczepieniu wątroby, są obciążeni większym ryzykiem powstawania zakrzepów. Nie sprecyzowano wprawdzie przyczyny powstawania zakrzepów, jednak sugeruje się, że powodem może być znacznie niższe stężenie białka S, prawdopodobnie odpowiedzialnego za patologiczną aktywację kaskady krzepnięcia. Z kolei w przypadku osocza SD zarejestrowanego w Europie, dość często stwierdzano hiperfibrinolizę u pacjentów otrzymujących ten rodzaj osocza, poddanych uprzednio przeszczepieniu wątroby.

Podczas sesji plakatowej Heger i wsp. [18] przedstawili ocenę skuteczności metody Octaplas-LG[®] zastosowanej do inaktywacji patologicznych prionów PrP^{Sc}. Stwierdzili także, że jakość osocza jest porównywalna z tym uzyskanym w procedurze Octaplas[®].

Inaktywacja czynników chorobotwórczych w koncentratkach krwinek czerwonych

Prace kliniczne nad wdrażaniem metod inaktywacji czynników chorobotwórczych w koncentratkach krwinek czerwonych są mniej zaawansowane niż prace dotyczące metod inaktywacji czynników chorobotwórczych w osoczu czy koncentratkach krwinek płytkowych. Podobnie jak w przypadku osocza i KKP do inaktywacji krwinek czerwonych próbowano zastosować chlorowodurek amotosalenu, który pod wpływem UVA (reakcja fotochemiczna), wiąże się nieodwracalnie z zasadami kwasów nukleinowych (wiązanie kowalencyjne), powodując inaktywację czynników chorobotwórczych. Metoda ta okazała się nieskuteczna, ponieważ hemoglobina absorbuje światło UVA, uniemożliwiając wbudowanie chlorowodoru amotosalenu do struktury kwasu nukleinowego. Kolejny związek, z którym wiązano znaczne nadzieje, to czynnik S-303, inaktywujący bakterie i wirusy w KKCz poprzez krzyżowe połączenia DNA i RNA w szybkiej reakcji zależnej od pH i niezależnej od światła. Wyniki *in vivo* (odzyskanie i przeżycie krwinek czerwonych inaktywowanych tą metodą) były tylko nieznacznie mniejsze w porównaniu z KKCz niepoddany inaktywacji) były zachęcające, jednakże tworzenie przeciwciał przeciwko inaktywowanym krwinkom czerwonym wymusiło doskonalenie procedury inaktywacji. Rozpoczęto również dodatkowe badania nad określeniem optymalnego środowiska zapewniającego podtrzymanie właściwości fizjologicznych krwinek czerwonych. Powstawanie neoantygenów stanowiło również problem podczas inaktywacji KKCz metodą z inaktywą (PEN 110). Z tego względu badania z inaktywą przerwano.

Sesja poświęcona porównaniu dwóch metod inaktywacji czynników chorobotwórczych w KKP (System Intercept/System Mirasol)

W wykładzie wygłoszonym podczas sesji plenarnej, Gathof [19] zwróciła uwagę na praktyczne zastosowanie dwóch metod inaktywacji czynników chorobotwórczych w KKP: metody z chlorowodorkiem amotosalenu (System Intercept) i metody z ryboflawiną (System Mirasol). Wyniki badań *in vitro* prowadzonych w różnych ośrodkach naukowych potwierdzają zasadność przechowywania krwinek płytkowych do 5 dni po ich inaktywacji. Autorka stwierdza ponadto, że KKP niepoddane inaktywacji oraz KKP poddane inaktywacji z zastosowaniem

jednej z tych metod są równie skuteczne dla pacjentów z małopłytkowością, aczkolwiek w przypadku KKP inaktywowanych w Systemie Intercept obserwuje się obniżenie skorygowanego wzrostu płytek (CCI, *corrected count increment*), prawdopodobnie w wyniku znacznie większej utraty płytek podczas usuwania chlorowodoru amotosalenu (po inaktywacji). Sugeruje się zatem, aby KKP poddawane inaktywacji w Systemie Intercept charakteryzowały się wyższą liczbą płytek (przynajmniej $3,5 \times 10^{11}$). W Niemczech czas przechowywania KKP skrócono do 4 dni, uznano bowiem, że ryzyko związane z przetoczeniowym zakażeniem bakteryjnym jest 50-krotnie wyższe niż w przypadku przetoczeń KKCz. Częstotliwość ciężkich powikłań wywołanych sepsą oceniono na 1:20 000 przetoczeń, a zakażenia bakteryjne po przetoczeniu KKP w jego końcowym okresie przechowywania oszacowano na 1:3 000 przetoczonych jednostek. Migracja ludności powoduje, że pojawiają się nie tylko nowe czynniki chorobotwórcze, ale także, na skutek mutacji, nowe odmiany znanych już wirusów czy bakterii, w stosunku do których nie opracowano jeszcze skutecznych testów (np. SARS, wirus Chikungunya, pasożyty *Trypanosoma Cruzi* i *Plasmodium falciparum*). Podczas wykładu zwrócono również uwagę na fakt, że idealna metoda inaktywacji powinna oddziaływać na wszystkie rodzaje czynników chorobotwórczych: wirusy, bakterie, grzyby, pasożyty i priony, nie uszkadzając aktywnych terapeutycznie komórek krwi. Stosowane związki chemiczne nie mogą być toksyczne, mutagenne ani rakotwórcze. Nie mogą także stymulować powstawania nowych antygenów u biorcy.

W Systemie Intercept krwinki płytkowe zawieszane są w mieszaninie 65-procentowego roztworu wzbogacającego i 35-procentowego osocza, a następnie naświetlane (3 J/cm^2 ; UV-A 320–400 nm) po uprzednim dodaniu syntetycznego psoralenu — chlorowodoru amotosalenu. Pod wpływem naświetlania związek ten tworzy nierozdzielalne krzyżowe połączenia z DNA i RNA zabezpieczające przed replikacją i namnażaniem czynników chorobotwórczych. Po naświetlaniu, chlorowodorek amotosalenu i jego fotoprodukty zostają usunięte w procedurze adsorpcji (*compound adsorption device*) w ciągu 4–16 godzin. Wyniki badań *in vitro* wykazują, że inaktywacja w Systemie Intercept zwiększa aktywność komórek, uwalnia cytokiny i zwiększa glikolizę (obniża pH). Zmiany takie mogą powodować znaczące obniżenie stężenia ATP, zmniejszenie liczby płytek krwi w KKP oraz mniejszą żywotność krwinek płytkowych po ich przetoczeniu.

Badania kliniczne

Przeprowadzono wielośrodkowe badania kliniczne KKP inaktywowanych w Systemie Intercept. W ramach badań euroSPRITE, 103 pacjentom z małopłytkowością przetaczano standardowe KKP otrzymane z kożuszków leukocytarno-płytkowych oraz KKP inaktywowane w Systemie Intercept. Celem badań była ocena skuteczności działania KKP na podstawie CCI, jak również monitorowanie hemostazy i ewentualnych powikłań poprzetoczeniowych. Wyniki badania nie potwierdziły statystycznie znamienych różnic wartości CCI godzinę i 24 godziny po przetoczeniu, aczkolwiek lepsze wyniki uzyskano po przetoczeniu KKP z grupy kontrolnej. Ponad 300 000 jednostek KKP poddano inaktywacji w systemie Intercept, a następnie przetoczono pacjentom w kilkunastu europejskich szpitalach. Program „Czuwania nad bezpieczeństwem krwi” potwierdził taką samą tolerancję przetoczeń oraz bezpieczeństwo KKP zarówno inaktywowanych, jak i kontrolnych. W Niemczech i we Francji obserwowano ciężkie reakcje poprzetoczeniowe, których nasilenie i rodzaj łączono z zastosowaniem roztworów wzbogacających.

W Systemie Mirasol KKP są zawieszane w osoczu lub w mieszaninie osocza z roztworem wzbogacającym, następnie naświetlane po uprzednim dodaniu ryboflawiny ($6,2 \text{ J/cm}^2$; UV). W odróżnieniu od Systemu Intercept, metoda inaktywacji czynników chorobotwórczych w Systemie Mirasol nie wymaga usuwania ryboflawiny. Jest to metoda niezwykle skuteczna nie tylko w stosunku do bakterii, pierwotniaków i wirusów otoczkowych, ale także do Parwowirusa B19. Jakość KKP inaktywowanych w Systemie Mirasol oceniano na podstawie ich właściwości funkcjonalnych i metabolicznych. Ocenie poddawano następujące parametry: odpowiedź na szok hipotoniczny (HSR), stężenie ATP, zdolność do agregacji. W zakresie tych parametrów, różnice pomiędzy grupą KKP kontrolną i grupą KKP poddanych inaktywacji w Systemie Mirasol nie były statystycznie znamienne. System Mirasol dopiero niedawno został opracowany i zarejestrowany w krajach Unii Europejskiej, dlatego liczba prób klinicznych jest znacznie mniejsza niż w przypadku Systemu Intercept. Przytoczone w wykładzie Gathof [19] dane dotyczące przeprowadzonych prób klinicznych, obejmujących przetoczenia honorowym dawcom autologicznych, inaktywowanych i znakowanych izotopem KKP po 5 dniach ich przechowywania pozwalają stwierdzić, że odzyskanie inaktywowanych KKP w krążeniu biorcy było o 25% niższe w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną.

Aspekty prawne dopuszczenia do obrotu inaktywowanych składników krwi

W podsumowaniu zagadnień dotyczących inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi należy również wymienić prezentację przedstawiciela Instytutu Paula Ehrlicha, który zapoznał słuchaczy z aspektami prawnymi dotyczącymi wdrażania metod inaktywacji, a szczególnie z warunkami, które muszą być spełnione, aby metodę dopuszczono do stosowania [20].

Warunki dopuszczenia do obrotu

Z uwagi na to, że procedury dopuszczenia do obrotu poszczególnych składników krwi znacznie różnią się w krajach Unii Europejskiej, Stanach Zjednoczonych, Kanadzie, Australii czy Japonii, odmienne będą także procedury dopuszczenia do obrotu inaktywowanych składników krwi. W wielu krajach dopuszcza się do obrotu tylko urządzenie do inaktywacji, w innych zaś jednostki organizacyjne służby krwi muszą posiadać dopuszczenie do obrotu również dla poszczególnych inaktywowanych składników krwi. Jednak bez względu na to, jakie obowiązują procedury, należy dążyć do jednolitej specyfikacji dla inaktywowanych składników krwi, a ocena procedur w zakresie bezpieczeństwa i toksyczności powinna przebiegać według ogólnie przyjętych zasad. Zarówno stopień inaktywacji bakterii, jak i wirusów powinny być oceniane według podobnych zasad. Należy jednak uwzględniać specyficzne właściwości bakterii, takie jak wzrost w hodowli czy różnice pomiędzy szczepami bakteryjnymi. Precyzyjne zdefiniowanie wymagań dotyczących jakości jest prawie niemożliwe, trudno bowiem znaleźć jednoznaczną i wyraźną korelację pomiędzy parametrami laboratoryjnymi a kliniczną skutecznością danego składnika krwi. Wynika stąd, że każda informacja odnosząca się do skuteczności i jakości inaktywowanego składnika krwi wymaga potwierdzenia w warunkach klinicznych.

Badania przedkliniczne

Wytyczne Międzynarodowej Konferencji do Spraw Harmonizacji (ICH, *International Conference on Harmonization*) dotyczące bezpieczeństwa przedklinicznego zostały przyjęte przez: *Committee for Proprietary Medicinal Products* (CPMP) dla potrzeb Unii Europejskiej, Japońskie Ministerstwo Zdrowia, Pracy i Opieki Społecznej (MHLW, *Ministry of Health, Labour and Welfare*) i *Food and Drug Administration* (FDA) (opublikowane w federalnym rejestrze). Rejestr ten zawiera wytyczne dotyczące prowadzenia badań z zakresu farmakokinetyki,

toksykologii oraz immunotoksykologii, a także w kierunku doboru takiej dawki związku zastosowanego w metodzie inaktywacji, która nie zainicjuje tworzenia się komórek rakowych i uszkodzeń na poziomie genu. Niezbędnym warunkiem dopuszczenia inaktywowanego składnika krwi do dalszych etapów procedury jest potwierdzenie jego nietoksyczności w badaniach przedklinicznych.

Badania jakościowe — inaktywacja wirusów

Równie szczegółowo opisano w rejestrze wymagania dotyczące oceny bezpieczeństwa wirusologicznego; przedstawiono je w formie trójstronnych wytycznych ICH zaakceptowanych przez Unię Europejską, Japonię i Stany Zjednoczone. Dotyczą one doboru wirusów „modelowych” oraz planowania badań oceniających proces inaktywacji. Istotne jest, aby słabe punkty procedury inaktywacji wirusów, wykryte w trakcie walidacji, były należycie udokumentowane. Fakt, że niektóre wirusy są odporne na daną metodę inaktywacji, niekoniecznie oznacza, że metodę inaktywacji należy odrzucić, albowiem bezpieczeństwo krwi zależy również od wielu innych czynników. Inaktywacja czynników chorobotwórczych w składnikach krwi zwiększa bezpieczeństwo ich stosowania, ale nadal obowiązują takie procedury, jak rygorystyczna kwalifikacja dawców oraz oznaczanie markerów wirusologicznych przy użyciu czułych testów zarówno metodami serologicznymi, jak i biologii molekularnej. Podczas wdrażania metody inaktywacji w centrum krwiodawstwa personel musi być poinformowany, w stosunku do jakich czynników chorobotwórczych metoda jest mniej skuteczna. Na przykład, w przypadku inaktywacji osocza za pomocą błękitu metylenowego należy wiedzieć, że metoda ta nie w pełni inaktywuje wirusy bezotoczkowe HAV (*hepatitis A virus*) i parwo B19.

Badania jakościowe — inaktywacja bakterii

Zasady oceny bezpieczeństwa procesu inaktywacji bakterii w składnikach krwi są podobne do zasad oceny skuteczności inaktywacji w przypadku wirusów, aczkolwiek należy zwrócić większą uwagę na warunki preparatyki (temperatura przechowywania, czas inaktywacji itp.) ze względu na specyfikę bakterii. W wyborze modelowych bakterii pomocne są wytyczne Farmakopei Europejskiej na temat badań sterylności komórkowych produktów medycznych. Do badań walidacyjnych można również stosować szczepy wymienione w Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych (ATCC, *American Type Culture Collection*), należy jednak wykazać, że namnażają się one w danym składniku

krwi i reprezentują spodziewane spektrum zanieczyszczeń bakteryjnych. Metodę „modelu” wirusa można zastąpić metodą szczepienia bakteriami. W odróżnieniu od badań z modelowymi wirusami, w badaniu polegającym na szczepieniu bakterii obowiązują dwie strategie: 1. szczepienie dużą liczbą bakterii, aby zdobyć dane na temat zdolności inaktywacyjnych metody, 2. szczepienie małymi liczbami bakterii, aby zaobserwować cechy wzrostu poszczególnych bakterii oraz zdobyć informacje o rzeczywistych warunkach całego procesu preparatyki i inaktywacji. Interpretacja danych z badań nad inaktywacją bakterii powinna uwzględniać fakt, że nawet nieznaczna liczba bakterii resztkowych, które nie poddały się inaktywacji, może namnożyć się i wywołać ciężkie powikłania poprzetoczeniowe. Zatem skuteczność metody inaktywacji bakterii wyraża się nie tylko zmniejszeniem liczby bakterii (log 10), ale także wyznaczeniem optymalnych warunków preparatyki, które zapobiegają namnażaniu bakterii. Bakterie cechuje różna wrażliwość na poszczególne metody inaktywacji. Metoda inaktywacji z użyciem chlorowodoru amotosalenu, niezwykle skuteczna dla bakterii G+ i G- musi w procedurze dopuszczenia uwzględniać ograniczoną skuteczność w przypadku gatunków, takich jak *Pseudomonas aeruginosa* oraz całkowity brak skuteczności w przypadku sporów bakteryjnych *Bacillus cereus* i *Clostridium perfringens*.

Kontrola jakości inaktywowanych składników krwi

Ocena inaktywowanych składników krwi musi przebiegać zgodnie z zasadami obowiązującymi dla składników krwi niepoddawanych inaktywacji, z uwzględnieniem różnic funkcjonalnych, metabolicznych i strukturalnych. Wyniki badań są niezbędne do oceny jakości składnika, nie stanowią jednak wystarczającej podstawy do oceny ich skuteczności klinicznej. Podsumowując, jakość składników krwi w znacznej mierze zależy od przebiegu preparatyki z uwzględnieniem czynników, takich jak: temperatura, czas, wirowanie, oddzielenie i przechowywanie oraz różnice w stosowanej metodzie inaktywacji. Wyniki obserwacji wykazały, że w trzech centrach krwiodawstwa, wyposażonych w identyczną aparaturę do inaktywacji (System Intercept), w których postępowano zgodnie z zaleceniami producenta, uzyskano różnej jakości inaktywowane KKP. W porównaniu z KKP kontrolnymi, utrata właściwości funkcjonalnych w 3. dniu po inaktywacji wahała się od niezmienionej do 20%, a w 6. dniu, od około 20% do 65%. Stwierdzono, że przyczyną były różnice w procesie preparatyki,

w sposobie mieszania płytek z roztworem wzbogacającym oraz w czasie wpływającym między pobraniem KKP (afereza) a procedurą inaktywacji. Należy zatem wnioskować, że na jakość składników komórkowych i osocza do przetoczenia w znacznej mierze wpływają szczegółowe warunki ich otrzymywania. W literaturze można znaleźć przykłady znacznych różnic w zakresie jakości osocza inaktywowanego błękitem metylenowym, których główną przyczyną jest stosowanie różnych systemów. Różnice między jakością osocza inaktywowanego błękitem metylenowym w różnych centrach krwiodawstwa mogą być znaczne, nawet jeśli w każdym przestrzegano zaleceń producenta i stosowano wydajny system usuwania zanieczyszczeń komórkowych i błękitu metylenowego oraz jego fotoproduktów. Haiden przedstawił wyniki z dwóch ośrodków, w których osocze poddawano inaktywacji według tych samych procedur (temperatura, czas wirowania, siła wirowania, identyczna procedura inaktywacji). Stwierdzono jednak różnicę w procesie wytwarzania; inny był czas od pobrania krwi do wirowania oraz od inaktywacji do szokowego zamrożenia. Najistotniejszą różnicą w zakresie jakości była duża strata aktywności fibrynogeny przy wydłużonym czasie wytwarzania (27%) w porównaniu z czasem krótszym (14%). Warto zauważyć, że strata aktywności fibrynogeny w obu przypadkach występowała tylko po naświetleniu, czyli przyczyną różnic jakości był czas wytwarzania.

Badania kliniczne

Centra krwiodawstwa stosują różne procedury inaktywacji składników. Chcąc zapewnić powtarzalną jakość inaktywowanych składników krwi, należy wszystkie etapy produkcji dokładnie zdefiniować i szczegółowo opisać. Stosunkowo niewielkie odchylenia w procesie wytwarzania mogą być przyczyną różnic we właściwościach składnika krwi, a to wpływa na jego bezpieczeństwo i skuteczność terapeutyczną. Należy również pamiętać, że składniki te przetaczane są biorcom, których cechuje większa podatność na infekcje, w związku z tym trzeba dołożyć wszelkich starań, aby za sprawą rygorystycznych badań i prób klinicznych zminimalizować wpływ tych czynników na jakość składników krwi. Poza niewątpliwie bardzo ważnymi badaniami przeprowadzanymi w warunkach *in vitro* najważniejszymi z punktu widzenia bezpieczeństwa biorcy są badania wykonywane *in vivo*. W literaturze przytoczono wiele przykładów niewłaściwie przeprowadzonych badań fazy III. Najważniejsze etapy badań klinicznych dla składników krwi to: 1. właściwy dobór parametrów klinicznych (nielaborato-

ryjnych), 2. właściwy dobór metod statystycznych, 3. wyraźne zdefiniowanie celu, 4. właściwy dobór grup kontrolnych, 5. porównanie skuteczności terapeutycznej składników kontrolnych i inaktywowanych, na przykład pod względem liczby płytek, objętości osocza itp. Dowiedziono, że inaktywacja czynników chorobotwórczych zmniejsza aktywność i liczbę białek osocza w FFP (*fresh frozen plasma*), a także liczbę płytek w KKP, dlatego zaleca się w fazie III badań klinicznych przetaczanie takiej liczby odpowiednich białek czy płytek, jaka jest zawarta w nieinaktywowanych składnikach krwi stanowiących grupę kontrolną.

Warunkiem jednoznacznej oceny diagnostycznej oraz oceny potencjalnych reakcji niepożądanych, tak ważnych dla bezpieczeństwa składników krwi jest przestrzeganie zasad dobrej praktyki klinicznej przez wszystkie centra krwiodawstwa i ośrodki badawcze. Wiele z dotychczasowych badań nad metodami inaktywacji prowadzono w niewystarczająco dobrze zaplanowanych warunkach, w związku z czym nie kwalifikują się one do oceny skuteczności klinicznej i nie można uznać ich za źródło niepodważalnych dowodów.

Wymagania po dopuszczeniu do użycia

Krew i jej składniki przetaczane są na ogół ciężko chorym, u których mogą wystąpić powikłania niedające się przewidzieć na etapie badań przedklinicznych i klinicznych. Co więcej, liczba chorych wybranych do badań może okazać się zbyt mała, aby stwierdzić rzadkie działania niepożądane, jak na przykład tworzenie nowych antygenów podczas wielokrotnego, obejmującego długi okres leczenia, przetaczania inaktywowanych składników krwi. W zależności od wiedzy na temat profilu bezpieczeństwa i rodzaju metod inaktywacji czynników chorobotwórczych, należy przewidzieć konieczność aktywnego monitorowania jakości inaktywowanych składników krwi. Monitorowanie obejmuje przede wszystkim walidację całego procesu otrzymywania inaktywowanych składników krwi oraz rozwiązywanie problemów związanych z wystąpieniem zdarzeń niepożądanych lub powikłań poprzetoczeniowych po zastosowaniu inaktywowanych składników krwi.

Piśmiennictwo

- Antoniewicz-Papis J., Woźniak J., Krzywdzińska A. i wsp. Lymphocyte survival/activation in stored platelet concentrates following gamma-irradiation or pathogen reduction technology treatment. *Vox Sang.* 2010; 99 (supl. 1): 3D-S10-02.
- Król D., Drybańska B., Zyla J., Bukowy M., Dyląg S. Usefulness of plasma subjected to pathogen reduction for cryoprecipitate production. *Vox Sang.* 2010; 99 (supl. 1): 239.
- Galuszka W., Bojarska E., Augustyniak Z. Infectious agents inactivation of human plasma with the theraflex methylene blue system. *Vox Sang.* 2010; 99 (supl. 1): 246–247.
- Strauss Patko M. Routine fresh frozen plasma manufacture with pathogen inactivation by methylene blue (theraflex MB-Plasma). *Vox Sang.* 2010; 99 (supl. 1): 253.
- Knuever-Hopf J., Schaefer W., Groener A. Human parvovirus in plasma is highly sensitive to methylene blue/light treatment. *Vox Sang.* 2010; 99 (supl. 1): 240.
- Pohler P., Legmann J., Veneruso V. Lack of antibody formation to plasma and platelet neoantigens after transfusion of USC-irradiated platelet concentrates in an autologous animal model. *Vox Sang.* 2010; 99 (supl. 1): 255.
- Castrillo A., Arcas C., Martinez-R.N. *In vitro* quality of apheresis platelets treated with the theraflex uv-system for pathogen inactivation. *Vox Sang.* 2010; 99 (supl. 1): 250.
- Löf H., Joelsson Saxner A., Knutson F. Pathogen inactivated platelets decrease transfusion reactions. *Vox Sang.* 2010; 99 (supl. 1): 240–241.
- Lehmann C., Rummler S., Kummer C., Barz D. Pathogen inactivation of single donor plasma. *Vox Sang.* 2010; 99 (supl. 1): 242.
- Saldado W., Le Yondre F., Perrault M. Process validation of the Intercept blood system™ for pathogen inactivation of apheresis plasma at a regional centre (efs-Centre Atlantique). *Vox Sang.* 2010; 99 (supl. 1): 254.
- Stanojkovic Z., Antic A. the influence of riboflavin and ultrafiolet light on quality of fresh frozen plasma. *Vox Sang.* 2010; 99 (supl. 1): 239.
- Maia S., Dobao M.L., Queiros L. Mirasol® treated plasma evaluation at Centro Regional de Sangue do Porto. *Vox Sang.* 2010; 99 (supl. 1): 245.
- Maia S., Cardoso M., Oliviera N. Flexibility of the system Mirasol PRT to adapt to a blood bank routine—the experience of CRSP, Porto. *Vox Sang.* 2010; 99 (supl. 1): 246.
- Ettinger A., Miklaur M.M., Hendrix B.K. Mirasol-treated plasma protein quality after 1 year of storage AT -18°C. *Vox Sang.* 2010; 99 (supl. 1): 241–242.
- Lachert E., Antoniewicz-Papis J., Dzieciatkowska O. Quality control of riboflavin and UV light treated plasma using the Mirasol PRT system. *Vox Sang.* 2010; 99 (supl. 1): 255.
- Reddy L., Marschner S., Doane S. Room temperature storage of whole blood treated with the Mirasol System. *Vox Sang.* 2010; 99 (supl. 1): 243–244.
- AuBuchon J.P. Current status of pathogen inactivation methods. *Vox Sang.* 2010; 5 (1): 125–133.
- Heger A., Bailey A., Gregori L. Octaplas L.G. improvement of biochemical quality and pathogen safety. *Vox Sang.* 2010; 99 (supl. 1): 254.
- Gathof B.S., Tauszig M.E., Picker S.M. Pathogen inactivation/reduction of platelet concentrates: turning theory into practice. *Vox Sang.* 2010; 5 (1): 114–119.
- Heiden M., Seitz R. Pathogen inactivation — regulators aspects. *Vox Sang.* 2010; 5 (1): 279–281.