



REGIONE LIGURIA
Centro Regionale Sangue

3° CORSO AVANZATO DI MEDICINA TRASFUSIONALE


I SISTEMI DI INATTIVAZIONE

Genova, 03 Novembre 2009

2[^] giornata – 1[^] edizione

Dott. Pietro PEGOLLO

Dirigente S.I.M.T. ASL 5 La Spezia
Responsabile Qualità e Accreditamento



Il riemergere di agenti infettivi che si pensavano debellati e la comparsa di nuovi microrganismi verso cui ancora non sono disponibili test di screening, rappresentano la nuova minaccia per la sicurezza della salute dei donatori e per la sicurezza della terapia trasfusionale dei riceventi.

Per ottenere l'inattivazione dei patogeni eventualmente presenti negli emocomponenti sono stati sviluppati diversi sistemi di inattivazione e molti sono tutt'ora allo studio per assicurare il massimo livello di sicurezza trasfusionale....

Selezione dei donatori attraverso
una rigida procedura standardizzata
di valutazione di idoneità
alla donazione di
sangue/emocomponenti


Utilizzo di donatori
volontari
e non remunerati

Impiego di adeguate
materiali e tecniche
per il prelievo

Eliminazione dei
rischi interventi:

Educazione dei donatori
ad uno stile di vita
“virtuoso”


Utilizzo di metodiche
di screening per
specifici agenti infettivi
trasmissibili con il sangue



Tale strategia è però di tipo reattivo, mentre l'inattivazione dei patogeni negli emocomponenti rappresenta un approccio di tipo proattivo per garantire la sicurezza della terapia trasfusionale..

Il vantaggio delle metodiche di inattivazione è rappresentato dalla immediata disponibilità dell'emocomponente, eliminando i tempi necessari all'allestimento e completamento che gli screening microbiologici impongono

Le tecniche di inattivazione sembrano promettere un livello aggiuntivo di protezione, sia verso gli agenti infettivi conosciuti sia verso quelli non ancora conosciuti e che costituiscono una minaccia silente per la sicurezza degli emocomponenti



Nei paesi industrializzati, la performance delle metodiche analitiche sierologiche e genomiche hanno raggiunto un elevatissimo grado di efficienza ed efficacia, riducendo il “periodo finestra” per quanto riguarda le infezioni sostenute da HIV, HCV, HBV, tanto che il rischio residuo di trasmettere tali virus, nei donatori periodici statunitensi, è attualmente calcolato come segue:


1 caso su 2.135.000 donazioni per HIV

1 caso su 1.935.000 donazioni per HCV

1 caso su 144.000 donazioni per HBV


I dati europei sono ancora più bassi.

Per contro, le complicanze infettive di tipo batterico, sempre nei paesi più industrializzati, attualmente rappresentano la complicanza trasfusionale più importante, soprattutto per quanto riguarda i concentrati piastrinici che vengono conservati a temperatura ambiente e che rappresentano quindi un vero e proprio terreno di coltura ottimale per molte specie batteriche.



La prevalenza di colture batteriche positive nei concentrati piastrinici oscilla tra 1 su 2000 unità e 1 su 4000 unità. Il rischio di decesso per trasfusione di concentrati piastrinici contaminati da batteri è stimato tra 1 su 2500 e 1 su 100.000 unità trasfuse.

La conservazione a bassa temperatura (tra 2°C ed 8°C) dei concentrati eritrocitari (GRC) riduce il rischio di crescita di colonie batteriche, anche se alcuni microrganismi, come la *Yersinia enterocolitica* e la *Serratia liquefaciens*, è ben noto che riescono a crescere anche a 4°C. Il rischio di contaminazione dei GRC da parte della Y.E. è stato stimato in 1 caso ogni 40.000 trasfusioni.



I patogeni in grado di contaminare gli emocomponenti sono molto numerosi; i virus patogeni conosciuti includono più di 35 Arboviridae (i Flavoviridae DENV-1, DENV-4 ed il virus dell'Encefalite S. Louis), vari Togaviridae, il virus Chikungunya, il Coronavirus, il Circovirus TT e la sua variante SEN, il Virus dell'Epatite D, varie famiglie di Herpesvirus, l'EBV, i Parvoviridae B19, 16 e 17.

Tra i patogeni (presenza di Leishmania phagocytosomalis, Plasmodium falciparum, Babesia microti, Borrelia burgdorferi, Chlamydia pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae, Toxoplasma gondii, la

mancanza percezione della pericolosità del patogeno?

insufficiente interesse commerciale da parte dell'industria dei diagnostici?

Molti dei patogeni in grado di contaminare gli emocomponenti attualmente non sono sottoposti ad analisi di screening, nell'ambito della procedura di validazione biologica delle unità di emocomponenti, in virtù della loro bassa prevalenza nella popolazione generale o per la mancanza di specifici test diagnostici



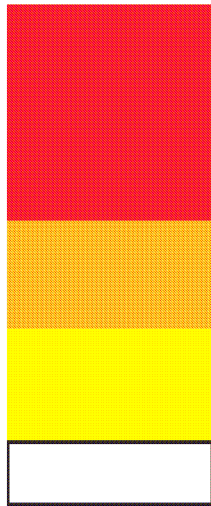
Cosa dice l'WHO circa la pericolosità delle malattie infettive?

From 1997 data, the WHO estimated that infectious diseases were responsible for about 33% of all deaths worldwide primarily in the developing world, and these diseases remain one of the principal challenges to human survival (WHO The World Health Report 1998: Life in the 21st Century. A vision for all. World Health Organization, Geneva, 1998).

I membri del AABB's Transfusion Transmitted Diseases Committee hanno identificato 68 agenti infettivi in grado di rappresentare un rischio (fattuale o potenziale) per la terapia trasfusionale, definendo un grading relativamente alla loro capacità di rappresentare una minaccia per la sicurezza del sangue (Stramer et al. Transfusion August 2009; 49:1S-29S)

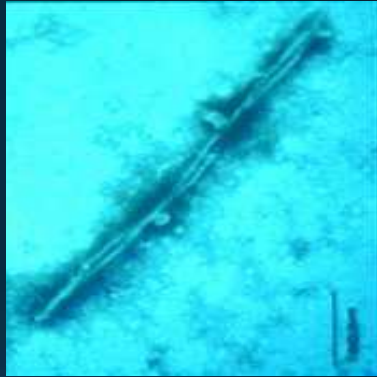


PRIORITY DEFINITIONS



- Red = Agents with low to high scientific/epidemiologic evidence of risk regarding blood safety with the potential for severe clinical outcomes. This prioritization also may be influenced by the committee's estimate of the risk of emergence of these agents in the US and Canada as well as public and/or regulatory concern.
- Orange = Agents with scientific/epidemiologic evidence of risk regarding blood safety that might support their elevation to a higher priority at some time in the future.
- Yellow = Agents with absent to low scientific/epidemiologic evidence of risk regarding blood safety for which there is public and/or regulatory concern.
- White = Agents evaluated but for which no higher prioritization appears warranted at this time.

Categorization of agents on the scientific/epidemiologic scale was based on data that appeared in the scientific literature.



PRION AGENTS

Classical Creutzfeldt–Jakob Disease (CJD)

Human Prion Diseases (Other Than vCJD)

Chronic Wasting Disease (CWD)

Variant Creutzfeldt–Jakob Disease (vCJD)

VIRAL AGENTS (I)

Borna Disease Virus Chikungunya Virus

Colorado Tick Fever Virus Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus

Dengue Viruses

Eastern Equine Encephalitis Virus

Ebola Virus Enteroviruses

Epstein–Barr Virus GB/Hepatitis G Viruses

Hantavirus—New World Hantavirus—Old World

Hepatitis A Virus





VIRAL AGENTS (II)

Hepatitis B Virus Variants Hepatitis E Virus

Herpes Viruses (Other Than CMV, EBV, and HHV-8)

Human Herpesvirus-8 Human Immunodeficiency Virus

Variants Human T-Lymphotropic Virus Variants Human Parvovirus B19

Influenza A and B Viruses (Other Than H5N1)

Influenza A Virus (Highly Pathogenic Avian Influenza—H5N1)

Japanese Encephalitis Virus La Crosse Virus Lassa Virus Lymphocytic

Choriomeningitis Virus Marburg Virus Monkeypox Virus Mumps Virus

Papillomaviruses Polyomaviruses Porcine Endogenous Retrovirus

Porcine Parvovirus Rhabdovirus (Rabies Virus)

St. Louis Encephalitis Virus

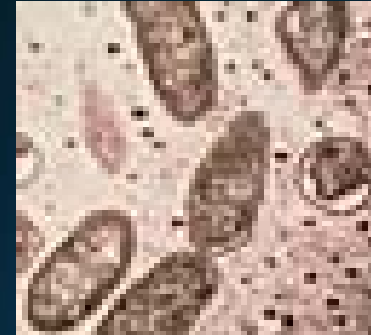
SARS Coronavirus Spumavirus (Simian Foamy Virus) Tick-Borne

Encephalitis Virus Complex Torque Teno Virus (TTV)

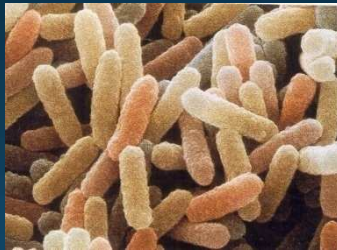
Complex Vaccinia Virus Variola Virus Western Equine Encephalitis Virus

RICKETTSIAL AGENTS

Anaplasma phagocytophilum
Coxiella burnetii Ehrlichia chaffeensis
Orientia tsutsugamushi
Rickettsia prowazekii Rickettsia rickettsii



BACTERIAL AGENTS



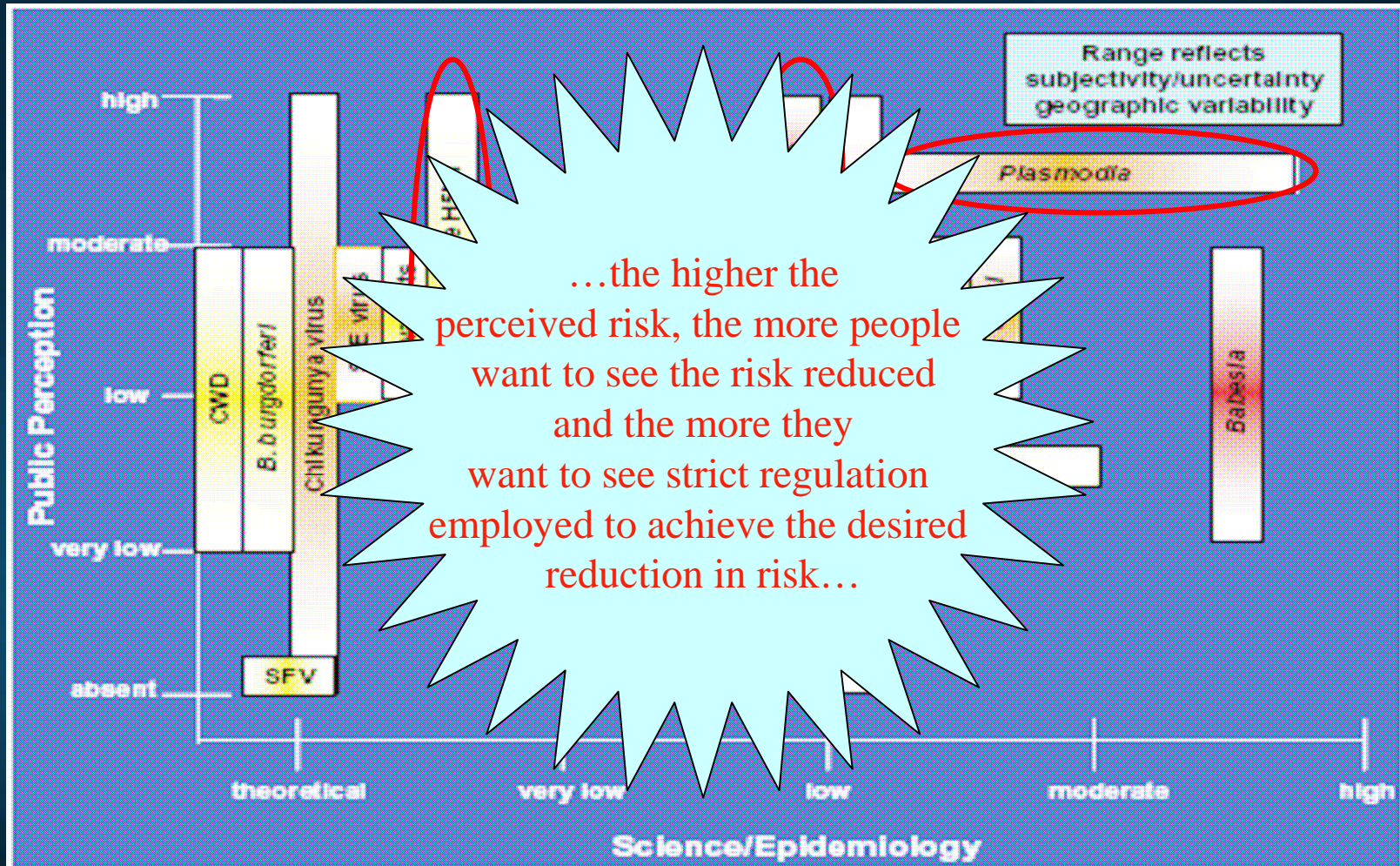
Bacillus anthracis Bartonella henselae
Borrelia burgdorferi Borrelia Species Brucella Species
Chlamydia pneumoniae Francisella tularensis
Listeria monocytogenes Yersinia enterocolitica Yersinia pestis


PROTOZOAN AGENTS AND NEMATODE AGENTS

Babesia Species
Filariae Leishmania Species Plasmodium Species
Toxoplasma gondii Trypanosoma brucei
Trypanosoma cruzi



In contrast, the public perception categorizations were developed by a more subjective process.






L'implementazione della sicurezza trasfusionale deve essere sempre sottoposta ad un criterio di giudizio scientifico, sulla base di evidenze cliniche, epidemiologiche e statistiche

Non possiamo ignorare però che gli interventi che operiamo per garantire la sicurezza della risorsa sangue devono tener conto anche delle aspettative della comunità che serviamo.





Le metodiche di inattivazione (MI) dei patogeni potenzialmente offrono la possibilità di prevenire la trasmissione di agenti infettivi, eliminando la necessità di introdurre nuovi criteri di sospensione dei donatori e nuovi tests diagnostici

Le MI possono agire anche su quei patogeni i cui tempi di incubazione sono molto lunghi e su quelli la cui trasmissione con la trasfusione di emocomponenti è incerta

Le MI potrebbero dare un vantaggio anche nei casi di fallimento dei tests NAT per i bassi valori di acido nucleico presente nei campioni in esame



La strategia reattiva, comunque obbligatoria per legge, è gravata da un intrinseco pericolo di mancare l'identificazione di agenti infettivi inattesi con conseguente aumento della morbilità e della mortalità

I tempi di allestimento di test diagnostici specifici possono comportare anche tempi lunghi di sospensione dei donatori con conseguente difficoltà nell'approvvigionamento della risorsa sangue...il caso WNV

Prima del 1999 non era stati riportati casi di WNV. Nel 2002 il WNV era già presente in 44 stati ed in Canada con oltre 4000 malati e 23 casi di malattia da WNV trasmessa con la trasfusione di emocomponenti. La preesistenza di test diagnostici per il WNV e la loro rapida commercializzazione, ha permesso di prevenire una più aggressiva trasmissione del WNV con la trasfusione degli emocomponenti



POSSIAMO PERMETTERCI DI ASPETTARE IL
PROSSIMO “VIRUS D’IMPORTAZIONE”
CONFIDANDO SOLO NELLA TEMPESTIVITA’
DELLA DIAGNOSTICA?



INACTIVATION...HOW DOES IT WORKS?

L'obiettivo dell'inattivazione dei patogeni è rappresentato dall'ottenimento della riduzione del maggior numero dei possibili patogeni potenzialmente presenti negli emocomponenti, senza comprometterne la componente cellulare o proteica, senza generare tossicità, carcinogenesi o teratogenesi.

Non è possibile garantire la sterilità assoluta degli emocomponenti.



PARLIAMO DI ARGOMENTI NUOVI?

Nel 1946, Edwin Cohn pubblicò quella che era destinata a diventare la più utilizzata metodica per il frazionamento delle proteina plasmatiche. Tale metodica si basava su di una serie di differenti passaggi di precipitazione, di separazione per centrifugazione o filtrazione, in differenti condizioni di pH, temperatura, forza ionica e gradienti di concentrazione di etanolo.

Questi processi fisico – chimici determinavano anche la rimozione dei patogeni, sebbene le più importanti proteine plasmatiche (Fatt. VIII e IX) venivano separate precocemente, nel processo di frazionamento, e quindi la sequenza dei trattamenti fisico – chimici della metodica non riusciva a garantire un'efficace rimozione dei patogeni eventualmente presenti.


Il Fattore VIII ed il Fattore IX vengono frazionati nelle prime due fasi della metodica di Cohn dove non è possibile garantire l'inattivazione di virus quali l'HCV ed l'HIV. Ecco perché il 90% degli emofilici era HCV ed HIV positivo.



I DIFFERENTI METODI PER L'INATTIVAZIONE DEI PATOGENI...UN LUNGO ELENCO

La Pastorizzazione è stata utilizzata sin dal 1948 per inattivare l'albumina, stabilizzata con acidi grassi a catena corta. Tale metodo, però, determinava la denaturazione di altre proteine plasmatiche, quali i fattori della coagulazione. Per evitare la perdita dei fattori della coagulazione, si rese necessario aggiungere degli stabilizzatori che andavano poi rimossi con metodiche di filtrazione o cromatografia.

Il riscaldamento a vapore migliora l'eliminazione dei virus; infatti, utilizzando vapore a 100°C per meno di 1 ora si ottiene l'eliminazione anche dei virus non capsulati. Tale metodica determina una minima perdita di proteine, se applicata per l'inattivazione delle Immunoglobuline e.v. Per le immunoglobuline può essere sfruttato anche l'ulteriore effetto inattivante fornito da un pH acido (a cui, però, solo le immunoglobuline rimangono stabili).




Come per l'inattivazione a calore secco, l'utilizzo di solventi organici e detergenti, quali il trinitrobutilsolfato all'1% ed Triton X-100 (4 ore a 30°C) nel processo di inattivazione del plasma in pool da 12.000 unità, non determina l'inattivazione dei virus non capsulati.

Le sostanze impiegate poi, devono essere rimosse dal pool di plasma; questo si ottiene con un procedimento di estrazione ad olio e con l'assorbimento cromatografico.

Il trattamento con SD determina la perdita di alcune proteine, quali l'Antitrombina e la Proteina S. La possibilità che i pazienti sottoposti a massive trasfusioni con plasma SD possano sviluppare uno stato di ipercoagulabilità, ha portato alla decisione di ritirare il plasma trattato con SD dal mercato americano

Nuove metodiche di trattamento con SD utilizzate su singola unità o mini pool (10 – 12 unità) hanno consentito di recuperare più del 90% dei fattori della coagulazione, della Proteina S e degli inibitori delle proteasi (antitrombina).




Le prime osservazioni sulla potenziale facoltà delle sostanze fotosensibilizzanti di inattivare i virus sono state riportate in letteratura a partire dagli anni '30. Risale a quegli anni la proposta di usare il blu di metilene nella preparazione di vaccini virali.

Nel 1955 venne proposto l'impiego di tali sostanze per inattivare nel plasma umano i virus epatitici, arrivando a classificare i virus secondo la capacità di essere inattivati da vari composti, fra cui le fenotiazine e i coloranti a base di acridina.

Tutte le sostanze attualmente proposte sono coloranti organici che hanno la proprietà di assorbire la luce (cromofori) venendo eccitati a un alto livello di energia e potendo reagire con un substrato o con altre molecole e generando prodotti che, a loro volta, possano ulteriormente reagire con il substrato (fotosensibilizzazione).


Se viene coinvolto l'ossigeno, le reazioni di fotosensibilizzazione vengono definite fotodinamiche.



Il primo utilizzo delle fenotiazine si deve a Paul Ehrlich ed il loro potere virucida è conosciuto sin dagli anni 30. Il meccanismo d'azione del Blu di Metilene MB si basa sull'affinità delle fenotiazine per gli acidi nucleici e le superfici virali, con successiva attivazione del composto una volta sottoposto ad una opportuna irradiazione con luce UV

L'MB è una fenotiazina fotoattiva usata, in Europa, da più di 15 anni per l'inattivazione delle singole unità di plasma.


I virus non capsulati sono i più resistenti a questo trattamento, mentre quelli intracellulari non vengono inattivati dal trattamento con MB.



Questi ultimi virus, però, vengono liberati durante il processo di congelamento/scongelo delle unità di plasma, diventano così suscettibili al MB. Il trattamento con MB non risulta essere efficace contro protozoi e batteri.

Per quanto riguarda le alterazioni a carico delle proteine plasmatiche, si stima che tale tecnica di inattivazione determini una riduzione dell'attività del fattore VIII superiore al 30%.


Il filtro finale rimuove più del 95% dei fotoderivati del MB (che, in vitro, hanno mostrato proprietà mutagene) e gli eventuali leucociti resistenti al processo di congelamento – scongelamento.



Mentre il trattamento con MB danneggia cospicuamente le piastrine, la Tionina, un'altra fenotiazina, può essere usata con sicurezza garantendo l'inattivazione di una gamma di patogeni sovrapponibile.


La funzionalità, l'attivazione e l'aggregazione piastrinica, così come i parametri biochimici delle piastrine, sono scarsamente alterati dal trattamento con la tionina ed UV.

Tale trattamento, però, non è in grado di inattivare i batteri ed i leucociti se non si aggiunge una fase di irradiazione dell'emocomponente con UV-B (1,2 – 2,4 J/cm² per 2 – 4 minuti). Questa fase supplementare di irradiazione rende ancora più efficace l'inattivazione virale.



La nanofiltrazione, conosciuta anche come filtrazione virale, é un valido sistema di rimozione dei virus grazie alla minima porosità dei sistemi filtranti utilizzati (pori da 15 a 40 nm). Questo sistema permette la rimozione della maggior parte dei virus (compresi i non capsulati) con un recupero dell'attività proteica pari al 90 – 95%.

Utilizzando filtri con pori delle dimensioni comprese tra i 35 e 10 nm, è stato possibile anche rimuovere le proteine prioniche, anche se il grado di rimozione dei prioni dipende molto dal loro grado di aggregazione. (solo i macroaggregati sembra che possano essere trattenuti efficacemente da questi filtri).




Gli studi effettuati su tale metodica non hanno ancora permesso di dimostrare eventuali alterazioni proteiche o formazione di neoantigeni, anche se già esistono evidenze favorevoli su alcune frazioni plasmatiche come l'Antitrombina, la Proteina C, il fibrinogeno e la ceruloplasmina che, dopo nanofiltrazione, non hanno presentato apparenti modificazioni.

La nanofiltrazione é una metodica che viene comunque utilizzata su molti plasmaderivati già sottoposti al trattamento con il calore e/o con SD.

L'FDA raccomanda la nanofiltrazione per la produzione degli anticorpi monoclonali.


Gli Psoraleni sono delle furocumarine planari, la maggior parte delle quali vengono sintetizzate dalle piante e ingeriti come alimenti. Sono molecole di piccole dimensioni in grado di intercalarsi tra le basi degli acidi nucleici. I diversi psoraleni differiscono largamente fra loro per solubilità, affinità per gli acidi nucleici e effetti secondari, quali la generazione di differenti specie di ossigeno attivo.



Se sottoposti ad illuminazione con UV-A (320 – 400nm), queste molecole sono in grado di creare dei legami covalenti con le basi degli acidi nucleici che impediscono la trascrizione e la replicazione dell'RNA e del DNA e quindi la replicazione di virus, batteri e protozoi. I virus non capsulati, però, non vengono inattivati, forse perché la proteina esterna impedisce agli psoraleni di arrivare al bersaglio

Lo Psoralene maggiormente impiegato per l'inattivazione delle unità di piastrine e di plasma è l'Amotosalen (Aminometil – trimetil – psoralene o S-59). Il vantaggio di questa molecola è rappresentato dal ridotto tempo di esposizione e dalla bassa dose di UV-A necessari per attivarla.

Questo riduce gli effetti dannosi sulle piastrine prodotti dalla esposizione a UV ad alta energia, senza perdita di effetto virucida. Gli studi di valutazione della tossicità, fototossicità, mutagenicità e carcinogenicità hanno dato ottimi risultati, fornendo all'Amotosalen un valido profilo di sicurezza.




INTERCEPT è sistema di inattivazione più conosciuto impiegante l'Amotosalen ed è stato studiato in 3 trials clinici in Europa (euroSPRITE) che hanno coinvolto 166 pazienti trombocitopenici.

In due di questi trials sono stati impiegati piastrine da pool di B.C., nel terzo piastrine da aferesi.

Questi studi hanno dimostrato che, a parità di dose di concentrato piastrinico trasfuso, le unità trattate con il sistema INTERCEPT e quelle convenzionali hanno prodotto sovrapponibili incrementi post trasfusionali della conta piastrinica, senza significative differenze nelle reazioni avverse.

Il trial americano che ha studiato INTERCEPT (SPRINT), ha coinvolto 645 pazienti trombocitopenici oncologici a cui sono state trasfuse solamente unità di piastrine da aferesi.

Nel trial è stato impiegato un totale di 4917 unità di piastrine: 2678 trattate con INTERCEPT e 2041 convenzionali.



Come indicatore di performance sensibile è stato utilizzato il grading del sanguinamento

Scala del WHO per misurare la gravità del sanguinamento.

Grade 0 no bleeding;


Grade 1 petechial bleeding;

Grade 2 mild blood loss (clinically significant);

Grade 3 gross blood loss, requires transfusion (severe);

Grade 4 debilitating blood loss, retinal or cerebral associated with fatality

Il sanguinamento “di grado 2 del WHO” è stato sovrapponibile tra i due gruppi (58.8% contro 57.7%). Anche l’incidenza del grado 3 o 4 è stata equivalente tra i due gruppi (4.1% contro 6.1%).




I pazienti che hanno ricevuto le piastrine trattate con INTERCEPT hanno presentato un incremento inferiore (incremento corretto of 11.1×10^3 contro 16.0×10^3).

Questi pazienti, quindi, hanno richiesto più trasfusioni di piastrine (8.4 contro 6.2) ed hanno presentato un intervallo tra le trasfusioni più breve (1.9 giorni contro 2.4).

Il diverso incremento della conta piastrinica post trasfusionale può essere spiegato dalla quota media di piastrine presenti per unità trattata con INTERCEPT (3.7×10^{11} contro 4.0×10^{11}).

Le reazioni trasfusionali sono state meno numerose nei pazienti in cui è stato utilizzato l'emocomponente trattato con il sistema INTERCEPT (3.0% contro 4.4%). Questo potrebbe essere dovuto al ridotto volume di plasma presente in tali unità ed all'inattivazione dei leucociti con riduzione della liberazione di citochine nel corso della conservazione.




L'Amotosalen é stato più largamente usato per inattivare il plasma. Gli studi effettuati sulla quantità di fattori della coagulazione presenti nel plasma trattato, dopo le procedure di scongelamento, hanno dimostrato un recupero, rispetto al plasma scongelato di controllo, in un range compreso tra il 73% ed il 98%.

I livelli di Fattore VIII, anche quando ridotti al 73%, sono ancora sufficienti per l'uso terapeutico, mentre non vi sono significative differenze per i livelli e l'attività del Fattore von Willebrand o per l'attività dell'ADAM TS 13.

Il Fibrinogeno mantiene un attività di circa 87%; la Proteina S e la Proteina C, così come l'Antitrombina, mantengono livelli superiori al 95% rispetto a quelli presenti prima del trattamento con lo psoralene, né è stata documentata attivazione dei fattori della coagulazione dopo il trattamento.

Trials randomizzati, in cui veniva utilizzato plasma inattivato per il trattamento di coagulopatie secondarie a malattie epatiche e trapianto di fegato, hanno dimostrato risultati simili a quanto ottenibile utilizzando plasma non inattivato.




L'uso combinato di radiazioni UV e di beta-propiolattone rappresenta un altro sistema di inattivazione virale degli emoderivati nelle industrie che producono plasmaderivati.

Il beta-propiolattone, sostanza che agisce anche come alchilante con gli acidi nucleici virali, è perfettamente tollerato a basso dosaggio.

Esso non può però essere usato da solo perchè, alla concentrazione necessaria per esercitare la sua azione battericida, fungicida e antivirale, denaturerebbe anche le proteine, denaturazione a cui vanno incontro anche con dosi terapeuticamente efficaci di UV.

L'uso combinato dei due agenti dà luogo ad un sinergismo di potenziamento capace di inattivare moltissimi virus, agendo a temperature inferiori a 37°C.

Questa tecnica, giustamente definita "a freddo" permette perciò la sterilizzazione delle proteine labili della coagulazione, degli enzimi e degli inibitori enzimatici, senza perdita dell'attività biologica e senza formazione di neodeterminanti antigenici capaci di sensibilizzare col tempo il ricevente.




Anche la Riboflavina (vitamina B2) è stata usata come un agente di inattivazione del plasma e delle piastrine, grazie alla sua capacità di legarsi agli acidi nucleici intercalandosi tra le basi del DNA e dell'RNA. Anche in questo caso l'attivazione avviene grazie all'azione degli UV o luce visibile.

La tossicità della riboflavina e dei suoi fotoderivati non sembra costituire un problema, dato che la riboflavina ed i suoi prodotti di degradazione sono presenti normalmente in natura.

La rimozione della riboflavina e dei suoi foto derivati può non essere necessaria in un sistema di inattivazione che utilizza tale vitamina.

Il plasma trattato con Riboflavina ed UV ha mostrato livelli accettabili di fattori della coagulazione senza evidenza di un aumento dell'attivazione del complemento.



Quale indicatore per la definizione della Infettività potenziale di un substrato biologico (tra cui anche gli emocomponenti)?

Il parametro chiamato TCID₅₀ indica la quantità di particelle virali in una coltura di cellule in grado di infettare il 50% degli animali inoculati.

La maggior parte dei metodi di inattivazione dei patogeni indicano la riduzione in scala logaritmica del TCID₅₀ che sono in grado di assicurare.

Sebbene una riduzione accettabile del TCID₅₀ per un dato organismo non è stata standardizzata, l'esperienza suggerisce che una riduzione inferiore a 4 log è insufficiente, mentre una riduzione maggiore di 6 log è di norma considerata sufficiente. Sulla base di questo dato viene basato il cut off di efficacia di una metodica di inattivazione.



STATO DELL'ARTE SUI PRINCIPALI SISTEMI DI INATTIVAZIONE

PIASTRINE E PLASMA

- Cerus Corporation INTERCEPT Blood System™
(<http://www.cerus.com>) Concord, CA, USA;
- CaridianBCT Biotechnologies Mirasol® PRT
(<http://www.caridianbct.com/>) Lakewood, CO, USA; and
- MacoPharma's Theraflex© UV. (<http://www.macopharma.com/>)
Tourcoing, France.
- Octapharma (Lachen, Switzerland; <http://www.octapharma.com>)

DATI PUBBLICATI

Transfusion-transmitted viruses in platelets

Virus	INTERCEPT ⁶³	Mirasol ^{64,66}
Enveloped		
<u>HIV-1</u>		
• Cell-free	>6.2	5.9 (includes cell-associated)
• Cell-associated	>6.1	See above
• Proviral	To limit of detection	4.5
<u>HBV</u>	>5.5 CID ₅₀ *	
<u>HCV</u>	>4.5 CID ₅₀	
HTLV-I, cell-associated	4.7	
HTLV-II, cell-associated	5.1	
<u>CMV, cell-associated</u>	>5.9	
<u>WNV</u>	>6.0 ⁶⁷	5.2
Nonenveloped		
B19V	4-5.5 ⁶⁸	
<u>HAV</u>	0†	

* Chimp Infectious Dose where 50% of the animals become infected.

† No reduction was observed (Lily Lin, pers comm., 2009).

DATI PUBBLICATI

Transfusion-transmitted viruses in platelets

Virus	Model for	INTERCEPT ⁶³	Mirasol ^{64,66}
Enveloped			
Vesicular stomatitis	Enveloped viruses	>5.8	>6.3
Influenza A (H5N1)	Influenza viruses	≥5.9 ⁶⁹	
Duck HBV	HBV	>6.2 ID ₅₀ [*]	
Bovine viral diarrhea	HCV	>6.0	
SARS		>6.2 ⁷⁰	
Vaccinia		>5.2	
Nonenveloped			
Bluetongue	Nonenveloped viruses	6.1-6.4	
Calicivirus	Nonenveloped viruses	1.7-2.4	
Simian adenovirus 15	Nonenveloped viruses	0.7-2.3	
Human adenovirus 5	Nonenveloped viruses	>5.7	
Porcine parvovirus	Nonenveloped viruses	0†	≥5.0

* Infectious dose where 50% of the ducks are infected.

† No reduction was observed.

DATI PUBBLICATI

Reduction of bacteria and spirochetes in platelets

	INTERCEPT ⁷¹	Mirasol ⁶⁶	Theraflex UV ⁶⁵
Gram Negative			
<u>Escherichia coli</u>	>6.4	>4.4	≥4.0
<i>Serratia marcescens</i>	>6.7	4.0	≥5.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>5.6		4.8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4.5	>4.5, >4.7*	≥4.9
<i>Salmonella choleraesuis</i>	>6.2		
<u>Yersinia enterocolitica</u>	>5.9		
<i>Enterobacter cloacae</i>	5.9		≥4.3
Gram Positive			
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	>6.6	4.2	4.8
<u>S. aureus</u>	6.6	3.6	≥4.8
<i>S. aureus</i> MRSA Strain		4.8	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	>6.8		
<i>Listeria monocytogenes</i>	>6.3		
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	>6.3		
<i>Bacillus cereus</i> (includes spores)	3.6		
<i>B. cereus</i> (vegetative)	>5.5	1.9†	4.3
<i>B. cereus</i> (isolated from donated blood)		2.7	
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	>6.0		
<i>Propionibacterium acnes</i>	>6.2		4.5
<i>Lactobacillus species</i>	>6.4		
<i>Clostridium perfringens</i> (vegetative form)	>6.5		≥4.7
Spirochetes			
<i>Treponema pallidum</i>	≥6.8 to ≤7.0		
<u>Borrelia burgdorferi</u>	>6.8		

* ATCC 43088 and ATCC 27853, respectively.

† ATCC 7064.



DATI PUBBLICATI

Reduction of protozoa/rickettsia in platelets

	INTERCEPT	Mirasol
<i>Plasmodium falciparum</i>	$\geq 6.0^{72}$	
<i>Trypanosoma cruzi</i>	$> 5.3^{73,74}$	6.0^{75}
<i>Leishmania mexicana</i>	$> 5.0^{76}$	
<i>Leishmania major</i> , strain Jish	$> 4.3^{76}$	$> 5.0^{77}$
<i>Babesia microti</i>	$> 5.3^{72}$	
<i>Orientia tsutsugamushi</i>		$> 5.0^{78}$

DATI PUBBLICATI

Reduction for known or potential transfusion-transmitted viruses in plasma

Virus	INTERCEPT ⁸³	Theraflex MB ^{85,86}	Octaplas ^{81,82}
Enveloped			
HIV-1			
• Cell-free	>6.8	≥5.45	≥7.2
• Cell-associated	>6.4		
HBV	>4.5 CID ₅₀ *		≥6.0 CID ₅₀
HCV	>4.5 CID ₅₀		≥5.0 CID ₅₀
HTLV-I, cell-associated	≥4.5		
HTLV-II, cell-associated	>5.7		
CMV		≥4.08	
WNV	≥6.8	≥5.78	
CHIKV	≥7.6		
Nonenveloped			
B19V	1.8		
HAV	0†		

* Chimp Infectious Dose where 50% of the animals become infected.

† No reduction was observed.

DATI PUBBLICATI

Reduction of bacteria and spirochetes in plasma


	INTERCEPT [®]
Gram Negative	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	≥7.4
<i>Yersinia enterocolitica</i>	>7.3
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> (HGA) agent	>4.2
Gram Positive	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	>7.3
Spirochetes	
<i>Treponema pallidum</i>	>5.9
<i>Borrelia burgdorferi</i>	>10.6



DATI PUBBLICATI

Reduction of protozoa in plasma

	INTERCEPT ⁸³	Theraflex MB
<u><i>Plasmodium falciparum</i></u>	<u>≥ 6.9</u>	
<u><i>Trypanosoma cruzi</i></u>	<u>> 5.0</u>	<u>> 4.9 to $> 5.8$⁸⁷</u>
<i>Babesia microti</i>	> 5.3	




L'efficacia e la sicurezza degli emocomponenti trattati con i vari sistemi di inattivazione oggi disponibili in alcune decine di centri (USA ed Europa) permettono alcune importanti conclusioni:

✓ I sistemi di inattivazione possono essere proposti come una valida alternativa agli esami microbiologici, alla irradiazione ed allo screening per il CMV

✓ Non solo per il plasma ma anche per il consumo di CP o RBC, i nuovi sistemi sono stati introdotti. **Al netto di tutte le metodiche che non vengono impiegate nella lavorazione dell'unità** si indicano una possibile riduzione delle reazioni avverse, compresa la GVHD (modelli animali)

✓ Il costo netto stimato per il trattamento dei Cp è pari a 45 USD per unità

Harvey et al. Transfusion, Volume 49, Giugno 2009 1262 - 1268



...photochemical treatment with the psoralen compound amotosalen HCl and UVA light and the Inactine PEN 110 effectively inactivates T cells as measured by sensitive in vitro assays and in animal models analogous to the types of patient populations at risk for TA-GVHD...

...clinical experience was obtained from European studies in which photochemical treatment with amotosalen and UVA light was used in place of gamma irradiation for prevention of TA-GVHD...

...this may further reduce the incidence of TA-GVHD as use of highly immunosuppressive therapies ...

Novel processes for inactivation of leukocytes to prevent transfusion-associated graft-versus-host disease

Bone Marrow Transplantation (2004) 33, 1–7 L. Corash and L. Lin

Dati messi a disposizione da **GRIFOLS**



Product Service

Form

Change Notification Approval of Significant Change

This form is to be filled in by TÜV Product Service only.

TÜV Project No.: 71333755 Department: MHS 2
 Applicant: Cerus Corporation Client No.: 60562
 Contact Person: Jennifer Yonemura Fax: 001 925 603 1684
 Change Notification ID: 008 Plasma/013 Platelets Date: 2008-01-23
 Affected Certificate(s): G7 07 11 60562 007, G7 07 11 60562 008, G1 07 11 60562 006
 Subject: INTERCEPT System for Plasma or Platelets, Expansion of labelling claim

Classification of the change:
 Significant Change, new or updated certificate does not need to be issued (approval by MHS)
 Significant Change, new or updated certificate needs to be issued (approval by Certification Body CRT2)

Action required:
 Contract Review
 Assessment of documents necessary
 Re-assessment of QM system necessary (audit)
 Re-assessment of product necessary (design dossier review, testing)

Documentation of assessment:
 Additional report is not necessary. This form serves as evidence of assessment performed (please see chapter *Comments*).
 Documentation review report Date: _____
 Audit report Date: _____
 Technical report Date: _____

Verification of implementation:
 Verification of implementation will be checked during next audit Date of audit planned: _____
 Implementation was checked during audit Date of audit: _____

Comments:

The Change Notification has been evaluated in internal Clinical Report No. 71333755 dated 2008-04-09.
Summary: No TA-GVHD was reported in pre-approval clinical trials and extensive post-approval routine use clinical experience, where hematology/oncology patients at risk for TA-GVHD were supported with INTERCEPT platelets without gamma irradiation. Fresh Frozen Plasma is not routinely irradiated prior to transfusion. Thus, treatment of plasma with INTERCEPT will add an additional measure of safety. The in vitro data are very comparable to the INTERCEPT platelet data for T cell inactivation which is used in clinical practice in place of gamma irradiation. Therefore, data provided support the rationale that pathogen inactivation using the INTERCEPT Blood System can be used as an alternative to gamma irradiation to prevent TA-GVHD.
 From a clinical point of view, the risk-to-benefit ratio can be assessed to be positive. The requirements of the Directive are fulfilled.

Recommendation:

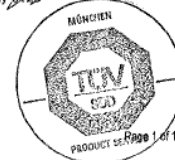
- The change may be approved
- The change cannot be implemented
- Certificate (attachment) may be issued

2008-04-15 Date Name: Dr. Susanne Ruberwolf Auditor or Product Specialist Signature: *[Signature]*

Decision:

Decision by: Certification Body (CRT2) or MHS
 TÜV Product Service cannot confirm that after implementation of the change submitted the quality system or product still meets the applicable requirements of the directive.
 Herewith, TÜV Product Service confirms that after implementation of the change submitted the quality system or product still meets the applicable requirements of the directive.

2008-04-15 Date Name: Jürgen Kunte TÜV Product Service, Notified Body 0123 Signature: *[Signature]*



Dati messi a disposizione da
GRIFOLS

Dott. Pietro PEGOLLO

Versione SIMT/03/2009



Comments:


The Change Notification has been evaluated in internal Clinical Report No. 71333755 dated 2008-04-09.

Summary: No TA-GVHD was reported in pre-approval clinical trials and extensive post-approval routine use clinical experience, where hematology/oncology patients at risk for TA-GVHD were supported with INTERCEPT platelets without gamma irradiation. Fresh Frozen Plasma is not routinely irradiated prior to transfusion. Thus, treatment of plasma with INTERCEPT will add an additional measure of safety. The in vitro data are very comparable to the INTERCEPT platelet data for T cell inactivation which is used in clinical practice in place of gamma irradiation. Therefore, data provided support the rationale that pathogen inactivation using the INTERCEPT Blood System can be used as an alternative to gamma irradiation to prevent TA-GVHD.

Dati messi a disposizione da GRIFOLS

...MA PER I GLOBULI ROSSI?...






L'inattivazione dei GRC rappresenta, tutt'ora, un problema assai impegnativo, dato che molti dei sistemi di inattivazione impiegabili alterano facilmente o distruggono la membrana dei globuli rossi, con riduzione della sopravvivenza delle cellule, emolisi o immunogenicità.

L'S-303 o F.R.A.L.E. (frangible anchor linker effector) è una piccola molecola a carica positiva creata per il trattamento d'inattivazione dei globuli rossi; si tratta di un agente alchilante derivato dalla mostarda di quinacrina (un colorante biologico).

Questa sostanza si intercala nelle regioni cariche negativamente dell'elica di DNA o RNA creando dei cross-legami che inattivano gli acidi nucleici e non viene attivata da una radiazione luminosa (es. UV) ma quando passa dal basso pH di conservazione al pH neutro del sangue.

L'S-303 si lega anche ad altre proteina ed alle membrane cellulari e più del 20% della sostanza può rimanere legato alla superficie dei globuli rossi o rimanere contenuto al loro interno.




Questa molecola ha dimostrato di essere attiva verso un gran numero di virus, batteri e protozoi e non ha mostrato tossicità inattese. I dati relativi alle lesioni da conservazione dei globuli rossi (rilascio di K extracellulare, Hb libera nel plasma, variazione del 2,3DPG, glucosio e lattato) risultano essere paragonabili ai controlli.

La funzionalità dei globuli rossi risulta essere normale e studi con globuli rossi marcati con Cr-51 hanno evidenziato una sopravvivenza superiore al 75% a 24 ore.

In due studi randomizzati e controllati in fase III, coinvolgenti pazienti sottoposti ad interventi di cardiocirurgia, è stata segnalata la comparsa di anticorpi diretti contro residui di S-303 legati alla superficie dei globuli rossi. I trials, quindi, sono stati sospesi.

Sono stati apportate delle modifiche al trattamento con l'S-303 per ridurre la quantità di globuli rossi a cui la molecola rimane legata per ridurre l'immonogenicità. Si è ancora in attesa di studi di valutazione di sicurezza ed efficacia.




Il PEN110 è un oligomero di etilenamina a basso peso molecolare, rapida solubilità e carico positivamente, caratterizzato da una elevata selettività per le basi di guanina degli acidi nucleici.

E' in grado di legare in modo covalente i gruppi fosfato carichi negativamente, con successiva apertura dell'anello imidazolico e rottura dell'acido nucleico che risulta incapace di replicarsi. La sua attivazione non dipende dall'applicazione di radiazione luminosa.

I globuli rossi, prima di essere sottoposti al trattamento con il PEN110 allo 0.1%, devono essere filtrati. La soluzione di globuli rossi e PEN110 deve incubare a temperatura ambiente per 6 ore con successiva diluizione del PEN110 a meno di 50 ng/mL mediante un lavaggio con 6 litri (!) di salina con destrosio al 5%. I globuli rossi sono poi conservati a 4°C per 42 giorni.

Questo oligomero è attivo verso un ampio spettro di virus (anche senza envelope), batteri, protozoi e micoplasma.




L'integrità della membrana dei globuli rossi sembra essere conservata dopo il trattamento con PEN110 ma anche con questo composto sono stati riportati casi di formazione di anticorpi (in pazienti cronicamente trasfusi affetti da anemia falciforme). La specificità di questi anticorpi non è stata riportata e tutti gli studi clinici collegati al PEN110 sono stati sospesi.

Il futuro dell'S-303 e del PEN110 è incerto, almeno sino a quando la loro immunogenicità non sarà stata studiata ulteriormente ed eliminata.

L'utilizzo della Riboflavina per inattivare i globuli rossi è attualmente in corso di sviluppo. Se si ottenessero risultati favorevoli, la Riboflavina sarebbe la prima sostanza che potrebbe essere utilizzata per tutti gli emocomponenti (globuli rossi, plasma e piastrine).

Il Blu di Dimetilmetilene (DB) è un'altra fenotiazina simile all'MB che è stata studiata come potenziale agente di inattivazione di patogeni per i globuli rossi.




Il DB è in grado di inattivare sia virus ad RNA sia virus a DNA nei leucociti e nei globuli rossi.

Recenti studi hanno dimostrato solo minime riduzioni del 2,3DPG post trattamento ma l'emolisi è risultata essere superiore all'1% (ed in alcuni studi ha superato il 40%).

Altri studi hanno dimostrato che la soluzione additiva di conservazione post trattamento compromette fortemente l'integrità dei globuli rossi dopo il trattamento fotochimico. Il citrato sembra prevenire l'emolisi dei globuli rossi trattati con DB.


Per l'inizio di trials clinici, tale metodica dovrà essere migliorata per poter preservare meglio l'integrità dei globuli rossi.

I coloranti fotosensibilizzanti costituiscono la base di diversi sistemi di inattivazione dei patogeni per i globuli rossi, ma la maggior parte di queste sostanze sono caratterizzate da una struttura molecolare rigida, costituita da anelli aromatici fissi in grado di liberare radicali ossigenati dopo fototrattamento, indipendentemente dal fatto che siano liberi in soluzione o legati ad un substrato.



In teoria queste molecole sono in grado di attraversare le membrane virali ed i capsidi andandosi ad intercalare agli acidi nucleici virali. Però sono anche in grado di legarsi ai lipidi ed alle glicoproteine della membrana dei globuli rossi e questo può portare al danneggiamento della membrana cellulare durante il fototrattamento.

L'ottimizzazione del metodo di inattivazione con questi coloranti flessibili si otterrà creando molecole dotate della minima affinità di legame possibile per i globuli rossi.




Il tiopirilio (TP) è un colorante fotosensibile a grande affinità per la membrana dei globuli rossi che, però, può essere utilizzato assieme ad un additivo chimico a struttura molecolare simile.

Il Dipyridamolo ha una struttura molecolare molto simile al TP e sembra bloccare il legame del TP con i globuli rossi, anche se non su tutti i siti di legame presenti sulla membrana.

Tale effetto del Dipyridamolo è comunque molto efficace nel contenere l'emolisi fotoindotta (solo lo 0,3%) utilizzando come soluzione di conservazione il RAS2 (Erytrosol), anche se il potassio extracellulare è risultato superiore rispetto quanto misurato nei controlli.

Un altro colorante fotosensibilizzante flessibile impiegato per l'inattivazione dei patogeni nei globuli rossi è l'Arancio di Tiazolo (AT).

Questo colorante agisce solo quando riesce a legarsi alla membrana dei globuli rossi e dato che la quota di molecola che si lega è solo il 21% circa, non ha bisogno di alcun inibitore per competizione.



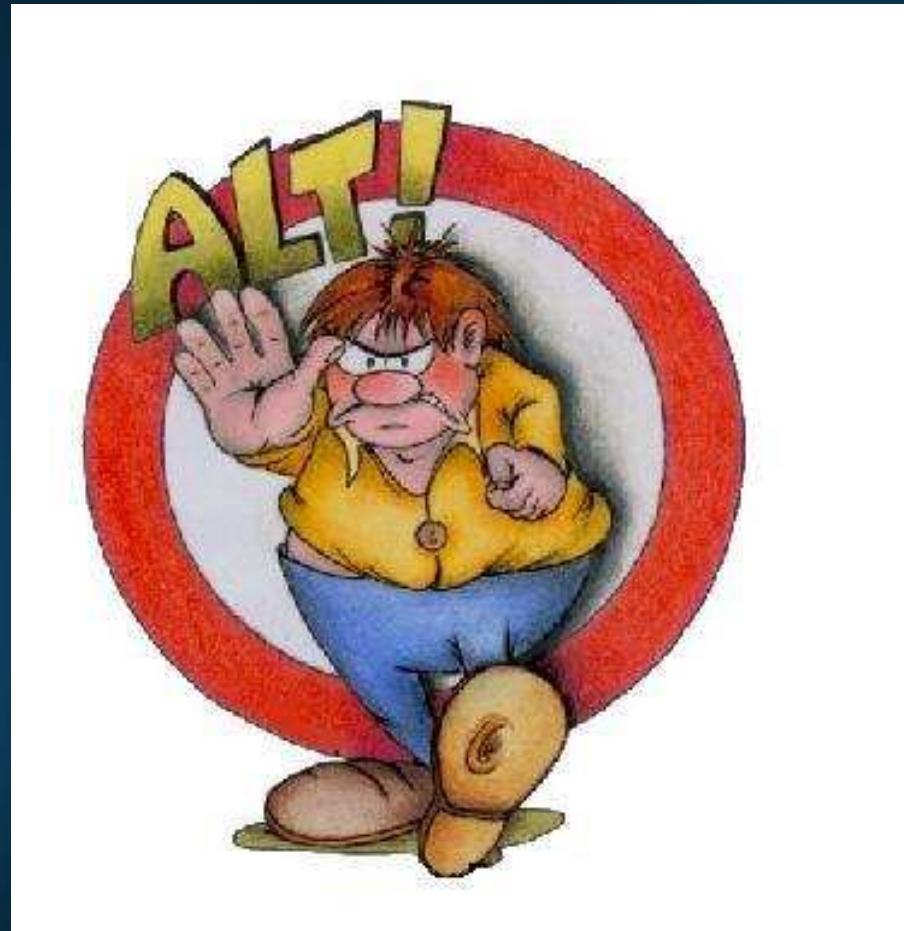
Le metodiche di inattivazione basate sull'impiego del TP e dell'AT appaiono promettenti ma non possono ancora rappresentare una speranza per il futuro dell'inattivazione dei patogeni, dato che sono state sperimentate solo su piccole quote di globuli rossi, ma non ancora su intere unità di GRC.

Così come non è stata ancora testata l'efficacia di queste molecole verso un ampio spettro di microrganismi, compresi i ceppi batterici più resistenti.

In base ai risultati degli studi di inattivazione in vitro e degli studi di follow-up clinico dei pazienti trattati con emoderivati attivati si può dire che la pastorizzazione, lo steam treatment e l'inattivazione chimica con solventi organici e detergenti sono i procedimenti che si sono rivelati più efficaci....

Il prossimo futuro ci dirà di più sui più moderni metodi di fotosensibilizzazione

Pending troubles.....





ELEMENTI RESISTENTI:

- PRIONI (vCJD)
- VIRUS NON CAPSULATI (Parvo B19 – HAV)
- SPORE BATTERICHE

RISCHI AGGIUNTIVI:

Tossicità/immunogenicità/carcinogenicità/teratogenicità delle sostanze utilizzate per l'inattivazione a carico di pazienti/operatori

COSTI

Il mondo industrializzato può permettersi di affrontare un aumento dei costi, in forza della speranza del raggiungimento del “rischio trasfusionale nullo”, ma questo non potrà che ingigantire il divario con i paesi in via di sviluppo.



...è ora di concludere!

**INATTIVAZIONE COME STRUMENTO STRATEGICO PER
COMBATTERE LA TRASMISSIONE TRASFUSIONE-
MEDIATA DI MICROORGANISMI...SOPRATTUTTO DI
QUELLI "D'IMPORZIONE"**

BABESIOSI – C. GAS - MALARIA

- NO** allestimento nuovi kits diagnostici
- NO** ulteriori lavorazioni su componenti/frazioni
- NO** sospensione preventiva dei donatori a rischio
- NO** riduzione della disponibilità risorsa sangue



... E PENSATE CHE AVETE ANCORA TUTTO IL POMERIGGIO