FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Výroba transfuzních přípravků

MVDr. Naďa Poloková
vedoucí výroby
TTO FN Brno

Vstupní materiál

- Minulost
  - Léčba odebranou plnou krví

- Současnost
  - Léčba s využitím jednotlivých krevních složek
    - Zpracování plné krve
    - Odběry aferetické

Odběrový materiál

- Minulost
  - Skleněné láhve
- Současnost
  - Plastové vaky (z PVC s přídavkem vhodných změkčovadel, ftalátů)
    - Systém vícečetných vaků navzájem propojených hadičkami
      - Venepunkční jehla
      - Odběrový vak s antikoagulačním roztokem
      - Satelitní vaky – P, EBR/ERD (s konzervačním roztokem)
    - Pro skladování trombocytů vaky z polyolefínu nebo PVC, propustné pro plyny

Odběrový materiál

Minulost:

Současnost:

Odběrový materiál

Současnost:

Výhody plastových vaků

- Prodloužená doba skladování
- Jednodušší manipulace
- Snížené riziko bakteriální kontaminace
- Nižší nároky na kvalitu výrobních prostor
- Jednorázový materiál
- Minimalizace rizika vzdušné embolie
- Minimalizace rizika záměny vzorku TP pro předtransfuzní vyšetření (segment je součástí vaku)
- Možnost odběru krevních složek

Konzervace krve

- Zabránění srážení (koagulace)
- Stabilizace
- Zachování optimální teploty pro krevní složky
- Zachování maximální míry sterility

Zabránění srážení (koagulace)

- Odběr krve do vaku s antikoagulačním roztokem
- Zabránit srážení krve a umožnit uchovávání erytrocytů
- Složení:
  - Citronan sodný (váže iontový vápník)
  - Kyselina citronová (snížení pH krve)
  - Glukóza (zdroj energie pro erytrocyty)
  - Adenin (podpora syntézy ATP, ADP, AMP)
  - Guanozin
  - Fosforečnan
- pro 400 ml krve 100ml ACD, 21 dnů (první roztok)
- pro 450 ml krve 63 ml CPDA, 35 dnů

Stabilizace

- Přidání **resuspenzního roztoku** (glukoza, adenin, fosforečnan sodný, chlorid sodný, manitol)
- Stabilizace buněčných membrán, prevence hemolýzy in vitro = zachování životnosti erytrocytů při odstranění až 90% plazmy – manitol
- NaCl – udržuje přirozené osmotické napětí roztoku
    - SAG-M 100ml 35 – 42 dnů
    - ADSOL 100ml 42 dnů
- Náhradní roztoky pro trombocyty – PAS (platelet additive solutions)

Konzervace sníženou teplotou - erytrocyty

- Zpomalení metabolizmu erytrocytů = prodloužení doby uchování

  - Erytrocyt 110-120 dnů při 37°C v těle
  - Mimo lidský organismus při 37°C 1-2 dny

- Při **+2 až +6°C** lze uchovat 21-49 dnů
  (v závislosti na zpracování a konzervačním roztoku)

Konzervace sníženou teplotou - plazma

- Zachování aktivity labilních koagulačních faktorů (FVIII, V), přirozených inhibitorů koagulace
- Šokové zmražení na -30°C v jádře vaku do 1 hodiny
- Skladování při teplotě **-25°C a nižší až 36 měsíců**, -18 až -25°C zkrácení exspirace na 3 měsíce
- Rozmražení při teplotě +37°C (vodní lázeň +37°C, rozmrazovač)

Konzervace teplotou - trombocyty

- Zabránění aktivace trombocytů
- Teplota uchování **+20 až +24°C**
  - až 5 dnů v plazmě
  - až 7 dnů ve směsi plazmy a náhradního roztoku
- Agitace
- Náhradní roztoky

Kryokonzervace

- Uchovávání krevních buněk ve zmrazeném stavu (erytrocyty, trombocyty, kmenové buňky)
  - Tekutý dusík -196°C
  - Páry tekutého dusíku -150°C
  - Mrazicí zařízení -80 až -90°C
- Kryoprotektivní látky – zabrání krystalizaci vody
  - Glycerol, dimetylsulfoxid (DMSO), hydroxyetylškrob (HES), albumin

Zachování sterility

- Riziko bakteriální kontaminace minimalizováno odběrem do uzavřeného systému
- Venepunkce – možné místo kontaminace (30 ml vzorkovací váček)
- Provádí se kontroly dezinfekce místa venepunkce (stěry)

Možnosti zpracování odebrané krve

- Odebraná plná krev – separace, filtrace
- Odběr krevních složek - separační techniky (aferéza)
- Filtrace
- Promytí
- Kryoprecipitace
- Ozařování ionizujícím zářením
- Inaktivační techniky
- Rozdělení/ smíšení

Zpracování krve

- Odběr plné krve
  - Centrifugace
  - Separace – manuální, automatická
  - Filtrace – odstranění leukocytů
- Odběr krevních složek – separační techniky (aferézy)
  - Kontinuální metoda
  - Diskontinuální metoda

Odběr plné krve

- celý proces včetně odběru = uzavřený (sterilní) systém vzájemně propojených odběrových vaků

- při zpracování odebrané lidské krve nebo odběrem jejích složek vznikají **transfuzní přípravky (TP)**

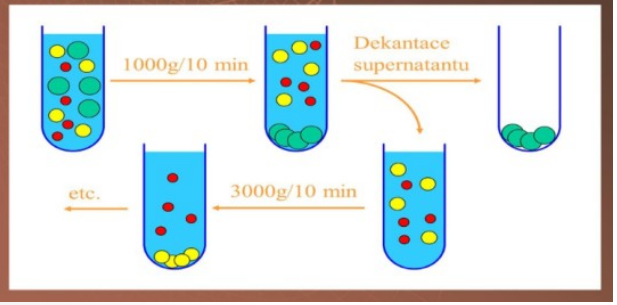
Odběr plné krve

- Separační techniky:
  - **Diferenciální centrifugace**
    - Sedimentace závislá na velikosti a koncentraci v krvi
    - Vliv viskozity okolí buněk, jejich flexibility a teploty (optimum +20°C)
    - Používají se speciální chlazené centrifugy

Separační techniky

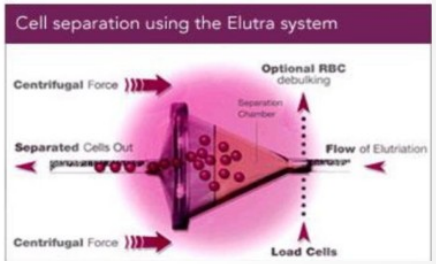
Diferenciální centrifugace

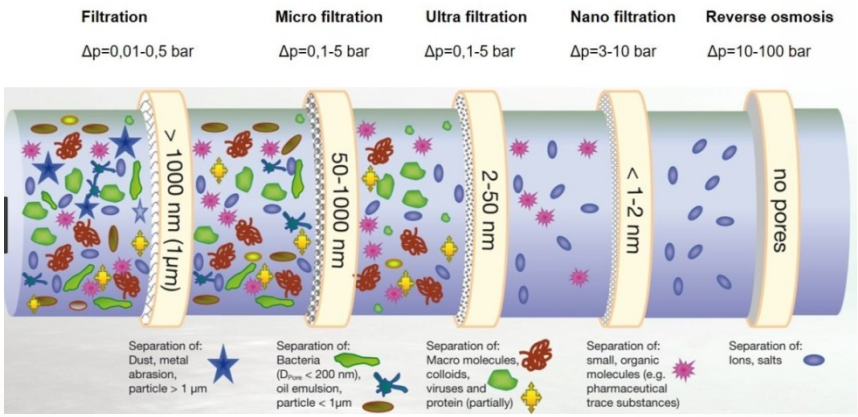
- opakovaná centrifugace se zvyšující se rychlostí otáček = gravitací



Centrifugační elutriace

- umožňuje pomocí speciálního zařízení rozdělit buňky podle rychlosti sedimentace, tj. nejen podle hustoty, ale i objemu.
- Tato metoda je však technicky mnohem složitější a vyžaduje zvláštní vybavení.
- Přístroj elutriátor

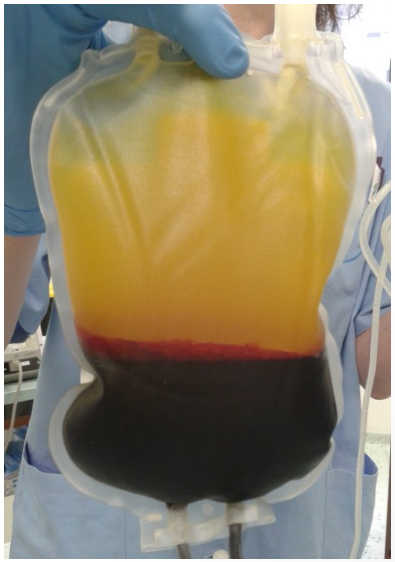




Odběr plné krve - centrifugace

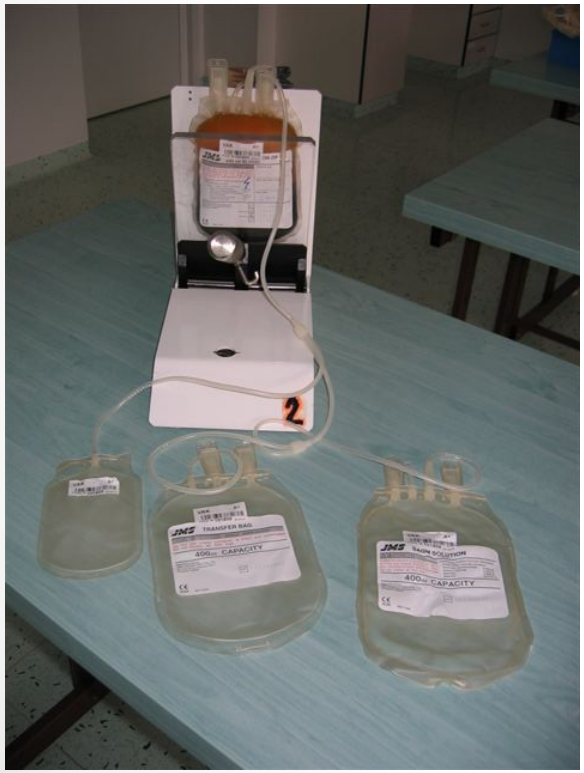
Odběr plné krve - separace

- Separace složek krve
  - oddělení jednotlivých složek a jejich přemístění do satelitních vaků
  - manuální nebo přístrojová



Odběr plné krve - separace

Manuální



Automatická

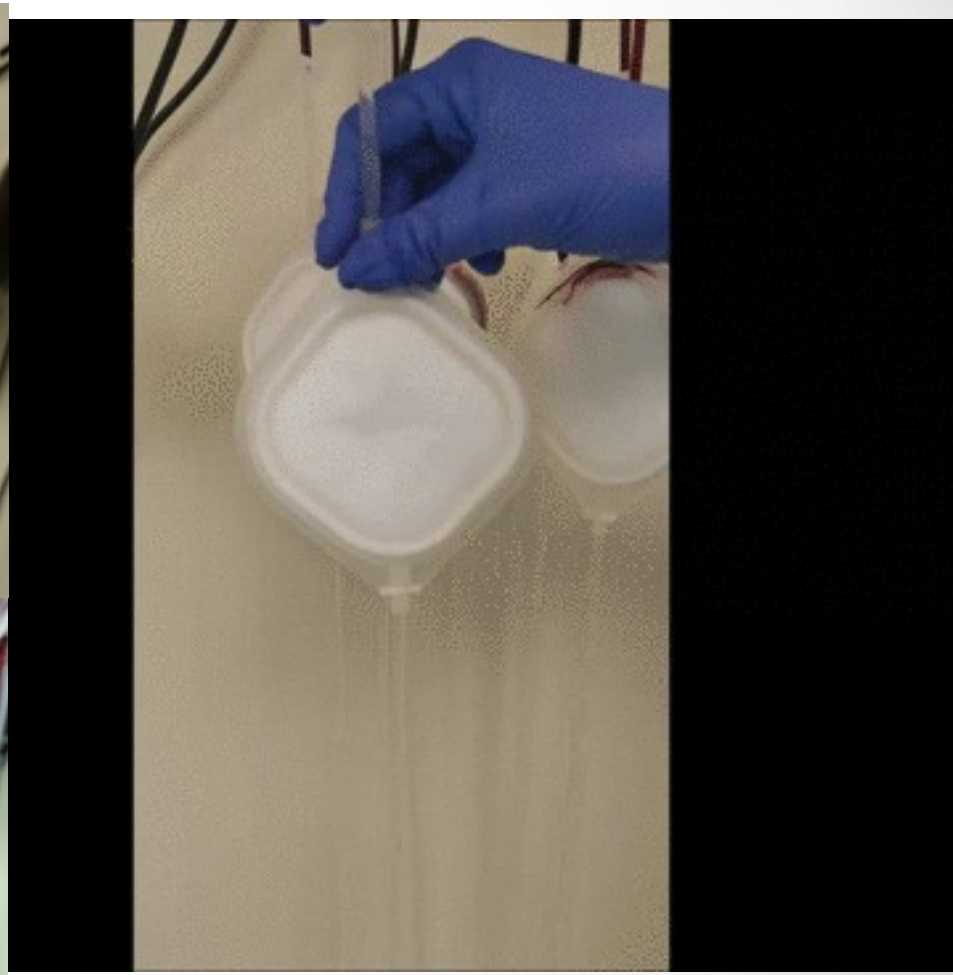
Automatický krevní lis

Manuální krevní lis

Odběr plné krve - filtrace

- Filtrace
  - In – line filtrace plné krve
    - před separací
  - In – line filtrace erytrocytů
    - pre-storage
    - post-storage
    - Bed-side u lůžka pacientů

Odběr plné krve - filtrace



Odběry krevních složek - aferézy

- Podle odebrané složky:
  - Plazmaferézy (separece plazmy)
  - Cytaferézy (odběr buněčných složek krve)
    - Trombocytů, granulocytů, erytrocytů, krvetvorných buněk
    - Trombocytaferézy
    - Erytrocytaferézy
- Jeden cyklus obsahuje odběr krve, její rozdělení dle typu přístroje a navrácení části odebrané krve + 0,9% NaCl
- Jednorázové odběrové soupravy
- Kontinuální x diskontinuální vstup

Odběry krevních složek - aferézy

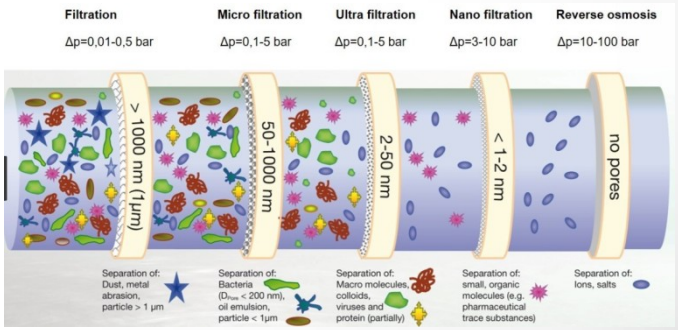
Filtrace

- Oddělení plazmy od erytrocytů
  - Membránová filtrace
- Odstranění leukocytů (= deleukotizace)
  leu = **méně než 1x10⁶/jednotku**

  - **Pre-storage** deleukotizace pomocí in-line deleukotizačních filtrů pro odebranou PK

  - **Post-storage** deleukotizace pomocí deleukotizačních filtrů pro vyrobené erytrocytové a trombocytové TP

    - laboratorní deleukotizace
    - bed side deleukotizace



Deleukotizace

= leukodeplece

Indikace:

- Opakované febrilní nehemolytické potransfuzní reakce
- Chronická léčba TP
- Před a po orgánových transplantacích
- Děti, těhotné ženy
- IUT

Promytí

- Odstranění bílkovin plazmy z TP (složky komplementu a protilátky) u erytrocytového a trombocytového TP
- 2-4 x promytí 0,9% NaCl (ery TP) nebo náhr. roztok pro trombocyty (trombo TP) s následnou centrifugací a odstraněním supernatantu
- sediment resuspendován v
  - konzervační roztok (SAGM) - erytrocytové TP
  - náhradní roztok pro trombocyty – trombocytové TP

Promytí

- Indikace:
  - Alergická reakce na plazmatické proteiny v TP
  - Prevence potransfuzní reakce u IgA deficitních pacientů

Kryoprecipitace

- Využití snížené rozpustnosti některých proteinů plazmy při nízké teplotě
- Po rozmražení a centrifugaci při +4°C oddělení sedimentu (kryoprecipitát) a supernatantu (K plazma)
- Kryoprecipitát obsahuje
  - Fibrinogen (FI)
  - Proakcelerin (FV)
  - von Wilebrandův faktor (vWF)
  - Faktor stabilizující fibrin (FXIII A)

Ozařování ionizujícím zářením

- Použití ionizujícího záření (paprsky **γ**) – odstranění rizika na transfuzi vázané reakce štěpu proti hostiteli (TA – GVHD)
- Dávka **<50 Gray a >25 Gray**
- Čas expozice závisí na síle zdroje (stárnutí)
- Ničí viabilitu T lymfocytů
- U ery TP vliv na buněčnou membránu – zkrácení doby exspirace na 28 dní ode dne odběru
  - pro pediatrické a neonatologické použití podání do 24 hodin od ozáření přípravku
  - Doporučováno ozařovat erytrocyty do 14 dnů od odběru

Ozařování ionizujícím zářením

Indikace:

- Transplantace orgánové a krvetvorných buněk
- IUT
- Transfuze novorozenců
- TP od pokrevních příbuzných
- Celotělové ozáření

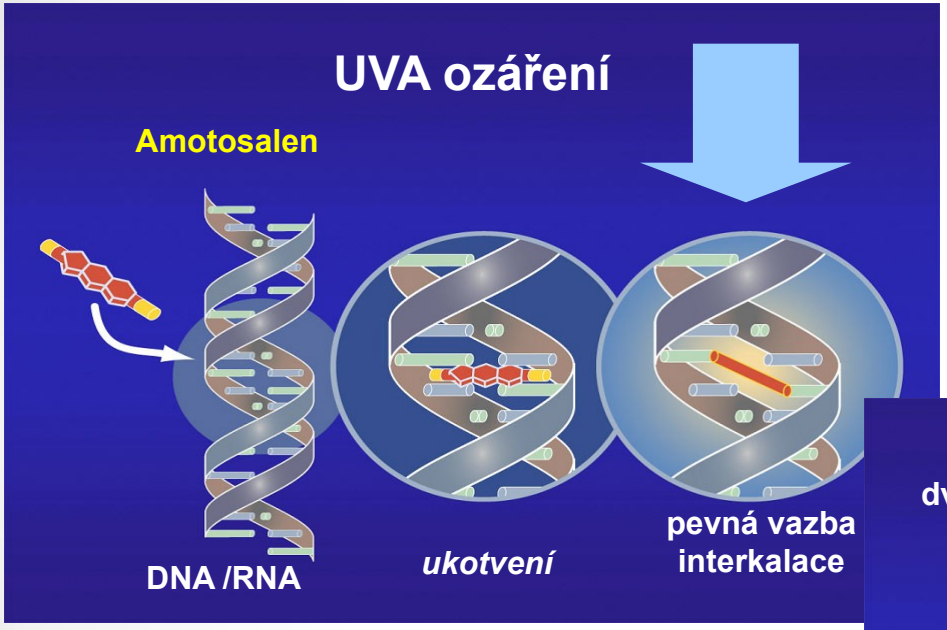
Inaktivační techniky

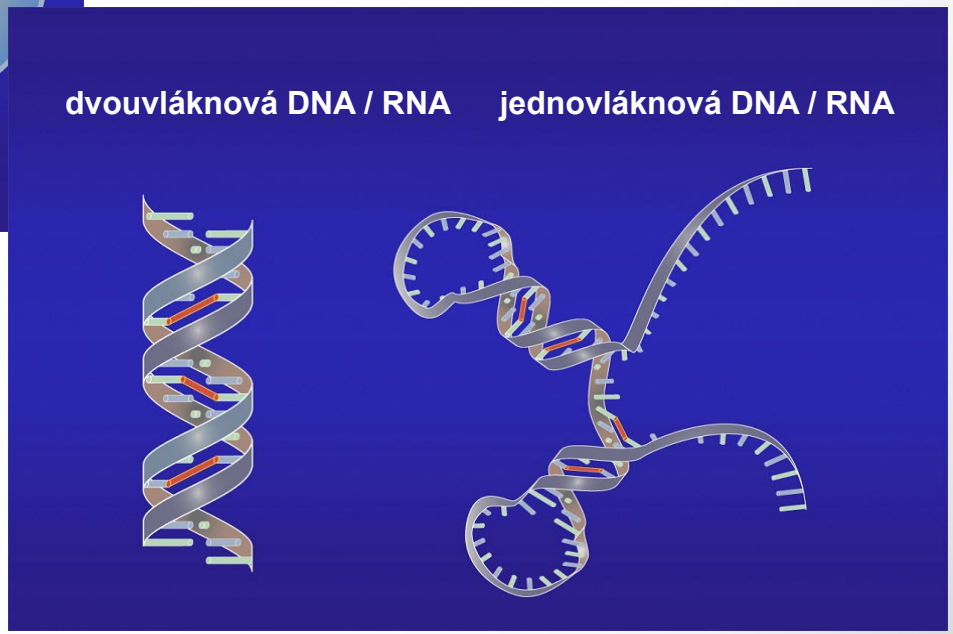
Chemické látky (tělu cizí i vlastní) určené k **inaktivaci patogenů v TP**

- Účinnost (zachování účinnosti léčiva)
- Bezpečnost (bez vedlejších účinků)
- Jednoduchost (snadno proveditelné)
- Efektivnost (v porovnání k vynaloženým nákladům)

  - SD metodiky (solvent-detergent)
  - Fotodynamické metodiky
  - Metodiky modifikace bází NK (psoraleny, riboflavin, metylenová modř)

Inaktivační techniky





Prevence TA-GvHD reakce

- Patogenní inaktivace nahrazuje ozařování TP
- Inaktivační techniky znemožňují replikaci NK a následnou inaktivaci nežádoucích patogenů, nežádoucích buněk kontaminujících TP (WBC – lymfocyty)

Patogenní inaktivace Mirasol

- Riboflavin a UV záření

Rozdělení / smíšení

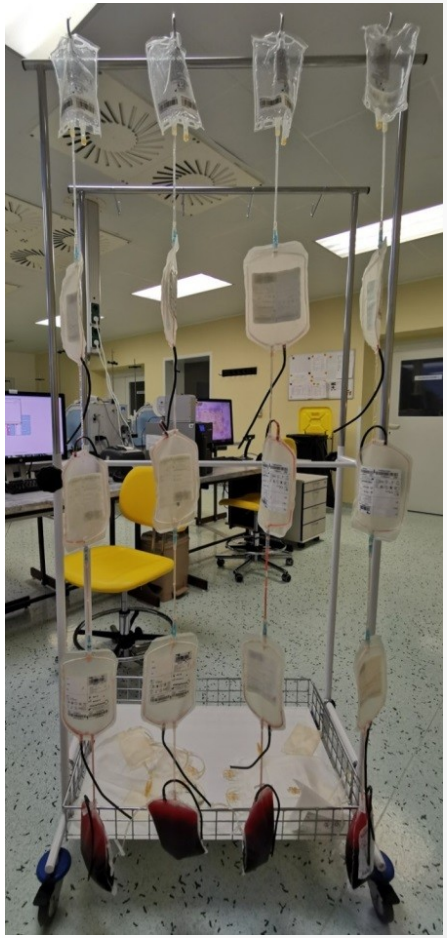
Rozdělení

- Erytrocytové TP – příprava pediatrické jednotky
- Plazma – rozdělení na části obsahující 1TU (plazmaferetický odběr) nebo příprava pediatrické jednotky

Smíšení

- Trombocytové TP – příprava TD
  - smíšením trombocytů z BC (1TU)
  - výroba směsných trombocytů z BC (4-6 BC)
  - Výroba směsných granulocytů z BC (až 10 BC)

Rozdělení / smíšení



Princip značení TP

- Vychází z Metodického pokynu MZ Standard značení TP
- Jednoznačné a neopakovatelné
- Dohledání všech operací a činností v procesu zpracování daného odběru

Caaaabb cccccc dd

- **Caaaa** identifikační kód ZTS (C2010)
- **bb** označení roku (19 = 2019)
- **cccccc** číslo odběru v daném roce (číselné řady dle typu odběru)
- **dd** číslo porce TP – jednotlivé TP vyrobené z daného odběru

C201019 001982.20

Princip značení TP

Skladování TP

- Erytrocytové TP
  - **+2 až +6°C**
- Trombocytové TP
  - **+20 až +24°C**
  - **Agitace (třepání)**
- Plazma
  - **-25°C a nižší**

SVP = správná výrobní praxe

- Činnost provádí vyškolený a kvalifikovaný personál
- používané výrobní a skladovací prostory odpovídají svému účelu
- všechny výrobní postupy jsou předem schválené a jasně definované
- používané přístroje, materiály a diagnostika jsou schválené a funkčně ověřené
- všechna laboratorní činnost je dokumentovaná
- výrobní záznamy a záznamy o distribuci umožňují zpětné dohledání
- postupy a produkty podléhají pravidelné vnitřní i vnější kontrole.

Transfuzní přípravky (TP)

- Individuálně vyráběné léčivé přípravky (IVLP)
- Mají funkci substituční
- Vyráběné v ZTS z krve jednoho dárce

Jednotky

Transfuzní jednotka (T.U.)

- představuje množství trasnfuzního přípravku vyrobeného z jednoho odběru plné krve tj. z 450 – 470 ml plné krve odebrané do antikoagulačního roztoku

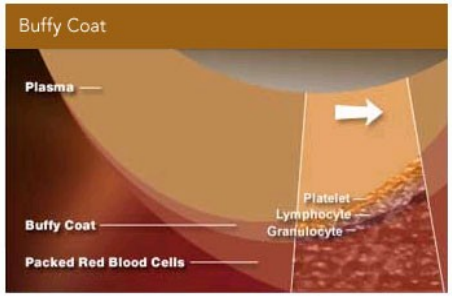
Terapeutická dávka (T.D.)

- odpovídá terapeutickému množství krevní složky s očekávaným účinkem pro pacienta

Plná krev

- Využití pro transfuzi zcela vyjímečně
- Vyšetření = každý odběr
  - HIV Ab/Ag, anti HCV, HBsAg, syfilis
  - AB0, Rh(D), anti-erytrocytární protilátky
  - Další infekce dle epidemiologické situace (HAV, WNV,…)
- Objem 450ml +/-10% bez antikoagulačního roztoku
- Hematologické parametry
  - hemoglobin (Hb) min **45g**/ jednotku
  - hematokrit (Htk) min **0,30**
- Hemolýza na konci doby uchování
- Sterilita

Plná krev



Buffy coat (BC)

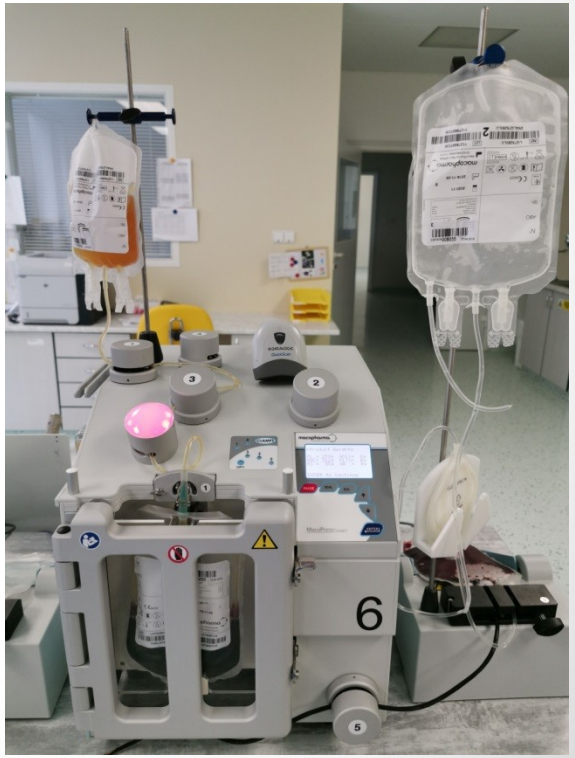
Trombocytový TP
Granulocytový TP

plazma

Erytrocytový TP

Zpracování plné krve

- diferenciální centrifugace
- oddělení jednotlivých složek krve a jejich přemístění do satelitních vaků
- smísení erytrocytů s konzervačním roztokem
- zpracování buffy coatu na trombocytový TP



Zpracování a výroba TP

- Uložení ve skladu
- Vyšetření
  - HIV, HCV, HBV, syfilis
  - KS, anti-ery Ab
  - kontrola kvality
- Uvolnění pro klinické použití (plazma po opakovaném vyšetření dárce krve)

Erytrocytové TP

- Erytrocyty z jednoho odběru plné krve, připravené při zpracování nebo přístrojovým odběrem (erytrocytaferézou)
- K mase erytrocytů je přidán resuspenzní roztok

Erytrocytové TP

- E erytrocyty
- ER erytrocyty resuspendované
- **EBR erytrocyty resuspendované bez buffy coatu**
- EP erytrocyty promyté
- **ERD erytrocyty resuspendované deleukotizované**
- ERA erytrocyty z aferézy
- EARD erytrocyty z aferézy deleukotizované

Erytrocytové TP – EBR / ERD

Indikace – úprava anémie, náhrada krevní ztráty

- Vyšetření (infekce HIV, HBV, HCV, syfilis, AB0, RhD, anti-erytrocytární protilátky)
- Objem 250 ml – 325 ml
- Hematologické parametry
  - hemoglobin (Hb) min 43g/ jednotku (EBR), min 40g/ jednotku (ERD)
  - leukocyty méně než 1,2 x 10^9 / jednotku (EBR)
  - leukocyty méně než 1 x 10^6 / jednotku (ERD)
  - hemolýza na konci doby uchování <0,8% ery
- Sterilita

Erytrocytové TP

- **Skladování**: v lednici při teplotě **+4°C ± 2°C** po dobu maximálně 42 dní ode dne odběru. Doba exspirace je uvedena na štítku transfuzního přípravku.
- **Transport**: Validovaná přeprava v předem vychlazených uzavřených termoboxech s chladicí vložkou, aby byla zajištěna teplota + 4°C ± 2°C. Nesmí být překročeno rozmezí +1°C až +10°C.
- **Upozornění**: Podání přípravku je vázáno na předtransfuzní vyšetření v laboratoři, která vyšetřuje zkoušky kompatibility!

Trombocytové TP

- Jsou koncentráty krevních destiček
- Připravují se zpracováním odběru plné krve nebo přístrojovým odběrem (trombocytaferézou)

Trombocytové TP

- TB trombocyty z buffy coatu
- TA trombocyty z aferézy
- TAD trombocyty z aferézy deleukotizované
- **TADR trombocyty z aferézy deleukotizované (v náhradním roztoku)**
- TADI trombocyty patogen-inaktivované
- TBS trombocyty z buffy coatu směsné
- TBSD trombocyty u buffy coatu směsné deleukotizované
- **TBSDR trombocyty z buffy coatu směsné deleukotizované (v náhradním roztoku)**

Trombocyty v náhradním roztoku

- Terapeutická dávka pro dospělého pacienta je získána aferézou nebo zpracováním odběrů plné krve od 4 dárců krve, ze které jsou odstraněny leukocyty
- Trombocyty v terapeuticky účinné formě resuspendované v plazmě a náhradním roztoku pro trombocyty v poměru 30%:70%, část leukocytů
- Náhradní roztok pro trombocyty

Trombocytové TP

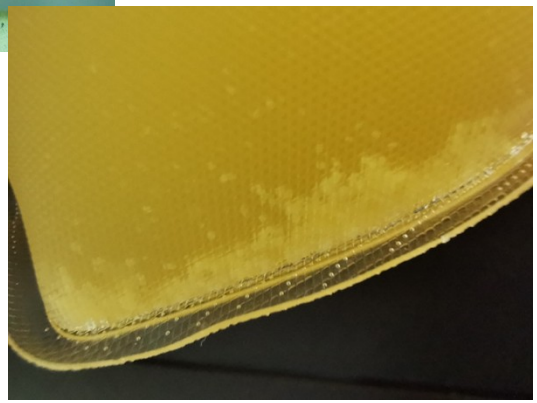
- **Indikace** - trombocytopenie či trombocytopatie s klinicky významným krvácením nebo s podezřením na něj. Substituce trombocytů před operačními výkony u trombocytopenie či trombocytopatie.
- Vyšetření (infekce HIV, HBV, HCV, syfilis, AB0, RhD, anti-erytrocytární protilátky)
- Objem 150 ml – 200 ml, ale i vyšší
- Obsah trombocytů **více než 2 x 10^{11}/ jednotku**
- Maximální koncentrace **1,5 x 10^{9}/ml**
- Obsah residuálních leukocytů <1 x 10^{6}/ jednotku
- pH >6,4
- sterilita

Trombocytové TP

- **Skladování**: na validovaných třepačkách (agitátorech) v nepřetržitém režimu agitace při teplotě od **+ 20°C do +24°C** nejdéle po dobu 5 dní. Teplota je kontinuálně monitorována.

- **Transport**: v termoboxech, temperovaných na teplotu od +20°C do + 24°C. Přípravek se zabalí do ochranné plastové folie. Transportní teplota se validuje a pohybuje se od +20°C do + 24°C.

Trombocytové TP



TADR – pediatrická dávka

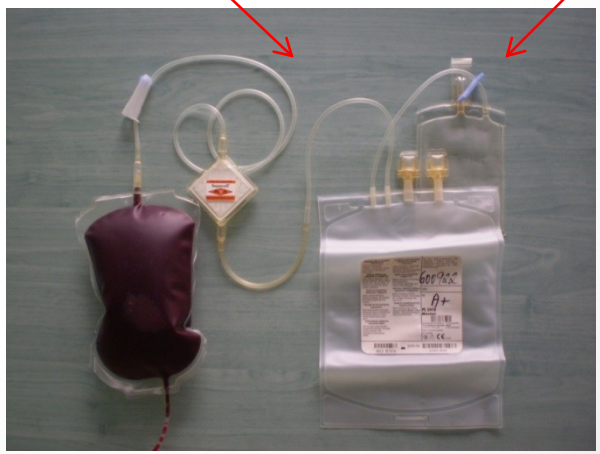
- Terapeutická dávka pro pediatrického pacienta je připravena rozdělením trombocytů získaných aferézou (1/2), ze kterých jsou odstraněny leukocyty.

Specifikace:

- Objem cca 90 ml – 110 ml
- Maximální koncentrace **1,5 x 10^9/ml**
- Obsah trombocytů
  více než **1 x 10^{11}/ jednotku**
- Obsah residuálních leukocytů
  <1 x 10^6/ jednotku
- pH >6,4
- Sterilita

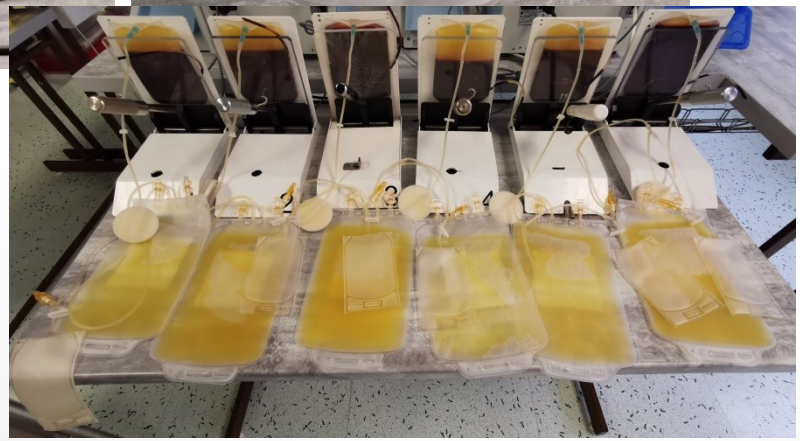
Výroba TBsDR

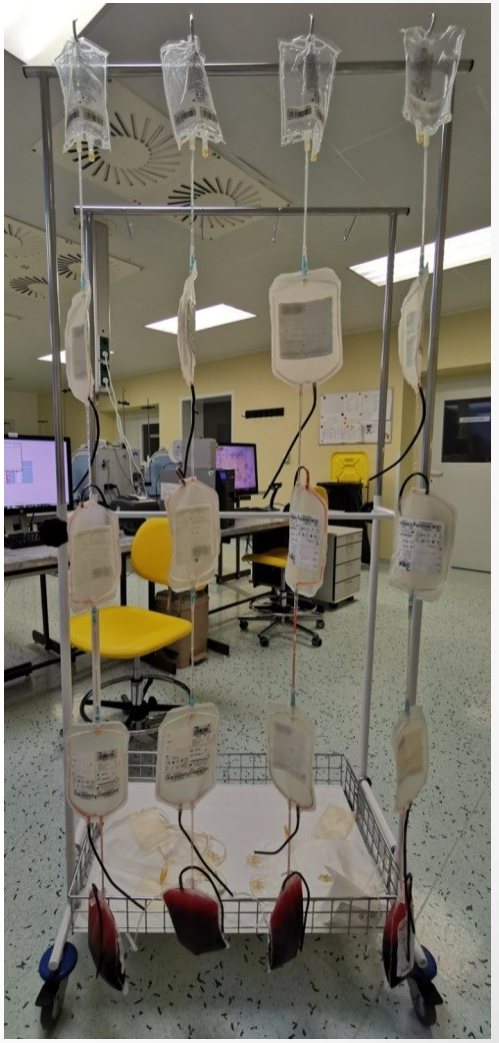
Metoda „chobotnice“



Výroba TBsDR

Metoda „vláček“





Plazma

- připravuje se zpracováním odběru plné krve nebo přístrojovým odběrem (plazmaferézou)
- používá se k doplnění faktorů koagulace při krvácení nebo jako surovina při výrobě léků

Plazmové TP

- P, PA plazma pro klinické použití
- PAI plazma patogen-inaktivovaná

- KRYO kryoprotein
- KRYOI kryoprotein patogen-inaktivovaný

Plazmové TP

Indikace – krvácení nebo kombinovaná koagulační porucha pokud je kontraindikováno podání koncentrátů izolovaných koagulačních faktorů

- mikroangiopatické trombocytopenii (trombotická trombocytopenická purpura, hemolyticko-uremický syndrom, HELP syndrom a další podobné stavy) a to přímo, nebo jako substituce při výměnné plazmaferéze

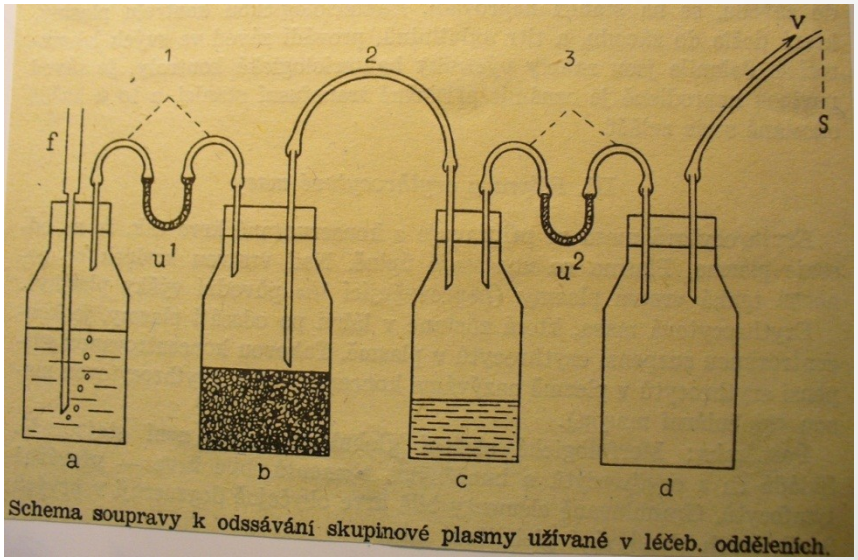
- hemolytické chorobě novorozence a to pro resuspenzi erytrocytů v rámci výměnné transfuze

Plazmové TP

- Vyšetření (infekce HIV, HBV, HCV, syfilis, AB0, RhD, anti-erytrocytární protilátky)
- Objem stanovený objem +/- 10% (204-276 ml)
- Faktor VIIIc **> 70%** hodnoty čerstvé odebrané jednotky plazmy
- Obsah bílkovin minimálně **50 g/ L**
- Residuální buňky:
  - ery méně než **6 x 10^9/L**,
  - leuko méně než **0,1 x 10^9/L**,
  - trombo méně než **50 x 10^9/L**
- sterilita

Výroba plazmy

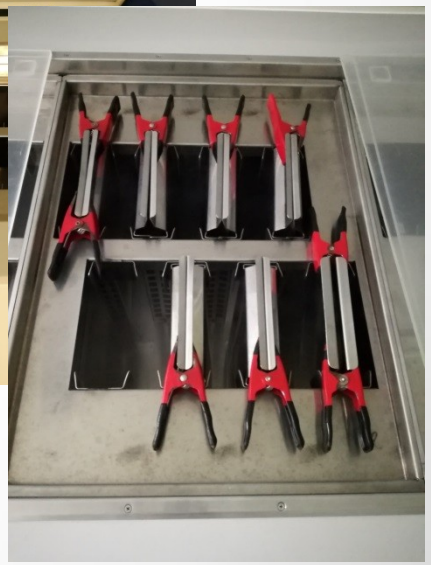
- Zpracování plazmy do roku 1992



Schema soupravy k odssávání skupinové plasmy užívané v léčeb. odděleních.

Plazma pro klinické použití

- šokové zmražení plazmy při teplotě od -65 do -80°C za účelem zachování termolabilních koagulačních faktorů plazmy (teplota v jádru vaku **-30°C do 1 hodiny**)



Plazma pro klinické použití

- uložení do skladu karanténní plazmy na definovanou dobu do dalšího odběru dárce - bezpečnostní opatření

Karanténa plazmy od 1994

- Opakované testování dárce krve po uplynutí definovaného časového intervalu s negativním výsledkem testu na přítomnost **HBV, HIV a HCV infekce**
- Interval je alespoň **6 měsíců**
  - interval, kdy, v případě nakažení, dojde ke změně výsledku vyšetření z **neg** na **poz**
  - interval karantény může být zkrácen v případě testování dárce krve metodami **NAT** (nucleic acid testing) – na **4 měsíce**
- uvolnění plazmy z karantény pro klinické použití „plazma pro klinické použití“

Plazmové TP

Skladování:

- 36 měsíců při teplotě **méně než –25°C**
- 3 měsíce při –18°C až –25°C.

Teplota se kontinuálně monitoruje.

Transport se zajišťuje ve vychlazeném uzavřeném termoboxu se suchým ledem v ochranném papírovém obalu. Transportní teplota se validuje.

Autologní TP

- APK plná krev pro autotransfuzi
- AE erytrocyty pro autotransfuzi
- AER erytrocyty resuspendované pro autotransfuzi
- AEBR erytrocyty resuspendované bez buffy coatu pro autotransfuzi

Výdej TP

- Na základě žádanky (**léčivo! = podpis lékař**)
- Na žádost odběratele TP poskytuje ZTS při výdeji souhrn základních údajů o TP podle jeho specifikace (**příbalová informace**)
- Provádí pracovník pověřený výdejem (pověření k výdeji TP a KD uděluje písemně vedoucí ZTS – primář)

Výdej TP

- Kontrola značení, integrita vaku, doby exspirace
- Platnost předtransfuzního vyšetření u erytrocytového TP
- **Vizuální kontrola** kvality TP
  - Erytrocytové TP – hemolýza
  - Trombocytové TP – víření, zabarvení
  - Plazma – zabarvení, údaje o karanténě
- Výdejový doklad – podklad pro EO nemocnice

ZTS vydává

- TP **vlastní výroby**, propouštěné pro léčebné použití po označení štítkem (alogenní a autologní)
- TP **dodané jiným ZTS** (alogenní a autologní)
- **KD** dodané distributorem na základě požadavku vydávajícího ZTS

Děkuji za pozornost