

Pathoogreductie van bloedproducten en de kliniek

D.J. van RHENEN

De veiligheid van bloedproducten is van groot belang voor een adequate patiëntenbehandeling. Met de uitgebreide voorzorgsmaatregelen die thans voor bloedbanken in Nederland van toepassing zijn, is een situatie bereikt waarbij het risico voor morbiditeit en mortaliteit door bloedproducten zeer laag is.

Toch zijn er nog restrisico's die door het huidige beleid niet worden voorkomen. Er blijft een gering risico als de donatie is afgenomen tussen het moment van besmetting en het reactief worden van de testen ('window'-donatie). Daarnaast is de veiligheid beperkt tot die micro-organismen waarop het bloed wordt getest. Nieuwe virussen kunnen hiermee aan de detectie ontsnappen. Voor de detectie van parasieten zijn geen testen beschikbaar in de bloedbankpraktijk. Om deze redenen zijn inactievatietechnieken ontwikkeld die op afzonderlijke donorproducten kunnen worden toegepast. Of deze pathoogreductietechnieken ook in de routinesetting van een bloedbank en in de klinische praktijk van een ziekenhuis kunnen worden toegepast, is onderwerp van nader onderzoek.

Trefwoorden: pathoogreductie, bloedproducten, veiligheid

De veiligheid van bloedtransfusie wordt in belangrijke mate bepaald door de veiligheid van de bloedproducten die worden getransfundeerd. Grofweg kan men de veiligheid onderverdelen in immunologische veiligheid en microbiologische veiligheid. Onder immunologische veiligheid wordt verstaan het voorkomen van immunologische effecten die door een transfusie kunnen worden veroorzaakt zoals antistofvorming, 'graft-versus-host'-ziekte en immunomodulatie. Een reductie van de immunologische effecten van transfusie is de afgelopen jaren gerealiseerd door het verwijderen van contaminerende leukocyten met het bloedproduct door buffycoatverwijdering en leukocytendepletie, waarmee het aantal leukocyten teruggebracht wordt tot minder dan een miljoen cellen.

Erasmus Medisch Centrum, Rotterdam en Sanquin Bloedbank Regio Zuidwest, Rotterdam

Correspondentie: prof. dr. D.J. van Rhenen, Sanquin Bloedbank Regio Zuidwest, Postbus 23370, 3001 KJ Rotterdam. E-mail: dick.van.rhenen@bloodrtd.nl

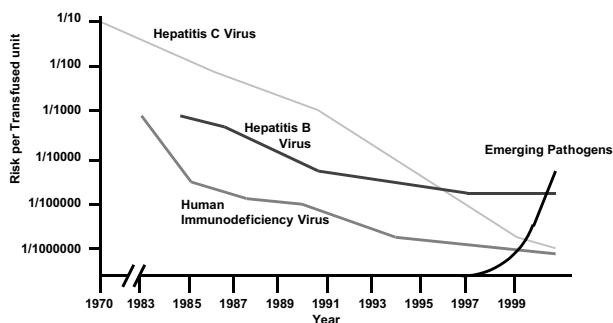
Microbiologische veiligheid wordt nagestreefd door te proberen overdracht van infecties door virussen, bacteriën en protozoa te voorkomen (1-4). Dit effect kan door een combinatie van drie activiteiten worden bereikt. Ten eerste wordt via de donorkeuring geprobeerd te voorkomen dat donoren, die een hoog risico vormen voor ziekteoverdracht, bloedproducten afstaan. Ten tweede worden alle donaties in Nederland getest via een aantal standaardtesten (hepatitis-B-antigeen, anti-Treponema-antistoffen, anti-HIV-1- en -2-antistoffen, anti-hepatitis-C-antistoffen, anti-HTLV-1- en -2-antistoffen en PCR-testen op het voorkomen van hepatitis-C-virus [HCV-NAT] en HIV [HIV-NAT]). Tenslotte wordt de microbiële veiligheid bevorderd door bloedproducten waar mogelijk koel of in bevroren toestand te bewaren.

Bovengenoemde maatregelen hebben tot een belangrijke reductie geleid van via transfusie overgedragen infecties. Het meest aansprekend is dit effect te zien bij virusinfecties (figuur 1).

Resterende risico's van bloedproducten

Het immunologisch risico is door leukocytendepletie sterk afgenomen. Toch is beschreven dat zelfs een gefiltreerd product aanleiding tot 'graft-versus-host'-ziekte (5, 6) kan zijn. Het microbiologisch risico is sterk afgenomen door de bovenbeschreven maatregelen. Risico's blijven bestaan in de volgende situaties:

- daar de veiligheidstesten zich beperken tot een klein aantal ziekten (hepatitis B en C, HIV, HTLV en lues) wordt geen bescherming geboden voor andere mogelijk belangrijke ziekten zoals EBV-infectie, CMV-infectie en nieuwe variant Creutzfeldt-Jacob-ziekte);



Figuur 1. Het geschatte risico van bloedoverdraagbare ziekten in de Verenigde Staten van Amerika (16).

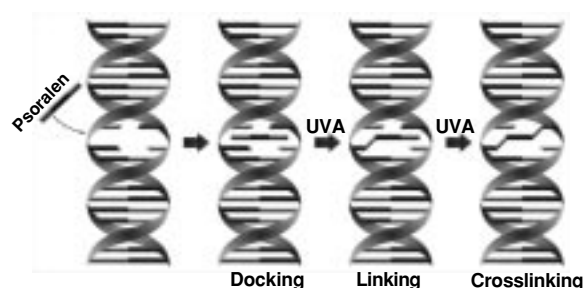
- door de gevoeligheid van de gebruikte techniek zal er een kortere of langere ‘window’-fase bestaan, de periode tussen het moment van besmetting en het reactief worden van de testen; door het gebruik van PCR-testen is deze ‘window’-fase verder bekort, maar infectie in deze fase is nog steeds mogelijk;
- het risico van bacteriële contaminatie kan door een aantal maatregelen worden beperkt maar niet uitgesloten; trombocytenproducten die bij een betrekkelijk hoge temperatuur bewaard moeten worden, zijn hierbij extra kwetsbaar;
- het risico van parasitaire ziekten in het bloed (malaria, ziekte van Chagas e.d.) kunnen met het huidige beleid niet worden voorkomen.

Pathogeenreductietechnieken

De bovenbeschreven methodes berusten op het principe dat het donorbloed getest wordt op eventueel aanwezige micro-organismen. Een concept dat de afgelopen jaren steeds meer is toegepast, is het inactiveren van het bloedproduct zelf. Dit is al langer mogelijk voor gepoold plasma, maar thans zijn ook technieken beschikbaar die individuele donoreenheden kunnen behandelen.

Cellulaire bloedproducten zijn te kwetsbaar voor de technieken die bij plasma wel kunnen worden toegepast. De laatste jaren komen echter technieken beschikbaar die geschikt zijn voor trombocyten- en donorplasmaproducten en die nucleïnezuurspecifiek zijn. Het principe berust erop (zie figuur 2) dat de werkzame stof (S59, een psoraleen) zich reversibel bindt aan het RNA/DNA van de cel. Deze binding wordt irreversibel door het product enkele minuten bloot te stellen aan UV-A-licht. Het resterende S59 wordt via absorptie met een SRD grotendeels verwijderd (zie figuur 3). DNA/RNA-structuren worden op deze manier op betrekkelijk korte afstanden “verlijmd” waardoor deling van de cel is uitgesloten. Alle DNA/RNA-bevattende cellen (bacteriën, virussen, parasieten en leukocyten) (9-12) worden hierdoor geïnactiveerd. Een andere techniek die voor trombocyten geschikt lijkt te zijn maar die nog niet klinisch is toegepast, is het gebruik van riboflavine (vit. B2) geactiveerd door zichtbaar licht/UV-licht.

De moeilijkste categorie producten om te inactiveren zijn erythrocyten. Lichtactivatie is hier niet mogelijk omdat de rode cellen het licht afschermen. Andere technieken worden daarom ontwikkeld om de werkzame stof te activeren. Het zal nog wel enige jaren duren voordat pathogeenreductietechnieken voor erythrocyten in de kliniek gebruikt kunnen worden.



Figuur 2. Principe van fotochemische inactivatie met psoralenen en UV-A.

Tabel 1. Pathogeenreductie van bloedproducten: effectiviteit van een aantal methoden; (-): geen significant effect, +: 3-6 log pathogeen reductie, ++: > 6 log pathogeenreductie

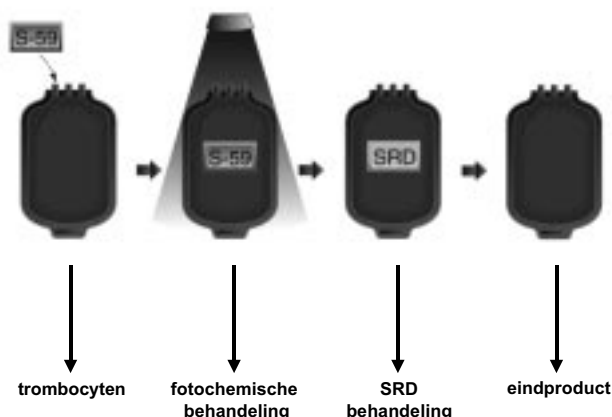
Pathogeen	MB-plasma	S-59-trombocyten
HBV (Duck HBV)	+	++
HCV (BVDV)	++	++
HIV: intracellulair	(-)	++
HIV: extracellulair	++	++
Parvo B19	+	+
HAV	(-)	(-)
Bacteriën: Gram-neg.	(-)	++
Bacteriën: Gram-pos.	(-)	+ / ++
Protozoa	(-)	+
Leukocyten	(-)	++

Effectiviteit van pathogeenreductietechnieken

In tabel 1 wordt een overzicht gegeven van een tweetal technieken, n.l. de methyleenblauwmethode voor plasma (13) en de S59/UV-A-methode voor pathogeenreductie bij bloedplaatjes (7). Voor de beoordeling van de effectiviteit worden voor transfusie relevante micro-organismen getest of bruikbare vervangers. De effectiviteit wordt uitgedrukt in de hoeveelheid logreductie. Al naar het micro-organisme en de techniek kan het effect variëren van geen effect tot meer dan 6 log (reductie met meer dan 1 miljoen).

Klinische studies met trombocyten die een pathogeenreductiebehandeling hebben ondergaan

Er is één techniek die nu in klinische studies (fase-III-studies) is uitgetest. Het betreft de pathogeenreductiemethode met het psoraleen S59 en UV-A-bestraling. De pathogeenreductiecapaciteit is tevoren in in-vitro vrijwilligersstudies uitgetest. De klinische studie is bedoeld om vast te stellen of het pathogeenreductieproces schadelijk is voor het klinisch effect van de toegediende trombocyten. Het betreft een multicenter onderzoek met trombocytenconcentraten vervaardigd uit buffycoats dat in Europa is uitgevoerd (EuroSprite studie) (14). Primair eindpunt van de studie was het count increment (CI) en het corrected count increment (CCI). In Amerika werd een studie uitgevoerd bij meer dan 600 patiënten die behandeld werden met via aferese gewonnen trombocyten (Sprint-studie)



Figuur 3. Fotochemische inactivatiemethode van trombocytenconcentraten.

Tabel 2. Klinische studies bij hemato-oncologische patiënten met trombocyten die een pathoogenereductiebehandeling hebben ondergaan (CI = count increment; CCI = corrected count increment)

	EuroSprite (14)	US Sprint (15)	EU Apheresis Study
aantal patiënten	103	645	43
product	5-donor-buffycoats	single donor aferese	single donor aferese
S59 reduction device	T-bag	T-bag	Wafer
primair eindpunt	1 h CI 1 h CCI	WHO-graad-2-bloedingscore	1 h CI 1 h CCI

Tabel 3. Klinische studies met trombocyten die een pathoogenereductiebehandeling hebben ondergaan: resultaten in vergelijking met een controlegroep (data tussen haakjes). * $p < 0.05$; NS is niet significant

	EuroSprite (14)	US Sprint (15)	EU Apheresis Study
trombocytenbewaarduur (d)	3,5 (3,4)	3,4 (3,6)	3,1 (3,2)
gemiddelde trombocytendosis (x 10 ¹¹) per patiënt	22,3 (21,2)	2,4 (24,1) *	15,8 (19,8)
bloedingsparameter	NS	NS	NS
CCI (1 h)	13,1 (14,8)	11,1 (16,0) *	11,6 (15,1)
CCI (24 h)	7,3 (10,6) *	6,7 (10,1) *	7,3 (10,4)
trombocytentransfusie-interval	3,0 (3,4)	1,9 (2,4) *	2,4 (2,8)
bijwerkingen	NS	NS	NS

(15). Het primair eindpunt van de studie was klinische hemostasekenmerken volgens het WHO-scorestelsel (m.n. huid-slijmvliesbloedingen). Een derde niet gepubliceerde studie van beperkte omvang werd in Europa uitgevoerd bij patiënten die aferesetrombocytenproducten ontvingen (EU Apheresis Study). Tabel 2 geeft een overzicht van belangrijke kenmerken van de verschillende studies. Tabel 3 laat een aantal belangrijke resultaten van de drie studies zien. Opvallende verschillen zijn te zien tussen de EuroSprite- en de Sprint-studie. Het betreft het verschil in de gemiddelde trombocytendosis per patiënt, de corrected count increment (CCI) na 1 uur en 24 uur en het trombocytentransfusie-interval. Deze verschillen zouden kunnen betekenen dat aferesetrombocyten kwetsbaarder zijn voor de pathoogenereductiebehandeling dan buffy-coat-plaatjes. Opvallend is echter dat de bloedingsparameters volgens de WHO-criteria geen verschil laten zien tussen de test- en de controlegroep. Nader onderzoek naar de interactie tussen de pathoogenereductie-techniek en de afereseprocedure lijkt aangewezen.

Conclusie

De ontwikkeling van pathoogenereductie van bloedproducten lijkt in een stroomversnelling te zijn gekomen. Waar pathoogenereductietechnieken in plasma-poolproducten algemeen worden toegepast, komen steeds meer technieken beschikbaar voor het behandelen van donoreenheden plasma maar ook van cellulaire producten zoals trombocyten. Nog wat verder weg is pathoogenereductie van erythrocyten, maar ook hier zijn er veelbelovende ontwikkelingen.

Literatuur

- Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, Korelitz JJ. The risk of transfusion-transmitted viral infections. *N Eng J Med* 1996; 334: 1685-1690.

- King AE, Robbins KE, Brown TM, Dunmire V, Thoe SY, Wong SY, Leo YS et al. Failure of routine HIV-1 tests in a case involving transmission with preseroconversion blood components during the infectious window period. *JAMA* 2000; 284: 238-240.
- Schuttler GC, Caspari C, Jursch CA, WR WRW, Gerlich WH, Schaefer S. Hepatitis C virus transmission by a blood donation negative in nucleic acid amplification tests for viral RNA. *Lancet* 2000; 355: 41-42.
- McDonald CP, Hartley S, Orchard K, Hughes G, Brett MM, Hewitt PE, Barbara JAJ. Fatal Clostridium perfringens sepsis from a pooled platelet transfusion. *Transfusion Med* 1998; 8: 19-22.
- Hayashi H, Nishiuchi T, Tamura H, Takeda K. Transfusion-associated graft-versus-host disease by leukocyte-filtered stored blood. *Anaesthesiology* 1993; 79: 1419-1421.
- Akoshi M, Takanashi M, Masuda M, Yamashita H, Hidano A, Hasegawa K, Kasajima T et al. A case of transfusion-associated graft-versus-host disease not prevented by white cell-reduction filters. *Transfusion* 1992; 32: 169-172.
- Lin L, Cook DN, Wiesehahn GP, Alfonso R, Behrman B, Cimino GD, Corten L et al. Photochemical inactivation of viruses and bacteria in platelet concentrates by use of a novel psoralen and long-wavelength ultraviolet light. *Transfusion* 1997; 37: 423-435.
- Alfonso R, Lin C, Dupuis K, Corten L, Reames A, Londe H, Chen C et al. Inactivation of viruses with preservation of coagulation function in fresh frozen plasma. *Blood* 1996; 88 (Suppl 1): 526a.
- Lin L, Corten L, Murthy KK, Corash L, Alter HJ. Photochemical inactivation of hepatitis B (HBV) and hepatitis C (HCV) virus in human platelet concentrates as assessed by a chimpanzee infectivity model. *Blood* 1998; 92 (Suppl 1): 502a.
- Knutson F, Alfonso R, Dupuis K, Mayaudon V, Lin L, Corash L, Hogman CF. Photochemical inactivation of bacteria and HIV in buffy-coat-derived platelet concentrates under conditions that preserve in vitro platelet function. *Vox Sanguinis* 2000; 78: 209-216.
- Grass JA, Hei DJ, Metchette K, Cimino GD, Wiesehahn GP, Corash L, Lin L. Inactivation of leukocytes in platelet concentrates by psoralen plus UVA. *Blood* 1998; 91: 2180-2188.

12. Grass JA, Wafa T, Reames A, Wages D, Corash L, Ferrara JLM, Lin L. Prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease by photochemical treatment. *Blood* 1999; 93: 3140-3147.
13. Hornsey VA, Drummond O, Young D, Docherty A, Prowse CV. A potentially improved approach to methylene blue virus inactivation of plasma: the Maco Pharma Mco-Tronic system. *Transfusion Med* 2001; 11: 31-36.
14. Rhenen DJ van, Gullikson H, Cazenave JP, Pamphilon D, Ljungman P, Klueter H, Davis K et al. Therapeutic efficacy and safety of pooled buffy coat platelet concentrates prepared with photochemical pathogen inactivation treatment: the *euroSPRITE* trial. *Blood* 2003; 101: 2426-2433.
15. McCullough J, Vesole D, Benjamin RJ, Slichter S, Pineda A, Snyder EL et al. Pathogen inactivated platelets using Helinx™ technology are haemostatically effective in thrombocytopenic patients: the *SPRINT* trial. *Blood* 2001; 98: 450a.
16. Silberstein LE, Toy P. Research opportunities in Transfusion Medicine. *JAMA* 2001; 285: 577-580.

Summary

Rhenen DJ van. Pathogen reduction of blood products in clinical practice. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2003; 28: 260-263.

The safety of the blood supply is important for a state of the art transfusion treatment. Extensive precautionary measures in the blood banks in the Netherlands have resulted in a small remaining risk of morbidity and mortality through blood products. There are, however, some remaining risks. Although the window phase is narrowed by new test techniques, window donations do still occur. The safety is also limited to the micro-organisms that are represented in the predonation tests. Emerging viruses can evade detection. No test on protozoa is available in blood-bank practice. New techniques have been developed to reduce the potential content of micro-organisms by inactivation in a nucleic acid specific manner. In this way all DNA/RNA-containing micro-organisms, but also leukocytes, are inactivated. Further research has to be done to evaluate the application of these techniques in blood-bank routine and in clinical practice.

Keywords: pathogen reduction, bloodproducts, safety

Ned Tijdschr Klin Chem 2003; 28: 263-267

Hemoglobine-oplossingen: komt het er nog van?

A.J. VERHOEVEN*

Al geruime tijd bestaat de interesse om een alternatief te ontwikkelen voor de klassieke rodebloedceltransfusie. Men heeft hierbij de verwachting dat een dergelijk substituuat goedkoper te produceren is, een langere bewaartijd heeft en het relatief ingewikkelde systeem van kruistypering overbodig maakt. Omdat het nog niet mogelijk is om cellulaire bloedproducten een behandeling te laten ondergaan om eventueel aanwezige pathogenen te inactiveren, wordt ook het punt van veiligheid in dit verband genoemd. Hoewel met het huidige systeem van testen in veel landen het punt van veiligheid nauwelijks nog relevant is, heeft onderzoek in Engeland uitgewezen dat met name professionals in de gezondheidszorg, die verantwoordelijk zijn voor transfusies bij patiënten, toch een farmaceutisch geproduceerd substituuat prefereren boven rode bloedcellen van een willekeurige donor (1). Verder mag in sommige werelddelen door een groeiend percentage besmette donoren een tekort aan veilige bloedproducten worden verwacht, hetgeen

een tweede factor is voor een goede marktverwachting van een te ontwikkelen substituuat. Tenslotte zou een hemoglobine-oplossing kunnen worden toegepast bij patiënten, die op religieuze gronden klassieke bloedtransfusies weigeren.

Ondanks alle kennis over de functie en eigenschappen van hemoglobine (Hb), heeft de industriële ontwikkeling van een veilig en werkzaam alternatief voor rodebloedcelconcentraten (RBC) al meer dan 30 jaar in beslag genomen. Diverse ontwikkelingsprojecten hebben het uiteindelijk niet gehaald, soms pas in een zeer laat stadium (tijdens fase-3-klinische trials), waardoor in totaal tenminste 500 miljoen dollar aan investeringen verloren zijn gegaan. De voornaamste reden hiervan is dat men zich bij het ontwikkelen van rodebloedcelsubstituten heeft gericht op het imiteren van hemoglobine zoals aanwezig in een rode bloedcel, en pas recent duidelijk is geworden dat ook de viscositeit van bloed, de dynamiek van de microcirculatie en de biologie van cellen in de vaatwand een belangrijke rol spelen in de respons op het infunderen van een hemoglobine-oplossing. Opgemerkt dient te worden dat ook pogingen zijn gedaan om een RBC-substituuat te ontwikkelen dat niet is gebaseerd op hemoglobine, maar op organische verbindingen (z.g. perfluorocarbonen) die in staat zijn om een reversibele binding met O₂ aan te gaan. Diverse preklinische en fase-1/2-klinische-studies hebben de potentie van deze benadering laten zien (2-5), maar

**De auteur is hoofd van de afdeling Transfusie Technologie van de Divisie Research van de Stichting Sanquin Bloedvoorziening, Amsterdam. De in dit artikel opgenomen meningen zijn uitsluitend opvattingen van de auteur zelf en weerspiegelen niet het beleid of toekomstverwachting van de stichting Sanquin. De auteur is erkentelijk voor de bijdragen van Dr. J.C. Bakker aan dit manuscript.*