

Metody ograniczania ryzyka zakażeń przenoszonych przez krew

Dane prezentowane podczas seminarium „Postępy w badaniach przeglądowych dawców krwi” (Warszawa, 5–6 października 2015 r.)

Reducing the risk of blood-borne infections.
Data presented at the seminar “Advances in blood donor screening”
(Warsaw, 5–6 October 2015)

Elżbieta Lachert

Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

J. Transf. Med. 2015; 8: 147–149

Przetaczanie krwi i jej składników nigdy nie było tak bezpieczne jak obecnie. Jedną z procedur ograniczających ryzyko przeniesienia wirusów jest wprowadzenie zgodnie z wytycznymi Unii Europejskiej oraz zaleceniami Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) oznaczania w każdej donacji markerów wirusów uznanych powszechnie za chorobotwórcze, takich jak: wirus zapalenia wątroby typu B (HBV, *hepatitis B virus*), wirus zapalenia wątroby typu C (HCV, *hepatitis C virus*) oraz wirus upośledzenia odporności (HIV, *human immunodeficiency virus*) [1]. Oznaczanie innych markerów wprowadzane jest w regionach o zwiększonej częstości występowania danego czynnika zakaźnego. Przykładem jest wirus Zachodniego Nilu (WNV, *West Nile virus*), który w latach 1999–2006 rozprzestrzenił się w Stanach Zjednoczonych i Kanadzie, a ryzyko związane z jego przeniesieniem oszacowano na 1,46–12,33/10 000 donacji. Z tego powodu w obu wymienionych krajach w 2002 roku wprowadzono obowiązek badania markerów WNV metodami biologii molekularnej [2]. Nadal jednak nie wyeliminowano ryzyka przeniesienia nieznanymi oraz nieoznaczanymi rutynowo czynnikami zakaźnymi, jak również takimi, do oznaczania których nie opracowano jeszcze skutecznych testów.

Ryzyko stwarzają także bakterie, przenoszone szczególnie z koncentratami krwinek płytkowych (KKP; 1/2000–1/3000 przetoczeń). Oszacowano, że ryzyko otrzymania KKP zakażonego bakteriami jest 50–250 razy większe niż przeniesienie zakażeń wirusologicznych, a rośnie kilkakrotnie, jeśli dotyczy KKP zlewanego. Dla porównania — częstość przeniesienia bakterii z koncentratami krwinek czerwonych (KCCz) oszacowano na 1/65 000–1/100 000 przetoczeń [3, 4].

Dodatkowym problemem są migracje ludności powodujące rozprzestrzenianie się nie tylko wirusów, ale i pasożytów, szczególnie z terenów, na których występują one endemicznie. Dlatego, oprócz opracowywania nowych, bardziej czułych testów do oznaczania markerów czynników zakaźnych, wprowadza się także dodatkowe metody ograniczenia ryzyka związanego z przetaczaniem krwi. Odnosi się to do procedur przed pobraniem, w trakcie pobierania i do preparatyki krwi, jak również wydawania składników krwi do użytku klinicznego.

Jedną z podstawowych procedur ograniczających ryzyko przeniesienia czynników zakaźnych jest prawidłowo opracowany i rzetelnie wypełniony kwestionariusz, uwzględniający między innymi pytania dotyczące ryzykownego zachowania potencjalnego dawcy oraz jego przebywania w regionie

zwiększonego ryzyka występowania czynników zakaźnych. Lekarz w trakcie kwalifikacji jest zobowiązany poinformować dawcę zarówno o konieczności zgłoszenia do centrum zlego samopoczucia lub infekcji, które wystąpiły w ciągu 48 godzin od donacji, jak i o możliwości samodyskwalifikacji, czyli powiadomienia centrum krwiodawstwa, że oddana krew nie nadaje się do celów klinicznych [5].

Zwiększanie liczby dawców wielokrotnych jest także jednym ze sposobów zmniejszania ryzyka przeniesienia czynników zakaźnych drogą przetoczeń, ponieważ udowodniono, że donacje od dawców wielokrotnych obarczone są mniejszym ryzykiem przeniesienia czynników zakaźnych [6]. W latach 1995–2003 Van der Bij i wsp. porównywali odsetek potwierdzonych pozytywnych wyników badań markerów czynników zakaźnych w grupie pierwszorazowych i wielokrotnych dawców w Holandii. Odsetek dodatnich wyników HBV u dawców pierwszorazowych był znacząco wyższy (80%) niż u dawców wielokrotnych. Analogicznie w przypadkach HCV (85% pozytywnych wyników u dawców pierwszorazowych — 105/123) oraz HIV (79% pozytywnych wyników u dawców pierwszorazowych — 26/33). Przyczyną może być niewystarczający stopień świadomości dawców pierwszorazowych o konieczności informowania o ryzykownych zachowaniach lub przebytych chorobach. Z drugiej strony dawcy wielokrotni są bardziej świadomi ryzyka związanego z przetoczeniem krwi, a historia ich donacji podlega monitorowaniu i archiwizacji [7].

Procedury przed pobraniem obejmują także kontrolę wizualną zestawu pojemników: dotyczy to zarówno objętości, jak i wyglądu płynu konserwującego. Nie wolno używać pojemników, których dreny lub ściany są nieszczelne, a powierzchnie wykazują nadmierne zawilgocenie. Płyn konserwujący musi być przejrzysty, bez zmętnień i zmian zabarwienia. Prawidłowo przeprowadzona ocena wizualna zabezpiecza przed pobraniem krwi do pojemnika uszkodzonego lub poddanego niewłaściwej sterylizacji.

Procedura przygotowania miejsca wkłucia jest krytycznym punktem procesu pobierania. Ryzyko przeniesienia czynników zakaźnych, szczególnie bakterii, można ograniczyć, jeśli czynności te wykonuje odpowiednio przeszkolony i systematycznie kontrolowany personel, a do dezynfekcji miejsca wkłucia używa się przynajmniej dwóch roztworów antyseptycznych o szerokim spektrum działania, na przykład alkohol izopropylowy i chlorheksydynę (metoda dwustopniowa). Proces dezynfekcji zawsze powinien zostać poddany walidacji. Prawidłowo wykonana dezynfekcja zmniejsza ryzyko zanieczyszczeń bakteryjnych o 50%, a tym

samym ogranicza ryzyko przeniesienia zakażeń, szczególnie z KKP.

Dodatkowym zabezpieczeniem przed przeniesieniem bakterii jest usunięcie pierwszej porcji pobranej krwi. De Korte i wsp. udowodnili, że usunięcie pierwszych 30–40 ml zmniejsza ryzyko przeniesienia zakażeń bakteryjnych o 50% [8].

Dobrą praktyką jest pozostawienie pobranej krwi pełnej w temperaturze pokojowej na 2 godziny. Czas ten pozwala leukocytom na sfagocytowanie bakterii, które mogły dostać się do pojemnika w trakcie pobierania krwi.

Automatyczne metody pobierania składników krwi, rozdziału krwi pełnej oraz zastosowanie systemu sterylnego łączenia drenów umożliwiają preparatykę w układzie zamkniętym, co znacznie ogranicza ryzyko przeniesienia zakażeń.

Ryzyko przeniesienia niektórych wirusów i bakterii ogranicza również leukoredukcja — procedura usuwania leukocytów z komórkowych składników krwi, która zapobiega nie tylko niehemolitycznym reakcjom gorączkowym i zmniejsza ryzyko wystąpienia alloimmunizacji HLA, ale także zapobiega przeniesieniu wirusów CMV, EBV, HHV-6, HHV-8, HTLV I/II oraz HIV-1/2. Usuwane są także wolne formy bakterii (bezpośrednia adhezja do materiału filtra), bakterie przylegające do leukocytów oraz bakterie z leukocytami znajdującymi się w ich wnętrzu [9, 10].

Do wykrywania drobnoustrojów we krwi i jej składnikach służą szybkie, lecz charakteryzujące się niską czułością metody oraz metody bardziej swoiste, wymagające jednak zastosowania specjalistycznego sprzętu (cytometria przepływowa, metody molekularne). Najczęściej stosowaną obecnie metodą jest automatyczny system do hodowli typu BacT/Alert, oparty na pomiarze stężenia CO₂ w pojemniku z podłożem bakteriologicznym z dodanym KKP o odpowiedniej objętości. Wadą metody jest dostępność wyniku dopiero po 2–7 dniach. Dodatkowo, stosowane obecnie metody nie wykrywają bakterii w bardzo małej liczbie, dlatego próbki pobierane są dopiero po 24 godzinach od otrzymania KKP, po namnożeniu bakterii [11].

Ze względu na brak możliwości zbadania wszystkich markerów czynników zakaźnych mogących potencjalnie znajdować się we krwi i jej składnikach oraz brak czułej i szybkiej metody detekcji bakterii coraz częściej stosuje się metody inaktywacji/redukcji biologicznych czynników chorobotwórczych w osoczu i KKP (system Intercept z zastosowaniem chlorowodoru amotosalenu i UV, system Mirasol z użyciem ryboflawiny i światła widzialnego, system Theraflex z zastosowaniem

biękitu metylenowego i UV). Metody inaktywacji w KKCz i w krwi pełnej są nadal w trakcie badań klinicznych [12]. Wymienione metody skutecznie inaktywują wirusy, bakterie i pasożyty w składnikach krwi, ale obniżają jednocześnie skuteczność leczniczą przetaczanych KKP i osocza. Stwierdzono znacznie niższy wzrost liczby krwinek płytkowych w krążeniu biorców po przetoczeniu inaktywowanego KKP, co w niektórych przypadkach może powodować zwiększenie częstości przetoczeń [13]. Podobnie w przypadku osocza — aktywność czynników krzepnięcia w inaktywowanym osoczu jest niższa niż w osoczu niepoddanym inaktywacji. Chociaż stosowanie inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach znacznie zwiększa ich bezpieczeństwo, jednak nie zaleca się rezygnowania z rutynowego wykonywania przesiewowych badań markerów czynników zakaźnych, ze względu na to, że skuteczność metod inaktywacji jest różna w odniesieniu do różnych wirusów. Wizualna kontrola przechowywanych składników krwi ma istotne znaczenie w rozpoznawaniu niektórych zakażeń bakteryjnych. Koncentraty krwinek czerwonych zakażone *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter* lub innymi Gram-ujemnymi pałeczkami mają ciemniejszy kolor, zapewne dlatego, że bakterie zużywają tlen związany z hemoglobina. W takich preparatach stwierdzono 2–4-krotnie wyższe stężenie methemoglobiny. Obniżenie pH oraz osłabienie zjawiska „wirowania” (*swirling phenomenon*) lub całkowity jego zanik stwierdzono w KKP zanieczyszczonych bakteriami [14].

W związku z powyższym najbezpieczniejszą strategią jest przetaczanie świeżych składników krwi, w których nie zdążyły się jeszcze namnożyć bakterie (nieusunięte w czasie dezynfekcji miejsca wkłucia, które przedostały się do pojemnika z krwią — początkowa liczba bakterii w składniku krwi < 10 CFU/ml). Ryzyko wystąpienia bakteryjnych powikłań jest wówczas znikome; stwierdzono, że większość powikłań bakteryjnych jest spowodowana przetoczeniem KKP przechowywanych ponad 3 dni oraz KKCz przechowywanych co najmniej przez 3 tygodnie (w pojemnikach zakażonych preparatów wykryto 10^6 – 10^8 CFU/ml bakterii).

Podsumowując, oprócz wprowadzanych do rutynowego stosowania coraz bardziej czułych i swoistych testów do oznaczania markerów czynników zakaźnych, wymienione w niniejszej pracy metody i procedury dodatkowo ograniczają ryzyko przeniesienia czynników zakaźnych. Do procedur będących „milowym krokiem” w kierunku

większego bezpieczeństwa mikrobiologicznego zaliczono rutynowe wprowadzenie jednorazowych pojemników z tworzywa sztucznego oraz pobieranie i preparatykę krwi w systemie zamkniętym.

Konflikt interesów

Praca powstała na podstawie wykładu wygłoszonego podczas seminarium „Postępy w badaniach przeglądowych dawców krwi” (Warszawa, 5–6 października 2015 r.), organizowanego przez Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o. pod nadzorem merytorycznym Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie.

Piśmiennictwo

- Roth W.K., Busch M.P., Schuller A. i wsp.; International Forum. International survey on NAT testing of blood donations: expanding implementation and yield from 1999 to 2009. *Vox Sang.* 2012; 102: 82–90.
- Biggerstaff B.J., Petersen L.R. Estimated risk of transmission of the West Nile virus through blood transfusion in US, 2002. *Transfusion* 2003; 43: 1007–1017.
- Blajchman M.A. Bacterial contamination of cellular blood components: risk, sources and control. *Vox Sang.* 2004; 87 (supl. 1): S98–S103.
- Klein H.G. How safe is blood, really? *Biologicals* 2010; 38: 100–104.
- Łętowska M. (red.). Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby krwi. Praca zbiorowa, wyd. III. Warszawa 2014.
- Allain J.P. Moving on from voluntary non-remunerated donors: who is the best donor? *Br. J. Haematol.* 2011; 154: 763–769.
- Van der Bij A.K., Coutinho R.A., Van der Poel C.L. Surveillance of risk profiles among new and repeat donors with transfusion-transmissible infections from 1995 through 2003 in the Netherlands. *Transfusion* 2006; 46: 1729–1736.
- de Korte D., Curvers J., de Kort W.L. i wsp. Effects of skin disinfection method, deviation bag, and bacterial screening on clinical safety of platelet transfusions in the Netherlands. *Transfusion* 2006; 46: 476–485.
- Steneker I., Biewenga J. Histologic and immunohistochemical studies on the preparation of white-cell poor red cell concentrates: the filtration process using three different polyester filters. *Transfusion* 1991; 31: 40–46.
- Laupacis A., Brown J., Costello B. i wsp. Prevention of CMV transmission in the era of universal WBC reduction: a consensus statement. *Transfusion* 2001; 41: 560–569.
- Ribault S., Harper K., Grave L. i wsp. Rapid Screening Method for Detection of Bacteria in Platelet Concentrates. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42: 1903–1908.
- Salunkhe V., van der Meer P.F., de Korte D., Seghatchian J., Gutiérrez L. Development of blood transfusion product pathogen reduction treatments: a review of methods, current applications and demands. *Transfus. Apher. Sci.* 2015; 52: 19–34.
- Mirasol Clinical Evaluation Study Group. A randomized controlled clinical trial evaluating the performance and safety of platelets treated with MIRASOL pathogen reduction technology. *Transfusion* 2010; 50: 2362–2375.
- Sen K. Rapid Identification of *Yersinia enterocolitica* in Blood by the 5' Nuclease PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38: 1953–1958.