



**ÚVN**

MILITARY UNIVERSITY HOSPITAL  
PRAGUE

**16. Střešovický transfuzní den ÚVN Praha**



## **Patogen inaktivační technologie – principy a přehled dostupných metod**

**pplk. MUDr. Dominik Kutáč, Ph.D.**

**Oddělení hematologie a krevní transfuze ÚVN Praha**

# Disclosure

**Žádné relevantní finanční nebo jiné vztahy k zveřejnění**



**ÚVN**

MILITARY UNIVERSITY HOSPITAL  
PRAGUE

# Úvod

- **důraz na bezpečnost transfuzních přípravků stran krví přenosných infekcí je jedním ze základních imperativů transfuzní praxe**
- **patogen redukční technologie (PRT) představují posun ve zvýšení bezpečnosti transfuzních přípravků od reaktivního přístupu k proaktivnímu**
- **komerčně dostupné technologie jsou efektivním nástrojem k inaktivaci virů, bakterií a parazitů, současně inaktivují reziduální leukocyty v transfuzních přípravcích**
- **Výsledkem je snížení rizika bakteriální, parazitární, či virové kontaminace, ale současně rizika GvHD reakce u příjemce a snižují i hladinu cytokinů způsobujících nehemolytické potransfuzní reakce.**

Reducing the risk of infection from plasma products: specific preventative strategies. Burnouf T, Radosevich M. Blood Rev. 2000;14:94-110.  
Probable transmission of hepatitis E virus (HEV) via transfusion in the United States. Ticehurst JR, Pisanic N, Forman MS, et al. Transfusion. 2019;59:1024-34.  
Hepatitis E virus: emerging from the shadows in developed countries. Dalton HR, Seghatchian J. Transfus Apher Sci. 2016;55:271-4.  
Current and emerging infectious risks of blood transfusions. Busch MP, Kleinman SH, Nemo GJ. J Am Med Assoc. 2003;289:959-62.  
Ebola virus convalescent blood products: where we are now and where we may need to go. Burnouf T, Seghatchian J. Transfus Apher Sci. 2014;51:120-5.



**ÚVN**

MILITARY UNIVERSITY HOSPITAL  
PRAGUE

# Nynější stav

## Bezpečnostní opatření ke snížení rizika patogenní kontaminace transfuzních přípravků

- **bezpríspevkové dárcovství krve a jejích složek**
- **důsledného vyšetření a posouzení způsobilosti dárců před každým odběrem**
- **robustní laboratorní screening**
- **důsledná desinfekce místa odběru**
- **tzv. look-back postupy, které spočívají v hlášení zjištěných reaktivit a likvidací přípravků daného dárce, či došetření přípravku nebo příjemce transfuzního**
- **u některých typů přípravků je pak možné bezpečnost dále zvýšit použitím patogen redukce**

World Health Organization Recommendations for the production, quality control and regulation of plasma for fractionation. Geneva: World Health Organization; 2005 <http://www.who.int/bloodproducts2005>.



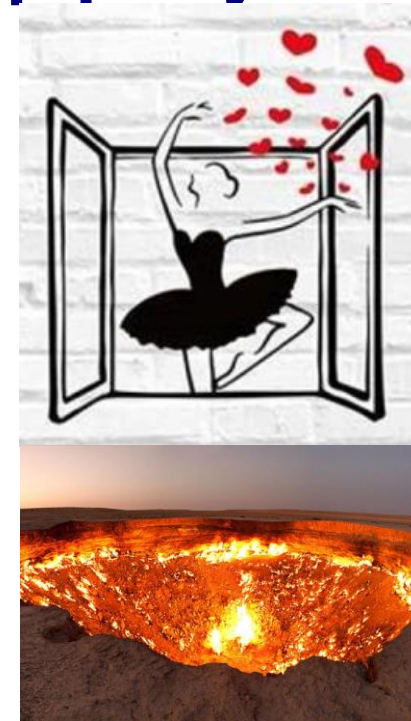
**ÚVN**

MILITARY UNIVERSITY HOSPITAL  
PRAGUE

# Nynější stav

## Bezpečnostní opatření ke snížení rizika patogenní kontaminace transfuzních přípravků

- **přes všechna tato opatření riziko přenosu infekce transfuzními přípravky stále zůstává !!!**
- **jedním z důvodů je tzv. imunologické okno**
- **u sérologických testů v řádu týdnů až měsíců**
- **vyšetření metodami NAT (Nucleic Acid Test) lze zkrátit na dny**



Optimizing the supply of whole blood-derived bioproducts through the combined implementation of cryopreservation and pathogen reduction technologies and practices: An overview. Bohonek M, Kutac D, Acker JP, et al. Transfus Apher Sci. 2020 Apr;59(2):102754.

Viral safety of human platelet lysate for cell therapy and regenerative medicine: moving forward, yes, but without forgetting the past. Burnouf T, Barro L, Nebie Q, et al. Transfus Apher Sci. 2019;58:102674.



**ÚVN**

MILITARY UNIVERSITY HOSPITAL  
PRAGUE



# Použití PRT - historie

## 1

- první PRT popsána v roce 1991 pro čerstvě zmraženou plazmu (FFP)
- 1. komerční PRT k ošetření trombocytů na bázi amotosalenu/UVA záření bylo uvedeno na trh s CE certifikací v roce 2002 (Intercept Blood System, Cerus Corporation, USA), stejná společnost vyvinula v roce 2006 též zařízení k ošetření FFP.
- v roce 2015 obdržela CE certifikaci pro PRT plné krve metoda užívající riboflavin/UV (Mirasol Pathogen Reduction Technology, Terumo BCT, USA)
- od té doby se objevily další komerční technologie pro PRT krevních destiček, plazmy

Solvent/detergent-treated plasma: a virus-inactivated substitute for fresh frozen plasma. Horowitz B, Bonomo R, Prince AM, et al. Blood. 1992 Feb 1;79(3):826-31.

Pathogen inactivation of blood components. Prowse CV: Transfus Alternat Transfus Med. 2008; 10:139-146

Component pathogen inactivation: a critical review. Prowse CV. Vox Sang. 2013 Apr;104(3):183-99.



**ÚVN**

MILITARY UNIVERSITY HOSPITAL  
PRAGUE

# **Použití PRT – co je to PRT a jak funguje?**

- **PRT užívají chemických fotoaktivních činidel a/nebo ultrafialové záření (UV)**
- **dochází k destrukci nukleových kyselin mikroorganismu případných mikroorganismů a reziduálních buněk v krevních složkách**
- **PRT se pokoušejí najít správnou rovnováhu mezi zničením patogenu a kvalitou buněk**
- **PRT by měla být maximálně účinná, širokospektrá, netoxická a s nízkým vlivem na parametry výsledného produktu v cenově přijatelná.**
- **V řadě míst a zemí se zavádí PRT, protože výhody bezpečnosti takto ošetřených přípravků převažují nad určitým vlivem PRT na jejich některé kvalitativní parametry a cenu**

Component pathogen inactivation: a critical review. Prowse CV. Vox Sang. 2013 Apr;104(3):183-99.

Inactivation of human white blood cells in platelet products after pathogen reduction technology treatment in comparison to gamma irradiation. Fast LD, DiLeone G, Marschner S. Transfusion. 2011 Jul;51(7):1397-404.

Council of Europe, European Committee (Partial Agreement) on Blood Transfusion (CD-P-TS), Symposium on Implementation of Pathogen Reduction Technologies for Blood Components September 2010 Executive Summary available at: [http://www.edqm.eu/medias/fichiers/Executive\\_Summary\\_Pathogen\\_Reduction.pdf](http://www.edqm.eu/medias/fichiers/Executive_Summary_Pathogen_Reduction.pdf) Accessed 5th November 2011

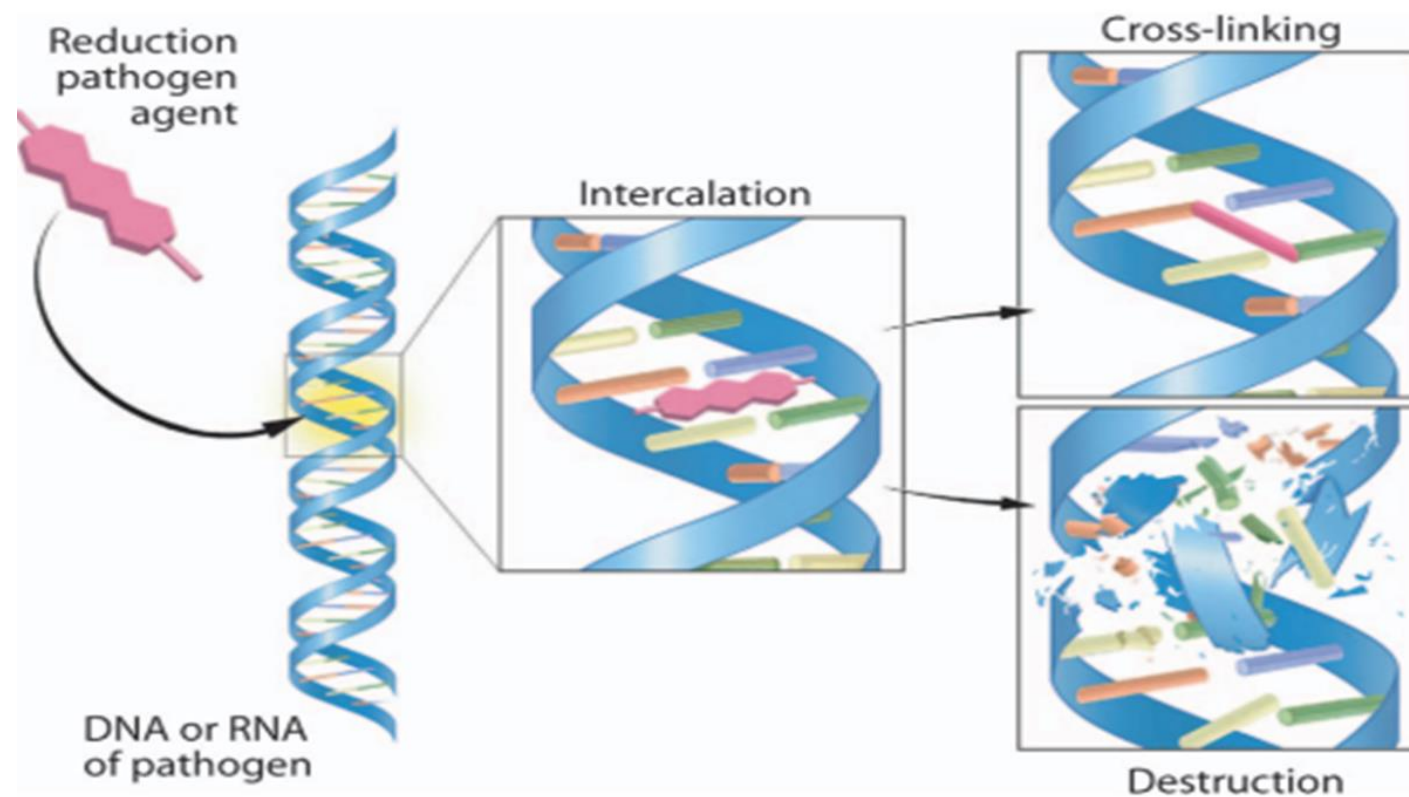
Pathogen reduction technology: methods, status of clinical trials, and future prospects. Corash L. Curr Hematol Rep. 2003 Nov;2(6):495-502.



**ÚVN**

MILITARY UNIVERSITY HOSPITAL  
PRAGUE

# Použití PRT – co je to PRT a jak funguje?



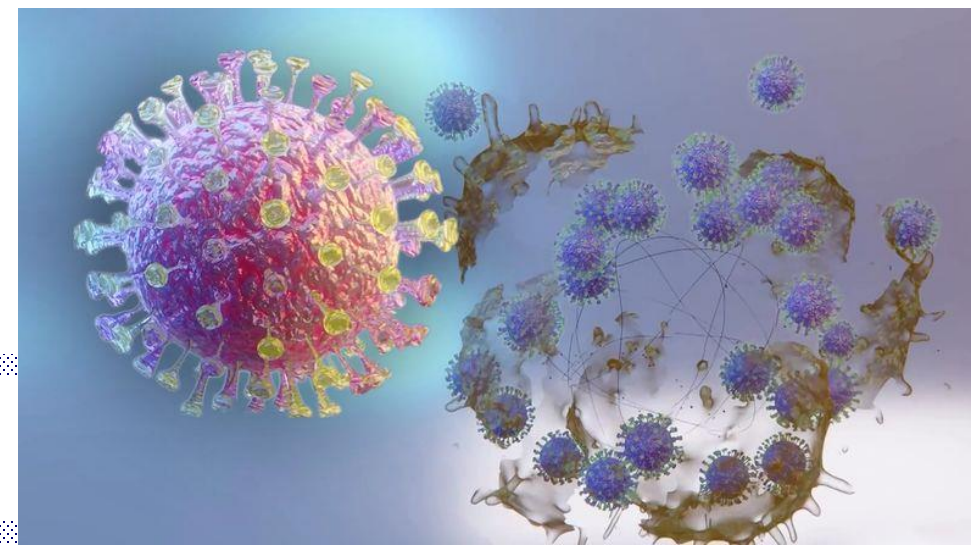
**ÚVN**

MILITARY UNIVERSITY HOSPITAL  
PRAGUE



# Použití PRT – co je to PRT a jak funguje?

- **virová nebo parazitární nákaza - stačí jediný organismus k vzniku infekce, ale musí mít funkční nukleovou kyselinu**
- **množství funkčních nukleových kyselin v transfuzním přípravku může odrážet největší možnou infekční nálož**
- **jestliže tedy PRT může eliminovat nejvyšší množství nukleové kyseliny patogenu a navíc i s bezpečnou rezervou, tak tato metoda může být použita k zajištění bezpečnosti daného transfuzního přípravku**
- **pokud množství nukleové kyseliny patogenu překoná bezpečnostní rezervu dané PRT, tak by PRT měla být doplněna vyšetřováním PCR minipoolů takto ošetřených transfuzních přípravků**



**ÚVN**

MILITARY UNIVERSITY HOSPITAL  
PRAGUE

# Použití PRT – co je to PRT a jak funguje?



- **u bakterií, které mohou proliferovat v TP po odběru, musí být úroveň PRT dostatečná k redukci maximálního počtu namnožených bakterií v přípravku**
- **důležité dodržet maximální možný čas mezi odběrem a ošetřením přípravku, aby nedošlo k přílišné proliferaci bakterií, které by PRT nedokázala ošetřit**
- **pro každý patogen je potřeba mít stanovenou maximální množství nukleové kyseliny tohoto agens zjištěnou u asymptomatických nosičů infekce**
- **PCR testování je tedy nutné v případě vysoce infekčních agens nebo při rezistenci na PRT (HAV, Parvovirus-B19)**
- **většina PRT nedokáže úplně zničit bakteriální spóry a také jsou méně účinné na viry bez lipidového obalu**

Component pathogen inactivation: a critical review. Prowse CV. Vox Sang. 2013 Apr;104(3):183-99.

Hemovigilance monitoring of platelet septic reactions with effective bacterial protection systems. Benjamin RJ, Braschler T, Weingand T, et al. Transfusion. 2017 Dec;57(12):2946-2957.

Evaluation of the effectiveness of a pathogen inactivation technology against clinically relevant transfusion-transmitted bacterial strains. Schmidt M, Hourfar MK, Sireis W, et al. Transfusion. 2015 Sep;55(9):2104-12.

Keeping Blood Transfusion Safe from West Nile Virus: American Red Cross Experience, 2003 to 2012. Dodd RY, Foster GA, Stramer SL. Transfus Med Rev. 2015 Jul;29(3):153-61.



**ÚVN**

MILITARY UNIVERSITY HOSPITAL  
PRAGUE

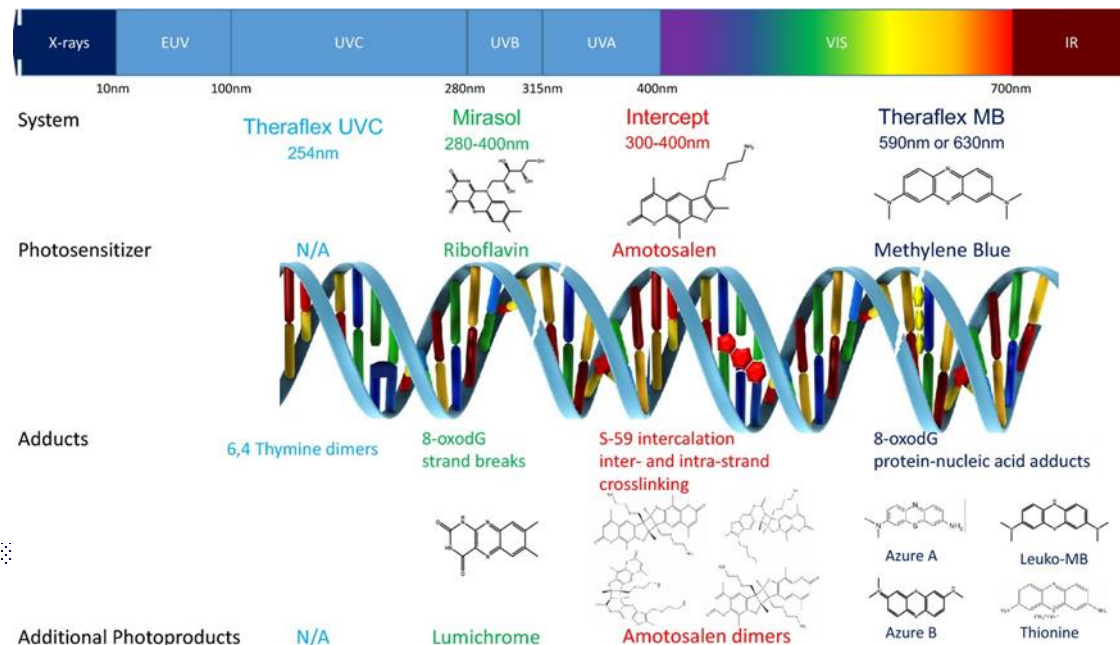
# Metody PRT

Pro rutinní použití jsou na trhu k dispozici tyto metody PRT od třech výrobců:

1/ amotosalen/UVA (Intercept® Blood System, Cerus)

2/ riboflavin/UVA-UVC (Mirasol® PRT, TerumoBCT)

3/ UVC (Theraflex®-UV, Macopharma) a viditelné světlo/methylenová modř (Theraflex®-MB, Macopharma).



**ÚVN**

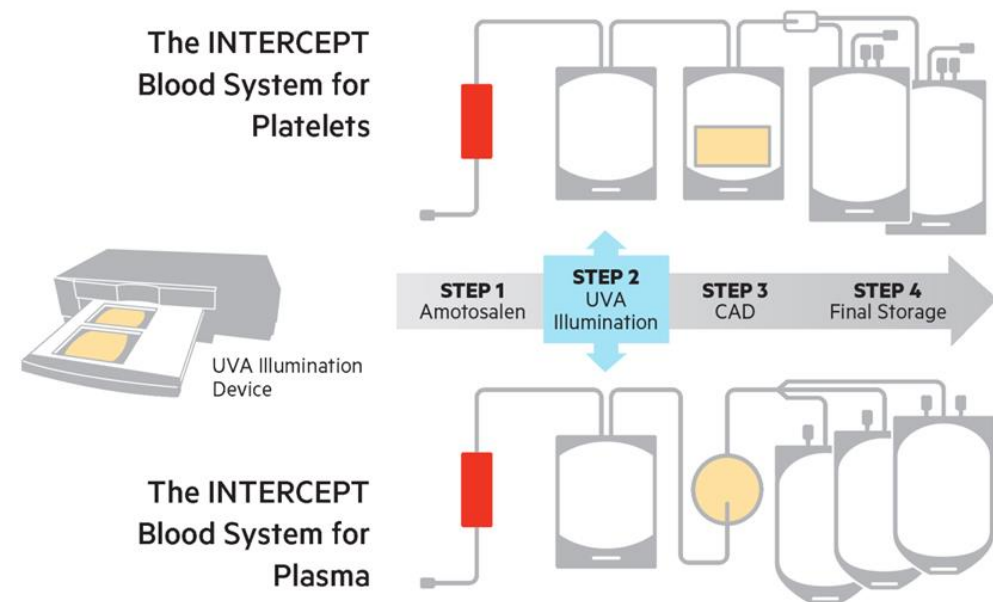
MILITARY UNIVERSITY HOSPITAL  
PRAGUE

# Metody PRT

## 1/ Intercept®Blood Systém

- jako fotoaktivní látka je použit syntetický psoralen (amotosalen)
- po navázání na nukleovou kyselinu a pouze po aktivaci UVA zářením 300–400 nm a dávkou 3 J/cm<sup>2</sup> zesílí uje DNA/RNA fotochemickou reakcí
- tato metoda je certifikovaná k ošetření plazmy a trombocytů

Obrázek - Intercept PRT postup: V horní části obrázku PRT trombocytů, v dolní části PRT plazmy. Krok (step) 1. přepuštění do ozařovacího setu a přidání amotosalenu, 2. UVA ozáření, 3. odstranění amotosalenu a fotoproduktů adsorbci, 4. přepuštění do skladovacích vaků (Intercept®).



**ÚVN**

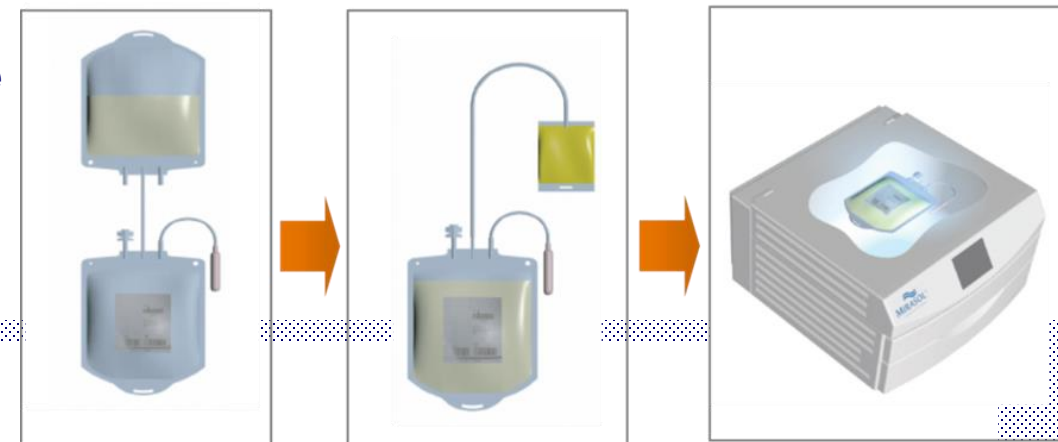
MILITARY UNIVERSITY HOSPITAL  
PRAGUE

# Metody PRT

## 2/ Mirasol®PRT

- využití fotoaktivních vlastností riboflavinu (vitamín B2), tj. přirozeně se vyskytující, netoxické látky, v kombinaci s ultrafialovým světlem
- využívá vlnové délky UV, které se rozprostírají od 280 do 400 nm, napříč UVA, UVB a UVC spektrem a dávkou 6J/ml u plné krve 80J/ml
- PRT touto metodou závisí na působení volných kyslíkových radikálů, které působí zlomy DNA/RNA fotodynamickou reakcí
- jednoduchá metoda, která je certifikovaná na ošetření čerstvé plné krve (jako jediná), plazmy a trombocytů
- velmi nenáročná a bezpečná technologie

Obrázek - Mirasol PRT postup: 1. přepuštění do ozařovacího setu, 2. přidání vitamínu B2, 3. ozáření UV, 4. přepuštění do skladovacího vaku (Mirasol®, není na schématu).



**ÚVN**

MILITARY UNIVERSITY HOSPITAL  
PRAGUE

# Metody PRT

## 3/ Theraflex®-UV

- **nepoužívá žádnou fotoaktivní látku**
- **spoléhá se pouze na úzkou šíři pásma UVC světla, s následnou tvorbou pyrimidinových dimerů v DNA/RNA fyzikální metodou**
- **Metoda je certifikovaná k ošetření trombocytů.**

Obrázek - Theraflex-UV PRT postup:  
přepuštění do ozářovacího vaku, ozáření a opětovné  
přepuštění do primárního vaku (Theraflex®)



**ÚVN**

MILITARY UNIVERSITY HOSPITAL  
PRAGUE



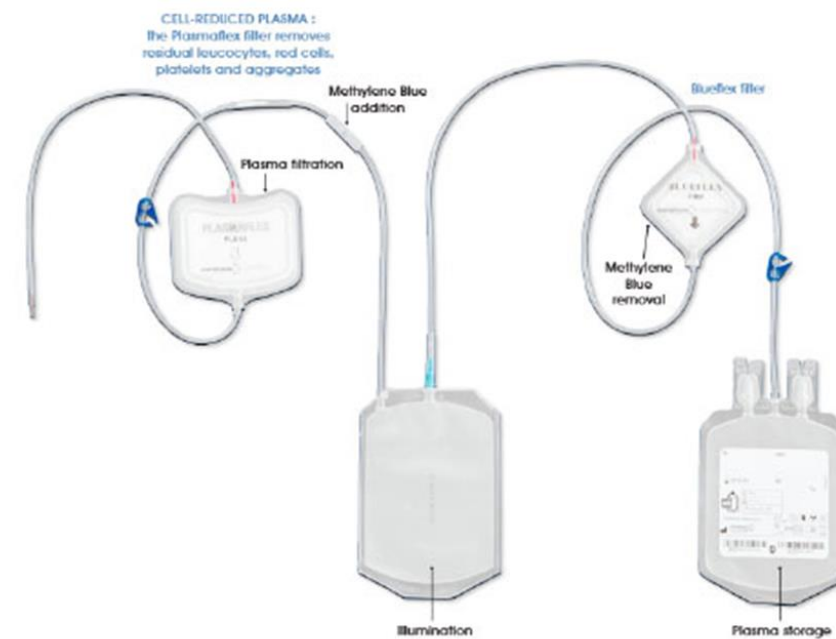
# Metody PRT

## 4/ Theraflex®-MB

- jako fotoaktivní látka je použita methylenová modř, která se pevně váže na nukleové kyseliny a dochází tak k přímému poškození DNA/RNA fotodynamickou reakcí kyslíkovými radikály, které vznikají po ozáření denním světlem
- metoda má certifikaci pouze k ošetření plazmy

Obrázek - Theraflex-MB PRT postup:

1. přepuštění do filtračního vaku, 2. přidání methylenové modře (MB), 3. ozáření, 4. odstranění MB, 5. přepuštění do skladovacího vaku (Theraflex®)



**ÚVN**

MILITARY UNIVERSITY HOSPITAL  
PRAGUE

# Efektivita a bezpečnost PRT

- **Riziko přenosu infekce stoupá s množstvím plazmy v transfuzním přípravku**
- **například dle Allaina HBV se přenese v 31 % erythrocyty, v 50 % trombocyty a v 84 % plazmou, HEV v 25 % erythrocyty a ve 100 % plazmou**
- **PRT obzvláště vhodná k ošetření přípravků erythrocytů, trombocytů a rekonvalescentní plazmy, které nemohou pro krátkou dobu expirace podstupovat karanténu nebo je nemožné přípravek testovat na přítomnost konkrétního infekčního agens**
- **přirozenou PRT může být i délka uchování v chladu (2-6 °C), kdy logaritmicky klesá riziko některých infekcí například HIV, toto může být spojeno se ztrátou viability lymfocytů nebo poklesem infekčnosti virových partikulí**

**Infectivity of blood products from donors with occult hepatitis B virus infection.** Allain JP, Mihaljevic I, Gonzalez-Fraile MI, et al. *Transfusion*. 2013 Jul;53(7):1405-15.

**Refinement of a viral transmission risk model for blood donations in seroconversion window phase screened by nucleic acid testing in different pool sizes and repeat test algorithms.** Weusten J, Vermeulen M, van Drimmelen H, et al. *Transfusion*. 2011 Jan;51(1):203-15.

**Transmission of HIV-1 by component type and duration of shelf storage before transfusion.** Donegan E, Lenes BA, Tomasulo PA, et al. *Transfusion*. 1990 Nov-Dec;30(9):851-2.

**Factors influencing human immunodeficiency virus type 1 transmission by blood transfusion.** Busch MP, Operskalski EA, Mosley JW, et al. *Transfusion Safety Study Group. J Infect Dis*. 1996 Jul;174(1):26-33.



**ÚVN**

MILITARY UNIVERSITY HOSPITAL  
PRAGUE

# Efektivita a bezpečnost PRT

- **v TP lze dosáhnout úrovně patogen redukce 4 logaritmů a efektivní redukci 100-1000 CFU patogenu**
- **neustále nutné zdokonalování a vývoj nových PRT, protože zatím neexistuje 100 % účinnost těchto technologií**
- **při PRT plazmy je důsledkem snížení aktivity F VIII o 20-30 %, aktivita ostatních koagulačních faktorů klesá méně**
- **Interceptem a Mirasolem ošetřené trombocyty skladované po dobu 5 dní při standardní teplotě 20-24 °C se blíží limitu FDA 67% recovery (tj. výtěžnost) čerstvě odebraných trombocytů**

Properties of pathogen-inactivated plasma components. Prowse C. Transfus Med Rev. 2009 Apr;23(2):124-33.

Efficacy of apheresis platelets treated with riboflavin and ultraviolet light for pathogen reduction. AuBuchon JP, Herschel L, Roger J, et al. Transfusion. 2005 Aug;45(8):1335-41.

Recovery and life span of 111indium-radiolabeled platelets treated with pathogen inactivation with amotosalen HCl (S-59) and ultraviolet A light. Snyder E, Raife T, Lin L, et al. Transfusion. 2004 Dec;44(12):1732-40.



**ÚVN**

MILITARY UNIVERSITY HOSPITAL  
PRAGUE

# Efektivita a bezpečnost PRT

- **Při PRT ošetření plné krve dochází ke ztrátě životnosti erytrocytů s vyšší dávkou UV záření a tím i ke zkrácení expirace. Takto ošetřené plné krve nebo z ní vyrobených erytrocytů**
- **Ve většině testů nebyla pozorována žádná toxicita při nejvyšších testovaných dávkách PRT**
- **Podobná bezpečnost PRT byla pozorována pro karcinogenitu a genotoxicitu**
- **Žádná studie neprokázala tvorbu nových antigenů po aplikaci PRT Intercept a Mirasol**

**Viability of red cells prepared with S-303 pathogen inactivation treatment.** Rios JA, Hambleton J, Viele M, et al. Transfusion. 2006 Oct;46(10): 1778-86.

**Stored red blood cell viability is maintained after treatment with a second-generation S-303 pathogen inactivation process.** Cancelas JA, Dumont LJ, Rugg N, et al. Transfusion. 2011 Nov;51(11):2367-76.

**In vivo viability of stored red blood cells derived from riboflavin plus ultraviolet light-treated whole blood.** Cancelas JA, Rugg N, Fletcher D, et al. Transfusion. 2011 Jul;51(7):1460-8.

**Towards pathogen inactivation of red blood cells and whole blood targeting viral DNA/RNA: design, technologies, and future prospects for developing countries.** Drew VJ, Barro L, Seghatchian J, et al. Blood Transfus. 2017 Oct;15(6):512-521.

**Pathogen reduction of whole blood: utility and feasibility.** Allain JP, Goodrich R. Transfus Med. 2017 Oct;27 Suppl 5:320-326.

**The role of toxicology assessment in transfusion medicine.** Ciaravino V, McCullough T, Cimino G. Transfusion. 2003 Oct;43(10):1481-92.

**Pathogen Reduction Technology Treatment of Platelets, Plasma and Whole Blood Using Riboflavin and UV Light.** Marschner S, Goodrich R. Transfus Med Hemother. 2011;38(1):8-18.

**Amotosalen interactions with platelet and plasma components: absence of neoantigen formation after photochemical treatment.** Lin L, Conlan MG, Tessman J, et al. Transfusion. 2005 Oct;45(10):1610-20.

**Toxicity testing of a novel riboflavin-based technology for pathogen reduction and white blood cell inactivation.** Reddy HL, Dayan AD, Cavagnaro J, et al. Transfus Med Rev. 2008 Apr;22(2):133-53.



**ÚVN**

MILITARY UNIVERSITY HOSPITAL  
PRAGUE

# Použití PRT v České republice

- **první PRT technologie v ČR byl zaveden systém Intercept v ÚHKT Praha, kde je již několik let úspěšně používán k ošetření trombocytů a plazmy**
- **rozšíření PRT došlo v ČR v roce 2020 v souvislosti s pandemií COVID-19, kdy se PRT začala používat na některých pracovištích k ošetření rekonvalescentní plazmy**
- **při využití PRT bylo možno karanténu rekonvalescentní plazmy úplně vypustit**
- **kromě ÚHKT Praha byl pořízen systém Mirasol v ÚVN Praha, FN Brno a Nemocnici České Budějovice**

Obrázek - vložení plazmy s přidaným riboflavinem do ozařovače Mirasol v ÚVN Praha

Production and use of convalescent plasma in COVID-19 treatment, taking into account the experience in the Central Military Hospital Prague. Bohoněk M, Řezáč D, Holub M. Cas Lek Cesk. 2020 Summer;159(5): 175-180.



**ÚVN**

MILITARY UNIVERSITY HOSPITAL  
PRAGUE

# Nové možnosti využití PRT

- **patogen redukční technologie představují výrazný posun ve zvýšení bezpečnosti transfuzních přípravků, vzhledem k nově se objevujícím, ale i stávajícím infekčním hrozbám**
- **PRT by se mohla určitě vyplatit v případě ohrožení novým nebo rychle se šířícím krevně přenosným patogenem, kdy by cenová efektivita byla příznivá v kontextu zvýšení bezpečnosti krve a krevních složek**
- **PRT při výrobě přípravků s dlouhou skladovací dobou - kryokonzervované erytrocyty a trombocyty**
- **provedeny studie zkoumající vliv PRT na kryokonzervované trombocyty – amotosalen/UVA, UVC a riboflavin/UVA-UVC (ÚVN)**
- **provedena studie zkoumající vliv PRT na kryokonzervované erytrocyty ošetřené riboflavinem/UVA-UVC před zmražením (ÚVN)**

Cryopreservation of UVC pathogen-inactivated platelets. Waters L, Padula MP, Marks DC, et al. Transfusion. 2019; 59: 2093-2102.

Cryopreservation of buffy coat-derived platelet concentrates photochemically treated with amotosalen and UVA light. Meinke S, Wikman A, Gryfelt G, et al. Transfusion. 2018; 58: 2657-2668.

Cryopreservation of apheresis platelets treated with riboflavin and UV light. Kutac D, Bohonek M, et al. Transfus Apher Sci. 2023 Apr;62(2):103580.

Effects of pre-freeze pathogen reduction with riboflavin and UV light on red cells stored post-thaw in AS-3 additive solution. Kutac D, Bohonek M, et. al. Transfusion. 2023 May;63(5):1067-1073.



**ÚVN**

MILITARY UNIVERSITY HOSPITAL  
PRAGUE



**Děkuji za pozornost!**





**Otázky ?**

**Dominik.kutac@uvn.cz**

