

# Nowoczesne techniki stosowane w preparatyce

Monika Słomczyńska – Nazimek

Dział Preparatyki

RCKiK Kraków

# **Metody inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi**

**Inaktywacja** – redukcja biologicznych czynników chorobotwórczych (wirusy, bakterie, grzyby, pasożyty) w składnikach krwi.

# **Metody inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi – dopuszczone do stosowania**

- **Metoda rozpuszczalnik/detergent (S/D).**

Polega na inkubacji puli osocza z rozpuszczalnikiem organicznym tri(n-butylo) fosforanem (TNBP) i detergentem (Triton X-100) przez 4 godziny w temperaturze 30°C. Po zakończonym procesie odczynniki usuwane są przez zastosowanie ekstrakcji w oleju roślinnym, filtracji żelowej lub chromatografii jonowymiennej. Następnie osocze jest filtrowane, przelewane do sterylnych pojemników i zamrażane.

# **Metody inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi – dopuszczone do stosowania**

- **Metoda rozpuszczalnik/detergent (S/D) – inaktywacja osocza.**

Metoda ta jest najczęściej stosowaną od 1985 procedurą inaktywacji czynników zakaźnych w produktach krwiopochodnych, głównie podczas produkcji dożylnych immunoglobulin i koncentratów czynników krzepnięcia, w tym także haptoglobiny i antytrombiny.

Metoda jest skuteczna jedynie do wirusów posiadających otoczkę lipidową. Dlatego w czasie frakcjonowania osocza należy wprowadzić drugą metodę inaktywacji, która jest skuteczna w stosunku do wirusów bezotoczkowych.

# **Metody inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi – dopuszczone do stosowania**

- **Metoda fotoinaktywacji przy zastosowaniu błękitu metylenowego – system Macotronic Theraflex.**

Metoda oparta jest o reakcję fotodynamiczną, gdzie czynnikiem fotouczulającym jest błękit metylenowy, wzbudzony światłem widzialnym o długości 620-670 nm. W reakcji tej czynniki chorobotwórcze inaktywowane są za pośrednictwem wolnych rodników tlenowych.

Metoda ta jest stosowana w przypadku pojedynczej jednostki osocza otrzymanego z KPK lub osocza z plazmaferezy, przeznaczonej do celów klinicznych.

# **Metody inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi – dopuszczone do stosowania**

- **Metoda fotoinaktywacji przy zastosowaniu błękitu metylenowego – system Macotronic Theraflex.**

Obecnie metoda jest stosowana do inaktywacji wirusów otoczkowych i bezotoczkowych. Zintegrowany system pojemników z tabletką błękitu metylenowego zawiera filtr do usuwania leukocytów, który służy do eliminacji wirusów wewnątrzleukocytarnych (CMV, HTLV-1, HTLV-2) oraz filtr umożliwiający usuwanie 95% błękitu metylenowego i jego fotoproduktów.

# **Metody inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi – dopuszczone do stosowania**

- **Metoda fotoinaktywacji z zastosowaniem chlorowodoru amotosalenu (S-59) – system Intercept.**

Metoda ta oparta jest na typowej reakcji fotochemicznej.

Czynnikiem fotouczulającym jest chlorowodorek amotosalenu, który pod wpływem promieniowania UVA z kwasami nukleinowymi czynników chorobotwórczych tworzy nieodwracalne wiązania kowalencyjne i uniemożliwia dalsze ich namnażanie.

Metoda ta okazuje się skuteczna wobec: wirusa HIV, CMV, HBV, HCV, BVDV (wołowy wirus biegunki), HTLV-1, HTLV-2 oraz szerokiego spektrum G (+) i G (-) bakterii.

# **Metody inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi – dopuszczone do stosowania**

- **Metoda fotoinaktywacji z zastosowaniem chlorowodoru amotosalenu (S-59) – system Intercept.**

Zestaw pojemników służy do inaktywacji 2-3 zlanych jednostek osocza z KPK. Podczas jednego procesu naświetlania podlegają 2 pojemniki z osoczem.

Składniki po inaktywacji poddawane są filtracji adsorpcyjnej w celu usunięcia amotosalenu i produktów jego przemiany.

Metoda ta dotyczy osocza i KKP.

W metodzie tej inaktywowane są limfocyty T. Zdolność proliferacji limfocytów i synteza cytokin jest zahamowana.

Metoda ta zapobiega TA – GvHD.



# **Metody inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi – dopuszczone do stosowania**

- **Metoda z ryboflawiną – system Mirasol.**

Metoda wykorzystuje ryboflawinę (witamina B2) jako czynnik fotouczulający w połączeniu z ekspozycją na światło ultrafioletowe. Jest to reakcja fotodynamiczna, w wyniku której czynniki chorobotwórcze inaktywowane są za pośrednictwem wolnych rodników tlenowych.

System wykazuje skuteczność przeciwko szerokiej gamie patogenów, w tym: wirusów- otoczkowych (HIV, HCV, WNV, CMV, HBV) i bezotczkowych (parwovirus B19, HAV), bakterii G (+) i G(-), pasożytów.

# Metody inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi – dopuszczone do stosowania

- **Metoda z ryboflawiną – system Mirasol.**

Ryboflawina (witamina B2) to związek występujący fizjologicznie w organizmie ludzkim, nietoksycznym, niemutagenny, dostarczany wraz z pożywieniem. To obojętnie naładowana molekula łatwo przenikająca przez błony lipidowe komórek czynników zakaźnych, wykazująca wysokie powinowactwo do kwasów nukleinowych, jak i struktur powierzchniowych wirusów. Zastosowanie w systemie Mirasol światła UV potęguje właściwości inaktywujące ryboflawiny poprzez wytworzenie wolnych rodników tlenowych oraz utlenianie reszt guanozyny. Pod wpływem światła UV reaguje nieodwracalnie z kwasami nukleinowymi wirusów oraz innych patogenów uniemożliwiając ich dalszą replikację.

# **Metody inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi – dopuszczone do stosowania**

- **Metoda z ryboflawiną – system Mirasol.**

System Mirasol składa się z:

- urządzenia do naświetlania, wagi, czytnika kodów kreskowych, systemu komputerowego,
- zestawu jednorazowego Mirasol, składającego się z pojemnika z ryboflawiną (35 ml), pojemnika do naświetlania i pojemnika do przechowywania.

System Mirasol inaktywuje osocze i KKP.

# **Metody inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi – dopuszczone do stosowania**

- **Metoda z ryboflawiną – system Mirasol.**

Osocze przeznaczone do inaktywacji musi zostać zamrożone w sposób „szokowy” < 8 godz. od pobrania.

Po inaktywacji osocze jest ważne 2 lata jeżeli jest przechowywane w temperaturze < -25 ° C.

Kontrola jakości FFP inaktywowanego:

- aktywność czynnika VIII – średnio (po zamrożeniu i rozmrożeniu) > 70% wartości dla jednostki świeżo pobranego osocza, >70 IU/100 ml,
- fibrynogen - średnio (po zamrożeniu i rozmrożeniu) > 60% wartości dla jednostki świeżo pobranego osocza,
- białko całkowite > 50 g/l.

# **Metody inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi – dopuszczone do stosowania**

- **Metoda z ryboflawiną – system Mirasol.**

Metoda inaktywuje limfocyty T odpowiedzialne za TA – GvHD i prawdopodobnie może być stosowana jako alternatywa napromieniania w celu zabezpieczenia biorców KKP przed rozwinięciem tego groźnego powikłania przetoczeniowego.

# Metody inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi

- Zastosowanie metod inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi zwiększa bezpieczeństwo przetaczanych składników.
- Metody te zmniejszają ryzyko przeniesienia:
  - znanych czynników chorobotwórczych, dla których nie zostały opracowane metody detekcji,
  - nieznanymi czynnikami chorobotwórczymi, które mogą zostać przeniesione na skutek migracji ludności,
  - bakterii (ryzyko związane z przetaczaniem KKP),
  - chorób pierwotniakowych, jak malaria, choroba Chagas'a, które nie są rutynowo badane.

# Metody inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi – dążenia

- Obecnie brak jednej, skutecznej metody w stosunku do szerokiego spektrum czynników chorobotwórczych, umożliwiającej inaktywację we wszystkich składnikach krwi. Dążenia naukowców zmierzają w kierunku, aby metoda inaktywacji była:
  - skuteczna w stosunku do szerokiego spektrum czynników zakaźnych (wirusy, bakterie, pasożyty),
  - nie zmieniała właściwości terapeutycznych składników krwi,
  - fotoprodukty pozostające w śladowych ilościach po zakończonym procesie inaktywacji nie mogą być toksyczne oraz nie wywoływały reakcji alergicznych u biorców,
  - czynnik ekonomiczny – koszty wdrażania metody muszą być proporcjonalne do jej skuteczności.

# **KKP w roztworze do przechowywania płytek krwi**

## Zlewany KKP w roztworze wzbogacającym do przechowywania KKP:

- składnik ten stanowią krwinki płytkowe, wyizolowane w postaci kożuszków leukocyarno-płytkowych z krwi pełnej konserwowanej połączone w jednym pojemniku w mieszaninie osocza i roztworu wzbogacającego,
- zlewany KKP zawiera  $3-5 \times 10^{11}$ ,
- zlewany KKP w roztworze składa się z 5-6 kożuszków leukocyarno-płytkowych zawieszonych w mieszaninie 20% osocza i 80% roztworu wzbogacającego.



# Krew i jej składniki

## SSP + roztwór wzbogacający do przechowywania KKP

- zawiera substancje chemiczne (organiczne i nieorganiczne) umożliwiające wydłużenie czasu przechowywania KKP powyżej 5 dni,
- poprawia bezpieczeństwo stosowania KKP poprzez obniżenie objętości osocza w KKP,
- zmniejsza ryzyko wystąpienia reakcji alergicznych lub niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych (TRALI),
- dostarcza związków odżywczych i tlenu,
- chroni przed spontaniczną aktywacją oraz zmniejszają aktywację, która jest skutkiem pobierania i preparatyki,
- buforuje w celu zabezpieczenia przed zakwaszeniem.

# Krew i jej składniki

## SSP + roztwór wzbogacający do przechowywania KKP

### Skład roztworu:

- cytrynian sodu
- chlorek sodu
- octan sodu
- dwuwodorofosforan sodu
- wodorofosforan sodu
  
- chlorek potasu
  
- chlorek magnezu

### Właściwości roztworu:

- zapobieganie aktywacji płytek krwi
- roztwór izoosmotyczny
- obniżenie poziomu wytwarzania mleczanów, działanie buforujące,
- utrzymanie poziomu pH, stymulacja glikolizy
- utrzymanie poziomu pH, stymulacja glikolizy
- obniżenie agregacji – poprawa funkcji płytek krwi
- obniżenie agregacji – poprawa funkcji płytek krwi