

Wybrane zagadnienia dotyczące inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w składnikach krwi

w świetle doniesień prezentowanych na 27. regionalnym Kongresie ISBT w Kopenhadze (17–21 czerwca 2017 r.)

Selected pathogen inactivation topics presented during the 27th Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion in Copenhagen (17–21 June 2017)

Elżbieta Lachert, Jolanta Antoniewicz-Papis

Zakład Transfuzjologii
Instytut Hematologii i Transfuzjologii

J. Transf. Med. 2017; 10: 107–111

W trakcie sesji plakatowej (*Pathogen inactivation*) 27. regionalnego Kongresu ISBT w Kopenhadze przedstawiono 24 prace dotyczące metod inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w składnikach krwi. Osiem prac dotyczyło systemu Mirasol PRT, 5 systemu Theraflex MB Plasma i systemu Theraflex UVC Platelets, a 11 prac odnosiło się do systemu Intercept. W niniejszym sprawozdaniu podsumowano prace dotyczące systemów: Mirasol PRT, Theraflex MB Plasma i Theraflex UVC Platelets. Zagadnienia dotyczące systemów Mirasol i Theraflex MB Plasma zostały przedstawione w sprawozdaniu, ponieważ niektóre centra krwiodawstwa i krwiolecznictwa w Polsce od lat stosują te właśnie systemy do inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w składnikach krwi. Niewielka liczba doniesień na temat systemu Theraflex UVC Platelets, szczególnie w polskich czasopiśmie, uzasadnia konieczność przekazania niektórych aktualnych wyników badań. Ze względu na dużą liczbę prac dotyczących inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych przy zastosowaniu systemu Intercept, analiza danych

dotyczących tego systemu będzie przedmiotem kolejnej publikacji.

System MIRASOL PRT

W wielu krajach rozwijających się nadal nie wykonuje się niektórych testów wirusologicznych ograniczających ryzyko przeniesienia biologicznych czynników zakaźnych i jest przetaczana krew pełna. Dodatkowo w krajach tych stwierdza się także większą częstotliwość występowania niektórych czynników zakaźnych. Dlatego też wdrożenie metody inaktywacji krwi pełnej wydaje się zasadne. Na podstawie wyników badań klinicznych przeprowadzonych w Afryce (AIMS, *African Investigation of Mirasol System*) dotyczących przetaczania krwi pełnej poddanej inaktywacji w systemie Mirasol stwierdzono, że przetaczanie inaktywowanej krwi znacznie zmniejszyło ryzyko przeniesienia malarii.

W jednej z przedstawianych prac wykonanych przy współpracy przedstawicieli firmy Terumo oraz *Blood Cell Research z Sanquin Blood Bank* w Amsterdamie oceniano jakość koncentratu krwinek czerwonych (KKCz) otrzymanych z krwi pełnej,

Adres do korespondencji: dr n. farm. Elżbieta Lachert, Zakład Transfuzjologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. I. Gandhi 14, 02–776 Warszawa, tel.: 22 349 63 82, faks: 22 349 63 76, e-mail: elachert@ihit.waw.pl

poddanej inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych przy zastosowaniu systemu Mirasol PRT, w którym zastosowano ryboflawinę i promieniowanie UV. System otrzymał oznakowanie CE i jest obecnie w trakcie badań w ośrodkach w Stanach Zjednoczonych Ameryki. Na podstawie analizy wyników badań stwierdzono, że czas przechowywania KKCz otrzymanych z krwi pełnej poddanej inaktywacji w systemie Mirasol PRT zależy zarówno od rodzaju antykoagulantu, na który pobrano krew, jak i roztworu wzbogacającego (RW), w którym przechowywano KKCz. Koncentraty krwinek czerwonych otrzymane z poddanej inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych krwi pełnej, przechowywane do 21 dni w temp. 1–6°C w roztworach wzbogacających: AS-3, PAGGSM i SAGM spełniały kryteria akceptacji Agencji ds. Żywności i Leków (FDA, *Food and Drug Administration*). Stwierdzono stopień hemolizy < 0,8%, pH > 6,2 i porównywalne stężenie ATP zarówno w KKCz poddanych inaktywacji, jak i kontrolnych. Na podstawie kolejnych wyników badań stwierdzono, że poddane inaktywacji KKCz, otrzymane z krwi pełnej pobranej na CPD i CP2D oraz przechowywane w roztworach wzbogacających AS-1 i AS-5 (CPD/AS-1, CP2D/AS-5), mogą być przechowywane do 21 dni. Natomiast KKCz przechowywane w roztworze CPD/AS-5 utrzymują stopień hemolizy < 1% do 14. dnia przechowywania [1].

W kolejnej pracy dotyczącej systemu Mirasol podkreślono istotne znaczenie czasu, jaki upływa od momentu pobrania krwi pełnej do przeprowadzenia procesu inaktywacji. Na podstawie analizy wyników badań wykonanych w laboratorium Terumo BCT (Lakewood, USA) potwierdzono, że krew pełna, przechowywana 24 godziny przed inaktywacją i przechowywana do 14. dnia po inaktywacji spełnia kryteria Rady Europy odnośnie stopnia hemolizy (< 0,8%). Na podstawie oceny stopnia hemolizy stwierdzono, że skrócenie czasu przechowywania KKCz przed inaktywacją do 8 godzin daje możliwość wydłużenia czasu przechowywania inaktywowanych KKCz do 21 dni [2].

Przedstawiciele kanadyjskiej służby krwi przedstawili pracę (Taha i wsp.), która została wykonana we współpracy z kanadyjskim Centrum Innowacji oraz Stanowym Uniwersytetem Kolorado w Stanach Zjednoczonych. Celem tej pracy była ocena stopnia inaktywacji biofilmu (pochodzącego z *S. epidermidis*) w koncentraty krwinek płytkowych (KKP) otrzymanych z kożuszków leukocyтарно-пłytkowych. W badaniach zastosowano zarówno biofilm, jak i same komórki *S. epidermidis*

ST-10002 (zanieczyszczające KKP) i *S. epidermidis* *AZ-66* (izolowane z powierzchni skóry). Najczęstszą przyczyną zanieczyszczeń bakteryjnych KKP jest tlenowa bakteria — *Staphylococcus epidermidis*. Bakteria ta często tworzy złożoną, wielokomórkową strukturę (biofilm) w przechowywanych koncentraty krwinek płytkowych, co powoduje, że wyniki badań określających liczbę bakterii mogą być fałszywie zaniżone. Pomimo przeprowadzenia badań potwierdzających skuteczność systemu Mirasol w stosunku do szerokiego spektrum Gram dodatnich i Gram ujemnych bakterii, nigdy nie sprawdzano skuteczności inaktywacji w stosunku do bakteryjnych „biofilmów”. W trakcie badań zaobserwowano znaczące obniżenie *S. epidermidis* *AZ-66* w porównaniu z *S. epidermidis* *ST-10,002* (odpowiednio $\geq 3,5$ log i 2,6–2,8 log, $p < 0,0001$) w KKP poddanych inaktywacji w systemie Mirasol. Nie stwierdzono różnic w stopniu inaktywacji *S. epidermidis* w KKP zarówno z wprowadzonym biofilmem, jak i samym *S. epidermidis* ($p > 0,05$). Jednakże w przypadku KKP z wprowadzonym biofilmem stwierdzono wyższą aktywację krwinek płytkowych w KKP ($p < 0,05$), której przyczyną mogła być zwiększona interakcja pomiędzy krwinkami płytkowymi i agregatami biofilmu. Wprawdzie zaobserwowano, że skuteczność inaktywacji zarówno biofilmu *S. epidermidis*, jak i samych komórek *S. epidermidis* była porównywalna, to stwierdzono także brak całkowitej inaktywacji biofilmu, w przypadku gdy wprowadzono go w ilości bakterii $\geq 10^3$ CFU/ml. Konieczne są zatem dalsze badania, uwzględniające na przykład różne ilości czynników zakaźnych poddawane inaktywacji [3].

W kolejnych dwóch pracach (Yonemura i wsp.) porównywano zarówno jakość krwi pełnej pobranej na antykoagulant CPDA-1, jak i skuteczność inaktywacji takiej krwi. Po 21 dniach przechowywania średni stopień hemolizy w inaktywowanej krwi pełnej pobranej do pojemnika z CPDA-1 wynosił $0,20 \pm 0,11\%$. Znaczące różnice stwierdzono natomiast w stężeniu potasu, które wynosiło $38,8 \pm 4,1$ mM w inaktywowanej krwi pełnej, podczas gdy w grupie krwi kontrolnej stężenie to wynosiło $20,4 \pm 3,2$ mM ($p < 0,0001$). Potwierdzono zatem, że inaktywowana, przechowywana w CPDA-1 krew pełna spełnia kryteria pod względem stopnia hemolizy (< 0,8%) w 21. dniu przechowywania, natomiast stężenie potasu jest porównywalne ze stężeniem oznaczonym w inaktywowanej krwi pełnej pobranej do pojemnika z CPD [4].

W trakcie badań klinicznych (randomizowane kontrolowane) przeprowadzonych w Afryce (AIMS, *the African Investigation of the Mirasol System*)

potwierdzono, że wprowadzenie inaktywacji krwi pełnej z zastosowaniem systemu Mirasol znacząco zmniejszyło ryzyko przeniesienia *Plasmodium spp.*, czynnika wywołującego malarię. Kolejne badania oceniające skuteczność systemu Mirasol potwierdzają znaczące obniżenie liczby także innych pierwotniaków i wirusów, takich jak *Babesia spp.* i HIV. Celem drugiej pracy (Yonemura S i wsp.) było porównanie stopnia inaktywacji czynników zakaźnych w krwi pełnej pobranej do pojemnika z antykoagulantem na CPD i w krwi pełnej pobranej na CPDA-1. Ocenę skuteczności systemu wykonano na podstawie stopnia inaktywacji bakteriofagów X174 i bakterii *Yersinia enterocolitica* (ATCC# 23715). Stwierdzono, że średnia redukcja bakteriofagów X174 w krwi pełnej pobranej na CPDA-1 i w krwi pełnej pobranej na CPD wynosiła $2,70 \pm 0,28$. Natomiast w przypadku *Y. enterocolitica* średnia redukcja wynosiła $2,66 \pm 0,26$ w krwi pełnej pobranej na CPDA-1 i $2,86 \pm 0,44$ w krwi pełnej pobranej na CPD. Potwierdzono zatem, że na skuteczność inaktywacji nie wpływa rodzaj antykoagulantu [5].

W pracy Lachert i wsp. przedstawiono stopień wdrożenia metod inaktywacji w polskich centrach krwiodawstwa i krwiolecznictwa (CKiK), który rozpoczęto już w 2008 roku przez wprowadzenie w kilku CKiK systemu Theraflex MB Plasma, a w 2009 roku rozpoczęto wdrażanie systemu Mirasol PRT. Obecnie w CKiK w Polsce wdrożono do użycia 12 systemów Theraflex MB Plasma i 28 systemów Mirasol PRT. Wprawdzie na podstawie analizy danych stwierdzono zwiększony odsetek przetoczonego, inaktywowanego osocza w kolejnych latach 2012–2015 (4,73% — 2012 r.; 7,22% — 2013 r., 8,74% — 2014 r., 9,47% — 2015 r.), w większości CKiK nadal inaktywacji poddaje się mniej niż 1% otrzymywanego osocza. W przypadku przetoczenia inaktywowanych KKP odsetek ten utrzymuje się prawie na tym samym poziomie w skali całego kraju (12,58% — 2012 r., 13,29% — 2013 r., 12,06% — 2014 r., 11,47% — 2015 r.). Należy podkreślić, że zaledwie dwa CKiK poddają inaktywacji KKP. Odsetek poddanych inaktywacji w tych centrach KKP wyniósł 30–60% otrzymywanych składników krwi. W pozostałych CKiK inaktywacja biologicznych czynników chorobotwórczych w KKP jest wykonywana w niewielkich ilościach. Prawdopodobnie przyczyną takiego stanu jest niewystarczająca wiedza lekarzy, dotycząca możliwości stosowania bardziej bezpiecznych składników krwi [6].

Korzyści z wprowadzenia inaktywacji czynników chorobotwórczych nie budzą wątpliwości. Proces inaktywacji zastępuje detekcję bakterii i te-

sty w kierunku CMV. Dodatkowo, może stanowić alternatywę dla napromieniania składników krwi, która jest procedurą zabezpieczającą przed przetoczeniową chorobą przeszczep przeciwko gospodarzowi (TA-GvHD, *Transfusion Associated-Graft versus Host Disease*). Z doniesień literaturowych wynika jednak, że proces inaktywacji może także powodować obniżenie liczby krwinek płytkowych w inaktywowanym KKP, co w konsekwencji może spowodować obniżenie skuteczności leczniczej po ich przetoczeniu. W Hiszpanii (Baleary) przeprowadzono retrospektywną analizę przetoczeń KKP (przed wprowadzeniem inaktywacji i po jej wprowadzeniu) obejmującą okres 3 lat. Stwierdzono, że parametry takie, jak: średnia dawka krwinek płytkowych w KKP, średnia liczba KKP przetaczanych danemu pacjentowi oraz całkowita dawka przetaczanych płytek były porównywalne w przypadku KKP poddanych inaktywacji w systemie Mirasol i KKP przetaczanych przed wdrożeniem inaktywacji. Potwierdzono zatem, że proces inaktywacji nie wpływa znacząco na obniżenie liczby krwinek płytkowych [7].

System Theraflex MB Plasma i system Theraflex UV Platelets

Fotodynamiczna metoda inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych z zastosowaniem błękitu metylenowego i światła widzialnego (system Theraflex MB Plasma) jest stosowana rutynowo w wielu krajach.

Celem pracy wykonanej przez Gravemann i wsp. było sprawdzenie wpływu temperatury na jakość osocza poddawanego inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych z zastosowaniem systemu Theraflex MB Plasma oraz sprawdzenie skuteczności systemu w stosunku do szerokiego spektrum czynników zakaźnych. Jednostki osocza przechowywane w temperaturze 22°C, 5°C i 30°C poddawano procesowi inaktywacji w systemie Theraflex MB Plasma (typ Macothronic B2; 120J/cm²). Najwyższe straty stwierdzono w aktywności czynnika VIII (17,7%) i fibrynogenu (14,4%) w osoczu przechowywanym przed inaktywacją w temp. 22°C. Dodatkowo stwierdzono, że temperatura osocza przed inaktywacją wpływa między innymi na rozpuszczalność tabletki błękitu metylenowego, stężenie fotoproduktów, a w konsekwencji na skuteczność inaktywacji. W trakcie badań stwierdzono znacznie ograniczoną rozpuszczalność błękitu metylenowego w temp. 5°C oraz postępującą degradację błękitu metylenowego (co wiąże się z powstawaniem fotoproduktów) wraz

ze wzrostem temperatury. W temperaturze 30°C powstaje przede wszystkim azur B, usuwany wraz z pozostałościami błękitu metylenowego przy zastosowaniu filtra Bluflex. Stwierdzono, że 22°C jest optymalną temperaturą, w której powinna być wykonywana inaktywacja osocza. W trakcie badań oceny skuteczności inaktywacji zaobserwowano znacząco mniejszą skuteczność inaktywacji wirusów, takich jak: wirus opryszczki suid (SHV, *Suid Herpes Virus*), wirus biegunki bydła (BVDV, *bovine viral diarrhoea virus*) oraz wirus pęcherzykowatego zapalenia jamy ustnej (VSV, *vesicular stomatitis virus*) w osoczu przechowywanym w temperaturze 5°C niż w osoczu przechowywanym w temperaturze 22°C i 30°C [8].

W systemie Therflex UV Platelets opracowanym we współpracy Niemieckiego Czerwonego Krzyża i firmy Macopharma zastosowano wyłącznie promieniowanie UVC, co powoduje, że biorcy KKP nie są narażani nawet na działanie śladowych ilości związku chemicznego w inaktywowanym KKP.

System Therflex UV Platelets otrzymał oznakowanie CE w 2009 roku, jednak nie został jeszcze wprowadzony do rutynowego stosowania. Obecnie system jest w trakcie badań klinicznych. Inaktywuje on szerokie spektrum bakterii, wirusów i pierwotniaków. Pilotażowe badania potwierdziły wysoką skuteczność systemu w stosunku do istotnych klinicznie gatunków bakterii, znajdujących się na liście *WHO International Repository of Platelet Transfusion Relevant Bacterial Reference Strains*. W pracy naukowców z Niemieckiego Instytutu w Springe dokonano oceny skuteczności systemu Therflex UV Platelets w stosunku do gatunków bakterii ostatnio dodanych do w/w listy WHO. Średnie obniżenie liczby bakterii o 6–7 log potwierdzono w przypadku takich gatunków, jak: *Enterobacter cloacae* (PEI-B-P-43), *Morganell Morgani* (PEI-B-P-91), *Proteus mirabilis* (PEI-B-P-91), *Pseudomonas fluorescens* (PEI-B-P-77), *Staphylococcus aureus* (PEI-B-P-63) i *Streptococcus bovis* (PEI-B-P-61) [9].

Celem pracy (Brixner V. i wsp.) była ocena *in vitro* KKP z aferezy, przechowywanych w roztworze wzbogacającym SSP+, poddanych inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w systemie Therflex UV Platelets. Koncentraty krwinek płytkowych poddane inaktywacji porównywano z KKP kontrolnymi oraz z KKP poddanymi napromienianiu, z zastosowaniem promieniowania gamma. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w liczbie krwinek płytkowych, w liczbie krwinek czerwonych, w liczbie krwinek białych i pH we wszystkich badanych grupach KKP. Wprawdzie

stwierdzono różną ekspresję CD 62 w KKP poddanych inaktywacji, KKP napromienianych i KKP kontrolnych, ale wartości te nie były statystycznie znamienne, a poddane inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w systemie KKP spełniały kryteria zawarte w niemieckich przepisach dotyczących krwiodawstwa. Bezpieczeństwo i tolerancja poddanych inaktywacji przetaczanych KKP są obecnie w trakcie badań klinicznych [10].

W pracy autorów z ośrodków australijskich, niemieckich i francuskich oceniano skuteczność systemów do inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych: *Theraflex UVC Platelets* i *Theraflex MB-Plasma* w stosunku do wirusa Zika. Stopień redukcji wirusa Zika po zastosowaniu systemu *Theraflex UVC Platelets* i *Theraflex MB-Plasma* wyniósł odpowiednio — 5 log w KKP i 5,68 log w osoczu [11].

Podsumowanie

Prace przedstawione podczas sesji plakatowej dotyczyły przede wszystkim oceny jakości składników krwi poddanych inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych oraz oceny skuteczności systemu w stosunku do różnych czynników zakaźnych. Na podstawie przeprowadzonych badań jakości wskazano między innymi akceptowalny czas przechowywania poddanych inaktywacji KKCz w zależności od zastosowanego antykoagulantu w krwi pełnej i roztworu wzbogacającego w KKCz. Stwierdzono także, że w przypadku inaktywacji czynników chorobotwórczych w osoczu z zastosowaniem systemu *Theraflex MB Plasma* istotnym parametrem jest temperatura, w jakiej osocze przechowywane jest przed inaktywacją. Wprawdzie przedstawione prace nie wykazały znaczącego wpływu procesu inaktywacji na obniżenie liczby krwinek płytkowych, to w większości prac dotyczących badań jakości inaktywowanych KKP stwierdza się większe obniżenie liczby krwinek płytkowych w porównaniu z KKP z grupy kontrolnej.

Ze względu na różne wyniki badań pochodzące z prac prowadzonych w różnych ośrodkach oraz na stosunkowo niedługą „historię” stosowania metod inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w służbie krwi, metody te powinny nadal poddawane być rygorystycznemu monitorowaniu. Dlatego też wszelkie dane dotyczące jakości poddanych inaktywacji składników krwi oraz informacje o skuteczności inaktywacji, szczególnie dotyczące nowo pojawiających się czynników zakaźnych, powinny być publikowane.

Piśmiennictwo

1. Dimberg LY, Doane S, Yonemura S, et al. Quality of red blood cells derived from whole blood treated with UV light and riboflavin. *Vox Sanguinis*. 2017; 112(Suppl.1): P-248.
2. Dimberg LY, Doane S, Hovenga N, et al. and Marschner S: Quality of whole blood treated with UV light and riboflavin after 24 H in room temperature. *Vox Sanguinis*. 2017; 112(Suppl.1): P-249.
3. Taha M, Culibrk B, Schubert P, et al. and Ramirez-Arcos S: Inactivation of biofilm –derived staphylococcus epidermidis in platelet concentrates with riboflavin and staphylococcus epidermidis in platelet concentrates with riboflavin and ultraviolet light treatment. *Vox Sanguinis*. 2017; 112(Suppl.1): P-252.
4. Yonemura S, Doane S, Gosney J, et al. Assessment of cell quality following riboflavin and ultraviolet light treatment of whole blood in citrate-phosphate-dextrose-adenine anticoagulant. *Vox Sanguinis*. 2017; 112(Suppl.1): P-264.
5. Yonemura S, Doane S, Gilmour D, et al. Assessment of pathogen reduction capacity following riboflavin and ultraviolet light treatment of whole blood in citrate-phosphate-dextrose-adenine anticoagulant. *Vox Sanguinis*. 2017; 112(Suppl.1): P-265.
6. Lachert E, Kubis J, Antoniewicz-Papis J, Rosiek A, Mikolowska A, and Letowska M. Pathogen inactivations systems in Polish Blood Transfusion Centers in 2012–2015. *Vox Sanguinis* 2017, 112, (Suppl.1), P-268.
7. Jimenez-Marco T, Garcia-Recio M, Bautista-Gili A, et al. Riboflavin and UV light treated platelets ensure an adequate transfusion dose, similar to untreated platelets. *Vox Sanguinis*. 2017; 112(Suppl.1): P-271.
8. Gravemann U, Handke W, Sumian C, et al. Influence of the temperature on the quality and virus inactivation capacity of methylene-blue treated plasma using the Theraflex MB-plasma System. *Vox Sanguinis*. 2017; 112(Suppl.1): P-257.
9. Gravemann SU, Tolksdorf F, Handke W, Culler and Seltsam A: Effectiveness of the THERAFLEX UV-PLATELETS technology against clinically relevant transfusion – transmitted bacteria strains. *Vox Sanguinis*. 2017; 112(Suppl.1): P-251.
10. Brixner V, Dombos S, Weber I, et al. In vitro assessment of untreated, UVC-treated and gamma-irradiated plasma reduced platelet concentrates prepared from thrombapheresis under routine conditions. *Vox Sanguinis*. 2017; 112(Suppl.1): P-253.
11. Marks DC, Fryk J, Hobson-Peters J, et al. Zika virus infectivity is reduced following treatment with the Theraflex UVC-Platelets and Theraflex MB-Plasma Systems. *Vox Sanguinis*. 2017; 112(Suppl.1): P-258.