

Deplezione pre-storage universale

Corso Avanzato di medicina
trasfusionale"

Genova – CRCC Liguria

12 novembre 2008

Anni '50

1. Scoperta della presenza di anticorpi antileucocitari nel siero di pazienti con agranulocitosi.

DAUSSET, J.; NENNA, A. - Présence d'une leucoagglutinine dans le serum d'un cas d'agranulocytose chronique. C. R. Soc. Biol., 146: 1539-44, 1953.

Anni '50

2. Dimostrazione che la riduzione significativa del numero di globuli bianchi nel sangue dei donatori è in grado di prevenire o ridurre la NHFTR associata alla trasfusione.

DAUSEET, J., FONSECA, A., BRECY, H. -
Elimination de certains chocs
transfusionnels par l'utilisation de sang appauvri en
leukocytes. Vox Sang, **2**, 248, 1957.

Ipotesi di Dausset:

Gli anticorpi antileucocitari sono acquisiti a seguito della sensibilizzazione contro i leucociti del donatore trasfusi e la NHFTR è causata dagli anticorpi antileucocitari del paziente che intervengono distruggendo i leucociti del donatore.

...e di conseguenza...

nei pazienti politrasfusi la somministrazione dei leucociti del donatore con la trasfusione dovrebbe essere evitata.

- La supposizione di Dausset venne confermata da numerosi studi clinici successivi:
 1. Brittingham, TE, Chaplin, H Jr. Febrile transfusion reactions caused by sensitivity to donor leukocytes and platelets. J Am Med Assoc 1957; 165:819
 2. The association of febrile transfusion reactions with leuko-agglutinins. Vox Sang. 1957 Sep;2(4):233-41.

Rischi trasfusionali prevenuti dalla leucoriduzione

| Rischio | Prevenuto dalla leucodeplezione |
|--|---------------------------------|
| NHFTR (< 5 x 10 ⁶) | ☺☺☺ |
| Immunizzazione HLA (< 5 x 10 ⁶) | ☺☺☺ |
| Trasmissione virus intracell. (< 5 x 10 ⁶) (es. CMV) | ☺☺ (= anti-CMV neg) |
| Trasmissione di batteri intracellulari | ? |
| Trasmissione di prioni | ? |
| Riattivazione di virus latenti | ? |
| Crisi ipotensive da citochine | ☺ |
| Lesioni eritrocitarie da conservazione | ☺ |
| TRALI | ? |
| Immunomodulazione | |
| -recidive neoplastiche | ? |
| -Infezioni post-operatorie | (☺) |
| GVHR* | (☺) |

❖ Il minimo numero di leucociti in grado di causare una GVHR non è definito: l'irradiazione è indispensabile per inattivare i linfociti superstiti.

Alla ricerca di un metodo

1. Centrifugazione differenziale
2. Lavaggio con salina
3. Sedimentazione con destrano



Risultati?

Questi metodi erano:

1. poco efficienti nell'eliminazione dei leucociti;
2. scarsamente affidabili;
3. richiedevano tempi lunghi;
4. per di più era difficile mantenere la sterilità durante la procedura, anche perché il sangue era ancora raccolto in flaconi di vetro.



Guerra del Vietnam

- Durante la guerra del Vietnam, la Marina Militare degli U.S.A. è alla ricerca di metodi per la conservazione ed il trasporto del sangue per lunghi periodi e sulla lunga distanza.



- Nel corso degli studi sulla preparazione, conservazione e trasfusione dei globuli rossi congelati si evidenziò che il congelamento distruggeva leucociti e piastrine ed i loro resti venivano allontanati dal lavaggio durante la deglicerizzazione.



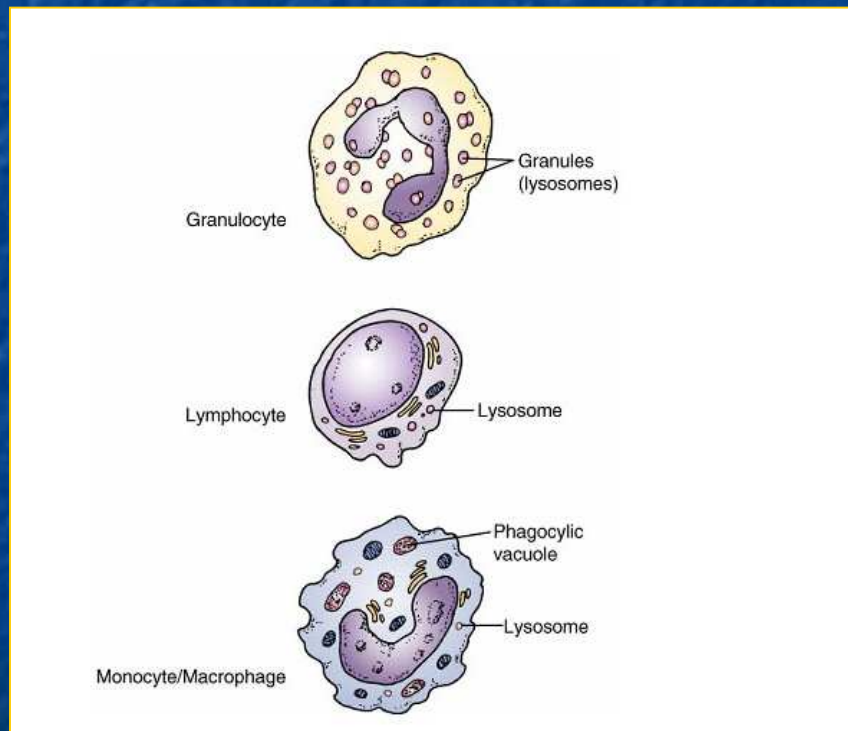
- Per questa ragione i globuli rossi scongelati potevano essere visti come un emocomponente leucodepleto.
- Sfortunatamente il complesso metodo di preparazione e gli alti costi ne resero poco proponibile l'impiego nei pazienti sensibilizzati agli antigeni leucocitari trasfusi.



58 anni fa...

- 1950: si dimostra (Fichtelius) che i leucociti possono essere trattenuti dalle fibre di lana di cotone.
- 1959: lo stesso può essere ottenuto con biglie o lana di vetro (Johnson e Garvin).
- 1962: si applica il principio alla preparazione del sangue leucodepleto (Greenwalt) con riduzione di 4-7 volte dei leucociti iniziali, usando fibre di nylon e sangue eparinato. Le piastrine si riducono del 45% ed i leucociti rimasti sono al 95% linfociti.

Ruoli differenti



Granulociti:

1. NHFTR
2. Reazioni ipotensive (citochine)

Cellule mononucleate:

1. NHFTR
2. Trasmissione CMV
3. Immunomodulazione
4. GVHD

Proprietà differenti

- Diversa capacità di adesione:
 1. Granulociti +++
 2. Cellule mononucleate +
- I filtri attualmente in uso trattengono i granulociti in maniera più efficiente e i pochi leucociti residui sono costituiti principalmente da cellule mononucleate.

Materiali impiegati:

1. Lana di cotone;
 2. Nylon;
 3. Poliestere;
 4. Acetato di cellulosa;
 5. Altri: (metacrilato, poliuretano microporoso, polibutilene teraftalato)
- ... ma il principio di base è sempre quello dell'adesione delle cellule al materiale del filtro.

Meccanismi di rimozione dei leucociti durante la filtrazione

- Adesione delle piastrine al materiale filtrante
- Interazione tra piastrine e leucociti
- Diretta adesione dei leucociti alle fibre
- Intrappolamento meccanico e passivo delle cellule

La filtrazione dell'emocomponente

Avviene attraverso diversi strati di una rete di microfibre sintetiche che forma un tessuto non tessuto (fibre non intrecciate) con pori di diverso diametro.

Efficacia dei filtri

- MASSA (area sezione in m^2)
- SPESSORE FILTRO in cm
- VOLUME SANGUE TRATTENUTO NEL FILTRO in ml
- COMPOSIZIONE MEMBRANE FILTRANTI
 - ↻ natura delle fibre
 - ↻ eventuali modificazioni chimico-fisiche ad esse apportate
 - ↻ diametro delle fibre in ηm
 - ↻ densità in gm/cm^3
 - ↻ area totale della superficie delle fibre in m^2
 - ↻ diametro medio dei pori in ηm
- FLUSSO in ml/min

Adesione

- CAPACITA' DEI LEUCOCITI DI ADERIRE ALLE FIBRE SINTETICHE
- 3 DISTINTE FAMIGLIE DI PROTEINE ADESIVE PRESENTI SULLA SUPERFICIE DELLA MEMBRANA CELLULARE DEI LEUCOCITI

- ✦ *INTEGRINE*

- ✦ *SELETTINE*

- ✦ *SOSTANZE IMMUNOGLOBULIN-LIKE*

NORMALMENTE QUESTE PROTEINE CONFERISCONO AI LEUCOCITI LA CAPACITA' DI ADERIRE IN CONDIZIONI FISIOLOGICHE (RISPOSTA IMMUNE) E PATOLOGICHE (INFIAMMAZIONE) ALLE CELLULE ENDOTELIALI E ALLE PLT (che possiedono i recettori)

Meccanismo di setaccio

- Entra in gioco in tutti i filtri di 3° generazione
- È di ordine fisico-chimico
- È legato alle dimensioni delle cellule ematiche rispetto al diametro medio dei pori
- Riguarda prevalentemente i linfociti

Configurazione dei filtri

Forma

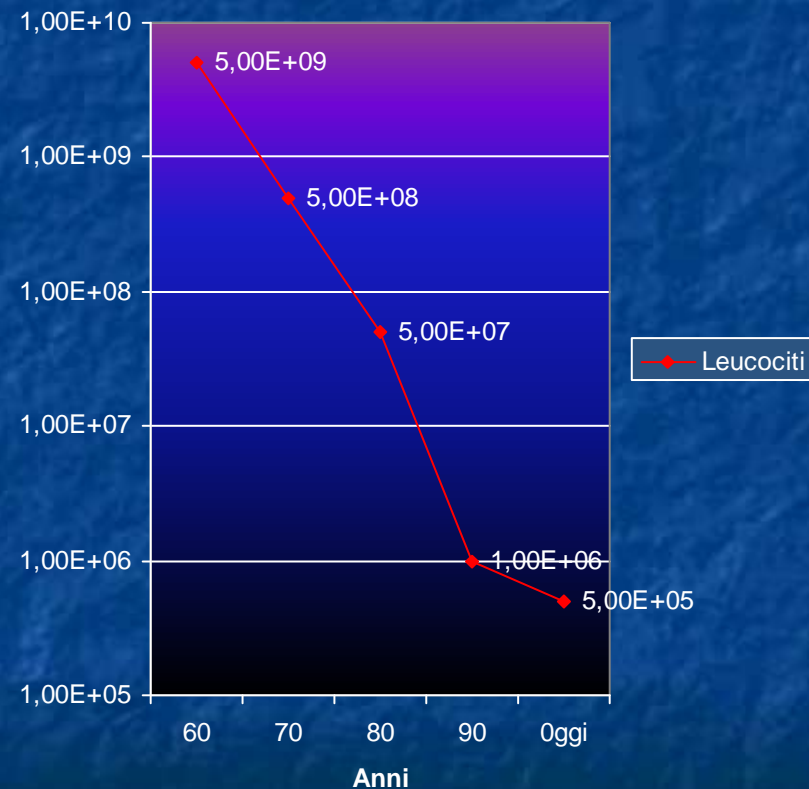
- A COLONNA
- DI FORMA PIATTA (FLAT BED)

Composizione

- RIMOZIONE LEUCOCITI NEI CONCENTRATI ERITROCITARI
 - Pori a diametro decrescente dagli strati superiori a quelli inferiori per trattenere microaggregati, gel di leucociti degenerati, lipidi insolubili a 4°C.
- RIMOZIONE LEUCOCITI NEI CONCENTRATI PIASTRINICI
 - Tutti i pori hanno un minor diametro medio.

Efficienza:

- Incrementata negli ultimi 40 anni.
- Contenuto di leucociti in una unità di sangue intero: $1-5 \times 10^9$.
- Anni '60: 5×10^8
- Anni '70: $2-5 \times 10^7$
- Anni '80: 5×10^6
- Anni '90: 1×10^6
- Oggi : $1-5 \times 10^5$



Concentrato eritrocitario privo di leucociti

- D.M. 3 marzo 2005
Ad un controllo di qualità a campione, il contenuto di leucociti deve essere inferiore a 1×10^6 per unità.
- Raccomandazione n. R (95) 15 10^a ed.
La conta leucocitaria deve essere inferiore a 1×10^6 per unità. Si possono raggiungere anche conteggi medi pari a $0,05 \times 10^6$.

Concentrato piastrinico

Leucodepleto

- Da singola unità
< $0,2 \times 10^6$ /unità
Raccomandazione
n. R (95) 15 10^a ed.

Leucodepleto

- Da aferesi
< 1×10^6 /unità
Raccomandazione
n. R (95) 15 10^a ed.

D.M. 3 marzo 2005

- Da plasma ricco di piastrine
< $0,2 \times 10^9$ /unità
- Da buffy-coat
< $0,05 \times 10^9$ /unità
...sempreché non siano state adottate misure volte a diminuire il contenuto...

Non solo efficienza ma anche sicurezza



intesa come **BIOCOMPATIBILITA'**

- **BIOCOMPATIBILITA'**: proprietà del materiale filtrante di alterare il meno possibile le componenti cellulari e plasmatiche dell'emocomponente.

In passato

- essendo un trattamento indaginoso la leucodeplezione era fatta:
 1. a richiesta;
 2. esclusivamente per determinati pazienti;
 3. principalmente per prevenire la NHFTR;
 4. con l'obbligo di procedere alla trasfusione subito dopo la preparazione per ragioni di sterilità.

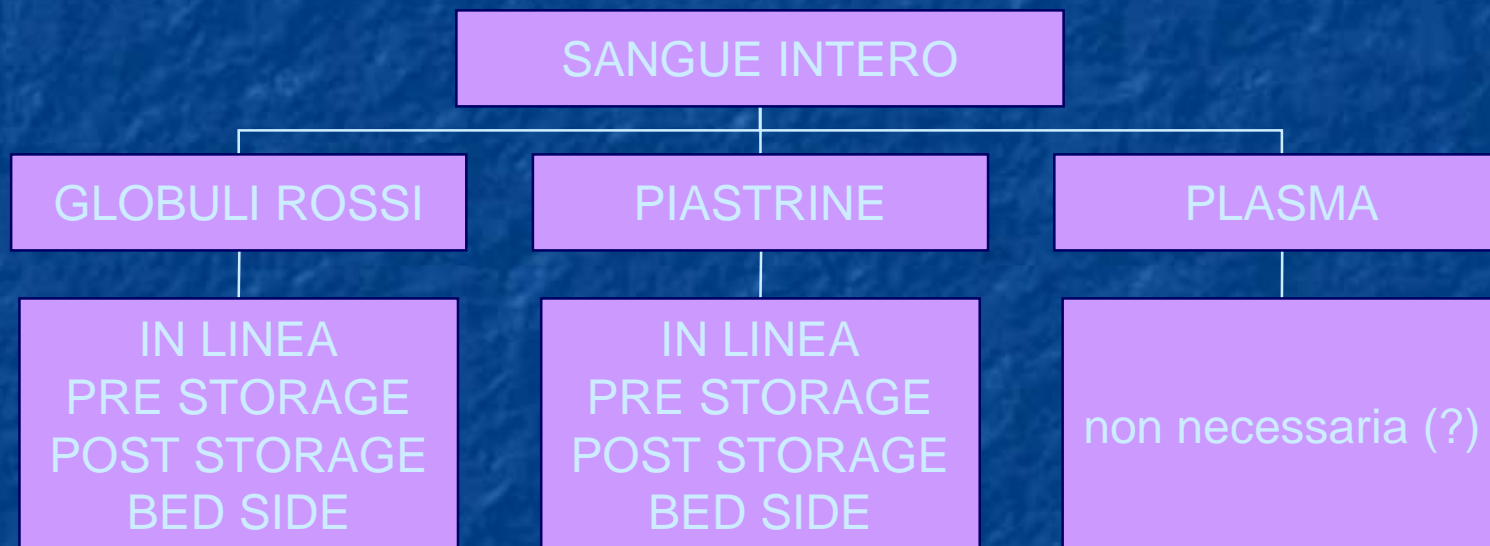
Oggi

- si tende a considerare i leucociti presenti nelle unità di sangue
 1. di poca o nessuna utilità;
 2. inutile aggravio per i pazienti;
 3. da eliminare dal sangue.

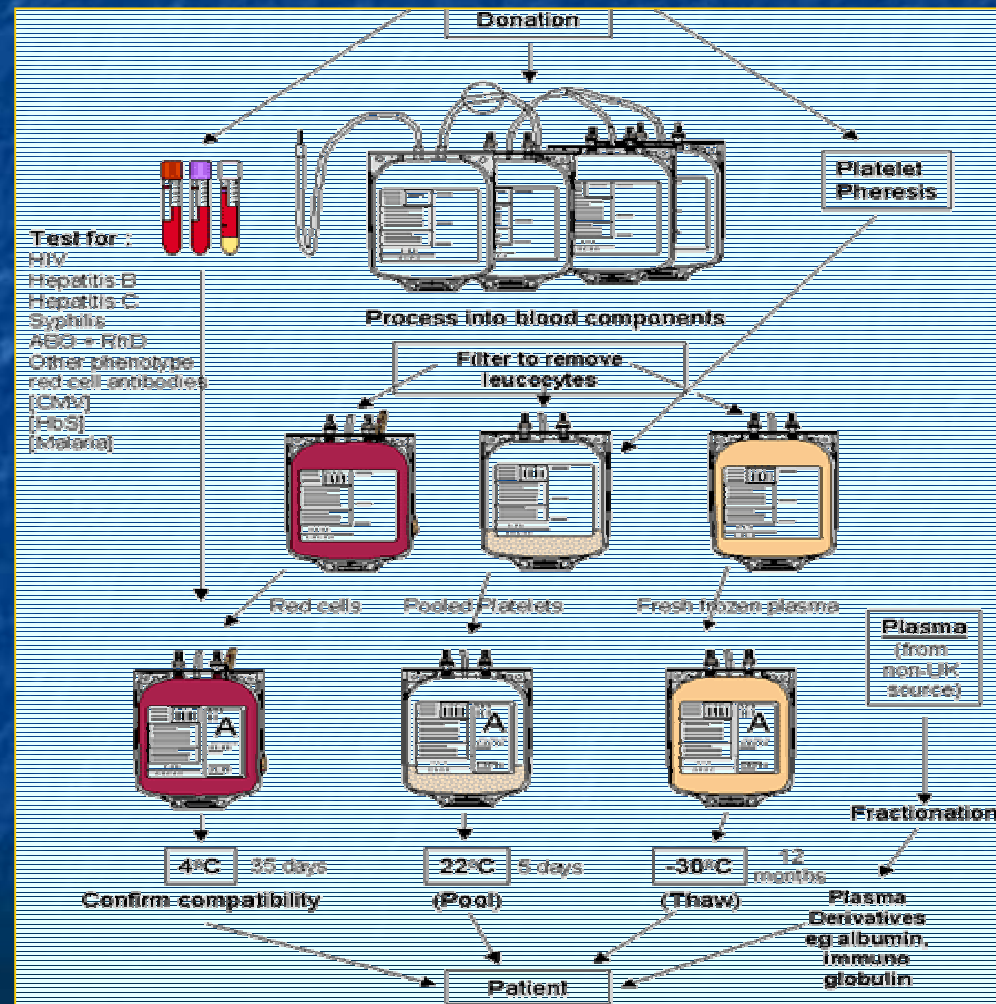
...e quindi la domanda diventa...

Filtrare tutto?

Filtrazione globale



E il plasma?





Filtrare quando?

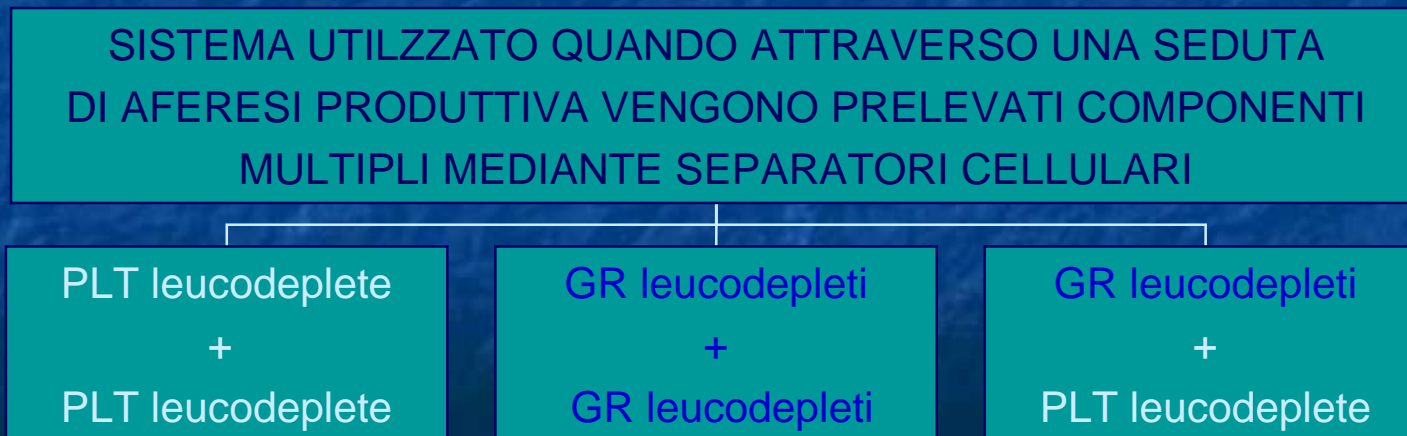
Modalità di filtrazione

- IN LINEA
- PRE STORAGE
- POST STORAGE
- BED-SIDE

Filtrazione in linea

MEDIANTE

- UTILIZZO DI SACCHE CON FILTRO DI DEPLEZIONE NEL SISTEMA DI PRELIEVO (DOPO 2-3 ORE?)
 - SEPARATORE CELLULARE

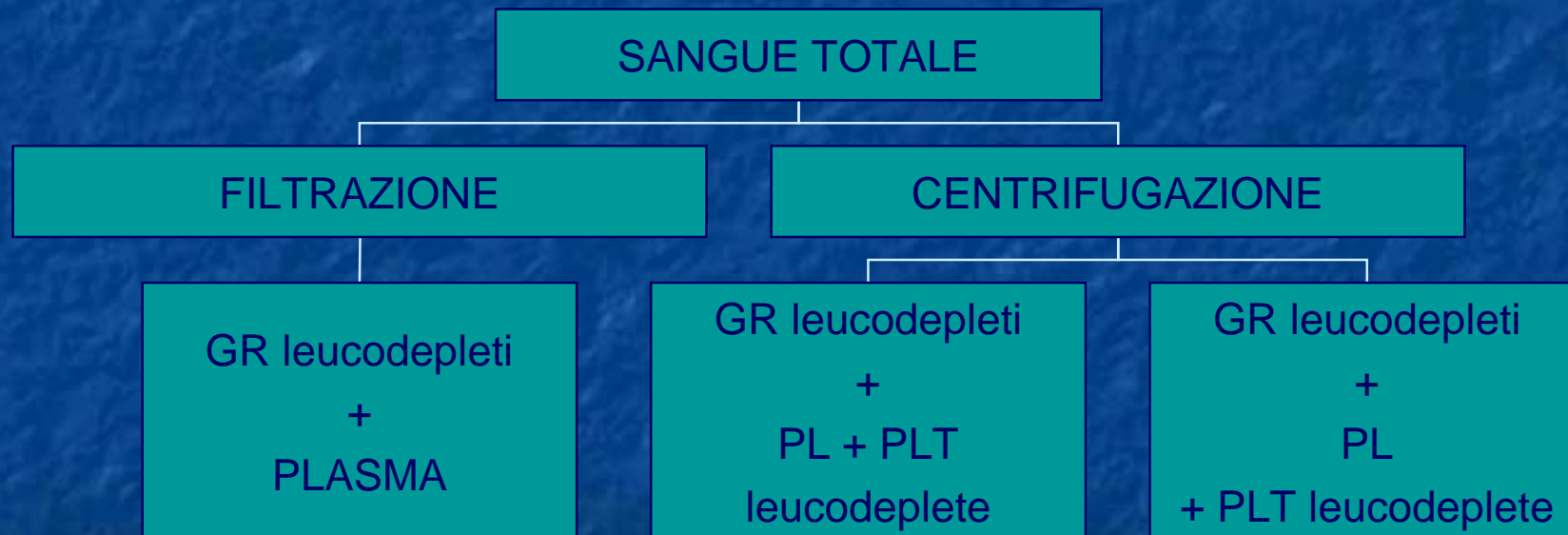


Pre-storage

ESEGUITA SU UNITA' DI PRELIEVO CON FILTRO INCORPORATO

- SISTEMA MANTENUTO CHIUSO
- CONTROLLO COSTANTE DELLA TEMPERATURA
- RIDUZIONE O ELIMINAZIONE DELLE CITOCHINE
- IMMEDIATA DISPONIBILITA' DI PRODOTTI FILTRATI
- DIMINUZIONE DEL LAVORO IN LABORATORIO
 - Perdendo il vantaggio del sistema chiuso con risultati simili può essere effettuata con filtri non incorporati)

Tipi di filtri in linea



Filtrazione post-storage (di laboratorio)

ESEGUITA SU EMOCOMPONENTI DOPO CONSERVAZIONE

- SISTEMA APERTO
- INFUSIONE NEL MINOR TEMPO POSSIBILE
- DIFFICOLTOSA LA MANOVRA DI DEPLEZIONE PER LA FORMAZIONE DI MICROAGGREGATI LEUCOCITARI DURANTE LA CONSERVAZIONE

(L'utilizzo del connettore sterile ha in parte modificato la procedura).

Filtrazione "bedside"

- **Al letto del paziente**

1. più variabilità rispetto alla filtrazione nei Servizi Trasfusionali
2. impossibilità di assicurare i controlli di qualità
3. i leucociti, in particolare i granulociti, decomponendosi nell'arco di pochi giorni durante la conservazione, rilasciano citochine e frammenti cellulari che non sono trattenuti dai filtri e possono essere causa di reazioni avverse e non va dimenticato che i prodotti del decadimento dei leucociti hanno un effetto negativo sui globuli rossi conservati.

- La sopravvivenza degli eritrociti è migliore nei concentrati eritrocitari leucodepleti di quanto non lo sia nelle unità non filtrate.

Migliora la funzionalità degli elementi cellulari conservati

- Migliore conservazione di ATP intraeritrocitario
- Diminuzione produzione lattato e consumo glucosio
- Minore rilascio LDH e potassio
- Ridotta emolisi a 42gg di conservazione
- Diminuzione concentrazione plasmatica C5a C3a.

Le procedure nella nostra ST

RACCOLTA



FILTRAZIONE



CENTRIFUGAZIONE



SEPARAZIONE



CONSERVAZIONE



**IMMAGAZZINAMENTO E
GESTIONE**

RACCOLTA



CENTRIFUGAZIONE



SEPARAZIONE



FILTRAZIONE



CONSERVAZIONE



**IMMAGAZZINAMENTO E
GESTIONE**

Come la pensiamo

- A. La leucodeplezione dovrebbe essere eseguita presso le strutture trasfusionali
- B. Le procedure dovrebbero soddisfare le GMP e seguire linee guida interne
- C. Il sistema usato dovrebbe procedere monitorizzato con opportuni controlli di qualità esterni.
- D. La raccolta piastrinica può essere ottimizzata attraverso i procedimenti di aferesi che garantiscono la leucodeplezione nel corso della raccolta.

Effetti sfavorevoli della leucodeplezione



Effetti sfavorevoli della leucodeplezione

- Nonostante i benefici della leucodeplezione superino di gran lunga i rischi che possono associarsi a tale procedura, la procedura non dovrebbe essere considerata completamente priva di rischi. In passato furono segnalati alcuni casi di "red eye syndrome" in riceventi che erano stati trasfusi con una particolare marca di filtri. Seppure la causa non venne completamente chiarita si suppose che l'acetato di cellulosa impiegato in tali filtri potesse essere stato all'origine del problema, tanto più che cambiando la formulazione dei filtri non si presentarono ulteriori casi. A parte questo dato aneddotico non sono stati documentati altri effetti sfavorevoli direttamente derivati dal processo di leucodeplezione.

Argomentazioni contro (1)

- La NHFTR compare nello 0,5% delle trasfusioni di RBC, ma soltanto una minoranza di questi riceventi manifesterà una reazione avversa di questo tipo dopo una successiva trasfusione.
- Febbre e brivido complicano solo il 2% di tutte le trasfusioni piastriniche, ma si presentano con una frequenza del 30% nei pazienti politrasfusi.
- Queste reazioni sono causate dalla presenza dei leucociti nel caso di pazienti alloimmunizzati, ma sono in genere dovute a diverse sostanze presenti nel plasma sovranatante (es. chemochine).

Argomentazioni contro (2)

- Gli effetti immunomodulatori rimangono oggetto di dibattito. L'aumento della frequenza di recidive neoplastiche e di infezioni post operatorie nei riceventi di sangue non leucodepleto resta controverso, poiché in queste situazioni vi sono molti fattori che si sovrappongono a confondere il quadro.

Argomentazioni contro (3)

- I principali svantaggi della leucodeplezione universale, tra di loro correlati, sono il suo costo ed il sovraccarico di lavoro per le strutture trasfusionali.

Considerazioni

- La prova inconfutabile della sua necessità è ancora da manifestarsi e i dati ad oggi disponibili giustificano la sua introduzione sul principio preventivo della protezione della salute pubblica.



Considerazioni

- Nessun effetto avverso né svantaggi di ordine sanitario sono stati associati ad una politica di leucoriduzione globale degli emocomponenti trasfusi.
- D'altro canto resto un approccio "selettivo" e restrittivo alla leucodeplezione rischia di non proteggere molti riceventi potenzialmente bisognosi.

Considerazioni

- Molti dei progressi in medicina, compreso ciò che incrementa la sicurezza dell'intervento terapeutico, sono accompagnati da un incremento dei costi.
- Ma il loro calcolo dovrebbe essere fatto a debita distanza dall'introduzione di una "leucoriduzione universale", stimolando i fornitori a sviluppare sistemi economici e di facile uso.

Conclusioni

Sebbene il "rischio zero" in ambito trasfusionale è probabilmente inottenibile, ogni passo che aiuta ad avvicinarci a questa meta resta la cosa giusta da fare.

Conclusioni

Indipendentemente dai motivi all'origine della scelta, la leucodeplezione rappresenta un miglioramento della qualità della trasfusione che riduce rischi trasfusionali noti e offre protezione da rischi, al momento, solo ipotizzati.

Sta agli organismi che si occupano di sanità pubblica la decisione di dove investire.



Grazie per l'attenzione!