


# Wybrane zagadnienia dotyczące inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi w świetle doniesień prezentowanych podczas 34. Regionalnego Kongresu *International Society of Blood Transfusion (ISBT)* w Barcelonie, 23–27 czerwca 2024 roku

## Selected issues on pathogen inactivation in blood components; reports presented at the 34<sup>rd</sup> Regional Congress of the *International Society of Blood Transfusion (ISBT)* in Barcelona, June 23–27, 2024

Paulina Goczyńska , Joanna Lasocka, Elżbieta Lachert

Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

### Wstęp

W trakcie 34. Regionalnego Kongresu *International Society of Blood Transfusion (ISBT)*, który odbył się w Barcelonie w dniach 23–27 czerwca 2024 roku przedstawiono 27 doniesień dotyczących inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi. Wyniki badań składników krwi poddanych inaktywacji czynników chorobotwórczych przedstawiono podczas sesji *Blood products — transfusion out of hospital and pathogen inactivation* oraz sesji plakatowej (*Blood product/ components — pathogen inactivation*). O metodach inaktywacji czynników chorobotwórczych wspomniano także w trakcie innych sesji, takich jak *Transfusion transmitted infections — hepatitis B (HBV)* lub *Transfusion transmitted infections*

— *bacteria*. Podczas sesji grupy roboczej (*Infectious disease panorama*) omówiono między innymi bezpieczeństwo stosowania osocza bogatokomórkowego i koncentratów krwinek płytkowych (KKP) oraz przedstawiono wyzwania stojące przed współczesną transfuzjologią w zakresie czystości mikrobiologicznej wyżej wymienionych preparatów [1]. Ze względu na fakt, że każda z prac we wprowadzeniu zawierała informacje dotyczące opisywanego systemu inaktywacji, zdecydowano, aby podstawowe informacje dotyczące omawianych systemów do inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi zawrzeć w tabeli 1 [2].

### Prezentacje ustne

Podczas sesji *Blood products — transfusion out of hospital and pathogen inactivation* przedstawiono

**Adres do korespondencji:** mgr Paulina Goczyńska, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. Indiry Gandhi 14, 02–776 Warszawa, e-mail: pgoczynska@ihit.waw.pl

Nadesłano: 03.11.2024

Przyjęto do druku: 25.11.2024

Data pierwszej publikacji: 23.12.2024

Artykuł jest dostępny bezpłatnie na podstawie licencji Creative Commons Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) umożliwiającej jego pobranie oraz udostępnianie pod warunkiem wskazania autorstwa i wydawcy. Niedopuszczalne jest wprowadzanie jakichkolwiek zmian lub wykorzystanie komercyjne bez zgody wydawcy.

**Tabela 1.** Systemy inaktywacji czynników chorobotwórczych w KKP i osoczu [2]

System/parametr	Intercept	Mirasol PRT	Theraflex UV Platelets
Rodzaj składnika krwi	Pojedyncza jednostka osocza z krwi pełnej Pulowane lub z aferezy KKP w osoczu lub w PAS (InterSol, SSP+)	Osocze; KKP w osoczu lub w PAS (SSP+) KKCz/KPK w trakcie badań	KKP, osocze w trakcie badań
Oznakowanie CE (rok)	KKP: 2002 Osocze: 2006	KKP: 2007 Osocze: 2008	KKP: 2009
Fotouczulacz	Chlorowodorek amotosalenu	Ryboflawina (witamina B <sub>2</sub> )	Nie zastosowano fotouczulacza
Fotoprodukty	Dimery S-59	Lumichrom, lumiflawina, 2'ketoflawina, 4-ketoflawina, mononukleotyd, flawiny, formylometyloflawina	Brak
Warunki inaktywacji	UVA (320–400 nm) 3 J/cm <sup>2</sup>	UV (280–400 nm) 6,24 J/cm <sup>2</sup>	UVC (254 nm) 0,2 J/cm <sup>2</sup>
Dodatkowe etapy	Usuwanie fotouczulacza i fotoproduktów (CAD)	Nie dotyczy	Nie dotyczy

CAD — *compound adsorption device*; KKCz — koncentrat krwinek czerwonych; KKP — koncentrat krwinek płytkowych; PAS (*platelet additive solution*) — roztwór wzbogacający; UV (*ultraviolet radiation*) — promieniowanie ultrafioletowe; UVA (*ultraviolet radiation in the UV-A range*) — promieniowanie ultrafioletowe w zakresie UV-A (długość fali 315–380 nm); UVC (*ultraviolet radiation in the UV-C range*) — promieniowanie ultrafioletowe w zakresie UV-C (długość fali 100–280 nm); CE — *Conformité Européenne*

trzy prace dotyczące metod inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi.

W pierwszej z nich zespół reprezentujący Kanadyjską Służbę Krwi omówił autorskie testy (wizualny i cytometryczny) do wykrywania i oznaczania resztkowych erytrocytów w składnikach krwi przeznaczonych do inaktywacji metodą Intercept. Przed wykonaniem procedury, osocze i KKP powinny zawierać poniżej  $4 \times 10^6$  erytrocytów w mililitrze składnika, stąd potrzeba opracowania skutecznej i prostej metody ich kwalifikacji do inaktywacji. Opracowano procedurę opartą na cytometrii przepływowej, wykorzystując zestaw BD Leucocount i próbki Trucount<sup>TM</sup> z fluorescencyjnymi kulkami, stanowiącymi próbe odniesienia dla resztkowych erytrocytów. Próbkę osocza, KKP z aferezy (KKP Af.) oraz zlewanego KKP (KKP Zl.) 10-krotnie rozcieńczono, przenoszono do próbek Trucount<sup>TM</sup>, znakowano CD235a (znacznikiem dla białka błonowego erytrocytów — glikoforyny A) i inkubowano, po czym przeprowadzono analizę. Na podstawie wyników badań stwierdzono, że metoda charakteryzuje się liniowością w zakresie do 1500 zdarzeń, współczynnikiem zmienności w obrębie serii od 2,55% do 3,36% (5 próbek, 9 serii dla każdej) i między seriami — od 2,02% do 5,12% (5 próbek, w niezależnych seriach). W celu opracowania metody oceny wizualnej do KKP dodawano

określoną liczbę erytrocytów (poniżej i powyżej dopuszczalnej granicy resztkowych zawartości erytrocytów), fotografowano je, a powstałe zdjęcia wywołano w technologii *true-color*. W celu oceny, czy test wizualny jest przydatny do użycia, poproszono przyszłych użytkowników o kwalifikację na podstawie fotografii, czy przedstawione im KKP (zawierające nieznaną im liczbę erytrocytów resztkowych) można poddać inaktywacji. Wartość współczynnika korelacji oceny użytkowników z faktyczną zawartością erytrocytów resztkowych w KKP wyniosła 0,9997. Stwierdzono, że obydwa testy — cytometryczny i wizualny — są skuteczne. Test wizualny był na tyle efektywny, że został wdrożony do użycia w Kanadyjskiej Służbie Krwi [3].

W drugiej prezentacji Kutac i wsp. [4] przedstawili wyniki wielośrodkowych badań oceniających wpływ metody inaktywacji (system Mirasol PRT) na funkcje i odzyskiwanie krwinek w kriokonserwowanych koncentratkach krwinek czerwonych (KKCz) i KKP Af. po ich rozmrożeniu. W celu uzyskania inaktywowanego KKCz, działaniu ryboflawiny i światła UV poddano 24 jednostki krwi pełnej (KP), z których otrzymano KKCz. Z otrzymanych KKCz pobierano próbki do badań a następnie preparaty zamrożono z dodatkiem 40-procentowego glicerolu i przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ . Po rozmrożeniu KKCz

przechowywano w temperaturze 4°C przez 21 dni, podczas których pobierano próbki do badań. Wykonano oznaczenie: hematokrytu, hemoglobiny, potasu, fosforu,  $\text{NH}_3$ , ATP, 2,3-DPG, osmolarności i stopnia hemolizy. Szesnaście jednostek KKP Af. poddano inaktywacji, pobrano próbki na badania, dodano 5-procentowy roztwór dimetylosulfotlenku (DMSO), odwirowano i usunięto nadsącz, a następnie zamrożono w temperaturze  $-80^\circ\text{C}$ . Po dwóch tygodniach KKP rozmrażano i rekonstruowano w osoczu. Następnie pobierano próbki do badań, w których oceniano: liczbę krwinek płytkowych (PLT, *platelets*), MPV, pH, stężenie glukozy, laktozy i mleczanów, gazometrię, CD42b, CD62, aneksynę V, obecność agregatów, tromboelastografię, czas generacji trombiny, endogenny potencjał trombiny i potencjał zakrzepowy. Grupę kontrolną stanowiło odpowiednio 20 jednostek KKCz i 15 jednostek KKP niepoddawanych inaktywacji. Na podstawie wyników ustalono, że kriokonserwowane KKCz poddane inaktywacji, mimo gorszych wyników otrzymanych w preparatach kontrolnych (m.in. wyższe stężenie potasu i amoniaku, niższe stężenie ATP pod koniec przechowywania), mogą być rutynowo wykorzystywane do 7. dnia po rozmrożeniu. Kriokonserwowane KKP po inaktywacji spełniało wymagania europejskich wytycznych, jednak w opinii autorów może wykazywać słabszą skuteczność kliniczną ze względu na znaczną aktywację płytek krwi i obniżoną siłę tworzenia się skrzepu.

W ostatniej z wygłaszanych prac analizowano wpływ różnych warunków inkubacji KKP w pojemniku z *compound adsorption device* (CAD) na jakość krwinek płytkowych. CAD jest stosowany w celu usunięcia fotouczulacza i fotoproduktów, które powstają podczas inaktywacji z wykorzystaniem amotosalenu i promieniowania ultrafioletowego (UV, *ultraviolet radiation*) (system Intercept). Za skuteczne usunięcie zbędnych substancji z KKP uważa się obniżenie ich stężenia poniżej  $7,5 \mu\text{M}$ . Według zaleceń producenta takie stężenie osiąga się podczas inkubacji składnika z CAD przy stałym wytrząsaniu przez 6–16 godzin. Isola i wsp. [5] przeprowadzili badanie, w którym trzy zlewane KKP (powstałe z 8 kożuszków leukocytarno-płytkowych) poddano inaktywacji, a następnie inkubacji w pojemniku z CAD w różnych warunkach. Pierwszy preparat, stanowiący kontrolę, mieszano podczas 16 godzinnej inkubacji, drugi — inkubowano przez 16 godzin bez mieszania, a trzeci — inkubowano również przez 16 godzin bez mieszania, po czym przedłużono inkubację o dodatkowe 6 godzin z mieszaniem. We wszystkich preparatach po zakończeniu preparatyki oznaczano

zawartość fotoproduktów oraz przeprowadzano badania sprawdzające wpływ warunków inkubacji na stan funkcjonalny krwinek płytkowych. Oceniano następujące parametry: „swirling”, liczbę krwinek płytkowych (PLT), pH,  $\text{pO}_2$ ,  $\text{pCO}_2$ , stężenie glukozy, LDH, ekspresję P-selektyny i sP-selektyny. Próbkę pobierano w 2., 3., 4. i 7. dniu przechowywania. Tylko w drugiej grupie, bez mieszania, nie uzyskano pożądanego obniżenia stężenia fotoproduktów. We wszystkich trzech badanych grupach preparatów uzyskano porównywalne wyniki „swirlingu”, liczby krwinek płytkowych, sP-selektyny,  $\text{pO}_2$  i  $\text{pCO}_2$ . Różnice w wynikach badań dotyczyły LDH, stężenia glukozy i ekspresji P-selektyny, wskazując na lepszą jakość krwinek płytkowych w KKP inkubowanym bez mieszania. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że w wypadku nieprawidłowości w preparatyce wynikających z braku mieszania podczas inkubacji składnika z CAD dodatkowa, 6 godzinna, inkubacja z mieszaniem pozwala na osiągnięcie akceptowalnego stężenia fotoproduktów, bez negatywnych konsekwencji dla parametrów funkcjonalnych krwinek płytkowych.

### Sesja plakatowa

W trakcie sesji plakatowej (*Pathogen inactivation*) przedstawiono 24 prace dotyczące metod inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi, z czego 16 prac dotyczyło systemu Intercept. Tylko jedna praca dotyczyła badań z wykorzystaniem systemu Mirasol PRT i jedna praca — inaktywacji z wykorzystaniem promieniowania UV-C. Nie przedstawiono żadnej pracy, w której omawiano by zastosowanie systemu Theraflex MB Plasma. W jednej pracy przedstawiono porównanie systemu Intercept i Mirasol, w dwóch innych — porównanie systemu Intercept i napromieniania. W jednej pracy zawarto wnioski z metaanalizy dotyczącej skuteczności stosowania KKP poddanych inaktywacji w celu zapobiegania krwawieniom u pacjentów w każdym wieku. Przedstawiciele Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie przygotowali pracę opisującą stan wdrożenia inaktywacji w centrach krwiodawstwa w Polsce. Na podstawie porównania tegorocznej liczby prac z liczbą zaprezentowanych podczas zeszłorocznego, 33 Kongresu ISBT (11 plakatów) widać wzrost zainteresowania tematyką inaktywacji i bezpieczeństwa przetaczanych składników krwi. O ile w 2023 roku system Intercept przedstawiono tylko w 4 plakatach, w 2024 roku prace, w których zastosowano system Intercept, zdominowały sesję

poświęconą tematowi inaktywacji. W większości dotyczyły bezpieczeństwa mikrobiologicznego inaktywowanych składników krwi lub kwalifikacji nowego typu iluminatora z diodami LED. Poniżej przedstawiono przegląd dziesięciu najciekawszych, w opinii autorów, prac.

### Intercept

Naukowcy z ośrodka w Strasburgu oceniali wpływ wydłużenia inkubacji ZI. KKP w pojemniku z CAD na parametry jakościowe i czynnościowe płytek krwi. W tym celu przygotowano 6 pul ZI. KKP, a każdą z pul podzielono na dwie porcje ( $n = 12$ ) odpowiadające dwóm badanym grupom: pierwszej, w której etap absorpcji fotouczulacza i fotoproduktów trwał standardowo 16 godzin i drugiej — z wydłużonym czasem inkubacji do 46 godzin. Podczas całego eksperymentu badano „swirling” i pobierano próbki w celu wykonania badań: pH,  $pO_2$ ,  $pCO_2$ , sP-selektyny, stężenia glukozy i resztkowego stężenia amotosalenu. „Swirling” w obu badanych grupach oceniono na „3” w trójstopniowej skali (1–3). Wprawdzie w grupie ZI. KKP poddawanych wydłużonej inkubacji stwierdzono niższą zawartość fotoproduktów, ale w obu badanych grupach stężenie amotosalenu kształtowało się na poziomie  $< 7 \mu M$ . Parametry jakościowe i funkcjonalne w obu badanych grupach nie różniły się znacząco między sobą, za wyjątkiem pH, którego wartość w trzecim dniu przechowywania była niższa dla preparatów po 46-godzinnej inkubacji ( $6,88 \pm 0,09$  vs.  $7,05 \pm 0,07$ ). W kolejnych dniach, do końca czasu przechowywania, wartość pH w obu grupach wyrównała się. Badanie sugeruje, że czas inkubacji z CAD może być wydłużony bez znaczącego wpływu na jakość płytek krwi, co może stanowić podstawę do opracowania właściwego postępowania w wypadku przekroczenia maksymalnego czasu inkubacji zalecanego przez producenta systemu Intercept [6].

Naukowcy z Utah (USA) w sposób innowacyjny zastosowali system Intercept do obniżenia stężenia testosteronu u dawców stosujących hormonalną terapię zastępczą testosteronem (TRT, *testosterone replacement therapy*). Jednym ze skutków stosowania TRT jest możliwość wystąpienia erytrocytozy (zwiększenie masy krwinek czerwonych w organizmie, podwyższenie hematokrytu i stężenia hemoglobiny) której leczenie polega między innymi na wykonywaniu cyklicznych upustów krwi pełnej. Agencja Żywności i Leków (FDA, *Food and Drug Administration*) zabrania stosowania osocza od wyżej wymienionych dawców, ze względu na

bardzo wysokie stężenie testosteronu we krwi. Od dawców stosujących TRT otrzymano ubogo-leukocytarną krew pełną, którą rozdzielano na poszczególne składniki krwi i poddawano badaniu na zawartość testosteronu (wolnego i całkowitego; w supernatancie po odwirowaniu KKCz i w osoczu), a następnie osocze z wyżej wymienionej donacji poddawano inaktywacji. Badania na zawartość testosteronu wykonano również po etapie inaktywacji oraz po inkubacji z CAD. U wszystkich dawców, niezależnie od rodzaju badanego materiału, stwierdzono podwyższony poziom testosteronu, który obniżył się dopiero w wyniku inkubacji z CAD. Nie zaobserwowano obniżenia stężenia testosteronu w wyniku samej inaktywacji. Obecnie brakuje odpowiedniej strategii pozwalającej na obniżenie poziomu testosteronu w oddanej krwi, dlatego poczynione obserwacje budzą duże nadzieje [7].

W celu oceny skuteczności inaktywacji komitet ekspertów Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) do spraw Standardyzacji Biologicznej (ECBS, *Expert Committee on Biological Standardization*) we współpracy z Instytutem Paula-Ehrlicha (PEI, *Paul-Ehrlich-Institut*) opracował specjalny panel szczepów bakteryjnych. Rok temu firma Cerus, dostawca systemu Intercept, sprawdziła skuteczność inaktywacji czterech bakterii z wyżej wymienionego panelu — *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli* oraz *S. epidermidis* — odpowiadających za infekcje przenoszone przez przetoczenie składników krwi. Wyniki przedstawiono podczas 33 Kongresu ISBT w Goteborgu. W tym roku przedstawiciele firmy Cerus przeprowadzili kolejne badania oceniające skuteczność inaktywacji trzech innych szczepów bakteryjnych pochodzących z panelu WHO-PEI: *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus thuringensis*. Do badania wykorzystano osocze oraz KKP Af. (krwinki płytkowe zawieszono w 100% osoczu) oraz KKP Af./RW (krwinki płytkowe zawieszono w mieszaninie RW i osocza: 65% PAS-C, 35% osocza). Do osocza dodano bakterie *P. fluorescens*, a do KKP — wszystkie trzy szczepy bakterii będące przedmiotem badania, a następnie preparaty poddano inaktywacji. Na podstawie wyników posiewów bakteryjnych stwierdzono, że system Intercept skutecznie inaktywuje *E. cloacae* i *B. thuringensis* w KKP oraz *P. fluorescens* w KKP i osoczu [8].

W innym badaniu naukowcy z tego samego ośrodka sprawdzali skuteczność inaktywacji czterech kolejnych bakterii: *Bacillus mobilis*, *Acinetobacter seifertii*, *Staphylococcus saprophyticus* i *Leclercia adecarboxylata*. Badania przeprowadzo-

no po stwierdzeniu septycznej, poważnej reakcji niepożądanego u pacjenta z Ohio (USA), któremu przetoczono inaktywowany KKP Af. W trakcie prowadzonych badań z pojemnika z resztkami poprzetoczeniowymi wyizolowano wszystkie cztery wyżej wymienione bakterie, a z krwi pacjenta wyhodowano dwie z nich: *S. saprophyticus* i *L. adecarboxylata*. Nie ustalono, na którym etapie doszło do zakażenia składnika krwi (przed czy po inaktywacji), jednakże był to pierwszy udokumentowany przypadek zakażenia składnika krwi bakterią *B. mobilis*. Badania oceniające skuteczność inaktywacji *S. saprophyticus* i *L. adecarboxylata* prowadzone są od dawna, natomiast skuteczność inaktywacji *B. mobilis* jest nieznana. Dlatego też KKP Af. (65% PAS-C, 35% osocze) zaszczepiono pojedynczymi szczepami bakterii lub mieszaniną czterech (w stosunku 1:1:1:1), a następnie poddano inaktywacji. Próbkę do posiewów mikrobiologicznych pobierano w różnych punktach czasowych przed i po inaktywacji i wysiewano na odpowiednie dla każdego typu bakterii podłoże. W żadnym przypadku nie doszło do wzrostu kolonii, co świadczy o pełnej skuteczności inaktywacji [9].

W dwuosobowym badaniu przeprowadzonym w Dublinie sprawdzono skuteczność inaktywacji ośmiu bakterii — pięciu z panelu szczepów bakteryjnych WHO-PEI: *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Bacillus cereus* oraz trzech pochodzących z rekomendacji Irlandzkiej Służby Krwi: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* i *Serratia marcescens*. Zł KKP przeznaczone do badania otrzymano przez połączenie 7 kożuszków leukocytarno-płytkowych z 280 ml roztworu wzbogacającego SSP+ (Macopharma), uzyskując podwójną dawkę terapeutyczną. Dla każdej bakterii (n = 8) otrzymano po 2 jednostki Zł. KKP, które połączono w pulę i zaszczepiono bakteriami (2000 CFU, po 500 CFU na dawkę terapeutyczną). Drugim, pośrednim celem badania było oszacowanie skutecznej dawki inokulacyjnej. Po dwóch godzinach inkubacji każdą pulę rozdzielono na dwie identyczne jednostki, stanowiące grupę badaną (poddaną następnie inaktywacji) i grupę kontrolną. Dodatkowo każdą z jednostek po zakończeniu preparatyki podzielono kolejny raz na pół, uzyskując ostatecznie cztery preparaty (dwa dla grupy kontrolnej i dwa — dla badanej). Wszystkie preparaty przechowywano w temperaturze 22°C, przez osiem dni. Próbkę na badania mikrobiologiczne pobrano przed zaszczepieniem bakteriami oraz w ósmym dniu przechowywania — obecność mikroorganizmów wykrywano z wykorzystaniem

analizatora BACT/ALERT 3D (Biomérieux), zaś ich identyfikację przeprowadzono za pomocą technologii MALDI-TOF (Biomérieux). Stwierdzono skuteczną inaktywację siedmiu z ośmiu bakterii. W ósmym dniu w grupie badanej wykryto tworzącą przetrwalniki bakterię *B. cereus*, co stanowi ograniczenie metod inaktywacji. Dodatkowo oceniono, że dawka inokulacyjna 500 CFU jest wystarczająca do przeprowadzania tego typu badań [10].

Praca naukowców z ośrodka w Arabii Saudyjskiej (Blood Bank, King Fahd Medical City Riyadh) dotyczyła wpływu wprowadzenia metod inaktywacji czynników chorobotwórczych w KKP na częstość występowania poważnych reakcji niepożądanych. Dane literaturowe wskazują, że częstość występowania ostrych niehemolitycznych reakcji gorączkowych po przetoczeniu KKP wynosi od 10 do 30%, natomiast od 1 do 2% stanowią reakcje alergiczne. Częstość występowania septycznych reakcji poprzetoczeniowych jest wprawdzie niższa (ok. 1:10 000 przetoczeń), ale reakcje te w większości przypadków są poważne i często kończą się zgonem pacjenta. Istotne zmniejszenie częstości występowania septycznych i alergicznych reakcji poprzetoczeniowych po wprowadzeniu metod inaktywacji czynników chorobotwórczych w KKP raportowały ośrodki w Szwajcarii i w Francji (Strasburg) (od 26% do 66% całkowitej liczby reakcji niepożądanych w Szwajcarii i 52% w Strasburgu). Zmniejszenie odsetka poważnych reakcji niepożądanych po przetoczeniu poddanych inaktywacji KKP spowodowane było głównie skuteczną inaktywacją krwinek białych oraz wprowadzeniem roztworów wzbogacających (PAS, *platelet additive solution*), które ograniczyły ilość przeciwciał i czynników osoczowych w preparatach. KKP (w 100-proc. osoczu) pobierano w Centrum Medycznym im. King Fahd Medical City (KFMC) Blood Center (Riyadh, KSA) metodą aferezy (Trima, Terumo-BCT, USA i MCS+, Haemonetics, USA) lub z krwi pełnej przy zastosowaniu zautomatyzowanego systemu Reveos (Terumo-BCT). Od lutego 2022 roku inaktywacji czynników chorobotwórczych przy zastosowaniu systemu Intercept (Cerus Corp, USA) poddawano KKP Af., a od września 2022 roku — KKP otrzymane z krwi pełnej. W 2023 roku około 50% wydawanych do lecznictwa KKP było poddanych procesowi inaktywacji. Dane dotyczące częstości występowania reakcji poprzetoczeniowych gromadzono za pomocą wewnętrznego systemu raportowania. Dane analizowano w trzech okresach, P1 (w 2021 roku, kiedy stosowano konwencjonalne KKP); P2 (w 2022 roku, kiedy zaczęto częściowo

wprowadzać metodę inaktywacji KKP), P3 (w 2023 roku, kiedy 50% KKP poddawano inaktywacji). W okresie P1 w KFMC przetoczono łącznie 33 907 składników krwi, z czego 27,2% stanowiły KKP, w P2 przetoczono łącznie 33 921 składniki krwi, z czego 23,6% stanowiły KKP, a w P3 przetoczono 37 193 składniki, z czego 22,1%, stanowiły KKP. Liczba przetoczonych jednostek KKCz na 1 przetoczenie KKP wynosiła w P1 — 1,93, w P2 — 2,25, a w P3 — 2,33. Częstość występowania reakcji poprzetoczeniowych po wszystkich składnikach krwi (przeliczając na 1000 transfuzji) przetoczonych w czasie badania wynosił dla P1 — 1,18, P2 — 1,03 i P3 — 0,81. Wskaźnik reakcji poprzetoczeniowych związanych z KKP (na 1000 transfuzji płytek krwi) wynosił 1,19 w P1, 1,87 w P2 i 1,46 w P3. Wskaźnik oceniający alergiczne reakcje poprzetoczeniowe (bezwzględna liczba na 1000 transfuzji) zmniejszył się między wszystkimi analizowanymi okresami, przy czym między P2 i P3 o 47% (0,71 w P1, 0,6 w P2 i 0,32 w P3). Wskaźnik niehemolitycznych reakcji poprzetoczeniowych nie zmienił się znacząco (0,38 w P1, 0,6 w P2 i 0,32 w P3). Wstępne dane wskazują na zmniejszenie ryzyka wystąpienia alergicznych reakcji poprzetoczeniowych (47%) po częściowym wdrożeniu metody inaktywacji KKP [11].

Pracownicy Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Radomiu (Polska), przeprowadzili badania dotyczące otrzymywania wystandaryzowanego osocza (o uśrednionej objętości i określonym stężeniu białek). Ze względu na fakt, że procedura wymaga połączenia osocza od pięciorga dawców, co znacząco zwiększa ryzyko przeniesienia zakażenia na biorcę, prewencyjnie zastosowano inaktywację czynników chorobotwórczych. Pięć jednostek osocza (zgodnych w układzie ABO) łączono w pulę, którą następnie dzielono na dwie porcje o objętości ok. 625–650 ml każda. Powstałe preparaty poddawano inaktywacji, po czym każdy z nich podzielono dodatkowo na trzy porcje, otrzymując sześć preparatów osocza inaktywowanego. Osocze w czasie maksymalnie do ośmiu godzin od preparatyki zamrożono w temperaturze  $-30^{\circ}\text{C}$ , uzyskując osocze świeżo mrożone (FFP, *fresh frozen plasma*). Łącznie w ramach badania otrzymano 30 opakowań FFP inaktywowanego. Badania stężenia fibrynogenu, cz. VIII i białka całkowitego (odpowiednio metodą Claussa, chromatyczną i kolorymetryczną) przeprowadzono w osoczu przed i po preparatyce oraz w FFP po miesiącu przechowywania. Średnia zawartość fibrynogenu w osoczu przed i po preparatyce oraz w FFP po miesiącu przechowywania wynosiła od-

powiednio  $324,6 \pm 30,0$  mg/dl;  $264,1 \pm 24,0$  mg/dl;  $232,2 \pm 24,3$  mg/dl (odzysk 71,5%), średnia zawartość cz. VIII —  $131,0 \pm 16,4$  IU/dl;  $96,4 \pm 17,1$  IU/dl;  $85,5 \pm 16,9$  IU/dl (odzysk 65%), a średnia zawartość białek osocza —  $60,7 \pm 2,7$  g/l;  $57,5 \pm 2,3$  g/l;  $56,5 \pm 1,4$  g/l (odzysk 92,9%). Inaktywowane FFP spełniło wymagania EDQM-u oraz wytycznych krajowych, przez co metoda ma szansę na implementację w rutynowym stosowaniu [12].

## System Mirasol

W kręgu zainteresowań naukowców z dziedziny transfuzjologii wciąż znajdują się mikropecherzyki błonowe (EV, *extracellular vesicles*) — koliste struktury błonowe, uwalniane z komórek pro- i eukariotycznych, w tym komórek krwi. S.P. Fortis i wsp. przeprowadzili badanie, w którym sprawdzono wpływ inaktywacji na liczbę EV tworzących się w KKP Af. Dziesięć jednostek KKP Af. zawieszonych w PAS podzielono na dwie porcje i przyporządkowano do dwóch grup: badanej, w której KKP poddawano inaktywacji przy użyciu systemu Mirasol oraz kontrolnej. Z obu grup preparatów pobierano próbki w 1., 3., 5. i 7. dniu przechowywania. Próbkę poddawano wirowaniu, a powstałe osocze ubogokomórkowe (PPP, *platelet poor plasma*), czyli docelowy materiał do badań, przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  do momentu wykonania oznaczenia. Rozmrożone i rozcieńczone próbki PPP poddawano badaniu przy użyciu urządzenia NanoSight NS300. Po przeprowadzeniu inaktywacji KKP Af. liczba EV (przypadających na 10 tys. krwinek płytkowych) uwolnionych w pierwszym dniu przechowywania była wyższa w porównaniu z grupą kontrolną ( $2,47 \times 10^{10}/10^5$  PLT vs.  $1,42 \times 10^{10}/10^5$  PLT). W grupie badanej występowało więcej „małych” EV, o średnicy od 20 do 300 nm. W trakcie przechowywania wzrosła liczba EV w grupie kontrolnej (dzień 1. —  $1,42 \times 10^{10}/10^5$  PLT, dzień 3. —  $2,65 \times 10^{10}/10^5$  PLT, dzień 5. —  $2,37 \times 10^{10}/10^5$  PLT, dzień 7. —  $2,74 \times 10^{10}/10^5$  PLT), natomiast w grupie badanej utrzymywała się na stałym poziomie około  $2,5 \times 10^{10}/10^5$  PLT. W grupie kontrolnej średni rozmiar EV utrzymywał się na stałym poziomie około 160 nm przez cały okres przechowywania. W grupie badanej rozmiar EV zmieniał się od 159,3 nm w dniu 1. do 173,9 nm w dniu 7. Wyższa liczba EV w początkowym okresie po inaktywacji oraz stabilność liczby EV w czasie mogą wskazywać, że inaktywacja wpływa na mechanizmy uwalniania EV, ale efekty te są umiarkowane [13].

## Promieniowanie UV-C

Ostatnio coraz częściej pojawiają się prace dotyczące inaktywacji czynników chorobotwórczych w KKCz przy zastosowaniu wyłącznie promieniowania UV-C. W pracy, w której uczestniczyli naukowcy z wielu ośrodków niemieckich, omówiono skuteczność inaktywacji w KKCz ze wszczepionym zarodźcem malarii. W celu sprawdzenia skuteczności inaktywacji *Plasmodium falciparum* z wykorzystaniem światła UV-C (254 nm) przygotowano trzy jednostki KKCz/RW (PAGGS-C, Ht ok. 30%) do których dodano *Plasmodium*, do końcowej parazytemii 0,1–1%. Następnie preparaty poddano inaktywacji, stosując promieniowanie UV-C (w dawkach od 1,5 J/cm<sup>2</sup> do 4,5 J/cm<sup>2</sup>). W dwóch z trzech prób stwierdzono, że promieniowanie o dawce 4,5 J/cm<sup>2</sup> doprowadziło do całkowitej inaktywacji *P. falciparum*. Badanie to potwierdziło, że inaktywacja przy zastosowaniu wyłącznie UVC (*ultraviolet radiation in the UV-C range*) — promieniowania ultrafioletowego w zakresie UV-C (długość fali 100–280 nm) jest skuteczna nie tylko w stosunku do bakterii i wirusów, ale także w stosunku do pierwotniaków [14].

## Porównanie metod inaktywacji

W pracy z ośrodka hiszpańskiego porównywano parametry jakościowe ZI. KKP poddawanych inaktywacji w systemie Intercept (311 jedn.) oraz ZI. KKP poddanych napromienianiu (523 jedn.). KKP przeznaczone do napromieniania otrzymywano metodą automatyczną (TACSI, Terumo) w wyniku połączenia 4 kożuszków leukocyarno-plateletowych z 300 ml roztworu wzbogacającego PAS-E (Grifols). Następnego dnia po preparatyce wykonywano procedurę napromieniania. KKP przeznaczone do inaktywacji otrzymano przez pulowanie 8 kożuszków leukocyarno-plateletowych i 280 ml roztworu wzbogacającego PAS-E (Macopharma), które poddano wirowaniu, rozdziałowi przy zastosowaniu prasy automatycznej, a następnie inaktywacji i 16-godzinnemu usuwaniu fotoproduktów. Po zakończeniu procedury preparat ostatecznie podzielono na dwie identyczne pod względem objętości porcje. KKP poddane napromienianiu charakteryzowały się znacznie większą objętością (364 ml ± 13 ml) niż KKP poddane inaktywacji (>184 ml ± 10 ml), a co za tym idzie zawierały mniej PLT w przeliczeniu na ml preparatu (0,8 × 10<sup>9</sup> vs. 1,3 × 10<sup>9</sup>). W przeliczeniu na całą jednostkę KKP poddane napromienianiu zawierały więcej PLT (2,9 × 10<sup>9</sup> ± 0,4) niż te inaktywowane (2,6 × 10<sup>9</sup> ± 0,3).

Sprawdzono także czas przechowywania wyżej wymienionych rodzajów KKP — jednostki inaktywowane były wydawane po średnio dwóch dniach (od dwóch do maksymalnie sześciu dni), podczas gdy napromieniane były przekazywane do podmiotów leczniczych po około trzech dniach (od dwóch do pięciu). Podejrzewa się, że mimo występowania statystycznie istotnych różnic w objętości czy liczbie krwinek płytkowych, nie będą one mieć znaczenia klinicznego, które ma być poddane ocenie w trakcie następnego etapu badań [15].

## Podsumowanie

Na podstawie liczby doniesień naukowych zaprezentowanych podczas 34 edycji ISBT można wnioskować, że inaktywacja, jako metoda zwiększająca bezpieczeństwo przetaczanych składników krwi, nadal cieszy się dużym zainteresowaniem naukowców. Przedstawione prace miały różnoraki charakter — od odtwórczych po nowatorskie (np. nowe zastosowania inaktywacji lub walidacje metod na potrzeby sytuacji awaryjnych lub kolejnych badań). Wśród ponad dwudziestu doniesień znalazły się również badania kliniczne, sprawdzające wpływ inaktywowanych składników na zwiększenie bezpieczeństwa biorców składników krwi. Obok rutynowego wdrożenia inaktywacji czynników chorobotwórczych w krwi pełnej i w koncentracie krwinek czerwonych, zbadanie odpowiedzi klinicznej i przekonanie klinicystów do wykorzystywania składników inaktywowanych jako „złotego standardu” jest jednym z najważniejszych wyzwań stojących przed transfuzjologami w najbliższym czasie. Niestety, nadal brakuje doniesień, które dawałyby nadzieje na przełom w kwestii zapewnienia bezpieczeństwa pacjentów przyjmujących preparaty KP lub KKCz — w tym roku na dwadzieścia siedem prezentacji tylko jedna dotyczyła inaktywacji czynników chorobotwórczych w KKCz z wykorzystaniem promieniowania UV-C, metody stosowanej dotychczas wyłącznie w celu inaktywacji czynników chorobotwórczych w KKP (system Therflex Platelets UV).

Należy podkreślić, że w niniejszym sprawozdaniu nie oceniano jakości przeprowadzonych badań. Starano się przede wszystkim przedstawić, w jaki sposób ośrodki, które dopiero wprowadzają metody inaktywacji, jak i te, które mają już wieloletnie doświadczenie z systemami do inaktywacji, oceniają zarówno jakość i bezpieczeństwo inaktywowanych składników krwi, jak i ich skuteczność kliniczną.

**Konflikt interesów:** nie zgłoszono

## **Piśmiennictwo**

1. Ramirez-Arcos S. Platelet component safety in the era of advanced bacterial screening and pathogen inactivation. *Vox Sang.* 2024; 119 (S1): WP09-L04.
2. Goczyńska P, Lasocka J, Lachert E. Selected issues on pathogen inactivation in blood components; reports presented at the 33rd Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion (ISBT) in Gothenburg, June 17–21, 2023. *J Transf Med.* 2023; 16(4): 278–283, doi: [10.5603/jtm.99304](https://doi.org/10.5603/jtm.99304).
3. Culibrk B, Howell A, Walsh G M, et al. Quantifying residual red blood cells in platelet and plasma components — flow cytometry and visual inspection tool support implementation of pathogen inactivation. *Vox Sang.* 2024; 119 (S1): PA27-LO3.
4. Kutac D, Bohonek M, Landova L, et al. Effect on pathogen reduction using riboflavin and UV light, subsequent cryopreservation and thawing on red blood cells and platelets concentrates. *Vox Sang.* 2024; 119 (S1): PA27-L04.
5. Isola H, Galvanin A, Pissenem Rudwill F, et al. Impact of no agitation on buffy coat platelet concentrates during reduction of residual amotosalen (CAD) after pathogen inactivation. *Vox Sang.* 2024; 119 (S1): PA27-L05.
6. Isola H, Pissenem Rudwill F, Galvanin A, et al. Impact of a 46 hours CAD duration on pathogen reduced buffy coat platelet concentrate double storage quality. *Vox Sang.* 2024; 119 (S1): P311.
7. Greenwall B, Reeder K, Anani W. Elevated plasma testosterone concentrations with males on testosterone replacement therapy are mitigated with pathogen reduction technology. *Vox Sang.* 2024; 119 (S1): P294.
8. Nahata P, McCormack M, Johnson A, et al. Amotosalen/UVA treatment of platelet and plasma components to inactivate WHO reference bacterial strains. *Vox Sang.* 2024; 119 (S1): P292.
9. Krath M, Nahata P, McCormack, et al. Amotosalen/UVA treatment of *Bacillus mobilis*, *Acinetobacter seifertii*, *Staphylococcus saprophyticus*, and *Leclercia adacarboxylata* from a contaminated apheresis platelet unit. *Vox Sang.* 2024; 119 (S1): P293.
10. Lambert A, McCague, McGhee K, et al. Successful inactivation of pathogenic bacterial strains in double-dose pooled buffy coat platelet using Amotosalen/UVA pathogen reduction treatment. *Vox Sang.* 2024; 119 (S1): P303.
11. Alsughair A, Alsaif A, Pukhta I, et al. The impact of pathogen reduction technology for platelets on the incidence of transfusion reactions — a single center study. *Vox Sang.* 2024; 119 (S1): P317.
12. Pula M, Picard-Maureau M, Parazmowska, The impact of plasma pooling, pathogen-reduction and the freeze/thaw process on plasma quality and standardization. *Vox Sang.* 2024; 119 (S1): P299.
13. Tsalas S, Fortis S P, Tsantes A G, et al. The platelet-derived microvesicles in pathogen inactivated apheresis bags stored in PAS. *Vox Sang.* 2024; 119 (S1): P302.
14. Fischer S, Zilkenat S, Schulze T, et al. Dose-dependent inactivation of *Plasmodium falciparum* in red blood cell concentrates by treatment with short wavelength ultraviolet light. *Vox Sang.* 2024; 119 (S1): P316.
15. Vera B, Larrea L, Vaya M, et al. Comparison of the quality parameters of irradiated vs pathogen-reduced platelet products. *Vox Sang.* 2024; 119 (S1): P315.