



Granulocyty z buffy coatu

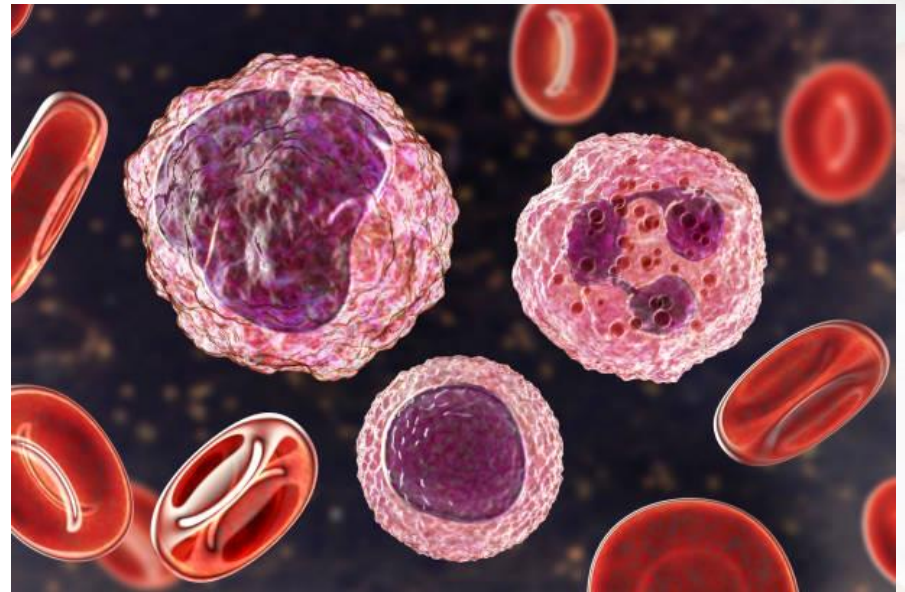
Rita Pacasová

Transfuzní a tkáňové oddělení
Fakultní nemocnice Brno

15. STŘEŠOVICKÝ TRANSFUZNÍ DEN
23. – 24. listopadu 2022

Transfuze granulocytů

- ⇒ pacienti s refrakterní infekcí
nebo s vysokým rizikem
rozvoje závažné infekce
- ⇒ pacienti s febrilní neutropenií
u nádorového onemocnění,
léčba myeloablativní
chemoterapií (ne vždy)





Transfuze granulocytů

- ⇒ Randomizovaná data řídka, publikace 15 – 20 let popisují transfuzi granulocytů u pacientů s neutropenií:
 - pro terapeutické indikace při infekci refrakterní na standardní léčbu (antimikrobiální/ antimykotické přípravky)
 - pro sekundární profylaxi u pacientů
 - s dříve prodělanou závažnou bakteriální nebo plísňovou infekci
 - vyžadují další cyklus chemoterapie nebo transplantaci hemopoetických kmenových buněk



Transfuze granulocytů - indikace

- ⇒ Normální hodnoty neutrofilních granulocytů
 - rozmezí $3,00$ až $5,50 \times 10^9$ /litr
- ⇒ Indikace transfuze granulocytů - neutropenie pacienta
 - méně než $0,5 \times 10^9$ /litr
 - současné projevy infekce trvající $> 24 - 48$ hodin
 - nedostatečná odpověď na standardní léčbu
- ⇒ Po transfuzi lze očekávat vzestup granulocytů o více než 1×10^9 /l, efekt přetrvává až 2 dny.

Výroba granulocytů v Brně - 1958

- ⇒ Zavedena příprava trombocytových a **leukocytových** koncentrátů z čerstvých odběrů plné krve (ve skle)
- suspenze trombo+**leuko**+(ery) v plazmě
 - výroba přípravku pro dospělého nejméně z **6-8 PK**
 - náročná příprava a nemožnost skladování (max 6 h) -> výroba a podání jen zcela výjimečně



Koncentrát leuko-trombo	1987	1988	1989
Zpracované litry PK/ TD	92 / 74	189 / 151	101/ 80

Výroba granulocytů v Brně - 1992

- ⇒ Zavedeny odběry plné krve do systému plastových vaků s manuálním zpracováním
- ⇒ Výroba trombocytů z buffy coatu
- ⇒ Výroba a podání **granulocytů**
 - čerstvý buffy coat (4-6 TU)
 - směsi z 4-10 BC
- ⇒ výroba a podání **výjimečné** na žádost klinického pracoviště



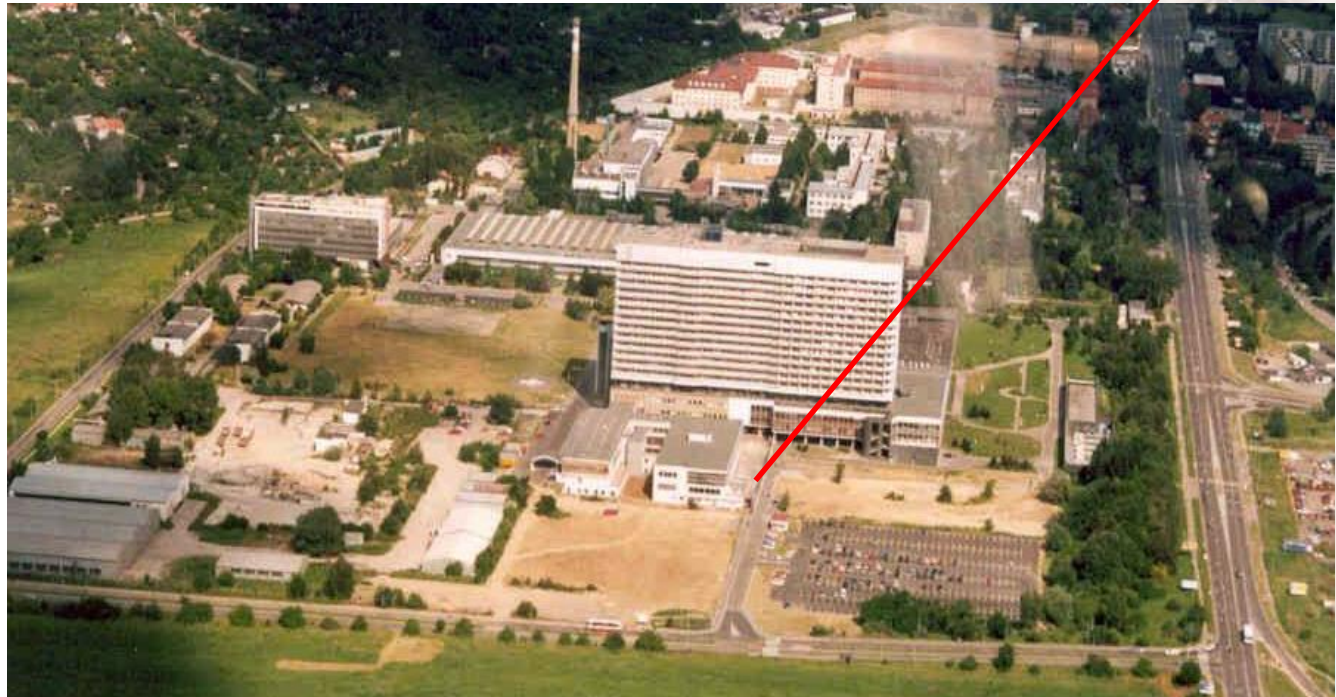
Výroba granulocytů v Brně - 1998

- ⇒ Instalace separátoru krevních složek Cobe Spectra na IHOK FN Brno
- ⇒ Možnost výroby **granulocytů** z aferézy, ozářených (GAO)



Výroba granulocytů v Brně - 2002

- ⇒ stěhování do nové budovy ve Fakultní nemocnici Brno
- ⇒ **2004 ! STANDARDIZACE !**
změna procesu
přípravy **směsných
granulocytů
z buffy coatu**
a validace jejich
výroby





Výroba granulocytů v Brně

⇒ Výdej
granulocytových
transfuzních
přípravků (TD)
v období
2002 až 2022

Rok	Počet pacientů	Počet G z BC	Počet G z aferézy
2002	1	3x 6 BC	0
2004	1	1x směs ze 4 BC 1x směs 7 BC	0
2006	1	0	2
2008	1	0	4
2013	1	3x směs 10 BC	5
2016	1	0	7
2017	2	0	5
2018	3	0	14
2021	2	4x směs 10 BC + 4x směs 5 BC	1
2022	4	64x směs z 5 BC	0

Granulocyty z BC - 2004

⇒ Požadavek výroba směsi BC pro pediatrického pacienta (ALL)

⇒ Limity:

→ Objem < 350 ml / Obsah granulocytů > $5,00 \times 10^9$ / TU

⇒ Ověření centrifugace směsi BC, snížení objemu a obsahu erytrocytů

Směs BC	Centrifugace	Počet BC	Objem (ml)	Obsah granulocytů $\times 10^9$ / TU
1	NE	4	390	3,25
2	NE	7	310	5,37
3	ANO	10	288	7,16
4	ANO	10	262	5,03
5	ANO	10	233	6,36



Granulocyty z BC - 2013

- ⇒ Požadavek výroba směsi BC pro pediatrického pacienta (ALL)
- ⇒ Limity: KS
 - KS **B neg**/ infekční status dárce **CMV negativní**
- ⇒ Výběr dárců plné krve/ překlenutí doby výběru aferetického dárce

Směs BC	CMV neg/ test DK	Počet BC	Objem (ml)	Obsah granulocytů x 10 ⁹ / TU
1	3/ 11	3	152	2,03
2	3 / 7	3	155	2,17
3	3 / 8	3	154	1,86

- ⇒ Následně 5x granulocyty z aferézy (dárce matka, otec a strýc)



Granulocyty z BC – 2018

⇒ Požadavky na výrobu granulocytů v roce 2018 – **3 pacienti !**

→ 1.5. - 6.5.2018 6 x GAO

→ 29.6. – 3.7.2018 5 x GAO

→ 2.11. – 4.11.2018 3 x GAO

⇒ Požadavek na další **standardizaci výroby granulocytů**

→ Separace alogenních dárců po stimulaci kortikosteroidy

→ **Výroba granulocytů směsných**



Granulocyty z BC – 2018

- ⇒ Ověření protokolu v Guide to the preparation, use and quality control of blood components, 19th edition (2017)
 - ⇒ Smísení až **12 AB0 BC do 18 hodin od odběru** a náhradního roztoku pro trombocyty před centrifugací, po ní separace erytrocytů, supernatantu a vrstvy bohaté na granulocyty - super BC, následně smíchání se 70 ml AB0 plazmy z jednoho odběru.
 - ⇒ Použití **2 -3 zbytků po přípravě směsných trombocytů** a fyziologický roztok před separací. Oddělení erytrocytů, supernatantu a vrstva bohatá na granulocyty - super BC
- ⇒ Ověření postupu dle Bashir et al., BJH (2008) 140, str. 701 – 711

bjh

research paper

Neutrophil function is preserved in a pooled granulocyte component prepared from whole blood donations

Saber Bashir,¹ Simon Stanworth,² Edwin Massey,³ Fred Goddard³ and Rebecca Cardigan¹

¹NHS Blood and Transplant, Brentwood, ²NHS Blood and Transplant, Oxford, and ³NHS Blood and Transplant, Bristol, UK



Granulocyty z BC specifikace 2018

⇒ Guide to the preparation, use and quality control of blood components, 19th edition (2017):

- Doporučená dávka pro dospělého pacienta:
 - **1,5 – 3,0 x 10⁸ Granulo/ kg**
 - tj. pro 60 kg = **9-18x 10⁹ granulocytů**
 - 1-2 TU/ den, kdy 1 TU = cca >9x 10⁹ Granulo
- Dávka pro pediatrického pacienta:
 - 0,3x10⁹ Granulo/ kg
 - tj. pro 20 kg dítě = **6x10⁹ granulocytů**
 - tj. pro 30 kg dítě = **9x10⁹ granulocytů**

Granulocyty z BC – validace 2019

⇒ Validace leden – duben 2019

⇒ Postup:

- Smísení **5 AB0 BC do 18 hodin od odběru** a 200 ml náhradního roztoku pro trombocyty před centrifugací
- po centrifugaci separace erytrocytů, supernatantu a vrstvy bohaté na granulocyty - super buffy coat,
- smíchání s 50 ml náhradního roztoku pro trombocyty

⇒ **PROBLÉM!**

- správné nastavení centrifugačních parametrů
- nastavení programu autom. lisů (**MacoPressSmart REVO**)
- ⇒ 1 800 xg / 5 minut, R5 B5, +22 °C (**HERAEUS Cryofuge 16**)



Granulocyty z BC – validace 2019

Směs BC/ Granulocyty z 5 BC	Limit	Průměr (n=16)
Objem ml	< 500	456
WBC x10 ⁹	>6,0	7,92
RBCx10 ¹²	-	1,31
PLT x10 ⁹	-	558
Granulo x10 ⁹	30%	2,85
Objem ml	<150	121
Granulo x10⁹ /%	> 2,5	2,71/ 95 %
WBC x10 ⁹ /%	>80%	6,73/ 85 %
RBCx10 ¹² /%	<25%	0,32/ 24 %
PLT x10 ⁹ /%	<25%	133/ 24 %

5 BC AB0 shodné



200 ml SSP+



Centrifugace
1800xg/ 5 min



- supernatant

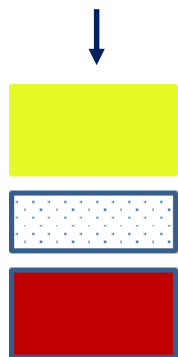


- super BC



- erythrocyty





- supernatant

- super BC

- erythrocyty

Přidání

50 ml SSP+

**Granulocyty z BC, směsné, ozářené
(GO)**



Super BC



Granulocyty z BC – značení

⇒ Typ TP

⇒ Množství

⇒ Počet BC

⇒ Objem
SSP+

⇒ Skladování
/ ozáření

Transfuzní a tkáňové oddělení FN BRNO Č. přípravku		A	
C201021 605486 ³⁰		RhD pozit	
G	GRANULOCYTY		
Množství: 105 g 102 ml 0.5 TD		Odebráno: 20.10.2021	
Vyrobeno z 5 odběrů, Odebráno do 63 ml CPD Zpracováno ve 200 ml SSP+		Použitelné do: 21.10.2021 11:59	
HBV: NEG SYPH: NEG HIV: NEG HCV: NEG			
Skladujte při teplotě +20 °C až +24 °C.			

Transfuzní a tkáňové oddělení FN BRNO Č. přípravku		A	
C201021 605486 ⁰¹		RhD pozit	
G	GRANULOCYTY		
Množství: 105 g 102 ml 0.5 TD		Odebráno: 20.10.2021	
Vyrobeno z 5 odběrů, Odebráno do 63 ml CPD Zpracováno ve 200 ml SSP+		Použitelné do: 21.10.2021 11:59	
HBV: NEG SYPH: NEG HIV: NEG HCV: NEG			
Skladujte při teplotě +20 °C až +24 °C. OZÁŘENO.			



Granulocyty z BC - 2021

- ⇒ Požadavek výroba směs BC pro dospělého pacienta (aplastic. anemie)
- ⇒ Limity: **granulocyty z BC, směsné**
 - Objem < 500 ml /TD / Obsah granulocytů > 10×10^9 / TD (=20 BC)

Směs BC	Počet BC	Objem (ml)	Obsah granulocytů x 10^9 / vak	Obsah granulocytů v TD
1	5	102	2,24	10,05 x 10^9 409 ml
2	5	102	2,45	
3	5	104	2,18	
4	5	101	3,18	
5	10	219	4,05	8,48 x 10^9 435 ml
6	10	216	4,43	
7	10	209	5,64	11,89 x 10^9 421 ml
8	10	212	6,25	

Specifikace UKBTS (2021) *

Granulocyty z BC směsné, v náhradním roztoku a plazmě

- ⇒ od roku 2012 výroba v UK, validace/ zkušební provozy
- ⇒ od 2018 v UK nevyrábí aferetické GAO (etické důvody!)
- ⇒ od 2021 v UK většina podaných granulocytových TP = směsné
- ⇒ od 2020 výroba ve Francii a Holandském království

→ Doporučená terapeutická dávka
pro dospělého pacienta:
2x GO (2 x směs z 10 BC)

→ Dávka pro pediatrického pacienta:
10 -20 ml / kg z GO

Joint UKBTS Professional Advisory Committee (¹)

Position Statement

Granulocyte Therapy

March 2021

Revised by: Edwin Massey, Simon Stanworth, Suzy Morton, & Rebecca Cardigan at the request of the Standing Advisory Committee on Blood Components

March 2021 - The contents of this document are believed to be current. Please continue to refer to the website for in-date versions.



Granulocyty z BC – 2022

- ⇒ Požadavky na výroba granulocytů z BC pro 4 dospělé pacienty (AML)
- ⇒ Limity: **granulocyty z BC, směsné z 5 BC**
 - Objem < 150 ml /vak / Obsah granulocytů > $2,5 \times 10^9$ / vak
 - Snížený obsah erytrocytů
- ⇒ Celkem vyrobeno **64 směsí z 5 BC** (14.8. až 19.9.2022) => 320 BC!
- ⇒ **Nová organizace výroby**
 - výroba ráno následující den po odběru (16 -24 hod po odběru)
 - doba použitelnosti – do půlnoci následující den po odběru PK
- ⇒ **Nové nastavení separace na automatickém lisu – změna logiky!!**
 - ⇒ pevné nastavení separovaných objemů pro supernatant (253 ml), erytrocyty (160 ml) – zbytek = super BC o objemu 80 – 130 ml

Granulocyty z BC – 2022

Parametr	2021 UK BTS*	2021 UKBTS* TD	2022 TTO	2022 TTO TD
Počet BC	10	20	5	20
Objem/ vak (ml)	175 - 250	350 - 500	88 - 125 ml	352 - 500 ml
Obsah granulo/ vak	$>5 \times 10^9$ (průměr 8,2)	$>10 \times 10^9$ (průměr 16,4)	$>2,5 \times 10^9$ (průměr 3,8)	$>10 \times 10^9$ (průměr 15,2)
Obsah erytrocytů/ vak	$0,15 \times 10^{12}$	$0,30 \times 10^{12}$	$0,30 \times 10^{12}$	$<1,2 \times 10^{12}$
Obsah trombocytů/ vak	$5,07 \times 10^{11}$	$10,14 \times 10^{11}$	$1,25 \times 10^{11}$	5×10^{11}
Skladování	20-24°C (bez třepání)			
Exspirace	do půlnoci následující den po odběru			

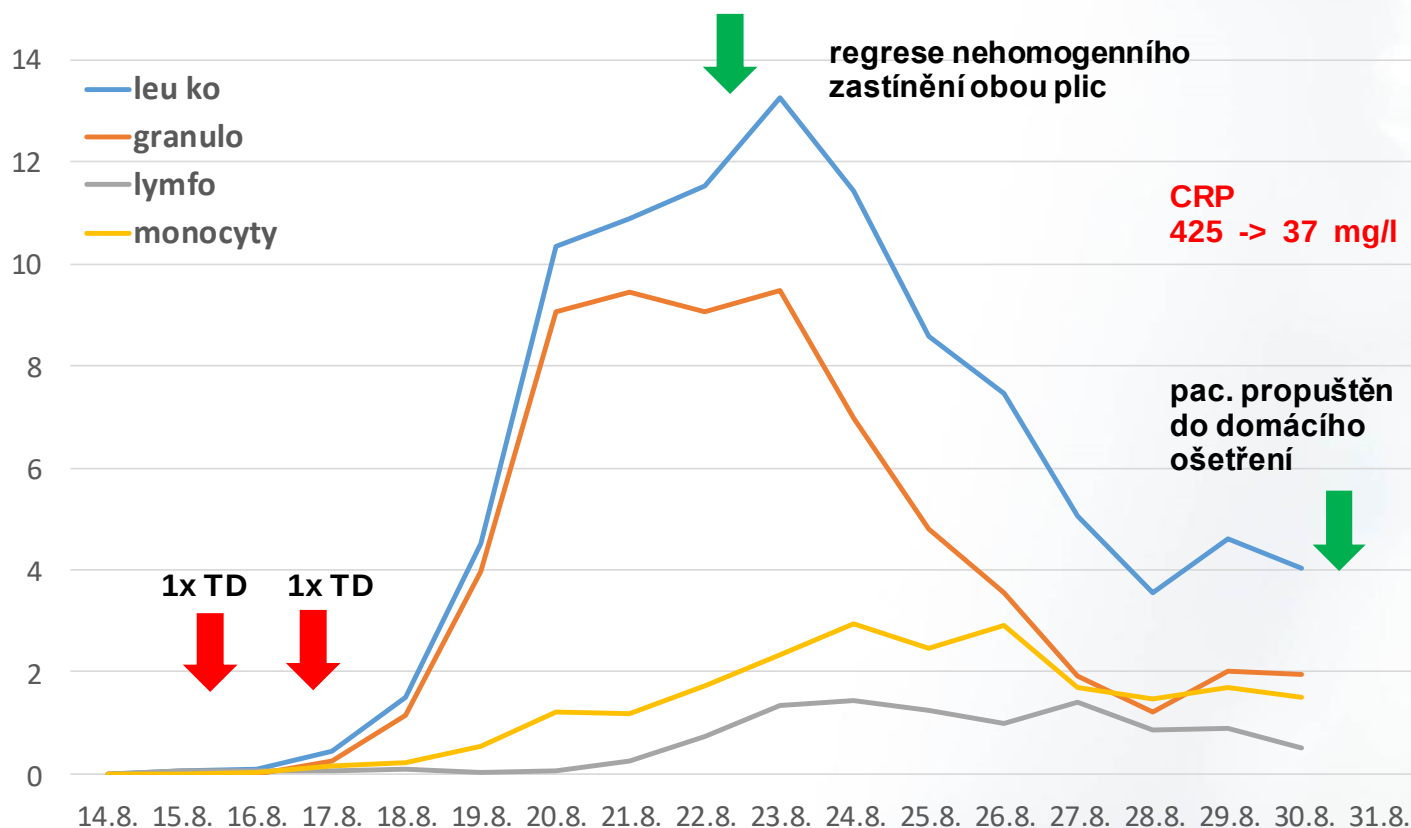
Granulocyty z BC - TTO - výhody

- ⇒ Směsi z 20 BC = terapeutická dávka pro dospělého pacienta
- Standardní obsah granulocytů **>10 x 10⁹**
 - Snížený objem do 500 ml
 - Snížený obsah ery (do 1,2 x 10¹²)
 - Obsah trombocytů ekvivalent 2 - 3 TD
 - Snížený obsah plazmy – **univerzální KS 0!!**

směs z 5x BC	Anti - A		Anti-B	
	C201022 603639	C201022 603640	C201022 603639	C201022 603640
IgM (max 32)	4	4	2	8
IgG	32	32	8	8

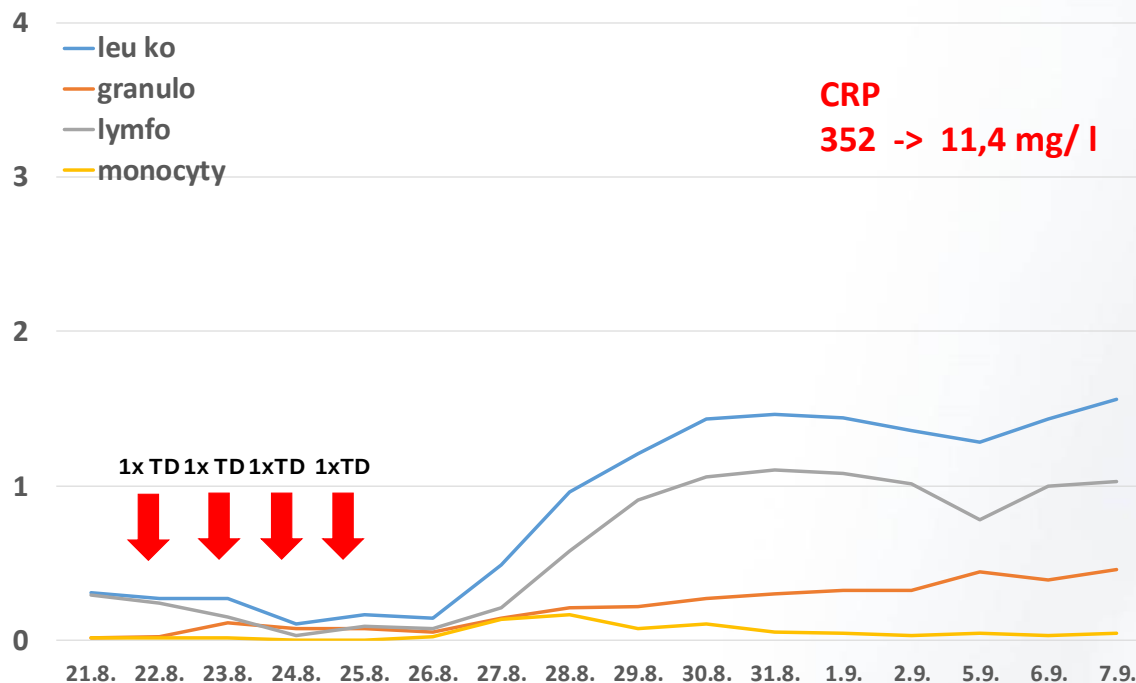
Kazuistika 1 – terapeutické podání

⇒ Pac. LB, 1978 (AML) – sepse G⁻, oboustranná bronchopneumonie



Kazuistika 2 – profylaktické podání

⇒ Pac. RF, 1963 (AML) – stav po indukční chemo, perianální absces, přetrvávající neutropenie, plán. aloTx





Postup výroby TTO FN Brno

- ⇒ **Rychlé zajištění** transfuze granulocytů po indikaci
 - klíčové pro pacienty s život ohrožujícím onemocněním
- ⇒ **Denní dostupnost** výroby (mimo neděle)
 - klinicky důležitá - podání granulocytů v časném počátku těžké infekce je kritické
- ⇒ **Standardní denní dávka** (TD)
 - konzistentní cca 15×10^9 buněk (4x směs z 5 BC), neexistují důkazy o množství účinné dávky granulocytů
- ⇒ Hlavní **limitující faktor** = objem
- ⇒ Výhoda **univerzálního použití** BC KS 0
- ⇒ **Etický pohled** - bez omezení, maximální využití darované PK

**I staré
poznatky
lze využít
pro tvorbu
něčeho
nového!**



I staré
poznatky
lze využít
pro tvorbu
něčeho
nového!



Děkuji za pozornost