

Biomedische topkwaliteit voor veiligere transfusies van trombocytenconcentraten

Auteur M.J. Dijkstra-Tiekstra

Trefwoorden cryopreservatie, kwaliteitscontrole, leukocyten, transfusie, trombocyten

Samenvatting

Op 17 november 2004 promoveerde drs. M.J. Dijkstra-Tiekstra aan de Vrije Universiteit in Amsterdam op het promotieonderzoek getiteld 'Biomedical excellence for safer transfusion of platelet concentrates: BEST of PC's' onder begeleiding van de promotor prof. dr. P.C. Huijgens en

copromotoren dr. H.W. Reesink en dr. R.N.I. Pietersz. Hieronder volgt een samenvatting van de belangrijkste bevindingen en conclusies uit het proefschrift.

(*Ned Tijdschr Hematol* 2005;2:195-198)

Inleiding

Bloed dat op de bloedbanken gedoneerd wordt, is uiteindelijk bestemd voor de patiënt. Alle processen die hierbij doorlopen moeten worden, vinden plaats binnen de zogenaamde transfusieketen. Het hier beschreven onderzoek is met name gericht op trombocytenconcentraten. Voor het maken van een trombocytenconcentraat wordt bloed van vijf donoren gebruikt. Na centrifugeren wordt elke eenheid bloed gescheiden in een eenheid erythrocyten, een eenheid plasma en een 'buffy coat' die het merendeel van het totale aantal trombocyten (>90%) en het totale aantal leukocyten (ongeveer 70%) bevat. Vervolgens worden vijf 'buffy coats' en een eenheid plasma samengevoegd en dit wordt zacht gecentrifugeerd. De trombocyten die in het plasma blijven zweven worden met een pers en via een filter overgebracht in een bewaarzak. Het filter verwijdert de leukocyten om leukocytentransfusiereacties, zoals koortsreacties, allo-immunisatie en refractoriteit, bij de patiënt te voorkomen.

De hier beschreven studies zijn gericht op kwaliteitscontrole, opslag en transfusie van trombocytenconcentraten.

Resultaten

Kwaliteitscontrole

Om zowel het product als het proces te controleren, vindt er een kwaliteitscontrole plaats. De trombocy-

tenconcentraten worden getest op onder andere volume (eis: 150-400 ml), $\text{pH}_{37^\circ\text{C}}$ in verlopen concentraten (eis: 6,8-7,4), trombocyten-, leukocyten- en erythrocytenaantallen (respectievelijke eisen: $>250 \times 10^9$, $<1 \times 10^6$ en $<5 \times 10^9$ per product), en bacteriële contaminatie (eis: negatief bij uitgifte).¹

De trombocytenactivering kan getest worden met behulp van de 'swirl'- en de CD62p (p-selectine)-test. Met de 'swirl'-test wordt de beweging van trombocyten gemeten. De beweging is te zien door het concentraat tegen het licht te houden en is goed (score 3) wanneer de trombocyten mooi schijfvormig zijn. De 'swirl' wordt steeds lager bij activering van de trombocyten, omdat de trombocyten bolvormig worden en dendrieten ontwikkelen.

CD62p bevindt zich in de α -granula van het trombocyt. Bij trombocytenactivering fuseren de α -granula met de buitenmembraan, waardoor CD62p aan de buitenkant van het trombocyt komt en met behulp van flow-cytometrie gemeten kan worden. De activering van trombocyten neemt toe wanneer de concentraten meer dan een week worden bewaard (zie *Figuur 1*).²

Twee hoofdstukken in het proefschrift zijn gewijd aan het tellen van resterende leukocyten met behulp van flow-cytometrie.^{3,4} Deze methode heeft de microscopische Nageotte-methode vervangen. Er zijn twee commerciële flow-cytometriemethoden (LeucoCOUNT™ van BD-Biosciences en Leuko-Sure™ van Beckman Coulter) en een goedkope

in-huismethode getest. Alleen met de commerciële methoden was het mogelijk om lage aantallen leukocyten (rond 1×10^6 /product) nauwkeurig en op de juiste wijze te tellen.³ Enige tijd nadat de methoden geïmplementeerd waren bij de bloedbanken, vond een evaluatie van deze testen plaats voor het tellen van leukocyten in plasma, erythrocyten- en trombocytenconcentraten. Het bleek echter dat geen van de negen participerende locaties voor alle drie de producten aan de eisen voor juistheid en nauwkeurigheid voldeden. Wel kon worden aangetoond dat de methoden met het goed/fout-criterium te gebruiken zijn, dat wil zeggen dat met grote zekerheid gezegd kan worden of een product meer of minder dan 1×10^6 leukocyten bevat.⁴

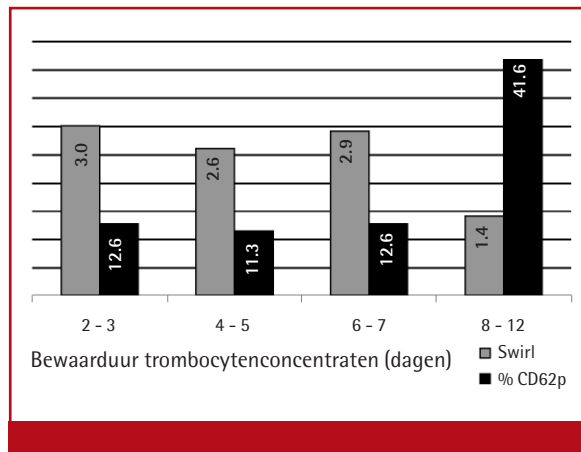
In de twee daaropvolgende studies is gebruik gemaakt van PCR voor de bepaling van het resterende aantal leukocyten, aangezien leukocyten de enige cellen in het bloed zijn met DNA.^{5,6} Het bleek dat in plasma ook een aanzienlijke, maar variabele, hoeveelheid celvrij-DNA voorkomt (gemiddeld $0,5 \times 10^6$ leukocytenequivalenten/trombocytenconcentraat). Voor de bepaling van de resterende hoeveelheden leukocyten moet daarom gecorrigeerd worden.⁵ Daarnaast werd aangetoond dat bij het bewerken en het bewaren van zowel bloed als trombocytenconcentraten de leukocyten fragmenteren en dat bij filtreren deze fragmenten niet worden weggevangen.⁶ Ook hier dient rekening mee gehouden te worden bij de bepaling van de hoeveelheid intacte leukocyten. Bovendien is het mogelijk dat deze fragmenten kunnen leiden tot allo-immunisatie bij de patiënt. Dit moet echter nog verder worden onderzocht.

Opslag

De trombocytenconcentraten worden standaard, gedurende maximaal 7 dagen, schuddend bij kamertemperatuur bewaard in een temperatuurgereguleerde schudkast. In combinatie met de speciale bewaarzak is op deze manier de gasuitwisseling voor de trombocyten optimaal.

Een andere manier van opslag is cryopreservatie. Met behulp van een cryoprotectant kunnen de concentraten gedurende enkele jaren bewaard worden in de dampfase van vloeibare stikstof (-150°C).

In een studie over dit onderwerp is onderzocht of de cryoprotectant dimethylsulfoxide (DMSO) verdund kan worden in een synthetische bewaarmiddel, zodat het daarna op een steriele manier kan worden toegevoegd aan de in te vriezen trombocyten. Het bleek dat om de gecryopreserveerde concentraten 24 uur na ontdooien te kunnen bewaren met behoud



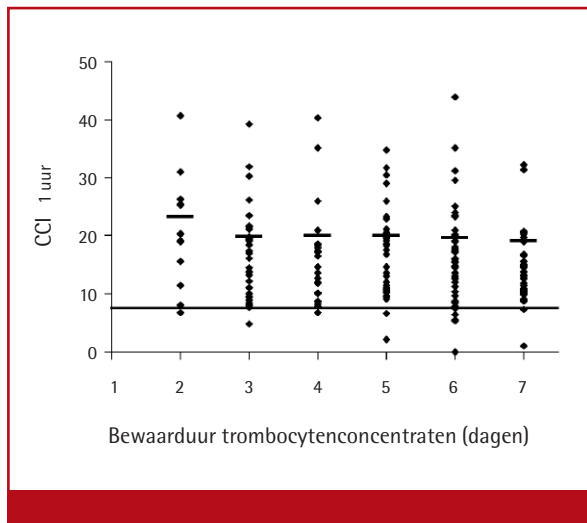
Figuur 1. De 'swirl'-waarde en het percentage CD62p-expressie in trombocytenconcentraten bij verschillende bewaarduren van de concentraten. De weergegeven waarden zijn gemiddelden met $n=12$, 17 , 13 en 13 voor respectievelijk de bewaarduren 2-3, 4-5, 6-7 en 8-12 dagen.

van kwaliteit er minimaal 50% plasma in het in te vriezen concentraat aanwezig moet zijn. Na verdunning in een synthetische bewaarmiddel kan DMSO 1:1 (v/v) worden toegevoegd aan trombocyten in het plasma.⁷

Transfusie

Transfusie van trombocytenconcentraten gebeurt veelal bij hemato-oncologische patiënten die, vanwege hun ziekte en behandeling, een zeer laag aantal trombocyten hebben ($<20 \times 10^9/l$; normaal $180-350 \times 10^9/l$). Om bloedingen te voorkomen krijgen deze patiënten regelmatig een trombocytentransfusie. In een studie zijn bij 55 patiënten (195 transfusies) de trombocytenopbrengsten, oftewel 'corrected count increment' (CCI: het verschil in trombocytenaantal bij de patiënt voor en na de transfusie gecorrigeerd voor het lichaamsoppervlak van de patiënt en het aantal getransfundeerde trombocyten), na transfusie bestudeerd en is er een onderscheid gemaakt tussen de concentraten met verschillende bewaarduren.⁸ Het percentage geslaagde transfusies (transfusies resulterende in een $\text{CCI} \geq 7,5$) verschilde niet tussen de concentraten met verschillende bewaarduren. Wel bleek dat de gemiddelde opbrengst van concentraten die twee dagen oud waren iets hoger was dan die van concentraten die zeven dagen oud waren. Tussen de overige bewaarduren werd er geen verschil gevonden (zie *Figuur 2* op pagina 197).⁸

Naar aanleiding van deze studie werd besloten om de bewaarduur van de concentraten te verlengen van maximaal 5 naar maximaal 7 dagen. Deze verlen-



Figuur 2. De 'correct count increment' (CCI; trombocytenopbrengsten), gemeten 1 uur na transfusie bij niet-refractaire hemato-oncologische patiënten met een pretransfusie trombocytenaantal van $<20 \times 10^9/l$, is uitgezet tegen de verschillende bewaarduren van trombocytenconcentraten. De ruitjes tonen de individuele trombocytenopbrengsten van de patiënt. De horizontale balkjes zijn de gemiddelde waarden, gecorrigeerd voor het aantal transfusies per patiënt (bepaald middels multi-levelanalyse; MLwiN), van de betreffende bewaarduur van het trombocytenconcentraat. De lijn bij CCI=7,5 is de ondergrens voor een geslaagde transfusie.

ging is een enorme verbetering voor de logistiek rond de bereiding van trombocytenconcentraten, met name bij zon- en feestdagen. Bovendien is het percentage trombocytenconcentraten waarvan de houdbaarheid verloopt hierdoor een stuk lager. Omdat de trombocyten die 6 en 7 dagen oud zijn als het ware nieuwe producten zijn, wordt in een post-surveillanceonderzoek de trombocytenopbrengsten bij meerdere ziekenhuizen nog gemonitord.

In een pilotstudie is onderzoek gedaan naar de correlatie tussen CD62p (trombocytenactivering) in het concentraat en de hoeveelheid bloedverlies (gemeten aan de hoeveelheid borstdrainagevloeistof) in 'coronary artery bypass graft' (CABG)-patiënten na transfusie (n=21). Deze patiënten hebben, omdat ze aan de hart-longmachine hebben gelegen en/of aspirine hebben gebruikt, te weinig effectieve trombocyten om de bloeding van de operatie te stoppen en ze krijgen daarom een trombocytentransfusie. Er werd echter geen correlatie ($r^2=0,03$) gevonden tussen CD62p-expressie in de concentraten en de hoeveelheid bloedverlies bij de patiënt. Waarschijnlijk komt dit doordat de getransfundeerde trombocytenconcentraten

een dusdanig goede in-vitro kwaliteit hadden, waardoor er slechts weinig variatie in CD62p-expressie werd gevonden. Het bloedverlies van de patiënt tot 12 uur na CABG en trombocytentransfusie varieerde van 150 tot 1.310 ml (gemiddeld 542 ml).²

Conclusie

Bij de eerste transfusies (19^e eeuw) werd bloed dat van de donor was afgenomen rechtstreeks getransfundeerd bij de patiënt. De transfusieketen is inmiddels behoorlijk uitgebreid met onder andere de donatie, de scheiding van de verschillende bloedcomponenten, de leukocytenverwijdering, de kwaliteitscontroletoetsen, opslag, transfusies, et cetera. Alle processen worden voortdurend geoptimaliseerd, zodat een steeds betere biomedische topkwaliteit voor veiligere transfusies van trombocytenconcentraten wordt bereikt.

In de hier beschreven studies betreft dit met name de invoering van de flow-cytometriebepaling voor het tellen van resterende aantallen leukocyten als kwaliteitscontroletoets. Verder is gebleken dat trombocytenconcentraten trombocytenfragmenten bevatten die mogelijk ook allo-immunisatie kunnen veroorzaken. Dit moet echter nog verder onderzocht worden.

Uit het onderzoek naar cryopreservatie van trombocyten is gebleken dat het mogelijk is DMSO te verdunnen in een synthetische vloeistof in plaats van plasma, voordat het aan de trombocyten wordt toegevoegd. De producten houden nog 24 uur na ontdooien een goede kwaliteit. De trombocytenopbrengst na de transfusie van regulier bewaarde trombocytenconcentraten (20-24°C) blijft ook voor de langer bewaarde trombocytenconcentraten goed. Hierdoor kan de bewaarduur van trombocytenconcentraten nu verlengd worden van maximaal 5 naar maximaal 7 dagen.

Referenties

1. Pietersz RN, Van der Poel CL, L'Herminez PC, De Wit HJ. Richtlijnen bloedproducten. RL 04.02.01/03. Amsterdam: Stichting Sanquin Bloedvoorziening.
2. Dijkstra-Tiekstra MJ, Pietersz RN, Huijgens PC. Correlation between the extent of platelet activation in platelet concentrates and in vitro and in vivo parameters. *Vox Sang* 2004;87:257-63.
3. Dijkstra-Tiekstra MJ, Schrijver JG, Van der Meer PF, Laport RF, Gratama JW, Levering WH, et al. Crossover study of three methods for low-level white blood cell counting on two types of flow cytometer. *Cytometry B Clin Cytom* 2003;54:39-45.

Aanwijzingen voor de praktijk

1. Resterende leukocyten kunnen op dit moment het beste bepaald worden met een flow-cytometrische test.
2. Trombocytenconcentraten bevatten naast intacte leukocyten ook leukocytenfragmenten. Mogelijk moet hier rekening mee gehouden worden in verband met allo-immunisatie. Dit behoeft echter nog verder onderzoek.
3. Gecryopreserveerde trombocytenconcentraten met DMSO in een synthetische bewaarvloeistof kunnen tot 24 uur na ontdooien bewaard worden met behoud van kwaliteit.
4. Trombocytenconcentraten zijn zeven dagen te bewaren, waarbij de trombocytenopbrengst na transfusie goed blijft.

4. Dijkstra-Tiekstra MJ, Van der Meer PF, Pietersz RN, De Wildt-Eggen J. Multicenter evaluation of two flow cytometric methods for counting low levels of white blood cells. *Transfusion* 2004;44:1319-24.

5. Dijkstra-Tiekstra MJ, Pietersz RN, Reesink HW, Van der Schoot CE. Influence of cell-free DNA in plasma on real-time polymerase chain reaction for determination of residual leukocytes in platelet concentrates. *Vox Sang* 2004;86:130-5.

6. Dijkstra-Tiekstra MJ, Van der Schoot CE, Pietersz RN, Huijgens PC, Van der Meer PF, Reesink HW. Development of white blood cell fragments, during the preparation and storage of platelet concentrates, as measured by using real-time polymerase chain reaction. *Vox Sang* 2004;87:250-6.

7. Dijkstra-Tiekstra MJ, De Korte D, Pietersz RN, Reesink HW, Van der Meer PF, Verhoeven AJ. Comparison of various dimethylsulphoxide-containing solutions for cryopreservation of leucoreduced platelet concentrates. *Vox Sang* 2003;85:276-82.

8. Dijkstra-Tiekstra MJ, Pietersz RN, Hendriks EC, Reesink HW, Huijgens PC. In vivo PLT increments after transfusions of

WBC-reduced PLT concentrates stored for up to 7 days. *Transfusion* 2004;44:330-6.

Ontvangen 21 december 2004, geaccepteerd 20 mei 2005.

Correspondentieadres

Mw. dr. M.J. Dijkstra-Tiekstra

Morelstraat 62-bis

3552 GR Utrecht

Tel.: 030 244 40 07

E-mail: margriet.dijkstra@solcon.nl

Belangenconflict: geen gemeld.

Financiële ondersteuning: geen gemeld.



Iets doen voor
de Zonnebloem?

Bouw mee aan ons nieuwe vakantieschip!

giro 145 (Breda)

www.ietsdoenvoordezonnebloem.nl

 CBR
VOOR
GOEDE DOELLEN