

## Inaktivacija patogenov v krvnih komponentah: tehnologije, trenutno v uporabi, in trendi v prihodnosti

Pathogen reduction in blood components:  
current technologies and future trends

Ana Milojkovič, Marko Cukjati

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Štajmerjeva 6, 1000 Ljubljana

### Korespondenca/ Correspondence:

Ana Milojkovič, dr. med.,  
specializantka transf.  
med.

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Štajmerjeva 6, Ljubljana  
email naslov: ana.milojkovic@ztn.si  
tel. 01/5438-372

### Ključne besede:

topilo-detergent,  
metilensko modrilo,  
amotosalen, riboflavin,  
inaktivacija patogenov

### Key words:

solvent-detergent,  
methylene blue,  
amotosalen, riboflavin,  
pathogen reduction

### Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2012;  
81 supl 2: II-289-98

Prispelo: 23. mar. 2012,  
Sprejeto: 25. sept. 2012

### Izvleček

Inaktivacija patogenov v krvnih komponentah je proaktivni pristop k preprečevanju prenosa povzročiteljev bolezni s transfuzijo. Postopki inaktivacije plazme s topilom in detergentom se uporabljajo že več kot dve desetletji. Večina novejših tehnik z uporabo aktivnih molekul in svetlobe s spremembo nukleinskih kislin virusov, bakterij, parazitov in levkocitov onemogoči njihovo pomnoževanje. Nekatere tehnike tudi učinkovito inaktivirajo levkocite in s tem zmanjšajo pogostost neželenih učinkov, ki jih ti povzročajo. Dober sistem za inaktivacijo patogenov mora imeti čim širši spekter delovanja na različne vrste patogenov, hkrati pa v čim manjši meri okvarjati celične in plazemske sestavine. Postopek mora imeti dovolj varen toksikološki profil, ne sme povzročati nastajanja neoantigenov in mora zagotoviti klinično učinkovitost transfundiranih komponent. Danes so v Evropi v uporabi 4 različni sistemi za inaktivacijo patogenov: sistem topilo/detergent (S/D), metilensko modrilo (MB) in vidna svetloba, amotosalen in UVA žarki, riboflavin in UV žarki. Na Zavodu za transfuzijsko medicino v Ljubljani od leta 2008 uporabljamo sistem z amotosalenom in UV žarki za inaktivacijo patogenov v trombocitnih pripravkih. Vsaka od navedenih tehnik ima svoje prednosti in slabosti. Zaenkrat univerzalnega sistema, ki bi lahko bil uporaben za vse krvne komponente, ni. V teku je razvoj sistema za inaktivacijo polne krvi. To bo tudi ekonomsko upravičilo uvajanje takega sistema, kar je danes, glede na zelo nizko možnost prenosa okužbe za znane s transfuzijo

prenosljive bolezni, eno glavnih vprašanj pred uvajanjem novih tehnologij. Drugo vprašanje je, koliko, in, če sploh lahko čakamo? V državah v razvoju bi tudi manj idealen sistem pomenil razliko med življenjem in smrtjo za mnoge bolnike. Predstavili bomo mehanizem dejstva, postopek predelave, toksikološki profil, učinkovitost redukcije patogenov, neželene reakcije in klinično učinkovitost navedenih metod.

### Abstract

Pathogen reduction in blood components represents a proactive approach in the prevention of spreading blood-borne pathogens via transfusion. Solvent-detergent pathogen reduction technology has been in routine use for more than two decades. Most current techniques use molecules which target viral, bacterial, protozoan or leukocyte nucleic acids and, with subsequent illumination, disable their replication. Beside pathogen reduction effect, some techniques successfully inactivate leukocytes, thus lowering the number of adverse reactions caused by them. Pathogen reduction system is expected to selectively reduce pathogen load while simultaneously preserving blood component function. This aim is very ambitious and still not attained. The technology must be non-toxic, must not form neoantigens and must preserve clinical function of blood components. Four systems currently used in Europe are: solvent/detergent (SD) pathogen reduction technology, methylene blue (MB) plus visible light reduction technology, amotosalen plus UVA light and riboflavin plus UV light

technology. The technology which utilizes amotosalen and UV light for pathogen reduction in platelet components was introduced into routine practice of the Blood Transfusion Centre of Slovenia in 2008. Each method has its advantages and disadvantages. So far, a system for universal inactivation of all three components has not been developed. Studies for whole blood inactivation system are ongoing. In view of the low risk in transmitting classical transfusion diseases, this

approach will be the only pathogen reduction technology the implementation of which will be justified with respect to cost/benefit issues. The other question is how long can we wait and if we can wait at all? In developing countries such a technology can mean difference between life and death. We will present the mechanisms of action, processing, toxicology profile, pathogen reduction efficacy, adverse effects and clinical experience of the methods mentioned above.

## Uvod

Na področju varnosti krvi in krvnih komponent je bil v zadnjih desetletjih dosežen velik napredek. Danes je transfuzija krvi in krvnih komponent bolj varna kot kadar koli v preteklosti. Področje varnosti, ki je bilo vedno v ospredju, je možnost prenosa povzročiteljev bolezni s transfuzijo. Uvedeni so številni ukrepi na področju izbire varnih krvodajalcev in presejalnega testiranja odvzete krvi. Kljub visoki stopnji varnosti za nekatere povzročitelje bolezni, kot so virus hepatitisa B (HBV), virus hepatitisa C (HCV) in virus človeške imunske pomanjkljivosti (HIV), pa ničelnega tveganja ne bomo nikoli dosegli. Nove porajajoče se nalezljive bolezni v času globalizacije so nenehna grožnja, ki terja vedno nove ukrepe na področju zagotavljanja varne transfuzije. Izkušnje iz preteklosti nas učijo, da je čas od prepoznavne novega povzročitelja kot potencialno nevarnega do vpeljave učinkovite strategije za preprečevanja njegovega prenosa s transfuzijo pogosto nesprejemljivo dolg. Tako je od odkritja virusa hepatitisa B minilo 30 let, od odkritja hepatitisa C pa 15 let, preden so bili uvedeni ustrezni ukrepi na področju transfuzijske medicine. Pri virusu HIV je bilo to obdobje 3 leta, virusu Zahodnega Nila (WNV) 4 leta in Trypanosomi cruzi 5 let.<sup>1</sup> Ob vse večji varnosti krvnih komponent za izbrane povzročitelje bolezni pa v ospredje stopajo tudi drugi povzročitelji, kot so različne po Gramu pozitivne in negativne bakterije in paraziti, ki so bili v preteklosti deležni manjše pozornosti.

Inaktivacija patogenov je novejši, proaktivni pristop k zagotavljanju varne transfuzije, ki pomembno dopolnjuje obstoječe ukre-

pe. Dober sistem inaktivacije mora imeti čimširši spekter delovanja na različne povzročitelje bolezni, hkrati pa ohranjati celične in plazemske sestavine v krvnih komponentah čim bolj nepoškodovane. S postopki inaktivacije lahko učinkovito preprečujemo prenose povzročiteljev bolezni, še preden so na voljo drugi učinkoviti ukrepi, oziroma še preden je povzročitelj bolezni sploh prepoznani. Nekatere tehnike inaktivacije delujejo tudi na levkocite v krvnih komponentah, ki so razlog za številne neželene učinke ob transfuziji: febrilne nehemolitične transfuzijske reakcije (FNHTR), s transfuzijo povezano akutno poškodbo pljuč (TRALI) in s transfuzijo povezane reakcije presadka proti gostitelju (TaGVHD).

V nadaljevanju so podrobneje opisane tehnike inaktivacije, ki se že rutinsko uporabljajo, in tiste, ki so v fazi kliničnih preizkušanj.

## S/D tehnologija

Tehnologija topilo detergent (solvent-detergent, S/D) je najstarejša tehnika inaktivacije patogenov, ki se uporablja že več kot 20 let. Zaradi mehanizma delovanja je uporabna zgolj za plazemske komponente.

*Biokemijske lastnosti in mehanizem delovanja.* Tehnika temelji na sočasnem delovanju organskega topila 1-odstotnega tri-n-butil fosfata (TNBP), ki raztaplja maščobne ovojnice virusov, in neioniziranega detergenta 1-odstotnega polioksietilen-p-t-oktilfenola (Triton X-100), ki stabilizira TNBP, prekinja maščobno plast v membrani in olajšuje izločanje lipidov.<sup>2</sup>

*Opis postopka.* Proces se izvaja na zlitju plazme s končnim volumnom 60 do 650 li-

trov in je primeren za industrijsko proizvodnjo. Virucidni detergent in topilo se zlitju plazme doda za 1,5 do 4 ure pri temperaturi 30 °C. Po končanem postopku se TNBP odstrani z oljno ekstrakcijo, Triton X-100 pa s kromatografsko adsorpcijo. Plazma se filtrira pred in po postopku zaradi odstranjevanja preostalih celic in celičnega drobirja.<sup>3</sup> Novejše metode vključujejo dodatno kromatografijo z geli, ki specifično vežejo prione.<sup>4</sup> Na voljo so tudi novi sistemi za S/D inaktivacijo posameznih enot plazme ali manjših zlitij 10 do 12 enot, ki se lahko izvajajo v transfuzijskih ustanovah.<sup>5</sup>

**Toksikološki profil.** Dovoljene koncentracije preostalih aktivnih učinkovin v SD plazmi po evropski Farmakopeji (6.2, julij 2008:1646) so < 2 µg / mL za TNBP in < 5 µg / mL za Triton X-100. Dejanske vrednosti so še nižje: 0,5 µg / mL za TNBP in 1 µg / mL za Triton X-100, kar kaže na visok varnostni profil.<sup>3</sup> V plazmi ni zaznavnih količin protiteles proti levkocitnim antigenom (SD plazma iz zlitja 200 do 380 L),<sup>3</sup> prav tako ni poročil o neoantigenih.<sup>6</sup>

**Učinkovitost inaktivacije patogenov.** S/D tehnologija učinkovito inaktivira viruse z maščobno ovojnico, kot so virus HIV, HBV za ≥ 6 log, in virus HCV s stopnjo redukcije ≥ 5 log. Tehnologija ni učinkovita proti patogenom brez maščobne ovojnice, kot sta virus hepatitisa A in parvovirus B19.<sup>2</sup> Možnost prenosa omenjenih virusov je sicer majhna zaradi velike prekuženosti populacije in prisotnosti nevtralizirajočih protiteles v zlitju plazme.<sup>7</sup> Sam postopek znižuje koncentracijo prionov v plazmi za 2,5 log, z dodatnim postopkom kromatografije na gelu, ki veže prionske beljakovine, pa je stopnja redukcije večja kot 5 log.<sup>4</sup>

**Vpliv na plazemske proteine.** Aktivnost faktorja VIII se zmanjša za 20–30 %, ostalih faktorjev koagulacije pa za manj kot 20 %, kar je primerljivo z drugimi tehnikami inaktivacije.<sup>8,9</sup> Pri večjih zlitjih (200–380 L) je aktivnost proteina S znižana za 35 % in α<sub>2</sub>-antiplazmina na 24–33 % normalnih vrednosti.<sup>3</sup> Novejši postopki na manjših zlitjih zagotavljajo ohranitev do 90 % začetne aktivnosti antikoagulacijskih faktorjev (protein C, protein S) in inhibitorjev proteaze (antitrombin III, α<sub>2</sub>-antiplazmina).<sup>5</sup>

**Klinična učinkovitost in neželene reakcije.** V obdobju od 1991 do 2009 je podjetje Octapharma (Lachen, Švica) skupaj svojimi licenčnimi partnerji proizvedla približno 10 milijonov enot S/D plazme. Poročajo o manjšem številu alergijskih reakcij v primerjavi z neinaktivirano plazmo, zabeležen pa ni bil noben primer TRALI, kar je verjetno posledica dilucijskega učinka med zlivanjem.<sup>3</sup> Zmanjšana aktivnost proteina S bi lahko privedla do hiperkoagulabilnega stanja, zlasti pri masivnih transfuzijah in pri izmenjalnih plazmaferezah v okviru zdravljenja trombotične trombocitopenične purpore (TTP).<sup>10</sup> Znižana vrednost α<sub>2</sub>-antiplazmina je pomembna pri bolnikih s hiperfibrinolizo, naprimer pri bolnikih v reperfuzijski fazi transplantacije jeter,<sup>11</sup> vendar v obsežnih kliničnih raziskavah vpliv sprememb aktivnosti nekaterih proteinov v S/D plazmi na učinkovitost plazme ni bil dokazan.<sup>3</sup>

## Novejše tehnologije fotoinaktivacije

Novejše tehnologije inaktivacije plazme so usmerjene v genom povzročiteljev bolezni. S kombinacijo aktivnih učinkovin in svetlobe, ali samo svetlobe v primeru inaktivacije z UVC žarki, na različne načine poškodujejo nukleinske kisline in s tem preprečijo delovanje in pomnoževanje patogenov. V tem prispevku se bomo omejili na tehnologije, ki so uspešno prestale fazo kliničnih preizkušanj ali se že rutinsko uporabljajo: inaktivacija z uporabo metilenskega modrila (MB) v kombinaciji z vidno svetlobo, inaktivacija z uporabo amotosalena in UV-A žarkov, inaktivacija z riboflavinom in UV žarki in inaktivacija z uporabo UVC žarkov brez dodajanja fotosenzibilizatorjev.

### Metoda inaktivacije z uporabo metilenskega modrila (MB) v kombinaciji z vidno svetlobo

**Biokemijske lastnosti in mehanizem delovanja.** MB je fotoaktivna fenotiazinska molekula, ki po obsevanju z vidno svetlobo tvori proste kisikove radikale, ki oksidirajo purinsko bazo gvanozin, povzročajo de-

strukcijo nukleinskih kislin in onemogočajo virusno replikacijo.

*Opis postopka.* Prvotno »Springeovo metodo« so izvajali v industrijskih obratih. Po dodatku metilenskega modrila se je plazma obsevala eno uro s fluorescentno svetlobo, po končanem postopku pa preostalega barvila niso odstranjevali iz plazme. Zaradi slabega prehajanja metilenskega modrila v celice se je plazma prej zamrzovala in ponovno odtajala, s čimer se je povečala dostopnost virusnega genoma, ki se je sprostil iz poškodovanih levkocitov. Novejši sistem THERAFLEX MB-plazma (MacoPharma, Mouvoux, France) je primeren za inaktivacijo posameznih enot plazme. Sistem je sestavljen iz 0,65 µm filtra, metilenskega barvila (85 µM MB klorida), vrečke za obsevanje in vrečke za shranjevanje obdelane plazme. S filtracijo se najprej odstranijo levkociti in celični drobir, nato se plazmi doda metilensko modrilo v končni koncentraciji 1 µM. Sledi obsevanje s svetlobo valovne dolžine 590 nm 15 do 20 min pri temperaturi ≤ 22 °C. Prejeta energija obsevanja je 180 J/cm<sup>2</sup>. Po končanem obsevanju se s filtracijo iz plazme odstrani več kot 95 % preostalega barvila in njegovih fotoproduktov.<sup>12</sup>

*Toksikološki profil.* Glede na razpoložljive podatke ima MB plazma varen toksikološki profil in ni poročil o genotoksičnosti ali formiranja neoantigenov.<sup>12</sup>

*Učinkovitost inaktivacije patogenov.* Postopek inaktivira predvsem viruse z maščobno ovojnico HIV, HBV, HCV in WNV za ≥ 5 log. Učinkovitost inaktivacije virusov brez maščobne ovojnice je različna. Metoda je slabo učinkovita za virus hepatitisa A, stopnja redukcije parvovirusa B19 pa je več kot 5 log. Za znotrajcelične viruse, parazite in bakterije opisana metoda ni dovolj učinkovita.<sup>12,13</sup>

*Vpliv na plazemske proteine.* Aktivnost faktorja VIII in fibrinogena se zmanjšata za 20–35 %, aktivnost ostalih faktorjev koagulacije v manjšem obsegu, za 10–15 %. Koncentracije ADAMTS 13 metaloproteinaze, proteina C, proteina S, antitrombina III in plazminogena se dobro ohranijo.<sup>8–9,14</sup> MB postopek vpliva na biološko aktivnost fibrina. Vzrok je najverjetneje fotooksidacija histidina in posledično onemogočena polime-

rizacija fibrinskih monomerjev, vendar pa fibrinogen lahko še vedno reagira s trombocitnimi receptorji (GP IIb/IIIa), kar je ključno za aktivacijo in agregacijo trombocitov.<sup>13</sup>

*Klinična učinkovitost in neželene reakcije.* Varnost tehnologije je bila dokazana na več kot 4,4 milijona enot plazme, inaktivirane z MB. Nekatere raziskave kažejo na manjšo učinkovitost MB plazme pri zdravljenju TTP, čeprav je koncentracija ADAMTS 13 metaloproteaze ohranjena.<sup>15</sup> Zaradi večje pogostnosti alergijskih reakcij v primerjavi s SZP, dva primera anafilaktične reakcije<sup>16</sup> in zaradi nestabilne koncentracije fibrinogena po inaktivaciji se je Francoska skupina za hemovigilanco (French agency for the safety of health products – Afssaps) odločila, da z marcem 2012 prepove uporabo MB plazme v Franciji. Podatki raziskav iz Belgije, Španije in Grčije sicer ne kažejo statistično značilne razlike v pogostnosti alergičnih reakcij med SZP in MB plazmo.<sup>12</sup>

## Metoda inaktivacije z uporabo amotosalena in UV-A žarkov

Metoda INTERCEPT (Cerus, Evropa) inaktivacije je na voljo tako za plazemske kot trombocitne pripravke in je namenjena za obdelavo posameznih enot trombocitov ali zlitja manjšega števila enot plazme. V razvoju je sistem, ki bi omogočal tudi inaktivacijo eritrocitov. Zaradi delovanja na ravni nukleinskih kislin se učinkovito inaktivirajo tudi dajalčevi levkociti.

*Biokemijske lastnosti in mehanizem delovanja.* Amotosalen (psoralen) pod vplivom UV-A žarkov reagira s pirimidinskimi bazami nukleinskih kislin in tvori kovalentne vezi, ki nepovratno preprečijo podvajanje nukleinskih kislin in prepisovanje v proteine.

*Opis postopka.* V zaprtem sistemu vrečk se pripravku doda raztopina amotosalena hidroklorida (S-59) v končni koncentraciji 150 µmol/L, nato pa obseva z UV-A žarki (320–400nm) 4–6 minut (skupna energija 3 J/cm<sup>2</sup>). Med obsevanjem se aktivira 80 % amotosalena, ki se razgradi na presnovne produkte. Po obsevanju se pripravek za 4–16 ur prelije v posebno vrečko z adsorpcijsko blazinico, ki veže preostali amotosalen in

razpadle produkte. Sistem je možno uporabiti za inaktivacijo SZP in trombocitov, resuspendiranih v plazmi ali ohranitveni raztopini (InterSol ali SSP+).<sup>17</sup>

*Toksikološki profil.* Eksperimenti na živalih so pokazali, da je mutageni odmerek amotosalena  $4 \times 10^3$  do  $7 \times 10^6$  višji od količine v inaktiviranem pripravku, toksični odmerek pa  $25 \times 10^3$  višji, kar govori v prid sprejemljivemu varnostnemu profilu amotosalena in njegovih fotoproduktov.<sup>18</sup> Pojavljanja neoantigenov niso opazili.<sup>19</sup>

*Učinkovitost inaktivacije patogenov.* Spekter inaktivacije vključuje viruse z maščobno ovojnico in sicer HIV-1/2 (tudi intracelularne oblike), HBV, HCV, HTLV I/II, CMV, WNV, chikungunia in denga virus s stopnjo redukcije 4,5 do  $> 6$  log. Učinkovitost inaktivacije je zelo različna za viruse brez maščobne ovojnice. Stopnja redukcije za parvovirus B19 je 3,5 do  $> 5$  log, virus HAV pa je odporen na to tehniko inaktivacije. Rezultati kažejo zelo dobro inaktivacijo po Gramu pozitivnih in negativnih bakterij, spirohet in parazitov in sicer od 4,3–6,8 log. Stopnja redukcije viabilnih celic T je  $> 5,4$  log.<sup>17</sup>

*Vpliv na trombocite in plazemske proteine.* Hemostatska funkcija trombocitov, obdelanih s tehnologijo Intercept, kot tudi večina faktorjev koagulacije v plazmi so dobro ohranjeni (73–98 %).<sup>17,20</sup> Aktivnost faktorja VIII po inaktivaciji je 73 %, kar ustreza strokovnim priporočilom.<sup>21</sup> Aktivnost fibrinogena po inaktivaciji je 87 %. V koncentraciji von Willebrandovega faktorja ali aktivnosti ADAMTS 13 metaloproteinaze po inaktivaciji niso dokazali statistično značilnih razlik. Protein C in protein S tako kot antitrombin so obdržali več kot od 95 % začetne aktivnosti.<sup>20</sup>

*Klinična učinkovitost in neželene reakcije.* Sistem Intercept ima od leta 2002 CE certifikat za trombocite in leta 2006 za plazmo. Do sedaj je bilo transfundiranih približno 700.000 produktov, obdelanih s tehnologijo Intercept. Dve študiji, v Evropi in ZDA sta obravnavali klinično učinkovitost trombocitov, inaktiviranih z amotosalenom. Študija EuroSPRITE ni pokazala statistično značilne razlike v porastu števila trombocitov po transfuziji (corrected count increment, CCI)

inaktiviranih trombocitov v primerjavi z neinaktiviranimi.<sup>22</sup> Študija SPRINT v ZDA je obravnavala hemostatsko funkcijo inaktiviranih trombocitov pri bolnikih s krvavitvijo. Rezultati so sicer pokazali manjši CCI, krajši presledek med transfuzijami in večje število transfundiranih enot v skupini bolnikov ki so dobili inaktivirane pripravke, vendar je bila incidenca krvavitev med skupinama primerljiva.<sup>23</sup> Učinkovitost plazme, obdelane s tehnologijo Intercept, je bila dokazana v več raziskavah pri bolnikih s kongenitalnimi ali pridobljenimi koagulopatijami kot tudi pri bolnikih, zdravljenih zaradi TTP.<sup>17</sup> Podatki, pridobljeni v sistemu hemovigilance, so pokazali visoko raven varnosti z zelo majhnim številom neželenih reakcij v primerjavi s SZP.<sup>24</sup> Glede na zelo visoko raven inaktivacije levkocitov je pripravek obdelan s tehnologijo Intercept enakovreden gama-obsevanemu pripravku v smislu preprečevanja boleznih presadka proti gostitelju (GVHD).

## Riboflavin + UV žarki

Tehnologija inaktivacije z riboflavinom in UV žarki se uporablja za inaktivacijo posameznih enot plazme ali trombocitov in se lahko izvaja v transfuzijskih ustanovah. V fazi kliničnega preizkušanja pa je tudi sistem za inaktivacijo polne krvi.

*Biokemijske lastnosti in mehanizem delovanja.* Riboflavin (Vitamin B2) je planarna molekula ki se naveže na nukleinske kisline in se aktivira pod uplivom UV žarkov. Z posredovanjem transferja elektronov ali ustvarjanjem prostih kisikovih radikalov modificira purinsko bazo gvanozin, kar poškoduje nukleinske kisline in onemogoča virusno replikacijo.<sup>20</sup>

*Opis postopka.* Pripravek plazme ali trombocitov se poveže v funkcionalno zaprt sistem s setom za inaktivacijo, ki vsebuje 35 mL riboflavina (500  $\mu\text{M}$  / L). Pripravek se nato obseva z UV žarki (285–365 nm) ob stalnem mešanju s frekvenco 120 ciklov v minuti pri temperaturi pod 37 °C do končne energije obsevanja od 6,24 J/mL. Odstranjevanje preostalega riboflavina oz. njegovih razpadnih produktov po inaktivaciji ni potrebno. Pri sistemu za inaktivacijo polne

krvi se energija UV žarkov prilagaja glede na koncentracijo eritrocitov v pripravku.<sup>25</sup>

*Toksikološki profil.* Riboflavin (Vitamin B2) je esencialna sestavina človeškega telesa. Obsežne študije so pokazale, da riboflavin in njegovi presnovni produkti niso toksični in nimajo mutagenega potenciala.<sup>18</sup>

*Učinkovitost inaktivacije patogenov.* Učinkovito deluje na viruse z maščobno ovojnico, in sicer HIV (tudi intracelularno), HCV, HBV, CMV, WNV, virusa chikungunia in rabies od 2,1 log do 6,3 log. Deluje tudi na viruse brez maščobne ovojnice in je edina metoda inaktivacije, ki učinkuje tudi na virus HAV s stopnjo redukcije 1,8 log in parvovirus B19 za  $\geq 5,1$  log. Deluje tudi na parazite od 3,2–5,0 log. Inaktivacija bakterij kaže učinkovitost od 98 %. Reducira tudi limfocite T za  $> 6$  log.<sup>25</sup>

*Vpliv na sestavine krvnih komponent.* Po inaktivaciji prihaja do določene stopnje aktivacije trombocitov, vendar je hemostatska sposobnost trombocitov ohranjena.<sup>26</sup> Plazma, obdelana z uporabo tehnologije Mirasol, ima za približno 20 % nižjo vrednost koagulacijskih faktorjev, in približno za 20–30 % znižano koncentracijo fibrinogena, FVIII in FXI. Inhibitorji koagulacije in ADAMTS 13 metaloproteinaza so dobro ohranjeni.<sup>8,9</sup>

*Klinična učinkovitost in neželene reakcije.* Postopek inaktivacije trombocitov z uporabo tehnologije Mirasol (CaridianBCT, Lakewood, Colorado) je dobil certifikat CE leta 2007, za plazmo pa 2008. V randomizirani študiji MIRACLE je obravnavana učinkovitost in varnost z Mirasolom obdelanih trombocitov. CCI po 1 h je bil nižji v obravnavani skupini, in sicer:  $11,725 \pm 1,140$  vs  $16,939 \pm 1,149$ . Po 24 urah so rezultati bili  $6,676 \pm 883$  vs  $9,886 \pm 915$ .<sup>25,27</sup> Rezultati pri obeh skupinah so ustrežali standardom, ki kaže, da mora biti CCI v prvi uri  $\geq 7,5 \times 10^9/L$ , po 24 urah pa  $\geq 4,5 \times 10^9/L$ .<sup>28</sup> Bili so primerljivi tudi z izsledki študije s psoralenom obdelanih trombocitov (EuroSPRITE)<sup>22</sup>. Med skupinama ni bilo razlike v številu neželenih reakcij, intervalu med transfuzijami, številu transfundiranih enot na bolnika in odmerku transfundiranih trombocitov.<sup>27</sup> Klinične študije o učinkovitosti plazme še potekajo. Inaktivacija patogenov v polni krvi je učinkovita v smislu inaktivacije patogenov in

levkocitov, kakovost vseh krvnih komponent, ki jih pridobimo iz polne krvi, je dobro ohranjena.<sup>25</sup>

## Metoda inaktivacije z uporabo UVC žarkov

Sistem za inaktivacijo patogenov z uporabo UVC žarkov je novejša tehnologija inaktivacije, ki temelji na že dolgo znani baktericidni in virucidni lastnosti UVC žarkov in ne potrebuje dodajanje fotoaktivnih substanc, kar je z vidika varnosti zelo pomembno. Sistem za inaktivacijo patogenov v trombocitih THERAFLEX UV-Platelet system, ki ima od leta 2009 CE certifikat, je uspešno prešel fazo I kliničnih preizkušanj. Pričakuje se odobritev faze III kliničnih raziskav.<sup>29</sup>

*Mehanizem delovanja.* UVC žarki (200–280nm) inaktivirajo patogene z neposrednim delovanjem na nukleinske kisline. Sprožijo nastanek dimerjev med pirimidinskimi bazami (ciklobutan-pirimidin in pirimidin-pirimidon dimerji), kar prepreči prepisovanje v proteine. Stopnja poškodb nukleinskih kislin, ki je večja od sposobnosti celičnih mehanizmov za njihov popravljanje, prepreči pomnoževanje patogenov ali sproži celično smrt.<sup>30</sup>

*Opis postopka.* Pripravek trombocitov resuspendiranih v plazmi in ohranitveni raztopini SSP+ (MacoPharma, Turcoing, France) se sterilno poveže s setom za inaktivacijo, ki je sestavljen iz vrečke za obsevanje velikosti 19 x 38cm in vrečke za končno shranjevanje obdelanega pripravka. Pripravek trombocitov se obojestransko obseva z UVC žarki (254 nm) na napravi Macotronic UV (MacoPharma) od 30 min do 24 ur ob stalnem mešanju s frekvenco 110 ciklov v minuti. Stalno mešanje omogoča nastajanje dovolj tankih plasti tekočine, skozi katere lahko prodirajo UVC žarki za učinkovito inaktivacijo. Končna energija obsevanja je odvisna od prepustnosti vrečke za UVC žarke in je v zadnji različici sistema 0,2 J/cm<sup>2</sup>. Po končanem obsevanju se trombocitni pripravek prelije v vrečko za shranjevanje.<sup>29</sup>

Proces inaktivacije patogenov v plazmi do sedaj ni bil preverjen, glede na preliminarno

narne raziskave bi bil ustrezen odmerek obsevanja  $1 \text{ J/cm}^2$ .<sup>29</sup>

*Toksikološki profil.* Pri postopku ne dodajamo novih substanc, zato standardni pristopi k toksikološkem testiranju niso potrebni.<sup>29</sup>

*Učinkovitost inaktivacije patogenov.* Učinkovitost inaktivacije humanega parvovirusa B19, virusa hepatitisa A, in virusa hepatitisa C je večja kot 4 log. Stopnja inaktivacije je nekoliko nižja za virus hepatitisa B in sicer 2–3 log in za WNV od 3,4–4 log. Virus HIV je sorazmerno odporen na obsevanje z UVC, s stopnjo redukcije 1 log. Učinkovitost inaktivacije po Gramu pozitivne in negativne bakterije, aerobne in anaerobne bakterije je  $> 4 \text{ log}$ ., omejena pa je učinkovitost za spore *Bacillus cereus*. Preliminarni rezultati kažejo tudi uspešno inaktivacijo parazitov, vendar so potrebne nadaljnje študije, ki bi to potrdile.<sup>29</sup>

*Vpliv na sestavine krvnih component.* Na živalskih modelih je potrjeno, da po obsevanju z UVC žarki ne prihaja do formiranja neoantigenov.<sup>29</sup> Kakovost plazemskih proteinov in trombocitov se do določene meje spremeni. Aktivnost faktorjev strjevanja se po obsevanju z  $1 \text{ J/cm}^2$  zmanjša za 10–20 %. Sorazmerno bolj občutljiv je faktor XI, saj se njegova aktivnost po obsevanju zmanjša za 23 %.<sup>30</sup> Trombociti, obsevani z UVC žarki, imajo rahlo povečano raven presnove in aktivacije. Med drugimi parametri je bila največja sprememba zabeležena pri odgovoru na osmotski šok, kjer so se vrednosti takoj po obsevanju zmanjšale za 20–30 %, med nadaljnjim hranjenjem pa ponovno nekoliko povečale. Rezultati kažejo, da so in vitro značilnosti obsevanih trombocitov primerljive z drugimi metodami inaktivacije.<sup>17,26</sup> V nadaljnjih raziskavah bi bilo potrebno preučiti vpliv teh sprememb na funkcionalnost in klinično učinkovitost trombocitov.<sup>30</sup>

## Metode za inaktivacijo patogenov v polni krvi in eritrocitnih komponentah

Kljub intenzivnemu razvoju v zadnjih letih tehnologija inaktivacije patogenov v polni krvi in eritrocitih še ni prešla v rutin-

sko uporabo. Poglavitna ovira je absorpcija svetlobe s strani hemoglobina in občutljivost celic na postopek fotoinaktivacije, ki se pri tem ne smejo poškodovati. Preizkušata se predvsem dva različna koncepta inaktivacije: inaktivacija z uporabo svetlobe zunaj spektra absorpcije hemoglobina, in inaktivacija brez uporabe svetlobe. Največ raziskav na področju prvega pristopa je usmerjenih v uporabo riboflavina, dimetilmtilen modrila, fleksibilnih fotosenzibilizirajočih barvil, kot je tiopiridium v kombinaciji z antioksidansom dipiridamolom ali tiazol oranžno. Pri drugem pristopu je bilo največ raziskav opravljenih z aktivnimi substancami PEN110 in S 303. Zaradi nastajanja neoantigenov so razvoj PEN110 opustili. Trenutno tehnologija z uporabo molekule S-303 največ obeta in je v fazi III kliničnih študij, zato jo nekoliko podrobneje predstavljamo.

### S-303 tehnologija

*Biokemijske lastnosti in mehanizem delovanja.* S-303 (Helinks) je sintetično izdelana molekula iz skupine alkilirajočih spojin (FRrangible Anchor Linker Effector-FRA-LE). Sestavljena je iz treh delov: akridinskega sidra (anchor), ki hitro prehaja skozi celično in nuklearno membrano, in se nekovalentno vgrajuje v nukleinske kisline, alkilirajoče efektorne skupine (efector), ki se kovalentno veže za purinske in pirimidinske baze nukleinskih kislin in onemogoča njihovo nadaljnjo replikacijo, in majhnega fleksibilnega, karbonskega povezovalca (linker), ki vsebuje labilno estrsko vez, ki hidrolizira v nevtralnem pH-ju in na ta način sprošča nereaktivni metabolit S 300. Zaradi nespecifičnih reakcij z drugimi molekulami, predvsem s proteini, se med postopkom dodaja naravni antioksidant glutation (GSH), ki deluje kot »puffer«. Ta za razliko od molekule S-303, ki hitro prehaja skozi membrane celic ali virusnih ovojnic, GSH ostaja v zunajceličnem prostoru, kjer inhibira nespecifične reakcije molekule S-303, hkrati pa ne zmanjšuje potenciala inaktivacije patogenov.<sup>31</sup>

*Opis postopka.* Set za predelavo je sestavljen iz treh vrečk. Prva vrečka vsebuje 140 mL posebne dilucijske raztopine, ki se ji dodajo eritrociti, S-303 in GSH. Vsebina se po-

tem prelije v vrečko za inaktivacijo, kjer približno 30 minut poteka proces inaktivacije, nato pa 6–18 ur razgradnja S-303 v neaktivni metabolit S-300 med inkubacijo pri sobni temperaturi. Supernatnat se po končanem postopku s centrifugiranjem odlje in eritrociti shranijo v ohranitveni raztopini SAGM do 35 dni.<sup>31</sup>

*Toksikološki profil.* Raziskave na živalih niso pokazale sistemske toksičnosti.<sup>31</sup>

*Učinkovitost inaktivacije patogenov.* Postopek učinkovito inaktivira po Gramu pozitivne in negativne bakterije, viruse z maščobno ovojnico ali brez. Rezultati kažejo stopnjo redukcije od 4,8 do 7,4 log. Stopnja inaktivacije parazitov je bila v razponu od 5,3 do 6,8 log.<sup>31</sup>

*Vpliv na sestavine krvnih komponent.* In vitro študije so pokazale, da je koncentracija ATP, 2,3-difosfoglicerida, poraba glukoze, produkcija laktata, koncentracija kalija in hemoliza v koncentratih rdečih krvnih celic po inaktivaciji primerna s kontrolno skupino.<sup>32</sup>

*Klinična učinkovitost in neželene reakcije.* Opravljenih je bilo več kliničnih študij za primerjanje klinične učinkovitosti inaktiviranih eritrocitov. Raziskave prve generacije so pokazale, da je odstotek preživetja eritrocitov kontrolne in tretirane skupine primerljiv in v skladu s strokovnimi priporočili, ki določajo vsaj 75-odstotno preživetje eritrocitov 24 ur po transfuziji pri več kot 70 % tretiranih enot.<sup>33</sup> Preverjali so učinkovitost inaktiviranih eritrocitov pri akutnih krvavitvah in pri korekciji kronične anemije pri bolnikih s hemoglobinopatijami. Raziskavo so predčasno zaključili zaradi pojava protiteles pri dveh bolnikih, ki sta prejela inaktivirane eritrocite. Tvorba protiteles je bila najverjetneje posledica reakcije na akridin, zaradi česar so v drugi generaciji sistema protokol nekoliko spremenili.<sup>32,34</sup> Sistem S-303 je v fazi kliničnih preizkušanj. Izsledki dosedanjih raziskav kažejo, da eritrociti, inaktivirani po opisanem postopku, vzdržujejo viabilnost in biokemijske značilnosti, potrebne za transfuzijsko terapijo.<sup>34</sup>

## Stanje na področju inaktivacije krvnih pripravkov v Sloveniji

Na Zavodu za transfuzijsko medicino v Ljubljani smo leta 2008 pričeli s tehniko inaktivacije patogenov v trombocitnih pripravkih z uporabo amotosalena in UVA žarkov. Ob uvedbi smo pozorno spremljali neželene reakcije pri transfuziji inaktiviranih trombocitov in od leta 2009 do leta 2010 dejavno sodelovali v sistemu hemovigilance INTERCEPT™. Spremljali smo 80 hematoloških bolnikov, ki so skupaj prejeli 466 transfuzij inaktiviranih trombocitnih pripravkov. Samo pri enem bolniku (0,2 %) je prišlo do akutne transfuzijske reakcije v smislu generalizirane urtikarije, ki je po dajanju antihistaminika izzvenela.<sup>35</sup> Od uvedbe nove tehnologije do konca leta 2011 smo skupaj inaktivirali 12912 terapevtskih enot trombocitov, pridobljenih iz polne krvi, in 5748 terapevtskih enot trombocitov, pridobljenih s postopkom afereze. V primerjavi s prejšnjimi leti se pogostnost neželenih reakcij po uvedbi inaktivacije ni zvišala. Klinični odgovor na inaktivirane trombocite smo preverjali po transfuziji 25 terapevtskih odmerkov trombocitov z merjenjem korigiranega zvišanja števila trombocitov (CCI) in pričakovanega preživetja trombocitov (PR) po 24 urah. Srednja vrednost CCI je bila 8960/ $\mu$ L (794/ $\mu$ L–20717/ $\mu$ L), odstotek pričakovanega preživetja trombocitov pa 15,67 % (1,97–61,0 %), kar so zadovoljive vrednosti.<sup>36</sup> Ni bilo podatkov o zmanjšani učinkovitosti trombocitov pri ustavljanju krvavitve ali o znižani učinkovitosti trombocitov na splošno v primerjavi z neinaktiviranimi pripravki.<sup>35</sup>

Poleg večje varnosti ima po naših izkušnjah uvedba tehnike inaktivacije trombocitov tudi druge pozitivne učinke. Zaradi podaljšanega roka uporabnosti inaktiviranih trombocitov od 5 na 7 dni se je znatno zmanjšal odstotek zapadlih trombocitnih pripravkov. Ker je postopek inaktivacije po svoji učinkovitosti enakovreden obsevanju z žarki gama za preprečevanje bolezni presadka proti gostitelju po transfuziji, postopek dodatnega obsevanja ni več potreben, kar skrajša čas izdaje in poveča razpoložljivost trombocitnih pripravkov za urgentna na-



ročila. Uvedba inaktivacije je tudi ustrezno nadomestilo za mikrobiološko testiranje trombocitnih pripravkov pred izdajo, kar dodatno olajša organizacijo dela in nemote- no preskrbo s trombocitnimi pripravki.

## Zaključek

Skupni cilj različnih postopkov inakti- vacije patogenov je zmanjševanje možnosti prenosa povzročiteljev bolezni s transfuzi- jo ob ohranjanju kakovosti celičnih in pla- zemskih sestavin v krvnih komponentah. Vse uveljavljene tehnologije inaktivacije povzročijo tudi večjo ali manjšo izgubo po- sameznih sestavin, vendar je klinična učin- kovitost inaktiviranih komponent še vedno sprejemljiva. Visoka pričakovanja glede varnosti na področju transfuzijske medic- ine, preostalo tveganje za klasične nalezljive bolezni, nove porajajoče se nalezljive bole- zni in izkušnje iz preteklosti nas spodbujajo k iskanju novih pristopov pri zagotavljanju varnih krvnih komponent. Postopki inakti- vacije s svojim proaktivnim konceptom po- membno dopolnjujejo obstoječe ukrepe pri zagotavljanju varne krvi. Obetavni rezultati raziskav na področju inaktivacije polne krvi in eritrocitov bodo postopkom inaktivacije dali novo težo in prepričljivejšo ekonomsko upravičenost.

## Literatura

- Alter H. Pathogen reduction: A precautionary principle paradigm. *Transf Med Rev* 2008; 22: 97–102
- Pelletier JPR, Transue S, Snyder EL. Pathogen inactivation techniques. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006; 19: 205–42
- Hellstern P, Solheim BG: The Use of Solvent/ Detergent treatment in Pathogen Reduction of Plasma; *Transf Med Hemother* 2011; 38: 65–70.
- Heger A, Svae T-E, Neisser-Svae A, Jordan S, behizad M, Römisch J. Biochemical quality of the pharmaceutical licenced plasma OctaplasLG after implementation of a novel prion protein (PrPSc) removal technology and reduction of the solvent/ detergent process time. *Vox Sanguinis* 2009; 97: 219–25.
- Burnouf T, Goubran HA, Radosevich M, Sayed MA, Gorgy G, El-Ekiaby M: A process for solvent/ detergent treatment of plasma for transfusion at blood centers that use a disposal blood bag system. *Transfusion* 2006; 46: 2100–08.
- Horovitz B, Bonomo R, Prince AM, Chin SN, Brotman B, Shulman RW. Solvent/detergent treated plasma: a virus inactivated substitute for fresh frozen plasma. *Blood* 1992 ; 79: 826–31
- Solheim BG, Rollag H, Svennevig JL, Arafa O, Fosse E, Bergerud U. Viral safety of solvent/detergent-treated plasma. *Transfusion* 2000; 40: 84–90.
- Prowse C: Properties of pathogen inactivated plasma components. *Transf Med Rev* 2009; 23: 124–33.
- Rock G: A comparison of methods of pathogen inactivation of FFP. *Vox Sanguinis* 2011; 100: 169–78.
- Yarranton H, Lawrie AS, Purdy G, Mackie IJ, Machin SJ. Comparison of von Willebrandt factor antigen, von Willebrandt factor cleaving protease and protein S in blood components used for treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transf med* 2004; 14: 39–44.
- DeJonge J, Groenland T, Metselaar H, Ijzermans J, vanVliet H, Visser L et al. Fibrinolysis During Liver Transplantation is Enhanced by using Solvent/ Detergent Virus-Inactivated Plasma (ESDEP®). *Anesth Analg* 2002; 94: 1127–31.
- Segatchian J, Struff WG, Reichenberg S. Main properties of the THERAFLEX MB-Plasma system for pathogen reduction. *Transf Med Hemother* 2011; 38: 55–64
- Williamson LM, Cardigan R, Prowse CV. Methylene blue-treated fresh-frozen plasma: What is its contribution to blood safety? *Transfusion* 2003; 43: 1322–9.
- AuBuchon JP: Current status of pathogen inactivation methods. *ISBT Science Series* 2010; 5: 125–33.
- Solheim BG, Hellstern P: Pathogen inactivation of plasma and cryoprecipitate. In: AuBuchon JP, Prowse C, eds: *Pathogen inactivation: The Penultimate Paradigm Shift*. Bethesda AABB Press; 2010. p. 69–98.
- Nubert K, Delhoume M, Orsel I, Laudy JS, Sellami M, Nathan N: Anaphylactic shock to fresh frozen plasma inactivated with methylene blue. *Transfu- sion* 2011; 51: 125–8.

17. Irsch J, Lin L. Pathogen Inactivation of Platelet and Plasma Blood components for transfusion Using the Intercept Blood System. *Transf Med Hemother* 2011; 38: 19–31.
18. Lewis R, Cavnar JA. Toxicology Assessment of Pathogen-Inactivation Technologies: Amotosalen and Riboflavin Case Studies: in AuBuchon JP, Prowse C (eds): pathogen inactivation: The Penultimate Paradigm Shift. Bethesda AABB Press; 2010. p 33–48.
19. Ciaravino V, McCullough G, Cimino G, Sullivan T. Preclinical safety profile of plasma prepared using the INTERCEPT Blood System. *Vox Sanguinis* 2003; 85: 171–82.
20. Bryant BJ, Klein HG.: Pathogen inactivation, The Definitive Safeguard for the Blood Supply. *Arch Pathol Lab Med.* 2007; 131: 719–33.
21. European committee on Blood transfusion. Guide to the preparation, use and quality management of blood components. 16th ed.; 2010: 312–20.
22. van Rhenen D, Gulliksson H, Cazenave JP, Pamphilon D, Ljungman P, Kluter H, et al. Transfusion of pooled byffy coat platelet components prepared with photochemical pathogen inactivation treatment: the EuroSPRITE trial. *Blood* 2003; 101: 2426–33
23. McCullough J, Vesole DH, Benjamin RJ, Slichter SJ, Pineda A, Coutre S. Therapeutic efficacy and safety of platelets treated with a photochemical process for pathogen inactivation: The SPRINT trial. *Blood* 2004; 104: 1534–41.
24. Cazenave JP, Waller C, Kientz D, Mendel I, Lin L, Jaquet M, et al. An active hemovigilance program characterising the safety profile of 7,483 transfusions with plasma components prepared with amotosalen and UVA photochemical treatment. *Transfusion* 2010; 50: 1210–09
25. Marchner S, Goodrich R. Pathogen Reduction Technology Treatment of Platelets, Plasma and whole Blood using Riboflavin and UV light. *Transf Med Hemother* 2011; 38: 8–18.
26. Perez-Pujol S, Tonda R, Lozano M, Fuste B, Lopez-Vilchez I. Effects of a new pathogen-reduction technology (Mirasol PRT) on functional aspects of platelet concentrates. *Transfusion* 2005; 45: 911–9.
27. Casaneve JP, Folley G, Bardiaux L, Boiron JM, Lafeuillade B, Debost M, et al.:for members of the Mirasol Clinical Evaluation Study group: A randomised controlled clinical trial evaluating the performance and safety of platelets treated with MIRASOL pathogen reduction technology: *Transfusion* 2010; 50: 2362–75.
28. British Committee for Standards in Haematology, Blood Transfusion Task Force: Guidelines for the use of platelet transfusions. *Br J Haematol* 2003; 122: 10–23
29. Seltstam A, Muller TH. UVC Irradiation for pathogen Reduction of Platelet Concentrates in Plasma. *Transfus Med Hemother* 2011; 38: 43–54.
30. Mohr H, Graveman U, Bayer A, Muller TH. Sterilisation of platelet concentrates at production scale by irradiation with short-wave ultraviolet light. *Transfusion* 2009; 49: 1956–63.
31. Henschler R, Seifried E, Mufti N. Development of the S-303 Pathogen Inactivation technology for Red Blood Cell Concentrates. *Transfus Med Hemother* 2011; 38: 33–42.
32. Cancelas JA. Pathogen inactivation of red cell components. In: AuBuchon JP, Prowse C, eds: Pathogen inactivation: The Penultimate Paradigm Shift. Bethesda AABB Press; 2010. p 49–67.
33. Rios JA, Hambleton J, Viele M, Rugg N, Sidermann G, Greenwalt T, et al. Viability of red cells prepared with S 303 pathogen inactivation treatment. *Transfusion* 2006; 46: 1778–86.
34. Cancelas JA, Dumont LJ, Rugg N, Szczeriorkowski ZM, Herchel L, Siegel A. Stored red cell viability is maintained after treatment with a second-generation S 303 pathogen inactivation process. *Transfusion* 2011; 51: 2367–76
35. Domanovic D, Milojkovic A, Cukjati M et al. Hemovigilance of Transfusions with Platelet Treated with INTERCEPT Blood System Using an Active Hemovigilance Program–Data from Slovenia-12th. INTERNATIONAL HAEMOVIGILANCE SEMINAR; 2010 Feb 17–19; Dubrovnik, Croatia.
36. Domanovic D, Milojkovic A, Cukjati M. Two Years of Experience with the Transfusion of Pathogen Inactivated Platelets Using the INTERCEPT Blood system™ and 7 day storage-XXIst Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion; 2011 June 18–22; Lisbona, Portugal.