

# Journal of Transfusion Medicine

ISSN 1689-6017  
e-ISSN 2080-1505

Rok 2023, tom 16, nr 4

## Blood transfusion service in Poland in 2022

*Działalność jednostek organizacyjnych służby krwi w Polsce w 2022 roku*

*Aleksandra Rosiek, Anna Nieradkiewicz, Elżbieta Lachert, Jolanta Antoniewicz-Papis, Joanna Lasocka, Paulina Goczyńska, Agata Mikołowska, Magdalena Łętowska*

## Methods of identification of human immunodeficiency virus (HIV) infections in Polish blood donors (2005–2022)

*Metody identyfikacji zakażeń wirusem nabytego deficytu odporności (HIV) u dawców krwi w Polsce w latach 2005–2022*

*Ewa Sulkowska, Piotr Grabarczyk*

## Thrombophilia and ischemic stroke

*Trombofilia a niedokrwienny udar mózgu*

*Jacek Musiał*

## Mimetics of active factor VIII (FVIIIa) and their impact on laboratory tests of haemostasis

*Mimetyki aktywnego czynnika VIII (FVIIIa) i ich wpływ na testy laboratoryjne hemostazy*

*Edyta Odnoczko*

## Selected issues on pathogen inactivation in blood components; reports presented at the 33<sup>rd</sup> Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion (ISBT) in Gothenburg, June 17–21, 2023

*Wybrane zagadnienia dotyczące inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi w świetle doniesień prezentowanych na 33. Regionalnym Kongresie International Society of Blood Transfusion (ISBT) w Göteborgu, 17–21 czerwca 2023 roku*

*Paulina Goczyńska, Joanna Lasocka, Elżbieta Lachert*



# Hematologia na Banacha



- 30 stycznia 2024 roku
- 5 marca 2024 roku
- 16 kwietnia 2024 roku
- 14 maja 2024 roku
- 10 września 2024 roku
- 15 października 2024 roku
- 5 listopada 2024 roku
- 3 grudnia 2024 roku

**Przewodniczący Komitetu Naukowego**  
*prof. dr hab. n. med. Grzegorz Basak*

**[www.hematologianabanacha.viamedica.pl](http://www.hematologianabanacha.viamedica.pl)**

Virtual Meeting jest skierowany do wszystkich osób zainteresowanych tematyką. Sesje satelitarne firm farmaceutycznych, sesje firm farmaceutycznych oraz wystawy firm farmaceutycznych są skierowane tylko do osób uprawnionych do wystawiania recept lub osób prowadzących obrót produktami leczniczymi – podstawa prawna: Ustawa z dnia 6 września 2001 r. Prawo farmaceutyczne (Dz.U. z 2008 r. nr 45, poz. 271).

PATRONAT MEDIALNY

PARTNER

tvmed

ikamed.pl

# Journal of Transfusion Medicine



Rok 2023, tom 16, nr 4

ISSN 1689-6017  
e-ISSN 2080-1505

**Redaktor naczelna:** Magdalena Łętowska  
**Zastępca redaktora naczelnego:** Jerzy Windyga  
**Sekretarz redakcji:** Krystyna Dudziak  
**Redaktor prowadzący:** Izabela Hallmann  
**Redaktorzy działów:**  
**Transfuzjologia kliniczna:** Ryszard Pogłód  
**Transfuzjologia laboratoryjna:** Piotr Grabarczyk  
**Hematologia i Hemostaza:** Jerzy Windyga

## Rada Naukowa:

Jean Pierre Allain (Anglia), Margarida Amil Diaz (Portugalia), Jolanta Antoniewicz-Papis, Ewa Brojer, Przemysław Juszczyński, Elżbieta Lachert, Ewa Lech-Marańda, Miquel Lozano (Hiszpania), Mario Muon (Portugalia), Edyta Odnoczko, Piotr Paluszkiwicz, Aleksandra Rosiek, Erwin Scharberg (Niemcy), Zbigniew Szczepiórkowski (Stany Zjednoczone)

**Journal of Transfusion Medicine** (ISSN 1689–6017, e-ISSN 2080–1505) jest czasopismem wydawanym cztery razy w roku przez VM Media Group sp. z o.o., Grupa Via Medica, ul. Świętokrzyska 73, 80–180 Gdańsk, tel.: 58 320 94 94; faks: 58 320 94 60; e-mail: viamedica@viamedica.pl; www.viamedica.pl

Wersja elektroniczna czasopisma znajduje się na stronie:  
<https://journals.viamedica.pl>

## Adres Redakcji:

Instytut Hematologii i Transfuzjologii  
Zakład Transfuzjologii  
ul. Indyry Gandhi 14, 02–776 Warszawa  
tel.: 22 349 63 71, tel./faks: 22 349 63 72  
e-mail: bloodorg@ihit.waw.pl

Zasady edycji i informacje dla autorów zamieszczono na stronie [www.jtm.viamedica.pl](http://www.jtm.viamedica.pl)

Prenumerata w wersji elektronicznej jest bezpłatna  
[https://journals.viamedica.pl/journal\\_of\\_transfusion\\_medicine/about/subscriptions](https://journals.viamedica.pl/journal_of_transfusion_medicine/about/subscriptions)

**Reklamy:** należy kontaktować się z wydawnictwem Via Medica, tel.: (58) 320 94 94; e-mail: [dsk@viamedica.pl](mailto:dsk@viamedica.pl)  
Redakcja nie ponosi odpowiedzialności za treść reklam.

Wszelkie prawa zastrzeżone, włącznie z tłumaczeniem na języki obce. Żaden fragment tego czasopisma zarówno tekstu, jak i grafiki nie może być wykorzystywany w jakiegokolwiek formie. W szczególności zabronione jest dokonywanie reprodukcji oraz przekładanie na język mechaniczny lub elektroniczny, a także utrwalanie w jakiegokolwiek postaci, przechowywanie w jakimkolwiek układzie pamięci oraz transmitowanie, czy to w formie elektronicznej, mechanicznej czy za pomocą fotokopii, mikrofilmu, nagrań, skanów bądź w jakikolwiek inny sposób, bez wcześniejszej pisemnej zgody wydawcy. Prawa wydawcy podlegają ochronie przez krajowe prawo autorskie oraz konwencje międzynarodowe, a ich naruszenie jest ścigane pod sankcją karną.

Czasopismo jest indeksowane w bazach *CrossRef*, *EBSCO*, *Free Medical Journals*, *Google Scholar*, Głównej Biblioteki Lekarskiej, *Index Copernicus* (76,83), Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (20), Polskiej Bibliografii Naukowej, *Ulrich's Periodicals Directory*, *WorldCat*.



# VI Kongres Onkologii Polskiej

Warszawa,  
17–19 października 2024 roku

Przewodniczący Komitetu Naukowego  
*prof. dr hab. n. med. Piotr Rutkowski*



*Nowoczesna Onkologia*  
— *wiele specjalności, wspólny cel*

[www.kongres.pto.med.pl](http://www.kongres.pto.med.pl)



Kongres jest skierowany do wszystkich osób zainteresowanych tematyką. Sesje satelitarne firm farmaceutycznych, sesje firm farmaceutycznych oraz wystawy firm farmaceutycznych są skierowane tylko do osób uprawnionych do wystawiania recept lub osób prowadzących obrót produktami leczniczymi — podstawa prawna: Ustawa z dnia 6 września 2001 r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. z 2017 r. poz. 2211, z późn. zm.).

ORGANIZATOR



ORGANIZATOR  
TECHNICZNY





# Journal of Transfusion Medicine

2023, tom 16, nr 4

ISSN 1689-6017  
e-ISSN 2080-1505

## CONTENTS

### ORIGINAL ARTICLE

#### Blood transfusion service in Poland in 2022

Aleksandra Rosiek, Anna Nieradkiewicz, Elżbieta Lachert, Jolanta Antoniewicz-Papis, Joanna Lasocka, Paulina Goczyńska, Agata Mikołowska, Magdalena Łętowska ..... 167

### REVIEW ARTICLES

#### Methods of identification of human immunodeficiency virus (HIV) infections in Polish blood donors (2005–2022)

Ewa Sulkowska, Piotr Grabarczyk.....211

#### Thrombophilia and ischemic stroke

Jacek Musiał .....246

#### Mimetics of active factor VIII (FVIIIa) and their impact on laboratory tests of haemostasis

Edyta Odnoczek .....260

### REPORT

#### Selected issues on pathogen inactivation in blood components; reports presented at the 33<sup>rd</sup> Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion (ISBT) in Gothenburg, June 17–21, 2023

Paulina Goczyńska, Joanna Lasocka, Elżbieta Lachert.....278

## SPIS TREŚCI

### ARTYKUŁ ORYGINALNY

#### Działalność jednostek organizacyjnych służby krwi w Polsce w 2022 roku

Aleksandra Rosiek, Anna Nieradkiewicz, Elżbieta Lachert, Jolanta Antoniewicz-Papis, Joanna Lasocka, Paulina Goczyńska, Agata Mikołowska, Magdalena Łętowska ..... 189

### ARTYKUŁY POGLĄDOWE

#### Metody identyfikacji zakażeń wirusem nabytego deficytu odporności (HIV) u dawców krwi w Polsce w latach 2005–2022

Ewa Sulkowska, Piotr Grabarczyk.....228

#### Trombofilia a niedokrwienny udar mózgu

Jacek Musiał .....253

#### Mimetyki aktywnego czynnika VIII (FVIIIa) i ich wpływ na testy laboratoryjne hemostazy

Edyta Odnoczek .....269

### SPRAWOZDANIE

#### Wybrane zagadnienia dotyczące inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi w świetle doniesień prezentowanych na 33. Regionalnym Kongresie *International Society of Blood Transfusion (ISBT)* w Göteborgu, 17–21 czerwca 2023 roku

Paulina Goczyńska, Joanna Lasocka, Elżbieta Lachert .....284





## **Dear Authors and Readers,**

*We welcome you to the 4<sup>th</sup> /2023 issue of Journal of Transfusion Medicine, which is also the 61<sup>st</sup> issue since the beginning of our editorial activity as well as the 18<sup>th</sup> issue published in the Polish/English language formula.*

*We hope that the initiative taken in 2019 to publish all the submitted works in two language versions has contributed to the promotion of the Journal of Transfusion Medicine on the international forum and the quarterly has succeeded in drawing attention of health professionals and broader scientific community. We strongly encourage you to cooperate with our quarterly. Works can be submitted either in Polish or English; the Editors take care of the translation of all manuscripts.*

*I would like to take this opportunity to share the good news with you. I am pleased to announce that on July 17<sup>th</sup> 2023, our Journal of Transfusion Medicine was awarded 70 points in the registry of scientific journals and peer-reviewed materials from international conferences by the Polish Ministry of Education and Science.*

*The end of the year is near, so I would like to express my sincere thanks to all the Authors and Translators, Reviewers and Editors whose daily work and commitment have contributed to the high level of our journal. A very sincere thank you to all! On behalf of the Editorial Board and myself, I would like to wish you a wonderful Christmas and all the best for the New Year. May 2024 bring relief and peace.*

*prof. dr hab. n. med. Magdalena Łętowska  
Redaktor Naczelny*



## **Szanowni Państwo,**

*Oddajemy do rąk Naszych Czytelników 4. numer czasopisma *Journal of Transfusion Medicine* przygotowany w 2023 roku, który jest jednocześnie 61. numerem, licząc od początku naszej działalności edytorskiej. Jest to zarazem 18. numer wydany w formule dwujęzycznej.*

*W 2019 roku — wspólnie z wydawnictwem *Via Medica* — podjęliśmy decyzję o publikowaniu wszystkich nadsyłanych prac w dwóch wersjach językowych: polskiej i angielskiej. Mamy nadzieję, że podjęta inicjatywa przyczyniła się do poszerzenia grona odbiorców naszego kwartalnika, jego zaistnienia na arenie międzynarodowej oraz zwiększenia oddziaływania na środowisko naukowe.*

*Autorzy mogą nadsyłać prace w języku polskim i/lub angielskim; tłumaczenie pozostaje po stronie Wydawcy. Serdecznie zachęcamy do współpracy z naszym kwartalnikiem.*

*Korzystając z okazji chciałabym podzielić się z Państwem dobrą wiadomością. Z przyjemnością ogłaszam, że zgodnie z komunikatem Ministerstwa Edukacji i Nauki z 17 lipca 2023 roku czasopismo *Journal of Transfusion Medicine* uzyskało 70 punktów w wykazie czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych.*









*Zbliża się koniec roku, dlatego pragnę wyrazić gorące podziękowanie wszystkim Autorom, Tłumaczom, Recenzentom i Redaktorom, którzy swoją codzienną pracą i zaangażowaniem przyczyniają się do wysokiego poziomu merytorycznego naszego czasopisma. Dziękuję wszystkim Państwu bardzo serdecznie!*

*W imieniu Redakcji oraz własnym pragnę złożyć Państwu najserdeczniejsze życzenia wspaniałych Świąt Bożego Narodzenia oraz wszelkiej pomyślności w Nowym Roku. Niech 2024 rok przyniesie wszystkim dużo wytchnienia i spokoju.*

*prof. dr hab. n. med. Magdalena Łętowska  
Redaktor Naczelny*



# Blood transfusion service in Poland in 2022

Aleksandra Rosiek , Anna Nieradkiewicz , Elżbieta Lachert ,  
 Jolanta Antoniewicz-Papis , Joanna Lasocka , Paulina Goczyńska ,  
 Agata Mikołowska , Magdalena Łętowska 

Department of Transfusion Medicine, Institute of Hematology and Transfusion Medicine, Warsaw, Poland

## Summary

**Background:** *The aim of this study was to present the basic aspects of the activity of Polish blood transfusion service in 2022.*

**Materials and methods:** *Analysis of data forwarded to the Institute of Hematology and Transfusion Medicine by the Polish Blood Transfusion Centers (Centers).*

**Results:** *In 2022, there were 23 Centers and 135 local collection sites operating in Poland. Blood and blood components were also collected during 12 089 mobile collections. The overall number of blood donors was estimated at 621 936, the majority of which were non-remunerated donors (621 715, including 31 243 responders to donation appeals) as well as 31 remunerated donors and 247 autologous donors. Most frequent were whole blood collections (1 289 164 donations), and the least frequent — granulocyte concentrate collections (111 donations) and collections by apheresis of RBC as the only component (15 donations). Whole blood was collected mostly in local collection sites (50.19%), less frequently in Centers (30.25%) and during mobile collections (19.56%). The most frequently prepared blood components were RBCs (1 266 346 units) and FFP (1 537 211 units). COVID-19 convalescent plasma was collected only sporadically (339 units altogether). In 2022, a total of 90 009 units of PCs pooled from whole blood and 52 957 units of PCs from apheresis were prepared.*

*Additional processing methods (leukocyte depletion, irradiation) were more frequently applied to PCs (44.74% leukodepleted, 55.26% both leukodepleted and irradiated), than to RBCs (23.06% leukodepleted, 10.38% both leukodepleted and irradiated, 0.05% irradiated). Pathogen reaction technologies were applied to 24.73% of FFP units issued for clinical use and 12.70% of PCs.*

*For various reasons the following amounts of blood components were wasted in 2022: 12 935 units of whole blood, 32 803 units of RBCs, 58 122 units of FFP, 1582 units of apheresis PCs, 3658 units of pooled PCs and 1681 units of cryoprecipitate.*

*As compared to the years 2020–2021, the value of most indicators of the activity of the blood transfusion service in Poland has increased.*

**Conclusions:** *The study data point to a smaller impact of the COVID-19 pandemic on blood donation in Poland in the year 2022 as compared to 2019–2021. The data may serve*

**Correspondence address:** dr n. med. Aleksandra Rosiek, Department of Transfusion Medicine, Institute of Hematology and Transfusion Medicine, ul. Indyry Gandhi 14, 02–776 Warszawa, Polska, tel: (22) 349 63 91, fax: (22) 349 63 76, e-mail: arosiek@ihit.waw.pl

Translation: mgr Krystyna Dudziak

Received: 21.11.2023

Accepted: 21.12.2023

Early publication date: 31.12.2023

This article is available in open access under Creative Common Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) license, allowing to download articles and share them with others as long as they credit the authors and the publisher, but without permission to change them in any way or use them commercially.

*as a starting point for the analysis of issues related to the activity of organizational units of the Polish blood transfusion service. The outcome may contribute to practical benchmarking, comparing experiences and seeking new solutions.*

**Key words:** blood donors; blood donation; blood components; COVID-19

*J. Transf. Med. 2023; 16: 167–188*

## Introduction

The activity of Polish blood transfusion service (BTS) is regulated by the Public Blood Transfusion Service Act of August 22, 1997 [1]. Pursuant to this Act, the following units of the public blood transfusion service are entitled to collect blood and prepare blood components: 21 Regional Blood Transfusion Centers, Military Blood Transfusion Center (WCKiK, supervised by the Ministry of Defense) and the Blood Transfusion Center of the Ministry of Internal Affairs and Administration (CKiK MSWiA), supervised by the Ministry of Internal Affairs and Administration. The Institute of Hematology and Transfusion Medicine (IHTM) has substantive supervision over the activity of all the above-mentioned entities of the public blood transfusion service.

In this presentation of selected issues related to the annual activities of the public blood transfusion service in Poland in 2022 we take into account some conditions of the first several months of the year as caused by the COVID-19 pandemic. The following topics were discussed for 2022: the number of donors, the number of donations, the collection sites for whole blood and blood components, including red blood cells (RBC), fresh frozen plasma (FFP), platelet concentrate (PC) and granulocyte concentrate (GC). We also discuss issues related to the use of some additional preparation methods as well as the inactivation of biological pathogens in labile blood components. The most common causes of the waste of blood components were explored as well as the degree of wastage.

## Material and methods

This work relies on the data provided by: 21 Regional Blood Transfusion Centers (RCKiK), WCKiK, CKiK MSWiA in the form of annual activity reports for 2022. Together with the National Blood Center (NCK), IHTM created a template of definitions for the purpose of standardization of the forwarded data.

**First-time donor** — donates blood during the reporting period but has never before donated blood for medical purposes.

**Multiple (regular) donor** — systematically donates blood (at least twice during the last 24 months).

**Multiple repeat donor** — donates blood again more than 2 years after the last donation.

**Non remunerated donor** — receives no financial compensation for donated blood/blood component at least once during the reporting period.

**Remunerated donor** — receives financial compensation for every donation during the reporting period.

**Responder to donation appeal** — donates blood /blood component following emergency appeal for donation at least once during the reporting period (the term also applies to former „family donors”).

**Directed donor** — donates blood for a specific patient at least once during the reporting period.

**Autologous donor** — donates blood/blood component for himself at least once during the reporting period.

**Donation** — whole blood or blood component collected by apheresis, including blood for clinical and scientific purposes collected from immunized and family donors etc.

**Unit (u.)** — volume of anticoagulated whole blood obtained from 450 ml of blood collected from the donor or volume of blood component obtained from one unit of anticoagulated whole blood.

**Unit of plasma** — volume of plasma obtained from whole blood or by automated plasmapheresis. One automated plasmapheresis procedure provides 3 units of plasma (600 ml).

**Unit of PC from apheresis** — platelets obtained from a single donor with cell separator (1 donation regardless of platelet count).

**Therapeutic dose of PC** — PCs (either pooled or from apheresis) dedicated for an adult; according to current guidelines it contains  $\geq 3 \times 10^{11}$  platelets.

## Results

### Blood Transfusion Centers (Centers)

In 2022, there were 23 Centers and 135 local collection sites operating in Poland. Moreover, 12 089 mobile collections were organized which is about 8.42% more than in the previous year. In 2022 mobile collections were organized by all RCKiK and WCKiK. The largest number of mobile collections was organized by RCKiK in Łódź (1672). More than 1000 mobile collections were organized also by RCKiK in Katowice (1085) and Warsaw (1131). As compared to the previous year, the number of mobile collections increased in 19 RCKiK and decreased in 3 (Table 1).

### Donors

In 2022, a total of 711 801 persons came to donate blood (in 2021 — 703 958), but only some of them (621 936) were found eligible for donation (in 2021 — 615 784).

As in the previous years, blood or blood components for clinical use were donated by 87% of the people who were willing to donate blood. The difference was mainly due to donor deferral. In 2022, a total of 9061 permanent deferrals were applied. There were also 224 128 temporary deferrals of 189 646 people, and the most common cause for deferral (74 236 cases) was low hemoglobin level (like in the previous years).

Temporary deferral was also applied to 558 people for various reasons related to the COVID-19 pandemic (disease itself, quarantine, contact with infected person/persons) and vaccinations (81). However, the number of deferrals for these reasons was significantly lower than in 2021 (3882, including 1802 vaccinations).

Donors were mostly voluntary unremunerated (621 715). In 2022, blood and blood components were also donated by 31 remunerated donors and 247 autologous donors. Amongst voluntary donors, 31 243 were responders to appeal and 67 were directed donors.

In 20 Centers blood was donated only by voluntary unremunerated donors. The highest numbers of remunerated donors were reported by RCKiK in Gdańsk (28).

Among the donors of blood and blood components there were 135 962 first-time donors (21.86%), 399 172 multiple regular donors (64.18%) and 86 802 multiple repeat donors (13.96%).

17 Centers reported an increase in the number of donors (from 0.11 to 9.67%), and 6 reported

decrease (from 0.02 to 10.15%). Table 2 presents the number of donors in each Center in 2022.

As in the previous years, the most numerous group were blood donors aged 18 to 44 (a total of 509 818, including 128 481 women and 381 337 men).

### Donations

In 2022, whole blood was the most frequently collected blood component (1 289 164 donations), while the least frequent were collections of: granulocyte concentrate (111 donations in 5 RCKiK) and apheresis RBCs as the only component (15 donations in 2 RCKiK). As in previous years, the largest numbers of whole blood donations were reported by RCKiK in Warsaw (112 595) and Katowice (123 610). Apheresis was mainly used for preparation of PCs (13 609 donations) and plasma (80 065 donations). The largest numbers of apheresis plasma donations were reported by RCKiK in Kalisz (15 773), and apheresis PC donations by RCKiK in Warsaw (2640).

Automated donations of a combination of blood components, mostly of PC and plasma (27 847 donations) were also collected mostly in RCKiK in Warsaw (8410), less frequently of PC and RBCs (214 donations) — almost exclusively at RCKiK in Wrocław (200 donations).

Table 3 presents the number of complete donations of blood and blood components in 2022.

Blood was collected primarily in the local collection sites (50.19% of whole blood donations), less frequently at the Center premises (30.25%), and during mobile collections (19.56%). As in previous years, the largest number of whole blood donations — 49.18% — took place during mobile collections organized by the RCKiK in Wałbrzych. Table 4 provides a list of whole blood collection sites in 2022.

### Blood components

#### Red blood cells

Donated blood was processed into blood components, mostly RBC (a total of 1 266 346 units), which was a slight country-wide increase as compared to the previous year (1 231 538 units). As in previous years, the largest amount of RBCs was obtained in RCKiK in Katowice and Warsaw (122 796 and 112 300 units, respectively) (Table 5). Most Centers (19) reported an increase in the number of RBC units.

**Table 1.** Mobile collections organized in Polish Blood Transfusion Centers in 2021 and 2022

Center	Mobile collections		Tendency (increase/decrease compared to 2021)
	2021	2022	
Białystok	581	636	↑
Bydgoszcz	770	782	↑
Gdańsk	201	205	↑
Kalisz	413	428	↑
Katowice	1273	1085	↓
Kielce	206	331	↑
Kraków	712	834	↑
Lublin	403	439	↑
Łódź	1267	1672	↑
Olsztyn	511	530	↑
Opole	154	176	↑
Poznań	717	849	↑
Racibórz	113	131	↑
Radom	399	431	↑
Rzeszów	304	217	↓
Słupsk	131	206	↑
Szczecin	359	383	↑
Wałbrzych	965	832	↓
Warszawa	1048	1131	↑
Wrocław	227	236	↑
Zielona Góra	201	205	↑
WCKiK	195	350	↑
CKiK MSWiA	0	0	bz
<b>Total</b>	<b>11 150</b>	<b>12 089</b>	<b>↑</b>

WCKiK — Military Blood Transfusion Center; CKiK MSWiA — Blood Transfusion Center of Internal Affairs and Administration; ↓ — decrease as compared to 2021; ↑ — increase as compared to 2021; bz — no change since 2021

Some part of RBC units was subjected to additional preparation the most common of which was leukocyte depletion and irradiation.

In 2022, a total of 292 065 units of leukodepleted RBCs were obtained (23.06% of all RBC units) and 131 387 units of leukodepleted irradiated RBCs (10.38%). RBC irradiation only was used sporadically, yielding 619 units of irradiated RBCs — 0.05% of all RBC units.

Country-wide, 33.44% of all RBCs were leukodepleted and 10.42% of RBCs were irradiated. Table 6 presents the number of leukodepleted and irradiated units of RBC prepared in individual Centers in 2022.

### **Platelet concentrate**

Platelet concentrate was the second most frequently prepared cellular blood component, just

like in the years before. Two basic methods were used for PC preparation:

- centrifugation of whole blood from traditional donations, and — if necessary — pooling several units of PC to obtain pooled PC. Some Centers used automated methods for obtaining PCs;
- apheresis with cell separators (some of the PCs obtained with this method were divided into smaller therapeutic doses). Apheresis PCs from modern separators are leuko-reduced and require no additional elimination of leukocytes.

In 2022, a total of 90 009 units of pooled PC were prepared (in 2021 — 85 677), including 52 110 units obtained from buffy coat with manual method and 37 899 with automated methods.

**Table 2.** Blood donors in Polish Blood Transfusion Centers in 2022

Center	Donors				Tendency (increase/decrease compared to 2021)
	First time	Multiple- regular	Multiple repeat	Total	
Białystok	4255	20 954	4225	29 434	↑
Bydgoszcz	6746	24 098	5292	36 136	↑
Gdańsk	5822	19 472	4 003	29 297	↑
Kalisz	3955	15 867	2883	22 705	↑
Katowice	9575	36 254	6841	52 670	↓
Kielce	3974	10 419	3006	17 399	↑
Kraków	11 260	32 545	7314	51 119	↑
Lublin	6425	19 264	4414	30 103	↑
Łódź	9327	22 283	6815	38 425	↑
Olsztyn	5999	12 430	992	19 421	↑
Opole	2573	10 108	1812	14 493	↑
Poznań	14 166	28 489	4296	46 951	↑
Racibórz	1943	9268	1994	13 205	↑
Radom	2473	7557	1803	11 833	↓
Rzeszów	5397	21 778	3956	31 131	↑
Słupsk	2392	5926	1531	9849	↑
Szczecin	5389	14 969	3499	23 857	↑
Wałbrzych	2605	8383	1437	12 425	↓
Warszawa	12 351	36 853	9222	58 426	↓
Wrocław	7849	23 758	5317	36 924	↓
Zielona Góra	3147	7612	3774	14 533	↓
WCKiK	6750	8487	2348	17 585	↑
CKiK MSWiA	1589	2398	28	4015	↑
<b>Total</b>	<b>135 962</b>	<b>399 172</b>	<b>86 802</b>	<b>621 936</b>	<b>↑</b>

WCKiK — Military Blood Transfusion Center; CKiK MSWiA — Blood Transfusion Center of Internal Affairs and Administration; ↓ — decrease as compared to 2021; ↑ — increase as compared to 2021

In 2022, a total of 52 957 units of PCs were obtained by apheresis (37.04% of all units issued for clinical use; in 2021 — 37.93%).

The highest number of PCs units from whole blood was obtained in Katowice (10 726 therapeutic units) and Poznań (10 360 PC units), while from apheresis — in Warsaw (11 125).

The percentage of apheresis PCs differed significantly between Centers — from 1.80% in Zielona Góra to 71.47% in Warsaw and 84.36% in Białystok (Table 7).

Since the beginning of 2021, only leukodepleted PCs are issued for clinical use in Poland; some part of PC units are also irradiated. In 2022, a total of 63 958 therapeutic doses of leukodepleted PCs were obtained which accounted for 44.74% of all obtained PCs, as well as 79 008 therapeutic doses of irradiated leukodepleted PCs (55.26%).

Table 8 presents the numbers of leukodepleted and irradiated PCs obtained in Polish Centers in 2022.

In 2022, a total of 138 594 therapeutic doses of PCs were issued for clinical use (in 2015 — 114 163, in 2016 — 118 391, in 2017 — 123 668, in 2018 — 127 049, in 2019 — 129,652, in 2020 — 120 858 and in 2021 — 130 865). So, after a decrease reported in 2020, a marked increase was recorded.

Some part of the prepared PCs were stored frozen (frozen platelet concentrate).

In 2022, subjected to freezing was 3.71% of all PCs (including 1.94% of pooled PCs and 6.78% of apheresis PCs).

In 2022, there was another slight increase in the percentage of frozen blood components (by 0.93%) although a decrease in the number of frozen PCs had been recorded for several last years. An

**Table 3.** Whole blood and apheresis donations in 2022\*

Center	Whole blood	Apheresis						Total
		Plasma	RBC	PC	GC	PC + plasma	PC + RBC	
Białystok	59 945	12 551	0	100	1	2094	0	74 691
Bydgoszcz	73 144	9784	1	883	15	0	0	83 827
Gdańsk	65 024	1582	0	357	0	109	0	67 072
Kalisz	44 376	15 773	0	0	0	427	0	60 576
Katowice	123 610	191	0	734	0	5230	0	129 765
Kielce	33 936	1367	0	785	0	0	0	36 088
Kraków	110 462	1309	0	1820	63	0	0	113 654
Lublin	61 253	6061	0	0	0	1943	0	69 257
Łódź	76 865	1179	0	1480	18	0	0	79 542
Olsztyn	40 746	1856	0	351	0	108	0	43 061
Opole	31 983	1163	0	723	0	165	0	34 034
Poznań	100 829	6543	0	0	0	1566	0	108 938
Racibórz	26 294	5242	0	0	0	397	0	31 933
Radom	23 278	2628	0	16	0	880	0	26 802
Rzeszów	67 860	4506	0	1887	0	91	0	74 344
Słupsk	19 784	1005	14	29	0	227	14	21 073
Szczecin	50 153	1061	0	5	0	940	0	52 159
Wałbrzych	27 604	274	0	26	0	196	0	28 100
Warszawa	112 595	1141	0	2640	14	8410	0	124 800
Wrocław	69 909	4641	0	1669	0	5003	200	81 422
Zielona Góra	31 867	206	0	0	0	61	0	32 134
WCKiK	30 390	1	0	54	0	0	0	30 445
CKiK MSWiA	7257	1	0	50	0	0	0	7308
<b>Total</b>	<b>1 289 164</b>	<b>80 065</b>	<b>15</b>	<b>13 609</b>	<b>111</b>	<b>27 847</b>	<b>214</b>	<b>1 411 025</b>

WCKiK — Military Blood Transfusion Center; CKiK MSWiA — Blood Transfusion Center of Internal Affairs and Administration; \*Complete donations only

increase was noted in the percentage of frozen apheresis PCs (by 2.1%) as well as of pooled PCs (by 0.12%). In most centers the percentage of frozen PCs did not change much in the consecutive years. In 2022, there are however significant differences in this respect between individual Centers, ranging from 0% in Kalisz, Poznań and WCKiK to 11.60% in Słupsk (decrease by 0.51% as compared to 2021), 17.26% in Wałbrzych (increase by 3.42%),

35.88% in Opole (increase by 12.59%), 43.26% in Radom (increase by 24.46%) and 56.18% in Racibórz (increase by 5.28%). Unlike in the previous years, Centers in Opole, Radom and Wałbrzych reported increase in the percentage of frozen PCs. As in the previous years, Racibórz reported the highest percentage of frozen pooled PCs (57.89%, decrease by 11.49%). In Wałbrzych, Radom, Racibórz, Słupsk, Zielona Góra, CKiK MSWiA reported

Table 4. Sites of whole blood collection in 2022

Centers	Whole blood collected (units)*						
	Center site		Local collection site		Mobile collection site		Total
	U	%	U	%	U	%	U
Białystok	27 081	44.91	19 351	32.09	13 871	23.00	60 303
Bydgoszcz	18 851	25.61	30 578	41.54	24 178	32.85	73 607
Gdańsk	21 940	33.51	38 407	58.66	5125	7.83	65 472
Kalisz	9872	22.12	20 239	45.35	14 513	32.52	44 624
Katowice	23 475	18.65	80 497	63.96	21 892	17.39	125 864
Kielce	14 531	42.54	10 563	30.93	9062	26.53	34 156
Kraków	25 560	22.98	63 874	57.43	21 789	19.59	111 223
Lublin	15 575	25.15	35 545	57.40	10 807	17.45	61 927
Łódź	29 992	38.58	32 782	42.17	14 959	19.24	77 733
Olsztyn	13 179	32.03	17 569	42.69	10 404	25.28	41 152
Opole	7168	22.36	21 766	67.90	3123	9.74	32 057
Poznań	27 898	27.15	56 746	55.23	18 103	17.62	102 747
Racibórz	3937	14.82	19 552	73.62	3069	11.56	26 558
Radom	13 489	57.66	1975	8.44	7932	33.90	23 396
Rzeszów	16 362	23.92	47 068	68.81	4973	7.27	68 403
Słupsk	11 294	55.86	5454	26.98	3469	17.16	20 217
Szczecin	21 758	43.15	19 637	38.95	9027	17.90	50 422
Wałbrzych	14 246	50.82	0	0.00	13 785	49.18	28 031
Warszawa	25 457	22.35	62 494	54.86	25 964	22.79	113 915
Wrocław	33 130	46.89	30 428	43.06	7104	10.05	70 662
Ziel. Góra	10 405	32.40	17 503	54.50	4209	13.11	32 117
WCKiK	1632	5.29	21 793	70.63	7432	24.09	30 857
CKiK MSWiA	7300	100.00	0	0.00	0	0.00	7 300
<b>Total</b>	<b>394 132</b>	<b>30.25</b>	<b>653 821</b>	<b>50.19</b>	<b>254 790</b>	<b>19.56</b>	<b>1 302 743</b>

WCKiK — Military Blood Transfusion Center; CKiK MSWiA — Blood Transfusion Center of Internal Affairs and Administration; \*incomplete donations included

the highest percentage of frozen apheresis PCs (72.98%; 70.65%, 54.19%, 53.09%, 46.67% and 28.00% respectively). At the same time, it should be noted that in Zielona Góra only 60 apheresis PCs were collected, 28 of which were frozen, while CKiK MSWiA collected 50 PCs and subjected 7 to freezing, hence such a high percentage of frozen PCs from apheresis.

In 2022, thawed frozen PCs accounted for 2.76% of all PC therapeutic doses issued for clinical use, i.e. 0.08% less than in 2021. The largest

number of thawed PC units was reported by Racibórz (45.27% of all PC units issued for clinical use), Opole (24.91%), Radom (23.20%), Wałbrzych (15.45%) as well as Słupsk (10.02%). Only the Centers in Kalisz, and Poznań reported no thawed PCs issued for clinical use.

#### **Fresh frozen plasma**

In 2022, a total of 1 537 211 FFP units were prepared (in 2019 — 1 373 514 units, in 2020 — 1 264 654 units and in 2021 — 1 425 640 units). As

**Table 5.** Units of RBCs prepared in Polish Blood Transfusion Centers in 2022

Center	RBCs	Increase/decrease compared to 2021
Białystok	59 923	↑
Bydgoszcz	73 103	↑
Gdańsk	64 822	↑
Kalisz	41 069	↑
Katowice	122 796	↑
Kielce	33 881	↑
Kraków	110 330	↑
Lublin	61 115	↑
Łódź	76 471	↑
Olsztyn	40 687	↑
Opole	31 922	↑
Poznań	93 163	↑
Racibórz	26 234	↓
Radom	22 883	↓
Rzeszów	66 345	↑
Słupsk	19 784	↑
Szczecin	50 126	↑
Wałbrzych	27 604	↑
Warszawa	112 300	↓
Wrocław	62 082	↑
Zielona Góra	31 819	↑
WCKiK	30 642	↓
CKiK MSWiA	7245	↑
<b>Total</b>	<b>1 266 346</b>	<b>↑</b>

WCKiK — Military Blood Transfusion Center; CKiK MSWiA — Blood Transfusion Center of Internal Affairs and Administration; ↓ — decrease as compared to 2021; ↑ — increase as compared to 2021

in the previous years, FFP was mainly obtained by manual method, i.e. plasma obtained from anticoagulated whole blood. With this method, 1 247 356 FFP units were obtained in 2022. On the other hand, with the less frequent method of apheresis 289 855

units were obtained, i.e. 18.86% of the total (in 2021 — 232 001 units, i.e. 16.27% of the total). This is the continuation of the upward trend observed for the last several years.

The percentage of FFP obtained by apheresis differed between Centers (the highest was reported by RCKiK in Kalisz — 54.16% and Białystok — 46.82%).

Table 9 presents the number of FFP units obtained by the manual method and by apheresis in individual Centers in 2022.

A total of 252 332 FFP units were issued for clinical use which is more than in 2021 (246 013 FFP units) though still less than in 2019 — 273 519). As compared to the previous year, the number of FFP units issued for clinical use increased in most (17) Centers (Table 10).

### **COVID-19 convalescent plasma**

In 2022, convalescent plasma was collected less frequently than in the previous years. A total of 339 units were collected for clinical purposes (in 2020 and 2021 — 87 071 and 57 708 respectively). Convalescent plasma was collected by 6 Centers; the highest volumes (173 units) were reported by the Center in Warsaw. 590 units of convalescent plasma were issued for clinical use (in 2021 — 58 670; in 2020 — 25 868). Table 11 presents the numbers of units obtained from COVID-19 convalescents and issued for clinical purposes by individual Centers in 2022.

### **Granulocyte concentrate**

As in previous years, in 2022 granulocyte concentrate (GC) was only sporadically obtained (111 donations in 5 Centers), although more frequently than in 2021 (104 donations) and in 2020 (82 donations). Most GC donations took place in Kraków (63) and Łódź (18).

### **Quarantine and inactivation of biological pathogens in labile blood components**

In Poland only quarantine<sup>1</sup> or pathogen inactivated FFP and cryoprecipitate are issued for clinical use to ensure the safety of transfused blood components. Currently there are three pathogen inactivation systems implemented in the Polish Blood Transfusion Centers: Theraflex MB Plasma (with methylene blue) for pathogen inactivation in plasma, Mirasol PRT (with riboflavin) and Intercept (with amotosalen hydrochloride) for pathogen

<sup>1</sup> Quarantine of FFP and cryoprecipitate consists in storage for at least 16 weeks of donation date followed by testing the donor for infectious disease markers (to eliminate the diagnostic window period)



**Table 6.** Leukodepleted and irradiated RBCs prepared in Polish Blood Transfusion Centers in 2022

Center	Units of leukodepleted RBCs	Units of irradiated RBCs	Units of both leukodepleted and irradiated RBCs
Białystok	1780	0	7164
Bydgoszcz	3371	0	12 325
Gdańsk	1953	3	19 533
Kalisz	38 402	0	759
Katowice	41 455	3	7248
Kielce	6240	0	3903
Kraków	9254	289	7527
Lublin	8813	7	10 532
Łódź	9100	26	14 017
Olsztyn	4458	0	4874
Opole	4204	0	606
Poznań	38 586	4	8106
Racibórz	2654	0	43
Radom	1944	0	82
Rzeszów	323	56	7851
Słupsk	1398	0	1791
Szczecin	1344	218	2531
Wałbrzych	2670	0	0
Warszawa	96 638	0	9124
Wrocław	3993	13	10 747
Zielona Góra	3453	0	2563
WCKiK	3073	0	61
CKiK MSWiA	6960	0	0
<b>Total</b>	<b>292 065</b>	<b>619</b>	<b>131 387</b>

WCKiK — Military Blood Transfusion Center; CKiK MSWiA — Blood Transfusion Center of Internal Affairs and Administration

inactivation in FFP and PC. Inactivation methods (Mirasol PRT and Intercept) are also effective for inactivation of immunocompetent T lymphocytes and this is an alternative to irradiation of cellular blood components for prevention of transfusion-associated Graft Versus Host Disease (TA-GvHD) [2–4].

In 2022 pathogen inactivation technology (PRT) was implemented in 23 Centers which used:

- Mirasol — 18 Centers (in 16 regional Centers,

- WCKiK and CKiK MSWiA);
- Theraflex MB Plasma (in 12 regional Centers);
- Intercept (in 2 regional Centers).

Individual Centers subjected different amounts of plasma to inactivation, ranging from 0.11% in Szczecin to 17.51% in Poznań. In 3 Centers, the volume of inactivated plasma exceeded 10% (Poznań — 17.51%, Warsaw — 16.9% and CKiK MSWiA — 13.20%), respectively). In another 3 Centers the percentage ranged from 3.18 to 7.57%.

**Table 7.** PCs from whole blood and apheresis (2022)

Center	PC (therapeutic doses)			
	Pooled (from whole blood)	Apheresis	Total	% of apheresis PCs
Białystok	1215	6554	7769	84.36
Bydgoszcz	8423	1060	9483	11.18
Gdańsk	5771	964	6735	14.31
Kalisz	1767	745	2512	29.66
Katowice	10 726	7310	18 036	40.53
Kielce	3140	927	4067	22.79
Kraków	8688	2456	11 144	22.04
Lublin	4763	2059	6822	30.18
Łódź	4650	1494	6144	24.32
Olsztyn	3750	562	4312	13.03
Opole	486	888	1374	64.63
Poznań	10 360	2774	13 134	21.12
Racibórz	596	513	1109	46.26
Radom	578	913	1491	61.23
Rzeszów	6632	2026	8658	23.40
Słupsk	1202	307	1509	20.34
Szczecin	3705	1251	4956	25.24
Wałbrzych	1797	248	2045	12.13
Warszawa	4442	11 125	15 567	71.47
Wrocław	3738	8617	12 355	69.75
Zielona Góra	3273	60	3273	1.80
WCKiK	154	54	208	25.96
CKiK MSWiA	153	50	203	24.63
<b>Total</b>	<b>90 009</b>	<b>52 957</b>	<b>142 966</b>	<b>37.04</b>

WCKiK — Military Blood Transfusion Center; CKiK MSWiA — Blood Transfusion Center of Internal Affairs and Administration

Countrywide, 4.69% of all plasma was subjected to inactivation. COVID-19 convalescent plasma was also subjected to inactivation and the values ranged from 58.96% in Warsaw to 100% in WCKiK, CKiK MSWiA as well as Kraków and Radom. Countrywide, 43.07% of COVID-19 convalescent plasma was pathogen inactivated. It is worth noting that the volume of collected COVID-19 convalescent plasma markedly decreased during the last two years.

In 2022, 75.25% of quarantine FFP and 92.15% of quarantine cryoprecipitate were issued for clinical use. 24.73% units of FFP and 9.48% units of cryoprecipitate subjected to pathogen inactivation were issued to hospitals (cryoprecipitate — only in Poznań and Bydgoszcz).

Inactivation of pooled PCs was performed in 8 Centers (7 with Mirasol system, 1 with Intercept). The percentage of pooled PCs subjected to

**Table 8.** Leukodepleted and irradiated PCs prepared in Polish Blood Transfusion Centers (2022)

Center	PC therapeutic doses	Leukodepleted PCs	Irradiated leukodepleted PCs
Białystok	7769	0	7769
Bydgoszcz	9483	605	8878
Gdańsk	6735	384	6351
Kalisz	2512	2330	182
Katowice	18 036	11 193	6843
Kielce	4067	2282	1785
Kraków	11 144	5537	5607
Lublin	6822	838	5984
Łódź	6144	570	5574
Olsztyn	4312	510	3802
Opole	1374	1256	118
Poznań	13 134	5064	8070
Racibórz	1109	1101	8
Radom	1491	1481	10
Rzeszów	8658	4649	4009
Słupsk	1509	627	882
Szczecin	4956	1731	3225
Wałbrzych	2045	2045	0
Warszawa	15 567	15 567	0
Wrocław	12 355	3721	8634
Zielona Góra	3333	2056	1277
WCKiK	208	208	0
CKiK MSWiA	203	203	0
<b>Total</b>	<b>142 966</b>	<b>63 958</b>	<b>79 008</b>

WCKiK — Military Blood Transfusion Center; CKiK MSWiA — Blood Transfusion Center of Internal Affairs and Administration

inactivation ranged from 0.31% (Center in Lublin) to 99.59% (Center in Warsaw). Countrywide, this accounted for 5.38% of all pooled PC units.

9 Centers inactivated apheresis PCs (7 used Mirasol, 1 used Intercept and 1 Center — in Radom — used both systems). The percentage of inactivated apheresis PCs ranged from 0.68% (in Katowice) to 96.40% (in Warsaw). Countrywide, this accounted for 24.34% of all apheresis PC

units. In 2022, 12.70% of all pathogen inactivated PC therapeutical units were issued for clinical use.

Table 12 presents the percentage of FFP, pooled PCs and PC units from apheresis subjected to pathogen inactivation in Centers (2022).

Table 13 presents the percentage of COVID-19 convalescent plasma subjected to pathogen inactivation in 2022.

**Table 9.** FFP (from whole blood and apheresis) prepared in Polish Blood Transfusion Centers in 2022 (number of units)

Center	Whole blood (manual method)	Apheresis	Total	% apheresis FFP
Białystok	59 928	52 759	112 687	46.82
Bydgoszcz	72 550	29 397	101 947	28.84
Gdańsk	64 803	4875	69 678	7.00
Kalisz	40 912	48 340	89 252	54.16
Katowice	122 796	5810	128 606	4.52
Kielce	33 824	4124	37 948	10.87
Kraków	110 322	3888	114 210	3.40
Lublin	59 050	20 355	79 405	25.63
Łódź	76 470	3407	79 877	4.27
Olsztyn	39 978	5748	45 726	12.57
Opole	31 922	3210	35 132	9.14
Poznań	92 990	24 180	117 170	20.64
Racibórz	26 234	16 351	42 585	38.40
Radom	22 846	8103	30 949	26.18
Rzeszów	66 332	13 526	79 858	16.94
Słupsk	19 813	3516	23 329	15.07
Szczecin	50 127	4700	54 827	8.57
Wałbrzych	26 933	1 176	28 109	4.18
Warszawa	112 227	11 718	123 945	9.45
Wrocław	61 874	24 054	85 928	27.99
Zielona Góra	31 819	618	32 437	1.91
WCKiK	16 614	0	16 614	0.00
CKiK MSWiA	6992	0	6992	0.00
<b>Total</b>	<b>1 247 356</b>	<b>289 855</b>	<b>1 537 211</b>	<b>18.86</b>

WCKiK — Military Blood Transfusion Center; CKiK MSWiA — Blood Transfusion Center of Internal Affairs and Administration

Table 14 presents the percentage of FFP, cryoprecipitate and PC therapeutic units issued for clinical use following pathogen inactivation (2022).

### Wastage of blood and blood components

In 2022, a total of 110 782 units of blood and most common blood components were wasted, including 12 935 units of anticoagulated whole blood, 32 803 units of RBCs, 58 122 units of FFP, 1582

therapeutic units of apheresis PCs, 3658 units of pooled PCs as well as 1681 units of cryoprecipitate.

As in the previous years, the most common reasons for wastage of blood components were:

- expiry date;
- seropositivity for transfusion transmitted viral diseases, syphilis tests, implementation of look-back procedure (hereinafter referred to as “pathogens”);
- other causes, including:

**Table 10.** FFP issued for clinical use in Polish Blood Transfusion Centers in 2022 (convalescent plasma not included)

Center	FFP issued for clinical use (units)	Tendency (increase/decrease compared to 2021)
Białystok	11 657	↑
Bydgoszcz	14 154	↑
Gdańsk	8792	↑
Kalisz	3353	↑
Katowice	23 395	↑
Kielce	5709	↓
Kraków	22 065	↑
Lublin	14 569	↓
Łódź	14 198	↓
Olsztyn	7291	↑
Opole	4937	↓
Poznań	18 451	↑
Racibórz	2314	↑
Radom	2267	↑
Rzeszów	11 809	↑
Słupsk	2371	↑
Szczecin	12 515	↓
Wałbrzych	6142	↓
Warszawa	35 924	↓
Wrocław	10 766	↑
Zielona Góra	6323	↑
WCKiK	9964	↓
CKiK MSWiA	3368	↑
<b>Total</b>	<b>252 332</b>	<b>↑</b>

WCKiK — Military Blood Transfusion Center; CKiK MSWiA — Blood Transfusion Center of Internal Affairs and Administration; ↓ — decrease as compared to 2021; ↑ — increase as compared to 2021

- inadequate visual control,
- low quantity/volume,
- incorrect serological results,
- other, including incorrect procedures, medical deferral, mechanical damage, donor self-deferral etc.

Components from autologous donations that were not put to clinical use were also subjected to wastage (33 units of RBCs and 101 units of FFP).

Table 15 presents the number of blood components wasted in individual Centers in 2022; causes of waste are presented in Table 16.

## Discussion

The year 2022 was still the year of COVID-19 pandemic but as of May 16<sup>th</sup> 2022 the state of pandemic has been replaced by the state of epidemic emergency. Regardless of the context however, the basic factor that determines the availability of blood supply is still the good will of a sufficient number of volunteer, non-remunerated blood donors [5–9].

In line with the observations presented above, in 2022 the number of donors in the Centers in Poland (621 936) was the highest in several last years (615 784 in 2021, 569 914 in 2020, 614 579 in 2019).

The increase in the number of blood donors was observed despite the several-year decrease in the population in the 18–65 age group — the potential “recruitment source” of blood donors. According to the data provided by the Demographic Yearbook reports (Central Statistical Office of Poland) for 31 December 2011 this number was estimated at 26 460 477, while for 31 December 2020 — 24 689 690 and for 12 December 2022 — 23 989 507 [10–12].

So, during the 2011–2022 period, the population in the above-mentioned age group decreased by 2,5 million, which may have a negative impact on the number of active blood donors.

In the member states of the Council of Europe, the average number of blood donors per 1000 inhabitants decreased in the period 2008–2011 from 29.0 to 25.0 [13]. In Poland, in 2022 the average number of blood donors per 1000 inhabitants was estimated at 16.47 (in 2021 — 16.14, in 2020 — 14.42, in 2019 — 15.39, 2018 — 15.37, and in 2017 — 15.30). This was the highest value in the last several years.

Both in Poland and in other countries, there is a downward trend in the number of people declaring their willingness to donate blood; this is particularly true for certain age groups. In Poland, such a tendency can be observed mostly in the 18–24 age group i.e. a group of potential future donors of blood and blood components [14].

Apart from the above-mentioned demographic changes, the number of blood donors is adversely affected by factors such as:

**Table 11.** Convalescent plasma collected and issued for clinical use by Polish Blood Transfusion Centers in 2022

Center	Convalescent plasma collected (units)	Issued for clinical use (units)
Białystok	0	7
Bydgoszcz	0	0
Gdańsk	0	24
Kalisz	0	0
Katowice	0	29
Kielce	12	30
Kraków	8	12
Lublin	0	35
Łódź	64	9
Olsztyn	0	0
Opole	0	28
Poznań	0	8
Racibórz	0	0
Radom	24	17
Rzeszów	28	0
Słupsk	0	0
Szczecin	21	12
Wałbrzych	3	0
Warszawa	173	0
Wrocław	0	25
Zielona Góra	0	351
WCKiK	3	0
CKiK MSWiA	3	3
<b>Total</b>	<b>339</b>	<b>590</b>

WCKiK — Military Blood Transfusion Center; CKiK MSWiA — Blood Transfusion Center of Internal Affairs and Administration

- periodic disease outbreaks — eg. COVID-19 pandemic;
- travel-associated risk of infection e.g. malaria or West Nile virus [15–17];
- emerging infectious diseases (other than COVID-19) e.g. the epidemic of Zika virus infections [18–19];
- health condition of the population, including reduced hemoglobin levels (the most common cause of deferrals in the last years) [20–22];
- no opportunity to donate blood or economic reasons.

The number of autologous donors has been low in the recent years. In 2022, it was estimated at 247, i.e. the lowest number in the last several years (in 2021 — 313, in 2020 — 323, in 2019 — 630, in 2018 — 598, in 2017 — 692). The smaller

number of preoperative autologous donations is a phenomenon observed in many countries [23].

In line with current recommendations, autologous donations are mostly relied on when they have significant advantage over allogenic transfusions, and when indications for transfusion are strong. Autologous donations are useful primarily in cases when compatible allogenic blood is unavailable, eg. when the patient has antibodies against antigens with high prevalence in the population [24].

In 2022, the total number of blood and blood component donations amounted to 1 411 025 including 1 289 164 whole blood donations which is an increase as compared to the previous year (in 2021 — 1 374 572 including 1 248 585 whole blood donations, in 2020 — 1 201 272 donations and 1 105 434 whole blood donations).

One of the methods used for more effective collection of blood components is automated apheresis. In 2022, the number of apheresis PCs and plasma donations combined increased as compared to 2021 (from 26 518 to 27 847) while the number of only PC donations decreased (from 14 411 to 13 609). There was a reported decrease in the number of only plasma donations (from 84 818 to 80 065). Collection by apheresis of other blood components, ie RBCs and granulocyte concentrate (GC) was only sporadic.

It is worth noting that automated methods (apheresis) are still used in Poland to a relatively small extent, in 2022 — only 8.64% of all donations were collected by apheresis which is less than in 2021 (9.16%).

In order to make blood donation easier for donors mobile collections are organized. In 2022, the Centers organized 12 089 mobile teams which is more than in the previous years (in 2021 — 11 150, in 2020 — 10 432) but still less than in the year 2019 (13 511). The percentage of whole blood donations collected by mobile teams was also relatively small — 19.56%. In 2022, blood was mostly collected at local collection sites — 50.19% of all whole blood donations. This may be explained by the fact that donors are more willing to donate in familiar places. However, the contemporary high standards for collection of blood dedicated for clinical use do not favor small collection sites; centralization of blood transfusion service is recommended.

The demand for blood components is affected by a number of factors, including current guidelines issued by scientific societies, profile of the clinical ward and recommendations of the physician. No doubt, the COVID-19 pandemic also had strong

**Table 12.** Percentage of pathogen-inactivated units of FFP, pooled PCs, apheresis PCs prepared in Polish Blood Transfusion Centers in 2022

Center	FFP (%)	Pooled PCs (%)	Apheresis PCs (%)	Systems
Białystok	1.26	0.00	0.00	Theraflex, Mirasol
Bydgoszcz	2.44	0.00	0.00	Theraflex, Mirasol
Gdańsk	1.12	0.00	0.00	Theraflex, Mirasol
Kalisz	2.07	0.00	0.00	Theraflex
Katowice	0.96	0.70	0.68	Mirasol
Kielce	0.74	0.00	66.67	Mirasol
Kraków	7.58	0.92	0.73	Mirasol
Lublin	2.43	0.31	8.35	Theraflex, Mirasol
Łódź	1.17	2.06	0.80	Mirasol, Intercept
Olsztyn	2.52	0.00	0.00	Theraflex
Opole	2.30	0.00	0.00	Theraflex
Poznań	17.51	0.00	0.00	Theraflex
Racibórz	1.13	0.00	0.00	Theraflex
Radom	2.35	0.00	56.96	Mirasol, Intercept
Rzeszów	2.76	1.43	12.29	Theraflex, Mirasol
Słupsk	0.35	0.00	0.00	Mirasol
Szczecin	0.11	0.00	0.00	Mirasol, Interscept
Wałbrzych	3.18	0.00	0.00	Mirasol
Warszawa	16.90	99.59	96.40	Mirasol, Intercept
Wrocław	3.38	0.00	0.00	Theraflex, Mirasol
Zielona Góra	2.20	0.00	0.00	Theraflex
WCKiK	0.98	33.12	44.44	Mirasol
CKiK MSWiA	13.20	1.31	54.00	Mirasol
<b>Total</b>	<b>4.69</b>	<b>5.38</b>	<b>24.34</b>	

WCKiK — Military Blood Transfusion Center; CKiK MSWiA — Blood Transfusion Center of Internal Affairs and Administration

impact on the activity of hospitals, and on the use of blood components.

In 2022, approximately 33 units of RBCs per 1 000 inhabitants were issued for clinical purposes (in 2021 — 30.92 units, in 2020 — 27.87, 2019 — 30.7 units, in 2018 — 30.38 units, in 2017 — 30.22 units, 2016 — 29.99, 2015 — 29.87) [ 11, 12, 25–28].

Following the downward trend in RBC consumption observed in 2020, the RBC consumption in 2022 increased. However, for years now the RBC consumption in Poland has been lower than in some other European countries — eg. in 2011 the RBC consumption in 32 member states of the Council of Europe averaged 37 units/1000 inhabitants [13].

In 2022 the number of FFP units issued for clinical purposes amounted to 252 332 and was higher than in the previous year (246 013 units) though still lower than in 2019 (273 519 units). The ratio of RBCs issued for clinical use to FFP

was approximately 4.94 (in 2021 — 4.81, in 2020 — 4.57, in 2019 — 4.31, in 2018 — 4.09, in 2017 — 3.77, in 2016 — 3.56, in 2015 — 3.45), so the upward trend continues [29–35].

These observations indicate that the consumption of FFP gradually declines as compared to RBC consumption. However, the RBC/FFP ratio still shows a higher consumption of FFP relative to RBCs than in many European countries [13]. This may be explained by the lower consumption of RBCs in Poland — as mentioned above, but in many cases also by the fact that FFP is used with no sufficient rationale and sometimes against currently rather restrictive indications for use [36, 37].

What is noteworthy is the significant decrease in the number of collections and clinical use of COVID-19 convalescent plasma for SARS-CoV-2 therapy, the so-called passive immunotherapy. In the first months of the COVID-19 pandemic, there was considerable interest in this therapeutic method,

**Table 13.** COVID-19 convalescent plasma — percentage subjected to pathogen inactivation in Polish Blood Transfusion Centers in 2022

Centers	Convalescent plasma (units)	Convalescent plasma subjected to pathogen inactivation (units)	Percentage of convalescent plasma subjected to pathogen inactivation
Białystok	0	0	0.00
Bydgoszcz	0	0	0.00
Gdańsk	0	0	0.00
Kalisz	0	0	0.00
Katowice	0	0	0.00
Kielce	12	0	0.00
Kraków	8	8	100.00
Lublin	0	0	0.00
Łódź	64	0	0.00
Olsztyn	0	0	0.00
Opole	0	0	0.00
Poznań	0	0	0.00
Racibórz	0	0	0.00
Radom	24	24	100.00
Rzeszów	28	0	0.00
Słupsk	0	0	0.00
Szczecin	21	0	0.00
Wałbrzych	3	0	0.00
Warszawa	173	102	58.96
Wrocław	0	0	0.00
Zielona Góra	0	0	0.00
WCKiK	3	3	100.00
CKiK MSWiA	3	3	100.00
<b>Total</b>	<b>339</b>	<b>146</b>	<b>43.07</b>

WCKiK — Military Blood Transfusion Center; CKiK MSWiA — Blood Transfusion Center of Internal Affairs and Administration

but subsequent studies have not given reliable results to prove its efficacy. Recommendations regarding the use of COVID-19 convalescent plasma are disputable and may apply only to certain groups of patients [38]. This probably was the reason for significant decline in interest in this therapeutic method both in Poland and other countries.

The last several years have witnessed the increase in the consumption of PC. In the period 2015–2019, the number of PC therapeutic units issued for clinical use increased from 114 163 to 129 652 (more than 13%). A similar phenomenon was observed in other countries [39].

In 2020 however, only 120 858 therapeutic units of PC were issued for clinical purposes, so the decline is obvious. In 2021 however, the number of PC therapeutic units issued for clinical use was 130 865, and in 2022 — 138 594 therapeutic units, so again an increase was recorded.

Additional preparation methods (leukocyte depletion, irradiation) for prevention of transfusion associated adverse reactions were applied mainly to PCs (44.74% leukodepleted PCs and 55.26% irradiated leukodepleted PCs), less often to RBCs (23.06% of leukodepleted RBCs, 10.38% irradiated leukodepleted RBCs and 0.05% irradiated RBCs).



**Table 14.** Percentage of pathogen-inactivated FFP, cryoprecipitate and PC units issued for clinical use in 2022

Center	% FFP (units)	% Cryoprecipitate (units)	% PCs (therapeutic doses)
Białystok	10.47	0	0.00
Bydgoszcz	8.29	15.95	0.00
Gdańsk	1.02	0	0.00
Kalisz	58.44	0	0.00
Katowice	7.34	0	0.69
Kielce	6.04	0	17.15
Kraków	39.05	0	0.87
Lublin	15.25	0	2.71
Łódź	12.63	0	1.35
Olsztyn	11.15	0	0.00
Opole	11.77	0	0.00
Poznań	96.44	100	0.00
Racibórz	28.61	0	0.00
Radom	36.79	0	38.07
Rzeszów	31.40	0	4.11
Słupsk	9.57	0	0.00
Szczecin	0.99	0	0.00
Wałbrzych	14.05	0	0.00
Warszawa	33.03	0	98.34
Wrocław	43.56	0	0.00
Zielona Góra	9.50	0	0.00
WCKiK	0.55	0.23	3.63
CKiK MSWiA	13.27	0	17.02
<b>Total</b>	<b>24.73</b>	<b>9.48</b>	<b>12.70</b>

WCKiK — Military Blood Transfusion Center; CKiK MSWiA — Blood Transfusion Center of Internal Affairs and Administration

As mentioned above, since 2021, only leukodepleted PCs are issued for clinical use in Poland. Moreover, leukodepleted RBCs require additional preparation, while in the case of apheresis PCs leukodepletion usually occurs at collection from the donor. Some automated methods of PC preparation from buffy coat also allow for the simultaneous elimination of leukocytes, but the cost of such procedure is still relatively high as compared to manual methods. Automated methods do however guarantee higher quality parameters due to standardization of preparation methods.

Regular leukodepletion is now implemented in many countries, although its effectiveness for prevention of transfusion related adverse reactions is sometimes questioned [40].

As in the previous years, the number of frozen PC units is still too high in some Centers. In 2022 — there was a slight decrease in the percentage of frozen PCs. The reported country-wide percentage

is acceptable but in some Centers the routine procedure of freezing large volumes of PCs is much too frequent and has to be limited. In some Centers, the number of frozen PC units has increased despite previously observed tendencies to be lower. Current indications for the clinical use of thawed PCs are quite limited. The component should be used only in exceptional cases, so it is not recommended to freeze more than 10% of all PCs prepared. This does not refer to freezing of apheresis PCs collected for patients with anti-HLA or anti-HPA antibodies. It is worth stressing that freezing and thawing increase the cost of preparation of components for clinical use and have a negative impact on the quality parameters of platelets and therefore their therapeutic efficacy. A cause for anxiety are those Centers which subject to freezing more than 50% of all PC units prepared; for apheresis PCs and pooled PCs — 50% and almost 60% respectively. It should however be emphasized that the overall

**Table 15.** Wastage of blood components in Polish Blood Transfusion Centers in 2022

Center	Whole blood	RBCs	PCs (therapeutic doses)		FFP	Cryoprecipitate
			Pooled (from whole blood)	Apheresis		
Białystok	168	662	26	12	693	83
Bydgoszcz	490	828	0	0	2307	282
Gdańsk	307	1336	281	10	2156	145
Kalisz	152	989	0	0	1749	23
Katowice	1082	3159	524	247	4716	116
Kielcach	59	925	262	34	1103	56
Kraków	808	2668	117	40	7158	115
Lublin	133	1381	178	99	2070	18
Łódź	1259	2379	313	103	2506	0
Olsztyn	65	529	59	9	559	13
Opole	110	931	35	45	902	4
Poznań	2062	2855	310	64	2426	18
Racibórz	60	455	60	38	663	0
Radom	522	1707	0	68	1037	54
Rzeszów	1511	2054	419	52	2306	94
Słupsk	455	705	102	11	812	34
Szczecin	191	2100	225	47	2343	71
Wałbrzych	453	1295	136	8	498	5
Warszawa	1515	2277	71	568	7664	170
Wrocław	725	1213	73	105	1787	61
Zielona Góra	299	660	423	10	589	5
WCKiK	454	1652	43	13	9144	302
CKiK MSWiA	55	43	0	0	2933	12
<b>Total</b>	<b>12 935</b>	<b>32 803</b>	<b>3658</b>	<b>1582</b>	<b>58 122</b>	<b>1681</b>

WCKiK — Military Blood Transfusion Center; CKiK MSWiA — Blood Transfusion Center of Internal Affairs and Administration

percentage has decreased as compared to 2021, also in the case of the issued components (decrease from 2.84% to 2.76%).

The Centers are obliged to safeguard the supply of blood/blood components but to fulfill this task they need to cooperate with hospitals and such cooperation requires implementation of appropriate management procedures for blood and blood components in every hospital, taking into account the individual needs of patients. Furthermore, it is of utmost importance to establish constant and regular cooperation between physicians responsible for blood management, hospital transfusion committees and the Centers.

Depletion of blood and blood component supplies is associated with wastage which — though

sometimes inevitable — occurs for a number of reasons. In order to limit the extent of waste of blood and blood components some countries have implemented special procedures [41].

The most common causes of wastage in 2022 (just like in previous years) are included in the category of “other reasons”, in particular:

- inadequate visual control;
- incorrect/low volume;
- incorrect serological results, incorrect performance (procedures), medical deferral, mechanical damage, donor self-deferral etc.

The less frequent causes of waste were expiry date or positive results of viral tests.

Analysis of data related to quarantine and pathogen inactivated FFP and cryoprecipitate reve-

**Table 16.** Reasons for blood component wastage in Polish Blood Transfusion Centers in 2022

Reason	Whole blood	RBCs	PC therapeutic doses pooled from whole blood	PC therapeutic doses from apheresis	FFP	Cryoprecipitate
Expiry date	4	12 053	2094	435	12 582	109
Seropositive for transfusion transmitted diseases, syphilis tests, implementation of <i>look-back</i> procedure	28.3	2810	247	76	5076	13
Other causes including: • inadequate visual control • low quantity/volume • incorrect serological results • other, including incorrect procedures, medical deferral, mechanical damage, donor self-deferral etc.	12 965	17 907	1317	1072	40 363	1647
Unused blood components from autologous donations	0	33			101	
<b>Total</b>	<b>12 997</b>	<b>32 803</b>	<b>3658</b>	<b>1583</b>	<b>58 122</b>	<b>1769</b>

al that quarantine FFP is still the most commonly used component in clinical practice (75.25%). Although currently all Centers are equipped with PRT systems (some have two different systems) only 7 (in which the percentage of pathogen inactivated blood components exceeds 10%) make adequate use of the illuminators installed on their premises to inactivate PCs and plasma. Other centers pathogen inactivate only „trace amounts” of plasma and PCs. In 2022, all centers used pathogen inactivation systems for FFP however, in 4 Centers the percentage of inactivated FFP units decreased. For the remaining Centers the numbers of pathogen inactivated units of FFP were higher than in the previous year (eg. by 0.09 in Szczecin and 4.28% in Poznań). So far, only the Center in Warsaw had implemented pathogen inactivation of FFP on a large scale. In 2022 an increase was reported also in CKiK MSWiA (13.20%) and Poznań (17.51%). In the latter Center the percentage of FFP subjected to pathogen inactivation was the highest. In Warsaw the percentage was 16.90%. For components such as pooled PC and apheresis PC the percentage of pathogen inactivated units was in Warsaw the highest of all Centers (99.59% and 96.40% respectively). In 2021 the values were 15.91% for FFP, 99.21% for pooled PC 98.53% for apheresis PC. Although many Centers had two pathogen inactivation systems installed, the percentage of pathogen inactivated components was

still low. Pathogen inactivation of pooled PCs and apheresis PCs is still performed only by several Centers (pooled PCs by 8 Centers and apheresis PCs by 9 Centers). In 2022, 3 Centers stopped performing pathogen inactivation of apheresis PCs. Among 8 Centers which performed pathogen inactivation of pooled PCs, 5 reported an increase in the number of inactivated PCs as compared to 2021. Among the 9 Centers which performed pathogen inactivation of apheresis PCs, 5 reported an increase in the number of inactivated PCs as compared to 2021.

As in the previous years, most Centers did not make adequate use of pathogen inactivation systems implemented on their premises. The most likely reason is that physicians rarely make orders for pathogen inactivated FFP, cryoprecipitate and PCs. One reason for limited use of pathogen inactivated plasma is the easy access to quarantine FFP. Moreover, physicians who order components for clinical use are not always fully aware that pathogen inactivated plasma is much safer than quarantine plasma as it is the safeguard against a wide spectrum of pathogens other than HIV, HBV, HCV and syphilis and offers protection against the consequences of the „diagnostic window” (as is the case for quarantine plasma). It is also likely that not all physicians have adequate knowledge and awareness regarding TA-GVHD prophylaxis which may be due to insufficient information on

transfusion-related adverse reactions that are found in guidelines and regulations dedicated to some medical disciplines.

## Conclusions

The study is a brief presentation of selected issues related to the activities of the Polish Blood Transfusion Centers (Centers) in 2022, as well as of some recently recorded trends observed over an extended period of time. As compared to the previous years, some values related to the activity of the Polish blood transfusion service (including the number of donors, donations, blood components prepared and issued for clinical use) have increased which is most probably due to the weaker effect of the COVID-19 pandemic and then of the state of epidemic emergency. The above observations may serve as starting point for the analysis of issues related to the activities of healthcare units in the Polish blood transfusion service, for comparison of experience and development of optimal solutions for the future. Similar data reviews related to blood and blood components are systematically performed also in other countries.

## Current problems of blood transfusion service

Problems related to the declining number of donors, fewer whole blood donations as the main source of RBCs — the most common blood component — are currently a major challenge for the blood transfusion service. This was particularly noticeable during the COVID-19 pandemic. On the one hand, it is important to effectively manage donors (which is the task of blood transfusion service) as well as patients (which is the task of medical entities).

The solutions developed in the previous year are still relevant and involve the following important motions related to blood:

- implementation of additional precautions and safety measures in blood establishments;
- implementation of additional criteria for blood donor deferral;
- implementation of solutions for coping with new challenges related to predicted deficiencies in the supply of blood and blood components, emergency situations and development of principles for priority supply of blood for patients [42].

There are ongoing studies to assess the effective use of the available stock of blood components

and to restrict indication criteria for transfusion eg. lower hemoglobin level at which transfusion is indicated [43, 44].

It is interesting that in the United States, for example, after a several year period of decline in the number of donations (and therefore a lower number of RBC units), since 2019 a stabilization of both the amount of prepared RBCs and the number of units used for clinical purposes has been observed [45].

A limitation of the studies and study results is the inability to obtain data on the one hand from all Centers which collect blood and on the other — from medical entities that transfuse blood and blood components. One must also consider differences in the consumption of blood components by regions as well as medical specialties (e.g., pediatric or emergency medicine departments).

Of utmost importance are: proper management of blood donors, ensuring the safety of personnel in blood transfusion establishments as well as implementation and application of Patient Blood Management (PBM) principles in situations of crisis [46–48].

In the coming years, the focus of attention shall be to seek methods and solutions to encourage voluntary blood donation in the general population and to determine the amount of blood components ordered and used in the clinical wards. The lack of a unified database for collection of reliable data is one of the main obstacles for proper assessment of both the capabilities of a blood establishments as well as the needs of the medical entities. Implementation of the e-blood system which is currently developed should facilitate such assessment.

## Acknowledgements

The authors express their thanks to the National Blood Center and the Blood Transfusion Centers for access to the relevant information and for their support in the analysis of the forwarded data.

**Conflict of interest:** none declared









## References

1. Ustawa z dnia 22 sierpnia 1997 r. o publicznej służbie krwi (Dz. U. Nr 106, poz. 681 z późn. zmian.).
2. Osselaer JC, Cazenave JP, Lambermont M, et al. An active haemovigilance programme characterizing the safety profile of 7437 platelet transfusions prepared with amotosalen photochemical treatment. *Vox Sang.* 2008; 94(4): 315–323, doi: 10.1111/j.1423-0410.2007.01035.x, indexed in Pubmed: 18248574.

3. Schlenke P. Pathogen inactivation technologies for cellular blood components: an update. *Transfus Med Hemother*. 2014; 41(4): 309–325, doi: 10.1159/000365646, indexed in Pubmed: 25254027.
4. Grass JA, Wafa T, Reames A, et al. Prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease by photochemical treatment. *Blood*. 1999; 93(9): 3140–3147, indexed in Pubmed: 10216113.
5. Farmer S, Trentino K, Hofmann A, et al. A programmatic approach to patient blood management – reducing transfusions and improving patient outcomes. *The Open Anesthesiology Journal*. 2015; 9(1): 6–16, doi: 10.2174/1874321801509010006.
6. van Hoeven LR, Koopman MMW, Koffijberg H, et al. Historical time trends in red blood cell usage in the Netherland. *Intern J Clin Transf Med* 2016;4 67–77, doi: 10.2147/IJCTM.S103644.
7. Ellingson KD, et al. Sapiano MRP, Haass KA, Continued decline in blood collection and transfusion in the United States-2015. *Transfusion*. 2017; 57(suppl 2): 1588–1598, doi: 10.1111/trf.14165, indexed in Pubmed: 28591469.
8. Expert Consensus Statement on achieving self-sufficiency in safe blood and blood products, based on voluntary non-remunerated blood donation (VNRBD)\*. *Vox Sanguinis*. 2012; 103(4): 337–342, doi: 10.1111/j.1423-0410.2012.01630.x.
9. World Health Organization. Towards self-sufficiency in safe blood and blood products based on voluntary non-remunerated donation. *Global Status*. 2013.
10. Główny Urząd Statystyczny, Komitet Redakcyjny. *Rocznik demograficzny 2012*.
11. Główny Urząd Statystyczny. *Rocznik Demograficzny 2021*. <https://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/roczniki-statystyczne/roczniki-statystyczne/rocznik-demograficzny-2021,3,15.html>.
12. Główny Urząd Statystyczny. *Rocznik Demograficzny 2023*. [https://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/roczniki-statystyczne/roczniki-statystyczne/rocznik-demograficzny-2023\\_3,17.html](https://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/roczniki-statystyczne/roczniki-statystyczne/rocznik-demograficzny-2023_3,17.html).
13. Poglód R, Rosiek A, Grabarczyk P, Łętowska M. Charakterystyka podstawowych wskaźników dotyczących krwiodawstwa i krwiolecznictwa w Europie - aktualne wyzwania i działania. *J Transf Med*. 2015; 8(2): 60–77.
14. Mikołowska A, Antoniewicz-Papis J. Retrospektywna analiza wybranych aspektów działalności publicznej służby krwi jako punkt wyjścia do oceny stanu polskiego krwiodawstwa. Część 1: Charakterystyka struktury demograficznej zbiorowości dawców. *J Transf Med*. 2020; 13(1): 29–66.
15. Napp S, Petrić D, Busquets N. West Nile virus and other mosquito-borne viruses present in Eastern Europe. *Pathog Glob Health*. 2018; 112(5): 233–248, doi: 10.1080/20477724.2018.1483567, indexed in Pubmed: 29979950.
16. Grabarczyk P, Niczyporuk J, Czupryna P, et al. Rekomendacje dotyczące ograniczania przenoszenia wirusa Zachodniego Nilu (WNV) przez transfuzje krwi oraz jej składników na terenie Polski. *J Transf Med*. 2020; 13(4): 228–238.
17. Siński E. Pasożytnicze pierwotniaki krwi potencjalnym zagrożeniem bezpieczeństwa krwiodawstwa w świetle doniesień prezentowanych na konferencji „Aktualne problemy dotyczące czynników zakaźnych przenoszonych przez krew” (10 marca 2017 r., Warszawa). *J Transf Med*. 2017; 10(2): 67–72.
18. Stramer SL, Hollinger FB, Katz LM, et al. Emerging infectious disease agents and their potential threat to transfusion safety. *Transfusion*. 2009; 49 Suppl 2: 1S–29S, doi: 10.1111/j.1537-2995.2009.02279.x, indexed in Pubmed: 19686562.
19. Jimenez A, Shaz BH, Bloch EM. Zika Virus and the blood supply: what do we know? *Transfus Med Rev*. 2017; 31(1): 1–10, doi: 10.1016/j.tmr.2016.08.001, indexed in Pubmed: 27569055.
20. Rosiek A, Tomaszewska A, Lachert E, et al. Obniżone stężenie hemoglobiny najczęstszą przyczyną dyskwalifikacji krwiodawców na terenie Polski. *Acta Haematol Pol*. 2015; 46: 24, doi: 10.1016/j.achaem.2015.07.044.
21. Vuk T, Magnussen K, De Kort W, et al. International forum: an investigation of iron status in blood donors. *Blood Transfus*. 2017; 15(1): 20–41, doi: 10.2450/2016.0101-16, indexed in Pubmed: 27643753.
22. Goldman M, Magnussen K, Gorlin J, et al. International Forum regarding practices related to donor haemoglobin and iron. *Vox Sang*. 2016; 111(4): 449–455, doi: 10.1111/vox.12431, indexed in Pubmed: 27564140.
23. Vassallo R, Goldman M, Germain M, et al. BEST Collaborative. Preoperative autologous blood donation: waning indications in an era of improved blood safety. *Transfus Med Rev*. 2015; 29(4): 268–275, doi: 10.1016/j.tmr.2015.04.001, indexed in Pubmed: 26006319.
24. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM). Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components: recommendation No. R (95) 15, wyd. 21: 2023.
25. Główny Urząd Statystyczny. *Ludność. Stan i struktura ludności oraz ruch naturalny w przekroju terytorialnym*. <https://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/ludnosc/ludnosc/ludnosc-stan-i-struktura-ludnosc-i-raz-ruch-naturalny-w-przekroju-terytorialnym-2019,6,27.html> (31.12.2019).
26. Główny Urząd Statystyczny, Komitet Redakcyjny. *Rocznik demograficzny, 2017*.
27. Główny Urząd Statystyczny Komitet Redakcyjny. *Rocznik demograficzny, 2015*.
28. Główny Urząd Statystyczny, Komitet Redakcyjny. *Rocznik demograficzny, 2016*.
29. Rosiek A, Tomaszewska A, Lachert E, et al. Działalność jednostek organizacyjnych służby krwi w Polsce w 2015 roku. *J Transf Med*. 2016; 9(4): 1–18.
30. Rosiek A, Tomaszewska A, Lachert E, et al. Działalność jednostek organizacyjnych służby krwi w Polsce w 2016 roku. *J Transf Med*. 2017; 10(4): 113.
31. Rosiek A, Tomaszewska A, Lachert E, et al. Działalność jednostek organizacyjnych służby krwi w Polsce w 2017 roku. *J Transf Med*. 2018; 11(4): 113–130.
32. Rosiek A, et al. Tomaszewska A, Lachert E, Działalność jednostek organizacyjnych służby krwi w Polsce w 2018 roku. *J Transf Med*. 2019; 12(4): 127–143.
33. Rosiek A, Tomaszewska A, Lachert E, et al. Działalność jednostek organizacyjnych służby krwi w Polsce w 2019 roku. *J Transf Med*. 2020; 13(4): 195–211.
34. Rosiek A Tomaszewska A, Lachert E, et al. Działalność jednostek organizacyjnych służby krwi w Polsce w 2020 roku. *J Trans Med* 2021 (14); 4: 194–213.
35. Rosiek A, et al. Nieradkiewicz A., lachert E., Działalność jednostek organizacyjnych służby krwi w Polsce w 2021 roku. *J Transf Med*. 2022; 15(4): 273–295.
36. NICE. Blood transfusion. NICE guideline. [nice.org.uk/guidance/ng24](https://www.nice.org.uk/guidance/ng24) [Online] (18 November 2015).
37. Klein AA, Arnold P, Bingham RM, et al. AAGBI guidelines: the use of blood components and their alternatives 2016. *Anaesthe-*

- sia. 2016; 71(7): 829–842, doi: 10.1111/anae.13489, indexed in Pubmed: 27062274.
38. Senefeld JW, Franchini M, Mengoli C, et al. COVID-19 convalescent plasma for the treatment of immunocompromised patients: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Netw Open*. 2023; 6(1): e2250647, doi: 10.1001/jamanetworkopen.2022.50647, indexed in Pubmed: 36633846.
  39. Estcourt LJ. Why has demand for platelet components increased? A review. *Transfus Med*. 2014; 24(5): 260–268, doi: 10.1111/tme.12155, indexed in Pubmed: 25327286.
  40. Simancas-Racines D, Osorio D, Martí-Carvajal AJ, et al. Leukoreduction for the prevention of adverse reactions from allogeneic blood transfusion. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015; 2015(12): CD009745, doi: 10.1002/14651858.CD009745.pub2, indexed in Pubmed: 26633306.
  41. Heitmiller ES, Hill RB, Marshall CE, et al. Blood wastage reduction using Lean Sigma methodology. *Transfusion*. 2010; 50(9): 1887–1896, doi: 10.1111/j.1537-2995.2010.02679.x, indexed in Pubmed: 20456700.
  42. Stanworth SJ, New HV, Apelseth TO, et al. Effects of the COVID-19 pandemic on supply and use of blood for transfusion. *Lancet Haematol*. 2020; 7(10): e756–e764, doi: 10.1016/S2352-3026(20)30186-1, indexed in Pubmed: 32628911.
  43. Lu W, et al. Yazer M., Li N. Hospital red blood cell and platelet supply and utilization from March to December of the first year of the COVID-19 pandemic: The Best collaborative study. *Transfusion*. 2022; 62: 1559–1570.
  44. Ondrasik R, Khan J, Szczepiorkowski ZM, et al. Passive order auditing associated with reductions in red blood cell utilization: National blood shortage experience. *Transfusion*. 2022; 62: 1551–1558.
  45. Free RJ, Sapiano MRP, Chavez Ortiz JL, et al. Continued stabilization of blood collections and transfusions in the United States: Findings from the 2021 National Blood Collection and Utilization Survey. *Transfusion*. 2023; 63 Suppl 4(Suppl 4): S8–SS18, doi: 10.1111/trf.17360, indexed in Pubmed: 37070720.
  46. Baron DM, Franchini M, Goobie SM, et al. Patient blood management during the COVID-19 pandemic: a narrative review. *Anaesthesia*. 2020; 75(8): 1105–1113, doi: 10.1111/anae.15095, indexed in Pubmed: 32339260.
  47. Bolcato M, Russo M, Trentino K, et al. Patient blood management: The best approach to transfusion medicine risk management. *Transfus Apher Sci*. 2020; 59(4): 102779, doi: 10.1016/j.transci.2020.102779, indexed in Pubmed: 32359972.
  48. Shander A, Hardy JF, Ozawa S, et al. Collaborators. A Global definition of patient blood management. *Anesth Analg*. 2022; 135(3): 476–488, doi: 10.1213/ANE.0000000000005873, indexed in Pubmed: 35147598.

# Działalność jednostek organizacyjnych służby krwi w Polsce w 2022 roku

Aleksandra Rosiek , Anna Nieradkiewicz , Elżbieta Lachert ,  
 Jolanta Antoniewicz-Papis , Joanna Lasocka , Paulina Goczyńska ,  
 Agata Mikołowska , Magdalena Łętowska 

Zakład Transfuzjologii Instytutu Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

Artykuł jest tłumaczeniem pracy:

Rosiek A, Nieradkiewicz A, Lachert E et al. Blood transfusion service in Poland in 2022. J Transf Med 2023; 16 (4): 167–188.  
 DOI: 10.5603/jtm.99300. Należy cytować wersję pierwotną.

## Streszczenie

**Wstęp:** Celem niniejszego opracowania było przedstawienie podstawowych aspektów działalności jednostek organizacyjnych polskiej służby krwi w 2022 roku.

**Materiał i metody:** Analiza danych dostarczonych przez Centra Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (CKiK).

**Wyniki:** W 2022 roku na terenie Polski działało 23 CKiK i 135 oddziałów terenowych (OT). Przeprowadzono 12 089 ekip wyjazdowych. Krew oddawało 621 936 osób, spośród których większość stanowili dawcy honorowi (621 715, w tym 31 243 dawców „na apel”), ponadto 31 dawców płatnych i 247 autologicznych. Najczęściej pobierano krew pełną (1 289 164 donacji), najrzadziej — koncentrat granulocytarny (111 donacji) i KKCz pobierany metodą aferezy jako jedyny składnik (15 donacji). Krew pełną pobierano przede wszystkim w OT (50,19%), rzadziej w siedzibach CKiK (30,25%) i w czasie ekip wyjazdowych (19,56%). Najczęściej otrzymywane składniki krwi to KKCz (1 266 346 j.) i FFP (1 537 211 j.). Osocze od ozdrowieńców COVID-19 pozyskiwano w 2022 roku sporadycznie (339 j.). W 2022 roku otrzymano w sumie 90 009 opakowań zlewanego KKP i 52 957 opakowań KKP metodą aferezy.

Dodatkowe metody preparatyki (usuwanie leukocytów, napromieniowanie) stosowano przede wszystkim w stosunku do KKP (44,74% UKKP, 55,26% NUKKP), rzadziej KKCz (23,06% UKKCz, 10,38% NUKKCz i 0,05% NKKCz). Inaktywacji czynników zakaźnych poddano łącznie około 24,73% wydanych do szpitali jednostek FFP i 12,70% opakowań KKP.

W 2022 roku z różnych przyczyn zniszczono 12 935 j. KKP, 32 803 j. KKCz, 58 122 j. FFP, 1582 opakowań KKP z aferezy, 3658 opakowań zlewanego KKP, a także 1681 j. krioprecypitatu.

W 2022 roku nastąpił wzrost wartości większości analizowanych wskaźników charakteryzujących działalność służby krwi w Polsce w porównaniu z latami 2020–2021.

**Wnioski:** Przedstawione w niniejszym opracowaniu dane wskazują na mniejszy niż w latach 2019–2021 wpływ pandemii COVID-19 na funkcjonowanie krwiodawstwa i krwiolecznictwa w Polsce w 2022 roku. Dane te mogą służyć jako punkt wyjścia do analizy zagadnień zwią-

**Adres do korespondencji:** dr n. med. Aleksandra Rosiek, Zakład Transfuzjologii Instytutu Hematologii i Transfuzjologii, ul. I. Gandhi 14, 02–776 Warszawa, tel.: 22 349 63 91, faks: 22 349 63 76, e-mail: arosiek@ihit.waw.pl

Nadesłano: 21.11.2023

Przyjęto do druku: 21.12.2023

Data pierwszej publikacji: 31.12.2023

Artykuł jest dostępny bezpłatnie na podstawie licencji Creative Commons Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) umożliwiającej jego pobranie oraz udostępnianie pod warunkiem wskazania autorstwa i wydawcy. Niedopuszczalne jest wprowadzanie jakichkolwiek zmian lub wykorzystanie komercyjne bez zgody wydawcy.

*zanych z funkcjonowaniem jednostek organizacyjnych polskiej służby krwi, do porównania doświadczeń oraz oceny stosowanych metod działania w celu wypracowania optymalnych rozwiązań.*

**Słowa kluczowe:** krwiodawcy; krwiodawstwo; składniki krwi; COVID-19

*J. Transf. Med. 2023; 16: 189–210*

## Wstęp

Podstawę prawną działalności publicznej służby krwi w Polsce stanowi ustawa z dnia 22 sierpnia 1997 roku o publicznej służbie krwi [1]. Zgodnie z tą ustawą, do pobierania krwi i oddzielania jej składników są uprawnione następujące jednostki publicznej służby krwi: Regionalne Centra Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (RCKiK), Wojskowe Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa, podległe Ministerstwu Obrony (WCKiK) oraz Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa MSWiA, podległe Ministerstwu Spraw Wewnętrznych i Administracji (CKiK MSWiA). Nadzór merytoryczny nad wszystkimi wymienionymi jednostkami publicznej służby krwi pełni Instytut Hematologii i Transfuzjologii (IHIT).

W tegorocznym, piętnastym już opracowaniu przedstawiono wybrane zagadnienia związane z działalnością publicznej służby krwi w Polsce w minionym roku, przy uwzględnieniu niektórych uwarunkowań związanych z trwającą w pierwszej połowie roku pandemią COVID-19. Omówiono w szczególności liczbę dawców, liczbę donacji, miejsca pobierania krwi pełnej i jej składników, w tym koncentratu krwinek czerwonych (KKCz), osocza świeżo mrożonego (FFP, *fresh frozen plasma*), koncentratu krwinek płytkowych (KKP) i koncentratu granulocytarnego (KG) w 2022 roku. Ponadto omówiono kwestie związane z zastosowaniem niektórych dodatkowych metod preparatyki, a także z inaktywacją biologicznych czynników chorobotwórczych w labilnych składnikach krwi. Przedstawiono również skalę i najczęstsze przyczyny zniszczeń składników krwi.

## Materiał i metody

W niniejszej pracy wykorzystano dane dostarczone przez 21 Regionalnych Centrów Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (RCKiK), WCKiK, CKiK MSWiA w postaci rocznych sprawozdań z działalności w 2022 roku. W celu ujednoczenia przysyłanych danych zastosowano szczegółowy formularz opracowany przez IHIT wspólnie z Naro-

dowym Centrum Krwi (NCK) wraz z objaśnieniami stosowanych pojęć.

**Dawca pierwszorazowy** — osoba, która w okresie sprawozdawczym oddała krew, a wcześniej nie oddawała krwi do celów leczniczych.

**Dawca wielokrotny stały (regularny)** — osoba systematycznie oddająca krew (przynajmniej 2 razy w ciągu ostatnich 24 miesięcy).

**Dawca wielokrotny powtórny** — osoba, która oddała ponownie krew w okresie dłuższym niż 2 lata od ostatniej donacji.

**Dawca honorowy** — osoba, która chociaż raz w okresie sprawozdawczym nie otrzymała wynagrodzenia za oddaną krew/jej składniki.

**Dawca płatny** — osoba, która za wszystkie donacje w okresie sprawozdawczym otrzymała ekwiwalent pieniężny.

**Dawca „na apel”** — osoba, która w okresie sprawozdawczym przynajmniej raz oddawała krew/jej składniki „na rzecz” określonej osoby lub grupy osób (dotyczy również osób określanych dawniej jako „dawcy rodzeni”).

**Dawca krwi typowanej** — osoba, która w okresie sprawozdawczym chociaż raz oddała krew dobieraną dla konkretnego pacjenta.

**Dawca autologiczny** — osoba, która w okresie sprawozdawczym oddawała krew/jej składniki wyłącznie dla własnych potrzeb klinicznych.

**Donacja** — pobranie krwi pełnej, pobranie składników krwi metodą aferezy, w tym pobranie krwi do celów klinicznych, naukowych, od dawców immunizowanych, rodzinnych itp.

**Jednostka (j.)** — ilość krwi pełnej konserwowanej, uzyskana w wyniku pobrania 450 ml krwi od dawcy lub ilość składnika krwi uzyskana z jednostki krwi pełnej konserwowanej.

**Jednostka osocza** — osocze uzyskane z krwi pełnej lub w wyniku plazmaferezy automatycznej. W jednym zabiegu plazmaferezy automatycznej otrzymuje się 3 j. osocza (600 ml).

**Jednostka KKP z aferezy** — krwinki płytkowe uzyskane przy użyciu separatora komórkowego od jednego dawcy (1 donacja niezależnie od liczby pobranych krwinek płytkowych).



**Opakowanie KKP do celów klinicznych** — przeznaczony dla osoby dorosłej preparat KKP (zlewany lub z aferezy) zawierający zgodnie z obowiązującymi wytycznymi dawkę terapeutyczną krwinek płytkowych, czyli  $\geq 3 \times 10^{11}$ .

## Wyniki

### Centra Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa

W 2022 roku na terenie Polski działało 23 CKiK oraz 135 oddziałów terenowych (OT). Ponadto przeprowadzono 12 089 ekip wyjazdowych, czyli o około 8,42% więcej niż w roku poprzednim. Ekipy wyjazdowe organizowały w 2022 roku wszystkie RCKiK oraz WCKiK. Najwięcej ekip zorganizowało RCKiK w Łodzi (1672). Ponad 1000 ekip zorganizowały również RCKiK w Katowicach (1085) i w Warszawie (1131). W porównaniu z rokiem poprzedzającym liczba ekip wzrosła w 19 RCKiK, a zmniejszyła się w 3 RCKiK (tab. 1).

### Dawcy

W 2022 roku do CKiK w celu oddania krwi zgłosiło się 711 801 osób (w 2021 r. — 703 958), jednak tylko część z nich — 621 936 osób ostatecznie oddało krew (w 2021 r. — 615 784).

Krew lub jej składniki do celów klinicznych oddawało zatem łącznie około 87% zgłaszających się (podobnie jak w latach poprzednich). Różnica między liczbą osób zgłaszających się w celu oddania krwi i faktycznie ją oddających wynikała w znacznej mierze z dyskwalifikacji części potencjalnych krwiodawców. W 2022 roku zdyskwalifikowano na stałe 9061 osób. Zastosowano również 224 128 dyskwalifikacji tymczasowych u 189 646 osób, przy czym najczęstszą ich przyczyną (74 236 przypadków dyskwalifikacji) było, podobnie jak w latach poprzednich, obniżone stężenie hemoglobiny.

Zastosowano również 558 dyskwalifikacji czasowych z powodu różnych okoliczności związanych z pandemią COVID-19 (w tym z powodu przebycia choroby, kwarantanny, kontaktu z osobą zakażoną) i 81 dyskwalifikacji z powodu szczepień przeciw COVID-19. Liczba dyskwalifikacji z tych przyczyn była jednak znacznie mniejsza niż w 2021 roku (3882, w tym 1802 szczepienia).

Większość krwiodawców stanowili dawcy honorowi (621 715 osób). W 2022 roku krew i jej składniki oddawało również 31 dawców płatnych i 247 autologicznych. Wśród dawców honorowych 31 243 osób oddało krew „na apel”, a 67 jako dawcy krwi typowanej.

W 20 CKiK krew oddawali wyłącznie dawcy honorowi, najwięcej osób oddawało krew odpłatnie w RCKiK w Gdańsku (28).

Wśród osób oddających krew i jej składniki było 135 962 (21,86%) dawców pierwszorazowych, 399 172 (64,18%) dawców wielokrotnych stałych i 86 802 (13,96%) dawców wielokrotnych powtórných.

W 17 CKiK obserwowano wzrost (od 0,11 do 9,67%), a w 6 — spadek liczby dawców (od 0,02 do 10,15%). Liczbę dawców w poszczególnych CKiK w 2022 roku przedstawiono w tabeli 2.

Najliczniejszą grupę krwiodawców stanowiły, jak w latach poprzednich, osoby w wieku 18–44 lat (łącznie 509 818 osób, w tym 128 481 kobiet i 381 337 mężczyzn).

### Donacje

W 2022 roku najczęściej pobierano krew pełną (1 289 164 donacji), natomiast najrzadziej pobieranymi składnikami krwi były: koncentrat granulocytarny (111 donacji w 5 RCKiK) i KKCz pobierany metodą aferezy jako jedyny składnik (15 donacji w 2 RCKiK). Podobnie jak w latach poprzednich, największą liczbę pobrań krwi pełnej przeprowadzono w RCKiK w Warszawie (112 595) i w Katowicach (123 610). Metodą aferezy pobierano przede wszystkim KKP (13 609 donacji) i osocze (80 065 donacji). Najwięcej donacji osocza metodą aferezy wykonano w RCKiK w Kaliszu (15 773), a donacji KKP metodą aferezy — w RCKiK w Warszawie (2640).

Przeprowadzano również donacje metodą aferezy dwóch składników krwi jednocześnie, przede wszystkim KKP i osocza (27 847 donacji), najwięcej w RCKiK w Warszawie (8410 donacji), znacznie rzadziej KKP i KKCz (214 donacji) — niemal wyłącznie w RCKiK we Wrocławiu (200 donacji).

Szczegółowe zestawienie liczby pełnych donacji krwi i jej składników w 2022 roku przedstawiono w tabeli 3.

Krew pobierano przede wszystkim w OT (50,19% donacji krwi pełnej), rzadziej w siedzibach CKiK (30,25%) i w czasie ekip wyjazdowych (19,56%). Podobnie jak w latach poprzednich, proporcjonalnie najwięcej donacji krwi pełnej — 49,18% — miało miejsce w czasie ekip wyjazdowych organizowanych przez RCKiK w Wałbrzychu. Szczegółowe zestawienie miejsc pobierania krwi pełnej w 2022 roku przedstawiono w tabeli 4.

**Tabela 1.** Liczba ekip wyjazdowych w poszczególnych CKiK w latach 2021 i 2022

CKiK	Liczba ekip wyjazdowych		Tendencja (wzrost/spadek w porównaniu z 2021 r.)
	2021 rok	2022 rok	
Białystok	581	636	↑
Bydgoszcz	770	782	↑
Gdańsk	201	205	↑
Kalisz	413	428	↑
Katowice	1273	1085	↓
Kielce	206	331	↑
Kraków	712	834	↑
Lublin	403	439	↑
Łódź	1267	1672	↑
Olsztyn	511	530	↑
Opole	154	176	↑
Poznań	717	849	↑
Racibórz	113	131	↑
Radom	399	431	↑
Rzeszów	304	217	↓
Słupsk	131	206	↑
Szczecin	359	383	↑
Wałbrzych	965	832	↓
Warszawa	1048	1131	↑
Wrocław	227	236	↑
Zielona Góra	201	205	↑
WCKiK	195	350	↑
CKiK MSWiA	0	0	bz
<b>Razem</b>	<b>11 150</b>	<b>12 089</b>	<b>↑</b>

↓ — spadek w stosunku do 2021 roku; ↑ — wzrost w stosunku do 2021 roku; bz — bez zmian w stosunku do 2021 roku

## Składniki krwi

### Koncentrat krwinek czerwonych

Z krwi pobranej od dawców otrzymywano składniki krwi, w tym przede wszystkim KKCz (łącznie 1 266 346 j.), co w skali kraju oznaczało nieznaczny wzrost w porównaniu z rokiem poprzednim (1 231 538 j.). Podobnie jak w latach poprzednich, najwięcej KKCz otrzymano w RCKiK w Katowicach i w Warszawie (odpowiednio 122 796 j. i 112 300 j.) (tab. 5). W większości (19) CKiK odnotowano wzrost liczby uzyskanych KKCz.

Część jednostek KKCz poddawano dodatkowej preparatyce. Najczęściej było to usuwanie leukocytów oraz napromieniowanie.

W 2022 roku uzyskano ogółem 292 065 j. ubogoleukocytarnego koncentratu krwinek czerwonych (UKKCz), co stanowiło 23,06% wszystkich

otrzymanych j. KKCz oraz 131 387 j. ubogoleukocytarnego napromieniowanego koncentratu krwinek czerwonych (NUKKCz) — 10,38%. Sporadycznie stosowano tylko napromieniowanie KKCz, uzyskując 619 j. napromieniowanego koncentratu krwinek czerwonych (NKKCz) — 0,05% wszystkich otrzymanych j. KKCz.

Łącznie w skali kraju poddano eliminacji leukocytów 33,44% wszystkich j. KKCz, a napromieniowaniu — 10,42% KKCz. Szczegółowe zestawienie liczby jednostek NKKCz i UKKCz uzyskanych przez poszczególne CKiK w 2022 roku przedstawiono w tabeli 6.

### Koncentrat krwinek płytkowych

Drugim co do częstości otrzymywania komórkowym składnikiem krwi był, podobnie jak w latach poprzednich, koncentrat krwinek płytko-

**Tabela 2.** Liczba dawców w poszczególnych CKiK w 2022 roku

CKiK	Liczba dawców				Tendencja (wzrost/spadek całkowitej liczby dawców w porównaniu z 2021 r.)
	Pierwszorazowych	Wielokrotnych stałych	Wielokrotnych powtórnych	Razem	
Białystok	4255	20 954	4225	29 434	↑
Bydgoszcz	6746	24 098	5292	36 136	↑
Gdańsk	5822	19 472	4003	29 297	↑
Kalisz	3955	15 867	2883	22 705	↑
Katowice	9575	36 254	6841	52 670	↓
Kielce	3974	10 419	3006	17 399	↑
Kraków	11 260	32 545	7314	51 119	↑
Lublin	6425	19 264	4414	30 103	↑
Łódź	9327	22 283	6815	38 425	↑
Olsztyn	5999	12 430	992	19 421	↑
Opole	2573	10 108	1812	14 493	↑
Poznań	14166	28 489	4296	46 951	↑
Racibórz	1943	9268	1994	13 205	↑
Radom	2473	7557	1803	11 833	↓
Rzeszów	5397	21 778	3956	31 131	↑
Słupsk	2392	5926	1531	9849	↑
Szczecin	5389	14 969	3499	23 857	↑
Wałbrzych	2605	8383	1437	12 425	↓
Warszawa	12351	36 853	9222	58 426	↓
Wrocław	7849	23 758	5317	36 924	↓
Zielona Góra	3147	7612	3774	14 533	↓
WCKiK	6750	8487	2348	17 585	↑
CKiK MSWiA	1589	2398	28	4015	↑
<b>Razem</b>	<b>135 962</b>	<b>399 172</b>	<b>86 802</b>	<b>621 936</b>	<b>↑</b>

↓ — spadek w stosunku do 2021 roku; ↑ — wzrost w stosunku do 2021 roku

wych. W celu jego przygotowania stosowano dwie podstawowe metody:

- odpowiednie odwirowanie krwi pełnej pochodzącej z tradycyjnych donacji, a następnie — w razie potrzeby — łączenie kilku jednostek tak uzyskanego KKP w celu otrzymania tzw. koncentratu zlewanego. Część CKiK stosowało w tym celu metody zautomatyzowane;
- metodą aferezy przy użyciu separatorów komórkowych (do celów klinicznych część uzyskanych w ten sposób jednostek KKP była dzielona na mniejsze opakowania); KKP uzyskane metodą aferezy przy użyciu nowoczesnych separatorów są ubogoleukocytarne i nie wymagają dodatkowej eliminacji leukocytów.

W 2022 roku przygotowano ogółem 90 009 opakowań zlewanego KKP (w 2021 r. — 85 677),

w tym z kożuszka leukocytarno-platekowego metodą manualną 52 110 opakowań, natomiast metodami zautomatyzowanymi — 37 899 opakowań.

Metodą aferezy uzyskano w 2022 roku 52 957 opakowań KKP, tj. 37,04% wszystkich opakowań KKP do użytku klinicznego (w 2021 r. — 37,93%).

Najwięcej KKP z krwi pełnej uzyskano w Katowicach (10 726 opakowań) i w Poznaniu (10 360 opakowań), natomiast przy użyciu metody aferezy — w Warszawie (11 125).

Odsetek KKP otrzymanego metodą aferezy różnił się znacznie w poszczególnych CKiK — od 1,80% w Zielonej Górze do 71,47% w Warszawie i 84,36% w Białymstoku (tab. 7).

Od początku 2021 roku w Polsce są wydawane do stosowania klinicznego wyłącznie ubogoleukocytarne KKP; część jednostek KKP poddawana jest

**Tabela 3.** Donacje krwi pełnej i jej składników (metodą aferezy) w 2022 roku\*

CKiK	Krew pełna	Afereza						Razem
		Osocze	KKCz	KKP	KG	KKP + osocze	KKP + KKCz	
Białystok	59 945	12 551	0	100	1	2094	0	74 691
Bydgoszcz	73 144	9784	1	883	15	0	0	83 827
Gdańsk	65 024	1582	0	357	0	109	0	67 072
Kalisz	44 376	15 773	0	0	0	427	0	60 576
Katowice	123 610	191	0	734	0	5230	0	129 765
Kielce	33 936	1367	0	785	0	0	0	36 088
Kraków	110 462	1309	0	1820	63	0	0	113 654
Lublin	61 253	6061	0	0	0	1943	0	69 257
Łódź	76 865	1179	0	1480	18	0	0	79 542
Olsztyn	40 746	1856	0	351	0	108	0	43 061
Opole	31 983	1163	0	723	0	165	0	34 034
Poznań	100 829	6543	0	0	0	1566	0	108 938
Racibórz	26 294	5242	0	0	0	397	0	31 933
Radom	23 278	2628	0	16	0	880	0	26 802
Rzeszów	67 860	4506	0	1887	0	91	0	74 344
Słupsk	19 784	1005	14	29	0	227	14	21 073
Szczecin	50 153	1061	0	5	0	940	0	52 159
Wałbrzych	27 604	274	0	26	0	196	0	28 100
Warszawa	112 595	1141	0	2640	14	8410	0	124 800
Wrocław	69 909	4641	0	1669	0	5 003	200	81 422
Zielona Góra	31 867	206	0	0	0	61	0	32 134
WCKiK	30 390	1	0	54	0	0	0	30 445
CKiK MSWiA	7257	1	0	50	0	0	0	7308
<b>Razem</b>	<b>1 289 164</b>	<b>80 065</b>	<b>15</b>	<b>13 609</b>	<b>111</b>	<b>27 847</b>	<b>214</b>	<b>1 411 025</b>

\*Tylko pełne donacje

również napromieniowaniu. W 2022 roku uzyskano ogółem 63 958 opakowań ubogoleukocytarnego koncentratu krwinek płytkowych (UKKP), co stanowiło 44,74% wszystkich otrzymanych opakowań KKP, oraz 79 008 opakowań napromieniowanego ubogoleukocytarnego koncentratu krwinek płytkowych (NUKKP) — 55,26%.

Szczegółowe zestawienie liczby UKKP i NUKKP uzyskanych przez poszczególne CKiK w 2022 roku przedstawiono w tabeli 8.

Do celów klinicznych CKiK wydały w 2022 roku łącznie 138 594 opakowań KKP (w 2015 r. — 114 163, w 2016 r. — 118 391, w 2017 r. — 123 668, w 2018 r. — 127 049, w 2019 r. — 129 652, a w 2020 r. — 120 858, w 2021 r. — 130 865), zatem

Tabela 4. Miejsca pobrań krwi pełnej w 2022 roku

CKiK	Pobrano KPK (j.) *						
	W CKiK		W OT		W czasie ekip		Razem
	J.	%	J.	%	J.	%	J.
Białystok	27 081	44,91	19 351	32,09	13 871	23,00	60 303
Bydgoszcz	18 851	25,61	30 578	41,54	24 178	32,85	73 607
Gdańsk	21 940	33,51	38 407	58,66	5125	7,83	65 472
Kalisz	9872	22,12	20 239	45,35	14 513	32,52	44 624
Katowice	23 475	18,65	80 497	63,96	21 892	17,39	125 864
Kielce	14 531	42,54	10 563	30,93	9062	26,53	34 156
Kraków	25 560	22,98	63 874	57,43	21 789	19,59	111 223
Lublin	15 575	25,15	35 545	57,40	10 807	17,45	61 927
Łódź	29 992	38,58	32 782	42,17	14 959	19,24	77 733
Olsztyn	13 179	32,03	17 569	42,69	10 404	25,28	41 152
Opole	7168	22,36	21 766	67,90	3123	9,74	32 057
Poznań	27 898	27,15	56 746	55,23	18 103	17,62	102 747
Racibórz	3937	14,82	19 552	73,62	3069	11,56	26 558
Radom	13 489	57,66	1975	8,44	7932	33,90	23 396
Rzeszów	16 362	23,92	47 068	68,81	4973	7,27	68 403
Słupsk	11 294	55,86	5454	26,98	3469	17,16	20 217
Szczecin	21 758	43,15	19 637	38,95	9027	17,90	50 422
Wałbrzych	14 246	50,82	0	0,00	13 785	49,18	28 031
Warszawa	25 457	22,35	62 494	54,86	25 964	22,79	113 915
Wrocław	33 130	46,89	30 428	43,06	7104	10,05	70 662
Ziel. Góra	10 405	32,40	17 503	54,50	4209	13,11	32 117
WCKiK	1632	5,29	21 793	70,63	7432	24,09	30 857
CKiK MSWiA	7300	100,00	0	0,00	0	0,00	7 300
<b>Razem</b>	<b>394 132</b>	<b>30,25</b>	<b>653 821</b>	<b>50,19</b>	<b>254 790</b>	<b>19,56</b>	<b>1 302 743</b>

\*Łącznie z niepełnymi donacjami

po odnotowanym w 2020 roku spadku zużycia KKP nastąpił dalszy jego wzrost.

Część otrzymanych UKKP przechowywano następnie w stanie zamrożenia (mrożony koncentrat krwinek płytkowych — MUKKP).

W 2022 roku zamrożono łącznie 3,71% pobranych jednostek KKP (1,94% zlewanych KKP, 6,78% KKP z aferezy).

W 2022 roku ponownie nastąpił niewielki wzrost odsetka składników mrożonych (o 0,93%),

pomimo tego, że od kilku lat obserwowano zmniejszenie odsetka zamrażanych KKP. Nastąpiło zwiększenie odsetka mrożonych KKP z aferezy (o 2,1%) i w przypadku preparatów zlewanych (o 0,12%). W większości CKiK obserwuje się w kolejnych latach zbliżony odsetek zamrażanych KKP. Występuje jednak znaczące zróżnicowanie tego wskaźnika pomiędzy poszczególnymi CKiK — w 2022 roku od 0% w Kaliszu, Poznaniu i WCKiK, do 11,60% w Słupsku (spadek o 0,51% w stosunku do

**Tabela 5.** Liczba jednostek KKCz otrzymanych w 2022 roku w poszczególnych CKiK

CKiK	Liczba jednostek KKCz	Tendencja (wzrost/spadek w porównaniu z 2021 r.)
Białystok	59 923	↑
Bydgoszcz	73 103	↑
Gdańsk	64 822	↑
Kalisz	41 069	↑
Katowice	122 796	↑
Kielce	33 881	↑
Kraków	110 330	↑
Lublin	61 115	↑
Łódź	76 471	↑
Olsztyn	40 687	↑
Opole	31 922	↑
Poznań	93 163	↑
Racibórz	26 234	↓
Radom	22 883	↓
Rzeszów	66 345	↑
Słupsk	19 784	↑
Szczecin	50 126	↑
Wałbrzych	27 604	↑
Warszawa	112 300	↓
Wrocław	62 082	↑
Zielona Góra	31 819	↑
WCKiK	30 642	↓
CKiK MSWiA	7245	↑
<b>Razem</b>	<b>1 266 346</b>	<b>↑</b>

↓ — spadek w stosunku do 2021 roku; ↑ — wzrost o w stosunku do 2021 roku

2021 r.), 17,26% w Wałbrzychu (wzrost o 3,42%), 35,88% w Opolu (wzrost o 12,59%), 43,26% w Radomiu (wzrost o 24,46%) oraz 56,18% w Raciborzu (wzrost o 5,28%). W przeciwieństwie do lat poprzednich w przypadku Opola, Radomia i Wałbrzycha stwierdzono wzrost odsetka zamrażanych KKP. W Raciborzu, podobnie jak w poprzednich

latach, stwierdzono największy odsetek zamrażanych zlewanych KKP (57,89%, spadek o 11,49%). W Wałbrzychu, Radomiu, Raciborzu, Słupsku, Zielonej Górze i CKiK MSWiA stwierdzono natomiast największy odsetek mrożonych preparatów z aferezy, odpowiednio 72,98%, 70,65%, 54,19%, 53,09%, 46,67% i 28,0%. Jednocześnie należy zauważyć, że w Zielonej Górze pobrano tylko 60 preparatów KKP z aferezy, a 28 z nich zamrożono, a w CKiK MSWiA pobrano 50 preparatów, a zamrożono 7, stąd tak wysoki odsetek mrożonych KKP z aferezy.

W 2022 roku rozmrożone MKKP stanowiły 2,76% wszystkich wydanych do użytku klinicznego jednostek KKP, tj. o 0,08% mniej niż w 2021 roku. Najwięcej rozmrożonych jednostek wydał Racibórz (45,27% wszystkich wydanych preparatów), Opole (24,91%), Radom (23,20%), Wałbrzych (15,45%) oraz Słupsk (10,02%). Tylko RCKiK w Kaliszu i w Poznaniu nie wydawały rozmrożonych KKP do użytku klinicznego.

### Osocze świeżo mrożone

W 2022 roku otrzymano ogółem 1 537 211 j. FFP (w 2019 r. — 1 373 514 j., w 2020 r. — 1 264 654, a w 2021 r. — 1 425 640 j.). Podstawową metodą otrzymywania FFP była, jak w latach poprzednich, metoda manualna, tj. pozyskiwanie osocza z krwi pełnej konserwowanej. Metodą tą uzyskano w 2022 roku 1 247 356 j. FFP, natomiast przy użyciu rzadziej stosowanej w tym celu metody aferezy uzyskano 289 855 j., czyli 18,86% całości (w 2021 r. — 232 001 j., czyli 16,27% całości). Jest to zatem kontynuacja trwającej od kilku lat tendencji wzrostowej.

Odsetek FFP otrzymanego metodą aferezy był różny w poszczególnych CKiK (największy w RCKiK w Kaliszu — 54,16% i w Białymstoku — 46,82%).

Liczbę jednostek FFP otrzymanych metodą manualną i metodą aferezy w poszczególnych CKiK w 2022 roku przedstawiono w tabeli 9.

Do celów klinicznych wydano łącznie 252 332 j. FFP, czyli więcej niż w 2021 roku (246 013 j.), jednak nadal mniej niż w 2019 roku (273 519 j. FFP). Liczba j. FFP wydanych do celów klinicznych wzrosła w porównaniu z rokiem poprzedzającym w większości (17) CKiK (tab. 10).

### Osocze od ozdrowieńców COVID-19

Osocze od ozdrowieńców COVID-19 pozyskiwano w 2022 roku znacznie rzadziej niż w latach poprzednich. Otrzymano łącznie 339 j. takiego osocza (w 2021 r. i 2020 r. — odpowiednio 87 071 j. i 57 708 j.). Osocze od ozdrowieńców pobierało

**Tabela 6.** Liczba jednostek ubogoleukocytarnego koncentratu krwinek czerwonych (UKKCz), napromieniowanego koncentratu krwinek czerwonych (NKKCz) i napromieniowanego ubogoleukocytarnego koncentratu krwinek czerwonych (NUKKCz) wytworzonych w poszczególnych CKiK w 2022 roku

CKiK	Liczba jednostek UKKCz	Liczba jednostek NKKCz	Liczba jednostek NUKKCz
Białystok	1780	0	7164
Bydgoszcz	3371	0	12 325
Gdańsk	1953	3	19 533
Kalisz	38 402	0	759
Katowice	41 455	3	7248
Kielce	6240	0	3903
Kraków	9254	289	7527
Lublin	8813	7	10 532
Łódź	9100	26	14 017
Olsztyn	4458	0	4874
Opole	4204	0	606
Poznań	38 586	4	8106
Racibórz	2654	0	43
Radom	1944	0	82
Rzeszów	323	56	7851
Słupsk	1398	0	1791
Szczecin	1344	218	2531
Wałbrzych	2670	0	0
Warszawa	96 638	0	9124
Wrocław	3993	13	10 747
Zielona Góra	3453	0	2563
WCKiK	3073	0	61
CKiK MSWiA	6960	0	0
<b>Razem</b>	<b>292 065</b>	<b>619</b>	<b>131 387</b>

6 CKiK, przy czym najwięcej (173 j.) pozyskano w RCKiK w Warszawie. Do celów klinicznych wydano 590 j. osocza od ozdrowieńców (w 2021 r. — 58 670 j., a w 2020 r. — 25 868 j.). Szczegółowe zestawienie liczby jednostek osocza uzyskanych od ozdrowieńców COVID-19 i wydanych do celów klinicznych przez poszczególne CKiK w 2022 roku przedstawiono w tabeli 11.

### ***Koncentrat granulocytarny***

Podobnie jak w latach poprzednich, koncentrat granulocytarny otrzymywano w 2022 roku bardzo rzadko (111 donacji w 5 RCKiK), jednak częściej niż w 2021 roku (104 donacje) i w 2020 roku (82 donacje). Najwięcej donacji KG miało miejsce w Krakowie (63) i w Łodzi (18).

**Tabela 7.** Otrzymywanie koncentratu krwinek płytkowych (KKP) z krwi pełnej i metodą aferezy w 2022 roku

CKiK	KKP (opakowania)			
	Zlewane (otrzymane z krwi pełnej)	Otrzymane metodą aferezy	Razem	% KKP z aferezy
Białystok	1215	6554	7769	84,36
Bydgoszcz	8423	1060	9483	11,18
Gdańsk	5771	964	6735	14,31
Kalisz	1767	745	2512	29,66
Katowice	10 726	7310	18 036	40,53
Kielce	3140	927	4067	22,79
Kraków	8688	2456	11 144	22,04
Lublin	4763	2059	6822	30,18
Łódź	4650	1494	6144	24,32
Olsztyn	3750	562	4312	13,03
Opole	486	888	1374	64,63
Poznań	10 360	2774	13 134	21,12
Racibórz	596	513	1109	46,26
Radom	578	913	1491	61,23
Rzeszów	6632	2026	8658	23,40
Słupsk	1202	307	1509	20,34
Szczecin	3705	1251	4956	25,24
Wałbrzych	1797	248	2045	12,13
Warszawa	4442	11125	15 567	71,47
Wrocław	3738	8617	12 355	69,75
Zielona Góra	3273	60	3273	1,80
WCKiK	154	54	208	25,96
CKiK MSWiA	153	50	203	24,63
<b>Razem</b>	<b>90 009</b>	<b>52 957</b>	<b>142 966</b>	<b>37,04</b>

### Karencjonowanie i inaktywacja biologicznych czynników chorobotwórczych w labilnych składnikach krwi

W Polsce do celów klinicznych stosuje się wyłącznie FFP i krioprecypitat poddane karencji<sup>1</sup> lub inaktywacji czynników chorobotwórczych. Aktualnie w jednostkach organizacyjnych pub-

licznej służby krwi do przeprowadzenia procesu inaktywacji używa się trzech systemów: Theraflex MB Plasma (metoda z błękitem metylenowym), za pomocą którego można inaktywować czynniki chorobotwórcze w osoczu, oraz systemy: Mirasol PRT (metoda z ryboflawiną) i Intercept (metoda z chlorowodorkiem amotosalenu), za pomocą któ-

<sup>1</sup> Karencjonowanie FFP i krioprecypitatu polega na przechowywaniu składników krwi przez co najmniej 16 tygodni od dnia donacji, a następnie sprawdzeniu wyników markerów czynników zakaźnych u dawcy (w celu eliminacji tzw. „okienka diagnostycznego”)



**Tabela 8.** Wytwarzanie ubogoleukocytarnego koncentratu krwinek płytkowych (UKKP) i napromieniowanego ubogoleukocytarnego koncentratu krwinek płytkowych (NUKKP) w 2022 roku

CKiK	Wytworzone KKP w sumie (opakowania)	UKKP (opakowania)	NUKKP (opakowania)
Białystok	7769	0	7769
Bydgoszcz	9483	605	8878
Gdańsk	6735	384	6351
Kalisz	2512	2330	182
Katowice	18 036	11 193	6843
Kielce	4067	2282	1785
Kraków	11 144	5537	5607
Lublin	6822	838	5984
Łódź	6144	570	5574
Olsztyn	4312	510	3802
Opole	1374	1256	118
Poznań	13 134	5064	8070
Racibórz	1109	1101	8
Radom	1491	1481	10
Rzeszów	8658	4649	4009
Słupsk	1509	627	882
Szczecin	4956	1731	3225
Wałbrzych	2045	2045	0
Warszawa	15 567	15 567	0
Wrocław	12 355	3721	8634
Zielona Góra	3333	2056	1277
WCKiK	208	208	0
CKiK MSWiA	203	203	0
<b>Razem</b>	<b>142 966</b>	<b>63 958</b>	<b>79 008</b>

rych można przeprowadzić inaktywację czynników chorobotwórczych w FFP i w KKP. Metody zastosowane w systemach Mirasol PRT oraz Intercept skutecznie inaktywują także immunokompetentne limfocyty T, co stanowi alternatywę dla radiatorów używanych w celu napromieniowania komórkowych składników krwi jako metoda zapobiegania poprzetoczeniowej chorobie przeszczep przeciwko gospodarzowi (TA-GvHD, *transfusion-associated graft versus host disease*) [2–4].

W 2022 roku inaktywację czynników chorobotwórczych stosowano w 23 CKiK przy użyciu systemów:

- Mirasol w 18 CKiK (w 16 RCKiK oraz w WCKiK i CKiK MSWiA);
- Theraflex MB Plasma w 12 RCKiK;
- Intercept w 2 RCKiK.

W poszczególnych CKiK inaktywacji poddano od 0,11% otrzymanego osocza (RCKiK w Szczecinie) do 17,51% (RCKiK w Poznaniu). W trzech

**Tabela 9.** Otrzymywanie osocza świeżo mrożonego (FFP) metodą manualną i metodą aferezy w poszczególnych CKiK w 2022 roku (liczba jednostek)

CKiK	Metoda manualna	Metoda aferezy	Razem	% FFP z aferezy
Białystok	59 928	52 759	112 687	46,82
Bydgoszcz	72 550	29 397	101 947	28,84
Gdańsk	64 803	4875	69 678	7,00
Kalisz	40 912	48 340	89 252	54,16
Katowice	122 796	5810	128 606	4,52
Kielce	33 824	4124	37 948	10,87
Kraków	110 322	3888	114 210	3,40
Lublin	59 050	20 355	79 405	25,63
Łódź	76 470	3407	79 877	4,27
Olsztyn	39 978	5748	45 726	12,57
Opole	31 922	3210	35 132	9,14
Poznań	92 990	24 180	117 170	20,64
Racibórz	26 234	16 351	42 585	38,40
Radom	22 846	8103	30 949	26,18
Rzeszów	66 332	13 526	79 858	16,94
Słupsk	19 813	3516	23 329	15,07
Szczecin	50 127	4700	54 827	8,57
Wałbrzych	26 933	1176	28 109	4,18
Warszawa	112 227	11 718	123 945	9,45
Wrocław	61 874	24 054	85 928	27,99
Zielona Góra	31 819	618	32 437	1,91
WCKiK	16 614	0	16 614	0,00
CKiK MSWiA	6992	0	6992	0,00
<b>Razem</b>	<b>1 247 356</b>	<b>289 855</b>	<b>1 537 211</b>	<b>18,86</b>

CKiK odsetek FFP poddanego inaktywacji wynosił ponad 10% (RCKiK w Poznaniu — 17,51%, RCKiK w Warszawie — 16,9% i CKiK MSWiA — 13,20%), a w kolejnych trzech CKiK odsetek FFP poddanego inaktywacji wynosił 3,18–7,57%. W skali kraju poddano inaktywacji łącznie 4,69% otrzymanego osocza. Inaktywacji poddawano również osocze pobrane od ozdowieńców COVID-19 — od 58,96% w RCKiK w Warszawie do 100% w WCKiK, w CKiK MSWiA oraz w RCKiK w Krakowie i RCKiK w Radomiu. W skali kraju inaktywacji czynników

zakaźnych poddano 43,07% osocza pobranego od ozdowieńców COVID-19. Warto podkreślić, że w porównaniu z poprzednimi dwoma latami ilość pobieranego i inaktywowanego osocza COVID-19 znacząco spadła.

Do celów klinicznych wydano w 2022 roku 75,25% karencjonowanych jednostek FFP i 92,15% karencjonowanych jednostek krioprecypitatu. Wydano również 24,73% j. FFP i 9,48% j. krioprecypitatu po inaktywacji biologicznych czynników

**Tabela 10.** Wykorzystanie osocza świeżo mrożonego (FFP) w poszczególnych CKiK do celów klinicznych w 2022 roku (bez osocza COVID)

CKiK	FFP wydane do celów klinicznych (jednostki)	Tendencja (wzrost/spadek w porównaniu z 2021 r.)
Białystok	11 657	↑
Bydgoszcz	14 154	↑
Gdańsk	8792	↑
Kalisz	3353	↑
Katowice	23 395	↑
Kielce	5709	↓
Kraków	22 065	↑
Lublin	14 569	↓
Łódź	14 198	↓
Olsztyn	7291	↑
Opole	4937	↓
Poznań	18 451	↑
Racibórz	2314	↑
Radom	2267	↑
Rzeszów	11 809	↑
Słupsk	2371	↑
Szczecin	12 515	↓
Wałbrzych	6142	↓
Warszawa	35 924	↓
Wrocław	10 766	↑
Zielona Góra	6323	↑
WCKiK	9964	↓
CKiK MSWiA	3368	↑
<b>Razem</b>	<b>252 332</b>	<b>↑</b>

↓ — spadek w stosunku do 2021 roku; ↑ — wzrost o w stosunku do 2021 roku

chorobotwórczych (krioprecypitat tylko w RCKiK w Poznaniu i w Bydgoszczy).

W 8 CKiK przeprowadzano inaktywację zlewanego KKP (w 7 przy użyciu systemu Mirasol, a w 1 przy użyciu systemu Intercept). Inaktywacji poddano od 0,31% (RCKiK w Lublinie) do 99,59% (RCKiK w Warszawie) otrzymanych opakowań

zlewanego KKP. W skali kraju stanowiło to łącznie 5,38% otrzymanych opakowań zlewanego KKP.

W 9 CKiK inaktywacji poddawano KKP z aferezy (w 7 przy użyciu systemu Mirasol, w 1 przy użyciu systemu Intercept i w 1 przy wykorzystaniu dwóch systemów jednocześnie — Mirasol i Intercept (RCKiK w Radomiu). Inaktywacji poddano od 0,68% (RCKiK w Katowicach) do 96,40% (RCKiK w Warszawie) otrzymanych opakowań KKP z aferezy. W skali kraju stanowiło to łącznie 24,34% otrzymanych opakowań KKP z aferezy. Do celów klinicznych wydano w 2022 roku łącznie 12,70% poddanych inaktywacji opakowań KKP.

Odsetek jednostek FFP, ZI.KKP i KKP-Af. Poddanych inaktywacji czynników chorobotwórczych w CKiK w 2022 roku przedstawiono w tabeli 12.

Odsetek poddanego inaktywacji osocza od ozdowieńców w CKiK w 2022 roku przedstawiono w tabeli 13.

Odsetek jednostek FFP, krioprecypitatu oraz opakowań KKP wydanych do celów klinicznych po inaktywacji czynników chorobotwórczych w 2022 roku przedstawiono w tabeli 14.

### Zniszczenia krwi i jej składników

W 2022 roku zniszczono łącznie 110 782 jednostek krwi i jej najczęściej stosowanych składników, w tym 12 935 j. KPK, 32 803 j. KKCz, 58 122 j. FFP, 1582 opakowania KKP z aferezy, 3658 opakowań zlewanego KKP, a także 1681 j. krioprecypitatu.

Podstawowe przyczyny zniszczeń składników krwi to, podobnie jak w latach poprzednich:

- przeterminowanie;
- dodatnie wyniki testów wirusologicznych lub w kierunku zakażenia kiłą, wdrożenie procedury *look-back* (dalej określane łącznie jako „czynniki zakaźne”);
- inne przyczyny, w tym:
  - nieprawidłowy wynik kontroli wizualnej,
  - nieprawidłowa objętość,
  - nieprawidłowe wyniki badań serologicznych,
  - inne, w tym nieprawidłowo wykonane procedury, dyskwalifikacja lekarska, uszkodzenie mechaniczne, samodyskwalifikacja dawcy.

Niszczono także niewykorzystane składniki krwi pochodzące z donacji autologicznych (33 j. KKCz i 101 j. FFP).

Szczegółowe zestawienie liczby składników krwi zniszczonych w poszczególnych CKiK w 2022 roku przedstawiono w tabeli 15, natomiast przyczyny zniszczeń składników krwi w CKiK w 2022 roku w tabeli 16.

**Tabela 11.** Osocze uzyskane od ozdrowieńców COVID-19 i wydane do celów klinicznych przez poszczególne CKiK w 2022 roku

CKiK	Otrzymano od ozdrowieńców COVID-19 (jednostki)	Wydano do celów klinicznych (jednostki)
Białystok	0	7
Bydgoszcz	0	0
Gdańsk	0	24
Kalisz	0	0
Katowice	0	29
Kielce	12	30
Kraków	8	12
Lublin	0	35
Łódź	64	9
Olsztyn	0	0
Opole	0	28
Poznań	0	8
Racibórz	0	0
Radom	24	17
Rzeszów	28	0
Słupsk	0	0
Szczecin	21	12
Wałbrzych	3	0
Warszawa	173	0
Wrocław	0	25
Zielona Góra	0	351
WCKiK	3	0
CKiK MSWiA	3	3
<b>Razem</b>	<b>339</b>	<b>590</b>

## Dyskusja

Rok 2022 był kolejnym rokiem pandemii COVID-19, jakkolwiek poczynając od 16 maja 2022 roku stan pandemii został w Polsce zastąpiony stanem zagrożenia epidemicznego. Podstawowym czynnikiem decydującym o zabezpieczeniu potrzeb związanych z krwiolecznictwem pozostawała, jak w latach poprzednich, dobra wola, a w konsekwencji dostateczna liczba honorowych krwiodawców [5–9].

Zgodnie z wyżej przedstawionymi obserwacjami, liczba osób oddających krew w polskich CKiK była w 2022 roku największa od kilku lat — 621 936 osób (w 2021 r. — 615 784, w 2020 r. — 569 914, w 2019 r. — 614 579).

Obserwowany wzrost liczby dawców miał miejsce pomimo utrzymującej się w ostatnich

latach niekorzystnej tendencji dotyczącej zmniejszania się liczby ludności w przedziale wiekowym 18–65 lat, z którego rekrutują się potencjalni krwiodawcy. Według danych podawanych przez Główny Urząd Statystyczny, liczba ta wynosiła zgodnie z szacunkami na dzień 31 grudnia 2011 roku 26 460 477 osób, natomiast 31 grudnia 2020 r. — już tylko 24 689 690, a 12 grudnia 2022 r. — 23 989 507 [10–12].

W tym okresie liczba ludności we wspomnianej grupie wiekowej zmniejszyła się zatem o około 2,5 miliona osób, co niewątpliwie może wpływać negatywnie na liczbę aktywnych krwiodawców.

W krajach należących do Rady Europy średni wskaźnik liczby krwiodawców w przeliczeniu na 1000 mieszkańców obniżył się w latach 2008–2011 z 29,0 do 25,0 [13]. W Polsce w 2022 roku analogiczna wartość wynosiła 16,47 (w 2021 r. — 16,14, w 2020 r. — 14,42, w 2019 r. — 15,39, 2018 r. — 15,37, a w 2017 r. — 15,30), była to zatem wartość najwyższa od kilku lat.

Ponadto zarówno w Polsce, jak w innych krajach, obserwuje się tendencję spadkową liczby osób zgłaszających chęć oddawania krwi; dotyczy to szczególnie niektórych przedziałów wiekowych. W Polsce tendencja taka daje się zauważyć zwłaszcza w populacji wiekowej 18–24 lata, czyli w grupie, która potencjalnie mogłaby zapewnić w przyszłości odpowiednią podaż krwi i jej składników [14].

Oprócz wspomnianych zjawisk demograficznych na liczbę krwiodawców mogą niekorzystnie wpływać takie czynniki, jak:

- okresowo występujące epidemie chorób, w tym pandemia COVID-19;
- pobyty dawców za granicą i związane z tym ryzyko zakażenia występującymi w niektórych regionach chorobami, np. malarią czy wirusem gorączki Zachodniego Nilu [15–17];
- inne (poza COVID-19) nowo pojawiające się choroby zakaźne, np. epidemia zakażeń wirusem Zika [18–19];
- stan zdrowotny społeczeństwa, w tym obniżone stężenie hemoglobiny (od szeregu lat najczęstsza przyczyna dyskwalifikacji krwiodawców) [20–22];
- brak okazji do oddania krwi czy względy ekonomiczne.

Liczba dawców autologicznych utrzymuje się w ostatnich latach na niskim poziomie. W 2022 roku wynosiła 247 osób, zatem najmniej od kilku lat (w 2021 r. — 313, w 2020 r. — 323, 2019 r. — 630 osób, 2018 r. — 598, 2017 r. — 692). Zmniejszenie znaczenia autologicznych donacji przedoperacyjnych obserwowano w wielu krajach [23].

**Tabela 12.** Odsetek jednostek FFP, ZI.KKP i KKP-Af. poddanych inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w CKiK w 2022 roku

RCKiK	FFP (%)	ZI.KKP (%)	KKP-Af. (%)	Systemy
Białystok	1,26	0,00	0,00	Theraflex, Mirasol
Bydgoszcz	2,44	0,00	0,00	Theraflex, Mirasol
Gdańsk	1,12	0,00	0,00	Theraflex, Mirasol
Kalisz	2,07	0,00	0,00	Theraflex
Katowice	0,96	0,70	0,68	Mirasol
Kielce	0,74	0,00	66,67	Mirasol
Kraków	7,58	0,92	0,73	Mirasol
Lublin	2,43	0,31	8,35	Theraflex, Mirasol
Łódź	1,17	2,06	0,80	Mirasol, Intercept
Olsztyn	2,52	0,00	0,00	Theraflex
Opole	2,30	0,00	0,00	Theraflex
Poznań	17,51	0,00	0,00	Theraflex
Racibórz	1,13	0,00	0,00	Theraflex
Radom	2,35	0,00	56,96	Mirasol, Intercept
Rzeszów	2,76	1,43	12,29	Theraflex, Mirasol
Słupsk	0,35	0,00	0,00	Mirasol
Szczecin	0,11	0,00	0,00	Mirasol, Interscept
Wałbrzych	3,18	0,00	0,00	Mirasol
Warszawa	16,90	99,59	96,40	Mirasol, Intercept
Wrocław	3,38	0,00	0,00	Theraflex, Mirasol
Zielona Góra	2,20	0,00	0,00	Theraflex
WCKiK	0,98	33,12	44,44	Mirasol
CKiK MSWiA	13,20	1,31	54,00	Mirasol
<b>Razem</b>	<b>4,69</b>	<b>5,38</b>	<b>24,34</b>	

Zgodnie z aktualnymi zaleceniami, przed podjęciem decyzji o wykonaniu autotransfuzji należy indywidualnie rozważyć związane z nią ryzyko i korzyści dla pacjenta. Donacja autologiczna może być przydatna przede wszystkim w przypadkach, gdzie nie jest dostępna zgodna grupowo krew allogeniczna, na przykład gdy u pacjenta wykryto przeciwciała przeciwko antygenom o wysokiej częstości występowania w danej populacji [24].

W 2022 roku całkowita liczba donacji krwi i jej składników wynosiła 1 411 025, w tym 1 289 164 donacji krwi pełnej, nastąpił zatem wzrost w porównaniu z latami poprzedzającymi (w 2021 r. — 1 374 572 donacji, w tym 1 248 585 donacji krwi pełnej, a w 2020 r. odpowiednio 1 201 272 donacji i 1 105 434 donacji krwi pełnej).

W celu usprawnienia pobierania składników krwi stosuje się między innymi metodę automatycznej aferezy. W 2022 roku wzrosła liczba łącznych donacji KKP i osocza metodą aferezy w stosunku do 2021 roku (z 26 518 do 27 847),

zmniejszyła się natomiast donacji samych KKP (z 14 411 do 13 609). Zmniejszyła się także liczba donacji samego osocza (z 84 818 do 80 065). Inne składniki krwi, tj. KKCz i koncentrat granulocytarny, nadal pobierano metodą aferezy tylko sporadycznie.

Należy przy tym zauważyć, że donacje przeprowadzane przy wykorzystaniu metod zautomatyzowanych (afereza) są nadal stosowane w Polsce w stosunkowo niewielkim zakresie. W roku 2022 stanowiły one około 8,64% wszystkich donacji, czyli mniej niż w 2021 roku (9,16%).

Ułatwieniu oddawania krwi służą między innymi organizowane przez poszczególne CKiK ekipy wyjazdowe. W 2022 roku zorganizowano 12 089 ekip, zatem więcej niż w latach poprzednich (w 2021 r. — 11 150, w 2020 r. — 10 432), jednak nadal mniej niż w 2019 roku (13 511). Stosunkowo niewielki był również odsetek donacji krwi pełnej przeprowadzonych podczas ekip wyjazdowych — 19,56%. W 2022 roku głównym miejscem

**Tabela 13.** Osocze od ozdrowieńców COVID-19 — odsetek poddanego inaktywacji w CKiK w 2022 roku

CKiK	Osocze pobrane od ozdrowieńców (jedn.)	Osocze poddane inaktywacji (j.)	Odsetek osocza poddanego inaktywacji
Białystok	0	0	0,00
Bydgoszcz	0	0	0,00
Gdańsk	0	0	0,00
Kalisz	0	0	0,00
Katowice	0	0	0,00
Kielce	12	0	0,00
Kraków	8	8	100,00
Lublin	0	0	0,00
Łódź	64	0	0,00
Olsztyn	0	0	0,00
Opole	0	0	0,00
Poznań	0	0	0,00
Racibórz	0	0	0,00
Radom	24	24	100,00
Rzeszów	28	0	0,00
Słupsk	0	0	0,00
Szczecin	21	0	0,00
Wałbrzych	3	0	0,00
Warszawa	173	102	58,96
Wrocław	0	0	0,00
Zielona Góra	0	0	0,00
WCKiK	3	3	100,00
CKiK MSWiA	3	3	100,00
<b>Razem</b>	<b>339</b>	<b>146</b>	<b>43,07</b>

pobrań pozostawały OT, w których wykonano 50,19% wszystkich donacji krwi pełnej. Wynika to w znacznej mierze z przyzwyczajenia krwiodawców, oddających do tej pory krew w OT. Funkcjonowaniu małych oddziałów terenowych nie sprzyjają jednak obowiązujące obecnie wysokie standardy uzyskiwania składników krwi do celów klinicznych, co w rezultacie wymaga zwiększania centralizacji działań służby krwi.

Na zapotrzebowanie na składniki krwi wpływa wiele czynników, w tym aktualne wytyczne towarzystw naukowych, indywidualne uwarunkowania kliniczne i subiektywna ocena sytuacji przez lekarza. Niewątpliwym wpływem na funkcjonowanie szpitali, a co za tym idzie — także na wykorzystanie

składników krwi — miały uwarunkowania związane z pandemią COVID-19.

W 2022 roku wydano do celów klinicznych około 33 j. KKCz w przeliczeniu na 1000 mieszkańców (w 2021 r. — 30,92 j., w 2020 r. — 27,87, w 2019 r. — 30,7 j., w 2018 r. — 30,38 j., w 2017 r. — 30,22 j., w 2016 r. — 29,99, w 2015 r. — 29,87) [11, 12, 25–28].

Po obserwowanym w 2020 roku spadku zużycia KKCz nastąpił zatem jego ponowny wzrost. Zużycie KKCz w Polsce jest jednak od lat mniejsze niż w niektórych krajach europejskich, na przykład w 2011 roku wykorzystanie KKCz w 32 krajach Rady Europy wyniosło średnio 37 j./1000 mieszkańców [13].

**Tabela 14.** Odsetek jednostek FFP, krioprecypitatu oraz opakowań KKP wydanych do celów klinicznych po inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w 2022 roku

CKiK	% FFP (j.)	% Krioprecypitatu (j.)	% KKP (op.)
Białystok	10,47	0	0,00
Bydgoszcz	8,29	15,95	0,00
Gdańsk	1,02	0	0,00
Kalisz	58,44	0	0,00
Katowice	7,34	0	0,69
Kielce	6,04	0	17,15
Kraków	39,05	0	0,87
Lublin	15,25	0	2,71
Łódź	12,63	0	1,35
Olsztyn	11,15	0	0,00
Opole	11,77	0	0,00
Poznań	96,44	100	0,00
Racibórz	28,61	0	0,00
Radom	36,79	0	38,07
Rzeszów	31,40	0	4,11
Słupsk	9,57	0	0,00
Szczecin	0,99	0	0,00
Wałbrzych	14,05	0	0,00
Warszawa	33,03	0	98,34
Wrocław	43,56	0	0,00
Zielona Góra	9,50	0	0,00
WCKiK	0,55	0,23	3,63
CKiK MSWiA	13,27	0	17,02
<b>Razem</b>	<b>24,73</b>	<b>9,48</b>	<b>12,70</b>

Do celów klinicznych wydano w 2022 roku łącznie 252 332 j. FFP, czyli więcej niż w 2021 roku (246 013 j.), jednak nadal mniej niż w 2019 roku (273 519 j. FFP). Natomiast stosunek liczby wydanych jednostek KKCz do FFP wynosił w 2022 roku w przybliżeniu 4,94 (w 2021 r. — 4,81, w 2020 r. — 4,57, w 2019 r. — 4,31, w 2018 r. — 4,09, w 2017 r. — 3,77, w 2016 r. — 3,56, w 2015 r. — 3,45), w tym zakresie utrzymywała się zatem tendencja wzrostowa [29–35].

Obserwacje te mogą wskazywać na stopniowe obniżanie się częstości stosowania FFP w stosunku do KKCz. Wskaźnik KKCz/FFP o wyżej podanej wartości nadal jednak świadczy o większym, niż w wielu krajach Europy, zużyciu FFP w stosunku do KKCz [13]. Może to wynikać z mniejszego w Polsce — jak to wspomniano powyżej — zużycia KKCz w przeliczeniu na liczbę mieszkańców, prawdopodobnie jednak w wielu przypadkach FFP stosowane jest bez dostatecznego uzasadnienia,

niezgodnie z bardzo obecnie ograniczonymi wskazaniami [36, 37].

Uwagę zwraca natomiast znaczny spadek liczby pobrań i wykorzystania osocza od ozdrowieńców COVID-19, stosowanego w ramach prób leczenia zakażenia SARS-CoV-2 w charakterze tak zwanej immunoterapii biernej. W pierwszych miesiącach pandemii COVID-19 zainteresowanie tą metodą leczniczą było znaczne, jednak późniejsze badania nie przyniosły pewnych wyników świadczących o jej skuteczności, a zalecenia odnośnie jej zastosowań nie są obecnie jednoznaczne i dotyczą tylko niektórych grup pacjentów [38]. Zapewne wpłynęło to na znaczny spadek zainteresowania tą metodą leczniczą, obserwowany także w Polsce.

W ostatnich latach obserwowano wzrost zużycia KKP. W latach 2015–2019 liczba wydawanych do celów klinicznych opakowań KKP zwiększyła się z 114 163 do 129 652 (ponad 13%). Podobne zjawisko obserwowano w innych krajach [39].

**Tabela 15.** Składniki krwi zniszczone w poszczególnych CKiK w 2022 roku

CKiK	KPK	KKCz	KKP (opakowania)		FFP	Krioprecypitat
			Zlewane (otrzymane z krwi pełnej)	Otrzymane metodą aferezy		
Białystok	168	662	26	12	693	83
Bydgoszcz	490	828	0	0	2307	282
Gdańsk	307	1336	281	10	2156	145
Kalisz	152	989	0	0	1749	23
Katowice	1082	3159	524	247	4716	116
Kielcach	59	925	262	34	1103	56
Kraków	808	2668	117	40	7158	115
Lublin	133	1381	178	99	2070	18
Łódź	1259	2379	313	103	2506	0
Olsztyn	65	529	59	9	559	13
Opole	110	931	35	45	902	4
Poznań	2062	2855	310	64	2426	18
Racibórz	60	455	60	38	663	0
Radom	522	1707	0	68	1037	54
Rzeszów	1511	2054	419	52	2306	94
Słupsk	455	705	102	11	812	34
Szczecin	191	2100	225	47	2343	71
Wałbrzych	453	1295	136	8	498	5
Warszawa	1515	2277	71	568	7664	170
Wrocław	725	1213	73	105	1787	61
Zielona Góra	299	660	423	10	589	5
WCKiK	454	1652	43	13	9144	302
CKiK MSWiA	55	43	0	0	2933	12
<b>Razem</b>	<b>12 935</b>	<b>32 803</b>	<b>3658</b>	<b>1582</b>	<b>58 122</b>	<b>1681</b>

Jednakże w 2020 roku wydano do celów klinicznych tylko 120 858 opakowań KKP, nastąpił zatem wyraźny spadek, natomiast w 2021 roku wydano do celów klinicznych 130 865, a 2022 roku — 138 594 opakowań KKP, nastąpił zatem niejako nawrót tendencji wzrostowej.

Dodatkowe metody preparatyki (usuwanie leukocytów, napromieniowanie) stosowano przede wszystkim w stosunku do KKP (44,74% UKKP, 55,26% NUKKP), rzadziej KKCz (23,06% UKKCz, 10,38% NUKKCz i 0,05% NKKCz). Wiąże się to z faktem, że — jak wspomniano powyżej — poczynając od 2021 roku w Polsce są wydawane do stosowania klinicznego wyłącznie ubogoleukocytarne KKP. Ponadto w przypadku KKCz pozyskanie składnika ubogoleukocytarnego wymaga

dodatkowej preparatyki, natomiast w przypadku KKP z aferezy eliminacja leukocytów następuje zwykle już na etapie pobierania koncentratu od dawcy. Niektóre zautomatyzowane metody uzyskiwania KKP z kożuszka leukocytarno-płytkowego umożliwiają również jednoczesną eliminację leukocytów, jednak koszt takiej preparatyki jest nadal stosunkowo wysoki w porównaniu z metodami manualnymi. Jednocześnie metody te pozwalają na lepsze zachowanie wysokich parametrów jakości z powodu standaryzacji metod otrzymywania składników krwi.

W wielu krajach stosuje się obecnie powszechną leukoredukcję, jakkolwiek dowody na jej skuteczność w zapobieganiu niepożądanym reakcjom



Tabela 16. Przyczyny zniszczeń składników krwi w CKiK w 2022 roku

Przyczyna zniszczenia	KPK	KKCz	KKP z krwi pełnej	KKP z aferezy	FFP	Krioprecypitat
Przeterminowanie	4	12 053	2094	435	12 582	109
Dodatknie wyniki testów wirusologicznych lub w kierunku zakażenia kiłą, wdrożenie procedury <i>look-back</i>	28,3	2810	247	76	5076	13
Pozostałe przyczyny, w tym: • nieprawidłowy wynik kontroli wizualnej • nieprawidłowa objętość • nieprawidłowe wyniki badań serologicznych • nieprawidłowo wykonane procedury, dyskwalifikacja lekarska, uszkodzenie mechaniczne, samodyskwalifikacja dawcy i inne	12 965	17 907	1317	1072	40 363	1647
Niewykorzystane składniki krwi pochodzące z donacji autologicznych	0	33			101	
<b>Razem</b>	<b>12 997</b>	<b>32 803</b>	<b>3658</b>	<b>1583</b>	<b>58 122</b>	<b>1769</b>

poprzetoczeniowym są niekiedy kwestionowane [40].

Podobnie jak w poprzednich latach liczba jednostek KKP zamrażanych przez niektóre CKiK jest zbyt duża. W 2022 roku zaobserwowano podobnie jak w latach poprzednich nieznaczne zmniejszenie odsetka zamrażanych KKP. Całkowity odsetek zamrażanych KKP obserwowany w skali kraju jest odpowiedni. Niestety nadal w niektórych CKiK ten odsetek jest zbyt wysoki. Należy zauważyć, że w kilku CKiK zaobserwowano wzrost odsetka zamrażanych KKP, pomimo wcześniejszej tendencji malejącej. Wskazania do przetaczania MKKP są nadal bardzo ograniczone. Składnik ten powinien być stosowany jedynie w wyjątkowych przypadkach, głównie w razie konieczności dobierania KKP dla pacjenta z przeciwciałami anty-HLA lub anty-HPA. Zamrażanie powyżej 10% otrzymywanych KKP nie jest wskazane. Procesy zamrażania i rozmrażania KKP pociągają za sobą zwiększone koszty uzyskiwania preparatów do użytku klinicznego, a jednocześnie mogą wpływać negatywnie na ich parametry jakościowe i związaną z tym skuteczność kliniczną. Niepokojący jest wzrost odsetka zamrażanych KKP w niektórych CKiK, sięgający prawie 50% dla wszystkich KKP, a w przypadku poszczególnych grup składników — KKP z aferezy lub zlewanych — odpowiednio blisko 50% i prawie 60%. Należy jednak zaznaczyć, że ogólny odsetek został zmniejszony w stosunku do 2021 roku, również w przypadku wydawanych preparatów (z 2,84% do 2,76%).

Wydaje się, że niezbędne jest usprawnienie współpracy CKiK ze szpitalami, poprzedzone wprowadzeniem właściwej gospodarki krwią i jej składnikami każdego szpitala, z uwzględnieniem indywidualnych potrzeb każdego pacjenta. Nadal niezwykle istotne pozostaje usprawnienie bieżącej współpracy lekarzy odpowiedzialnych za gospodarkę krwią i komitetów transfuzjologicznych z CKiK.

Do zubożenia zasobów krwi i jej składników przyczyniają się ich zniszczenia wynikające z różnych przyczyn, nieraz nieuniknione. W celu ograniczenia zakresu zniszczeń w niektórych krajach stosuje się odpowiednie procedury [41].

Najczęstszymi przyczynami zniszczeń w 2022 roku (podobnie jak w latach poprzednich) były tzw. „inne przyczyny”, a w szczególności:

- nieprawidłowy wynik kontroli wizualnej;
- nieprawidłowa objętość;
- nieprawidłowe wyniki badań serologicznych;
- nieprawidłowo wykonane procedury, dyskwalifikacja lekarska, uszkodzenie mechaniczne, samodyskwalifikacja dawcy i inne.

Przeterminowanie lub dodatnie wyniki badań na obecność markerów chorób zakaźnych znacznie rzadziej stanowiły przyczynę zniszczeń.

Po przeanalizowaniu danych dotyczących karencji i inaktywacji czynników chorobotwórczych w FFP i krioprecypitacie stwierdzono, że nadal do celów klinicznych wydawane jest przede wszystkim osocze poddane karencji (75,25%). Chociaż obecnie wszystkie CKiK są wyposażone w systemy do inaktywacji (niektóre nawet w dwa różne

systemy), to tylko w 7 CKiK (w których odsetek inaktywowanych składników przekracza 10%) proces inaktywacji nie ogranicza się do „śladowych” ilości osocza i KKP. W 2022 roku inaktywację czynników chorobotwórczych FFP przeprowadzały już wszystkie CKiK, jednak w 4 z nich stwierdzono obniżenie odsetka jednostek FFP poddanych inaktywacji. W pozostałych CKiK zauważono mniejszy lub większy wzrost (np. RCKiK w Szczecinie o 0,09%, w Poznaniu o 4,28%). Dotychczas tylko RCKiK w Warszawie prowadziło inaktywację FFP na szeroką skalę. W 2022 roku wzrost odnotowano także w CKiK MSWiA (13,20%) i RCKiK w Poznaniu (17,51%) — największy odsetek FFP poddanego inaktywacji. W RCKiK w Warszawie odsetek ten wynosił 16,90%. Dla innych składników (Zl. KKP i KKP-Af.) odsetek przeprowadzonych w Warszawie inaktywacji był najwyższy spośród wszystkich CKiK — odpowiednio 99,59% i 96,40%. W 2021 roku wartości te wynosiły 15,91% dla FFP, 99,21% dla Zl. KKP i 98,53% dla KKP-Af. W wielu CKiK, mimo posiadania dwóch systemów do inaktywacji, odsetek inaktywowanych składników krwi był jednak nadal niski. Inaktywacja Zl. KKP i KKP Af. nadal prowadzona jest tylko przez kilka CKiK (Zl. KKP — 8 CKiK, KKP-Af. — 9 CKiK). Co więcej z inaktywowania KKP-Af. w 2022 roku zrezygnowało 3 CKiK. Z 8 CKiK, które poddawały inaktywacji Zl.KKP, w 5 CKiK stwierdzono wzrost odsetka inaktywowanych KKP w porównaniu z 2021 rokiem. Z 9 CKiK stosujących system do inaktywacji czynników chorobotwórczych w KKP-Af. w 5 CKiK stwierdzono zwiększony odsetek inaktywowanych KKP-Af w porównaniu z 2021 rokiem.

Podobnie jak w latach ubiegłych, większość CKiK nie wykorzystuje w pełni zainstalowanych systemów do inaktywacji, co wynika w dużej mierze z braku zamówień na FFP, krioprecypitat i KKP poddanych inaktywacji czynników chorobotwórczych. Jedną z przyczyn przetaczania małej ilości osocza poddanego inaktywacji jest wystarczająca liczba jednostek FFP poddanego karencji. Jednocześnie lekarze nie zawsze mają świadomość, że osocze poddane inaktywacji jest bardziej bezpieczne od osocza karencjonowanego, ponieważ zabezpiecza przed przeniesieniem szerokiego spektrum czynników zakaźnych, a nie tylko trzech wirusów (HIV, HBV, HCV) oraz kiły, czyli przed następstwami istnienia tak zwanego okienka diagnostycznego (jak to ma miejsce w przypadku osocza poddanego karencji). Dodatkowo nie wszyscy lekarze posiadają dostateczną wiedzę na temat profilaktyki TA-GVHD. Spowodowane jest to prawdopodobnie faktem, że w przepisach dla niektórych dyscyplin medycznych

znajduje się zbyt mało informacji dotyczących niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych.

## Wnioski

W przedstawionym opracowaniu zaprezentowano pokrótce wybrane zagadnienia związane z działalnością polskiej służby krwi w 2022 roku, a także niektóre tendencje zmian obserwowane w dłuższym okresie czasowym. Szereg analizowanych wartości charakteryzujących działalność służby krwi w Polsce (w tym liczba dawców, donacji, wytworzonych i wydanych do celów klinicznych składników krwi) uległo w 2022 roku wzrostowi w porównaniu z latami poprzedzającymi, co może świadczyć o malejącym wpływie pandemii COVID-19, a następnie stanu zagrożenia epidemicznego na funkcjonowanie krwiodawstwa i krwiolecznictwa w Polsce. Uzyskane w ten sposób obserwacje mogą stanowić punkt wyjścia do analizy zagadnień związanych z funkcjonowaniem jednostek organizacyjnych polskiej służby krwi, do porównania doświadczeń oraz oceny stosowanych metod działania w celu wypracowania optymalnych rozwiązań na przyszłość. Podobne przeglądy danych dotyczących donacji krwi i jej składników są dokonywane systematycznie w innych krajach.

## Aktualne problemy krwiodawstwa i krwiolecznictwa

Problemy związane ze zmniejszającą się liczbą dawców, mniejszą liczbą pobieranej krwi pełnej, która stanowi główne źródło najczęściej stosowanego w leczeniu składnika krwi, czyli KKCz, stanowią obecnie duże wyzwanie dla służby krwi. Szczególnie dało się to zaobserwować podczas pandemii COVID-19. Dlatego też z jednej strony istotne jest efektywne zarządzanie dawcami, co jest zadaniem jednostek służby krwi, jak i pacjentami, co należy do zadań podmiotów leczniczych.

Nadal jak najbardziej aktualne pozostają wypracowane we poprzednim roku rozwiązania, w tym konieczność:

- wprowadzenia dodatkowych środków ostrożności w jednostkach służby krwi;
- wprowadzenia dodatkowych kryteriów dyskwalifikacji krwiodawców związanych z aktualną sytuacją epidemiologiczną;
- wprowadzenia rozwiązań związanych między innymi z przewidywanymi niedoborami składników krwi oraz koniecznością odpowiedniego planowania postępowania awaryjnego i zasad ustalania priorytetów zaopatrzenia pacjentów [42].

Coraz więcej badań prowadzonych jest w kierunku oceny prawidłowego wykorzystania dostępnych zapasów składników krwi oraz możliwości zastrzeżenia kryteriów wskazujących na konieczność ich przetoczenia, na przykład obniżenie poziomu stężenia hemoglobiny, przy którym powinno się wkroczyć z przetaczaniem KKCz [43, 44].

Interesujący jest fakt, że na przykład w Stanach Zjednoczonych po kilkuletnim okresie zmniejszania się liczby donacji, w wyniku których uzyskiwano KKCz, od 2019 roku zaobserwowano stabilizację zarówno ilości otrzymywanej, jak i wykorzystywanej do celów klinicznych tego składnika krwi [45].

Ograniczeniem prowadzonych badań i uzyskanych wyników jest fakt, że nie udało się uzyskać danych ze wszystkich ośrodków pobierających oraz przetaczających krew i jej składniki. Zmiany w zużyciu składników krwi są także zależne od obszaru, w którym są stosowane (np. oddziały pediatryczne czy medycyny ratunkowej).

Niezwykle istotne jest zarówno odpowiednie zarządzanie dawcami krwi, zapewnienie bezpieczeństwa personelu w placówkach służby krwi, jak i znaczenie wdrożenia i stosowania zasad zarządzania krwią pacjenta (PBM, *patient blood management*) w celu poprawy kryzysowych sytuacji [46–48].

Dlatego też w najbliższych latach istotne będzie zarówno poszukiwanie metod i rozwiązań mających na celu zachęcenie społeczeństwa do oddawania krwi, jak i ocena ilości zamawianych i zużywanych składników krwi. Brak jednolitej bazy umożliwiającej zebranie wiarygodnych danych jest jedną z głównych barier uniemożliwiających właściwą ocenę zarówno możliwości jednostek służby krwi, jak i potrzeb leczenia. Wdrożenie systemu teleinformatycznego e-krew, opracowywanego w ostatnich latach, powinno umożliwić taką ocenę.

## Podziękowanie

Autorzy składają podziękowanie Narodowemu Centrum Krwi oraz Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa za udostępnienie i pomoc w opracowaniu danych wykorzystanych w niniejszej pracy.

**Konflikt interesów:** nie zgłoszono

## Piśmiennictwo

1. Ustawa z dnia 22 sierpnia 1997 r. o publicznej służbie krwi (Dz. U. Nr 106, poz. 681 z późn. zmian.).
2. Osselaer JC, Cazenave JP, Lambermont M, et al. An active haemovigilance programme characterizing the safety profile of 7437 platelet transfusions prepared with amotosalen photochemical treatment. *Vox Sang.* 2008; 94(4): 315–323, doi: 10.1111/j.1423-0410.2007.01035.x, indexed in Pubmed: 18248574.
3. Schlenke P. Pathogen inactivation technologies for cellular blood components: an update. *Transfus Med Hemother.* 2014; 41(4): 309–325, doi: 10.1159/000365646, indexed in Pubmed: 25254027.
4. Grass JA, Wafa T, Reames A, et al. Prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease by photochemical treatment. *Blood.* 1999; 93(9): 3140–3147, indexed in Pubmed: 10216113.
5. Farmer S, Trentino K, Hofmann A, et al. A programmatic approach to patient blood management – reducing transfusions and improving patient outcomes. *The Open Anesthesiology Journal.* 2015; 9(1): 6–16, doi: 10.2174/1874321801509010006.
6. van Hoven LR, Koopman MMW, Koffijberg H, et al. Historical time trends in red blood cell usage in the Netherlands. *Intern J Clin Transf Med* 2016;4 67–77, doi: 10.2147/IJCTM.S103644.
7. Ellingson KD, et al. Sapiano MRP, Haass KA, Continued decline in blood collection and transfusion in the United States-2015. *Transfusion.* 2017; 57(suppl 2): 1588–1598, doi: 10.1111/trf.14165, indexed in Pubmed: 28591469.
8. Expert Consensus Statement on achieving self-sufficiency in safe blood and blood products, based on voluntary non-remunerated blood donation (VNRBD)\*. *Vox Sanguinis.* 2012; 103(4): 337–342, doi: 10.1111/j.1423-0410.2012.01630.x.
9. World Health Organization. Towards self-sufficiency in safe blood and blood products based on voluntary non-remunerated donation. *Global Status.* 2013.
10. Główny Urząd Statystyczny, Komitet Redakcyjny. Rocznik demograficzny 2012.
11. Główny Urząd Statystyczny. Rocznik Demograficzny 2021. <https://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/roczniki-statystyczne/roczniki-statystyczne/rocznik-demograficzny-2021,3,15.html>.
12. Główny Urząd Statystyczny. Rocznik Demograficzny 2023. <https://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/roczniki-statystyczne/roczniki-statystyczne/rocznik-demograficzny-2023,3,17.html>.
13. Poglód R, Rosiek A, Grabarczyk P, Łętowska M. Charakterystyka podstawowych wskaźników dotyczących krwiodawstwa i krwiolecznictwa w Europie - aktualne wyzwania i działania. *J Transf Med.* 2015; 8(2): 60–77.
14. Mikołowska A, Antoniewicz-Papis J. Retrospektywna analiza wybranych aspektów działalności publicznej służby krwi jako punkt wyjścia do oceny stanu polskiego krwiodawstwa. Część 1: Charakterystyka struktury demograficznej zbiorowości dawców. *J Transf Med.* 2020; 13(1): 29–66.
15. Napp S, Petric D, Busquets N. West Nile virus and other mosquito-borne viruses present in Eastern Europe. *Pathog Glob Health.* 2018; 112(5): 233–248, doi: 10.1080/20477724.2018.1483567, indexed in Pubmed: 29979950.
16. Grabarczyk P, Niczyporuk J, Czupryna P, et al. Rekomendacje dotyczące ograniczania przenoszenia wirusa Zachodniego Nilu (WNV) przez transfuzje krwi oraz jej składników na terenie Polski. *J Transf Med.* 2020; 13(4): 228–238.
17. Siński E. Pasożytnicze pierwotniaki krwi potencjalnym zagrożeniem bezpieczeństwa krwiodawstwa w świetle doniesień prezentowanych na konferencji „Aktualne problemy dotyczące czynników zakaźnych przenoszonych przez krew” (10 marca 2017 r., Warszawa). *J Transf Med.* 2017; 10(2): 67–72.
18. Stramer SL, Hollinger FB, Katz LM, et al. Emerging infectious disease agents and their potential threat to transfusion safety. *Transfusion.* 2009; 49 Suppl 2: 1S–29S, doi: 10.1111/j.1537-2995.2009.02279.x, indexed in Pubmed: 19686562.

19. Jimenez A, Shaz BH, Bloch EM. Zika Virus and the blood supply: what do we know? *Transfus Med Rev.* 2017; 31(1): 1–10, doi: 10.1016/j.tmr.2016.08.001, indexed in Pubmed: 27569055.
20. Rosiek A, Tomaszewska A, Lachert E, et al. Obniżone stężenie hemoglobiny najczęstszą przyczyną dyskwalifikacji krwiodawców na terenie Polski. *Acta Haematol Pol.* 2015; 46: 24, doi: 10.1016/j.achaem.2015.07.044.
21. Vuk T, Magnussen K, De Kort W, et al. International forum: an investigation of iron status in blood donors. *Blood Transfus.* 2017; 15(1): 20–41, doi: 10.2450/2016.0101-16, indexed in Pubmed: 27643753.
22. Goldman M, Magnussen K, Gorlin J, et al. International Forum regarding practices related to donor haemoglobin and iron. *Vox Sang.* 2016; 111(4): 449–455, doi: 10.1111/vox.12431, indexed in Pubmed: 27564140.
23. Vassallo R, Goldman M, Germain M, et al. BEST Collaborative. Preoperative autologous blood donation: waning indications in an era of improved blood safety. *Transfus Med Rev.* 2015; 29(4): 268–275, doi: 10.1016/j.tmr.2015.04.001, indexed in Pubmed: 26006319.
24. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM). Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components: recommendation No. R (95) 15, wyd. 21: 2023.
25. Główny Urząd Statystyczny. Ludność. Stan i struktura ludności oraz ruch naturalny w przekroju terytorialnym. <https://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/ludnosc/ludnosc/ludnosc-stan-i-struktura-ludnosc-i-oraz-ruch-naturalny-w-przekroju-terytorialnym-2019>, 31.12.2019.
26. Główny Urząd Statystyczny, Komitet Redakcyjny. *Rocznik demograficzny*, 2017.
27. Główny Urząd Statystyczny Komitet Redakcyjny. *Rocznik demograficzny*, 2015.
28. Główny Urząd Statystyczny, Komitet Redakcyjny. *Rocznik demograficzny*, 2016.
29. Rosiek A, Tomaszewska A, Lachert E, et al. Działalność jednostek organizacyjnych służby krwi w Polsce w 2015 roku. *J Transf Med.* 2016; 9(4): 1–18.
30. Rosiek A, Tomaszewska A, Lachert E, et al. Działalność jednostek organizacyjnych służby krwi w Polsce w 2016 roku. *J Transf Med.* 2017; 10(4): 113.
31. Rosiek A, Tomaszewska A, Lachert E, et al. Działalność jednostek organizacyjnych służby krwi w Polsce w 2017 roku. *J Transf Med.* 2018; 11(4): 113–130.
32. Rosiek A, et al. Tomaszewska A, Lachert E, Działalność jednostek organizacyjnych służby krwi w Polsce w 2018 roku. *J Transf Med.* 2019; 12(4): 127–143.
33. Rosiek A, Tomaszewska A, Lachert E, et al. Działalność jednostek organizacyjnych służby krwi w Polsce w 2019 roku. *J Transf Med.* 2020; 13(4): 195–211.
34. Rosiek A, Tomaszewska A, Lachert E, et al. Działalność jednostek organizacyjnych służby krwi w Polsce w 2020 roku. *J Trans Med* 2021 (14); 4: 194–213.
35. Rosiek A, et al. Nieradkiewicz A., Lachert E., Działalność jednostek organizacyjnych służby krwi w Polsce w 2021 roku. *J Transf Med.* 2022; 15(4): 273–295.
36. NICE. Blood transfusion. NICE guideline. [nice.org.uk/guidance/ng24](https://www.nice.org.uk/guidance/ng24) [Online] (18 November 2015).
37. Klein AA, Arnold P, Bingham RM, et al. AAGBI guidelines: the use of blood components and their alternatives 2016. *Anaesthesia.* 2016; 71(7): 829–842, doi: 10.1111/anae.13489, indexed in Pubmed: 27062274.
38. Senefeld JW, Franchini M, Mengoli C, et al. COVID-19 convalescent plasma for the treatment of immunocompromised patients: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Netw Open.* 2023; 6(1): e2250647, doi: 10.1001/jamanetworkopen.2022.50647, indexed in Pubmed: 36633846.
39. Estcourt LJ. Why has demand for platelet components increased? A review. *Transfus Med.* 2014; 24(5): 260–268, doi: 10.1111/tme.12155, indexed in Pubmed: 25327286.
40. Simancas-Racines D, Osorio D, Martí-Carvajal AJ, et al. Leukoreduction for the prevention of adverse reactions from allogeneic blood transfusion. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015; 2015(12): CD009745, doi: 10.1002/14651858.CD009745.pub2, indexed in Pubmed: 26633306.
41. Heitmiller ES, Hill RB, Marshall CE, et al. Blood wastage reduction using Lean Sigma methodology. *Transfusion.* 2010; 50(9): 1887–1896, doi: 10.1111/j.1537-2995.2010.02679.x, indexed in Pubmed: 20456700.
42. Stanworth SJ, New HV, Apelseth TO, et al. Effects of the COVID-19 pandemic on supply and use of blood for transfusion. *Lancet Haematol.* 2020; 7(10): e756–e764, doi: 10.1016/S2352-3026(20)30186-1, indexed in Pubmed: 32628911.
43. Lu W, et al. Yazer M., Li N. Hospital red blood cell and platelet supply and utilization from March to December of the first year of the COVID-19 pandemic: The Best collaborative study. *Transfusion.* 2022; 62: 1559–1570.
44. Ondrasik R, Khan J, Szczepiorkowski ZM, et al. Passive order auditing associated with reductions in red blood cell utilization: National blood shortage experience. *Transfusion.* 2022; 62: 1551–1558.
45. Free RJ, Sapiano MRP, Chavez Ortiz JL, et al. Continued stabilization of blood collections and transfusions in the United States: Findings from the 2021 National Blood Collection and Utilization Survey. *Transfusion.* 2023; 63 Suppl 4(Suppl 4): S8–SS18, doi: 10.1111/trf.17360, indexed in Pubmed: 37070720.
46. Baron DM, Franchini M, Goobie SM, et al. Patient blood management during the COVID-19 pandemic: a narrative review. *Anaesthesia.* 2020; 75(8): 1105–1113, doi: 10.1111/anae.15095, indexed in Pubmed: 32339260.
47. Bolcato M, Russo M, Trentino K, et al. Patient blood management: The best approach to transfusion medicine risk management. *Transfus Apher Sci.* 2020; 59(4): 102779, doi: 10.1016/j.transci.2020.102779, indexed in Pubmed: 32359972.
48. Shander A, Hardy JF, Ozawa S, et al. Collaborators. A Global definition of patient blood management. *Anesth Analg.* 2022; 135(3): 476–488, doi: 10.1213/ANE.0000000000005873, indexed in Pubmed: 35147598.

# Methods of identification of human immunodeficiency virus (HIV) infections in Polish blood donors (2005–2022)

Ewa Sulkowska, Piotr Grabarczyk 

Department of Virology, Institute of Hematology and Transfusion Medicine, Warsaw, Poland

## Summary

*The human immunodeficiency virus (HIV) attacks the immune system to cause a lifelong severe illness called AIDS (acquired immunodeficiency syndrome). The HIV infection is a serious condition associated with high costs of therapy and care. Since the beginning of the AIDS/HIV epidemic the number of HIV infected people worldwide has exceeded 84 million, and about 40 million have already died of AIDS.*

*Transfusion of blood and blood components is one of the transmission routes for HIV infection. The risk of transmission of infection by this route has been significantly reduced e.g. by introducing mandatory screening tests for blood donors. There are still however reports of sporadic cases of transfusion transmitted infections related to the so-called diagnostic window and virus polymorphism.*

*In Poland, mandatory testing of anti-HIV were introduced for all blood donors in 1987, and HIV RNA in 2005. Enzyme immunoassays (EIA) have gradually been improved and currently all Polish Blood Transfusion Centers (BTCs) analyze both IgG and IgM antibodies as well as p24 antigen (IV generation tests) in donors. HIV RNA is tested in individual donations (IDT) or in mini pools (MP); the sensitivity expressed as 95% limit of detection [95% LOD] is 45–18 IU/mL and 1469 IU/mL — 302 IU/mL, respectively.*

*Verification tests were always performed at the Department of Virology of the Institute of Hematology and Transfusion Medicine (IHTM) with Western blot (WB) and molecular biology methods: transcription mediated amplification (TMA) and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR).*

*This publication presents detailed strategy and methodology for conducting screening and verification tests for HIV in Polish blood donors in the years 2005–2022. The study is an extension and update of a part of the author's doctoral dissertation and initiates a discussion on the donor qualification process and the effectiveness of screening studies.*

**Key words:** RNA HIV; anti-HIV; p24 antigen; blood donor; screening tests; NAT; WB HIV

*J. Transf. Med.* 2023; 16: 211–227

---

**Correspondence address:** dr n. med. Ewa Sulkowska, Department of Virology, Institute of Hematology and Transfusion Medicine, ul. Chocimska 5, 00–791 Warszawa, Poland, e-mail: esulkowska@ihit.waw.pl  
Translation: mgr Krystyna Dudziak

Received: 03.10.2023

Accepted: 03.11.2023

Early publication date: 31.12.2023

This article is available in open access under Creative Common Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) license, allowing to download articles and share them with others as long as they credit the authors and the publisher, but without permission to change them in any way or use them commercially.

## Introduction

More than 30 years after the discovery of the HIV virus, the epidemiology of HIV infections worldwide is still a significant public health care challenge. Since the beginning of the AIDS epidemic, approximately 85 million people have been diagnosed with HIV and about 40 million have died [1]. In Poland, since the beginning of the epidemic (1985), the infection has been detected in about 28,000 people. AIDS was diagnosed in nearly 4 thousand people and 1,448 patients have died [2].

Currently, transfusion of blood and blood components is safer than ever before. Procedures for reducing the risk of pathogen transmission (HIV included), have been successively implemented in the Polish blood transfusion service as reflected in published documents and legal acts [3–8] pursuant to the recommendations of European Union directives [9–12] and the World Health Organization (WHO) [13]. Manufacturers of equipment and tests have Food and Drug Administration (FDA) certificates [14]. However, despite implementation of all procedures strengthening the safety of blood and blood components, sporadic cases of transfusion transmitted HIV infections are still reported worldwide [15–19].

### Discovery of HIV vs transfusion safety; beginnings of testing in transfusion medicine

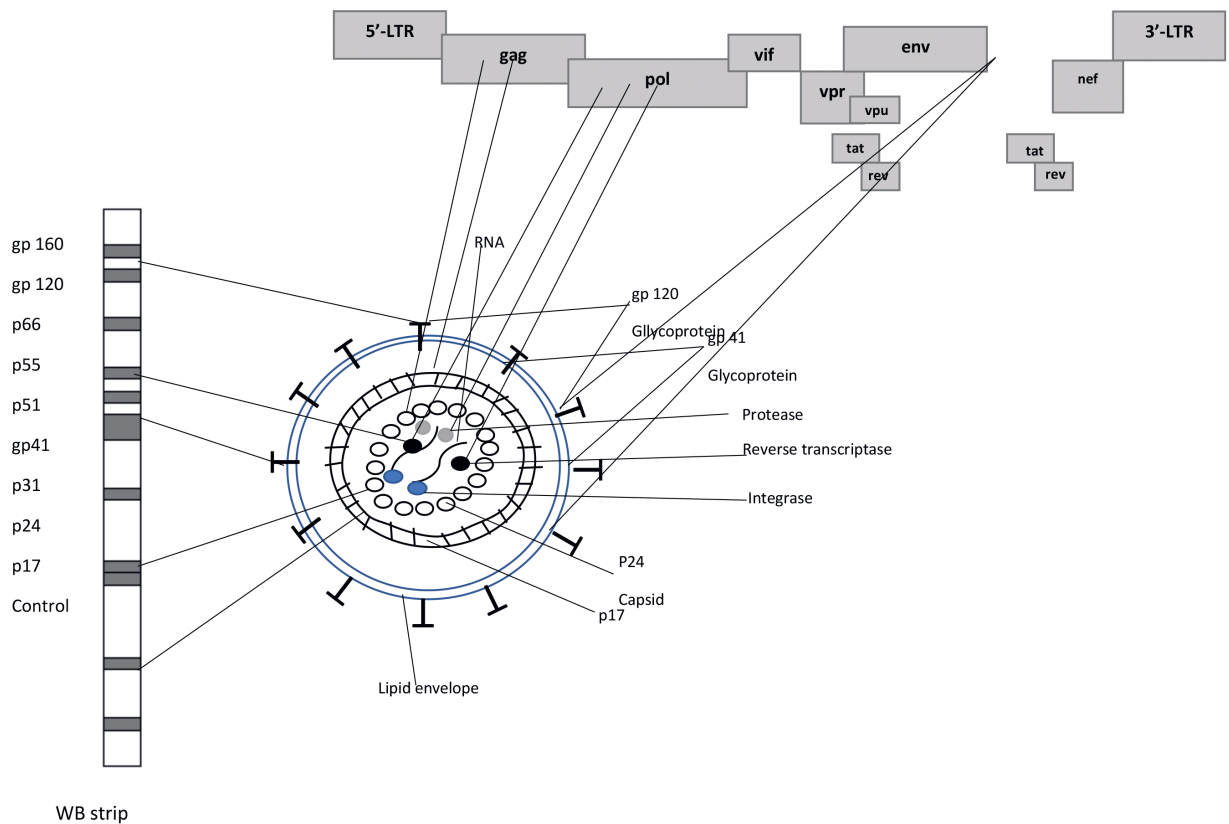
AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) was first recognized in the summer of 1981 in the United States. Young homosexual men developed opportunistic infections which resulted in severe pneumonia caused by *Pneumocystis carinii* bacteria. Patients were emaciated with facial lesions caused by a rare type of cancer called Kaposi's sarcoma. The characteristic feature of the disease was lymphopenia and a significant decrease in the CD4+ lymphocyte count [20]. Observations and epidemiological data from 1982 showed that the newly described syndrome spread to other groups of patients including hemophiliacs and drug addicts and manifested properties of infectious disease (transmitted through body fluids, infected blood or blood products) [21–26]. In September 1982, the CDC (Centre for Disease Prevention and Control) suggested AIDS as the name for the described disease [20]. In early 1983, AIDS was first reported among women-partners of infected men [24]. There have also been reports of AIDS in children

who had most likely contracted the disease during pregnancy, labor or soon after birth [27, 28].

In March 1983, recommendations for AIDS prevention were issued in the United States of America and individuals from high risk groups were deferred/discouraged from donating blood and blood components for clinical use. The aim was to reduce the risk of AIDS transmission through transfusion of blood or blood components. At that time, transfusion-related AIDS accounted for approximately 2% of all AIDS cases reported in the United States [29]. At the beginning of the epidemic it was estimated that as many as 1 per 100 donations could have been responsible for HIV or HCV infection [30]. The March recommendations had no significant impact on the procedures related to the safety of blood and blood components because the proposed donor eligibility/qualification strategies in the USA were questioned as ineffective or discriminatory towards the homosexual male community [31].

Further studies on identification of the cause of AIDS infections led to the isolation of a new virus at the Pasteur Institute in Paris in May 1983. The virus was named LAV (Lymphadenopathy-Associated Virus), later LAV<sub>BRO</sub> (BRO — from the first letters of the patient's last name). This virus was signaled as the hypothetical cause of AIDS [32]. The newly discovered retrovirus had many of the characteristics of the previously discovered human T-cell leukemia virus (HTLV). The virus was isolated from the RNA genetic material of a Caucasian patient with AIDS. Ultimately, the newly identified virus was classified as human T-lymphotropic retrovirus [32].

The next step towards identifying the factors that cause AIDS was the discovery of American scientists from the National Cancer Institute in Bethesda. In April 1984, the Institute announced that AIDS was caused by HTLV-III retrovirus. During a joint conference with the Pasteur Institute, LAV and HTLV-III were announced as identical and were the probable cause of AIDS [33]. At that stage it was assumed that a vaccine could become available within two years [34]. In 1986, the newly discovered virus was named HIV [35]. There were numerous controversies as to which center was the first to isolate HIV. The dispute seems to have been settled by the Nobel Prize awarded in Medicine and Physiology in 2008 which went to Professors Françoise Barré-Sinoussi and Luc Montagnier for the discovery of the human immunodeficiency virus (HIV) [36].



**Figure 1.** Organization of the HIV virion and the construction of the Western blot test (based on [40])

At the beginning of 1985, the FDA registered the first enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of anti-HTLV III/LAV antibodies [37]. In the same year, recommendations were issued for donors of blood and blood components to be screened for anti-HTLV III. According to these recommendations, all donations positive in screening tests were to be subjected to utilization and the donors notified of the positive test results. A test result was considered positive if repetitively reactive; each initially positive (reactive) test had to be repeated with some other available test, usually immunofluorescent or immunoprecipitation assays. In the years that followed, confirmatory testing was performed with Western blot (WB) reference test — a HIV antibody test. The first WB test was registered by the FDA on April 29, 1987 [38, 39].

### Structure, genome organization, taxonomy

HIV virus belongs to the family *Retroviridae*, genus *Lentiviridae*. So far, two types of the virus have been separated: HIV-1 and HIV-2 [40]. The

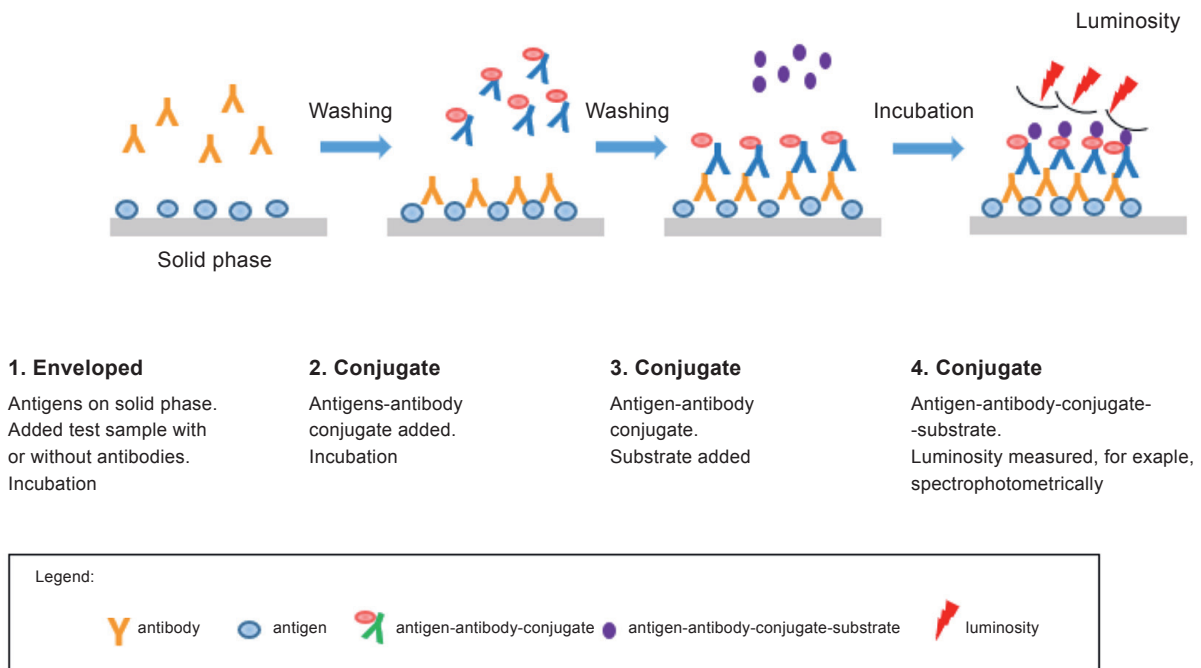
virion is spherical in shape with a diameter of about 100 nm, consisting of a cylinder-shaped core and a lipid envelope (Fig. 1). Each virion contains 72 glycoprotein complexes that are integrated into the lipid membrane, and each complex consists of trimeric outer glycoprotein gp120 and trans-membrane splicing protein gp41. The bond between gp120 and gp41 is loose, and easily broken. The gp120 glycoprotein can be detected in both serum and lymphoid tissue of HIV-infected patients. Underneath the capsid is a layer of protein (p17). In the capsid, made up of the p24 protein, there is genetic material that takes the form of two single copies of ssRNA(+). In the virion, there are p6 and p7 proteins, two transport RNA (tRNA) molecules that are primers for cDNA synthesis, viral enzymes — reverse transcriptase (a heterodimer consisting of p66 protein having a domain with polymerase activity and RNAase H and p51 protein with a stabilizing effect), p10 protease and p32 integrase (Fig. 1). The HIV-1 genome includes nine genes. Three of them — gag, pol, env encode information needed for the production of structural and enzymatic proteins, while the others, i.e. tat, rev, nef, vif, vpr, vpu carry information on the construction

of regulatory proteins, which control HIV-1 ability to infect cells, produce progeny virions and disease progress. Long Terminal Repeat (LTR) sequences are located at both ends of the genome. These are regions responsible for regulation of viral gene expression [40, 41]. The organization of the viral structure is important for understanding the design and effectiveness of tests used for identification of infected donors. WB tests are based mainly on structural proteins of HIV (Fig. 1). As mentioned earlier, WB assays confirm the specificity of antibodies detected in blood donors in diagnostic and screening tests. In Polish blood transfusion service, the WB HIV results are interpreted in accordance with the American Red Cross guidelines, where a positive result is one in which antibodies to at least one viral protein are found in each of the three protein categories — envelope-forming, core and enzyme proteins. Now that HIV tests must be certified (CE IVD and number of notified body) [42, 43] the results are interpreted according to the manufacturers' leaflets. A negative result means that no antibody to any of the proteins was detected. An indeterminate result does not meet the criteria of either a positive or negative result and is most often due to non-specific reactions or indicates an early stage of infection [44–46]. Figure

1 presents the organization of the HIV viron and the construction of the Western blot test.

### Evolution of the methodology of diagnostic and screening tests

The basic principle of enzyme immunoassays (EIA) or enzyme-linked immunosorbent assays-(ELISA) is binding of serum antibodies by antigens covalently bound to a solid phase surface, such as a microtiter well. After washing away the unbound antibodies the antigen-antibody conjugate is incubated with the substrate. In the presence of antibodies, a colored reaction pattern is produced which is monitored by spectrophotometric measures. The basic mechanisms of the I–III generation EIA assays are presented on the diagram in Figure 2. In the IV and V generation assays, not only solid phase antigens are coated but also specific anti-p24 antibodies. The sample tested for the presence of specific antibodies directed against the virus is added to the antigen-coated well (solid phase). If the sample contains antibodies directed against this antigen, an immune complex is formed and the antibody is permanently bound to the substrate. The next step is the washing out the non-specific antibodies from the tested serum/plasma. When the well is washed out, the so-called conjugate — an



**Figure 2.** Scheme of the basic principles of the I–III generation ELISA/EIA test (based on [48], the term conjugate was used to describe an enzyme-antibody complex)



antibody (directed against human antibodies) linked to the enzyme by a covalent binding. Incubation and another rinsing follows and then a substrate proper for the enzyme is added to the well. The product of the enzymatic reaction (usually coloured) is assessed by appropriate methods (most often spectrophotometric measures) although in EIA assays chemiluminometry methods are also frequently used. The design of many commercial EIA assays tests is more complicated; assays of the latest generation enable detection of both HIV antibodies and antigens.

It is worth stressing that the light signal usually correlates with the amount of antibodies in the tested material. The specificity of antigen-antibody binding renders the results obtained with EIA tests highly reliable. Sporadically however, non-specific results are obtained as result of a cross-reaction when the antibody binds to another antigen [47, 48]. It is therefore important to have each ELISA reactive result verified with a confirmation test [47, 49].

The I generation assays used lysate from infected cells as the antigen source, and visualization was based on animal monoclonal antibodies which detect human IgG class antibodies [49, 50]. Abbott Laboratories was the first company which received FDA approval of the first licensed antibody test to identify HIV in blood [51]. In the years that followed, the ELISA assay was further developed. The II generation assays used glycoproteins or recombinant antigens instead of whole proteins. The specificity and sensitivity of the tests were thus increased [50]. III generation tests used a different EIA design. Recombinant HIV antigens placed in the solid phase were used to “capture” serum anti-HIV antibodies of both IgG and IgM class. Anti-HIV antibodies from patient’s serum bind to recombinant or synthetic HIV antigens (the so-called antigen sandwich). The antibodies or antigen are covalently labeled with the enzyme or biotin/streptavidin to form the so-called conjugate (Fig. 2). The design further enhanced test specificity and enabled detection of IgM isotypes in addition to IgG class antibodies. The new tests allowed to detect antibodies about 21 days of infection which shortened the serological window period.

IV generation tests (combo), are able to detect both p24 antigen (HIV-1) and antibodies directed to HIV-1 and HIV-2. Antigen p24 is a distinctive HIV protein that makes up most of the HIV viral core or capsid. High levels of p24 are present in the blood serum of newly infected individuals during the short period between infection and se-

roconversion making p24 antigen assays useful in diagnosing primary HIV infection at a time when antibody levels are low [52]. The IV generation assay was designed/developed in 1989 by Abbott. The test contributed to shortening serological window period by 7 days (on average) as compared to III generation assays (up to 14 days) [50, 53–56]. In 2015, V-generation tests were implemented for HIV diagnosis which simultaneously detected both IgG and IgM class antibodies and the p24 antigen. The main difference as compared to IV-generation tests was the additional option of acquiring separate results for antibodies and the p24 antigen [50].

Western blot (WB) assays are used to verify tests reactive in EIA. WB is an enzyme immunoassay and the result presents in the form of bands which correspond to individual proteins (Fig. 1). The results can be read visually (no device necessary) or with the help of automated reader. WB tests determine the protein to which the antibodies were developed. The tests are of higher specificity than ELISA [57–59].

The algorithm for screening tests and verification tests in blood donors are outlined in the European guidelines [60] while for persons other than blood donors, the algorithm for HIV testing is presented in national guidelines [61–67]. In blood transfusion practice an initially reactive sample is retested in duplicate and if the result is repeat reactive a confirmatory test is performed using serological techniques and NAT (nucleic acid testing) [3–8].

Research on detection of the virus responsible for AIDS using molecular biology techniques was introduced in the United States in the second half of the 1980s [68]. Once the information on genome sequence of the virus became available it was possible to use it for blood donor screening. While analyzing the rationale for using such techniques it was emphasized however that, attention was focused on the fact, that although the HIV infection could be detected even before p24 antigen and anti-HIV antibodies appeared, the efficacy was low due to the low frequency of the expected positive results. Mathematical models demonstrated that in the U.S. HIV RNA donor testing would prevent 16 cases of viral transmission per year while the cost of such screening would amount to \$96 million [69]. Technical difficulties related to NAT testing were also emphasized. In the years that followed it was demonstrated that the implementation of screening by NAT is technically feasible and absolutely justified because it contributes to the strengthening of transfusion safety [70]. Further

HIV-1



Figure 3. Timetable of the introduction of NAT blood donation testing up to 2010 — by virus and country (based on [72])

advancement of molecular biology technology as well as development of multiplex assays for simultaneous detection of genetic material of several viruses, rendered mass screening in blood transfusion more accessible. At the same time, many countries reported numerous cases of transfusion transmitted HIV infections [71]. Several countries implemented NAT testing for blood donors. According to current national and international guidelines, NAT techniques should detect at least 10,000 IU/mL of HIV RNA per single donation [3–8]. Figure 3 presents the implementation of NAT for HIV by country.

Further evolution was stimulated (among others) by data from Germany; in the period 2007–2010, false-negative NAT results which detected a single region of HIV-1 RNA were reported in 6 blood donors. To improve the diagnostic sensitivity of HIV-1 RNA, especially of the polymorphic forms, tests were introduced that simultaneously detected at least two conserved regions (dual-target assay) of the viral genome. German studies of 2010–2014 demonstrated higher clinical sensitivity of HIV detection with dual-target assays (amplification of two regions of the viral genome) as compared to those that analyze a single region [72, 73].

The principles and diagnostic algorithm of HIV detection in the general population, differ slightly from those in blood donor screening. According to the recommendations of the Polish AIDS Scientific Society (PTN AIDS), the former type of testing should be based on serological tests. Third- and fourth-generation tests as well as the so-called rapid tests are recommended [61–65]. As of 2017, PTN AIDS recommends using IV generation tests for donor screening. In exceptional cases, HIV-1 RNA testing is allowed [66, 67]. A negative screening test 12 weeks after exposure rules out HIV transmission.

When a reactive result is obtained, the test should be repeated in duplicate; in the case of repeat reactive result, a confirmation test is re-

quired. The patient should be informed as soon as possible and informed on prevention of HIV transmission as well as referred to an outpatient clinic or hospital [74].

**Evolution of HIV screening methodology in Poland**

Anti-HIV testing of blood donors in Poland began in 1986 — about 5% of donations were then tested. According to the recommendation of the Minister of Health and Social Welfare, the detection of anti-HIV antibodies were to trigger widespread screening in blood transfusion service. Anti-HIV-antibodies were first detected in September 1986 when blood was collected from a HIV-infected donor at the Blood Transfusion Center in Opole (IHTM data). Since November 1987, mass blood donor screening was performed with II generation tests, which detected only anti-HIV-1 antibodies 42 days of exposure (on average). At the same time, new methods were evaluated and procedures developed for correct and reliable interpretation of results [75]. The first recommendations for blood transfusion service regarding HIV/AIDS prophylaxis and diagnosis were issued in Poland in 1989 with the aim of standardizing diagnostic procedures for HIV infection [76]. In the years that followed donor screening was performed with III generation tests. In 2000, IV generation EIA tests were implemented which detected antibodies and antigens. Another step towards better safety of blood and blood components was the implementation in the first quarter of 2007 of IV generation chemiluminescent tests using a fully automated apparatus. Full automation reduced the risk of human error during testing [77].

In Poland, HIV genetic material was first tested in donors with indeterminate results in Western blot and in individuals exposed to HIV-infected material. Viral DNA integrated with host DNA was tested and no HIV genetic material was detected [78]. NAT screening in blood donors for HIV RNA

which detected infection before serological markers appeared was implemented in Poland in the second half of 2003. At first, only some BTCs performed this screening using Procleix test (mandatory at the time for HCV RNA) which could also be used for HIV-1 RNA detection. Moreover, since 2003, HIV RNA testing became an additional procedure apart from Western blot, used for confirmation of repeat reactive results in serological tests [79]. In 2005, HIV RNA testing became mandatory for every donation [77, 79].

### Sample collection for HIV screening

Blood samples for pathogen testing are collected during or after the donation from the same venipuncture and into disposable tubes (vacuum system). Samples from donor candidates are collected during the donor qualification procedure.

Only negative test results qualify blood or blood components for clinical use [3–8].

### Methods

Serological tests, were always performed in single donations; NAT assays in single donations or minipools of equal volume plasma from “n” donor samples ( $n = 24$  or  $8$  or  $6$ ). The tests and equipment/apparatus were CE IVD marked/certified. Screening tests were performed according to IHTM recommendations as presented in the subsequent versions of the “*Medical Principles for Collection of blood, Separation and issue of Blood Components for Organizational Units of the Public Blood Transfusion Service*” [3–5] and subsequent legal acts [6–8]. International regulations do not specify the principles of test design; according to the Directive, tests should detect the most common subtypes, mutants, recombinant forms, as well as newly emerging forms of the virus [42].

### Serological tests

According to national and international recommendations [3–9], the analytical and clinical sensitivity and specificity of serological tests was close to 100% and  $> 99.5\%$  respectively. From 2005 to 2022, tests from various manufacturers were used in BTCs for blood donor screening. Figure 4 presents the serological methods used for donor screening at individual BTCs in Poland in 2005–2022.

The algorithm for HIV immunochemical testing used throughout the period under analysis is shown in Figure 5. It was described in detail in the successive versions of the recommendations

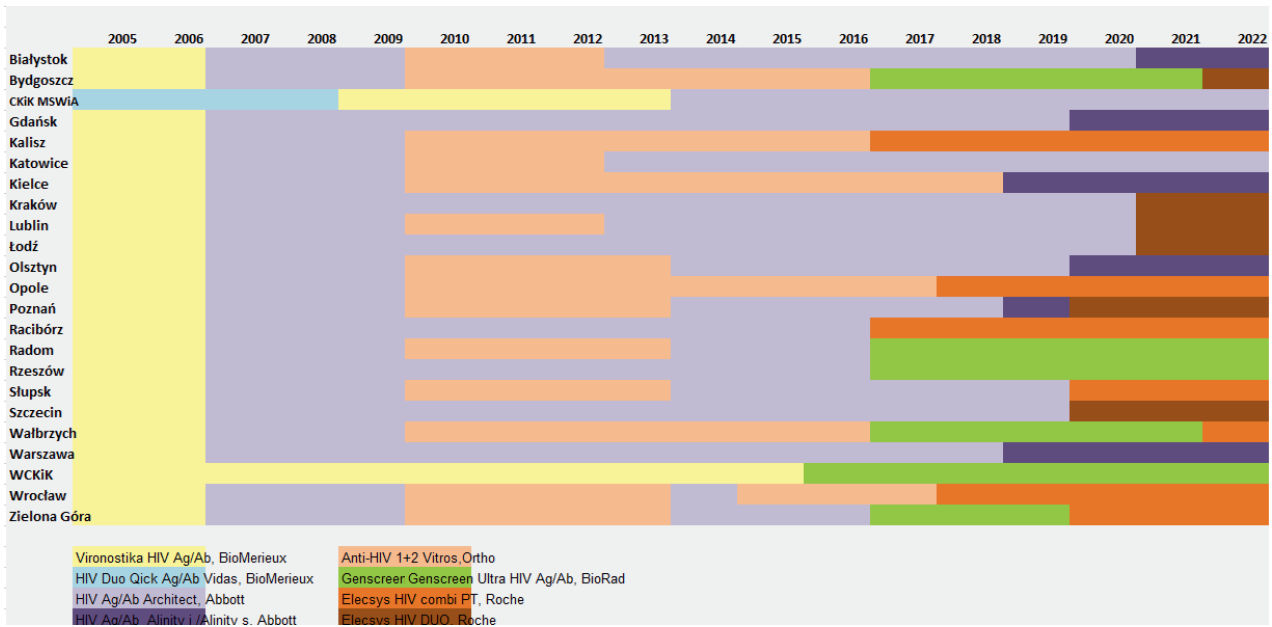
in effect in blood transfusion service (the *Medical Principles* [3–5] and the later *Good Practices* [6–8]).

According to current Polish regulations, an initially reactive result (IR) in the screening test had to be repeated in duplicate from the same sample on the following day. If repeat reactive result (RR) is obtained (at least two positive results in three tests), the donor’ blood sample was sent to IHTM for confirmatory assay.

### NAT screening for HIV RNA

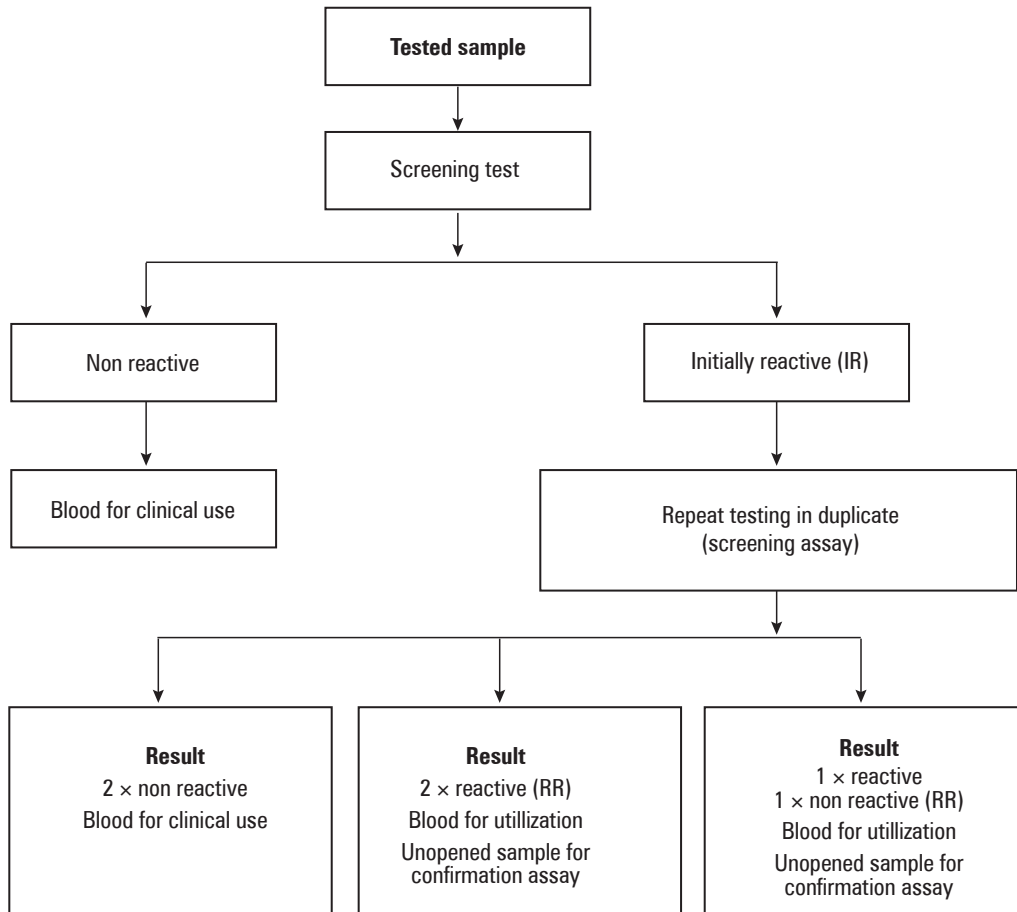
Since its implementation in the Polish blood transfusion service, NAT testing has been performed with two alternative methods: PCR (Polymerase Chain Reaction) and TMA (Transcription Mediated Amplification). The essence of PCR is the *in vitro* multiplication (amplification) of a selected genome fragment using thermostable DNA polymerase (Fig. 6). HIV is an RNA virus, therefore the first step must be reverse transcription. For this purpose a reverse transcriptase or DNA polymerase with both polymerase and reverse transcriptase properties are used. PCR is a cycling process — each cycle consists of three steps that differ as regards temperature. Repetition of the cycle doubles the number of the amplified DNA fragments. In reality, the reaction is slightly less effective mainly due to lower activity of the polymerase enzyme used in PCR. Specificity of the process is determined by proper selection/design of primer sequences, probes and temperature of reaction. The outcome is a copy of the tested DNA fragment of precise length and sequence [46]. A variation of the PCR method is RT-PCR (real time Polymerase Chain Reaction), which detects the amplification in actual/real time. The transcription mediated amplification (TMA) reaction uses transcription as a method to amplify nucleic acids. The composition of the reaction mixture is similar to that in PCR but here two enzymes are used: murine reverse transcriptase (RT) and bacteriophage T7 RNA polymerase. A schematic of the TMA reaction is shown in Figure 7 [46]. The efficiency of TMA and PCR reactions is very high – within an hour the number of nucleic acid molecules is multiplied up to  $10^9$  times. Tests performed in blood donations are fully automated which markedly reduces the risk of false results due to human error.

Table 1 presents the characteristics of the tests used for HIV RNA screening. HIV RNA testing was performed at the Molecular Biology Laboratories (PBMs) of the Blood Transfusion Centers. The Centers that had no PBM outsour-

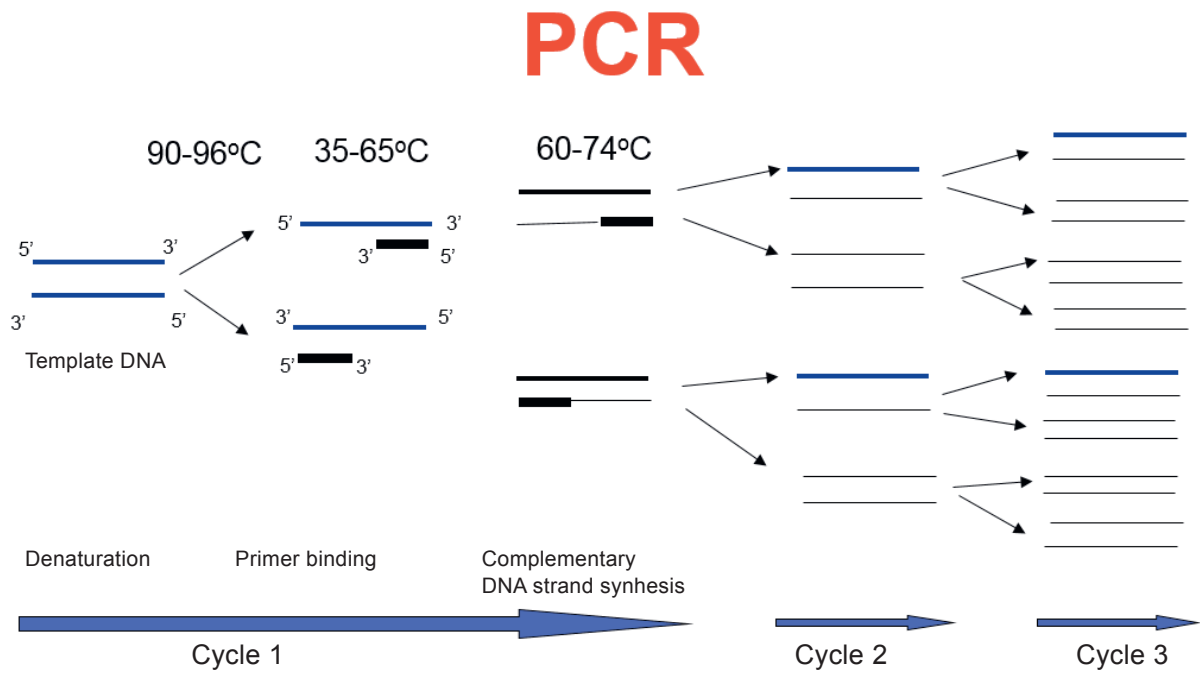


**Figure 4.** Serological screening methods used in Polish blood transfusion service (2005–2022)

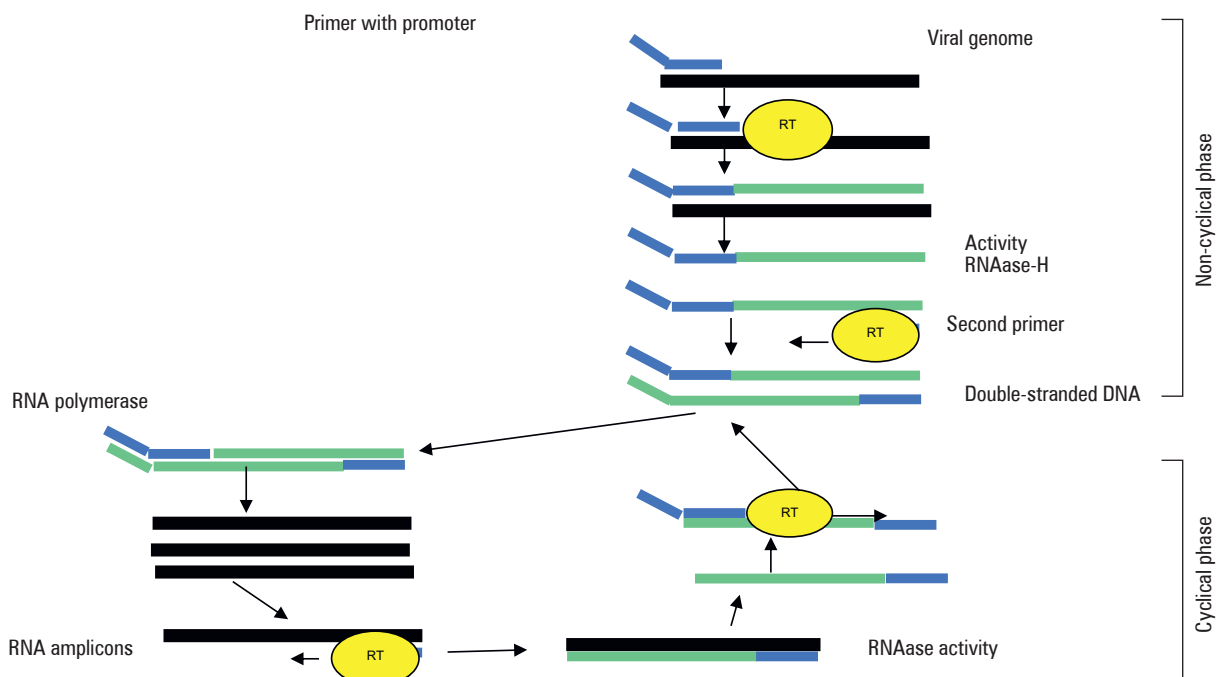
ELISA — enzyme-linked immunosorbent assay; ELFA — enzyme-fluorescent assay; CIMA — chemiluminescent assay; ECI — enzyme-linked immunosorbent assay; ECLIA — electrochemiluminescent assay; CKiK MSWiA — Blood Transfusion Center of the Ministry of Internal Affairs and Administration, supervised by the Ministry of Internal Affairs and Administration



**Figure 5.** Algorithm of screening tests (serological tests) performed in Blood Transfusion Centers (BTCs)



**Figure 6.** PCR reaction scheme, (based on [46])



**Figure 7.** TMA reaction scheme, (based on [46])

**Table 1.** Characteristics of RNA HIV screening in BTC and confirmatory test in BTCs in the period 2005–2022 (sensitivity data based on IFU)

Test	Format	Sensitivity for donation IU/ml (95%LOD)	Differential tests	Used
<b>TMA</b>				
Procleix Ultrio		45	Yes	2005–2009
Procleix Ultrio Plus	IDT	27.6	Yes	2010–2013
Procleix Ultrio Elite		18	Yes	2014–2022
<b>TMA</b>				
Procleix Ultrio Plus	MP 8	221	Yes	2012–2014
<b>PCR</b>				
Ampliscreen HIV	MP 24	1469	No	2005–2007
<b>R-T PCR</b>				
Taqscreen MPX		294	Yes	2007–2012
Taqscreen MPX v.2.0	MP 6	302	Yes	2013–2018
MPX		154,2	Yes	2019–2022
<b>TMA</b>				
Procleix Ultrio Elite	MP 4	72	Yes	2017–2022

IDT — study in a single donation; the number next to MP indicates the number of donations in mini pool e.g. MP 8 — study in a mini pool of 8 donations

ced the service to a BTC that had. Information on NAT screening assays used at BTCs is shown in Figure 8. Two strategies were used for screening with molecular biology techniques:

- in single donations (ID) or
- in mini-pools (MP) of plasma from “n” donations.

The methods used were:

- TMA in:
  - single donations (ID) or
  - minipools of 8 donations (in 1 BTC in 2012–2014) or
  - minipools of 4 donations (4 BTCs since 2022);
- PCR in minipools of:
  - 24 donations (2005–2006) or
  - 6 donations (since 2007).

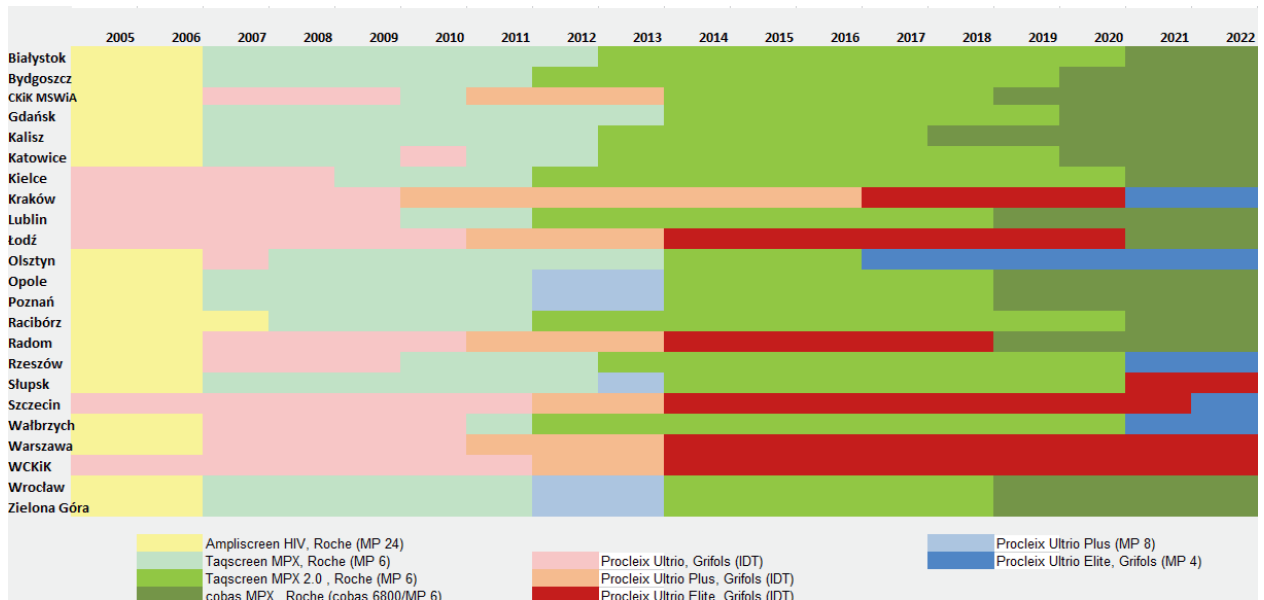
All screening tests except *ampliscreen HIV* were multiplex which allowed simultaneous detection of HIV and HCV RNA and HBV DNA. A reactive result in a multiplex test required additional differential testing to identify the virus responsible for the reactive result. An exception here was the Taqscreen MPX v. 2 test in which a reactive result was immediately obtained with an indication of the virus responsible. Once a reactive result was obtained for a TMA screened pool, single donations were tested using differential tests for each virus (HIV-1/2, HCV, HBV). If a reactive result was obtained in single donations, testing was performed in duplicate with differential tests. A nonreactive result did not defer the donor but blood components from such a donation could not be used for clinical

purposes. The flowchart for each test is shown in Figure 9.

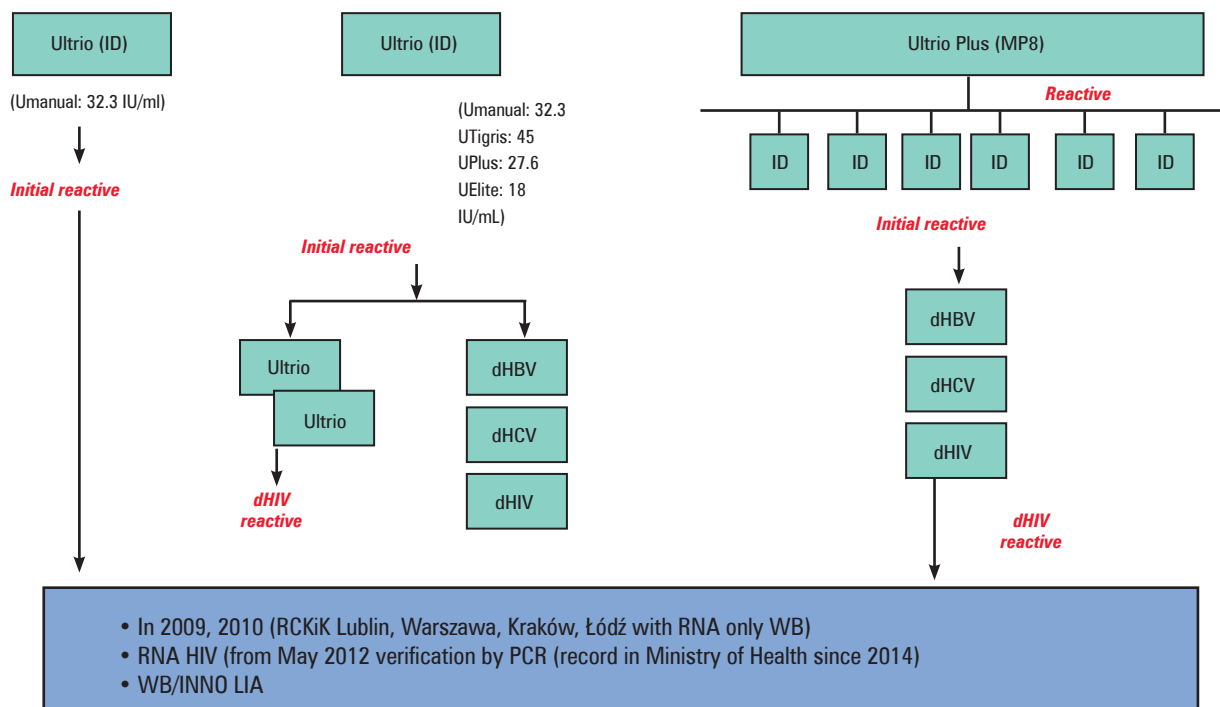
When an initially reactive result was obtained in PCR (in 24 or 6 donation pools), further tests were performed in the BTCs. For 24 donation pools, the next step was the testing of 4 subpools of 6 donations each. Once a reactive result was obtained in a 6 donation pool (subpool), testing was continued in the single donations of this subpool. Donations from the negative subpool were qualified for clinical use. The testing algorithm is shown in Figure 10.

### Evolution of NAT screening strategies in BTCs

The analytical sensitivity of NAT tests used for HIV RNA screening in the Polish blood transfusion service has evolved as more assays were introduced and the assay format changed (MP24, 6, 4, IDT). In 2005–2006, the sensitivity of the MP24 test was estimated at 1469 IU/mL [95% LOD]. Following implementation in 2007 of the Cobas Taqscreen assay in MP6 the analytical sensitivity increased several-fold to approximately 300 IU/ml. The analytical sensitivity of TMA in single donations was very high from the very beginning for: Procleix Ultrio (2005–2009 — 45 IU/ml [estimated 95% LOD], for Procleix Ultrio Plus (2010–2013) 27.6 IU/ml and the highest for the Procleix Ultrio Elite test (used since 2014 until now) — about 18 IU/ml. Data presented in Figure 11.



**Figure 8.** Molecular biology screening methods used in Polish blood transfusion service in the period 2005–2022; CKiK MSWiA — Blood Transfusion Center of the Ministry of Internal Affairs and Administration, supervised by the Ministry of Internal Affairs and Administration

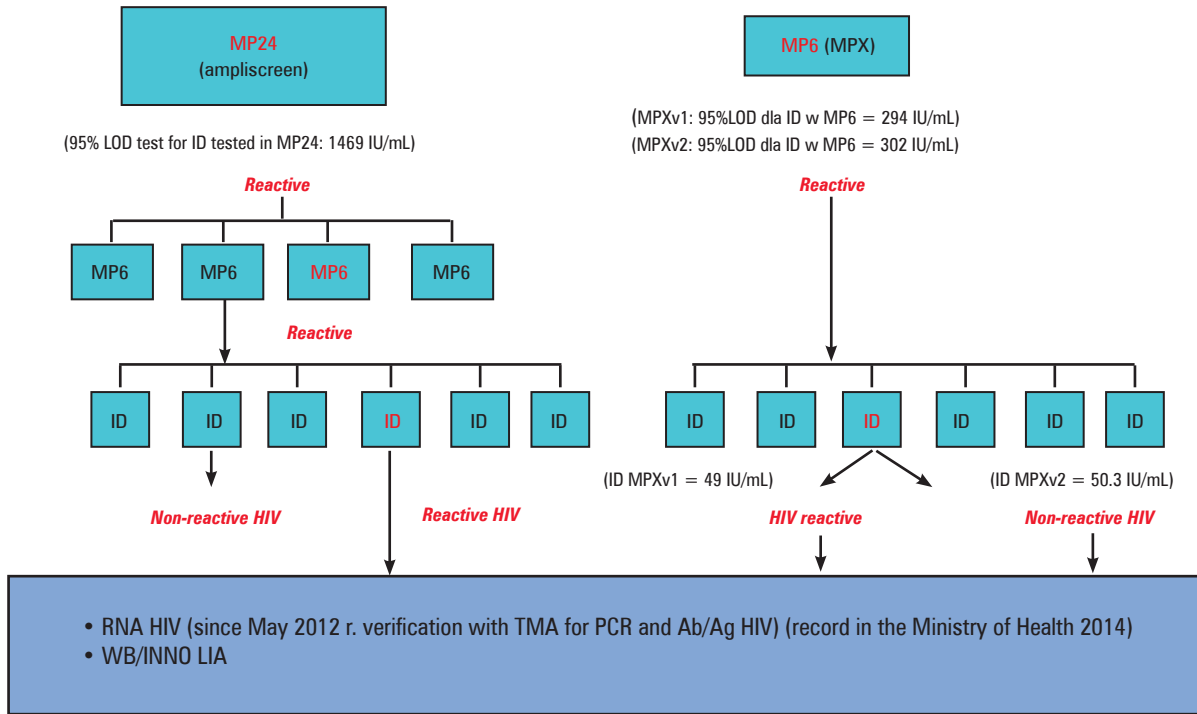


**Figure 9.** Procedure for reactive result in HIV RNA screening — TMA (sensitivity data based on IFU)  
 ID — individual donation; dHBV — discrimination HBV; dHCV — discrimination HCV; dHIV — discrimination HIV;  
 RNA — ribonucleic acid; WB — western blot test; MZ — Ministry of Health; WB/INNO LIA — western blot test;  
 PCR — polymerase chain reaction

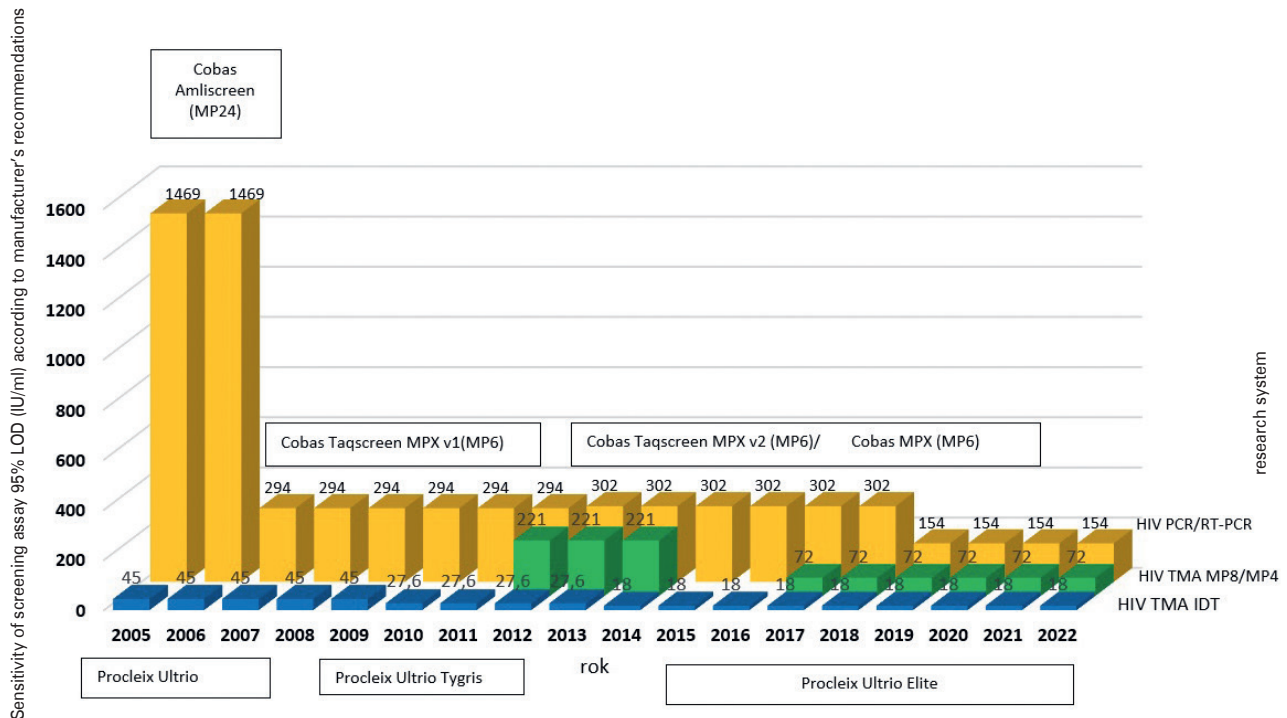
### Quality control of screening tests performed in BTCs (2005–2022)

The BTC laboratories which performed screening for transfusion transmitted pathogens followed the procedures listed below to ensure reliability of results:

- screening was preceded by evaluation of equipment and tests as well as validation of processes;
- process validation was conducted in each BTC immediately prior to screening with sample panels prepared by the Department of Virology

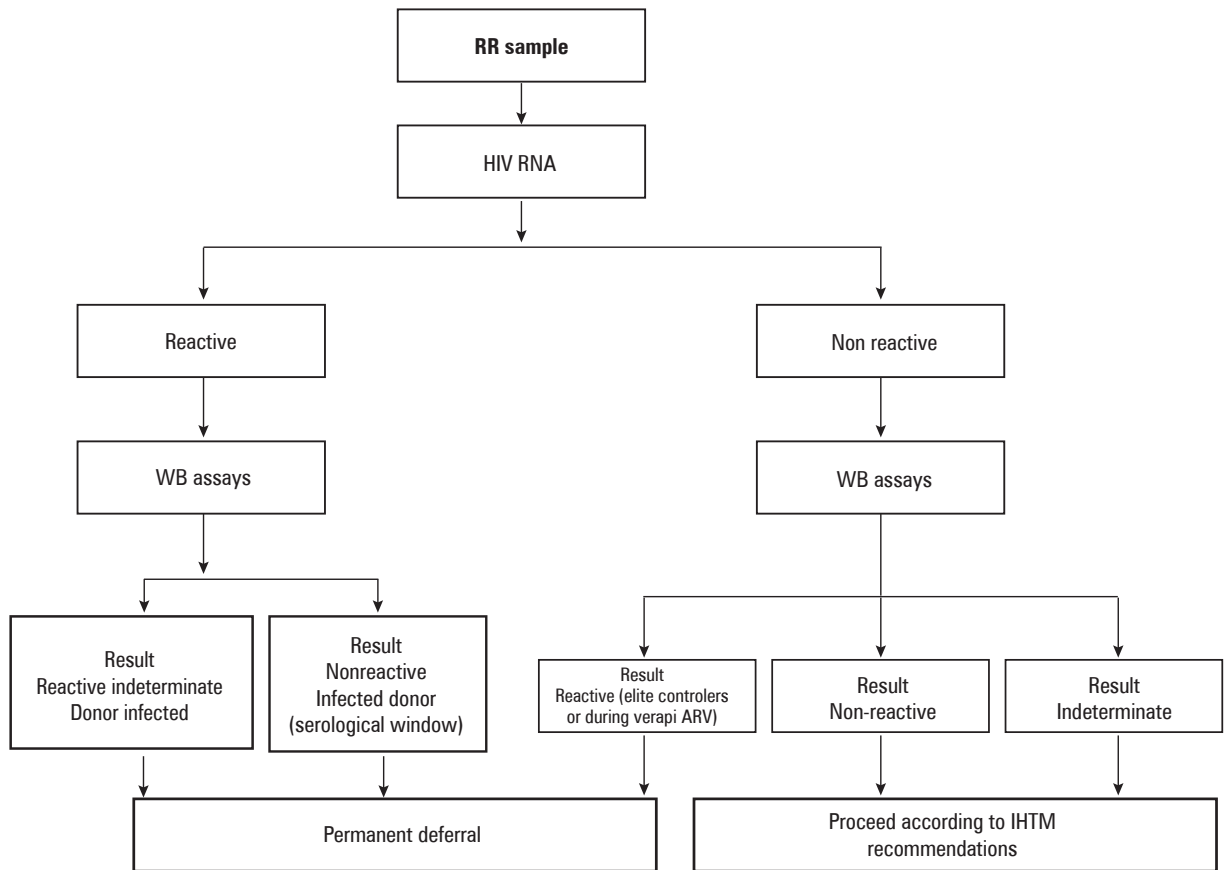


**Figure 10.** Procedure in Blood Transfusion Centers for reactive result in PCR (sensitivity data based on IFU) MP24 — minipool 24 donations; MP6 — minipool 6 donations; ID — individual donation; RNA — ribonucleic acid; HIV — human immunodeficiency virus; TMA — transcription mediated amplification; PCR — Polymerase Chain Reaction Ab/Ag HIV — antibody/ antigen HIV; MZ — Ministry of Health; WB/INNO LIA — western blot test



**Figure 11.** Analytical sensitivity of NAT tests for HIV RNA in Polish blood transfusion service in the years 2005–2022 (sensitivity data based on IFU)





**Figure 12.** Algorithm of the verification procedure following repeat reactive HIV-1/2 result in screening tests

- screening tests were performed strictly according to manufacturer’s requirements;
- all laboratories participated in the external quality control program as well as in the EDCNet program of daily external laboratory quality control;
- all laboratories were audited regularly every two years.

### Confirmatory tests

Samples which were repeat reactive in serological screening or/and NAT were sent to the Department of Virology (IHTM for verification/confirmatory testing.

Confirmatory tests serve to confirm or exclude HIV infection — samples which were repeat reactive in serological screening or/and NAT were tested in Western blot (WB) and HIV genetic material

was additionally tested (always in single donations). The flowchart for the verification process is shown in Figure 12. In May 2012, the algorithm for confirmatory NAT testing was supplemented by mandatory testing of HIV RNA with a method other than the one used for screening. If screening was performed with PCR, the TMA method was used for confirmatory testing at IHTM; if screening was performed with TMA, the verification test was performed with PCR. This recommendation served to detect polymorphic forms which remained undetected by NAT. The intention was to eliminate false negative results (the so-called escape mutants).

In cases of unconfirmed infection, the first, 6-month temporary deferral was imposed on the donor. Subsequent indeterminate results of confirmatory tests resulted in extension of deferral by another 6 months to more than two years. The donor could be restored to donating blood when the results of both screening and confirmatory tests were negative. If non-specific results persisted

**Table 2.** WB tests used at the IHTM for confirmatory testing of HIV infection in the years 2005–2022

Years	Test (manufacturer, country)
2005–2006	HIV BLOT 2.2 (Genelabs® Diagnostics, Singapore)
2007–2008	HIV-1 BLOT 1.3 (Genelabs® Diagnostics, Singapore)
2009	HIV BLOT 2.2 (Genelabs® Diagnostics, Singapore)
2010	INNO-LIA™ HIV I/II Score (Innogenetics, Belgium)
2011–2012	HIV BLOT 2.2 (MP Diagnostics, Singapore)
2013	HIV BLOT 2.2 (MP Diagnostics, Singapore ) INNO-LIA™ HIV I/II Score (Innogenetics, Belgium)
2014	INNO-LIA™ HIV I/II Score (Innogenetics, Belgium)
2015–2022	recomLine HIV-1& HIV-2 IgG (Mikrogen, Germany)
From 10.2022	INNO-LIA™ HIV I/II Score (Fujirebio, Belgium)

**Table 3.** NAT tests used in verification studies at the IHTM in the years 2005–2022 (sensitivity data based on IFU)

Years	Test (manufacturer/m country)	Sensitivity to donation IU/ml (95%LOD)	Number of amplified regions
2005–2006	Procleix Ultrio (Gen-probe, USA)	32.3 IU/ml	No data*
2007–2009	Procleix Ultrio (Gen-probe, USA)	32.3 IU/ml	No data*
	Cobas Ampliscreen HIV-1 v 1.5 (Roche, USA)	61.2 IU/ml	No data*
2010	Procleix Ultrio (Gen-probe, USA)	32.3 IU/ml	No data*
	Procleix Ultrio Plus (Gen-probe, USA)	28.6 IU/ml	No data*
	Cobas Ampliscreen HIV-1 v 1.5 (Roche, USA)	61.2 IU/ml	No data*
2011–2013	Procleix Ultrio Plus (Gen-probe, USA)	28.6 IU/ml	No data*
	Cobas Ampliscreen HIV-1 v 1.5 (Roche, USA)	61.2 IU/ml	No data*
2014	Procleix Ultrio Elite (Gen-probe, USA)	18 IU/ml	2
	Confirmatory PCR Kit HIV-1 v 1.1 (GFE Blut, Germany)	89.5 IU/ml	3
2015–2021	Procleix Ultrio Elite (Gen-probe, USA)	18 IU/ml	2
	Confirmatory PCR Kit HIV-1 v 1.2 (GFE Blut, Germany)	13.7 IU/ml	3
From 11.2021	Procleix Ultrio Elite (Gen-probe, USA)	18 IU/ml	2
	artus® HI Virus — 1 RG RT-PCR KIT (Qiagen, Germany)	66.9 IU/ml	1

\*No information in test flyer/leaflet

for longer periods of time, long-term temporary deferral (2–5 years) was imposed on the donor. Permanent deferral was imposed on the donor only after HIV infection was confirmed.

During the period covered by the current analysis, WB tests from various manufacturers were used for serological confirmation assays (Table 2). Tests used for HIV-1/2 RNA detection in verification testing are presented in Table 3.

### Residual risk of transfusion-transmitted HIV infection; how to reduce the risk

Despite screening tests, the risk of transfusion transmitted HIV infection still exists (residual risk). One way to reduce this risk is the deferral of donor candidates and donors who have reported behavior and circumstances associated with higher risk of HIV infection in the pre-donation

questionnaire or during medical interview. Implementation of serological screening tests and NAT has dramatically increased the safety of blood and blood components. Bruhn et al. conducted estimates of screening efficacy (assuming alternatively two values of infectious dose  $ID_{50} = 3.16$  viremia and  $ID_{50} = 316$  viremia) for the RBCs in donations from first-time and multiple donors for different screening scenarios worldwide [80].

Screening efficacy in donations from first-time donors increased from 98.73% for screening performed with anti-HIV antibody detecting tests to 99.78% for both ID-NAT and antibody tests; in donations from multiple donors the screening efficacy ranged from 86.7% for anti-HIV antibody tests to 97.68% for the more effective ID-NAT/Ab + testing strategy [80]. Lelie et al. estimated the diagnostic window period for the Ultrio Elite test on the Panther platform (single donation) at 4 days, and for the MPX test on the cobas 6800 platform (6 donation minipool) at 5.7 days. Currently, the estimated residual risk is  $< 1/1,000,000$  donations and defined as the risk of transfusion transmitted infection despite the use of screening tests, all control measures and good practices for multiple donors in developed countries.

### **Current status and the future of blood donor testing for HIV**

The current screening and verification pattern seems to be sufficient to ensure transfusion safety of blood and blood components. The analysis of residual risk demonstrates that further increase of the sensitivity of NAT testing will not contribute much to blood safety. The level of residual risk is acceptable and does not justify further financial investment to increase test sensitivity.

**Conflict of interest:** none declared

### **References**

1. <http://aidsinfo.unaids.org>.
2. [https://aids.gov.pl/hiv\\_aids/450-2-2/](https://aids.gov.pl/hiv_aids/450-2-2/).
3. Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby, pod red. M. Łętowskiej. Wydanie I, Warszawa 2006.
4. Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby, pod red. M. Łętowskiej. Wydanie II. Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa 2011.
5. Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby, pod red. M. Łętowskiej. Wydanie III, Warszawa 2014.
6. Obwieszczenie Ministra Zdrowia z dnia 9 czerwca 2017 r. w sprawie wymagań dobrej praktyki pobierania krwi i jej składników, badania, preparatyki, przechowywania, wydawania i transportu dla jednostek organizacyjnych publicznej służby krwi, 2017.
7. Obwieszczenie Ministra Zdrowia z dnia 6 marca 2019 w sprawie wymagań dobrej praktyki pobierania krwi i jej składników, badania, preparatyki, przechowywania, wydawania i transportu dla jednostek organizacyjnych publicznej służby krwi, 2019.
8. Obwieszczenie Ministra Zdrowia z dnia 30 marca 2021 w sprawie wymagań dobrej praktyki pobierania krwi i jej składników, badania, preparatyki, przechowywania, wydawania i transportu dla jednostek organizacyjnych publicznej służby krwi, 2021.
9. Dyrektywa 2002/98/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 27 stycznia 2003 r. ustanawiająca normy jakości i bezpiecznego pobierania, testowania, przetwarzania, przechowywania i dystrybucji krwi ludzkiej i składników krwi oraz zmieniająca dyrektywę 2001/83/WE 2003.
10. Dyrektywa Komisji 2004/33/WE z dnia 22 marca 2004 wykonująca dyrektywę 2002/98/WE Parlamentu Europejskiego w zakresie niektórych wymagań technicznych dotyczących krwi i jej składników, 2004.
11. Dyrektywa Komisji 2005/61/WE z dnia 30 września 2005 wykonująca dyrektywę 2002/98/WE Parlamentu Europejskiego w zakresie wymogów dotyczących śledzenia losów krwi oraz powiadamiania o poważnych, niepożądanych reakcjach i zdarzeniach, 2005.
12. Dyrektywa Komisji 2005/62/WE z dnia 30 września 2005 wykonująca dyrektywę 2002/98/WE Parlamentu Europejskiego w zakresie norm i specyfikacji wspólnotowych odnoszących się do systemu jakości obowiązującego w placówkach służby krwi, 2005.
13. WHO. Screening donated blood for transfusion-transmissible infections: recommendations. ISBN 978 92 4 154788 8.
14. FDA. <https://www.fda.gov>.
15. Ferreira M, Nel T. Differential transmission of human immunodeficiency virus (HIV) via blood components from an HIV-infected donor. *Transfusion*. 2005; 46(1): 156–157, doi: 10.1111/j.1537-2995.2006.00688.x, indexed in Pubmed: 16398747.
16. Zanetti AR, Bodini U, Clerici M, et al. Transfusion of red blood cells from an HIV-RNA-positive/anti-HIV-negative donor without HIV infection in the recipient. *Transfusion*. 2007; 47(7): 1328–1329, doi: 10.1111/j.1537-2995.2007.01298.x, indexed in Pubmed: 17581171.
17. Kalus U, Edelmann A, Pruss A, et al. Noninfectious transfusion of platelets donated before detection of human immunodeficiency virus RNA in plasma. *Transfusion*. 2009; 49(3): 435–439, doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.02012.x, indexed in Pubmed: 19040413.
18. Schmidt M, Korn K, Nübling C, et al. First transmission of human immunodeficiency virus Type 1 by a cellular blood product after mandatory nucleic acid screening in Germany. *Transfusion*. 2009; 49(9): 1836–1844, doi: 10.1111/j.1537-2995.2009.02203.x, indexed in Pubmed: 19453990.
19. Álvarez M, Luis-Hidalgo M, Bracho MA, et al. Transmission of human immunodeficiency virus Type-1 by fresh-frozen plasma treated with methylene blue and light. *Transfusion* 2016; 56(4): 831–836, doi: 10.1111/trf.13409, indexed in Pubmed: 26585542.
20. CDC. Pneumocystis pneumonia – Los Angeles. *MMWR* 1981: 250–252.

21. CDC. Kaposi's sarcoma and pneumocystis pneumonia among homosexual men – New York City and California. *MMWR* 1981; 305–308.
22. CDC A. CDC. A cluster of Kaposi's sarcoma and Pneumocystis carinii Pneumonia among homosexual male Resident of Los Angeles City and range Counties, California. *MMWR* 1982; 305–307.
23. CDC. Current Trends Update on Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) — United States. *MMWR* 1982; 507–508.
24. CDC. Eideamic Notes and Reort Possible transfusion-associated acquired immune deficiency syndrome (AIDS) – California. *MMWR* 1982; 652–654.
25. CDC. Opportunistic Infections and Kaposi's sarcoma among Haitians in the United States *MMWR* 1982; 353–354.
26. CDC. Update on acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) among patients with hemophilia A. *MMWR* 1982; 644–652.
27. CDC. Unexplained Immunodeficiency and opportunistic infections in infants. New York, New Jersey, California *MMWR* 1982, 665–667.
28. CDC. Current trends acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *MMWR* 1983; 309–311.
29. CDC. Current trends prevention of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): report of inter-agency recommendations. *MMWR* 1983; 101–103.
30. Goodman J. The safety and availability of blood and tissues — progress and challenges. *N Engl J Med.* 2004; 351(8): 819–822, doi: 10.1056/nejme048146, indexed in Pubmed: 15317896.
31. Leveton LB, Sox HC, Stoto MA. HIV and the blood supply: an analysis of crisis decisionmaking: Academy Press (US); 1995. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK232419/>, doi: 10.17226/4989, indexed in Pubmed: 25121199.
32. Barré-Sinoussi F. HIV/Aids: the exemplary history of an epidemic which resists]. *Med Sci (Paris)* 2018; 34(6-7): 499–500, doi: 10.1051/medsci/20183406001, indexed in Pubmed: 30067222.
33. Marks PW. The blood supply and men who have sex with men. *N Engl J Med.* 2017; 376(15): 1486–1487, doi: 10.1056/nejmc1701828, indexed in Pubmed: 28406277.
34. Culliton B. Five firms with the right stuff. *Science.* 1984; 225(4667): 1129–1129, doi: 10.1126/science.225.4667.1129, indexed in Pubmed: 17782407.
35. Coffin J, Haase A, Levy J, et al. Human immunodeficiency viruses. *Science.* 1986; 232(4751): 697–697, doi: 10.1126/science.3008335, indexed in Pubmed: 3008335.
36. Vahlne A. A historical reflection on the discovery of human retroviruses. *Retrovirology.* 2009; 6(1), doi: 10.1186/1742-4690-6-40, indexed in Pubmed: 19409074.
37. Weiss SH. Screening test for HTLV-III (AIDS agent) antibodies. Specificity, sensitivity, and applications. *JAMA: The Journal of the American Medical Association.* 1985; 253(2): 221–225, doi: 10.1001/jama.253.2.221.
38. CDC. Provisional public health service inter-agency recommendations for screening donated blood and plasma for antibody to the virus causing acquired immunodeficiency syndrome. *MMWR* 1985; 1-5.
39. CDC. Perspectives in disease prevention and healthpromotion public health service guidelines for counseling and antibody testing to prevent HIV infection and AIDS *MMWR* 1987; 509–515.
40. Gurtler L, Aepfelbacher M, Bauerfeind U, et al. Human immunodeficiency virus (HIV). *Transfus Med Hemother.* 2016; 43(3): 203–222, doi: 10.1159/000445852, indexed in Pubmed: 27403093.
41. Hoffmann C (ed.). HIV 2015/16. ISBN: 978-3-941727-17-5. Medizin Fokus Verlag, Hamburg 2015.
42. Dyrektywa 98/79/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 27 października 1998 r. w sprawie wyrobów medycznych używanych do diagnozy in vitro. 1998.
43. Decyzja Komisji z dnia 3 lutego 2009 r. zmieniająca decyzję 2002/364/WE w sprawie wspólnych specyfikacji technicznych dla wyrobów medycznych używanych do diagnozy in vitro. 2009.
44. (CDC) CfDC. Interpretation and use of the western blot assay for serodiagnosis. *Morbidity & Mortality Weekly Report* 1989.
45. Shaw GM, Hunter E. HIV Transmission. *Cold spring harbor perspectives in medicine.* 2012; 2(11): a006965–a006965, doi: 10.1101/cshperspect.a006965, indexed in Pubmed: 23043157.
46. Brojer EG. (red). Czynniki zakaźne istotne w transfuzjologii. Fundacja Pro Pharmacia Futura, 2015.
47. Gan S, Patel K. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Invest Dermatol.* 2013; 133(9): 1–3, doi: 10.1038/jid.2013.287, indexed in Pubmed: 23949770.
48. SeraCare. Technical Guide for ELISA. [guide-kpl-elisa-technical-guide pdf](https://www.seracare.com/~/media/seracare/Technical-Guide-for-ELISA.pdf), 2013.
49. Barrett J, Dawson G, Heller J, et al. Performance evaluation of the abbott HTLV III EIA, a test for antibody to HTLV III in donor blood. *Am J Clin Pathol.* 1986; 86(2): 180–185, doi: 10.1093/ajcp/86.2.180, indexed in Pubmed: 3017089.
50. Alexander T. Human immunodeficiency virus diagnostic testing: 30 years of evolution. *Clin Vaccine Immunol.* 2016; 23(4): 249–253, doi: 10.1128/cvi.00053-16, indexed in Pubmed: 26936099.
51. Heckler M. The Challenge of the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med.* 1985; 103(5): 655, doi: 10.7326/0003-4819-103-5-655, indexed in Pubmed: 2996394.
52. Peters P, Westheimer E, Cohen S, et al. Screening yield of HIV antigen/antibody combination and pooled HIV RNA testing for acute HIV infection in a high-prevalence population. *JAMA.* 2016; 315(7): 682–690, doi: 10.1001/jama.2016.0286, indexed in Pubmed: 26881371.
53. Gürtler L, Mühlbacher A, Michl U, et al. Reduction of the diagnostic window with a new combined p24 antigen and human immunodeficiency virus antibody screening assay. *J Virol Methods.* 1998; 75(1): 27–38, doi: 10.1016/s0166-0934(98)00094-9, indexed in Pubmed: 9820572.
54. Yerly S, Simon F, Perrin L. Early diagnosis of primary HIV infections: using a combined screening test (p24 antigen and anti-HIV antibodies). *Schweiz Med Wochenschr.* 1999; 129(8):319–322.
55. Liniacki A, Piasek A. Diagnostyka laboratoryjna zakażeń HIV. *Przegl Lek* 2003; 478–484, indexed in Pubmed: 14750423.
56. Weber B, Thorstensson R, Tanprasert S, et al. Reduction of the diagnostic window in three cases of human immunodeficiency-1 subtype E primary infection with fourth-generation HIV screening assays. *Vox Sanguinis.* 2003; 85(2): 73–79, doi: 10.1046/j.1423-0410.2003.00334.x, indexed in Pubmed: 12925157.
57. Ferroni P, Tagger A, Pasquali M, et al. Antibody screening and confirmatory testing of Italian blood donors. One-year experience of a reference center. *Vox Sang.* 1988; 55(3): 143–147, doi: 10.1111/j.1423-0410.1988.tb05081.x, indexed in Pubmed: 3238947.
58. Hofbauer JM, Schulz TF, Hengster P, et al. Comparison of Western blot (immunoblot) based on recombinant-derived p41 with conventional tests for serodiagnosis of human immunodeficiency virus infections. *J Clin Microbiol.* 1988; 26(1):

- 116–120, doi: 10.1128/jcm.26.1.116-120.1988, indexed in Pubmed: 3277988.
59. Lelie PN, Reesink HW, Huisman H. Evaluation of three second-generation and three confirmatory assays for antibodies to human immunodeficiency virus. *Vox Sang.* 1988; 54(2): 84–91, doi: 10.1111/j.1423-0410.1988.tb01622.x, indexed in Pubmed: 3287766.
60. ECPAobTC-P.T. Guide to the preparation, use and quality assurance of Blood components, 2015.
61. AIDS PTN. Zasady Opieki nad osobami zakażonymi HIV, 2007.
62. AIDS PTN. Zasady opieki nad osobami zakażonymi HIV, 2011.
63. AIDS PTN. Zasady opieki nad osobami zakażonymi HIV, 2013.
64. AIDS PTN. Zasady opieki nad osobami zakażonymi HIV, 2015.
65. AIDS PTN. Zasady opieki nad osobami zakażonymi HIV, 2016.
66. AIDS PTN. Zasady opieki nad osobami zakażonymi HIV, 2017.
67. AIDS PTN. Zasady opieki nad osobami zakażonymi HIV, 2018.
68. Shaw G, Hahn B, Arya S, et al. Molecular characterization of human T-cell leukemia (lymphotropic) virus type III in the acquired immune deficiency syndrome. *Science.* 1984; 226 (4679): 1165–1171, doi: 10.1126/science.6095449, indexed in Pubmed: 6095449.
69. AuBuchon JP, Birkmeyer JD, Busch MP. Cost-effectiveness of expanded human immunodeficiency virus-testing protocols for donated blood. *Transfusion.* 1997; 37(1): 45–51, doi: 10.1046/j.1537-2995.1997.37197176950.x, indexed in Pubmed: 9024489.
70. Cardoso MS, Koerner K, Kubanek B. Mini-pool screening by nucleic acid testing for hepatitis B virus, hepatitis C virus, and HIV: preliminary results. *Transfusion.* 1998; 38(10): 905–907, doi: 10.1046/j.1537-2995.1998.381098440853.x, indexed in Pubmed: 9767739.
71. Roth W. History and future of nucleic acid amplification technology blood donor testing. *Transfus Med Hemother.* 2019; 46(2): 67–75, doi: 10.1159/000496749, indexed in Pubmed: 31191192.
72. Chudy M, Weber-Schehl M, Pichl L, et al. Blood screening nucleic acid amplification tests for human immunodeficiency virus type 1 may require two different amplification targets. *Transfusion.* 2011; 52(2): 431–439, doi: 10.1111/j.1537-2995.2011.03281.x, indexed in Pubmed: 21810100.
73. Hourfar K, Eberle J, Müller M, et al. Human immunodeficiency virus 1 dual-target nucleic acid technology improves blood safety: 5 years of experience of the German Red Cross blood donor service Baden-Württemberg–Hessen. *Transfusion.* 2018; 58(12): 2886–2893, doi: 10.1111/trf.14919, indexed in Pubmed: 30325043.
74. AIDS PTN. Zasady opieki nad osobami zakażonymi HIV, 2019.
75. Ostrowska W, Kawecka M. Przetaczanie krwi i jej pochodnych. Przepisy dla szpitali, PZWL.
76. Postępowanie Zapobiegawcze i Diagnostyczne w Przypadku Zakażenia HIV i zachorowania na AIDS, wskazówki dla pracowników służby zdrowia (do użytku służbowego). PZWL, 1989.
77. Grabarczyk P, Kopacz A, Sulkowska E, et al. Badania wirusów przenoszonych przez krew u dawców krwi w Polsce. *Przeg Epidemiol.* 2015: 591–595.
78. Brojer E, Moraczewska-Głóskowska Z, Sankowska M. Badanie obecności materiału genetycznego wirusa HIV w mononuklearach dawców krwi z wątpliwymi wynikami testu Western-Blot. *Problemy HIV i AIDS.* 1995: 9–11.
79. Mikulska MS, Grabarczyk E, Medyńska P, et al. Częstość zakażeń wirusem HIV w populacji dawców w Polsce w latach 1988–2007. *J Transf Med.* 2008: 20–27.
80. Bruhn R, Lelie N, Custer B, et al. Prevalence of human immunodeficiency virus RNA and antibody in first-time, lapsed, and repeat blood donations across five international regions and relative efficacy of alternative screening scenerios. *Transfusion.* 2013; 2399–2412, doi: 10.1111/trf.12299, indexed in Pubmed: 23782054.

# Metody identyfikacji zakażeń wirusem nabytego deficytu odporności (HIV) u dawców krwi w Polsce w latach 2005–2022

Ewa Sulkowska, Piotr Grabarczyk 

Zakład Wirusologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

## Artykuł jest tłumaczeniem pracy:

Sulkowska E, Grabarczyk P. Methods of identification of human immunodeficiency virus (HIV) infections in Polish blood donors (2005–2022). *J Transf Med* 2023; 16 (4): 211–227. DOI: 10.5603/jtm.99301

Należy cytować wersję pierwotną.

## Streszczenie

Wirus HIV stanowi wciąż istotny problem dla zdrowia publicznego w Polsce i na świecie — szacowana liczba zakażonych na całym świecie od początku epidemii AIDS/HIV przekroczyła 84 miliony osób, a z powodu AIDS zmarło około 40 mln osób.

Jedną z dróg przeniesienia zakażenia HIV jest transfuzja krwi i jej składników. Ryzyko przeniesienia zakażenia tą drogą zostało istotnie zredukowane między innymi przez wprowadzenie obowiązkowych badań przeglądowych u dawców krwi. Jednak nadal są odnotowywane sporadyczne przypadki przeniesienia zakażenia przez transfuzję związane z tak zwanym okienkiem diagnostycznym oraz polimorfizmem wirusa.

W Polsce u wszystkich dawców krwi w 1987 roku wprowadzono obowiązkowe badanie przeciwciał anti-HIV, a w 2005 roku RNA HIV. Badania technikami immunoenzymatycznymi były sukcesywnie doskonalone i obecnie wszystkie Centra Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (CKiK) w Polsce badają u dawców zarówno przeciwciała klasy IgG, jak i IgM oraz antygen p24 (testy IV generacji). RNA HIV bada się w pojedynczych donacjach (IDT) lub w mini pulach (MP); czułość wykrywania wyrażona jako 95% limit detekcji [95% LOD] wynosi odpowiednio 45 do 18 j.m./ml i 1469 j.m./ml do 302 j.m./ml.

Badania weryfikacyjne są wykonywane wyłącznie w Zakładzie Wirusologii IHiT za pomocą testów typu Western blot (WB) oraz metod biologii molekularnej: metodą amplifikacji przez transkrypcję (TMA) oraz metodą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-PCR).

W niniejszej publikacji szczegółowo przedstawiono strategię oraz metodykę prowadzenia badań przeglądowych oraz weryfikacyjnych w kierunku HIV u dawców krwi w Polsce w latach 2005–2022. Opracowanie stanowi rozwinięcie oraz aktualizację części rozprawy doktorskiej autorki oraz inicjuje dyskusję dotyczącą procesu kwalifikacji dawców oraz efektywności badań przeglądowych.

**Słowa kluczowe:** RNA HIV; anti-HIV; antygen p24; dawca krwi; badania przeglądowe; NAT; WB HIV

*J. Transf. Med.* 2023; 16: 228–245

**Adres do korespondencji:** dr n. med. Ewa Sulkowska, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Zakład Wirusologii, ul. Indry Gandhi 14, 02–776 Warszawa, e-mail: esulkowska@ihit.waw.pl

Nadesłano: 03.10.2023

Przyjęto do druku: 03.11.2023

Data pierwszej publikacji: 31.12.2023

Artykuł jest dostępny bezpłatnie na podstawie licencji Creative Commons Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) umożliwiającej jego pobranie oraz udostępnianie pod warunkiem wskazania autorstwa i wydawcy. Niedopuszczalne jest wprowadzanie jakichkolwiek zmian lub wykorzystanie komercyjne bez zgody wydawcy.

## Wstęp

Po ponad 30 latach od odkrycia ludzkiego wirusa niedoboru odporności (HIV, *human immunodeficiency virus*) sytuacja epidemiologiczna w zakresie zakażeń tym wirusem na świecie stanowi wciąż istotne wyzwanie dla zdrowia publicznego. Od początku epidemii zespołu nabytego niedoboru odporności (AIDS, *acquired immunodeficiency syndrome*) zakażenie HIV zdiagnozowano u około 85 milionów osób. Z powodu AIDS zmarło około 40 mln osób [1]. W Polsce od początku epidemii (1985 r.) zakażenie wykryto u około 28 tys. osób, AIDS rozpoznano u blisko 4 tys. osób, a 1448 chorych zmarło [2].

Obecnie przetaczanie krwi i jej składników jest bezpieczne. Procedury ograniczające ryzyko przeniesienia biologicznych czynników chorobotwórczych, w tym HIV, są wprowadzane w polskim krwiodawstwie sukcesywnie w ogłaszanych dokumentach i aktach prawnych [3–8] zgodnie z wytycznymi zawartymi w dyrektywach Unii Europejskiej [9–12] oraz zaleceniami Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) [13]. Testy i aparatura poszczególnych producentów posiadają świadectwa dopuszczenia do badań wydane przez Agencję Żywności i Leków (FDA, *Food and Drug Administration*) [14]. Nadal na świecie zdarzają się sporadyczne przypadki przeniesienia zakażenia HIV przez transfuzję, mimo wprowadzenia procedur zapewniających bezpieczeństwo krwi i jej składników [15–19].

### Odkrycie HIV a bezpieczeństwo przetoczeń oraz rozpoczęcie badań w krwiodawstwie

Zespół nabytego niedoboru odporności po raz pierwszy został rozpoznany latem 1981 roku w Stanach Zjednoczonych. Młodzi, homoseksualni mężczyźni zapadali na oportunistyczne infekcje powodujące ciężkie zapalenie płuc wywołane przez bakterię *Pneumocystis carinii*. Chorzy byli wycieńczeni, mieli zmiany na twarzy wywołane rzadkim nowotworem, zwanym mięsakiem Kaposiego. Charakterystyczną cechą tej choroby była limfopenia i znaczne obniżenie liczby limfocytów CD4+ [20]. Obserwacje i dane epidemiologiczne z 1982 roku pokazały, że nowo opisany zespół chorobowy rozprzestrzenił się również w innych grupach, między innymi wśród chorych na hemofilię, narkomanów i wykazuje cechy choroby zakaźnej; jest przenoszony przez płyny ustrojowe, zakażoną krew lub produkty krwipochodne [21–26]. *Centre for Disease*

*Prevention and Control* (CDC) we wrześniu 1982 roku dla opisanej powyżej choroby zaproponowało nazwę AIDS [20]. Na początku 1983 roku AIDS po raz pierwszy odnotowano wśród kobiet będących partnerkami mężczyzn, którzy chorowali na tę chorobę [24]. Jednocześnie pojawiły się doniesienia na temat AIDS u dzieci, które jak podejrzewano, zaraziły się od swoich matek w trakcie ciąży lub w trakcie porodu lub wkrótce po urodzeniu [27, 28].

W marcu 1983 roku w Stanach Zjednoczonych wydano zalecenia dotyczące zapobiegania AIDS. Wprowadzono rekomendacje, aby osoby należące do grup o zwiększonym ryzyku zachorowania na AIDS powstrzymywały się od oddawania krwi i jej składników do celów leczniczych. Zalecenie to miało na celu zmniejszenie ryzyka AIDS związanego z podawaniem krwi lub produktów krwipochodnych. Przypadki AIDS w następstwie przetoczenia krwi stanowiły wówczas około 2% wszystkich zgłoszonych przypadków AIDS w Stanach Zjednoczonych [29]. Szacuje się, że na początku epidemii w Stanach Zjednoczonych nawet 1 na 100 donacji mogła przenosić zakażenie HIV lub HCV [30]. Wydanie rekomendacji nie wpłynęło istotnie na zmianę procedur służących zachowaniu bezpieczeństwa krwi i jej składników w Stanach Zjednoczonych, ponieważ kwestionowano proponowane strategie kwalifikacji dawców jako nieskuteczne lub dyskryminujące środowiska homoseksualnych mężczyzn [31].

Dalsze prace nad ustaleniem przyczyny zachorowań na AIDS doprowadziły w maju 1983 roku do wyizolowania w Instytucie Pasteura w Paryżu nowego wirusa, któremu nadano nazwę LAV (ang. *lymphadenopathy-associated virus*), później LAV<sub>BRO</sub> (indeks BRO pochodził od pierwszych liter nazwiska pacjenta). Postawiono hipotezę, że to właśnie ten wirus jest przyczyną AIDS [32]. Nowo poznany retrowirus posiadał wiele cech wcześniej odkrytych wirusów ludzkiej białaczki T-komórkowej (HTLV, *human T-lymphotropic virus*). Wirus został wyizolowany z materiału pobranego od pacjenta rasy kaukaskiej, chorego na AIDS, a jego materiał genetyczny miał postać RNA. Ostatecznie nowo poznanego wirusa zakwalifikowano do rodziny retrowirusów T-limfotropowych [32].

Kolejnym krokiem w kierunku poznania czynnika wywołującego AIDS było odkrycie dokonane przez amerykańskich uczonych z *National Cancer Institute* w Bethesda. W kwietniu 1984 roku instytut ten ogłosił, że zidentyfikowano przyczynę AIDS — retrowirusa HTLV-III. Podczas wspólnej konferencji z Instytutem Pasteura ogłoszono, że LAV i HTLV-III są identyczne i są prawdopodob-

ną przyczyną AIDS [33]. Na tym etapie wiedzy o wirusie zakładano, że szczepionka zostanie opracowana w ciągu 2 lat [34]. Nazwę HIV nadano nowo odkrytemu wirusowi w 1986 roku [35]. Powstały liczne kontrowersje dotyczące ustalenia, kto pierwszy wyizolował wirusa HIV. Wydaje się, że spór ten został rozstrzygnięty przez przyznanie Nagrody Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii w 2008 roku profesorom Françoise Barré-Sinoussi i Lucowi Montagnier za odkrycie HIV [36].

Na początku 1985 roku FDA zarejestrowało pierwszy test immunoenzymatyczny (ELISA, *enzyme linked immunosorbent assay*), służący identyfikacji przeciwciał anti-HTLV III/LAV [37]. W tym samym roku wydano rekomendację badania przesiewowego dawców krwi i jej składników w kierunku anti-HTLV III. Zgodnie z tymi zaleceniami wszystkie donacje z pozytywnymi wynikami testu przeglądowego miały być niszczone, a dawca był powiadamiany o wynikach badań. Za wynik pozytywny uznawano wynik powtarzalnie reaktywny. Każde badanie, którego wynik był wstępnie reaktywny, miało być powtarzane. W tym celu stosowano inne dostępne testy, najczęściej testy immunofluorescencyjne i radioimmunoprecypitacyjne. W kolejnych latach zaczęto wykonywać badania potwierdzające z zastosowaniem testów typu *Western blot* (WB) — pierwszy test WB FDA zarejestrowała 29 kwietnia 1987 roku [38, 39], w którym ustalano obecność swoistych przeciwciał do poszczególnych białek HIV.

### Budowa, organizacja genomu, taksonomia

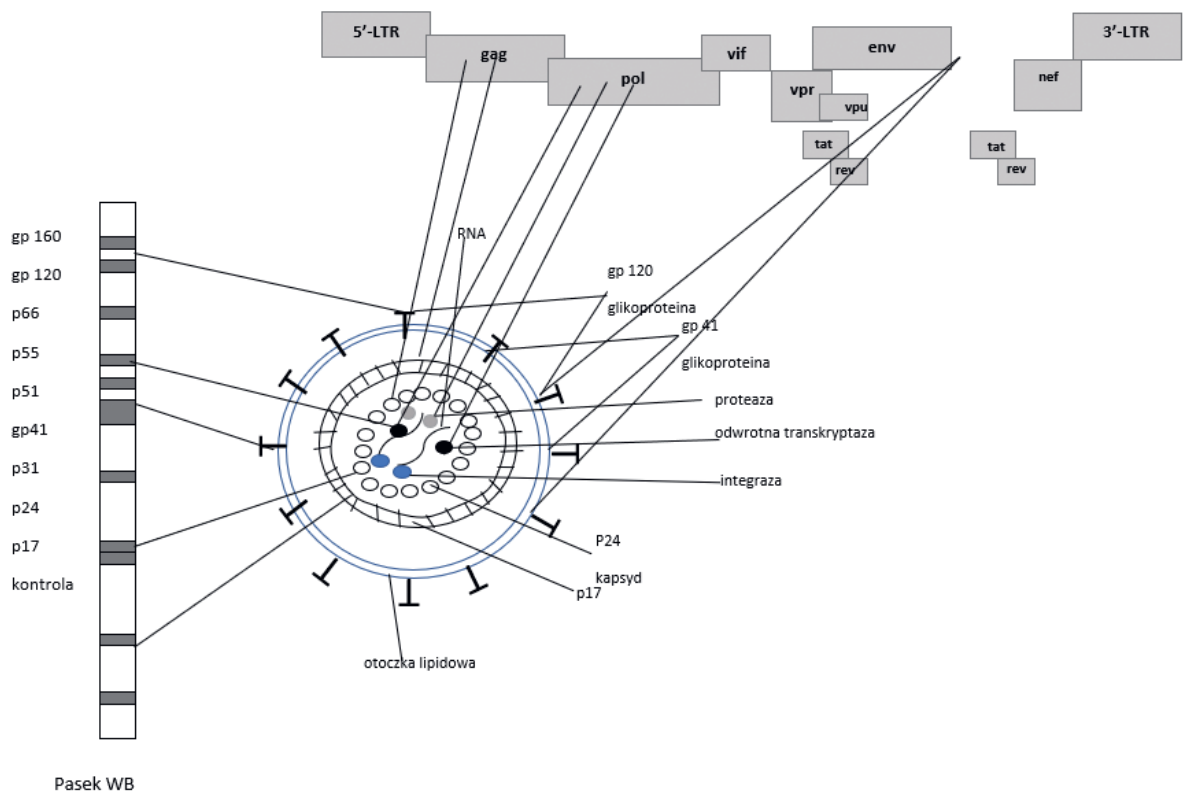
Wirus HIV należy do rodziny *Retroviridae*, rodzaj *Lentiviridae*. Dotychczas wydzielono dwa typy wirusa: HIV-1 i HIV-2 [40]. Wirion ma kulisty kształt o średnicy około 100 nm, składa się z rdzenia w kształcie cylindra oraz lipidowej osłonki (ryc. 1). Każdy wirion zawiera 72 kompleksy glikoproteinowe, które są zintegrowane z błoną lipidową, a każdy kompleks składa się z trimerów zewnętrznej glikoproteiny gp120 i transbłonowego białka spinającego gp41. Wiązanie między gp120 a gp41 jest luźne, łatwo dochodzi do jego zerwania. Glikoproteinę gp120 można wykryć zarówno w surowicy, jak i w tkance limfatycznej pacjentów zakażonych wirusem HIV. Pod osłonką znajduje się warstwa białka (p17). W kapsydzie zbudowanym z białka p24 znajduje się materiał genetyczny mający postać dwóch pojedynczych kopii ssRNA(+). W wirionie znajdują się białka p6 i p7, dwie cząsteczki transportowego RNA (tRNA) będące starterami

do syntezy cDNA, enzymy wirusowe — odwrotna transkryptaza (heterodimer składający się z białka p66 posiadającego domenę o aktywności polimeraz i RNAzy H oraz białka p51 o działaniu stabilizującym), proteaza p10 i integraza p32 (ryc. 1). Genom wirusa HIV-1 obejmuje 9 genów. Trzy z nich — *gag*, *pol*, *env* — kodują informacje potrzebne do wytworzenia białek strukturalnych i enzymatycznych, pozostałe, to jest: *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, *vpu*, niosą informacje o budowie białka regulatorowego, kontrolującego zdolność HIV-1 do zakażenia komórek, produkcji wirionów potomnych i progresji choroby. Na obu końcach genomu znajdują się sekwencje LTR (*long terminal repeat*, długie powtórzone sekwencje nukleotydów). Są to regiony odpowiedzialne za regulację ekspresji genów wirusa [40, 41]. Organizacja budowy wirusa jest istotna dla zrozumienia konstrukcji oraz efektywności testów wykorzystywanych do identyfikacji zakażonych dawców. W testach typu WB są wykorzystywane główne białka strukturalne HIV (ryc. 1). Jak powiedziano wcześniej, testy WB są wykonywane w celu potwierdzenia swoistości przeciwciał wykrytych w badaniach diagnostycznych oraz przeglądowych u dawców krwi. W polskim krwiodawstwie interpretowano wynik WB HIV zgodnie z wytycznymi Amerykańskiego Czerwonego Krzyża, gdzie za wynik dodatni uważa się wynik, w którym stwierdza się obecność przeciwciał przynajmniej do jednego białka wirusa w każdej z trzech kategorii białek — białek tworzących otoczkę, rdzeń i białek enzymatycznych. Obecnie, gdy testy do badań wirusa HIV muszą być certyfikowane (CE IVD wraz z numerem jednostki notyfikującej) [42, 43], stosuje się interpretację wyników zgodnie z ulotką producenta. Wynik ujemny to wynik, w którym nie wykryto przeciwciał do żadnego z białek. Wynik nieokreślony to wynik, który nie spełnia kryterium wyniku dodatniego ani ujemnego. Najczęściej jest spowodowany nieswoistymi reakcjami lub może wskazywać na wczesną fazę zakażenia [44–46]. Zastosowanie poszczególnych białek wirusa do skonstruowania testu przedstawiono na rycinie 1.

### Ewolucja metodyki badań diagnostycznych i przeglądowych

Testy immunoenzymatyczne (EIA, *enzyme immunoassay* lub ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*) są oparte na wiązaniu przeciwciał z surowicy pacjenta przez antygeny związane kowalencyjnie z fazą stałą (dno studzienki). Powstały kompleks antygen–przeciwciało po odpłukaniu niezwiązanych przeciwciał jest inkubowany z substra-





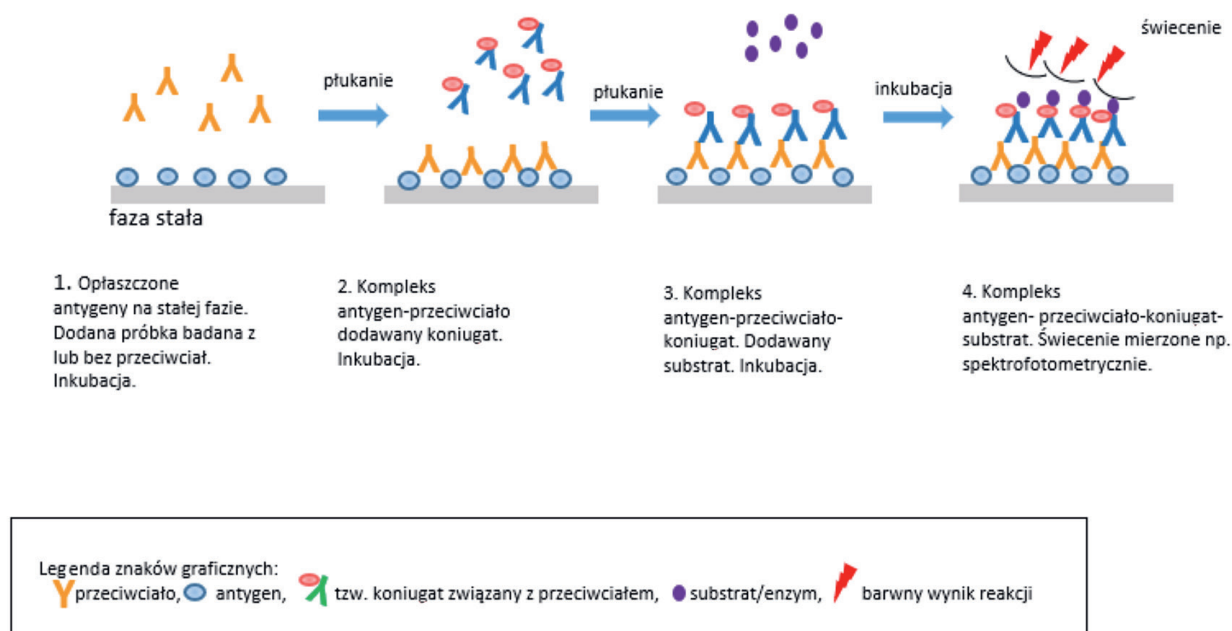
**Rycina 1.** Organizacja wirionu HIV a konstrukcja testu typu *Western blot*. Opracowano na podstawie [40]

tem. W przypadku obecności przeciwciał powstaje barwny kompleks, a produkt reakcji jest mierzony spektrofotometrycznie. Schemat obrazujący podstawowe zasady działania testu EIA I-III generacji przedstawiono na rycinie 2. W przypadku testów IV i V generacji oprócz antygenów na fazie stałej są opłaszczane swoiste przeciwciała anti-p24. W trakcie badania do dołka opłaszczanego antygenem (faza stała) jest dodawana próbka badana, w której są poszukiwane przeciwciała skierowane do białek wirusa. Jeśli obecne są w niej przeciwciała skierowane do tego antygeny, powstaje kompleks immunologiczny i przeciwciało zostaje trwale związane z podłożem. Następnym etapem badania jest odplukanie nieswoistych przeciwciał obecnych w badanej surowicy/osoczu. Po odplukaniu dołka jest dodawany tak zwany koniugat, czyli przeciwciało (skierowane przeciw przeciwciałom ludzkim) połączone wiązaniem kowalencyjnym z enzymem. Po inkubacji i ponownym przepłukaniu dołka jest dodawany odpowiedni dla użytego enzymu substrat. W wyniku reakcji enzymatycznej powstaje produkt reakcji (najczęściej barwny), którego obecność ocenia się odpowiednimi metodami (najczęściej metodą spektrofotometryczną, chociaż

często w testach EIA są stosowane także metody chemiluminometrii). Wiele komercyjnych testów EIA ma bardziej skomplikowaną konstrukcję od podanej powyżej; najnowsze ich generacje pozwalają wykryć nie tylko przeciwciała anti-HIV, ale też antygeny wirusa.

Warto podkreślić, że wartość sygnału świetlnego jest najczęściej proporcjonalna do ilości przeciwciał w badanym materiale. Dzięki swoistości wiązania antygen–przeciwciało wyniki uzyskiwane za pomocą testów EIA mają wysoką wiarygodność. Jednak sporadycznie zdarzają się przypadki, gdy jest otrzymywany wynik nieswoisty, będący następstwem reakcji krzyżowej, gdy przeciwciało wiąże się z innym antygenem [47, 48]. Dlatego ważne jest, aby w przypadku badań w kierunku wirusa HIV każdorazowo weryfikować reaktywny wynik ELISA w teście potwierdzenia [47, 49].

Do konstrukcji testów I generacji wykorzystywano jako źródło antygeny lizat z zakażonych komórek, a do wizualizacji używano monoklonalne przeciwciała zwierzęce wykrywające ludzkie przeciwciała klasy IgG [49, 50]. Firmą, która jako pierwsza otrzymała rejestrację, była Abbott Laboratories [51]. W kolejnych latach ulepszano test



**Rycina 2.** Schemat obrazujący podstawowe zasady działania testu ELISA/EIA generacji I-III. Opracowano na podstawie [48]. Koniugat — kompleks enzymu z przeciwciałami

ELISA. W testach II generacji wykorzystywano glikoproteiny lub rekombinowane antygeny, zamiast całych białek. Zmiana ta umożliwiła zwiększenie swoistości i czułości testów [50]. W testach III generacji zastosowano odmienną konstrukcję testu EIA. Rekombinowane antygeny HIV umieszczone w fazie stałej, tak jak w testach poprzedniej generacji, wykorzystano do „wyłapania” z surowicy przeciwciał anti-HIV obu klas IgG i IgM. Związane przeciwciała wykrywano za pomocą przeciwciał skierowanych do powstałych kompleksów lub innych fragmentów syntetycznych/rekombinowanych antygenów HIV wyznakowanych enzymatycznie (tzw. *antigen sandwich*). Przeciwciała lub antygen są kowalencyjnie oznakowane enzymem lub biotyną/streptawidyną, tworząc tak zwany koniugat (ryc. 2). Taka konstrukcja testu doprowadziła do dalszego zwiększenia swoistości testu oraz umożliwiła wykrywanie, oprócz przeciwciał klasy IgG, także izotypu IgM. Nowe testy pozwalały na wykrycie przeciwciał około 21 dni od zakażenia, tym samym został skrócony czas okienka serologicznego.

Testy IV generacji (tzw. combo) wykrywają zarówno antygen p24 (HIV-1), jak i przeciwciała skierowane do HIV-1 i HIV-2. Antygen p24 HIV jest białkiem tworzącym większość rdzenia wirusa. Stężenie antygeny p24 w surowicy krwi w pierw-

szych kilku tygodniach po zakażeniu jest wysokie, dlatego badanie tego markera jest szczególnie przydatne do diagnozowania infekcji HIV na wczesnym etapie, gdy poziom przeciwciał jest niski [52]. Test IV generacji został opracowany w 1989 roku przez zespół naukowy firmy Abbott. Jego stosowanie pozwala skrócić okienko serologiczne średnio o 7 dni w porównaniu z testami III generacji (do 14 dni) [50, 53–56]. W 2015 roku wprowadzono do diagnostyki HIV testy V generacji, wykrywające jednocześnie obie klasy przeciwciał (IgG i IgM) oraz antygen p24. Podstawową różnicą, w porównaniu z testami IV generacji, jest dodatkowa możliwość uzyskania oddzielnych wyników dla przeciwciał oraz antygeny p24 [50].

Do weryfikacji wyników reaktywnych w testach EIA są wykorzystywane testy typu *Western blot* (WB). Badanie ma charakter testu immunoenzymatycznego i wynik widoczny jest w postaci prążków odpowiadających poszczególnym białkom (ryc. 1). Odczyt reakcji może być wizualny, bez użycia aparatury lub zautomatyzowany, przy użyciu czytnika. W przypadku testów WB można określić, do którego białka zostały wytworzone przeciwciała. Testy te charakteryzują się wyższą swoistością niż testy ELISA [57–59].

Algorytm badań przeglądowych oraz weryfikacyjnych wykonywanych u dawców krwi przedsta-

## HIV-1

1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Niemcy		Austria Japonia Stany Zjednoczone	Austria Holandia Singapur	Kanada Francja Nowa Zelandia Hiszpania	Belgia, Hong Kong, Irlandia Szwajcaria	Grecja Polska Portugalia Wielka Brytania		RPA, Korea Południowa	Estonia Włochy Tajlandia	Kuwejt Malezja Słowenia	Finlandia Izrael Łotwa Tajwan	Dania, Norwegia	

**Rycina 3.** Harmonogram wprowadzania badań NAT w badaniu kwalifikacyjnym dawców krwi w poszczególnych krajach przed 2010 rokiem. Opracowano na podstawie [71]

wiono w wytycznych europejskich [60], a u innych osób wykonujących badanie w kierunku wirusa HIV w wytycznych krajowych [61–67]. W pionie krwiodawstwa próbka wstępnie reaktywna jest ponownie badana w dwóch powtórzeniach. Po uzyskaniu wyniku powtarzalnie reaktywnego przeprowadza się badanie weryfikacyjne za pomocą technik serologicznych i badań technikami NAT (metody biologii molekularnej, *nucleic acid testing* [3–8].

Badania nad wirusem odpowiedzialnym za AIDS technikami biologii molekularnej rozpoczęto w drugiej połowie lat 80. XX wieku w Stanach Zjednoczonych [68]. Dzięki poznaniu sekwencji genomu wirusa stały się możliwe jego badania u krwiodawców. Analizując zasadność prowadzenia badań RNA HIV u krwiodawców, podkreślano jednak, mimo że powalają one wykryć zakażenie przed pojawieniem się antygenu p24 oraz przeciwciał anti-HIV, że efektywność ich stosowania jest niewielka ze względu na niską częstość oczekiwanych wyników dodatnich. Za pomocą modeli matematycznych obliczono, że badania RNA HIV zapobiegnie w Stanach Zjednoczonych 16 przypadkom przeniesienia wirusa na rok, a koszt takich badań wyniesie 96 milionów dolarów rocznie [69]. Wskazywano na duże trudności techniczne związane z wykonaniem testów NAT oraz ich niską opłacalnością (*cost effectiveness*). W kolejnych latach wykazano, że wprowadzenie badań przeglądowych metodami biologii molekularnej jest technicznie możliwe i uzasadnione, gdyż zwiększa bezpieczeństwo przetoczeń [70]. Dalszy rozwój technologii badań molekularnych i opracowanie testów typu multipleks, wykrywających równocześnie materiał genetyczny kilku wirusów, spowodowało, że badania stały się bardziej dostępne do prowadzenia masowych badań przeglądowych w krwiodawstwie. Jednocześnie w wielu krajach pojawiały się liczne informacje mówiące o przeniesieniu zakażenia przez transfuzję krwi i jej składników [71]. W kolejnych krajach rozpoczęto wprowadzenie badań wykorzystujących metodę NAT. Obecnie zgodnie

z krajowymi oraz międzynarodowymi wytycznymi techniki NAT muszą wykrywać w przeliczeniu na pojedynczą donację przynajmniej 10.000 j.m./ml RNA HIV [3–8]. Czas wprowadzania badań za pomocą technik biologii molekularnej w kierunku wirusa HIV-1 w krwiodawstwie w różnych krajach przedstawiono na rycinie 3.

Do dalszej ewolucji badań przyczyniły się dane pochodzące między innymi z Republiki Federalnej Niemiec. W latach 2007–2010 u 6 dawców krwi otrzymano wyniki fałszywie ujemne w testach NAT wykrywających jeden region RNA HIV-1. W celu poprawy czułości diagnostycznej wykrywania RNA HIV-1, a zwłaszcza form polimorficznych, wprowadzono do użytku testy wykrywające jednocześnie przynajmniej dwa konserwatywne regiony (*dual target assay*) genomu wirusa. Badania niemieckie dotyczące okresu 2010–2014 wykazały większą czułość kliniczną wykrywania HIV testami *dual-target* (amplifikacja dwóch regionów genomu wirusa) w porównaniu z tymi, które analizują jeden region genomu wirusa [72, 73].

Zasady i schemat diagnostyki zakażenia HIV w populacji ogólnej nieznacznie różni się w porównaniu z badaniami przeglądowymi dawców krwi. Zgodnie z zaleceniami Polskiego Towarzystwa Naukowego AIDS (PTN AIDS) ten pierwszy rodzaj badań powinien się opierać na badaniach wykonywanych technikami serologicznymi. Zalecane jest stosowanie testów III i IV generacji oraz tak zwanych testów szybkich (*rapid tests*) [61–65]. Od 2017 roku PTN AIDS zaleca stosowanie testów IV generacji jako testów przesiewowych. W wyjątkowych sytuacjach dopuszcza się rozpoznanie zakażenia na podstawie badania HIV-1 RNA [66, 67]. Wynik ujemny testu przesiewowego po 12 tygodniach od ekspozycji wyklucza przeniesienie zakażenia HIV.

Po uzyskaniu wyniku reaktywnego należy wykonać badanie w dwóch powtórzeniach. Jeżeli uzyska się wynik powtarzalnie reaktywny, należy wykonać badanie za pomocą testu potwierdzenia.

Wynik dodatni należy wydać pacjentowi bez zbędnej zwłoki. Podczas wydawania wyniku należy między innymi przypomnieć o profilaktyce przenoszenia zakażeń HIV od osób zakażonych oraz skierować pacjenta do poradni/kliniki [74].

## **Ewolucja metodyki badań przeglądowych w kierunku HIV w Polsce**

Badanie dawców krwi w kierunku anty-HIV rozpoczęto w Polsce w 1986 roku — zbadano wówczas około 5% oddanych donacji. Zgodnie z zaleceniem Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej wykrycie przeciwciał anty-HIV miało być sygnałem do rozpoczęcia powszechnych badań przeglądowych w krwiodawstwie. Po raz pierwszy przeciwciała wykryto we wrześniu 1986 roku, zakażony dawca oddał krew w Stacji Krwiodawstwa w Opolu [dane Instytutu Hematologii i Transfuzjologii (IHiT)]. Początkowo od listopada 1987 roku powszechne badania krwiodawców prowadzono za pomocą testów II generacji wykrywających jedynie przeciwciała anty-HIV-1, średnio po 42 dniach od zakażenia. Jednocześnie oceniano nowe metody i ustalano procedury mające na celu uzyskiwanie wiarygodnych wyników, a także prawidłową interpretację wyników [75]. W celu ujednoczenia postępowania diagnostycznego dotyczącego diagnostyki zakażenia HIV w 1989 roku wydano pierwsze rekomendacje dotyczące profilaktyki i diagnostyki HIV/AIDS dla służby zdrowia w Polsce [76]. W polskim krwiodawstwie w kolejnych latach prowadzono badania za pomocą testów III generacji. Testy EIA IV generacji, wykrywające przeciwciała i antygeny, wprowadzono w 2000 roku. Kolejnym krokiem w kierunku zwiększenia bezpieczeństwa krwi i jej składników było wdrożenie w pierwszym kwartale 2007 roku chemiluminescencyjnych testów IV generacji wykonywanych w pełni automatycznym aparacie. Wdrożenie pełnej automatyzacji ograniczyło ryzyko wystąpienia błędu ludzkiego w trakcie badań [77].

W Polsce pierwsze badanie materiału genetycznego HIV przeprowadzono u dawców, u których w badaniach serologicznych testami typu *Western blot* otrzymano wyniki wątpliwe oraz u osób, które miały kontakt z materiałem pochodzącym od osób zakażonych. Badano DNA wirusa zintegrowane z DNA w mononuklearach dawcy. W żadnym przypadku nie wykryto materiału genetycznego wirusa HIV [78]. Przeglądowe badania NAT u dawców krwi w kierunku RNA HIV, pozwalające wykryć zakażenie przed pojawieniem się markerów serologicznych, rozpoczęto w Polsce w drugiej

połowie 2003 roku. Początkowo wykonywano je tylko w niektórych Centrach Krwiodawstwa, które wykorzystywały do prowadzenia obowiązkowego wówczas badania RNA HCV test *Procleix*, który dodatkowo dawał możliwość detekcji RNA HIV-1. Ponadto od 2003 roku badanie RNA HIV stanowiło dodatkową procedurę, obok testów *Western blot*, stosowaną do weryfikacji wyników powtarzalnie reaktywnych w testach serologicznych [79]. W 2005 roku wprowadzono obowiązek badania RNA HIV w każdej donacji [77, 79].

## **Pobieranie próbek na badanie przeglądowe w kierunku HIV**

Próbki krwi do badań czynników zakaźnych są pobierane z tego samego wkłucia, z którego pobierana jest donacja, w trakcie lub po zakończeniu donacji, do próbek jednorazowego użytku (system próżniowy). Próbki do badań od kandydatów na dawców są pobierane podczas badań kwalifikacyjnych.

Wyniki ujemne są podstawą do kwalifikacji krwi i jej składników do użytku klinicznego [3–8].

## **Metody**

Badania testami serologicznymi zawsze były wykonywane w pojedynczej donacji, technikami NAT w pojedynczej donacji lub w minipulach powstałych po zlaniu równych porcji osocza z „n” próbek dawców ( $n = 24$  lub  $8$  lub  $6$ ). Testy i aparatura wykorzystywane do badań posiadały znak CE IVD. Badania przeglądowe prowadzono zgodnie z zaleceniami IHiT, zawartymi w kolejnych wersjach „Medycznych zasad pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązujących w jednostkach organizacyjnych publicznej służby krwi” [3–5] oraz późniejszych aktach prawnych [6–8]. Przepisy międzynarodowe nie określają zasad konstrukcji testów. Zgodnie z Dyrektywą testy powinny wykrywać najczęściej spotykane podtypy, mutanty, formy zrekombinowane, jak również nowo pojawiające się formy wirusa [42].

## **Badania serologiczne**

Zgodnie z zaleceniami krajowymi oraz międzynarodowymi [3–9] testy serologiczne charakteryzowały się czułością analityczną i kliniczną zbliżoną do 100% oraz swoistością  $> 99,5\%$ . W latach 2005–2022 w Centrach Krwiodawstwa i Krwiolęcznictwa (CKiK) do badań przeglądowych dawców krwi stosowano testy różnych producentów. Zastosowanie metod serologicznych do prowadzenia

badania dawców w poszczególnych CKiK w Polsce w latach 2005–2022 przedstawiono na rycinie 4.

Algorytm badań immunochemicznych w kierunku HIV obowiązujący przez cały okres objęty analizą przedstawiono na rycinie 5. Szczegółowo był on opisywany w kolejnych wersjach rekomendacji obowiązujących w krwiodawstwie (kolejne wersje *Medycznych zasad* [3–5] oraz później *Dobrych praktyk* [6–8]).

Zgodnie z zasadami obowiązującymi w polskim krwiodawstwie po uzyskaniu wyniku reaktywnego (IR, *initially reactive*) w teście przeglądowym należało wykonać badanie w tej samej próbce natępnego dnia w dwóch powtórzeniach. Po uzyskaniu wyniku powtarzalnie reaktywnego (RR) (łącznie przynajmniej dwa wyniki dodatnie w trzech badaniach) próbkę krwi dawcy przesłano na badania weryfikacyjne do IHiT.

### Przeładowe badania NAT w kierunku RNA HIV

Badania NAT w polskim krwiodawstwie od początku ich prowadzenia są wykonywane za pomocą dwóch alternatywnych metod: reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*) i amplifikacji przez transkrypcję (TMA, *transcription mediated amplification*). Istotą reakcji PCR jest namnożenie (amplifikacja) *in vitro* wybranego fragmentu genomu przy użyciu termostabilnej polimerazy DNA (ryc. 6). Ze względu na to, że wirus HIV jest wirusem RNA, pierwszym etapem reakcji musi być odwrotna transkrypcja. Do tego celu stosuje się odwrotną transkryptazę lub polimerazę DNA o własnościach zarówno polimerazy, jak i odwrotnej transkryptazy. Reakcja PCR ma charakter cykliczny — każdy cykl składa się z trzech etapów różniących się temperaturą. Powtórzenie cyklu powoduje podwojenie liczby namnażanego fragmentu DNA. W rzeczywistości wydajność reakcji jest nieco niższa, wynika to między innymi ze spadku aktywności stosowanego w reakcji enzymu polimerazy. Odpowiednie dobranie sekwencji primerów, sond oraz temperatury reakcji warunkuje specyficzność procesu. Wynikiem reakcji PCR jest powstanie kopii badanego fragmentu DNA o ściśle określonej długości i o określonej sekwencji [46]. Odmianą metody PCR jest metoda reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-PCR, *real time-polymerase chain reaction*), która umożliwia wykrywanie tworzącego się produktu amplifikacji w czasie rzeczywistym. Metoda TMA wykorzystuje transkrypcję jako metodę amplifikacji kwasów nukleinowych. Skład mieszaniny

reakcyjnej jest podobny jak w reakcji PCR, ale tu są wykorzystywane dwa enzymy: mysia odwrotna transkryptaza (RT, *murine revers transcriptase*) oraz polimeraza RNA bakteriofaga T7. Schemat reakcji TMA przedstawiono na rycinie 7 [46]. Wydajność reakcji TMA i PCR jest bardzo wysoka — w ciągu godziny liczba cząsteczek kwasu nukleinowego jest zwiokrotniona nawet  $10^9$  razy. Badania wykonywane w krwiodawstwie są w pełni zautomatyzowane, zmniejsza to zasadniczo ryzyko wyników fałszywych spowodowanych błędem ludzkim.

W tabeli 1 przedstawiono charakterystykę testów wykorzystywanych do prowadzenia badań przeglądowych RNA HIV. Badania w kierunku RNA HIV wykonywano w Pracowniach Biologii Molekularnej (PBM) Centrów Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa. Centra, które nie miały PBM, zlecały badanie do innego CKiK. Informacje dotyczące testów NAT wykorzystywanych do badań przeglądowych w CKiK przedstawiono na rycinie 8. Badania przeglądowe technikami biologii molekularnej były prowadzone w dwóch strategiach:

- a) w pojedynczej donacji (ID) lub;
- b) w minipulach (MP) powstałych przez zlanie porcji osocza z „n” donacji.

Badania prowadzono metodą:

— TMA w:

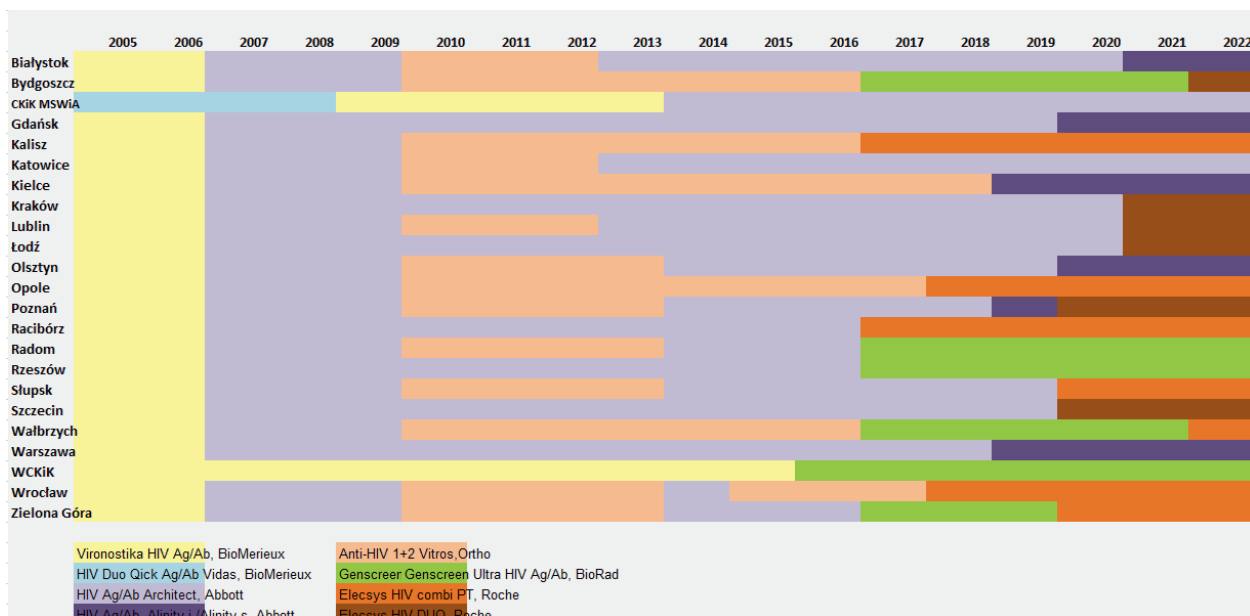
- pojedynczych donacjach (ID) lub
- minipulach złożonych z 8 donacji (w 1 CKiK w latach 2012–2014) lub
- minipulach złożonych z 4 donacji (4 CKiK od 2022 r.);

— PCR w minipulach złożonych z:

- 24 donacji (lata 2005–2006) lub
- 6 donacji (od 2007 r.).

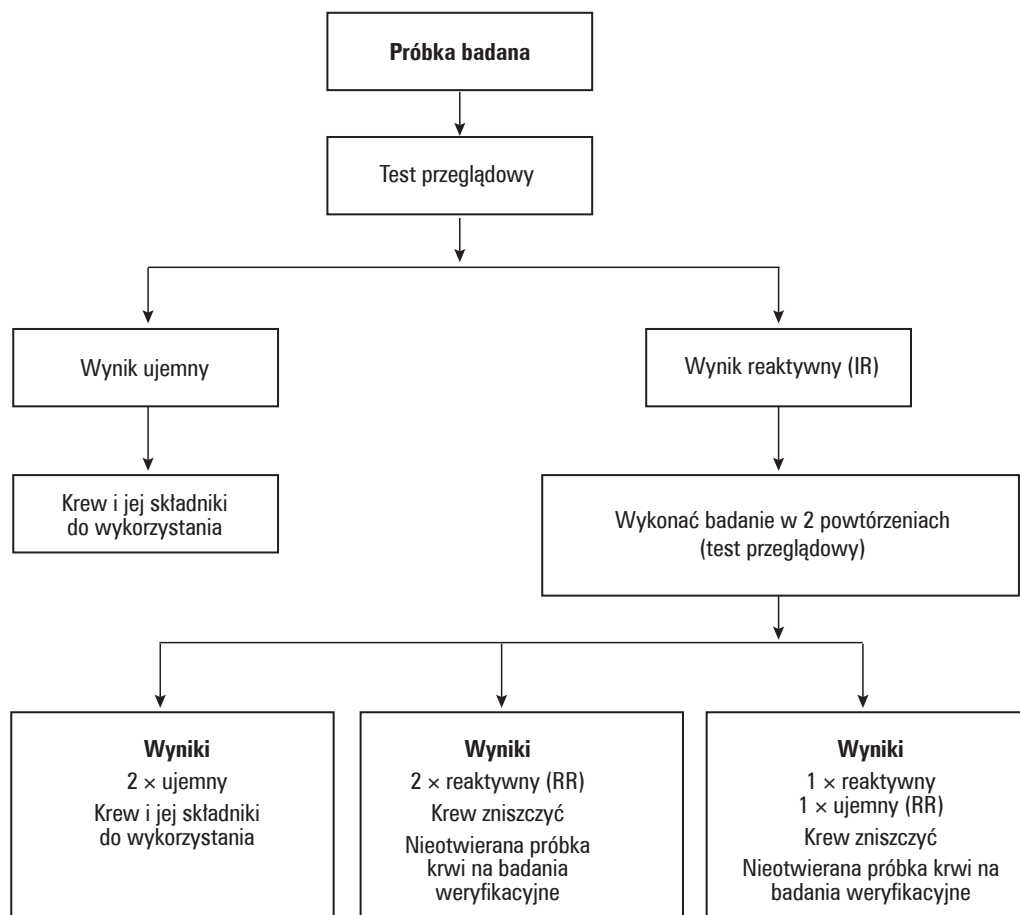
Wszystkie testy przeglądowe poza Ampliscreen HIV były testami typu *multipleks* — ich konstrukcja umożliwiała równoległe wykrycie RNA wirusów HIV i HCV oraz DNA HBV. Otrzymanie wyniku reaktywnego w teście *multipleks* (poza Taqscreen MPX v. 2) wymagało wykonania dodatkowych badań różnicujących, wskazujących obecność, którego z wirusów spowodowała reaktywny wynik testu przeglądowego. W teście Taqscreen MPX v. 2 od razu otrzymywano wynik reaktywny ze wskazaniem, który wirus został wykryty.

Po otrzymaniu wyniku reaktywnego dla puli w trakcie badania przesiewowego metodą TMA wykonywano badania w pojedynczych donacjach wchodzących w jej skład z zastosowaniem testów różnicujących w kierunku poszczególnych wirusów (HIV-1/2, HCV, HBV). W badaniach prowadzonych w pojedynczych donacjach po uzyskaniu wyniku reaktywnego wykonywano badanie w dwóch po-

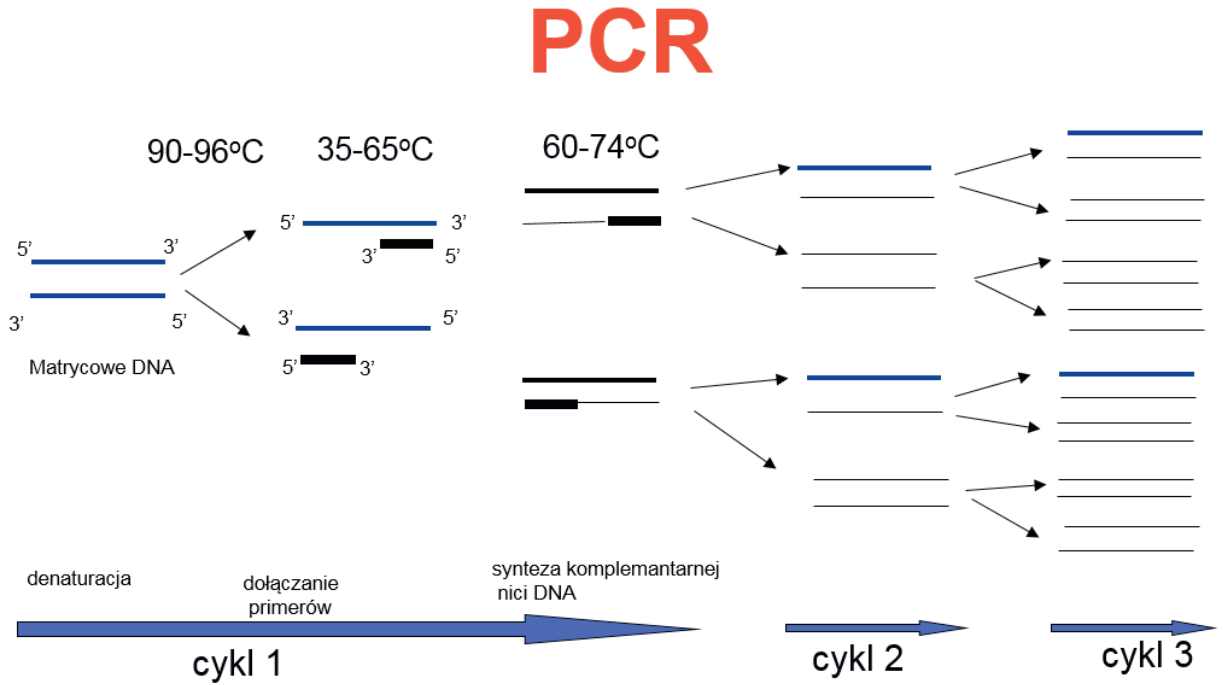


**Rycina 4.** Metody serologiczne wykorzystywane do badań przeglądowych w krwiodawstwie w Polsce w latach 2005–2022

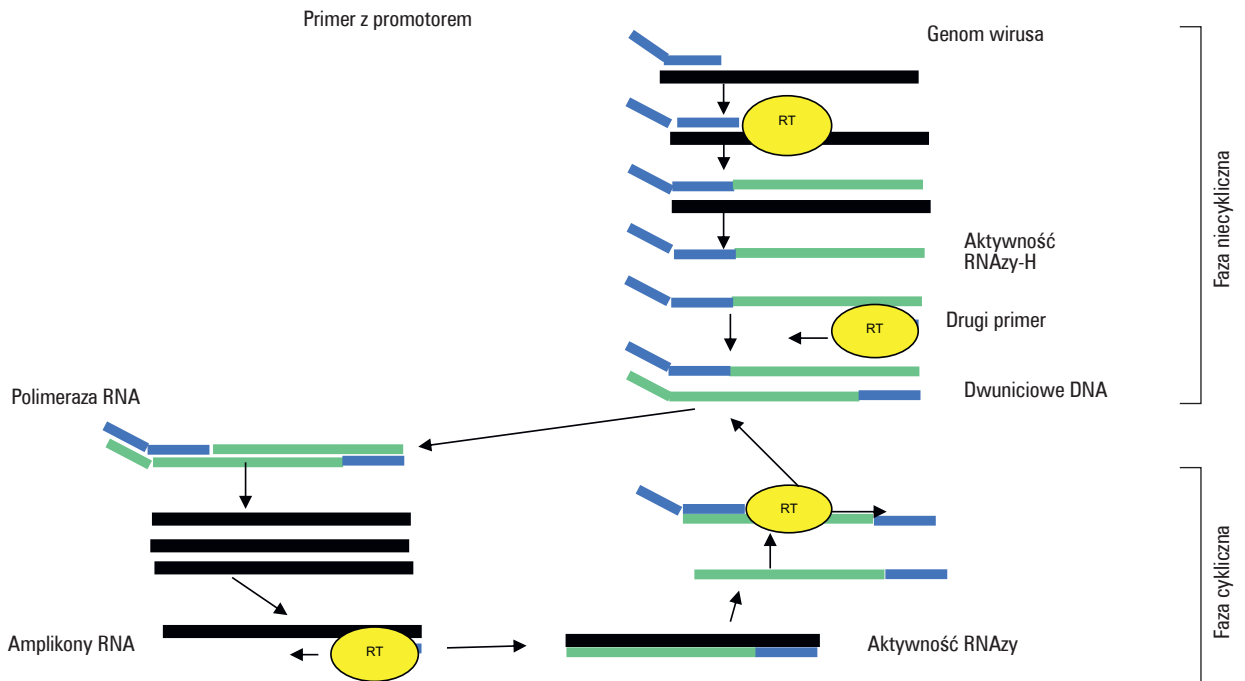
ELISA — test immunoenzymatyczny; ELFA — test enzymofluorescencyjny, CIMA — test chemiluminescencyjny; ECI — test immunoenzymatyczny; ECLIA — test elektrochemiluminescencyjny; CKiK MSWiA — Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa MSWiA, podległe Ministerstwu Spraw Wewnętrznych i Administracji



**Rycina 5.** Algorytm badań przeglądowych (testy serologiczne) wykonywanych w Centrach Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa



**Rycina 6.** Schemat reakcji metodą reakcji łańcuchowej polimerazy. Opracowano na podstawie [46]



**Rycina 7.** Schemat reakcji metodą amplifikacji przez transkrypcję. Opracowanie na podstawie [46]

**Tabela 1.** Charakterystyka testów wykorzystywanych do prowadzenia badań RNA HIV w Centrach Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w latach 2005–2022 (dane dotyczące czułości na podstawie ulotek do testów)

Test	Format	Czułość dla donacji j.m./ml (95%LOD)	Badania różnicujące	Okres stosowania
<b>TMA</b>				
Procleix Ultrio	IDT	45	Tak	2005–2009
Procleix Ultrio Plus		27,6	Tak	2010–2013
Procleix Ultrio Elite		18	Tak	2014–2022
<b>TMA</b>				
Procleix Ultrio Plus	MP 8	221	Tak	2012–2014
<b>PCR</b>				
Ampliscreen HIV	MP 24	1469	Nie	2005–2007
<b>R-T PCR</b>				
Taqscreen MPX	MP 6	294	Tak	2007–2012
Taqscreen MPX v.2.0		302	Tak	2013–2018
MPX		154,2	Tak	2019–2022
<b>TMA</b>				
Procleix Ultrio Elite	MP 4	72	Tak	2017–2022

IDT — badanie w pojedynczej donacji; cyfra obok MP oznacza, z ilu donacji była złożona minipula, np. MP 8 — badanie w puli złożonej z 8 donacji

wtórzeniach i dodatkowo badanie różnicujące. Jeśli uzyskano wyniki ujemne, dawcy nie dyskwalifikowano, jednak składniki krwi z takiej donacji nie mogły być wykorzystywane do celów klinicznych. Schemat postępowania dla poszczególnych testów przedstawiono na rycinie 9.

W CKiK po uzyskaniu wyniku wstępnie reaktywnego w badaniach wykonywanych techniką PCR (pule po 24 lub 6 donacji) przeprowadzono dalsze badania. W przypadku puli złożonej z 24 donacji w kolejnym etapie przeprowadzono badania 4 subpul, z których każda składała się z osocza pochodzącego z 6 donacji. Po uzyskaniu wyniku reaktywnego w puli złożonej z 6 donacji (subpula) badano pojedyncze donacje wchodzące w skład reaktywnej subpuli. Donacje wchodzące w skład puli z ujemnymi wynikami kwalifikowano do użytku klinicznego. Schemat postępowania przedstawiono na rycinie 10.

### **Ewolucja strategii badań przeglądowych NAT w Centrach Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa**

Czułość analityczna testów NAT wykorzystywanych w badaniach RNA HIV w polskim krwiodawstwie zmieniała się wraz z wprowadzaniem kolejnych testów oraz zmianą formatu badania (MP24, 6, 4, IDT). Początkowo w latach 2005–2006 badanie w MP24 miało czułość [szacunkowe 95% LOD] 1469 IU/ml. Po wprowadzeniu w 2007 roku

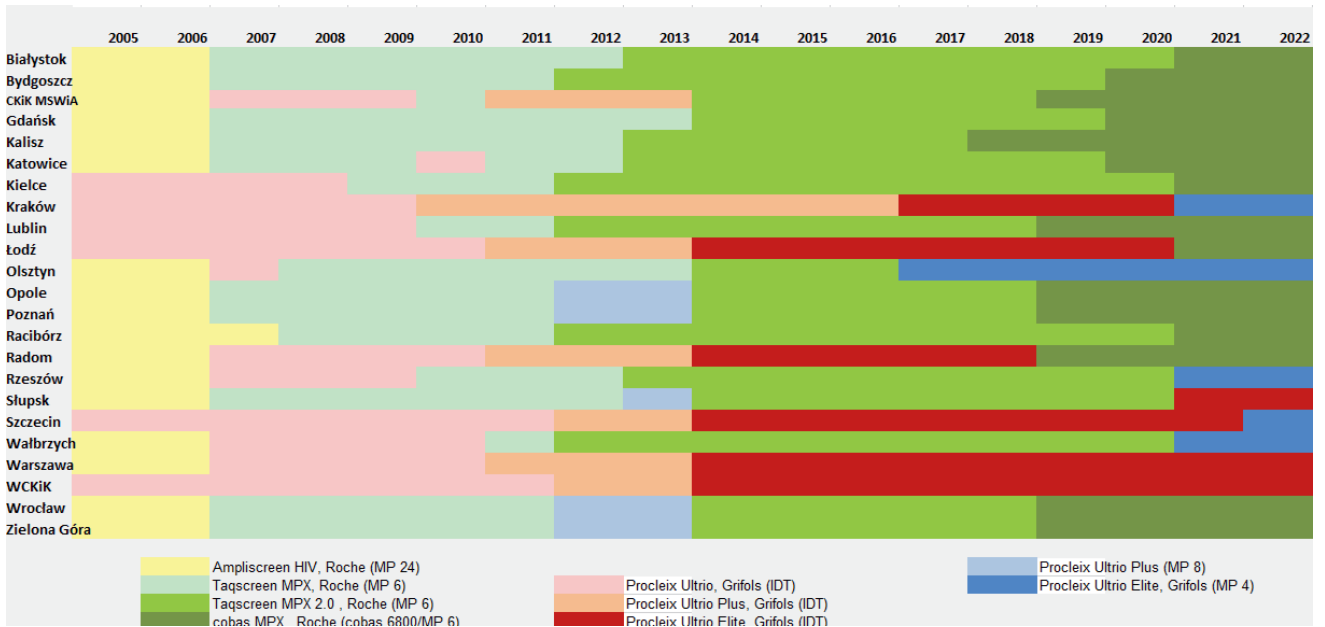
badania w MP6 testem Cobas Taqscreen czułość analityczna uległa zwiększeniu kilkukrotnie i wynosiła około 300 j.m./ml. W badaniu indywidualnych donacji wykorzystującym TMA od początku czułość analityczna była bardzo wysoka: dla Procleix Ultrio (lata 2005–2009) wynosiła 45 j.m./ml [szacunkowe 95% LOD], dla Procleix Ultrio Plus (2010–2013) 27,6 j.m./ml i najwyższy poziom osiągnęła dla testu Procleix Ultrio Elite (stosowany od 2014 r. do chwili obecnej) — około 18 j.m./ml. Szczegółowe informacje przedstawiono na rycinie 11.

### **Kontrola jakości badań przeglądowych w latach 2005–2022 w Centrach Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa**

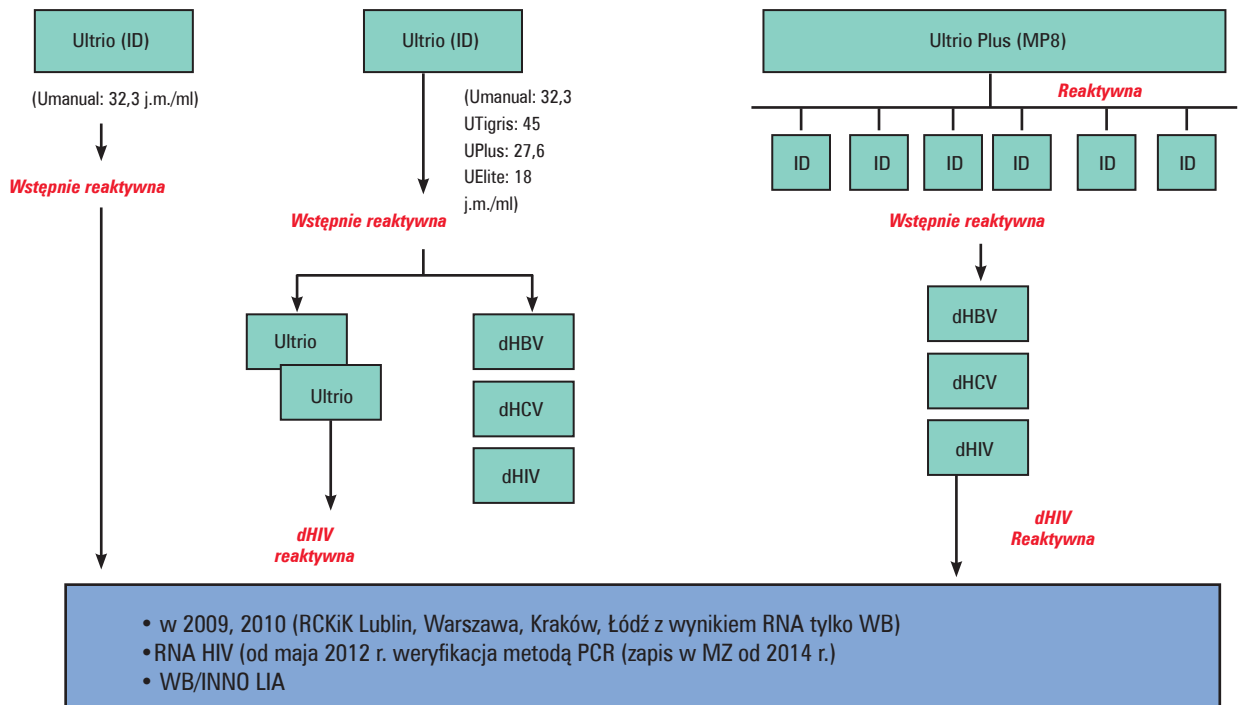
W laboratoriach CKiK wykonujących badania przeglądowe czynników zakaźnych przenoszonych przez krew stosowano procedury zapewniające wiarygodność uzyskanych wyników:

- przed rozpoczęciem badań prowadzono ewaluację urządzeń i testów oraz walidację procesów;
- w każdym CKiK bezpośrednio przed rozpoczęciem badań wykonywano walidację procesu z zastosowaniem paneli próbek przygotowanych przez Zakład Wirusologii (ZW) IHiT; udział w takim programie kontroli jakości powtarzano co 12 miesięcy;
- badania wykonywano ściśle według wymogów producentów testów;



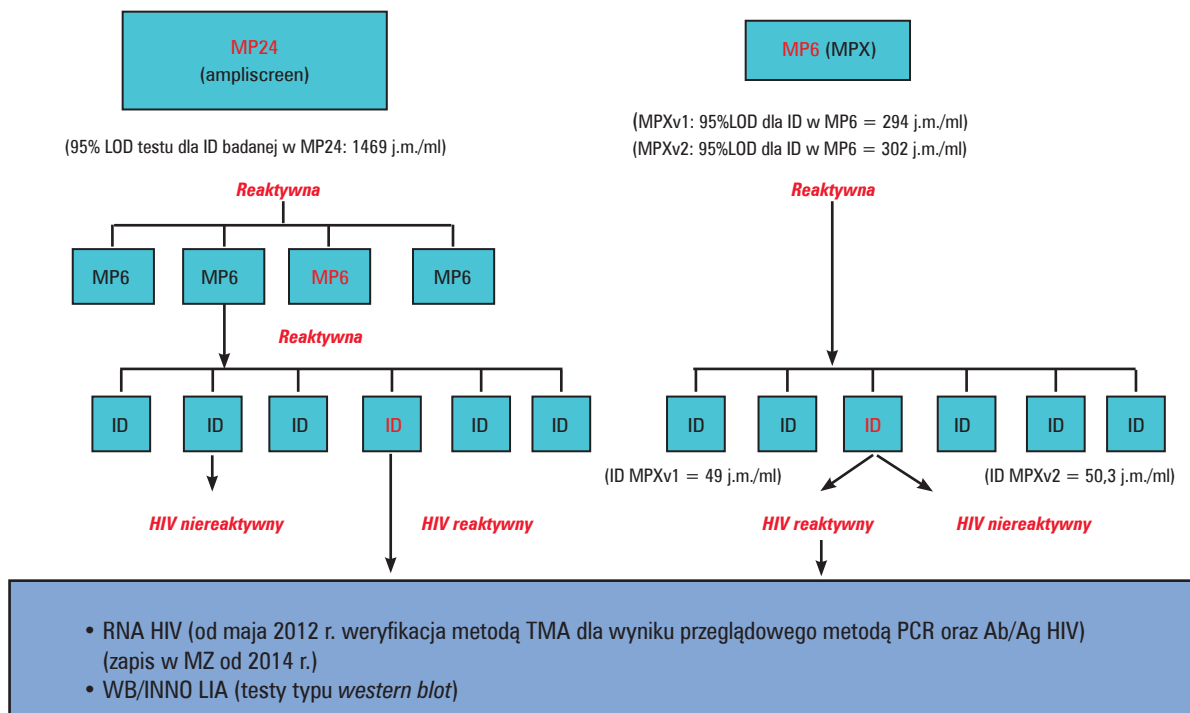


**Rycina 8.** Metody biologii molekularnej wykorzystywane do badań przeglądowych w krwiodawstwie w Polsce w latach 2005–2022; CKiK MSWiA — Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa MSWiA, podległe Ministerstwu Spraw Wewnętrznych i Administracji



**Rycina 9.** Postępowanie w Centrach Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa po otrzymaniu reaktywnego wyniku badania przeglądowego — badanie metodą amplifikacji przez transkrypcję (dane dotyczące czułości na podstawie ulotek do testów) ID — pojedyncza donacja; dHBV — dyskryminacja HBV; dHCV — dyskryminacja HCV; dHIV — dyskryminacja HIV; RNA — kwas rybonukleinowy; WB — test *western blot*; MZ — Ministerstwo Zdrowia; WB/INNO LIA — testy typu *western blot*

- wszystkie laboratoria uczestniczyły w programie zewnętrznej kontroli jakości oraz w programie codziennej zewnątrzlaboratoryjnej kontroli jakości EDCNet;
- wszystkie laboratoria były audytowane regularnie co 2 lata.



**Rycina 10.** Schemat postępowania w Centrach Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa po otrzymaniu reaktywnego wyniku w badaniu przeglądowym prowadzonym metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (dane dotyczące czułości na podstawie ulotek do testów ID — pojedyncza donacja; dHBV — dyskryminacja HBV; dHCV — dyskryminacja HCV; dHIV dyskryminacja HIV; RNA — kwas rybonukleinowy; WB — test *western blot*; MZ — Ministerstwo Zdrowia; WB/INNO Lia — testy typu *western blot*)

### Badania weryfikacyjne

Na badania weryfikacyjne do ZW IHiT przysyłano próbki krwi pochodzące od dawców, u których w badaniach przeglądowych prowadzonych metodami serologicznymi lub/i NAT otrzymano wynik lub wyniki powtarzalnie reaktywne.

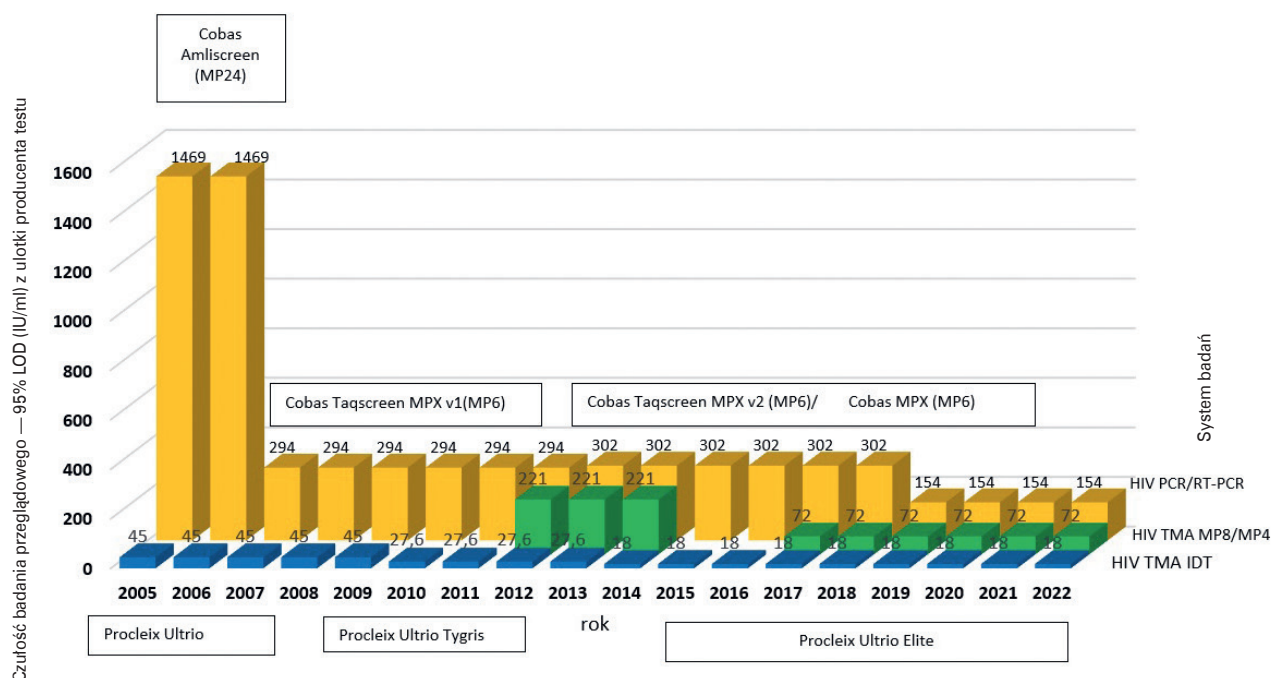
Badania weryfikacyjne służyły potwierdzeniu lub wykluczeniu zakażenia wirusem HIV — próbki z wynikami powtarzalnie reaktywnymi w badaniach przeglądowych metodami serologicznymi lub/i NAT analizowano w testach typu WB oraz dodatkowo badano materiał genetyczny wirusa HIV (zawsze w indywidualnych donacjach). Schemat postępowania w trakcie procesu weryfikacji przedstawiono na rycinie 12. W maju 2012 roku do algorytmu badań weryfikacyjnych prowadzonych technikami NAT wprowadzono obowiązek badania RNA HIV inną metodą niż wykonano badanie przeglądowe. Jeśli badanie przeglądowe wykonywano techniką PCR, to w ZW IHiT wykonywano badanie metodą TMA, natomiast jeśli badanie przeglądowe wykonywano metodą TMA, to badanie weryfikacyjne prowadzono metodą PCR. Wprowadzenie tej rekomendacji było podyktowane występowaniem przypadków form polimorficznych niewykrywanych w NAT i miało uchronić przed wynikami fałszywie negatywnymi (tzw. *escape mutants*).

W przypadku, kiedy nie potwierdzono zakażenia, pierwsza dyskwalifikacja czasowa była nakładana na dawcę na okres 6 miesięcy. Po kolejnych wynikach nierozstrzygających badania weryfikacyjnego okres dyskwalifikacji był wydłużany na kolejne 6 miesięcy do ponad 2 lat. Do oddawania krwi dawcę przywracano, gdy wyniki badania przeglądowego i testu potwierdzenia były zgodne ujemne. W przypadku długotrwałego utrzymywania się wyników nieswoistych nie była nakładana dyskwalifikacja stała, ale długotrwała dyskwalifikacja czasowa (np. na 2–5 lat). Dyskwalifikację stałą nakładano wyłącznie w przypadku potwierdzenia zakażenia wirusem HIV.

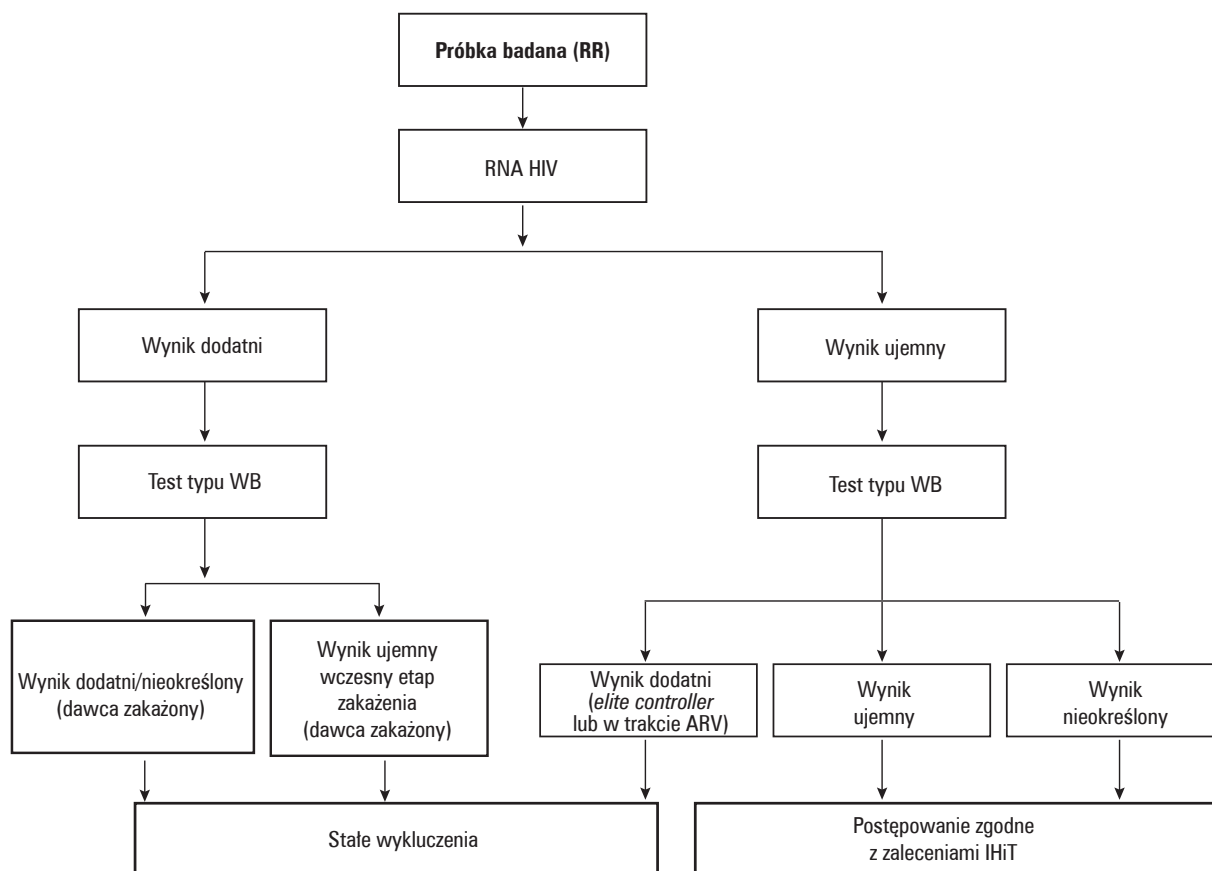
Do badań weryfikacyjnych metodami serologicznymi w trakcie okresu objętego obecną analizą wykorzystywano testy typu WB różnych producentów (tab. 2). Testy do wykrywania RNA HIV-1/2 stosowane w badaniach weryfikacyjnych przedstawiono w tabeli 3.

### Ryzyko resztkowe przeniesienia HIV przez transfuzje i metody jego ograniczania

Mimo prowadzenia badań przeglądowych, wciąż istnieje ryzyko przeniesienia zakażenia HIV przez transfuzję krwi i jej składniki (tzw. ryzyko



**Rycina 11.** Czulość analityczna badań technikami NAT w kierunku RNA HIV w polskim krwiodawstwie w latach 2005–2022 (dane dotyczące czulości na podstawie ulotek do testów)



**Rycina 12.** Algorytm postępowania weryfikacyjnego po stwierdzeniu wyniku powtarzalnie reaktywnego HIV-1/2 w badaniach przeglądowych; IHiT — Instytut Hematologii i Transfuzjologii

**Tabela 2.** Testy typu WB wykorzystywane w Zakładzie Wirusologii w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii do badań potwierdzających zakażenie wirusem HIV w latach 2005–2022

Lata	Nazwa testu (producent, kraj)
2005–2006	HIV BLOT 2.2 (Genelabs® Diagnostics, Singapur)
2007–2008	HIV-1 BLOT 1.3 (Genelabs® Diagnostics, Singapur)
2009	HIV BLOT 2.2 (Genelabs® Diagnostics, Singapur)
2010	INNO-LIA™ HIV I/II Score (Innogenetics, Belgia)
2011–2012	HIV BLOT 2.2 (MP Diagnostics, Singapur)
2013	HIV BLOT 2.2 (MP Diagnostics, Singapur) INNO-LIA™ HIV I/II Score (Innogenetics, Belgia)
2014	INNO-LIA™ HIV I/II Score (Innogenetics, Belgia)
2015–2022	recomLine HIV-1& HIV-2 IgG (Mikrogen, Niemcy)
od 10.2022	INNO-LIA™ HIV I/II Score (Fujirebio, Belgia)

**Tabela 3.** Testy NAT wykorzystywane w badaniach weryfikacyjnych w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii w latach 2005–2022 (dane dotyczące czułości na podstawie ulotek do testów)

Lata	Nazwa testu (producent, kraj)	Czułość dla donacji j.m./ml (95%LOD)	Liczba amplifikowanych regionów
2005–2006	Procleix Ultrio (Gen-probe, USA)	32,3 j.m./ml	Brak danych*
2007–2009	Procleix Ultrio (Gen-probe, USA)	32,3 j.m./ml	Brak danych*
	Cobas Ampliscreen HIV-1 v 1.5 (Roche, USA)	61,2 j.m./ml	Brak danych*
2010	Procleix Ultrio (Gen-probe, USA)	32,3 j.m./ml	Brak danych*
	Procleix Ultrio Plus (Gen-probe, USA)	28,6 j.m./ml	Brak danych*
2011–2013	Cobas Ampliscreen HIV-1 v 1.5 (Roche, USA)	61,2 j.m./ml	Brak danych*
	Procleix Ultrio Plus (Gen-probe, USA)	28,6 j.m./ml	Brak danych*
2014	Procleix Ultrio Elite (Gen-probe, USA)	18 j.m./ml	2
	Confirmatory PCR Kit HIV-1 v 1.1 (GFE Blut, Germany)	89,5 j.m./ml	3
2015–2021	Procleix Ultrio Elite (Gen-probe, USA)	18 j.m./ml	2
	Confirmatory PCR Kit HIV-1 v 1.2 (GFE Blut, Germany)	13,7 j.m./ml	3
Od 11.2021 r.	Procleix Ultrio Elite (Gen-probe, USA)	18 j.m./ml	2
	artus® HI Virus – 1 RG RT-PCR KIT (Qiagen, Niemcy)	66,9 j.m./ml	1

\*Brak informacji w ulotce do testów

resztkowe). Jednym ze sposobów ograniczania tego ryzyka jest wprowadzenie dyskwalifikacji kandydatów na dawców oraz dawców, którzy zgłosili w ankiecie poprzedzającej donację lub podczas wywiadu lekarskiego zachowania i okoliczności związane ze zwiększonym ryzykiem zakażenia. Wprowadzenie badań przeglądowych prowadzonych technikami serologicznymi oraz NAT radykalnie zwiększyło bezpieczeństwo krwi i jej składników. Bruhn i wsp. przeprowadzili szacunki skuteczności badań przesiewowych (zakładając alternatywnie dwie wartości dawki zakaźnej  $ID_{50} = 3,16$  wirionów i  $ID_{50} = 316$  wirionów) dla KKCz w donacjach pochodzących

od dawców pierwszorazowych i wielokrotnych dla różnych strategii badań we wszystkich regionach świata [80].

Skuteczność badań przesiewowych w donacjach dawców pierwszorazowych wzrasta z 98,73%, gdy badania przeglądowe są wykonywane za pomocą testów wykrywających przeciwciała anty-HIV do 99,78%, gdy są wykonywane zarówno testy ID-NAT, jak i testy na obecność przeciwciała. W donacjach pochodzących od dawców wielokrotnych skuteczność ta waha się od 86,7% dla donacji badanych tylko na obecność przeciwciała anty-HIV do 97,68%, gdy jest stosowana bardziej efektywna

strategia badań ID-NAT/Ab+ [80]. Lelie i wsp. oszacowali okres okienka diagnostycznego dla testu Ultrio Elite na platformie Panther (badanie w pojedynczej donacji) na 4 dni, a dla testu MPX na platformie cobas 6800 (badanie w minipuli złożonej z 6 donacji) na 5,7 dni. Obecnie ryzyko resztkowe (rezydualne) rozumiane jako ryzyko przeniesienia zakażenia mimo prowadzenia badań przeglądowych i zachowania wszystkich środków kontroli i dobrych praktyk dla dawców wielokrotnych w krajach rozwiniętych, w tym w Polsce, wynosi  $< 1/1\ 000\ 000$  donacji.

### **Stan obecny i perspektywy badań w kierunku wirusa HIV wśród dawców krwi**

Wydaje się, że obecnie obowiązujący schemat badań przeglądowych oraz weryfikacyjnych jest wystarczający, aby zapewnić bezpieczeństwo przetoczeń krwi i jej składników. Na podstawie analizy ryzyka resztkowego wydaje się, że dalsze zwiększanie czułości testów NAT nie wpłynie na zwiększenia bezpieczeństwa krwi. Poziom ryzyko resztkowego jest akceptowalny i nie uzasadnia zwiększania kosztów badań przeglądowych, będącego następstwem zwiększenia ich czułości.

**Konflikt interesów:** nie zgłoszono

### **Piśmiennictwo**

1. <http://aidsinfo.unaids.org>.
2. [https://aids.gov.pl/hiv\\_aids/450-2-2/](https://aids.gov.pl/hiv_aids/450-2-2/).
3. Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby, pod red. M. Łętowskiej. Wydanie I, Warszawa 2006.
4. Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby, pod red. M. Łętowskiej. Wydanie II. Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa 2011.
5. Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby, pod red. M. Łętowskiej. Wydanie III, Warszawa 2014.
6. Obwieszczenie Ministra Zdrowia z dnia 9 czerwca 2017 r. w sprawie wymagań dobrej praktyki pobierania krwi i jej składników, badania, preparatyki, przechowywania, wydawania i transportu dla jednostek organizacyjnych publicznej służby krwi, 2017.
7. Obwieszczenie Ministra Zdrowia z dnia 6 marca 2019 w sprawie wymagań dobrej praktyki pobierania krwi i jej składników, badania, preparatyki, przechowywania, wydawania i transportu dla jednostek organizacyjnych publicznej służby krwi, 2019.
8. Obwieszczenie Ministra Zdrowia z dnia 30 marca 2021 w sprawie wymagań dobrej praktyki pobierania krwi i jej składników, badania, preparatyki, przechowywania, wydawania i transportu dla jednostek organizacyjnych publicznej służby krwi, 2021.
9. Dyrektywa 2002/98/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 27 stycznia 2003 r. ustanawiająca normy jakości i bezpiecznego pobierania, testowania, przetwarzania, przechowywania i dystrybucji krwi ludzkiej i składników krwi oraz zmieniająca dyrektywę 2001/83/WE 2003.
10. Dyrektywa Komisji 2004/33/WE z dnia 22 marca 2004 wykonująca dyrektywę 2002/98/WE Parlamentu Europejskiego w zakresie niektórych wymagań technicznych dotyczących krwi i jej składników, 2004.
11. Dyrektywa Komisji 2005/61/WE z dnia 30 września 2005 wykonująca dyrektywę 2002/98/WE Parlamentu Europejskiego w zakresie wymogów dotyczących śledzenia losów krwi oraz powiadamiania o poważnych, niepożądanych reakcjach i zdarzeniach, 2005.
12. Dyrektywa Komisji 2005/62/WE z dnia 30 września 2005 wykonująca dyrektywę 2002/98/WE Parlamentu Europejskiego w zakresie norm i specyfikacji wspólnotowych odnoszących się do sytemu jakości obowiązującego w placówkach służby krwi, 2005.
13. WHO. Screening donated blood for transfusion-transmissible infections: recommendations. ISBN 978 92 4 154788 8.
14. FDA. <https://www.fda.gov>.
15. Ferreira M, Nel T. Differential transmission of human immunodeficiency virus (HIV) via blood components from an HIV-infected donor. *Transfusion*. 2005; 46(1): 156–157, doi: 10.1111/j.1537-2995.2006.00688.x, indexed in Pubmed: 16398747.
16. Zanetti AR, Bodini U, Clerici M, et al. Transfusion of red blood cells from an HIV-RNA-positive/anti-HIV-negative donor without HIV infection in the recipient. *Transfusion*. 2007; 47(7): 1328–1329, doi: 10.1111/j.1537-2995.2007.01298.x, indexed in Pubmed: 17581171.
17. Kalus U, Edelmann A, Pruss A, et al. Noninfectious transfusion of platelets donated before detection of human immunodeficiency virus RNA in plasma. *Transfusion*. 2009; 49(3): 435–439, doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.02012.x, indexed in Pubmed: 19040413.
18. Schmidt M, Korn K, Nübling C, et al. First transmission of human immunodeficiency virus Type 1 by a cellular blood product after mandatory nucleic acid screening in Germany. *Transfusion*. 2009; 49(9): 1836–1844, doi: 10.1111/j.1537-2995.2009.02203.x, indexed in Pubmed: 19453990.
19. Álvarez M, Luis-Hidalgo M, Bracho MA, et al. Transmission of human immunodeficiency virus Type-1 by fresh-frozen plasma treated with methylene blue and light. *Transfusion* 2016; 56(4): 831–836, doi: 10.1111/trf.13409, indexed in Pubmed: 26585542.
20. CDC. Pneumocystis pneumonia—Los Angeles. *MMWR* 1981; 30(25): 250–252.
21. CDC. Kaposi's sarcoma and pneumocystis pneumonia among homosexual men – New York City and California. *MMWR* 1981; 30(5): 305–308.
22. CDC A. CDC. A cluster of Kaposi's sarcoma and Pneumocystis carinii Pneumonia among homosexual male Resident of Los Angeles City and range Counties, California. *MMWR* 1982; 31(5): 305–307.
23. CDC. Current Trends Update on Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) — United States. *MMWR* 1982; 31(5): 507–508.
24. CDC. Epidemic Notes and Reort Possible transfusion-associated acquired immune deficiency syndrome (AIDS) – California. *MMWR* 1982; 31(5): 652–654.

25. CDC. Opportunistic Infections and Kaposi's sarcoma among Haitians in the United States MMWR 1982; 353–354.
26. CDC. Update on acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) among patients with hemophilia A. MMWR 1982; 644–652.
27. CDC. Unexplained Immunodeficiency and opportunistic infections in infants. New York, New Jersey, California MMWR 1982, 665–667.
28. CDC. Current trends acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). MMWR 1983; 309–311.
29. CDC. Current trends prevention of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): report of inter-agency recommendations. MMWR 1983; 101–103.
30. Goodman J. The safety and availability of blood and tissues — progress and challenges. *N Engl J Med.* 2004; 351(8): 819–822, doi: 10.1056/nejme048146, indexed in Pubmed: 15317896.
31. Leveton LB, Sox HC, Stoto MA. HIV and the blood supply: an analysis of crisis decisionmaking: Academy Press (US); 1995. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK232419/>, doi: 10.17226/4989, indexed in Pubmed: 25121199.
32. Barré-Sinoussi F. HIV/Aids: the exemplary history of an epidemic which resists. *Med Sci (Paris)* 2018; 34(6-7): 499–500, doi: 10.1051/medsci/20183406001, indexed in Pubmed: 30067222.
33. Marks PW. The blood supply and men who have sex with men. *N Engl J Med.* 2017; 376(15): 1486–1487, doi: 10.1056/nejmc1701828, indexed in Pubmed: 28406277.
34. Culliton B. Five firms with the right stuff. *Science.* 1984; 225(4667): 1129–1129, doi: 10.1126/science.225.4667.1129, indexed in Pubmed: 17782407.
35. Coffin J, Haase A, Levy J, et al. Human immunodeficiency viruses. *Science.* 1986; 232(4751): 697–697, doi: 10.1126/science.3008335, indexed in Pubmed: 3008335.
36. Vahlne A. A historical reflection on the discovery of human retroviruses. *Retrovirology.* 2009; 6(1), doi: 10.1186/1742-4690-6-40, indexed in Pubmed: 19409074.
37. Weiss SH. Screening test for HTLV-III (AIDS agent) antibodies. Specificity, sensitivity, and applications. *JAMA: The Journal of the American Medical Association.* 1985; 253(2): 221–225, doi: 10.1001/jama.253.2.221.
38. CDC. Provisional public health service inter-agency recommendations for screening donated blood and plasma for antibody to the virus causing acquired immunodeficiency syndrome. MMWR 1985; 1-5.
39. CDC. Perspectives in disease prevention and healthpromotion public health service guidelines for counseling and antibody testing to prevent HIV infection and AIDS MMWR 1987; 509–515.
40. Gurtler L, Aepfelbacher M, Bauerfeind U, et al. Human immunodeficiency virus (HIV). *Transfus Med Hemother.* 2016; 43(3): 203–222, doi: 10.1159/000445852, indexed in Pubmed: 27403093.
41. Hoffmann C (ed.). HIV 2015/16. ISBN: 978-3-941727-17-5. Medizin Fokus Verlag, Hamburg 2015.
42. Dyrektywa 98/79/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 27 października 1998 r. w sprawie wyrobów medycznych używanych do diagnozy in vitro. 1998.
43. Decyzja Komisji z dnia 3 lutego 2009 r. zmieniająca decyzję 2002/364/WE w sprawie wspólnych specyfikacji technicznych dla wyrobów medycznych używanych do diagnozy in vitro. 2009.
44. (CDC) CfDC. Interpretation and use of the western blot assay for serodiagnosis. *Morbidity & Mortality Weekly Report* 1989.
45. Shaw GM, Hunter E. HIV Transmission. *Cold spring harbor perspectives in medicine.* 2012; 2(11): a006965–a006965, doi: 10.1101/cshperspect.a006965, indexed in Pubmed: 23043157.
46. Brojer EG. (red). Czynniki zakaźne istotne w transfuzjologii. Fundacja Pro Pharmacia Futura, 2015.
47. Gan S, Patel K. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Invest Dermatol.* 2013; 133(9): 1–3, doi: 10.1038/jid.2013.287, indexed in Pubmed: 23949770.
48. SeraCare. Technical Guide for ELISA. [guide-kpl-elisa-technical-guide.pdf](#), 2013.
49. Barrett J, Dawson G, Heller J, et al. Performance evaluation of the abbot HTLV III EIA, a test for antibody to HTLV III in donor blood. *Am J Clin Pathol.* 1986; 86(2): 180–185, doi: 10.1093/ajcp/86.2.180, indexed in Pubmed: 3017089.
50. Alexander T. Human immunodeficiency virus diagnostic testing: 30 years of evolution. *Clin Vaccine Immunol.* 2016; 23(4): 249–253, doi: 10.1128/cvi.00053-16, indexed in Pubmed: 26936099.
51. Heckler M. The Challenge of the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med.* 1985; 103(5): 655, doi: 10.7326/0003-4819-103-5-655, indexed in Pubmed: 2996394.
52. Peters P, Westheimer E, Cohen S, et al. Screening yield of HIV antigen/antibody combination and pooled HIV RNA testing for acute HIV infection in a high-prevalence population. *JAMA.* 2016; 315(7): 682–690, doi: 10.1001/jama.2016.0286, indexed in Pubmed: 26881371.
53. Gurtler L, Mühlbacher A, Michl U, et al. Reduction of the diagnostic window with a new combined p24 antigen and human immunodeficiency virus antibody screening assay. *J Virol Methods.* 1998; 75(1): 27–38, doi: 10.1016/s0166-0934(98)00094-9, indexed in Pubmed: 9820572.
54. Yerly S, Simon F, Perrin L. Early diagnosis of primary HIV infections: using a combined screening test (p24 antigen and anti-HIV antibodies). *Schweiz Med Wochenschr.* 1999; 129(8):319–322.
55. Liniacki A, Piasek A. Diagnostyka laboratoryjna zakażeń HIV. *Przegl Lek* 2003; 478–484, indexed in Pubmed: 14750423.
56. Weber B, Thorstensson R, Tanprasert S, et al. Reduction of the diagnostic window in three cases of human immunodeficiency-1 subtype E primary infection with fourth-generation HIV screening assays. *Vox Sanguinis.* 2003; 85(2): 73–79, doi: 10.1046/j.1423-0410.2003.00334.x, indexed in Pubmed: 12925157.
57. Ferroni P, Tagger A, Pasquali M, et al. Antibody screening and confirmatory testing of Italian blood donors. One-year experience of a reference center. *Vox Sang.* 1988; 55(3): 143–147, doi: 10.1111/j.1423-0410.1988.tb05081.x, indexed in Pubmed: 3238947.
58. Hofbauer JM, Schulz TF, Hengster P, et al. Comparison of Western blot (immunoblot) based on recombinant-derived p41 with conventional tests for serodiagnosis of human immunodeficiency virus infections. *J Clin Microbiol.* 1988; 26(1): 116–120, doi: 10.1128/jcm.26.1.116-120.1988, indexed in Pubmed: 3277988.
59. Lelie PN, Reesink HW, Huisman H. Evaluation of three second-generation and three confirmatory assays for antibodies to human immunodeficiency virus. *Vox Sang.* 1988; 54(2): 84–91, doi: 10.1111/j.1423-0410.1988.tb01622.x, indexed in Pubmed: 3287766.
60. ECPAobTC-P-T. Guide to the preparation, use and quality assurance of Blood components, 2015.
61. AIDS PTN. Zasady Opieki nad osobami zakażonymi HIV, 2007.
62. AIDS PTN. Zasady opieki nad osobami zakażonymi HIV, 2011.
63. AIDS PTN. Zasady opieki nad osobami zakażonymi HIV, 2013.

64. AIDS PTN. Zasady opieki nad osobami zakażonymi HIV, 2015.
65. AIDS PTN. Zasady opieki nad osobami zakażonymi HIV, 2016.
66. AIDS PTN. Zasady opieki nad osobami zakażonymi HIV, 2017.
67. AIDS PTN. Zasady opieki nad osobami zakażonymi HIV, 2018.
68. Shaw G, Hahn B, Arya S, et al. Molecular characterization of human T-cell leukemia (lymphotropic) virus type III in the acquired immune deficiency syndrome. *Science*. 1984; 226(4679): 1165–1171, doi: 10.1126/science.6095449, indexed in Pubmed: 6095449.
69. AuBuchon JP, Birkmeyer JD, Busch MP. Cost-effectiveness of expanded human immunodeficiency virus-testing protocols for donated blood. *Transfusion*. 1997; 37(1): 45–51, doi: 10.1046/j.1537-2995.1997.37197176950.x, indexed in Pubmed: 9024489.
70. Cardoso MS, Koerner K, Kubanek B. Mini-pool screening by nucleic acid testing for hepatitis B virus, hepatitis C virus, and HIV: preliminary results. *Transfusion*. 1998; 38(10): 905–907, doi: 10.1046/j.1537-2995.1998.381098440853.x, indexed in Pubmed: 9767739.
71. Roth W. History and future of nucleic acid amplification technology blood donor testing. *Transfus Med Hemother*. 2019; 46(2): 67–75, doi: 10.1159/000496749, indexed in Pubmed: 31191192.
72. Chudy M, Weber-Schehl M, Pichl L, et al. Blood screening nucleic acid amplification tests for human immunodeficiency virus type 1 may require two different amplification targets. *Transfusion*. 2011; 52(2): 431–439, doi: 10.1111/j.1537-2995.2011.03281.x, indexed in Pubmed: 21810100.
73. Hourfar K, Eberle J, Müller M, et al. Human immunodeficiency virus 1 dual-target nucleic acid technology improves blood safety: 5 years of experience of the German Red Cross blood donor service Baden-Württemberg–Hessen. *Transfusion*. 2018; 58(12): 2886–2893, doi: 10.1111/trf.14919, indexed in Pubmed: 30325043.
74. AIDS PTN. Zasady opieki nad osobami zakażonymi HIV, 2019.
75. Ostrowska W, Kawecka M. Przetaczanie krwi i jej pochodnych. Przepisy dla szpitali, PZWL.
76. Postępowanie Zapobiegawcze i Diagnostyczne w Przypadku Zakażenia HIV i zachorowania na AIDS, wskazówki dla pracowników służby zdrowia (do użytku służbowego). PZWL, 1989.
77. Grabarczyk P, Kopacz A, Sulkowska E, et al. Badania wirusów przenoszonych przez krew u dawców krwi w Polsce. *Przeg Epidemiol*. 2015: 591–595.
78. Brojer E, Moraczewska-Głoskowska Z, Sankowska M. Badanie obecności materiału genetycznego wirusa HIV w mononuklearach dawców krwi z wątpliwymi wynikami testu Western-Blot. *Problemy HIV i AIDS*. 1995: 9–11.
79. Mikulska MS, Grabarczyk E, Medyńska P, et al. Częstość zakażeń wirusem HIV w populacji dawców w Polsce w latach 1988–2007. *J Transf Med*. 2008: 20–27.
80. Bruhn R, Lelie N, Custer B, et al. Prevalence of human immunodeficiency virus RNA and antibody in first-time, lapsed, and repeat blood donations across five international regions and relative efficacy of alternative screening scenerios. *Transfusion*. 2013: 2399–2412, doi: 10.1111/trf.12299, indexed in Pubmed: 23782054.

# Thrombophilia and ischemic stroke

Jacek Musiał 

Prof. Andrzej Szczeklik 2<sup>nd</sup> Department of Internal Medicine, Jagiellonian University,  
 Collegium Medicum, Kraków, Poland

## Summary

*Ischemic stroke is mainly provoked by atherosclerotic changes in cerebral arteries or thromboembolic episodes related to cardiac arrhythmias. Less frequently, especially in the younger patients stroke may be related to hypercoagulable states. Detection of thrombophilia requires specialized diagnostic procedures and in some situations change patients' management. Presence of thrombophilia may influence decision to close patent foramen ovale in a patient after ischemic stroke. On the other hand, antiphospholipid syndrome diagnosis influences the choice of antithrombotic treatment in the secondary prevention of stroke.*

**Keywords:** ischemic stroke; inherited thrombophilia; atiphospholipid syndrome; patent foramen ovale

*J. Transf. Med. 2022; 16: 246–252*

## Introduction

Congenital thrombophilia is mainly associated with an increased risk of episodes of venous thromboembolism [1]. However, arterial thrombosis in the form of ischemic stroke already appears in the original description of the first family with congenital thrombophilia — antithrombin deficiency, originally described by Egeberg in 1965 [2]. More commonly, however, arterial thrombosis is associated with an acquired thrombophilia, such as antiphospholipid syndrome, in about a third of cases [3]. In the latter case, for reasons that are not fully explained, most episodes are ischemic stroke [4].

Stroke is the second most common cause of death worldwide (nearly 11% of all deaths) and the most common factor leading to adult disability [5, 6]. The primary cause of stroke is atherosclerosis of the intracerebral arteries and small arteries of the brain, often arising as a consequence of hypertension, and strongly associated with the

presence of classic cardiovascular risk factors [7]. The second major cause is strokes caused by embolic episodes due to cardiac arrhythmias (primarily atrial fibrillation), persistent foramen ovale (paradoxical embolism), or valvular defects, and valvular prostheses [7]. However, in about 30% of ischemic strokes, especially in young people, the cause cannot be established. Such a stroke is referred to as a cryptogenic stroke [8]. It is therefore worthwhile to determine the role of congenital and acquired thrombophilia in episodes of ischemic stroke, especially in younger people, where the causes of such stroke are not obvious. This raises the question of whether diagnosis for such a defect can lead to a favorable change of patient management.

## Congenital thrombophilia

Data on the role of congenital thrombophilia in adult ischemic stroke patients are divergent. While

**Correspondence address:** prof. dr hab. n. med. Jacek Musiał, II Department of Internal Medicine, Jagiellonian University, Medical College, ul. Skawińska 8, 31–066 Kraków, Polska, e-mail: jacek.musial@uj.edu.pl  
 Translation: mgr Krystyna Dudziak

Received: 21.11.2023

Accepted: 21.12.2023

Early publication date: 31.12.2023

This article is available in open access under Creative Commons Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) license, allowing to download articles and share them with others as long as they credit the authors and the publisher, but without permission to change them in any way or use them commercially.



some large observational studies have found no increased prevalence of thrombophilic defects in ischemic stroke patients [9], others have pointed to an increased proportion of patients with factor V type Leiden gene mutations, or prothrombin G20210A gene mutations, particularly in younger people with stroke [10, 11]. Finally, a large meta-analysis of available studies published four years ago indicated that the presence of particular types of congenital thrombophilia is associated with a slightly increased risk of ischemic stroke in adults, with the exception of (rare) antithrombin deficiency [12]. The odds ratio (OR) here was not high: 1.25 (95% CI: 1.08–1.44); 1.48 (95% CI: 1.22–1.80); 2.13 (95% CI: 1.16–3.90); and 2.26 (95% CI: 1.34–3.80 for factor V Leiden, prothrombin gene G20210A mutation, protein C deficiency, and protein S deficiency, respectively).

Although congenital thrombophilia increases the risk of ischemic stroke to a small extent, especially in younger people without other significant cardiovascular risk factors, the finding of its presence, neither allows to determine the risk of recurrent episodes, nor currently changes the management of patients after stroke [13, 14].

One specific topic within the study of the impact of congenital thrombophilia on the incidence of ischemic stroke is the problem of patent foramen ovale (PFO). The defect is the result of the lack of permanent postnatal closure of the foramen ovale by the close fusion of the septum primum and septum secundum of the atrial septum. Such a defect is observed in about 25% of people [15], and with the availability of transesophageal echocardiography, the detection of PFO in ischemic stroke survivors is not difficult today. The junction between the right and left atrium predisposes small thrombi to enter the systemic circulation, which can result in arterial paradoxical embolism, including ischemic stroke.

A discussion of the factors determining surgical percutaneous closure of PFO is beyond the scope of this paper. These include both echocardiographic parameters and clinical factors, as included in the RoPE score [16]. It should only be noted here that the procedure, according to recommendations [17, 18], should be especially considered in a group of patients with PFO under 60 years of age who have had a cryptogenic stroke. A newer more precise term here is: embolic stroke of undetermined source (ESUS). PFO closure is associated in such patients with a significant reduction in the relative risk of recurrent stroke (RR 0.36) compared to conservative management (anticoagulant treatment)

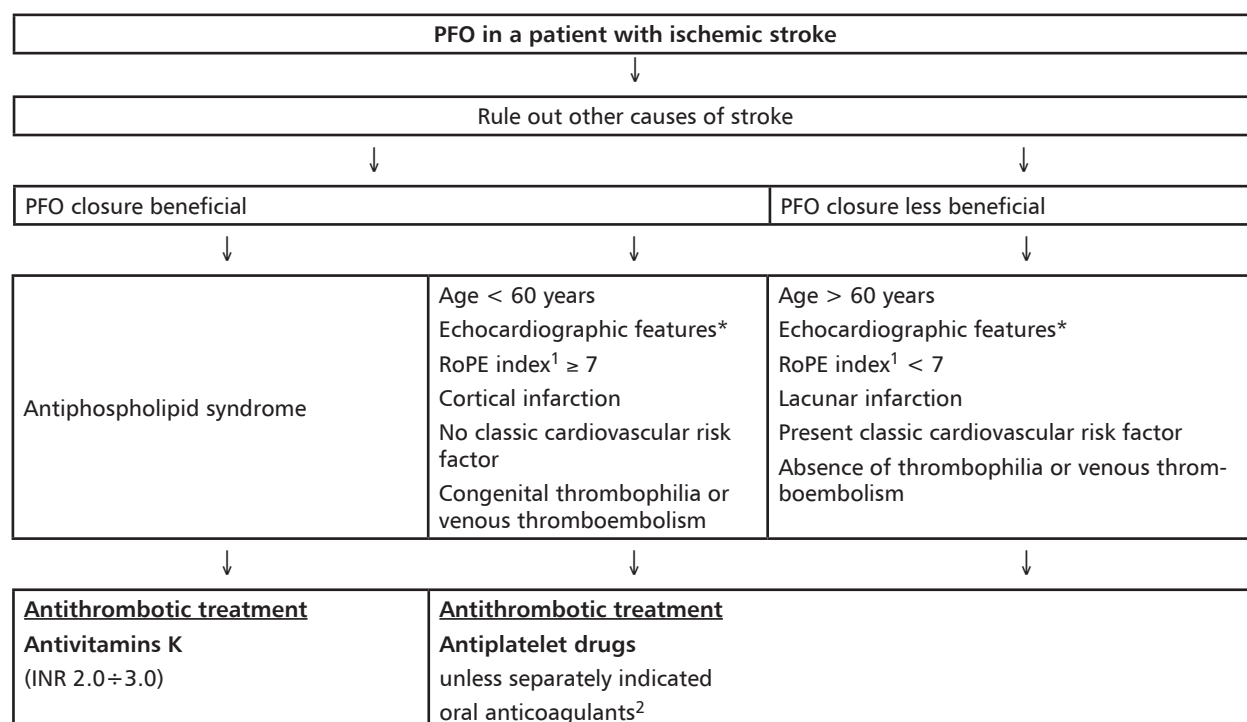
[19]. Such a procedure is particularly indicated for patients with thrombophilia, as a current systematic review and meta-analysis of available studies showed them to have a higher risk of stroke recurrence (hazard rate HR = 2.41; 95% CI: 1.44–4.06), compared to patients with PFO and cryptogenic stroke without accompanying thrombophilia [20]. After PFO closure, the risk of such recurrence was just below the level of statistical significance (OR = 2.07; 95% CI: 0.95–4.48). In conclusion, the prevailing view today is that in patients with a history of cryptogenic stroke and established persistent foramen ovale, associated with thrombophilia, the appropriate management is surgical closure of the PFO [14, 20, 21].

It should be emphasized that the studies and systematic review cited above, concerning post stroke patients with known persistent foramen ovale and concomitant thrombophilia, mostly included cases of congenital and acquired thrombophilia together. A similar case was with studies of patients in whom the decision was made to forgo surgery and undertake conservative treatment. The drug groups used include antiplatelet agents, antivitamin K, and more recently, direct oral anticoagulants (DOACs). Current pooled studies indicate that no study has been able to demonstrate superiority in the selection of any of the aforementioned drug groups with regard to the effectiveness of ischemic stroke prevention [21, 22].

Currently, there is a lack of data on the indications and duration of anticoagulant treatment in thrombophilic patients undergoing surgical PFO closure. The general recommendations of the European Society of Cardiology prescribe dual antiplatelet therapy for 1–6 months after PFO closure and single antiplatelet therapy for 5 years [23]. It seems that, with the exception of patients with antiphospholipid syndrome (see below), patients with congenital thrombophilia after PFO closure are subject to the above general rules of management.

An important question arises about the indications for diagnosis of congenital thrombophilia in patients who have had a stroke and are diagnosed with PFO. Data from daily practice indicate that in about two thirds of these patients, no thrombophilia testing is performed [24]. This resonates with current views in Europe that routine diagnostics for thrombophilia in patients after a cerebral ischemic episode in whom the presence of a PFO has been confirmed is not needed [14, 23]. It is understood that congenital thrombophilia should be included in the management plan only if it has already been

**Figure 1.** Management of patients after ischemic stroke and diagnosed persistent oval hole (modified from [14])



\*The degree of leakage, the number of microbubbles after injection of shaken saline, the presence of atrial septal aneurysm

<sup>1</sup>an index taking into account the presence/absence of clinical factors affecting the risk of stroke in PFO: hypertension, diabetes, stroke or transient cerebral ischemia (TIA), smoking

<sup>2</sup>vitamin K antagonists or direct oral anticoagulants (DOACs)

previously identified [14]. The data presented above, however, indicate that such a diagnosis should nevertheless be indicated, both for congenital thrombophilia and especially for the co-occurrence of antiphospholipid syndrome (see below). This is because the finding of thrombophilia can influence both the decision to surgically close a PFO and the choice of anticoagulant treatment.

The principles of management of post stroke patients with persistent foramen ovale are shown in Figure 1.

### Antiphospholipid syndrome

Antiphospholipid syndrome is characterized by the coexistence of antiphospholipid antibodies (aPL) in the blood of the patient with clinical manifestations, mainly in the form of venous thrombosis, arterial thrombosis, and thrombosis of small vessels, and in women also obstetric complications. New classification criteria for antiphospholipid syndrome, published in 2023 [25], allow us to classify a patient as APS if we confirm the persistent presence of antiphospholipid antibodies in moderate, or high titers, along with a range of clinical manifestations, among which arterial

thrombosis is mentioned. Laboratory classification criteria include the presence of lupus anticoagulant (LA), measured by coagulometric methods, and/or anticardiolipin antibodies (aCL) and/or antibodies directed against beta2 glycoprotein I (aβ<sub>2</sub> GPI) in the IgG and IgM classes. Arterial thrombosis as a clinical criterion must meet the condition of excluding other equally or more likely causes of its occurrence. The reader will find a broader discussion of these issues at “New classification criteria for antiphospholipid syndrome — 2023” *Journal of Transfusion Medicine* 2023, vol. 16, no. 3, 103–109 ([https://journals.viamedica.pl/journal\\_of\\_transfusion\\_medicine/article/view/97795](https://journals.viamedica.pl/journal_of_transfusion_medicine/article/view/97795)).

Signs of central nervous system ischemia associated with antiphospholipid syndrome include ischemic stroke, episodes of transient cerebral ischemia (TIA, transient ischaemic attack), and hyperintense white matter foci of presumed ischemic etiology found on imaging studies (MRI) [26]. A current systematic review of available studies indicates that among people under the age of 50 who have had an ischemic stroke, or TIA, antiphospholipid antibodies are found in about 17% of cases [27].

As with most of the clinical manifestations of APS, it is difficult to establish a strict, specific relationship between single types of antiphospholipid antibodies and stroke [28]. The strongest association with all thrombotic complications here is the presence of lupus anticoagulant. To determine the risk of thrombotic complications, we now rather use the so called antibody profile. A high risk profile, both for the occurrence of a thrombotic episode (including stroke) and its recurrence, is associated with the persistent presence of all three types of antibodies (triple positivity) [29, 30]. The same was true for a high risk profile carried by the presence of two types of antibodies, including lupus anticoagulant and aCL, or a $\beta_2$  GPI, especially in the IgG class and at high titers. In contrast, low thrombotic risk is associated with the transient presence of single aPL at low/moderate titers [31]. There are indications that thrombotic risk may also increase in patients with APS and the co-occurring clinical criterion of moderate thrombocytopenia [32].

Since stroke occurs most often in the context of arteriosclerosis in the elderly, the question arises in whom we should carry out diagnostic testing for antiphospholipid syndrome. Such testing is particularly indicated in cases of cryptogenic stroke, and in younger people; some recommendations here suggest an age limit of < 50 years [33]. A contemporary survey indicates that any age limit for the diagnosis of antiphospholipid syndrome in stroke patients is used by only about 30% of investigators [26]. This is because antiphospholipid syndrome may also occur in the elderly [34]. Here, however, the diagnostic approach would have to be individualized due to the frequent coexistence of many other classic cardiovascular risk factors. The pathogenetic role of detected antiphospholipid antibodies may be questionable here, and their presence incidental. Conversely, the finding of aPL with a high risk profile in an elderly person not burdened with classical risk factors will argue more strongly for such a role.

To date, the optimal time after stroke for aPL laboratory testing has not been determined. The effect of anticoagulants or acute phase proteins on the results of lupus anticoagulant testing of lupus anticoagulant determinations [33] dictates that determinations should be delayed beyond the acute phase of stroke. However, the tests should be performed as soon as possible, as the results may influence a fundamental change in treatment.

In the treatment of antiphospholipid syndrome after ischemic stroke, first of all, all classic cardiovascular risk factors should be identified and any mo-

difiable factors should be vigorously combated [31]. Secondary thromboprophylaxis is based on indefinite administration of vitamin K antagonists (VKA) preparations with maintenance of an INR between 2.0 and 3.0 [31]. In case of ineffectiveness, it is recommended to either increase the intensity of anticoagulation with VKA to an INR of 3.0–4.0, or to administer VKA in doses that maintain the INR between 2.0–3.0 and add acetylsalicylic acid (ASA) in low doses 75–100 mg [31]. At this point, it should be noted that in the case of other episodes associated with ischemia of the central nervous system (TIA, probably vascularized white matter lesions), the management in daily practice includes the administration of acetylsalicylic acid in low doses, the use of dual antiplatelet therapy (ASA + clopidogrel), or the administration of other antiplatelet drugs.

The introduction of direct oral anticoagulants (DOAC) for treatment and prophylaxis of APS patients has created a potentially attractive alternative to the cumbersome use of VKA in the treatment of APS patients. In 2018, the first study comparing treatment with rivaroxaban 20 mg daily with warfarin (INR 2.0–3.0) in patients with triple positive APS was published [35]. It showed a lower efficacy of rivaroxaban, manifested by a higher rate of arterial thrombotic episodes. International recommendations, published just a year later, included the recommendation that DOACs should not be used in patients with arterial thrombosis burdened by antiphospholipid antibodies with a high risk profile [31, 36]. However, they were allowed to be used in patients with venous thrombosis, and in patients without high risk profile aPL. Nevertheless, two meta analyses have now been published, including further clinical studies of the effects of DOACs compared to VKA in APS patients, including patients after episodes of venous thromboembolism, and patients with aPL with a lower risk profile, including the presence of dual antibody types (double positivity) [37, 38]. Included in the analysis were studies conducted in the US, UK, Spain, and, as mentioned, Italy. They included a total of 472 subjects. Three studies used rivaroxaban, and one used apixaban. The analysis indicated that the use of DOACs compared to warfarin increases the risk of recurrent arterial thrombosis by about 3–5 times, with no effect on the risk of recurrent venous thrombosis. Among the increased episodes of arterial thrombosis, ischemic stroke predominated. Its risk of recurrence increased (10 to 13 times) with DOAC use compared to warfarin [37, 38]. These findings

**Table 1.** Diagnosis and management of APS in patients after ischemic stroke

Indications for APS diagnosis in patients after ischemic stroke
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Patients after ischemic stroke/transient cerebral ischemic episode &lt; 50 years of age</li> <li>• Patients after cryptogenic stroke/embolic stroke of unknown source (ESUS<sup>1</sup>)</li> <li>• Post ischemic stroke patients with associated systemic autoimmune disease (mainly systemic lupus erythematosus)</li> <li>• Patients after ischemic stroke who have had prior venous thrombosis</li> <li>• Women after ischemic stroke with prior complications of pregnancy</li> </ul>
Recommended diagnostic tests
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lupus anticoagulant coagulometric methods, three step procedure</li> <li>• aCL, IgG and/or IgM classes; by ELISA method<sup>2</sup></li> <li>• aβ2 GPI of IgG and/or IgM class; ELISA method<sup>2</sup></li> </ul>
Treatment of APS in post stroke patients
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vitamin K antagonists (INR 2.0÷3.0), or</li> <li>• Vitamin K antagonists (INR 2.0÷3.0) + acetylsalicylic acid at low doses (75–100), or</li> <li>• Vitamin K antagonists (INR 3.0÷4.0)</li> <li>• Elimination/treatment of classic modifiable cardiovascular risk factors</li> </ul>

<sup>1</sup>ESUS — embolic stroke of undetermined source

<sup>2</sup>ELISA an immunoenzymatic method is recommended for determining moderate/high levels of antiphospholipid antibodies (aPL). Automated platforms can also be used to determine aPL, but for which there are no defined levels of moderate/high levels of aPL

should lead to changes in recommendations for secondary thromboprophylaxis in patients with the thrombotic form of antiphospholipid syndrome [39]. Warfarin should be used not only in patients with aPL with a high risk profile and a history of arterial thrombosis, but also in patients after a history of venous thrombosis and those who are potentially at lower thrombotic risk (presence of two types of aPL, or only persistent presence of one type of antibody at higher titers) [40]. Because of the important implications of the diagnosis of antiphospholipid syndrome for the mode of thromboprophylaxis in people with ischemic stroke, the diagnosis of APS must be made on the basis of strict criteria [26], as confirmation of APS diagnosis influences strongly antithrombotic prophylaxis. Vitamin K antagonists should be probably instituted as soon as the first positive aPL determination indicating increased thrombotic risk becomes available, even before confirmation of persistent aPL positivity after next 3 months [27]. Diagnosis and management of APS in patients after ischemic stroke are presented in Table 1.

**Conflict of interest:** none declared

## References

- Zawilska K. Trombophilia wrodzona. W: Zakrzepy i zatory, pod red. Windyga J, Pasierski T, Torbicki A. PZWL, Warszawa 2014: 53–68.
- Egeberg O. Thrombophilia caused by inheritable deficiency of blood antithrombin. *Scand J Clin Lab Invest.* 1965; 17: 92, doi: 10.3109/00365516509077290, indexed in Pubmed: 14260761.
- Musiał J. Zespól antyfosfolipidowy. W: Zakrzepy i zatory, pod red. Windyga J, Pasierski T, Torbicki A. PZWL, Warszawa 2014: 69–84.
- Cervera R, Piette J, Font J, et al. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis & Rheumatism.* 2002; 46(4): 1019–1027, doi: 10.1002/art.10187, indexed in Pubmed: 11953980.
- World Health Organization. The top 10 causes of death. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
- Adamson J, Beswick A, Ebrahim S. Is stroke the most common cause of disability? *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2004; 13(4): 171–177, doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2004.06.003, indexed in Pubmed: 17903971.
- Niewada M, Członkowska A. Zakrzepy i zatory tętnic mózgowych. W: Zakrzepy i zatory, pod red. Windyga J, Pasierski T, Torbicki A. PZWL, Warszawa 2014: 347–369.
- Yaghi S, Bernstein R, Passman R, et al. Cryptogenic Stroke. *Circul Res.* 2017; 120(3): 527–540, doi: 10.1161/circresaha.116.308447, indexed in Pubmed: 28154102.
- Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, et al. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. *N Engl J Med.* 1995; 332(14): 912–917, doi: 10.1056/NEJM199504063321403, indexed in Pubmed: 7877648.
- Hamedani AG, Cole JW, Mitchell BD, et al. Meta-analysis of factor V Leiden and ischemic stroke in young adults: the importance of case ascertainment. *Stroke.* 2010; 41(8): 1599–1603, doi: 10.1161/STROKEAHA.110.581256, indexed in Pubmed: 20616326.
- Jiang B, Ryan KA, Hamedani A, et al. Prothrombin G20210A mutation is associated with young-onset stroke: the genetics of

- early-onset stroke study and meta-analysis. *Stroke*. 2014; 45(4): 961–967, doi: 10.1161/STROKEAHA.113.004063, indexed in Pubmed: 24619398.
12. Chiasakul T, De Jesus E, Tong J, et al. Inherited thrombophilia and the risk of arterial ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *J Am Heart Assoc*. 2019; 8(19): e012877, doi: 10.1161/JAHA.119.012877, indexed in Pubmed: 31549567.
  13. Majmundar S, Thapa S, Miller ES, et al. Low value of inherited thrombophilia testing among patients with stroke or transient ischemic attack: A three-year retrospective study. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2023; 32(10): 107308, doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2023.107308, indexed in Pubmed: 37633204.
  14. Swan D, Connors JM, Thachil J. Dilemmas in hematology: consults in patients with arterial thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2023; 21(3): 421–432, doi: 10.1016/j.jtha.2023.01.002, indexed in Pubmed: 36696207.
  15. Hagen PT, Scholz DG, Edwards WD. Incidence and size of patent foramen ovale during the first 10 decades of life: an autopsy study of 965 normal hearts. *Mayo Clin Proc*. 1984; 59(1): 17–20, doi: 10.1016/s0025-6196(12)60336-x, indexed in Pubmed: 6694427.
  16. Thaler DE, Di Angelantonio E, Di Tullio MR, et al. The risk of paradoxical embolism (RoPE) study: initial description of the completed database. *Int J Stroke*. 2013; 8(8): 612–619, doi: 10.1111/j.1747-4949.2012.00843.x, indexed in Pubmed: 22883936.
  17. Messé S, Gronseth G, Kent D, et al. Practice advisory update summary: Patent foramen ovale and secondary stroke prevention. *Neurology*. 2020; 94(20): 876–885, doi: 10.1212/wnl.0000000000009443, indexed in Pubmed: 32350058.
  18. Kavinsky C, Szerlip M, Goldsweig A, et al. SCAI Guidelines for the management of patent foramen ovale. *Journal of the Society for Cardiovascular Angiography & Interventions*. 2022; 1(4): 100039, doi: 10.1016/j.jscvai.2022.100039.
  19. Turc G, Calvet D, Guérin P, et al. CLOSE investigators. closure, anticoagulation, or antiplatelet therapy for cryptogenic stroke with patent foramen ovale: systematic review of randomized trials, sequential meta-analysis, and new insights from the CLOSE study. *J Am Heart Assoc*. 2018; 7(12), doi: 10.1161/JAHA.117.008356, indexed in Pubmed: 29910193.
  20. Hviid CVB, Simonsen CZ, Hvas AM. Recurrence risk in patients with cryptogenic stroke, patent foramen ovale, and thrombophilia: a systematic review and meta-analysis. *Thromb Haemost*. 2019; 119(11): 1839–1848, doi: 10.1055/s-0039-1693739, indexed in Pubmed: 31378004.
  21. Farjat-Pasos JJ, Nuche J, Mesnier J, et al. Transcatheter patent foramen ovale closure in stroke patients with thrombophilia: current status and future perspectives. *J Stroke*. 2022; 24(3): 335–344, doi: 10.5853/jos.2022.01697, indexed in Pubmed: 36221936.
  22. Geisler T, Keller T, Martus P, et al. Apixaban versus aspirin for embolic stroke of undetermined source. *NEJM Evid*. 2023; 3(1), doi: 10.1056/evidoa2300235.
  23. Pristipino C, Sievert H, D'Ascenzo F, et al. European position paper on the management of patients with patent foramen ovale. General approach and left circulation thromboembolism. *Eur Heart J*. 2018; 40(38): 3182–3195, doi: 10.1093/eurheartj/ehy649, indexed in Pubmed: 30358849.
  24. Dębski M, Abdelrahman A, Alshehri H, et al. Contemporary management of patent foramen ovale: a multinational survey on cardiologists' perspective. *J Interv Cardiol*. 2021; 2021: 6955791, doi: 10.1155/2021/6955791, indexed in Pubmed: 34602869.
  25. Barbhahiya M, Zuily S, Naden R, et al. 2023 ACR/EULAR antiphospholipid syndrome classification criteria. *Ann Rheum Dis*. 2023; 82(10): 1258–1270, doi: 10.1136/ard-2023-224609, indexed in Pubmed: 37640450.
  26. Cohen H, Werring D, Chandratheva A, et al. Survey on antiphospholipid syndrome diagnosis and antithrombotic treatment in patients with ischemic stroke, other brain ischemic injury, or arterial thromboembolism in other sites: communication from ISTH SSC subcommittee on lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies. *J Thromb Haemost*. 2023; 21(10): 2963–2976, doi: 10.1016/j.jtha.2023.06.020, indexed in Pubmed: 37391096.
  27. Sciascia S, Sanna G, Khamashta MA, et al. APS Action. The estimated frequency of antiphospholipid antibodies in young adults with cerebrovascular events: a systematic review. *Ann Rheum Dis*. 2015; 74(11): 2028–2033, doi: 10.1136/annrheumdis-2014-205663, indexed in Pubmed: 24942381.
  28. Mittal P, Quattrocchi G, Tohidi-Esfahani I, et al. Antiphospholipid syndrome, antiphospholipid antibodies, and stroke. *Int J Stroke*. 2023; 18(4): 383–391, doi: 10.1177/17474930221150349, indexed in Pubmed: 36571450.
  29. Pengo V, Ruffatti A, Legnani C, et al. Incidence of a first thromboembolic event in asymptomatic carriers of high-risk antiphospholipid antibody profile: a multicenter prospective study. *Blood*. 2011; 118(17): 4714–4718, doi: 10.1182/blood-2011-03-340232, indexed in Pubmed: 21765019.
  30. Pengo V, Ruffatti A, Legnani C, et al. Clinical course of high-risk patients diagnosed with antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost*. 2010; 8(2): 237–242, doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03674.x, indexed in Pubmed: 19874470.
  31. Tektonidou MG, Andreoli L, Limper M, et al. EULAR recommendations for the management of antiphospholipid syndrome in adults. *Ann Rheum Dis*. 2019; 78(10): 1296–1304, doi: 10.1136/annrheumdis-2019-215213, indexed in Pubmed: 31092409.
  32. Vreede AP, Bockenstedt PL, McCune WJ, et al. Cryptic conspirators: a conversation about thrombocytopenia and antiphospholipid syndrome. *Curr Opin Rheumatol*. 2019; 31(3): 231–240, doi: 10.1097/BOR.0000000000000595, indexed in Pubmed: 30747734.
  33. Devreese KMJ, de Groot PG, de Laat B, et al. Guidance from the Scientific and Standardization Committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis: Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection and interpretation. *J Thromb Haemost*. 2020; 18(11): 2828–2839, doi: 10.1111/jth.15047, indexed in Pubmed: 33462974.
  34. Zuily S, Clerc-Urmès I, Bauman C, et al. APS ACTION Investigators. Cluster analysis for the identification of clinical phenotypes among antiphospholipid antibody-positive patients from the APS ACTION Registry. *Lupus*. 2020; 29(11): 1353–1363, doi: 10.1177/0961203320940776, indexed in Pubmed: 32703117.
  35. Pengo V, Denas G, Zoppellaro G, et al. Rivaroxaban vs warfarin in high-risk patients with antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2018; 132(13): 1365–1371, doi: 10.1182/blood-2018-04-848333, indexed in Pubmed: 30002145.
  36. Zuily S, Cohen H, Isenberg D, et al. Use of direct oral anticoagulants in patients with thrombotic antiphospholipid syndrome: Guidance from the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost*. 2020; 18(9): 2126–2137, doi: 10.1111/jth.14935, indexed in Pubmed: 32881337.

37. Giarretta I, Ageno W, Dentali F. Lack of efficacy of direct oral anticoagulants compared to warfarin in antiphospholipid antibody syndrome. *Haematologica*. 2022; 107(11): 2737–2741, doi: 10.3324/haematol.2022.281586, indexed in Pubmed: 35861020.
38. Khairani CD, Bejjani A, Piazza G, et al. Direct oral anticoagulants vs vitamin K antagonists in patients with antiphospholipid syndromes: Meta-analysis of randomized trials. *J Am Coll Cardiol*. 2023; 81(1): 16–30, doi: 10.1016/j.jacc.2022.10.008, indexed in Pubmed: 36328154.
39. Crowther MA, Jones AE, Witt DM. Warfarin is the preferred therapy for patients with thrombotic APS: back to the future. *J Am Coll Cardiol*. 2023; 81(1): 31–33, doi: 10.1016/j.jacc.2022.10.015, indexed in Pubmed: 36328156.
40. Hart R, Catanese L, Perera K, et al. Embolic stroke of undetermined source. *Stroke*. 2017; 48(4): 867–872, doi: 10.1161/strokeaha.116.016414, indexed in Pubmed: 28265016.

# Trombofilia a niedokrwienny udar mózgu

Jacek Musiał 

II Katedra Chorób Wewnętrznych im. Prof. Andrzeja Szczeklika, Uniwersytet Jagielloński,  
 Collegium Medicum, Kraków

Artykuł jest tłumaczeniem pracy:

Musiał J. Thrombophilia and ischemic stroke. J Transf Med 2023; 16 (4): 246–252. DOI: 10.5603/jtm.99302.

Należy cytować wersję pierwotną.

## Streszczenie

*Niedokrwienny udar mózgu najczęściej jest spowodowany zmianami miażdżycowymi w domózgowych naczyniach tętniczych lub zatorowością w przebiegu zaburzeń rytmu serca. W rzadziej przypadkach, szczególnie u ludzi młodych, może jednak wiązać się ze stanami nadkrzepliwości krwi. Wykrycie współistnienia trombofilii wymaga specjalistycznej diagnostyki i w pewnych przypadkach wpływa zasadniczo na postępowanie z chorym. Wykrycie trombofilii może wpływać na decyzję o zabiegowym zamknięciu przetrwałego otworu owalnego u chorych po przebytych udarze niedokrwiennym mózgu, natomiast wykrycie zespołu antyfosfolipidowego wpływa istotnie na wybór leczenia przeciwzakrzepowego w ramach wtórnej prewencji udaru.*

**Słowa kluczowe:** niedokrwienny udar mózgu; wrodzona trombofilia; zespół antyfosfolipidowy; przetrwały otwór owalny

*J. Transf. Med. 2023; 16: 253–259*

## Wstęp

Trombofilia wrodzona wiąże się głównie ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia epizodów żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej [1]. Obraz zakrzepicy tętniczej pod postacią niedokrwiennego udaru mózgu pojawia się już jednak w oryginalnym opisie pierwszej rodziny z wrodzoną trombofilią — niedoborem antytrombiny, opisanym oryginalnie przez Egeberga w 1965 roku [2]. Częściej jednak, bo w około 1/3 przypadków zakrzepica tętnicza wikła przebieg nabytej trombofilii, jaką jest zespół antyfosfolipidowy [3]. W tym ostatnim przypadku z nie do końca wyjaśnionych przyczyn większość epizodów stanowi niedokrwienny udar mózgu [4].

Udar mózgu jest drugą najczęstszą przyczyną zgonu na świecie (prawie 11% wszystkich zgonów)

i najczęstszym czynnikiem wiodącym do niepełnosprawności osób dorosłych [5, 6]. Podstawową przyczyną udarów mózgu jest miażdżycza tętnic domózgowych oraz małych tętnic mózgu, powstająca często w następstwie nadciśnienia tętniczego oraz silnie związana z obecnością klasycznych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego [7]. Drugą istotną przyczyną są udary mózgu wywołane epizodami zatorowymi na skutek zaburzeń rytmu serca (przede wszystkim migotanie przedsionków), przetrwałego otworu owalnego (zator paradoksalny), wad zastawkowych oraz protez zastawkowych [7]. Jednak w około 30% przypadków udarów niedokrwiennych szczególnie u ludzi młodych nie udaje się wykryć przyczyny. Taki udar określamy mianem udaru kryptogennego [8]. Warto zatem określić rolę trombofilii wrodzonej i nabytej w epi-

**Adres do korespondencji:** prof. dr hab. n. med. Jacek Musiał, II Katedra Chorób Wewnętrznych im. Prof. Andrzeja Szczeklika, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, ul. Skawińska 8, 31-066 Kraków, e-mail: jacek.musial@uj.edu.pl

Nadesłano: 21.11.2023

Przyjęto do druku: 21.12.2023

Data pierwszej publikacji: 31.12.2023

Artykuł jest dostępny bezpłatnie na podstawie licencji Creative Commons Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) umożliwiającej jego pobranie oraz udostępnianie pod warunkiem wskazania autorstwa i wydawcy. Niedopuszczalne jest wprowadzanie jakichkolwiek zmian lub wykorzystanie komercyjne bez zgody wydawcy.

zodach niedokrwiennego udaru mózgu, szczególnie u ludzi młodszych, gdzie przyczyny takiego udaru nie są oczywiste. Wiąże się z tym pytanie, czy diagnostyka w kierunku takiego defektu może prowadzić do korzystnej dla chorego zmiany sposobu postępowania?

### Trombofilia wrodzona

Dane dotyczące roli trombofilii wrodzonej u dorosłych chorych z niedokrwiennym udarem mózgu są rozbieżne. Podczas gdy w niektórych dużych badaniach obserwacyjnych nie stwierdzano zwiększonej częstości defektów trombofilicznych u chorych z niedokrwiennym udarem mózgu [9], w innych wskazywano na zwiększony udział chorych z mutacją genu czynnika V typu Leiden, czy mutacją genu protrombiny G20210A, szczególnie u młodszych osób z udarem [10, 11]. Ostatecznie w opublikowanej 4 lata temu dużej metaanalizie dostępnych badań wskazano, że obecność poszczególnych typów wrodzonej trombofilii wiąże się z nieco zwiększonym ryzykiem niedokrwiennego udaru mózgu u osób dorosłych, za wyjątkiem (rzadko występującego) niedoboru antytrombiny [12]. Iloraz szans (*odds ratio*) nie był tu wysoki i wynosił dla czynnika V Leiden — 1,25 (95% CI: 1,08–1,44), dla mutacji G20210A genu protrombiny — 1,48 (95% CI: 1,22–1,80), dla niedoboru białka C — 2,13 (95% CI: 1,16–3,90) oraz dla niedoboru białka S — 2,26 (95% CI: 1,34–3,80).

Jakkolwiek wrodzona trombofilia zwiększa w niewielkim stopniu ryzyko wystąpienia niedokrwiennego udaru mózgu, szczególnie u ludzi młodszych, bez innych istotnych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego, to jednak stwierdzenie jej obecności nie pozwala ani na określenie ryzyka nawrotu epizodu, ani nie wpływa aktualnie na zmianę postępowania u chorych po udarze mózgu [13, 14].

Pewnym szczegółowym tematem w ramach badań nad wpływem trombofilii wrodzonej na występowanie niedokrwiennego udaru mózgu jest problem przetrwałego otworu owalnego (PFO, *patent foramen ovale*). Wada jest efektem braku trwałego poporodowego zamknięcia otworu owalnego poprzez ściśle połączenie się *septum primum* i *septum secundum* przegrody międzyprzedsionkowej. Taki defekt występuje u około 25% ludzi [15], a przy rozpowszechnieniu przezprzełykowego badania echokardiograficznego wykrywanie PFO u osób po przebytych niedokrwiennym udarze mózgu nie przysparza obecnie trudności. Połącznie pomiędzy prawym, a lewym przedsionkiem usposabia do przedostawania się drobnych zakrzepów

do krążenia systemowego, czego następstwem mogą być tętnicze zatory paradoksalne, w tym niedokrwienny udar mózgu.

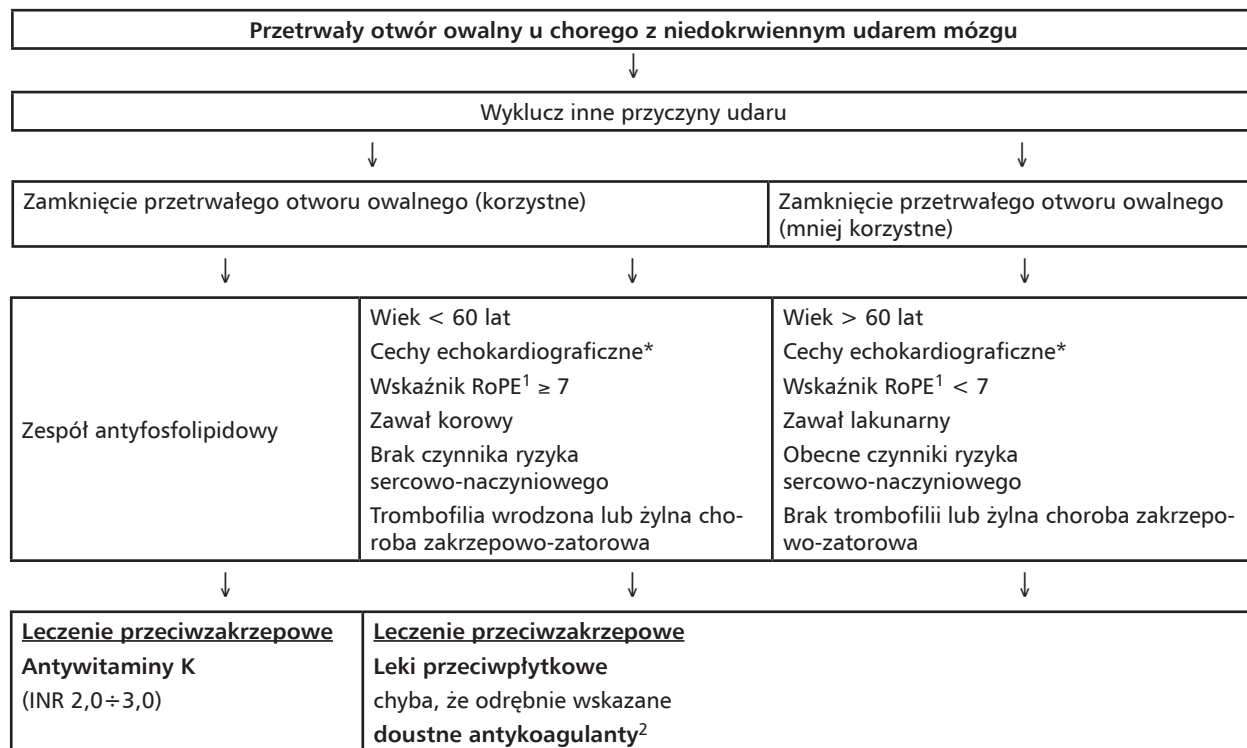
Dyskusja o czynnikach decydujących o zabiegowym, przezskórnym zamknięciu PFO wykracza poza ramy niniejszego opracowania. Należą do nich zarówno parametry echokardiograficzne, jak i czynniki kliniczne, ujęte we wskaźniku RoPE (*risk of paradoxical embolism*) [16]. Należy tu tylko zaznaczyć, iż zabieg zgodnie z zaleceniami [17, 18] należy szczególnie rozważyć w grupie chorych z PFO poniżej 60. roku życia, u których wystąpił kryptogeny udar mózgu. Nowszym bardziej precyzyjnym określeniem jest udar wywołany zatorem o nieokreślonym źródle (ESUS, *embolic stroke of undetermined source*). Zamknięcie PFO wiąże się u takich chorych z istotną redukcją względnego ryzyka nawrotu udaru (RR 0,36) w stosunku do postępowania zachowawczego (leczenie przeciwzakrzepowe) [19]. Zabieg taki jest szczególnie wskazany u osób z trombofilią, ponieważ aktualny przegląd systematyczny i metaanaliza dostępnych badań wykazały u nich większe ryzyko nawrotu udaru [ryzyko hazardu (HR, *hazard rate*) — HR = 2,41; 95% CI: 1,44–4,06], w porównaniu z chorymi z PFO i kryptogenym udarem mózgu, bez towarzyszącej trombofilii [20]. Po zamknięciu PFO ryzyko takiego nawrotu znalazło się tuż poniżej poziomu istotności statystycznej (OR = 2,07; 95% CI: 0,95–4,48). Podsumowując, dominuje obecnie pogląd, iż u chorych po przebytych kryptogenym udarze mózgu i stwierdzonym przetrwałym otworem owalnym, obarczonych trombofilią, właściwym postępowaniem jest zabiegowe zamknięcie PFO [14, 20, 21].

Należy podkreślić, iż przytaczane powyżej badania i przegląd systematyczny, dotyczące chorych po udarze mózgu ze stwierdzonym przetrwałym otworem owalnym i towarzyszącą trombofilią, obejmowały najczęściej łącznie przypadki trombofilii wrodzonej i nabytej. Podobnie przedstawiają się badania dotyczące chorych, u których podjęto decyzję o odstąpieniu od zabiegu i podjęciu leczenia zachowawczego. Stosowane grupy leków obejmują: leków przeciwplytkowe, antywitamina K, a ostatnio także doustne bezpośrednie inhibitory krzepnięcia (DOAC, *direct oral anticoagulants*). Aktualne zbiorcze opracowania wskazują, iż w żadnym z badań nie udało się wykazać wyższości w doborze jakiegokolwiek z wymienionych grup leków w odniesieniu do skuteczności zapobiegania niedokrwiennemu udarowi mózgu [21, 22].

Obecnie brakuje danych co do wskazań i czasu trwania leczenia przeciwzakrzepowego u chorych



**Rycina 1.** Postępowanie u chorych po niedokrwiennym udarze mózgu i rozpoznanym przetrwałym otworze owalnym (zmodyfikowano za: [14])



\*stopień przecieku, ilość mikropęcherzyków powietrza po wstrzyknięciu wstrząśniętego roztworu soli fizjologicznej, obecność tętniaka przegrody międzyprzedsionkowej

<sup>1</sup>wskaźnik uwzględniający obecność/nieobecność czynników klinicznych wpływających na ryzyko udaru mózgu w PFO: nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, udar lub przejściowe niedokrwienie mózgu, palenie tytoniu

<sup>2</sup>antywitaminy K lub doustne bezpośrednie inhibitory krzepnięcia (DOAC, *direct oral anticoagulants*)

wskaźnik RoPE — (*risk of paradoxical embolism*); INR (*international normalized ratio*) — znormalizowany czas protrombinowy

z trombofilii, poddanych zabiegowemu zamknięciu PFO. Ogólne zalecenia *European Society of Cardiology* nakazują podwójne leczenie przeciw płytkowe przez okres 1–6 miesięcy po zamknięciu PFO i pojedynczą terapię przeciw płytkową przez okres 5 lat [23]. Wydaje się, iż za wyjątkiem chorych z zespołem antyfosfolipidowym, chorych z wrodzoną trombofilii po zamknięciu PFO obowiązują powyższe ogólne zasady postępowania.

Pojawia się istotne pytanie o wskazania do diagnostyki w kierunku wrodzonej trombofilii u chorych, którzy przebyli udar i u których wykryto obecność PFO. Dane z codziennej praktyki wskazują, iż u około 2/3 tych chorych nie wykonuje się diagnostyki w kierunku trombofilii [24]. Współbrzmia z tym obecne w Europie poglądy, iż rutynowa diagnostyka w kierunku trombofilii u chorych po przebytych niedokrwiennych epizodach mózgowym, u których potwierdzono obecność PFO, nie jest potrzebna [14, 23]. Przyjmuje się, iż trombofilii wrodzoną należy uwzględnić w planie

postępowania, jedynie jeśli została już ona uprzednio stwierdzona [14]. Przedstawione powyżej dane wskazują jednak, iż taka diagnostyka powinna być jednak wskazana zarówno w odniesieniu do trombofilii wrodzonej, jak i przede wszystkim pod kątem współwystępowania zespołu antyfosfolipidowego. Stwierdzenie trombofilii może wpływać na decyzję o zabiegowym zamknięciu PFO, a także na wybór leczenia przeciwzakrzepowego.

Zasady postępowania u chorych po przebytych udarze mózgu i z przetrwałym otworem owalnym przedstawiono na rycinie 1.

### Zespół antyfosfolipidowy

Zespół antyfosfolipidowy (APS, *antiphospholipid syndrome*) charakteryzuje się współwystępowaniem obecności przeciwciał antyfosfolipidowych (aPL, *antiphospholipid antibodies*) we krwi chorego z objawami klinicznymi, głównie pod postacią zakrzepicy żylną, tętniczej oraz zakrzepicy drobnych naczyń, a u kobiet także powikłań położniczych.

Opublikowane w 2023 roku nowe kryteria klasyfikacyjne APS [25] pozwalają zakwalifikować chorego do grupy APS, jeśli zostanie potwierdzona u niego trwała obecność przeciwciał antyfosfolipidowych w umiarkowanych lub wysokich mianach wraz z wieloma objawami klinicznymi, spośród których wymienia się zakrzepicę tętniczą. Laboratoryjne kryteria klasyfikacyjne obejmują obecność antykoagulantu tocznia (LA, *lupus anticoagulant*), mierzono metodami koagulometrycznymi i/lub przeciwciał antykardiolipinowych (aCL, *anticardiolipin antibodies*) i/lub przeciwciał skierowanych przeciwko beta2-glikoproteinie I ( $\text{a}\beta_2\text{-GPI}$ ) w klasach IgG oraz IgM. Zakrzepica tętnicza jako kryterium kliniczne musi spełniać warunek wykluczenia innych równie lub bardziej prawdopodobnych przyczyny jej wystąpienia. Szersze omówienie tych zagadnień znajdzie Czytelnik w artykule „Nowe kryteria klasyfikacyjne zespołu antyfosfolipidowego — 2023”, opublikowanego w Journal of Transfusion Medicine 2023, tom 16, nr 3, 110–116 ([https://journals.viamedica.pl/journal\\_of\\_transfusion\\_medicine/article/view/97598](https://journals.viamedica.pl/journal_of_transfusion_medicine/article/view/97598)).

Objawy niedokrwienia centralnego systemu nerwowego związane z zespołem antyfosfolipidowym obejmują: niedokrwienno udar mózgu, epizody przejściowego niedokrwienia mózgu (TIA, *transient ischaemic attack*), a także stwierdzane w badaniach obrazowych (rezonans magnetyczny) hiperintensywne ogniska istoty białej o przypuszczalnej etiologii niedokrwiennej [26]. Bieżący przegląd systematyczny dostępnych badań wskazuje, iż wśród osób poniżej 50. roku życia, które przeżyły niedokrwienno udar mózgu lub TIA, przeciwciała antyfosfolipidowe stwierdza się w około 17% przypadków [27].

Tak jak w przypadku większości objawów klinicznych APS, trudno ustalić ścisły, szczególnie związek pomiędzy pojedynczymi typami przeciwciał antyfosfolipidowych a udarem mózgu [28]. Obecność antykoagulantu tocznia najsilniej wiąże się ze wszystkimi powikłaniami zakrzepowymi. Dla określenia ryzyka wystąpienia powikłań zakrzepowych należy się posłużyć obecnie tak zwanym profilem przeciwciał. Profil wysokiego ryzyka, zarówno dla wystąpienia epizodu zakrzepowego (w tym udaru mózgu), jak i jego nawrotu, wiąże się z trwałą obecnością wszystkich trzech typów przeciwciał (*triple positivity*; trójpozytywność) [29, 30]. Podobnie wysoki profil ryzyka wiąże się z obecnością dwóch typów przeciwciał, w tym antykoagulantu tocznia i aCL lub  $\text{a}\beta_2\text{-GPI}$ , szczególnie w klasie IgG i w wysokich mianach. Natomiast niskie ryzyko zakrzepowe wiąże się z przejściową obecnością

pojedynczych aPL w niskich/umiarkowanych mianach [31]. Istnieją przesłanki wskazujące, iż ryzyko zakrzepowe może rosnać także u chorych z APS i współwystępującym kryterium klinicznym, jakim jest umiarkowana małopłytkowość [32].

Ponieważ udar mózgu występuje najczęściej w kontekście miażdżycy tętnic u osób starszych, pojawia się pytanie, u kogo należy prowadzić diagnostykę w kierunku zespołu antyfosfolipidowego. Badania takie są szczególnie wskazane w przypadku kryptogennego udaru mózgu oraz u osób młodszych; niektóre zalecenia sugerują granicę wieku < 50 roku życia [33]. Współczesne badanie ankietowe wskazuje, iż jakkolwiek granicę wieku w diagnostyce zespołu antyfosfolipidowego u chorych z udarem mózgu stosuje jedynie około 30% badaczy [26]. Wiąże się to z możliwością wystąpienia zespołu antyfosfolipidowego także u osób starszych [34]. Tu jednak należałoby indywidualizować podejście diagnostyczne ze względu na częste współwystępowanie wielu innych, klasycznych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego. Patogenetyczna rola wykrytych przeciwciał antyfosfolipidowych może tu być wątpliwa, a ich obecność przypadkowa. Odwrotnie, stwierdzenie aPL o wysokim profilu ryzyka u starszej osoby nieobciążonej klasycznymi czynnikami ryzyka będzie za taką rolę silniej przemawiać.

Dotychczas nie określono optymalnego momentu po udarze mózgu dla wykonania badań laboratoryjnych w kierunku aPL. Wpływ leków przeciwzakrzepowych lub białek ostrej fazy na wynik oznaczenia antykoagulantu tocznia [33] nakazuje odsunięcie oznaczeń poza ostrą fazę udaru. Badania należy jednak wykonać w miarę szybko, ponieważ ich wynik może wpłynąć na zasadniczą zmianę sposobu leczenia.

W leczeniu zespołu antyfosfolipidowego po niedokrwienno udarze mózgu należy przede wszystkim zidentyfikować wszystkie klasyczne czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego i energicznie zwalczać wszelkie czynniki modyfikowalne [30]. Wtórna profilaktyka przeciwzakrzepowa opiera się na bezterminowym podawaniu doustnych preparatów antywitamin K (AWK) z utrzymywaniem wskaźnika znormalizowanego czasu protrombinowego (INR, *international normalized ratio*) — pomiędzy 2,0 a 3,0 [31]. W przypadku nieskuteczności zaleca się zwiększenie intensywności antykoagulacji przy użyciu doustnych antywitamin K (AWK) do INR 3,0 ÷ 4,0, albo podawanie AWK w dawkach utrzymujących INR w przedziale 2,0 ÷ 3,0 i dodanie kwasu acetylosalicylowego (ASA) w niskich dawkach — 75–100 mg [31]. W tym miejscu trzeba

zaznaczyć, iż w przypadku innych epizodów związanych z niedokrwieniem centralnego systemu nerwowego (TIA, prawdopodobnie naczyniopochodne zmiany w istocie białej) postępowanie w codziennej praktyce obejmuje także podawanie kwasu acetylosalicylowego (ASA, *acetylsalicylic acid*) w niskich dawkach, stosowanie podwójnej terapii przeciwplatekowej (ASA + clopidogrel) lub podawanie innych leków przeciwplatekowych.

Wprowadzenie do leczenia i profilaktyki przeciwzakrzepowej DOAC stworzyło potencjalnie atrakcyjną alternatywę dla kłopotliwych w stosowaniu AWK w leczeniu chorych z APS. W 2018 roku ukazało się pierwsze badanie porównujące leczenie rywaroksabanem w dawce 20 mg na dobę z warfaryną (INR 2,0–3,0) u chorych z trójpozytywnym APS [35]. W badaniu wykazano mniejszą skuteczność rywaroksabanu, objawiającą się wyższą częstością tętnicznych epizodów zakrzepowych. Międzynarodowe zalecenia, opublikowane już rok później, zawierały zalecenie, aby u chorych z zakrzepicą tętniczną, obarczonych przeciwciałami antyfosfolipidowymi o wysokim profilu ryzyka, nie stosować DOAC [31, 36]. Dopuszczano jednak możliwość ich stosowania u chorych z objawami zakrzepicy żyłnej oraz u chorych bez obecności aPL o wysokim profilu ryzyka. Aktualnie ukazały się jednak dwie metaanalizy obejmujące dalsze badania kliniczne efektów DOAC w porównaniu z AWK u chorych na APS, obejmujące także chorych po epizodach żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej, oraz chorych

z aPL o niższym profilu ryzyka, w tym z obecnością dwóch typów przeciwciał (*double positivity*) [37, 38]. W analizie ujęto badania prowadzone w Stanach Zjednoczonych, Wielkiej Brytanii, Hiszpanii oraz we Włoszech, które objęły łącznie 472 osoby. W trzech badaniach stosowano rywaroksaban, a w jednym apiksaban. Analiza wskazała, iż stosowanie DOAC w porównaniu z warfaryną zwiększa około 3–5-krotnie ryzyko wystąpienia nawrotu zakrzepicy tętnicznej przy braku wpływu na ryzyko nawrotu zakrzepicy żyłnej. Wśród zwiększonej ilości epizodów zakrzepicy tętnicznej dominował niedokrwienny udar mózgu. Jego ryzyko nawrotu w przypadku stosowania DOAC w porównaniu z warfaryną rosło aż kilkunastokrotnie (10–13 razy) [37, 38]. Wyniki te powinny doprowadzić do zmian w zaleceniach dotyczących wtórnej profilaktyki przeciwzakrzepowej u chorych z zakrzepową postacią zespołu antyfosfolipidowego [39]. Warfaryna powinna być stosowana nie tylko u osób z aPL o wysokim profilu ryzyka i przebyłym epizodzie zakrzepicy tętnicznej, lecz także u chorych po przebyłym epizodzie zakrzepicy żyłnej i tych, którzy są potencjalnie zagrożeni niższym ryzykiem zakrzepowym (obecność dwóch typów aPL lub tylko trwała obecność jednego typu przeciwciał w wyższych mianach) [39]. U osób z niedokrwinnym udarem mózgu obecność APS należy przeprowadzić na podstawie ścisłych kryteriów [25] ze względu na istotne następstwa rozpoznania tego zespołu dla sposobu profilaktyki przeciwzakrzepowej.

**Tabela 1.** Diagnostyka i postępowanie w zespole antyfosfolipidowym u chorych po niedokrwinnym udarze mózgu

**Wskazania do diagnostyki w kierunku zespołu antyfosfolipidowego u osób po niedokrwinnym udarze mózgu**

- Chorzy po niedokrwinnym udarze mózgu/przejęciowym epizodzie niedokrwienia mózgu < 50. roku życia
- Chorzy po udarze kryptogennym/zatorowym udarze mózgu o nieznanym źródle (ESUS<sup>1</sup>)
- Chorzy po niedokrwinnym udarze mózgu z towarzyszącą ogólnoustrojową chorobą autoimmunologiczną (głównie toczeń rumieniowaty układowy)
- Chorzy po niedokrwinnym udarze mózgu, którzy przebyli uprzednio zakrzepicę żylną
- Kobiety po niedokrwinnym udarze mózgu, u których uprzednio wystąpiły powikłania ciąży

**Zalecane badania diagnostyczne**

- Antykoagulant tocznia — metody koagulometryczne, procedura trójstopniowa
- aCL, klasy IgG i/lub IgM (metodą ELISA<sup>2</sup>)
- aβ2-GPI klasy IgG i/lub IgM (metodą ELISA<sup>2</sup>)

**Leczenie zespołu antyfosfolipidowego u osób po przebyłym udarze mózgu**

- Doustne antywitaminy K (INR 2,0÷3,0) lub
- Doustne antywitaminy K (INR 2,0÷3,0) + kwas acetylosalicylowy w niskich dawkach (75–100 mg), lub
- Doustne antywitaminy K (INR 3,0÷4,0)
- Eliminacja/leczenie klasycznych modyfikowalnych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego

<sup>1</sup>ESUS — udar mózgu o nieznanym źródle, patrz też: [40]

<sup>2</sup>ELISA — metoda immunoenzymatyczna jest zalecana dla określania umiarkowanych/wysokich poziomów przeciwciał antyfosfolipidowych (aPL); do oznaczania aPL można także używać platform automatycznych, dla których jednak brakuje zdefiniowanych poziomów umiarkowanych/wysokich poziomów aPL

Doustne antywitaminy K po niedokrwiennym udarze mózgu powinny być najpewniej zastosowane już w momencie uzyskania pierwszego dodatniego wyniku oznaczenia aPL, wskazującego na zwiększone ryzyko zakrzepowe, jeszcze przed uzyskaniem potwierdzenia ich trwałego występowania, po okresie następnych 3 miesięcy [28]. Diagnostykę i postępowanie w APS u chorych po niedokrwiennym udarze mózgu przedstawiono w tabeli 1.

**Konflikt interesów:** nie zgłoszono

## Piśmiennictwo

1. Zawilska K. Trombofilia wrodzona. W: Zakrzepy i zatory, pod red. Windyga J, Pasierski T, Torbicki A. PZWL, Warszawa 2014: 53–68.
2. Egeberg O. Thrombophilia caused by inheritable deficiency of blood antithrombin. *Scand J Clin Lab Invest.* 1965; 17: 92, doi: 10.3109/00365516509077290, indexed in Pubmed: 14260761.
3. Musiał J. Zespół antyfosfolipidowy. W: Zakrzepy i zatory, pod red. Windyga J, Pasierski T, Torbicki A. PZWL, Warszawa 2014: 69–84.
4. Cervera R, Piette J, Font J, et al. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis & Rheumatism.* 2002; 46(4): 1019–1027, doi: 10.1002/art.10187, indexed in Pubmed: 11953980.
5. World Health Organization. The top 10 causes of death. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
6. Adamson J, Beswick A, Ebrahim S. Is stroke the most common cause of disability? *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2004; 13(4): 171–177, doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2004.06.003, indexed in Pubmed: 17903971.
7. Niewada M, Członkowska A. Zakrzepy i zatory tętnic mózgowych. W: Zakrzepy i zatory, pod red. Windyga J, Pasierski T, Torbicki A. PZWL, Warszawa 2014: 347–369.
8. Yaghi S, Bernstein R, Passman R, et al. Cryptogenic Stroke. *Circul Res.* 2017; 120(3): 527–540, doi: 10.1161/circresaha.116.308447, indexed in Pubmed: 28154102.
9. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, et al. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. *N Engl J Med.* 1995; 332(14): 912–917, doi: 10.1056/NEJM199504063321403, indexed in Pubmed: 7877648.
10. Hamedani AG, Cole JW, Mitchell BD, et al. Meta-analysis of factor V Leiden and ischemic stroke in young adults: the importance of case ascertainment. *Stroke.* 2010; 41(8): 1599–1603, doi: 10.1161/STROKEAHA.110.581256, indexed in Pubmed: 20616326.
11. Jiang B, Ryan KA, Hamedani A, et al. Prothrombin G20210A mutation is associated with young-onset stroke: the genetics of early-onset stroke study and meta-analysis. *Stroke.* 2014; 45(4): 961–967, doi: 10.1161/STROKEAHA.113.004063, indexed in Pubmed: 24619398.
12. Chiasakul T, De Jesus E, Tong J, et al. Inherited thrombophilia and the risk of arterial ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *J Am Heart Assoc.* 2019; 8(19): e012877, doi: 10.1161/JAHA.119.012877, indexed in Pubmed: 31549567.
13. Majmundar S, Thapa S, Miller ES, et al. Low value of inherited thrombophilia testing among patients with stroke or transient ischemic attack: A three-year retrospective study. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2023; 32(10): 107308, doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2023.107308, indexed in Pubmed: 37633204.
14. Swan D, Connors JM, Thachil J. Dilemmas in hematology: consults in patients with arterial thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2023; 21(3): 421–432, doi: 10.1016/j.jtha.2023.01.002, indexed in Pubmed: 36696207.
15. Hagen PT, Scholz DG, Edwards WD. Incidence and size of patent foramen ovale during the first 10 decades of life: an autopsy study of 965 normal hearts. *Mayo Clin Proc.* 1984; 59(1): 17–20, doi: 10.1016/s0025-6196(12)60336-x, indexed in Pubmed: 6694427.
16. Thaler DE, Di Angelantonio E, Di Tullio MR, et al. The risk of paradoxical embolism (RoPE) study: initial description of the completed database. *Int J Stroke.* 2013; 8(8): 612–619, doi: 10.1111/j.1747-4949.2012.00843.x, indexed in Pubmed: 22883936.
17. Messé S, Gronseth G, Kent D, et al. Practice advisory update summary: Patent foramen ovale and secondary stroke prevention. *Neurology.* 2020; 94(20): 876–885, doi: 10.1212/wnl.0000000000009443, indexed in Pubmed: 32350058.
18. Kavinsky C, Szerlip M, Goldsweig A, et al. SCAI Guidelines for the management of patent foramen ovale. *Journal of the Society for Cardiovascular Angiography & Interventions.* 2022; 1(4): 100039, doi: 10.1016/j.jscai.2022.100039.
19. Turc G, Calvet D, Guérin P, et al. CLOSE investigators. closure, anticoagulation, or antiplatelet therapy for cryptogenic stroke with patent foramen ovale: systematic review of randomized trials, sequential meta-analysis, and new insights from the CLOSE study. *J Am Heart Assoc.* 2018; 7(12), doi: 10.1161/JAHA.117.008356, indexed in Pubmed: 29910193.
20. Hviid CVB, Simonsen CZ, Hvas AM. Recurrence risk in patients with cryptogenic stroke, patent foramen ovale, and thrombophilia: a systematic review and meta-analysis. *Thromb Haemost.* 2019; 119(11): 1839–1848, doi: 10.1055/s-0039-1693739, indexed in Pubmed: 31378004.
21. Farjat-Pasos JI, Nuche J, Mesnier J, et al. Transcatheter patent foramen ovale closure in stroke patients with thrombophilia: current status and future perspectives. *J Stroke.* 2022; 24(3): 335–344, doi: 10.5853/jos.2022.01697, indexed in Pubmed: 36221936.
22. Geisler T, Keller T, Martus P, et al. Apixaban versus aspirin for embolic stroke of undetermined source. *NEJM Evid.* 2023; 3(1), doi: 10.1056/evidoa2300235.
23. Pristipino C, Sievert H, D’Ascenzo F, et al. European position paper on the management of patients with patent foramen ovale. General approach and left circulation thromboembolism. *Eur Heart J.* 2018; 40(38): 3182–3195, doi: 10.1093/eurheartj/ehy649, indexed in Pubmed: 30358849.
24. Dębski M, Abdelrahman A, Alshehri H, et al. Contemporary management of patent foramen ovale: a multinational survey on cardiologists’ perspective. *J Interv Cardiol.* 2021; 2021: 6955791, doi: 10.1155/2021/6955791, indexed in Pubmed: 34602869.
25. Barbhayya M, Zuily S, Naden R, et al. 2023 ACR/EULAR antiphospholipid syndrome classification criteria. *Ann Rheum Dis.* 2023; 82(10): 1258–1270, doi: 10.1136/ard-2023-224609, indexed in Pubmed: 37640450.

26. Cohen H, Werring D, Chandratheva A, et al. Survey on antiphospholipid syndrome diagnosis and antithrombotic treatment in patients with ischemic stroke, other brain ischemic injury, or arterial thromboembolism in other sites: communication from ISTH SSC subcommittee on lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies. *J Thromb Haemost.* 2023; 21(10): 2963–2976, doi: 10.1016/j.jtha.2023.06.020, indexed in Pubmed: 37391096.
27. Sciascia S, Sanna G, Khamashta MA, et al. APS Action. The estimated frequency of antiphospholipid antibodies in young adults with cerebrovascular events: a systematic review. *Ann Rheum Dis.* 2015; 74(11): 2028–2033, doi: 10.1136/annrheumdis-2014-205663, indexed in Pubmed: 24942381.
28. Mittal P, Quattrocchi G, Tohidi-Esfahani I, et al. Antiphospholipid syndrome, antiphospholipid antibodies, and stroke. *Int J Stroke.* 2023; 18(4): 383–391, doi: 10.1177/17474930221150349, indexed in Pubmed: 36571450.
29. Pengo V, Ruffatti A, Legnani C, et al. Incidence of a first thromboembolic event in asymptomatic carriers of high-risk antiphospholipid antibody profile: a multicenter prospective study. *Blood.* 2011; 118(17): 4714–4718, doi: 10.1182/blood-2011-03-340232, indexed in Pubmed: 21765019.
30. Pengo V, Ruffatti A, Legnani C, et al. Clinical course of high-risk patients diagnosed with antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost.* 2010; 8(2): 237–242, doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03674.x, indexed in Pubmed: 19874470.
31. Tektonidou MG, Andreoli L, Limper M, et al. EULAR recommendations for the management of antiphospholipid syndrome in adults. *Ann Rheum Dis.* 2019; 78(10): 1296–1304, doi: 10.1136/annrheumdis-2019-215213, indexed in Pubmed: 31092409.
32. Vreede AP, Bockenstedt PL, McCune WJ, et al. Cryptic conspirators: a conversation about thrombocytopenia and antiphospholipid syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* 2019; 31(3): 231–240, doi: 10.1097/BOR.0000000000000595, indexed in Pubmed: 30747734.
33. Devreese KMJ, de Groot PG, de Laat B, et al. Guidance from the Scientific and Standardization Committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis: Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection and interpretation. *J Thromb Haemost.* 2020; 18(11): 2828–2839, doi: 10.1111/jth.15047, indexed in Pubmed: 33462974.
34. Zully S, Clerc-Urmès I, Bauman C, et al. APS ACTION Investigators. Cluster analysis for the identification of clinical phenotypes among antiphospholipid antibody-positive patients from the APS ACTION Registry. *Lupus.* 2020; 29(11): 1353–1363, doi: 10.1177/0961203320940776, indexed in Pubmed: 32703117.
35. Pengo V, Denas G, Zoppellaro G, et al. Rivaroxaban vs warfarin in high-risk patients with antiphospholipid syndrome. *Blood.* 2018; 132(13): 1365–1371, doi: 10.1182/blood-2018-04-848333, indexed in Pubmed: 30002145.
36. Zully S, Cohen H, Isenberg D, et al. Use of direct oral anticoagulants in patients with thrombotic antiphospholipid syndrome: Guidance from the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost.* 2020; 18(9): 2126–2137, doi: 10.1111/jth.14935, indexed in Pubmed: 32881337.
37. Giarretta I, Ageno W, Dentali F. Lack of efficacy of direct oral anticoagulants compared to warfarin in antiphospholipid antibody syndrome. *Haematologica.* 2022; 107(11): 2737–2741, doi: 10.3324/haematol.2022.281586, indexed in Pubmed: 35861020.
38. Khairani CD, Bejjani A, Piazza G, et al. Direct oral anticoagulants vs vitamin K antagonists in patients with antiphospholipid syndromes: Meta-analysis of randomized trials. *J Am Coll Cardiol.* 2023; 81(1): 16–30, doi: 10.1016/j.jacc.2022.10.008, indexed in Pubmed: 36328154.
39. Crowther MA, Jones AE, Witt DM. Warfarin is the preferred therapy for patients with thrombotic APS: back to the future. *J Am Coll Cardiol.* 2023; 81(1): 31–33, doi: 10.1016/j.jacc.2022.10.015, indexed in Pubmed: 36328156.
40. Hart R, Catanese L, Perera K, et al. Embolic stroke of undetermined source. *Stroke.* 2017; 48(4): 867–872, doi: 10.1161/strokeaha.116.016414, indexed in Pubmed: 28265016.

# Mimetics of active factor VIII (FVIIIa) and their impact on laboratory tests of haemostasis

Edyta Odnoczko 

Laboratory of Hemostasis and Porphyria Genetics, Department of Haemostasis and Metabolic Disorders, Institute of Hematology and Transfusion Medicine, Warsaw, Poland

## Summary

*The introduction of long-acting, subcutaneously administered mimetics mimicking active factor VIII (FVIIIa) is undoubtedly a breakthrough in the prophylactic treatment of haemophilia A patients. The innovative nature and mode of action of FVIIIa mimetic molecules has significant impact on the current algorithms for laboratory monitoring of haemophilia treatment. Drug level monitoring for dose adjustment is not required; in clinical practice however, laboratory monitoring of haemostasis may be useful, if surgical intervention is required or bleeding occurs despite prophylaxis. In such cases, awareness of the impact of FVIIIa mimetic therapy on laboratory tests of haemostasis is a necessary condition for efficient utilization and interpretation of results.*

**Keywords:** haemophilia A; haemostasis tests; factor VIII; FVIII mimetics; emicizumab; mim8

*J. Transf. Med. 2023; 16: 260–268*

## Introduction

Haemophilia A (HA) is one of the most common congenital bleeding disorders. It is caused by the absence or impaired synthesis of plasma coagulation factor VIII (FVIII, Factor VIII). It is a genetically determined monogenic disease, inherited in a sex-linked recessive manner, which makes FVIII deficiency and the accompanying hemorrhagic diathesis manifest mainly in men, while women are carriers of a mutated variant of the gene encoding FVIII (F8, Xq28) [1]. The disease manifests as an excessive bleeding tendency and the severity of bleeding depends on the degree of FVIII deficiency. HA is diagnosed by measuring plasma FVIII activity. Depending on the degree of FVIII deficiency, there are 3 forms of HA:

- severe, when FVIII is less than one International Unit (IU)/dl;
- moderate, when FVIII is between 1–5 IU/dl;
- mild, when FVIII is > 5–50 IU/dl [1].

The severe form of Haemophilia A is a life-threatening bleeding disorder (FVIII < 1 IU/dl) which manifests with spontaneous bleeding, primarily into joints and muscles, typically beginning around 2–3 years of age [2]. The mainstay of treatment for severe HA is the use of deficient blood clotting factor concentrates (known as replacement therapy). Both the treatment of active bleeding and long-term prophylaxis of bleeding in this group of patients rely on intravenous injections of FVIII concentrate, the number of which can reach more than 150 per year if performed regularly. Moreover, the most serious complication of substitution

**Correspondence address:** dr n. med. Edyta Odnoczko, Laboratory of Hemostasis and Porphyria Genetics, Department of Hemostasis and Metabolic Disorders, Institute of Hematology and Transfusion Medicine, ul. Gandhi 14, 02-776 Warszawa, Polska, e-mail: eodnoczko@ihit.waw.pl

Translation: mgr Krystyna Dudziak

Received: 21.11.2023

Accepted: 21.12.2023

Early publication date: 31.12.2023

This article is available in open access under Creative Common Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) license, allowing to download articles and share them with others as long as they credit the authors and the publisher, but without permission to change them in any way or use them commercially.

**Table 1.** Bispecific antibodies mimicking FVIIIa used in hemophilia A, with or without inhibitors (adapted from [1])

FVIIIa mimetic	Route of administration	Drug dosage	Application/clinical research
Emicizumab	Subcutaneously	1 × per week, 1 × every 2 weeks or 1 × every 4 weeks	FDA and EMA approved; Adults, adolescents, and children with severe or moderate haemophilia A, with or without inhibitors
Mim8	Subcutaneously	1 × per week or 1 × per month	Phase III clinical trial: FRONTIER 4/5

FDA — Food and Drug Administration, EMA — European Medicines Agency

therapy (affecting about 20–40% of patients with severe and 3–13% with non-severe HA) is the occurrence of alloantibodies that neutralize FVIII activity (the so-called FVIII inhibitor), as a result of which prophylaxis and inhibition of bleeding in this group of patients do not lend themselves to FVIII substitution therapy [3–5]. In addition, the burden on the patient of having to administer FVIII concentrate 3–4 times a week can lead to variable clinician adherence and poorer treatment outcomes [6]. It should also be added that, as a consequence, suboptimal HA treatment can lead to an increased number of complications, such as recurrent joint bleeding, hemophilic arthropathy and reduced quality of life [6].

For the above reasons, the last few years have witnessed significant advances in innovative treatments for hemophilia, among which the development and introduction of molecules that mimic active FVIII, the so-called FVIIIa mimetics (FVIIIa mimetics), into the prophylactic treatment of HA is groundbreaking [1, 7] (Table 1). The development of such novel monoclonal antibodies has revolutionized the treatment of HA, expanding the therapeutic options for this hemorrhagic diathesis with so-called non-replacement therapy [7]. These drugs are characterized primarily by their long duration of action, lack of neutralization by the FVIII inhibitor and subcutaneous route of administration, which significantly improves the quality of life of HA patients and the effectiveness of prophylactic treatment [7].

The first FVIIIa mimetic introduced for the prophylactic treatment of bleeding in HA is emicizumab (Hemlibra®, Roche Switzerland) [3, 6]. This drug is a humanized, bispecific, monoclonal immunoglobulin G4 (IgG4) that, to restore hemostasis, replaces FVIIIa in the tenase complex by binding human coagulation factors IXa and X [8–11]. Emicizumab is an antibody that has no structural similarity to FVIII, making it non-neutralizable by alloantibodies (inhibitor) to FVIII [9,

12]. In November 2017, the U.S. Food and Drug Administration (FDA, Food and Drug Administration), followed by the European Medicines Agency (EMA, European Medicines Agency) in February 2018, approved the use of emicizumab in patients with HA complicated by FVIII inhibitor, and in subsequent years its use for prophylaxis in patients with severe and moderate HA without inhibitor, as it has been shown to significantly reduce bleeding rates in this group of patients as well [1, 3, 10, 13, 14]. Emicizumab was very quickly recognized as a drug signaling a new era of HA treatment, as in all phase III clinical trials, emicizumab prophylaxis led to a spectacular reduction in annualized bleeding rate (ABR, annualized bleeding rate), with a median ABR of 2.6 for all dosing regimens in patients in HAVEN trials 1 through 4, and more than 80% of participants had no bleeding after week 24 of therapy [11]. Emicizumab has a prolonged half-life in the bloodstream (4–5 weeks), which allows the drug to be dosed once every one, two or four weeks, compared to conventional replacement therapy [3, 8]. A second invaluable benefit of using Hemlibra® in HA patients is, unlike the use of standard FVIII concentrates, the subcutaneous route of administration and the associated increase in comfort and quality of life for this group of patients. For the above reasons, but primarily because of its effectiveness in inhibiting bleeding, the use of emicizumab is growing rapidly worldwide. The drug is currently approved for clinical use in many countries, with the understanding that in Poland, as of 06/01/2024, it can only be available for patients with severe HA complicated by an inhibitor and in exceptional cases in patients with severe hemophilia A without an inhibitor.

The search for an ideal HA treatment and the successful development of FVIIIa mimetic therapy using emicizumab has driven the development of further next-generation bispecific antibodies based on this concept of action and designed for subcutaneous prophylactic HA treatment with and

without inhibitors. In 2021, literature reported the development by Novo Nordisk of a molecule called denecimig (Mim8), which is a human next-generation bispecific antibody that, like emicizumab, mimics the action of FVIIIa by forming a complex with FX and FIXa on the phospholipid surface of activated platelets to accelerate FX activation [4, 7, 11, 15, 16]. Data from *in vitro* studies using human blood, as well as animal models of HA, indicate that Mim8 increases thrombin generation approximately 15-fold compared to the emicizumab analog [6, 15–17]. What differentiates Mim8 from emicizumab is the construction of a monovalent anti-FIX arm that more potently stimulates the proteolytic activity of FIX to activate FX [6, 15]. The drug is intended for subcutaneous prophylactic treatment of patients with HA with or without inhibitors, and its efficacy, safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics are currently being evaluated in clinical trials. Current data from clinical trials showed that the half-life ( $t_{1/2}$ ) of Mim8 was approximately 30 days, confirming the possibility of dosing the drug weekly or monthly [1, 6].

Other next-generation bispecific FVIII mimetics in development include NXT007 (Chugai Pharmaceutical Co, Roche) and BS-027125 (Bioverativ, Sanofi), currently in preclinical evaluation [1, 3, 7, 11, 18, 19].

The so far published clinical data indicate that the treatment regimen with FVIIIa mimetics ensures the achievement of a stable and lasting response, making dose adjustment unnecessary. Adhering to the prescribed regimen ensures the attainment of the desired drug concentration and its persistence in the circulation, even for several months after the last dose injection [14]. Clinical situations in which experts currently agree that laboratory monitoring and haemostasis control can be useful include: surgeries and surgical procedures, breakthrough bleeding despite prophylaxis, bleeding following injuries, and verifying the effectiveness of ongoing treatment [10, 20, 21].

It should be emphasized that the innovative nature and mode of action of FVIIIa mimetic molecules bring significant implications for existing algorithms in the laboratory monitoring of haemophilia treatment. The half-life of a mimetic molecule, such as emicizumab, is approximately 4 to 5 weeks, which means that this therapy can impact laboratory test results for up to 6 months after administration [12, 22]. Awareness of the impact of the use of the aforementioned mimetic therapy on laboratory tests of hemostasis is a prerequisite for their efficient use and proper interpretation of

their results. This article discusses the effect of FVIIIa mimetic drugs on individual hemostasis tests, with a particular focus on the monitoring of combined FVIII replacement therapy with FVIII concentrates.

### Effects of FVIIIa mimetics on baseline and specialized tests of hemostasis

As mentioned, the mimetics in question are molecules that mimic activated FVIII and, unlike the FVIII protein, do not require thrombin-mediated feedback activation [12, 23, 24]. This feature of mimetic molecules significantly affects especially the routine test of hemostasis, which is the activated partial thromboplastin time (aPTT) and all tests derived from it (Table 2) [8, 12, 14–16, 20]. aPTT is indeed excessively shortened to varying degrees depending on the reagent used, usually below the normal reference range [8, 13, 14, 25]. Importantly, because FVIIIa mimetics are long-acting drugs, this shortening occurs after the first dose of the drug, even at very low concentrations, and may persist for several months after treatment is discontinued [12, 14, 22]. In addition, it is worth noting that the measurement of aPTT in a patient treated with FVIIIa mimetics is not suitable for monitoring this therapy, but its prolongation may indicate the patient's noncompliance with the drug regimen or the development of so-called Anti-Drug Antibody (ADA) [9, 13].

In the case of other routine haemostasis tests, a clinically insignificant impact of emicizumab and mim8 on prothrombin time (PT) measurements has been observed, depending on the reagent used. Associated determinations of factors II, V, VII, and X also remain without significant changes [8, 9, 14, 22, 27, 28]. Similarly, measurement of thrombin time (TT) and determination of fibrinogen concentration using the Clauss method remain without clinically significant impact from the action of the discussed drug [8, 27].

Specialized tests based on aPTT measurement, used, among other things, to examine the activity of factors in the intrinsic pathway of the coagulation system (VIII, IX, XI, and XII), show falsely elevated values [14, 20, 25]. This effect also applies to the measurement of protein C and S activity with the coagulation assay and the activated protein C resistance test (APCR), when performed based on aPTT measurement [8, 14, 22, 28, 29]. In all HA patients treated with emicizumab who require heparin therapy, a chromogenic anti-Xa test should be used to measure drug levels [8, 14].



**Table 2.** Effect of FVIIIa mimetics on the results of selected coagulation tests (adapted from [8, 9, 22, 26, 27])

Type of haemostasis laboratory test.	False result	Reliable result	Comment
<b>Routine tests</b>			
aPTT	✓		False-shortened result (even < 20 s) Effect already seen at minimal drug concentration (> 5 µg/ml)
aPTT correction test	✓		False negative result
PT		✓	The result is normal or slightly prolonged
Fibrinogen (Clauss method)		✓	Not affected
TT		✓	Not affected
<b>Specialized tests</b>			
Determination of FVIII activity by a one-stage coagulation assay	✓		False high result. Value from several hundred to even several thousand IU/dl [%]
Determination of FIX, FXI and FXII activity using a one-step coagulation test	✓		False high result. Measurement based on aPTT
Determination of the activity of FII, FV, FVII, and FX by a one-stage coagulation assay		✓	Not affected Measurement based on PT
Determination of inhibitor titer against human FVIII by the Bethesda assay with FVIII measurement using a coagulation method	✓		False negative result Indicates lack of inhibitor
Determination of FVIII activity by a chromogenic assay using a reagent of human origin (FX, FIX)	✓		False high result It serves as a "surrogate" for the drug's activity in a patient without FVIII treatment
Determination of FVIII activity by a chromogenic assay using a reagent of bovine origin (FX)		✓	Not affected
Determination of inhibitor titer against human FVIII by the Bethesda assay with FVIII measurement using a chromogenic method with a reagent of bovine origin (FX)		✓	Not affected
Determination using an immunological test (Eli-sa)		✓	Not affected
Determination of anti-Xa using a chromogenic assay		✓	Not affected

aPTT — activated partial thromboplastin time; PT — prothrombin time; TT — thrombin time; FVIII — factor VIII; FX — factor X

In addition, tests to detect FVIII inhibitors, i.e., a screening test based on aPTT measurement of a mixture of test plasma and normal plasma (the so-called "correction test") and the Bethesda test with measurement of FVIII with a one-step coagulation test show false-negative results [8, 14].

### **The impact of FVIIIa mimetics on the Measurement of FVIII in Plasma**

Based on global experiences with the use of emicizumab in HA patients, it is known that long-term bleeding prophylaxis with this group of drugs

significantly reduces the risk of bleeding events. However, when bleeds identified as breakthrough bleeds, or those resulting from trauma, or the need for invasive surgery, or the deployment of ITI, need to be treated, the concomitant use of an FVIIIa mimetic and FVIII concentrate may be necessary, in which case the appropriate choice of tests to reliably monitor such therapy is important [8, 10, 14, 21]. It should be noted, however, that in a joined analysis of the HAVEN 1–4 study, breakthrough bleeds, both spontaneous and post-traumatic, were very rare during emicizumab prophylaxis [3].

In the diagnosis and monitoring of haemophilia A treatment, two main strategies are used to measure the activity of FVIII in plasma: the one-stage coagulation test (FVIII:C, FVIII coagulation activity) and the chromogenic test [4, 21, 25]. Currently, in the treatment of haemophilia A, there is a fairly wide range of plasma-derived or recombinant (rFVIII, recombinant Factor VIII) Factor VIII concentrates with standard (SHL, standard half-life) or extended half-life (EHL) [12, 30]. Discrepancies in the results of FVIII activity measured by the coagulation and chromogenic tests have been described in the literature for many years [4, 12, 25]. Initially, these discrepancies pertained to the classification of non-severe haemophilia A, and later emerged as a consequence of introducing structurally modified FVIII molecules (rFVIII, EHL) to the market, as well as gene therapy for haemophilia A [4, 14].

### **The impact of FVIIIa mimetics on FVIII coagulation tests**

The most common test used worldwide for determining FVIII activity is the one-stage coagulation test based on aPTT measurement. This test is used to assess the coagulation activity of FVIII:C in the diagnosis, classification, and monitoring of replacement therapy for Haemophilia A. Due to the significant shortening of aPTT caused by Hemlibra® and Mim8, the FVIII:C activity in this test is falsely elevated [14]. The results of conducted studies suggest that the degree of overestimation of the FVIII:C result is to some extent dependent on the applied aPTT reagents, which differ from each other in the content of activator or phospholipids [4, 12]. For this reason, in patients using FVIIIa mimetics, the FVIII:C test is unreliable, and its performance is not recommended [8, 22, 25, 31].

It is worth noting that a certain modification of the FVIII:C test has found application in laboratory practice, involving the use of a specific calibrator for the drug. This has been validated for the emicizumab molecule, enabling quantitative determi-

nation of the drug concentration in the patient's plasma (see below) [12, 14].

### **Impact of FVIIIa mimetics on FVIII chromogenic assays**

To monitor FVIII activity in HA patients, a chromogenic test is also used, but this test is usually less available and its use is limited to hemophilia treatment centers [14]. Studies conducted to date have shown that due to the false overestimation of FVIII in the coagulation test, the chromogenic test should be used to monitor FVIII replacement therapy in patients using FVIIIa mimetics (emicizumab, Mim8) [9, 10, 14, 15, 25]. Commercially available chromogenic assays differ in the source of the coagulation response activating agents: FIXa and FX, which can be of human (h, human) or bovine (b, bovine) origin [4]. Since FVIIIa mimetics bind only human FIXa and FX, chromogenic assays containing bovine-derived FIXa and FX do not present interference and aPTT shortening, as this bispecific molecule does not interact with them [4, 12, 21]. That's why, according to current recommendations, patients treated with emicizumab should have infused FVIII activity using a chromogenic test with reagents of bovine origin [e.g., Coamatic FVIII test (Chromogenix), Coatest SP (Chromogenix), or FVIII Chromogenic FVIII (Siemens)], Electrachrome FVIII (IL Werfen), TriniCHROM FVIII:C (Stago) [4, 8, 9, 14, 22, 25]. When using hybrid laboratory kits containing bFX and hFIX [e.g., Technochrome FVIII:C (Technoclone), Rossix FVIII (Rossix), BIOPHEN FVIII:C (Hyphen-Biomed)], initial validation and local verification of the reliability of FVIII assays is recommended [4, 8, 9, 15, 25].

It is important to note that chromogenic tests containing hFIXa and hFX are sensitive to the presence of FVIIIa mimetics in a concentration-dependent manner. However, they are not specific solely to the medication, as they also measure the presence of endogenous or infused FVIII in the tested plasma [10, 12, 14, 32].

### **Effect of FVIIIa mimetics on the determination of FVIII inhibitor (anti-hFVIII)**

In any patient with HA complicated by an inhibitor, regular monitoring of FVIII inhibitor titer (concentration) is recommended as part of routine care [14]. This requirement also applies to the group of patients treated with prophylactic FVIIIa mimetics with a positive history of the inhibitor.

Determination of inhibitor titers (antibodies) to human FVIII (anti-hFVIII) in the laboratory is most often performed, as recommended, using the Bethesda test with Nijmegen modification (NBA, Nijmegen Bethesda Assay) [4, 25]. This test is a multi-step test that, among other things, includes measurement of residual FVIII activity performed routinely by a single-step coagulation method [8, 14]. Because it is dependent on the measurement of aPTT, the result of the FVIII inhibitor titer in this case is also unreliable, as it indicates the false absence or significantly reduced content of FVIII [12, 14, 20]. The initial laboratory procedure, in the form of heating the test plasma sample at 56°C before performing the Bethesda test, does not eliminate drug interference [4, 8, 12, 14]. Therefore, in order to determine the FVIII inhibitor titer in a patient receiving an FVIIIa mimetic, chromogenic measurement using bovine reagents should be used to assess residual FVIII activity in the Bethesda test [8–10, 25, 31]. According to expert recommendations, it is believed that appropriate tests for monitoring FVIII inhibitor should be available in every HA center, including a modification with chromogenic measurement of FVIII with bovine FXa [22, 25]. Importantly, in practice, to ensure consistency in FVIII inhibitor diagnosis, it is recommended that FVIII inhibitor titers be determined prior to initiation of therapy with Hemilibra® using the same chromogenic assay that will be used during emicizumab therapy [8, 9, 26].

### **Measurement of drug concentration in plasma**

As mentioned above, routine determination of FVIIIa mimetic concentration for the purpose of dose adjustment is not considered necessary, but this test can be very useful in some situations (eg. when anti-drug antibodies are suspected) [3, 8, 9]. Moreover, currently experts recommend that tests that also monitor emicizumab concentration should be available in hemophilia treatment centers [14, 22, 25]. In addition, German recommendations published in 2020 specified the frequency of monitoring emicizumab concentrations 1 week after the last saturating dose, then every 3 months for a year, and successively every 6 to 12 months or in the absence of efficacy [22, 31]. Currently, most data are available in the literature for emicizumab, but it can be assumed that the principles of measuring the concentration of each FVIII mimetic will be performed in an analogous manner.

For the determination of FVIII mimetics, a modified assay based on the measurement of FVIII activity by single-step coagulation in diluted patient plasma against a drug-specific calibrator is most commonly used (mainly for emicizumab) [8, 9, 12, 14, 25, 31]. At the moment, a calibrator for emicizumab is commercially available, manufactured in a kit with assay controls (R2 Diagnostics, Enzyme Research Laboratories, <https://r2diagnostics.com/>), which contains 100 µg/mL of emicizumab and can be used on various analyzer platforms [8, 12, 13]. Studies conducted to date have used a portion of the drug, with an appropriately adjusted concentration, as reference material when determining Mim8 concentration [15]. When measuring emicizumab concentrations, a higher sample dilution was used compared to the one-step FVIII assay (pre-dilution of the sample in the analyzer 1:8), which allows measuring the range of emicizumab (10–100 µg) in the plasma sample [4, 12]. Emicizumab concentrations obtained with the modified one-step FVIII assay have been shown to correlate significantly with concentrations determined with the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) previously used in HAVEN clinical trials. In addition, verification of the method with locally used reagents is recommended in each laboratory; studies have shown satisfactory reproducibility of the test despite the use of different measurement systems (APTT reagents, FVIII-deficient plasma and analyzers) [8, 13]. For the determination of drug concentration, it is also possible to use the chromogenic method to measure FVIII with reference to the calibrator described above [8, 12, 22, 24]. When interpreting the result of emicizumab concentration measurements, it should be taken into account that the possible concomitant use of FVIII concentrate and/or inhibitor bypass preparations may overestimate the drug concentration [20]. When it becomes necessary to determine the concentration of emicizumab in plasma in the presence of FVIII, thermal inactivation of the plasma sample may be considered [4].

Currently, for patients with suspected anti-emicizumab neutralizing antibodies, the World Federation of Hemophilia (WFH) recommends measuring emicizumab levels using a modified one-step assay that includes the aforementioned additional step of pre-diluting the test plasma and calibrating the assay using specific emicizumab calibrators [25]. Validated assays that directly measure the presence of anti-drug antibodies may also be used for this purpose, if available.

**Table 3.** Summary of the application of selected haemostasis tests in the presence of FVIIIa mimetic (modified from [8, 9, 12, 14, 25])

Purpose of the study	Laboratory test
Presence of the drug	Chromogenic test for measurement of FVIII with factors of human origin (hFIXa and hFX) Measurement of drug concentration using a modified coagulation test for FVIII calibrated against a specific calibrator
FVIII activity after infusion	Chromogenic test for measuring FVIII with bovine FXa (bFX) and bovine/human FIXa (bFIXa/hFIXa)
Inhibitor against FVIII	Bethesda assay with chromogenic measurement of FVIII using bovine FXa (bFX) and bovine/human FIXa (bFIXa/hFIXa)
Drug concentration	Modified coagulation assay for measuring FVIII calibrated against a specific calibrator Infusion of FVIII concentrate increases the result
ADA	No direct test Prolongation of aPTT may indicate the presence of ADA (Anti-Drug Antibody) Modified coagulation assay for measuring the drug concentration of FVIII

h — human; b — bovine, FIXa — activated factor IX; FX — factor X

### Measurement of anti-drug antibodies (anti-emicizumab)

It is worth noting that with any drug therapy, there is a small risk of developing anti-drug antibodies (ADA). The suspicion of ADA formation arises when a patient's rate of breakthrough bleeding increases and aPTT prolongs. The use of emicizumab was associated with the development of ADA in 5.1% of patients (34/668) who participated in HAVEN clinical trials 1–4 [3]. In most of these patients, no significant change in plasma emicizumab levels or increase in bleeding incidence was observed, and antibodies neutralizing the drug were detected in < 1% of cases [3, 8]. Moreover, the appearance of ADA does not affect the efficacy of FVIII replacement therapy or inhibitor bypass therapy [3]. Since no commercially available laboratory kits for direct detection of ADA have been developed to date, determination of the drug concentration in the patient's blood is recommended when antibodies to emicizumab are suspected [8, 9, 14, 22].

A summary of the use of the laboratory tests discussed above for monitoring FVIIIa mimetics is summarized in Table 3.

### Measurement of thrombin generation

To date, the role of global tests assessing hemostasis, including measurement of thrombin generation, in monitoring patients using FVIIIa mimetics has not been established [8, 9]. Despite the fact that the thrombin generation assay (TGA, throm-

bin generation assay) is not a routinely used test of hemostasis in clinical practice, mainly due to difficulties in interpretation, low reproducibility and low availability, its usefulness with regard to assessing the hemostatic potential of FVIIIa mimetics, especially emicizumab, has been reported more than once in the literature. Attempts to use this assay to assess thrombin generation in patient-derived or in vitro-prepared samples in a model with combined treatment of FVIII, rVIIa and aPCC appear to be particularly interesting [3, 24, 33]. The main idea of these studies is to analyze in vitro the effect of BPA therapy (by-passing agents therapy) in a patient treated with FVIIIa mimetics, prior to their administration to the patient. There are also attempts to use TGA for perioperative bleeding control to minimize the potential risk of thrombotic events [20].

### Summary

The introduction of non-substitutive therapy with long-acting, subcutaneous FVIIIa mimetics into the treatment of hemophilia A represents a significant advancement in the treatment of this group of patients. The use of these modern molecules in HA patients and their novel mode of action require ongoing education of medical personnel, including laboratory personnel, for awareness of the impact of new-generation drugs on laboratory tests of hemostasis is a key component of the diagnostic process. The availability of appropriate laboratory tests and the continuous improvement of knowledge regarding new-generation drugs is

particularly important in hemophilia centers, as in the future mimetic therapy is likely to become the dominant paradigm in HA treatment. Monitoring these novel HA treatment options may therefore require ongoing adaptation of appropriate tests to provide clinicians with reliable results. In addition, it is not unlikely that FVIIIa mimetics will also find application in the prophylactic treatment of bleeding in von Willebrand's disease and acquired hemophilia A (an indication for emicizumab in clinical trials) [3, 7].

### Conflict of interest

EO — participated in clinical trials and received remuneration for lectures given by following companies: Baxalta, Baxter, Shire, Takeda, Novo Nordisk, Roche, SOBI, Siemens, Werfen

### References

- Lewandowska M, Nasr S, Shapiro AD. Therapeutic and technological advancements in haemophilia care: Quantum leaps forward. *Haemophilia*. 2022; 28 Suppl 4: 77–92, doi: 10.1111/hae.14531, indexed in Pubmed: 35521732.
- Windyga J, Chojnowski K, Klukowska A, et al. Część I: Wytyczne postępowania w hemofilii A i B niepowikłanej inhibitorem czynnika VIII i IX (wydanie zaktualizowane). *Acta Haematologica Polonica*. 2016; 47(2): 86–114, doi: 10.1016/j.achaem.2016.04.009.
- Alcedo Andrade PE, Mannucci PM, Kessler CM. Emicizumab: the hemophilia A game changer. *Haematologica*. 2023 [Epub ahead of print], doi: 10.3324/haematol.2022.282099, indexed in Pubmed: 37916312.
- Müller J, Miesbach W, Prüller F, et al. Standing Commission Labor (STAEKOLA) of the Society of Thrombosis and Haemostasis Research (GTH). An Update on Laboratory Diagnostics in Haemophilia A and B. *Hamostaseologie*. 2022; 42(4): 248–260, doi: 10.1055/a-1665-6232, indexed in Pubmed: 35104901.
- Windyga J, Chojnowski K, Klukowska A, et al. Część I: Wytyczne postępowania w hemofilii A i B niepowikłanej inhibitorem czynnika VIII i IX (wydanie zaktualizowane). *Acta Haematol Pol*. 2016; 47(2): 86–114, doi: 10.1016/j.achaem.2016.04.009.
- Persson P, Amstrup AB, Coester HV, et al. Mim8, a novel factor VIIIa mimetic bispecific antibody, shows favorable safety and pharmacokinetics in healthy adults. *Res Pract Thromb Haemost*. 2023; 7(6): 102181, doi: 10.1016/j.rpth.2023.102181, indexed in Pubmed: 37745159.
- Ozelo MC, Yamaguti-Hayakawa GG. Impact of novel hemophilia therapies around the world. *Res Pract Thromb Haemost*. 2022; 6(3): e12695, doi: 10.1002/rth2.12695, indexed in Pubmed: 35434467.
- Jenkins PV, Bowyer A, Burgess C, et al. Laboratory coagulation tests and emicizumab treatment A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation guideline. *Haemophilia*. 2020; 26(1): 151–155, doi: 10.1111/hae.13903, indexed in Pubmed: 31859415.
- Windyga J, Chojnowski K, Klukowska A, et al. Emicizumab (Hemlibra®) in hemophilia A patients with inhibitors against factor VIII — guidelines of the Group for Haemostasis of the Polish Society of Haematology and Transfusion Medicine. *J Transf Med*. 2020; 13(3): 165–175, doi: 10.5603/jtm.2020.0006.
- Lippi G, Favaloro EJ. Emicizumab (ACE910): Clinical background and laboratory assessment of hemophilia A. *Adv Clin Chem*. 2019; 88: 151–167, doi: 10.1016/bs.acc.2018.10.003, indexed in Pubmed: 30612605.
- Ellsworth P, Ma A. Factor-mimetic and rebalancing therapies in hemophilia A and B: the end of factor concentrates? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2021; 2021(1): 219–225, doi: 10.1182/hematology.2021000253, indexed in Pubmed: 34889356.
- Peyvandi F, Kenet G, Pekrul I, et al. Laboratory testing in hemophilia: Impact of factor and non-factor replacement therapy on coagulation assays. *J Thromb Haemost*. 2020; 18(6): 1242–1255, doi: 10.1111/jth.14784, indexed in Pubmed: 32115865.
- Lowe A, Kitchen S, Jennings I, et al. Effects of Emicizumab on APTT, FVIII assays and FVIII Inhibitor assays using different reagents: Results of a UK NEQAS proficiency testing exercise. *Haemophilia*. 2020; 26(6): 1087–1091, doi: 10.1111/hae.14177, indexed in Pubmed: 33094895.
- Bowyer AE, Lowe AE, Tiefenbacher S. Laboratory issues in gene therapy and emicizumab. *Haemophilia*. 2021; 27 Suppl 3: 142–147, doi: 10.1111/hae.13976, indexed in Pubmed: 32469128.
- Bowyer AE, Kitchen S, Ezban M. The effect of a next generation factor VIII mimetic bispecific antibody (Mim8) on assays of factor VIII activity and thrombin generation. *J Thromb Haemost*. 2023; 21(3): 480–487, doi: 10.1016/j.jtha.2022.12.023, indexed in Pubmed: 36696203.
- Lauritzen B, Bjelke M, Björkdahl O, et al. A novel next-generation FVIIIa mimetic, Mim8, has a favorable safety profile and displays potent pharmacodynamic effects: Results from safety studies in cynomolgus monkeys. *J Thromb Haemost*. 2022; 20(6): 1312–1324, doi: 10.1111/jth.15682, indexed in Pubmed: 35191180.
- Østergaard H, Lund J, Greisen PJ, et al. A factor VIIIa-mimetic bispecific antibody, Mim8, ameliorates bleeding upon severe vascular challenge in hemophilia A mice. *Blood*. 2021; 138(14): 1258–1268, doi: 10.1182/blood.2020010331, indexed in Pubmed: 34077951.
- Yamaguchi K, Soeda T, Sato M, et al. Pharmacology and Pharmacokinetics of NXT007; Emicizumab-Based Engineered Fixa/Fx Bispecific Antibody with Improved Properties. *Blood*. 2020; 136(Supplement 1): 19–19, doi: 10.1182/blood-2020-138958.
- Teranishi-Ikawa Y, Soeda T, Koga H, et al. A bispecific antibody NXT007 exerts a hemostatic activity in hemophilia A monkeys enough to keep a nonhemophilic state. *J Thromb Haemost*. 2023 [Epub ahead of print], doi: 10.1016/j.jtha.2023.09.034, indexed in Pubmed: 37940048.
- López-Jaime FJ, Benítez O, Díaz Jordán BL, et al. Expert opinion paper on the treatment of hemophilia a with emicizumab. *Hematology*. 2023; 28(1): 2166334, doi: 10.1080/16078454.2023.2166334, indexed in Pubmed: 36636993.
- Tripodi A, Chantarangkul V, Novembrino C, et al. Advances in the Treatment of Hemophilia: Implications for Laboratory Testing. *Clin Chem*. 2019; 65(2): 254–262, doi: 10.1373/clinchem.2017.284356, indexed in Pubmed: 30282700.
- Holstein K, Albisetti M, Bidlingmaier C, et al. 'Ständige Kommission Hämophilie' (Haemophilia board) of the German, Swiss Austrian Society for Thrombosis Haemostasis Research (GTH). Practical Guidance of the GTH Haemophilia Board on the Use of Emicizumab in Patients with Haemophilia A. *Hamostaseolo-*

- gie. 2020; 40(5): 561–571, doi: 10.1055/a-1127-6476, indexed in Pubmed: 32588417.
23. Müller J, Miesbach W, Prüller F, et al. Standing Commission Labor (STAEKOLA) of the Society of Thrombosis and Haemostasis Research (GTH). An Update on Laboratory Diagnostics in Haemophilia A and B. *Hamostaseologie*. 2022; 42(4): 248–260, doi: 10.1055/a-1665-6232, indexed in Pubmed: 35104901.
  24. Lenting PJ. Laboratory monitoring of hemophilia A treatments: new challenges. *Blood Adv*. 2020; 4(9): 2111–2118, doi: 10.1182/bloodadvances.2019000849, indexed in Pubmed: 32396619.
  25. Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, et al. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia panelists and co-authors. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia*. 2020; 26 Suppl 6: 1–158, doi: 10.1111/hae.14046, indexed in Pubmed: 32744769.
  26. Castaman G, Santoro C, Coppola A, et al. ad hoc Working Group. Emergency management in patients with haemophilia A and inhibitors on prophylaxis with emicizumab: AICE practical guidance in collaboration with SIBioC, SIMEU, SIMEUP, SIPMeL and Siset. *Blood Transfus*. 2020; 18(2): 143–151, doi: 10.2450/2019.0186-19, indexed in Pubmed: 31657709.
  27. Bowyer AE, Hickey K, Kitchen S, et al. A next generation FVIII mimetic bispecific antibody, Mim8, the impact on non-factor VIII related haemostasis assays. *Haemophilia*. 2023; 29(6): 1633–1637, doi: 10.1111/hae.14884, indexed in Pubmed: 37824563.
  28. Adamkewicz JI, Chen DC, Paz-Priel I. Effects and Interferences of Emicizumab, a Humanised Bispecific Antibody Mimicking Activated Factor VIII Cofactor Function, on Coagulation Assays. *Thromb Haemost*. 2019; 119(7): 1084–1093, doi: 10.1055/s-0039-1688687, indexed in Pubmed: 31064025.
  29. Nougier C, Jeanpierre E, Ternisien C, et al. With contributions from the Working Group on Biology of Haemorrhagic Disorders (BIMHO, Under the Aegis of GFHT). Emicizumab treatment: Impact on coagulation tests and biological monitoring of haemostasis according to clinical situations (BIMHO group proposals). *Eur J Haematol*. 2020; 105(6): 675–681, doi: 10.1111/ejh.13490, indexed in Pubmed: 32668090.
  30. Bowyer AE, Maclean RM, Kitchen S. The combination of emicizumab and recombinant factor VIII in plasma: Which assays can we use for accurate measurement? *Int J Lab Haematol*. 2023; 45(3): 368–376, doi: 10.1111/ijlh.14021, indexed in Pubmed: 36710421.
  31. Escuriola-Ettingshausen C, Auerswald G, Königs C, et al. Optimizing the management of patients with haemophilia A and inhibitors in the era of emicizumab: Recommendations from a German expert panel. *Haemophilia*. 2021; 27(3): e305–e313, doi: 10.1111/hae.14010, indexed in Pubmed: 32937002.
  32. Bowyer A, Kitchen S, Maclean R. Effects of emicizumab on APTT, one-stage and chromogenic assays of factor VIII in artificially spiked plasma and in samples from haemophilia A patients with inhibitors. *Haemophilia*. 2020; 26(3): 536–542, doi: 10.1111/hae.13990, indexed in Pubmed: 32249990.
  33. Lund J, Jensen K, Burnier L, et al. In vitro effects of combining Mim8 with factor VIII, FVIIa, and activated prothrombin complex concentrates in thrombin generation assays. *J Thromb Haemost*. 2023; 21(6): 1493–1502, doi: 10.1016/j.jth.2023.03.007, indexed in Pubmed: 37037699.

# Mimetyki czynnika VIII (FVIIIa) i ich wpływ na testy laboratoryjne hemostazy

Edyta Odnoczko 

Pracownia Genetyki Hemostazy i Porfirii, Zakład Hemostazy i Chorób Metabolicznych,  
Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

Artykuł jest tłumaczeniem pracy:

Odnoczko E. Mimetics of active factor VIII (FVIIIa) and their impact on laboratory tests of haemostasis. *J Transf Med* 2023; 16 (4): 260–268. DOI: 10.5603/jtm.99303. Należy cytować wersję pierwotną.

## Streszczenie

*Wprowadzenie do leczenia hemofilii A długodziałających, podskórnie podawanych mimetyków naśladujących aktywny czynnik VIII (FVIIIa) jest bez wątpienia przełomem w leczeniu profilaktycznym tej grupy chorych. Nowatorski charakter i sposób działania cząsteczek mimetyków FVIIIa wiąże się ze znaczącymi implikacjami w dotychczasowych algorytmach laboratoryjnych monitorowania leczenia hemofilii. Monitorowanie stężenia leku w celu dostosowania dawki nie jest wymagane, jednak w praktyce klinicznej kontrolowanie laboratoryjne hemostazy może być przydatne na przykład w przypadku konieczności przeprowadzenia interwencji chirurgicznej lub wystąpienia krwawień mimo stosowanej profilaktyki. Wówczas świadomość wpływu stosowania terapii mimetykami FVIIIa na testy laboratoryjne hemostazy jest warunkiem koniecznym do sprawnego posługiwania się nimi i interpretowania uzyskanych wyników.*

**Słowa kluczowe:** hemofilia A; testy hemostazy; czynnik VIII; mimetyki FVIII; emicizumab; mim8

*J. Transf. Med.* 2023; 16: 269–277

## Wstęp

Hemofilia A (HA, *hemophilia A*) to jedna z najlepiej poznanych wrodzonych osoczowych skaz krwotocznych. U jej podłoża leży brak lub upośledzenie syntezy osoczowego czynnika krzepnięcia VIII (FVIII, *factor VIII*). Jest to genetycznie uwarunkowana choroba monogenowa, dziedziczona w sposób recesywny sprzężony z płcią, co sprawia, że niedobór FVIII i towarzysząca temu skaza krwotoczna objawia się głównie u mężczyzn, natomiast kobiety są nosicielkami zmutowanego wariantu genu kodującego FVIII (F8, Xq28) [1].

Jak wspomniano, choroba ta objawia się nadmierną skłonnością do krwawień, zaś ich nasilenie w dużej mierze jest podyktowane stopniem niedoboru FVIII. Hemofilię A rozpoznaje się na podstawie wyników pomiaru aktywności FVIII w osoczu. W zależności od stopnia niedoboru FVIII wyróżnia się 3 postacie HA:

- ciężką, gdy FVIII wynosi mniej niż jedna jednostka międzynarodowa (IU, *International Unit*)/dl;
- umiarkowaną, gdy FVIII mieści się w przedziale 1–5 IU/dl;
- łagodną, gdy FVIII wynosi > 5–50 IU/dl [1].

**Adres do korespondencji:** dr n. med. Edyta Odnoczko, Pracownia Genetyki Hemostazy i Porfirii, Zakład Hemostazy i Chorób Metabolicznych Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie, ul. I. Gandhi 14, 02–776 Warszawa, e-mail: eodnoczko@ihit.waw.pl

Nadesłano: 21.11.2023

Przyjęto do druku: 21.12.2023

Data pierwszej publikacji: 31.12.2023

Artykuł jest dostępny bezpłatnie na podstawie licencji Creative Commons Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) umożliwiającej jego pobranie oraz udostępnianie pod warunkiem wskazania autorstwa i wydawcy. Niedopuszczalne jest wprowadzanie jakichkolwiek zmian lub wykorzystanie komercyjne bez zgody wydawcy.

**Tabela 1.** Bispecyficzne przeciwciała naśladujące FVIIIa stosowane w hemofilii A z inhibitorem lub bez (zmodyfikowano za: [1])

Mimetyk FVIIIa	Droga podania	Dawkowanie leku	Zastosowanie/badania kliniczne
Emicizumab	Podskórnie	1 × na tydzień, 1 × co 2 tygodnie lub 1 × co 4 tygodnie	Zatwierdzone przez FDA i EMA Dorośli, młodzież i dzieci z ciężką, umiarkowaną hemofilią A, z inhibitorem lub bez
Mim8	Podskórnie	1 × na tydzień lub 1 × na miesiąc	Badanie kliniczne fazy III: FRONTIER 4/5

FDA (*Food and Drug Administration*) — Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków; EMA (*European Medicines Agency*) — Europejska Agencja Leków

Hemofilia A jest zagrażającą życiu szką krwotoczną, w której ciężka postać choroby (FVIII < 1 IU/dl) objawia się samoistnymi krwawieniami, głównie do stawów i mięśni, a ich początek przypada zazwyczaj na 2–3 rok życia [2]. Podstawą leczenia ciężkiej HA jest stosowanie koncentratów niedoborowego czynnika krzepnięcia krwi (tzw. terapia substytucyjna). Zarówno leczenie aktywnych krwawień oraz długoterminowa profilaktyka krwawień w tej grupie chorych polega na wykonywaniu dożylnych wstrzyknięć koncentratu FVIII, których liczba w przypadku regularnego ich wykonywania może sięgnąć ponad 150 w ciągu roku. Ponadto najpoważniejszym powikłaniem terapii substytucyjnej (dotyczy ok. 20–40% chorych z ciężką i 3–13% z nieciężką HA) jest występowanie alloprzeciwciał neutralizujących aktywność FVIII (tzw. inhibitora FVIII), wskutek czego profilaktyka i hamowanie krwawień w tej grupie chorych nie poddają się leczeniu substytucyjnemu FVIII [3–5]. Dodatkowo obciążenie chorego koniecznością 3–4-krotnego cotygodniowego podania koncentratu FVIII może prowadzić do zmiennego przestrzegania zaleceń klinicysty i gorszych wyników leczenia [6]. Należy także dodać, iż w konsekwencji suboptymalne leczenie HA może prowadzić do zwiększonej liczby powikłań, takich jak nawracające krwawienia do stawów, artropatia hemofilowa i obniżona jakość życia [6].

Z powyższych względów w ciągu ostatnich kilku lat nastąpił znaczny postęp w zakresie innowacyjnych metod leczenia hemofilii, wśród których przełomowe jest opracowanie i wprowadzenie do leczenia profilaktycznego HA cząsteczek naśladujących aktywny FVIII, tzw. mimetyków FVIIIa (*mimetisc FVIIIa*) [1, 7] (tab. 1). Pojawienie się tego rodzaju nowatorskich przeciwciał monoklonalnych zrewolucjonizowało sposób leczenia HA, poszerzając możliwości terapeutyczne tej szki krwotocznej o tak zwaną terapię niesubstytucyjną (*non-replacement therapy*) [7]. Leki te charakteryzuje przede wszystkim długi okres działania, brak neutralizacji przez inhibitor FVIII oraz podskórna

droga ich podawania, co istotnie podnosi jakość życia chorych na HA i skuteczność leczenia profilaktycznego [7].

Pierwszym, wprowadzonym do profilaktycznego leczenia krwawień w HA mimetykiem FVIIIa jest emicizumab (Hemlibra®, Roche Szwajcaria) [3, 6]. To lek będący humanizowaną, bispecyficzną, monoklonalną immunoglobuliną G4 (IgG4), która by przywrócić prawidłowy przebieg hemostazy, zastępuje FVIIIa w kompleksie tenazy, wiążąc ludzkie czynniki krzepnięcia IXa i X [8–11]. Emicizumab jest przeciwciałem, które nie wykazuje podobieństwa strukturalnego do FVIII, co sprawia, że nie jest on neutralizowany przez alloprzeciwciała (inhibitor) wobec FVIII [9, 12]. W listopadzie 2017 roku Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (FDA, *Food and Drug Administration*), a następnie w lutym 2018 roku Europejska Agencja Leków (EMA, *European Medicines Agency*) zatwierdziły stosowanie emicizumabu u pacjentów z HA powikłaną inhibitorem FVIII, natomiast w kolejnych latach jego stosowanie w profilaktyce u pacjentów z ciężką i umiarkowaną HA bez inhibitora, ponieważ wykazano znaczne zmniejszenie częstości krwawień także w tej grupie pacjentów [1, 3, 10, 13, 14]. Bardzo szybko uznano emicizumab za lek sygnalizujący nową erę leczenia HA, gdyż we wszystkich badaniach klinicznych III fazy profilaktyka emicizumabem doprowadziła do spektakularnego zmniejszenia częstości krwawień w ujęciu rocznym (ABR, *annualized bleeding rate*), przy medianie ABR wynoszącej 2,6 dla wszystkich schematów dawkowania u pacjentów w badaniach HAVEN od 1 do 4, a u ponad 80% uczestników nie wystąpiło żadne krwawienie po 24. tygodniu terapii [11]. Emicizumab cechuje się wydłużonym okresem półtrwania w krwiobiegu (4–5 tygodni), co pozwala na dawkowanie tego leku raz na tydzień, 2 lub 4 tygodnie, w porównaniu z konwencjonalną terapią substytucyjną [3, 8]. Drugą nieocenioną korzyścią stosowania Hemlibra® u chorych na HA jest, w przeciwieństwie do stosowania standardowych koncentratów FVIII, podskórna droga jego



podania i związany z tym wzrost komfortu i jakości życia tej grupy pacjentów. Z powyższych powodów, lecz przede wszystkim ze względu na jego skuteczność w hamowaniu krwawień, stosowanie emicizumabu szybko rośnie na całym świecie. Lek ten obecnie jest dopuszczony do użytku klinicznego w wielu krajach, przy czym w Polsce na dzień 06.01.2024 roku może być zastosowany jedynie u pacjentów z ciężką HA powikłaną inhibitorem i w wyjątkowych przypadkach u pacjentów z ciężką postacią hemofilii A bez inhibitora.

Poszukiwania idealnego sposobu leczenia HA i pomyślny rozwój terapii mimetycznej FVIIIa z wykorzystaniem emicizumabu stał się napędem do opracowania kolejnych bispecyficznych przeciwciał nowej generacji opartych na tym koncepcie działania i przeznaczonych do podskórnego profilaktycznego leczenia HA z inhibitorami i bez nich. W literaturze w 2021 roku pojawiły się doniesienia dotyczące opracowania przez Novo Nordisk cząsteczki o nazwie denecimig (Mim8), będącej ludzkim, bispecyficznym przeciwciałem nowej generacji, które podobnie jak emicizumab naśladuje działanie FVIIIa, tworząc kompleks z FX i FIXa na fosfolipidowej powierzchni aktywowanych płytek krwi w celu przyspieszenia aktywacji FX [4, 7, 11, 15, 16]. Dane z badań *in vitro* z użyciem ludzkiej krwi, jak również zwierzęcych modeli HA, wskazują, że Mim8 około 15-krotnie zwiększa wytwarzanie trombin w porównaniu z analogiem emicizumabu [6, 15–17]. To, co różni Mim8 od emicizumabu, to skonstruowanie monowalentnego ramienia anty-FIXa, które silniej stymuluje aktywność proteolityczną FIXa w celu aktywacji FX [6, 15]. Lek ten przeznaczony jest do podskórnego profilaktycznego leczenia pacjentów z HA z inhibitorami lub bez, a jego skuteczność, bezpieczeństwo, farmakokinetyka i farmakodynamika aktualnie oceniana jest w badaniach klinicznych. Bieżące dane z badań klinicznych wykazały, że czas półtrwania ( $t_{1/2}$ ) Mim8 wynosił około 30 dni, co potwierdza możliwość dawkowania leku raz na tydzień lub raz na miesiąc [1, 6].

Inne bispecyficzne mimetyki FVIII nowej generacji, będące w opracowywaniu, to NXT007 (Chugai Pharmaceutical Co, Roche) oraz BS-027125 (Biovenerativ, Sanofi), znajdujące się obecnie w fazie oceny przedklinicznej [1, 3, 7, 11, 18, 19].

Opublikowane dotychczas dane kliniczne wskazują, że schemat leczenia mimetykami FVIIIa zapewnia osiągnięcie stabilnej i trwałej odpowiedzi, dlatego monitorowanie leku w celu dostosowania dawki nie jest wymagane. Stosowanie leku zgodnie z ustalonym schematem zapewnia osiągnięcie po-

żądanego stężenia leku i jego pozostawanie w krążeniu nawet przez kilka miesięcy po wstrzyknięciu ostatniej dawki [14]. Sytuacje kliniczne, w których aktualnie eksperci zgadzają się, że monitorowanie laboratoryjne i kontrolowanie hemostazy mogą być przydatne, to: zabiegi chirurgiczne, krwawienia przebijające mimo stosowanej profilaktyki, krwawienia w następstwie urazów oraz weryfikacja skuteczności prowadzonego leczenia [10, 20, 21].

Należy podkreślić, że nowatorski charakter i sposób działania cząsteczek mimetyków FVIIIa niesie ze sobą znaczące implikacje w dotychczasowe algorytmy laboratoryjnego monitorowania leczenia hemofilii. Okres półtrwania cząsteczki mimetyku, na przykład emicizumabu, wynosi 4–5 tygodni, co sprawia, że terapia ta może wpływać na wyniki badań laboratoryjnych przez okres do 6 miesięcy po podaniu [12, 22]. Świadomość wpływu stosowania wspomnianej powyżej terapii mimetycznej na testy laboratoryjne hemostazy jest warunkiem niezbędnym do sprawnego posługiwania się nimi i właściwego interpretowania ich wyników. W niniejszym artykule omówiono wpływ działania leków będących mimetykami FVIIIa na poszczególne testy hemostazy, ze szczególnym uwzględnieniem monitorowania skojarzonej terapii substytucyjnej koncentratami FVIII.

### **Wpływ mimetyków FVIIIa na testy podstawowe i specjalistyczne hemostazy**

Jak wspomniano, omawiane mimetyki to cząsteczki naśladujące aktywowany FVIII, które w odróżnieniu od białka FVIII, nie wymagają aktywacji ze sprzężeniem zwrotnym za pośrednictwem trombin [12, 23, 24]. Ta cecha cząsteczek mimetyków istotnie wpływa przede wszystkim na rutynowy test hemostazy, jakim jest czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (aPTT, *activated partial thromboplastin time*) oraz wszystkie testy jemu pochodne (tab. 2) [8, 12, 14–16, 20]. Test aPTT ulega bowiem nadmiernemu skróceniu w różnym stopniu zależnie od stosowanego odczynnika, zwykle poniżej prawidłowego zakresu referencyjnego [8, 13, 14, 25]. Co ważne, ze względu na to, iż mimetyki FVIIIa są lekami długodziałającymi, skrócenie to występuje już po podaniu pierwszej dawki leku, nawet przy bardzo małych jego stężeniach i może się utrzymywać przez kilka miesięcy po odstawieniu leczenia [12, 14, 22]. Dodatkowo warto zauważyć, że pomiar aPTT u pacjenta leczonego mimetykami FVIIIa nie nadaje się do monitorowania tej terapii, ale jego wydłużenie może wskazywać na nieprzestrzeżenie przez pacjenta zaleceń lekarskich lub na

**Tabela 2.** Wpływ mimetyków FVIII na wyniki wybranych testów krzepnięcia (zmodyfikowano za: [8, 9, 22, 26, 27])

Rodzaj testu laboratoryjnego hemostazy	Wynik fałszywy	Wynik wiarygodny	Komentarz
<b>Testy rutynowe</b>			
aPTT	✓		Wynik fałszywie skrócony (nawet < 20 s) Efekt widoczny już przy minimalnym stężeniu leku (> 5 µg/ml)
Test korekcji aPTT	✓		Wynik fałszywie ujemny
PT		✓	Wynik prawidłowy lub nieznacznie wydłużony
Fibrynogen (metoda Claussa)		✓	Brak wpływu
TT		✓	Brak wpływu
<b>Testy specjalistyczne</b>			
Oznaczenie aktywności FVIII testem koagulacyjnym jednostopniowym	✓		Wynik fałszywie zawyżony. Wartość od kilkuset do nawet kilku tysięcy IU/dl (%)
Oznaczenie aktywności FIX, FXI i FXII testem koagulacyjnym jednostopniowym	✓		Wynik fałszywie zawyżony. Pomiar oparty na aPTT
Oznaczenie aktywności FII, FV, FVII i FX testem koagulacyjnym jednostopniowym		✓	Brak wpływu Pomiar oparty na PT
Oznaczenie miana inhibitora wobec ludzkiego FVIII testem Bethesda z pomiarem FVIII metodą koagulacyjną	✓		Wynik fałszywie ujemny. Wskazuje na brak inhibitora
Oznaczenie aktywności FVIII testem chromogennym z użyciem odczynnika pochodzenia ludzkiego (FX, FIX)	✓		Wynik fałszywie zawyżony. Stanowi „surogat” działania leku u pacjenta bez leczenia FVIII
Oznaczenie aktywności FVIII testem chromogennym z użyciem odczynnika pochodzenia wołowego (FX)		✓	Brak wpływu
Oznaczenie miana inhibitora wobec ludzkiego FVIII testem Bethesda z pomiarem FVIII metodą chromogenną z użyciem odczynnika pochodzenia wołowego (FX)		✓	Brak wpływu
Oznaczenia testem immunologicznym (Elisa)		✓	Brak wpływu
Oznaczenie anty-Xa testem chromogennym		✓	Brak wpływu

aPTT (*activated partial thromboplastin time*) — czas częściowej tromboplastyny po aktywacji; PT (*prothrombin time*) — czas protrombinowy; TT (*thrombin time*) — czas trombinowy, FVIII (*factor VIII*) — czynnik VIII; FX (*factor X*) — czynnik X

wytworzenie tak zwanych przeciwciał przeciwlkowych (ADA, *anti-drug antibody*) [9, 13].

W przypadku pozostałych rutynowych testów hemostazy odnotowano klinicznie nieistotny wpływ emicizumabu i mim8 na pomiar czasu protrombinowego (PT, *prothrombin time*) zależnie od stosowanego odczynnika, a związane z nim oznaczenia czynników II, V, VII, X również pozostają bez

istotnych zmian [8, 9, 14, 22, 27, 28]. Pomiar czasu trombinowego (TT, *thrombin time*) oraz oznaczenie stężenia fibrynogenu metodą Claussa pozostają także bez istotnego klinicznie wpływu działania omawianego leku [8, 27].

Testy specjalistyczne oparte na pomiarze aPTT, służące między innymi badaniu aktywności czynników szlaku wewnątrzpochodnego układu

krzepnięcia VIII, IX, XI i XII, wykazują fałszywie podwyższoną wartość [14, 20, 25]. Efekt ten dotyczy także pomiaru aktywności białka C i S testem koagulacyjnym oraz testu odporności na aktywowane białko C (APCR), jeżeli są one wykonywane na podstawie pomiaru aPTT [8, 14, 22, 28, 29]. U wszystkich pacjentów z HA leczonych emicizumabem, którzy wymagają leczenia heparyną, do pomiaru stężenia leku należy stosować chromogenny test anty-Xa [8, 14]. Ponadto testy służące wykrywaniu inhibitorów FVIII, tj. test przesiewowy oparty na pomiarze aPTT mieszaniny osocza badanego z osoczem prawidłowym (tzw. test korekcji) oraz test Bethesda z pomiarem FVIII testem koagulacyjnym jednostopniowym wykazują fałszywie ujemny wynik [8, 14].

### **Wpływ mimetyków FVIIIa na oznaczenie FVIII w osoczu**

Na podstawie ogólnoswiatowych doświadczeń ze stosowania u pacjentów z HA emicizumabu, wiadomo, że długoterminowa profilaktyka krwawień z zastosowaniem tej grupy leków istotnie zmniejsza ryzyko ich występowania. Jednakże w przypadku konieczności leczenia krwawień zidentyfikowanych jako krwawienia przebijające, bądź będące skutkiem urazu lub też konieczności wykonania zabiegu inwazyjnego, lub wdrożenia ITI, może zaistnieć konieczność równoczesnego zastosowania mimetyku FVIIIa i koncentratu FVIII, a wówczas istotny jest właściwy dobór testów pozwalających na wiarygodne monitorowanie takiej terapii [8, 10, 14, 21]. Należy jednak podkreślić, że w zbiorczej analizie badania HAVEN 1–4 podczas stosowania profilaktyki emicizumabem krwawienia przełomowe, zarówno samoistne, jak i pourazowe, występowały bardzo rzadko [3].

W rozpoznawaniu i monitorowaniu leczenia HA są wykorzystywane dwie główne strategie pomiaru aktywności FVIII w osoczu: jednoetapowy test koagulacyjny (FVIII:C, *FVIII coagulation activity*) i test chromogenny [4, 21, 25]. Aktualnie w leczeniu HA dostępna jest dość szeroka gama osoczo pochodnych lub rekombinowanych (rFVIII, *recombinant factor VIII*) koncentratów czynnika VIII o standardowym (SHL, *standard half life*) lub przedłużonym okresie półtrwania (EHL, *extended half life*) [12, 30]. W literaturze już od lat są opisywane rozbieżności w wynikach aktywności FVIII mierzonej testem koagulacyjnym i chromogennym [4, 12, 25]. Początkowo dotyczyły one klasyfikacji nieciężkiej HA, potem zaś jako następstwo wprowadzania na rynek zmodyfikowanych strukturalnie

cząsteczek FVIII (rFVIII, EHL), a także terapii genowej HA [4, 14].

### **Wpływ mimetyków FVIIIa na testy koagulacyjne FVIII**

Najczęściej stosowanym na świecie testem do oznaczania aktywności FVIII jest test koagulacyjny jednostopniowy, oparty na pomiarze aPTT. Test ten służy badaniu aktywności koagulacyjnej FVIII:C w diagnostyce, klasyfikacji oraz monitorowaniu leczenia substytucyjnego HA. Z uwagi na to, że Hemlibra® i Mim8 powodują znaczne skrócenie aPTT, aktywność FVIII:C w tym teście jest fałszywie zawyżona [14]. Wyniki przeprowadzonych dotychczas badań sugerują, że stopień przeszacowania wyniku FVIII:C jest w pewnym stopniu zależny od zastosowanych odczynników aPTT, które różnią się między sobą zawartym aktywatorem lub fosfolipidami [4, 12]. Z tego powodu u pacjentów stosujących mimetyki FVIIIa test FVIII:C jest niemiarodajny i w tym przypadku nie zaleca się jego wykonywania [8, 22, 25, 31].

Warto nadmienić, że w praktyce laboratoryjnej znalazła zastosowanie pewna modyfikacja testu FVIII:C polegająca na zastosowaniu swoistego dla leku kalibratora. Ten zmodyfikowany test został zwalidowany dla cząsteczki emicizumabu, umożliwiając w ten sposób ilościowe określenie stężenia leku w osoczu pacjenta (patrz poniżej) [12, 14].

### **Wpływ mimetyków FVIIIa na testy chromogenne FVIII**

Do monitorowania aktywności FVIII u pacjentów z HA stosowany jest także test chromogenny, przy czym badanie to jest zwykle trudniej dostępne i ograniczone do ośrodków leczenia hemofilii [14]. Przeprowadzone dotychczas badania dowiodły, że z uwagi na fałszywie zawyżoną wartość FVIII w teście koagulacyjnym, do monitorowania terapii substytucyjnej FVIII u pacjentów stosujących mimetyki FVIIIa (emicizumab, Mim8) powinno się stosować test chromogenny [9, 10, 14, 15, 25]. Dostępne na rynku testy chromogenne różnią się między sobą źródłem wchodzących w jego skład czynników aktywujących reakcję krzepnięcia: FIXa i FX, które mogą być pochodzenia ludzkiego (*h, human*) lub wołowego (*b, bovine*) [4]. Ponieważ mimetyki FVIIIa wiążą tylko ludzkie FIXa i FX, w testach chromogennych zawierających FIXa i FX pochodzenia wołowego nie obserwuje się interferencji i skrócenia aPTT, gdyż ta bispecyficzna cząsteczka nie wchodzi z nimi w reakcję [4, 12, 21]. Dlatego właśnie, zgodnie z aktualnymi zaleceniami, u pacjentów leczonych emicizumabem

należy wykonywać pomiar aktywności infuzyjnego FVIII testem chromogennym z odczynnikami pochodzenia wołowego [np. zestawami Coamatic FVIII test (Chromogenix), Coatest SP (Chromogenix) lub FVIII Chromogenic FVIII (Siemens)], Electrachrome FVIII (IL Werfen), TriniCHROM FVIII:C (Stago) [4, 8, 9, 14, 22, 25]. W przypadku stosowania hybrydowych zestawów laboratoryjnych zawierających bFX i hFIXa [np. Technochrom FVIII:C (Technoclone), Rossix FVIII (Rossix), BIOPHEN FVIII:C (Hyphen-Biomed)] zaleca się wstępną walidację i lokalną weryfikację wiarygodności oznaczeń FVIII [4, 8, 9, 15, 25].

Warto pamiętać, że testy chromogenne, które zawierają hFIXa i hFX, są w sposób zależny od stężenia wrażliwe na obecność mimetyku FVIIIa, przy czym nie są one specyficzne tylko i wyłącznie dla leku, gdyż mierzą także obecność endogennego lub infuzyjnego FVIII w badanym osoczu [10, 12, 14, 32].

### Wpływ mimetyków FVIIIa na oznaczanie inhibitora FVIII (anty-hFVIII)

U każdego pacjenta z HA powikłaną inhibitorem w ramach rutynowej opieki zaleca się regularną kontrolę miana (stężenia) inhibitora FVIII [14]. Wymaganie to dotyczy także grupy pacjentów leczonych profilaktycznie mimetykami FVIIIa z pozytywnym wywiadem na obecność inhibitora. Oznaczenie miana inhibitora (przeciwciał) wobec ludzkiego FVIII (anty-hFVIII) w laboratorium najczęściej wykonuje się, zgodnie z rekomendacjami, z użyciem testu Bethesda w modyfikacji Nijmegen (NBA, *Nijmegen Bethesda Assay*) [4, 25]. Test ten jest testem wieloetapowym, który między innymi obejmuje pomiar aktywności resztkowej FVIII wykonywany rutynowo metodą koagulacyjną jedno-stopniową [8, 14]. Z uwagi na to, że jest on zależny od pomiaru aPTT, wynik miana inhibitora FVIII w tym przypadku także nie jest wiarygodny, gdyż wskazuje na fałszywą jego nieobecność lub znacznie zmniejszoną zawartość [12, 14, 20]. Wstępna procedura laboratoryjna, w postaci ogrzewania próbki osocza badanego w 56°C przed wykonaniem testu Bethesda, nie eliminuje interferencji leku [4, 8, 12, 14]. Dlatego też, aby określić miano inhibitora FVIII u pacjenta otrzymującego mimetyk FVIIIa, do oceny aktywności resztkowej FVIII w teście Bethesda należy wykorzystywać pomiar chromogenny z użyciem odczynników wołowych [8–10, 25, 31]. Zgodnie z zaleceniami ekspertów uważa się, że w każdym ośrodku leczenia HA powinny być dostępne odpowiednie testy do monitorowania in-

hibitora FVIII, w tym także modyfikacja z pomiarem chromogennym FVIII z wołowym FXa [22, 25]. Co ważne, w praktyce w celu zapewnienia spójności diagnostyki inhibitora FVIII rekomendowane jest oznaczenie miana inhibitora FVIII przed rozpoczęciem terapii lekiem Hemilibra® przy użyciu tego samego testu chromogennego, który będzie stosowany podczas terapii emicizumabem [8, 9, 26].

### Pomiar stężenia leku w osoczu

Jak wspomniano powyżej rutynowe oznaczanie stężenia mimetyku FVIIIa w celu dostosowania dawki nie jest uważane za konieczne, jednak badanie to w pewnych sytuacjach może być bardzo przydatne (m.in. w sytuacji podejrzenia wytworzenia przeciwciał przeciwleukowych) [3, 8, 9]. Co więcej aktualnie eksperci zalecają, aby w ośrodkach leczenia hemofilii dostępne były testy monitorujące także stężenie emicizumabu [14, 22, 25]. Ponadto w zaleceniach niemieckich opublikowanych w 2020 roku określono częstotliwość monitorowania stężenia emicizumabu po 1 tygodniu od ostatniej dawki nasycającej, następnie co 3 miesiące przez rok i kolejno co 6 do 12 miesięcy lub w przypadku braku skuteczności [22, 31]. Obecnie w literaturze dostępnych jest najwięcej danych dotyczących emicizumabu, można jednak założyć, że zasady wykonywania pomiaru stężenia każdego mimetyku FVIII będą wykonywane w analogiczny sposób.

W celu oznaczenia stężenia mimetyku FVIII najczęściej (głównie dla emicizumabu) korzysta się ze zmodyfikowanego testu opartego na pomiarze aktywności FVIII metodą koagulacyjną jedno-stopniową w rozcieńczonym osoczu pacjenta, w odniesieniu do swoistego dla leku kalibratora [8, 9, 12, 14, 25, 31]. Obecnie komercyjnie jest dostępny kalibrator dla emicizumabu, wyprodukowany w zestawie wraz z kontrolami testu (R2 Diagnostics, Enzyme Research Laboratories, <https://r2diagnostics.com/>), który zawiera 100 µg/ml emicizumabu i może być zastosowany na różnych platformach analizatorów [8, 12, 13]. W dotychczas przeprowadzonych badaniach przy oznaczeniach stężenia Mim8 wykorzystywano jako materiał referencyjny porcję leku, o odpowiednio dostosowanym stężeniu [15]. W przypadku pomiaru stężenia emicizumabu stosowano większe rozcieńczenie próbki w porównaniu z jednoetapowym testem FVIII (wstępne rozcieńczenie próbki w analizatorze 1:8), co umożliwia pomiar zakresu emicizumabu (10–100 µg) w badanej próbce osocza [4, 12]. Wykazano, że stężenia emicizumabu uzyskane za pomocą zmo-

dyfikowanego jednoetapowego testu FVIII korelują istotnie ze stężeniami określonymi za pomocą testu immunoenzymatycznego (ELISA) stosowanego wcześniej w badaniach klinicznych HAVEN. Ponadto w każdym laboratorium rekomendowana jest weryfikacja metody z użyciem odczynników stosowanych lokalnie; w badaniach wykazano zadowalającą powtarzalność testu pomimo stosowania różnych systemów pomiarowych (odczynników APTT, osocza deficytowego FVIII i analizatorów) [8, 13]. Do oznaczenia stężenia leku możliwe jest także wykorzystanie metody chromogennej do pomiaru FVIII w odniesieniu do opisanego powyżej kalibratora [8, 12, 22, 24]. Przy interpretacji wyniku oznaczeń stężenia emicizumabu należy wziąć pod uwagę fakt, że ewentualne równoległe stosowanie koncentratu FVIII i/lub preparatów omijających inhibitor może powodować zawyżenie stężenia leku [20]. Wówczas gdy zajdzie konieczność oznaczenia stężenia emicizumabu w osoczu w obecności FVIII, można rozważyć inaktywację termiczną próbki osocza [4].

W przypadku pacjentów z podejrzeniem obecności przeciwciał neutralizujących anty-emicizumab, Światowa Organizacja Hemofili (WFH, *World Federation of Hemophilia*) zaleca pomiar stężenia emicizumabu przy użyciu zmodyfikowanego jednostopniowego testu obejmującego wspomniany dodatkowy etap wstępnego rozcieńczenia osocza badanego oraz kalibrację testu przy użyciu specyficznych kalibratorów emicizumabu [25]. W tym celu mogą być również stosowane zatwierdzone

testy mierzące w sposób bezpośredni obecność przeciwciał przeciwleukowych, jeśli są one dostępne.

### **Pomiar przeciwciał przeciwleukowych (anty-emicizumab)**

Warto podkreślić, że w przypadku każdej terapii farmakologicznej istnieje niewielkie ryzyko rozwoju przeciwciał przeciwleukowych (ADA). Podejrzenie wytworzenia ADA pojawia się w chwili, gdy u pacjenta zwiększa się częstość krwawień przełomowych i dochodzi do wydłużenia aPTT. Stosowanie emicizumabu wiązało się z rozwojem ADA u 5,1% pacjentów (34/668), którzy uczestniczyli w badaniach klinicznych HAVEN 1–4 [3]. U większości z nich nie zaobserwowano istotnej zmiany stężenia emicizumabu w osoczu oraz zwiększenia częstości występowania krwawień, zaś przeciwciała neutralizujące lek wykryto w < 1% przypadków [3, 8]. Ponadto pojawienie się ADA nie wpływa na skuteczność leczenia substytucyjnego FVIII lub terapii omijającej inhibitor [3]. Z uwagi na to, że dotychczas nie opracowano komercyjnie dostępnych zestawów laboratoryjnych służących bezpośredniemu wykrywaniu ADA, w przypadku podejrzenia wytworzenia przeciwciał przeciwko emicizumabowi zalecane jest oznaczenie stężenia leku we krwi pacjenta [8, 9, 14, 22].

Podsumowanie wykorzystania omówionych powyżej testów laboratoryjnych do monitorowania mimetyku FVIIIa zestawiono w tabeli 3.

**Tabela 3.** Podsumowanie zastosowania wybranych testów hemostazy w obecności mimetyku FVIIIa (zmodyfikowano za: [8, 9, 12, 14, 25])

<b>Cel badania</b>	<b>Test laboratoryjny</b>
Obecność leku	Test chromogeny do pomiaru FVIII z czynnikami pochodzenia ludzkiego (hFIXa i hFX) Pomiar stężenia leku zmodyfikowanym testem koagulacyjnym do pomiaru FVIII skalibrowanym wobec specyficznego kalibratora
Aktywność FVIII po infuzji	Test chromogeny do pomiaru FVIII z FXa pochodzenia wołowego (bFX) i FIXa pochodzenia wołowego/ludzkiego (bFIXa/hFIXa)
Inhibitor wobec FVIII	Test Bethesda z pomiarem FVIII testem chromogenym z FXa pochodzenia wołowego (bFX) i FIXa pochodzenia wołowego/ludzkiego (bFIXa/hFIXa)
Stężenie leku	Zmodyfikowany test koagulacyjny do pomiaru FVIII skalibrowany wobec specyficznego kalibratora Infuzja koncentratu FVIII zawyża wynik
ADA	Brak testu bezpośredniego Wydłużenie aPTT może wskazywać na obecność ADA Zmodyfikowany test koagulacyjny FVIII do pomiaru stężenia leku

h (*human*) — ludzki; b (*bovine*) — wołowy, FIXa (*activated Factor IX*) — aktywowany czynnik IX; FX (*Factor X*) — czynnik X

## Pomiar generacji trombiny

Dotychczas nie ustalono roli globalnych testów oceniających hemostazę, w tym pomiaru generacji trombiny, w monitorowaniu pacjentów stosujących mimetyk FVIIIa [8, 9]. Mimo tego, że test generacji trombiny (TGA, *thrombin generation assay*) nie jest rutynowo stosowanym testem hemostazy w praktyce klinicznej, głównie ze względu na trudności w interpretacji, niską powtarzalność i małą dostępność, to niejednokrotnie w literaturze donoszono o jego przydatności w odniesieniu do oceny potencjału hemostazycznego mimetyków FVIIIa, zwłaszcza emicizumabu. Szczególnie ciekawe wydają się próby wykorzystywania tego testu do oceny wytwarzania trombiny w próbkach pochodzących od pacjentów lub przygotowanych *in vitro* w modelu ze skojarzonym leczeniem FVIII, rVIIa i aPCC [3, 24, 33]. Głównym zamysłem tych badań jest analiza *in vitro* wpływu terapii BPA u pacjenta leczonego mimetykami FVIIIa przed ich podaniem pacjentowi. Próbuje się także wykorzystać TGA do okołoperacyjnej kontroli krwawień, aby zminimalizować potencjalne ryzyko zdarzeń zakrzepowych [20].

## Podsumowanie

Wprowadzenie do leczenia hemofilii A terapii niesubstytucyjnej z użyciem długodziałających, podskórnych mimetyków FVIIIa stanowi znaczny postęp w leczeniu tej grupy chorych. Stosowanie u pacjentów z HA tych nowoczesnych cząsteczek i ich nowatorski sposób działania wymagają stałej edukacji personelu medycznego, w tym personelu laboratorium, ponieważ świadomość wpływu leków nowej generacji na testy laboratoryjne hemostazy jest kluczowym elementem procesu diagnostycznego. Dostępność odpowiednich testów laboratoryjnych i stałe podnoszenie wiedzy dotyczącej leków nowej generacji jest szczególnie ważne w ośrodkach mających pod opieką pacjentów z hemofilią, gdyż być może w przyszłości terapia mimetyczna stanie się dominującym paradygmatem w leczeniu HA. Monitorowanie tych nowoczesnych opcji leczenia HA może zatem wymagać ciągłego dostosowania odpowiednich testów, tak by dostarczyć klinicystom wiarygodne ich wyniki. Ponadto niewykluczone, że mimetyki FVIIIa znajdą także zastosowanie w leczeniu profilaktycznym krwawień w chorobie von Willebranda i nabytej hemofilii A (wskazanie dla emicizumabu w trakcie badań klinicznych) [3, 7].

## Konflikt interesów

EO — uczestniczyła w badaniach klinicznych i otrzymywała wynagrodzenie za wygłoszone wykłady od firm: Baxalta, Baxter, Shire, Takeda, Novo Nordisk, Roche, SOBI, Siemens, Werfen

## Piśmiennictwo

1. Lewandowska M, Nasr S, Shapiro AD. Therapeutic and technological advancements in haemophilia care: Quantum leaps forward. *Haemophilia*. 2022; 28 Suppl 4: 77–92, doi: 10.1111/hae.14531, indexed in Pubmed: 35521732.
2. Windyga J, Chojnowski K, Klukowska A, et al. Część I: Wytyczne postępowania w hemofilii A i B niepowikłanej inhibitorem czynnika VIII i IX (wydanie zaktualizowane). *Acta Haematologica Polonica*. 2016; 47(2): 86–114, doi: 10.1016/j.achaem.2016.04.009.
3. Alcedo Andrade PE, Mannucci PM, Kessler CM. Emicizumab: the hemophilia A game changer. *Haematologica*. 2023 [Epub ahead of print], doi: 10.3324/haematol.2022.282099, indexed in Pubmed: 37916312.
4. Müller J, Miesbach W, Prüller F, et al. Standing Commission Labor (STA EKOLA) of the Society of Thrombosis and Haemostasis Research (GTH). An Update on Laboratory Diagnostics in Haemophilia A and B. *Hamostaseologie*. 2022; 42(4): 248–260, doi: 10.1055/a-1665-6232, indexed in Pubmed: 35104901.
5. Windyga J, Chojnowski K, Klukowska A, et al. Część II: Wytyczne postępowania w hemofilii A i B niepowikłanej inhibitorem czynnika VIII i IX (wydanie zaktualizowane). *Acta Haematol Pol*. 2016; 47(2): 86–114, doi: 10.1016/j.achaem.2016.04.009.
6. Persson P, Amstrup AB, Coester HV, et al. Mim8, a novel factor VIIIa mimetic bispecific antibody, shows favorable safety and pharmacokinetics in healthy adults. *Res Pract Thromb Haemost*. 2023; 7(6): 102181, doi: 10.1016/j.rpth.2023.102181, indexed in Pubmed: 37745159.
7. Ozelo MC, Yamaguti-Hayakawa GG. Impact of novel hemophilia therapies around the world. *Res Pract Thromb Haemost*. 2022; 6(3): e12695, doi: 10.1002/rth2.12695, indexed in Pubmed: 35434467.
8. Jenkins PV, Bowyer A, Burgess C, et al. Laboratory coagulation tests and emicizumab treatment A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation guideline. *Haemophilia*. 2020; 26(1): 151–155, doi: 10.1111/hae.13903, indexed in Pubmed: 31859415.
9. Windyga J, Chojnowski K, Klukowska A, et al. Emicizumab (Hemlibra®) in hemophilia A patients with inhibitors against factor VIII — guidelines of the Group for Haemostasis of the Polish Society of Haematology and Transfusion Medicine. *J Transf Med*. 2020; 13(3): 165–175, doi: 10.5603/jtm.2020.0006.
10. Lippi G, Favaloro EJ. Emicizumab (ACE910): Clinical background and laboratory assessment of hemophilia A. *Adv Clin Chem*. 2019; 88: 151–167, doi: 10.1016/bs.acc.2018.10.003, indexed in Pubmed: 30612605.
11. Ellsworth P, Ma A. Factor-mimetic and rebalancing therapies in hemophilia A and B: the end of factor concentrates? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2021; 2021(1): 219–225, doi: 10.1182/hematology.2021000253, indexed in Pubmed: 34889356.
12. Peyvandi F, Kenet G, Pekrul I, et al. Laboratory testing in hemophilia: Impact of factor and non-factor replacement therapy on

- coagulation assays. *J Thromb Haemost.* 2020; 18(6): 1242–1255, doi: 10.1111/jth.14784, indexed in Pubmed: 32115865.
13. Lowe A, Kitchen S, Jennings I, et al. Effects of Emicizumab on APTT, FVIII assays and FVIII Inhibitor assays using different reagents: Results of a UK NEQAS proficiency testing exercise. *Haemophilia.* 2020; 26(6): 1087–1091, doi: 10.1111/hae.14177, indexed in Pubmed: 33094895.
  14. Bowyer AE, Lowe AE, Tiefenbacher S. Laboratory issues in gene therapy and emicizumab. *Haemophilia.* 2021; 27 Suppl 3: 142–147, doi: 10.1111/hae.13976, indexed in Pubmed: 32469128.
  15. Bowyer AE, Kitchen S, Ezban M. The effect of a next generation factor VIII mimetic bispecific antibody (Mim8) on assays of factor VIII activity and thrombin generation. *J Thromb Haemost.* 2023; 21(3): 480–487, doi: 10.1016/j.jtha.2022.12.023, indexed in Pubmed: 36696203.
  16. Lauritzen B, Bjelke M, Björkdahl O, et al. A novel next-generation FVIIIa mimetic, Mim8, has a favorable safety profile and displays potent pharmacodynamic effects: Results from safety studies in cynomolgus monkeys. *J Thromb Haemost.* 2022; 20(6): 1312–1324, doi: 10.1111/jth.15682, indexed in Pubmed: 35191180.
  17. Østergaard H, Lund J, Greisen PJ, et al. A factor VIIIa-mimetic bispecific antibody, Mim8, ameliorates bleeding upon severe vascular challenge in hemophilia A mice. *Blood.* 2021; 138(14): 1258–1268, doi: 10.1182/blood.2020010331, indexed in Pubmed: 34077951.
  18. Yamaguchi K, Soeda T, Sato M, et al. Pharmacology and Pharmacokinetics of NXT007; Emicizumab-Based Engineered Fx/Fx Bispecific Antibody with Improved Properties. *Blood.* 2020; 136(Supplement 1): 19–19, doi: 10.1182/blood-2020-138958.
  19. Teranishi-Ikawa Y, Soeda T, Koga H, et al. A bispecific antibody NXT007 exerts a hemostatic activity in hemophilia A monkeys enough to keep a nonhemophilic state. *J Thromb Haemost.* 2023 [Epub ahead of print], doi: 10.1016/j.jtha.2023.09.034, indexed in Pubmed: 37940048.
  20. López-Jaime FJ, Benítez O, Díaz Jordán BL, et al. Expert opinion paper on the treatment of hemophilia A with emicizumab. *Hematology.* 2023; 28(1): 2166334, doi: 10.1080/16078454.2023.2166334, indexed in Pubmed: 36636993.
  21. Tripodi A, Chantarangkul V, Novembrino C, et al. Advances in the Treatment of Hemophilia: Implications for Laboratory Testing. *Clin Chem.* 2019; 65(2): 254–262, doi: 10.1373/clinchem.2017.284356, indexed in Pubmed: 30282700.
  22. Holstein K, Albisetti M, Bidlingmaier C, et al. 'Ständige Kommission Hämophilie' (Haemophilia board) of the German, Swiss Austrian Society for Thrombosis Haemostasis Research (GTH). Practical Guidance of the GTH Haemophilia Board on the Use of Emicizumab in Patients with Haemophilia A. *Hamostaseologie.* 2020; 40(5): 561–571, doi: 10.1055/a-1127-6476, indexed in Pubmed: 32588417.
  23. Müller J, Miesbach W, Prüller F, et al. Standing Commission Labor (STA EKOLA) of the Society of Thrombosis and Haemostasis Research (GTH). An Update on Laboratory Diagnostics in Haemophilia A and B. *Hamostaseologie.* 2022; 42(4): 248–260, doi: 10.1055/a-1665-6232, indexed in Pubmed: 35104901.
  24. Lenting PJ. Laboratory monitoring of hemophilia A treatments: new challenges. *Blood Adv.* 2020; 4(9): 2111–2118, doi: 10.1182/bloodadvances.2019000849, indexed in Pubmed: 32396619.
  25. Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, et al. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia panelists and co-authors. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia.* 2020; 26 Suppl 6: 1–158, doi: 10.1111/hae.14046, indexed in Pubmed: 32744769.
  26. Castaman G, Santoro C, Coppola A, et al. ad hoc Working Group. Emergency management in patients with haemophilia A and inhibitors on prophylaxis with emicizumab: AICE practical guidance in collaboration with SIBioC, SIMEU, SIMEUP, SIPMeL and SISET. *Blood Transfus.* 2020; 18(2): 143–151, doi: 10.2450/2019.0186-19, indexed in Pubmed: 31657709.
  27. Bowyer AE, Hickey K, Kitchen S, et al. A next generation FVIII mimetic bispecific antibody, Mim8, the impact on non-factor VIII related haemostasis assays. *Haemophilia.* 2023; 29(6): 1633–1637, doi: 10.1111/hae.14884, indexed in Pubmed: 37824563.
  28. Adamkewicz JI, Chen DC, Paz-Priel I. Effects and Interferences of Emicizumab, a Humanised Bispecific Antibody Mimicking Activated Factor VIII Cofactor Function, on Coagulation Assays. *Thromb Haemost.* 2019; 119(7): 1084–1093, doi: 10.1055/s-0039-1688687, indexed in Pubmed: 31064025.
  29. Nougier C, Jeanpierre E, Ternisien C, et al. With contributions from the Working Group on Biology of Haemorrhagic Disorders (BIMHO, Under the Aegis of GFHT). Emicizumab treatment: Impact on coagulation tests and biological monitoring of haemostasis according to clinical situations (BIMHO group proposals). *Eur J Haematol.* 2020; 105(6): 675–681, doi: 10.1111/ejh.13490, indexed in Pubmed: 32668090.
  30. Bowyer AE, Maclean RM, Kitchen S. The combination of emicizumab and recombinant factor VIII in plasma: Which assays can we use for accurate measurement? *Int J Lab Hematol.* 2023; 45(3): 368–376, doi: 10.1111/ijlh.14021, indexed in Pubmed: 36710421.
  31. Escuriola-Ettingshausen C, Auerswald G, Königs C, et al. Optimizing the management of patients with haemophilia A and inhibitors in the era of emicizumab: Recommendations from a German expert panel. *Haemophilia.* 2021; 27(3): e305–e313, doi: 10.1111/hae.14010, indexed in Pubmed: 32937002.
  32. Bowyer A, Kitchen S, Maclean R. Effects of emicizumab on APTT, one-stage and chromogenic assays of factor VIII in artificially spiked plasma and in samples from haemophilia A patients with inhibitors. *Haemophilia.* 2020; 26(3): 536–542, doi: 10.1111/hae.13990, indexed in Pubmed: 32249990.
  33. Lund J, Jensen K, Burnier L, et al. In vitro effects of combining Mim8 with factor VIII, FVIIa, and activated prothrombin complex concentrates in thrombin generation assays. *J Thromb Haemost.* 2023; 21(6): 1493–1502, doi: 10.1016/j.jtha.2023.03.007, indexed in Pubmed: 37037699.

# Selected issues on pathogen inactivation in blood components; reports presented at the 33<sup>rd</sup> Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion (ISBT) in Gothenburg, June 17–21, 2023

Paulina Goczyńska<sup>ORCID</sup>, Joanna Lasocka<sup>ORCID</sup>, Elżbieta Lachert<sup>ORCID</sup>

Department of Transfusion Medicine, Institute of Hematology and Transfusion Medicine, Warsaw, Poland

## Introduction

Pathogen inactivation in blood components was the subject of more than a dozen papers presented at the 33<sup>rd</sup> Regional ISBT Congress, held in Gothenburg (June 17–21, 2023). The outcome of testing pathogen-reduced blood components was demonstrated both during the Parallel Session 8: Pathogen inactivation and the poster session (Blood products, Pathogen inactivation).

Axel Seltsam of the Bavarian Red Cross, held oral presentation on the current status of the implementation of pathogen inactivation methods in blood components. He stressed the growing interest in inactivation methods as result of the spread of infectious agents from endemic regions an example of which was the recent global COVID-19 pandemic. Thanks to pathogen inactivation systems the transfusion of blood components is now safer and the components are more available. Pathogen inactivation methods reduce the risk of transmitting bacteria (particularly in PC), parasites and viruses. Some of them also inactivate T lymphocytes which is crucial for prevention of Transfusion-Associated Graft-versus-Host-Disease (TA-GvHD). Nowadays, pathogen inactivation systems are routinely used for plasma and PC and their mechanism of action is based on photodynamic and photochemical reactions. Although

several methods for pathogen inactivation in whole blood (WB) and in red blood cells (RBCs) are already available none has yet been implemented for routine use. Most advanced and promising are two methods; for pathogen inactivation in whole blood (the Mirasol PRT system) and in RBCs with amustalin and glutathione. In the opinion of some presenting authors the low interest in pathogen inactivation methods observed in some countries may be related to anxiety over potentially lower effectiveness of pathogen-reduced blood components, expensive procedure and possible adverse reactions. However the first clinical trials have already demonstrated sufficient clinical efficacy and an acceptable safety profile of pathogen-reduced blood components, though in some clinical settings more transfusions may be required. The authors stressed the point that although pathogen inactivation was indeed associated with higher workload, the recent economic evaluations and studies of the benefit-risk ratio suggest that implementation of pathogen inactivation for plasma and PC significantly reduces the risk of transfusion-transmitted infection when new pathogens emerge [1]. In another oral presentation, a representative of several French blood transfusion centers (Paris, Marseille, Nantes, Rennes, La Plaine St-Denis) summarized the impact of implementation of 100%

---

**Correspondence address:** mgr Paulina Goczyńska, Department of Transfusion Medicine, Institute of Hematology and Transfusion Medicine, ul. Indiry Gandhi 14, 02–776 Warszawa, Polska, tel: +48 22 349 63 86, e-mail: pgoczynska@ihit.waw.pl  
 Translation: mgr Krystyna Dudziak

Received: 05.09.2023

Accepted: 18.09.2023

Early publication date: 31.12.2023

This article is available in open access under Creative Common Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) license, allowing to download articles and share them with others as long as they credit the authors and the publisher, but without permission to change them in any way or use them commercially.



of pathogen-reduced PC in additive solution on their manufacture and issue as well as the risk of transfusion-transmitted infections. In France, the Intercept system was implemented into routine use in November 2017. In a survey that covered the years 2013–2022, the risk of pathogen transmission was compared before and after the implementation of pathogen inactivation. The percentage of PCs from whole blood (with additive solution) increased from 51% in 2013 to 72% in 2022. In 2019 the storage time of pathogen-reduced PC was extended up to 7 days. In 2018, the percentage of PC for separation was 30%, while in 2022 it already accounted for 96.5%. In 2017, apheresis PCs, were still not subject to separation and in 2022 the percentage was 11%. It was also stressed that implementation of pathogen inactivation for PC extended storage duration which resulted in lower wastage due to shelf life. Although pathogen-reduced PC had lower platelet count and more transfusions were necessary, the total number of transfused PCs per patient increased only slightly. A significant reduction of bacterial transmission with transfused pathogen-reduced PCs was also reported [2].

### Poster session

The poster session (*Pathogen inactivation*) included 11 presentations referring to methods of pathogen inactivation in blood components. Four presentations were devoted to the Intercept system. One poster dealt with RBCs obtained from WB pathogen-reduced in the Mirasol PRT system and another referred to PCs pathogen reduced in the Mirasol PRT system. One poster was devoted to comparative studies of the Intercept and the Mirasol PRT systems. Two centers presented pilot studies — one with the Theraflex UV Platelets system, the other with amustalin and glutathione for RBCs. Two posters focused on the Theraflex MB Plasma system. Each of the 11 posters forwarded information on the inactivation system which they used; the collective data for all systems described are presented in form of a Table 1.

### Intercept system

For years now the Strasbourg Blood Transfusion Center has been using the Intercept system for pathogen reduction in PCs. Together with Cerus representatives they presented an evaluation study of in vitro quality of buffy-coat PCs treated with prototype light-emitting diode (LED) illuminator used instead of the conventional UVA light emitting

diode illuminator. Four study groups of PCs were compared (n = 5 each):

- PC PAS-C (InterSol)/axis (55%/45%) pathogen-reduced with conventional UVA light emitting diode illuminator (INT100 at 320–400 nm, 3.9 J/cm<sup>2</sup>);
- PC with PAS-C/axis (55%/45%) pathogen-reduced with a prototype light emitting diode (LED) illuminator (350 nm, 3.3 J/cm<sup>2</sup>);
- PC with PAS-E (SSP+)/plasma (55%/45%) pathogen-reduced conventional UVA light emitting diode illuminator;
- PC with PAS-E/plasma (55%/45%) and pathogen-reduced with a prototype light emitting diode (LED) illuminator.

In vitro platelet quality and function were assessed with multiple biochemical and functional tests during 7 days of storage. In all study groups platelet counts were stable throughout the storage period. Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 and glycoprotein VI (GPVI) expression remained stable, while the expression of GPIb $\alpha$  and GPV was lower in all study groups. PCs treated with both UVA and LED light irradiation presented similar glucose consumption, lactate levels, LDH release as well as pH values. The analysis of results revealed that the use of either the prototype light-emitting diode (LED) illuminator or the UVA light emitting diode illuminator (INTERCEPT) had similar effect on the metabolism, activation, viability and hemostatic function of platelets in PCs from buffy-coat stored for 7 days in PAS-C or PAS-E/plasma [3]. In 2021, a report was published in the United States which described a transfusion-transmitted bacterial infection (TTBI) in a recipient of apheresis PC which had been pathogen reduced with the Intercept system. Post-transfusion residual PC screening revealed the presence of three bacteria — *Staphylococcus saprophyticus*, *Leclercia adecarboxylata* and *Enterobacter soli*. The stage at which contamination occurred — collection or preparation — was not determined. Assuming that the contamination occurred prior to inactivation, the conclusion is that inactivation with the Intercept system proved ineffective against these pathogens. Cerus therefore designed a study to evaluate the effectiveness of inactivation of pure *E. soli* culture and in a mixture with *L. adecarboxylata* and *S. saprophyticus* cultures. For this purpose, a mixture of *E. soli* culture and a mixture of *E. soli*, *L. adecarboxylata* and *S. saprophyticus* cultures (1:1:1 ratio) were added to an apheresis platelet unit and then pathogen-reduced using the Intercept system. Samples were collected before and after the bacteria were added,

**Table 1.** Pathogen inactivation systems for PC and plasma

System/parametr	Theraflex MB Plasma	Intercept	Mirasol PRT	Theraflex UV Platelets
Type of blood component	Single unit of plasma from WB or apheresis	PC Single unit of plasma from WB (pooled) or apheresis PC in plasma or PAS (InterSol, SSP+)	Plasma; PC in plasma or PAS (SSP+)	PC, plasma during testing
CE marking (year)	2000	PC: 2002; plasma: 2006	PC: 2007; plasma: 2008	PC: 2009
Photosensitizer	Methylene blue	Amotosalen hydrochloride (S-59)	Riboflavin (vit. B2)	No photosensitizer used
Photoproducts	Azur A, B, C; thionone	Dimers S-59	Lumichrome, lumiflavin, 2'-ketoflavin, 4-ketoflavin, mononucleotide, flavin forms methylflavin	None
Conditions	Visible light (590 or 630 nm) 180 J/cm <sup>2</sup> UVA (320–400 nm) 3 J/cm <sup>2</sup> UV (280–400 nm) 6.24 J/cm <sup>2</sup> UVC (254 nm) 0.2 J/cm <sup>2</sup>	UVA (320–400 nm) 3 J/cm <sup>2</sup>	UV (280–400 nm) 6.24 J/cm <sup>2</sup>	UVC (254 nm) 0.2 J/cm <sup>2</sup>
Additional steps	Leukoreduction (Plasmaflex); removal of photosensitizer and photoproducts (Blueflex)	Removal of photosensitizer and photoproducts	Not applicable	Not applicable

as well as after inactivation with the Intercept system. None of the microbiological tests revealed bacterial growth, which only proved the Intercept system to be effective for these pathogens [4]. In another poster presentation the authors stressed the fact that in Europe, the Intercept system is in routine use for pathogen inactivation in both pooled and apheresis PC whereas in the USA — mostly for apheresis PCs (TRIMA® in 100% plasma or AMICUS® in a 65% PAS-3/35% plasma mixture). In 2015, members of the WHO Expert Committee on Biological Standardization (ECBS) in collaboration with the Paul-Ehrlich Institute (PEI), approved an expanded panel of bacterial strains used for evaluation of methods strengthening microbiological safety of blood components (Spindler-Raffel et al, Vox Sang. 2015). The aim of the study presented by Cerus was to evaluate the effectiveness of inactivation of a broad spectrum of bacterial strains that were added to apheresis PCs in plasma, to apheresis PCs in additive solution (65% PAS-3/35% plasma) and to plasma units. The Intercept system was found to inactivate high titers of *K. pneumoniae* and *S. aureus* in plasma. Inactivation was effective for *K. pneumoniae*,

*S. aureus*, *E. coli* and *S. epidermidis* in PCs. The data show the INTERCEPT system to be effective for inactivation of WHO reference bacterial strains responsible for transfusion-transmitted bacterial infections [5]. A Swedish blood transfusion center presented their own method of pooling and inactivation of unused plasma. The Uppsala University Hospital noted a high percentage of plasma waste (about 25% of the whole 2018-inventory) initially intended for patients with serious injuries (e.g., traffic accidents). Unused plasma units (e.g. when the patient dies) are returned to the hospital blood bank and can still be used up to 7 day storage. Usually, however, they are destroyed. To prevent the big waste, a method was devised to create pools of unused plasma. For this purpose, 100 units of leukocyte-reduced plasma units were frozen ( $\leq -25^{\circ}\text{C}$ ), thawed after 7 days and then 10 pools (of 10 units each) were prepared. Each pool was then divided into 4 (650 ml) sub-pools each of which was subjected to inactivation in the Intercept system. Following inactivation, each sub-pool was divided into 3 units to finally give 120 units of inactivated plasma (200 ml each) to be frozen and thawed as required. The quality control tests revealed that

freezing and thawing did not significantly affect factor VIII activity and fibrinogen concentration, the value of these parameters however were significantly reduced as result of inactivation (though the values were still acceptable; 69% and 87% of the initial value for factor VIII and fibrinogen content respectively). The authors concluded that pooling 10 plasma units before inactivation may contribute to standardization of the volume and protein content in plasma units and reduction of plasma waste to 12% [6].

### **Mirasol PRT system — pathogen inactivation in platelet concentrate**

Since 1990 when methods of pathogen inactivation in blood components were implemented, transfusions have become much safer. Inactivation however adversely affects the quality of blood components and leads to lower recovery of platelet cells in the recipient's circulatory system. In consequence, for some patients a higher number of transfusions is required. With the aim of improving the quality of platelets in leuko-reduced PCs. Representatives of the Dutch Sanquin Blood Bank decided to check whether such components as pyruvate, glutathione and vitamin C added to the additive solution (PAS-E) favorably affect the post-inactivation quality of PCs. A pool of 10 buffy-coat PCs was divided into two sub-pools: one with PAS-E (T-PAS+ from Terumo BCT), the other with PAS-E and glutathione, pyruvate and vitamin C. Both sub-pools were inactivated using the Mirasol PRT system and the components were stored for up to 8 days. The analysis of results revealed that pyruvate decreases glucose uptake, lactate formation and promotes better pH maintenance. Both glutathione and vitamin C inhibit activation (CD62P expression) and apoptosis (annexin V). The authors emphasized that pyruvate and antioxidants in the additive solution may mitigate some inactivation effects. Further studies are however required to confirm the beneficial effects of the modified formula of the additive solution. Equally important is to assess whether the modified content of the additive solution improves platelet quality after pathogen inactivation. [7].

### **Mirasol PRT system — pathogen inactivation in whole blood**

Despite years of research, no method of pathogen inactivation in RBCs has yet been implemented into routine use, although red blood cells are

the most often transfused blood component. The Mirasol PRT system for pathogen inactivation in whole blood was CE marked in 2015, this however has not increased the interest in this method. The staffs of the Regional Blood Transfusion Center (RCKiK) in Lodz and the Institute of Hematology and Transfusion Medicine in cooperation with Terumo, presented research on the quality of leukoreduced RBCs (PAGSM) obtained from WB inactivated with the Mirasol PRT system (Terumo BCT) with the automated method (Reveos). The study included 40 WB units which were divided into 2 groups: study group (S) — subjected to inactivation and control (C) which obtained/prepared RBCs then stored at 2–6°C for up to 42 days. The expression of CD 44, CD 47 and annexin V antigens was monitored. Comparison of the parameters on storage day 1 and 42 demonstrated no significant differences in CD44, CD47 or annexin V antigen expression, which suggests that the Mirasol system of pathogen inactivation in WB has no effect on the expression of the these antigens in RBCs [8].

### **Intercept system, vs. Mirasol PRT system**

In 2021 the Luxembourg Red Cross implemented some measures to upgrade their self-sufficiency and to reduce PC waste related to shelf life. In their study the quality of pathogen-reduced PCs in the Mirasol PRT system and the Intercept system were compared. The results pointed to the Intercept system which was implemented and the storage time of pathogen-reduced PCs was extended to 6 days. The quality of PCs during the initial period of Intercept system implementation, particularly apheresis PC, did not meet the standard for quality control (QC). It was therefore decided to assess the impact of the introduced changes on QC results, to determine the number of components not meeting the QC standards and to estimate the waste related to shelf life — as well as to determine the average „age” of the PCs issued. For comparison, retrospective data was used (Pathogen-reduced PCs using the Mirasol PRT system) as well as current data (Pathogen-reduced PCs using the Intercept system). In addition, a breakdown was made into pooled PCs (Revos system, Terumo BCT) and apheresis PCs (Trima, Terumo BCT). PCs pathogen-reduced in the Intercept system manifested a higher loss of platelets in the pooled PCs which was attributed to the removal of residual photosensitizing compound and its photoproducts (compound adsorption device, CAD). No loss in

the platelet count was observed in apheresis PC as the PCs subjected to inactivation always had an above — standard platelet count. Moreover, the duration of component issue was extended from 2.73–4.03 days to 3.31–4.26 days (required incubation with CAD). The extension of shelf life and good QC parameters, have no adverse affect on the overall process of PC production and quality. The percentage of waste decreased and no increase in the percentage of non-QC-compliant PCs was recorded [9].

### **Theraflex MB Plasma System**

Two posters were devoted to pathogen inactivation in plasma using the Theraflex MB Plasma System. They referred to the effectiveness of bacterial and viral inactivation in plasma stored in DEHP-free plastic containers [10, 11].

### **Theraflex UV-Platelets System**

Representatives of the Bavarian Red Cross came forward with a study on the implementation of PC pathogen inactivation using the Theraflex UV-Platelets system solely based on the properties of short-wave UVC-light (UVC). The recipients of PCs pathogen reduced with this method are not exposed to as much as trace amounts of chemical compounds. The purpose of the study was process validation and qualitative assessment of pathogen-reduced PCs. 6 duplicate units of apheresis PC were divided into study group (S) — pathogen-reduced with the Theraflex UV Platelet system and a control group (C). All PC units were stored at 22°C with agitation. The quality control parameters were within normal range, the average platelet count in both groups was similar, and both groups also demonstrated similar response to hypotonic shock response and swirling. Although the glucose consumption was higher in the test group, in both cases (C and B) there were traces of glucose on storage day 9 [12].

### **Pathogen inactivation technology using amustaline (S-303) and glutathione (GSH)**

Under intensive investigation are currently pathogen inactivation methods dedicated for erythrocyte-containing blood components. One of them is the chemical method of pathogen inactivation with amustaline (S-303) and glutathione (GSH).

S-303 efficiently crosses through cell membranes and viral capsids and incorporates into the helical regions of nucleic acids to form interstrand cross-linking by di-alkylating group. Among others, S-303 also reacts with phosphates, proteins and water. Glutathione (GSH) is added to prevent such non-specific reactions. Numerous clinical studies have reported the formation of neoantigens and antibodies in susceptible patients following transfusion of RBCs pathogen-reduced with the chemical method (amustalin and glutathione). German scientists have therefore conducted a pilot study to find an optimal method of determining these antibodies. The study demonstrated that in vivo recovery and survival of red blood cells can be traced using Surface acridine or biotin flow cytometric markers. The authors stressed the fact that the acridine marker requires no additional preparation steps [13].

### **Summary**

The 33<sup>rd</sup> ISBT Congress presented a wide variety of papers on inactivation. The quality of PCs inactivated in the new prototype illuminator (Intercept system) was evaluated. The Intercept system was assessed for the effectiveness of pathogen inactivation against new bacterial strains in the pathogen reduced PCs. A pilot study was conducted to evaluate the benefits of introducing new chemical compounds into the PAS-E additive solution to improve the quality of PCs pathogen-reduced in the Intercept system. There was also a study — rather controversial from the point of view of Polish legal regulations, regarding ways of reducing wastage of plasma units. One study recalled the method of pathogen inactivation in PCs solely with UVC. Although the method (used in the Theraflex UV Platelets system) was CE marked in 2009, its application seems to be somewhat limited. Contrary to expectations and rather disappointing is the fact that so few studies were devoted to pathogen inactivation in whole blood and packed red blood cells. This implies that routine implementation of pathogen inactivation systems for better safety of red-blood cell components is still a long way off. Attention was also focused on new challenges facing blood transfusion service — including the need to change the plasticizer in kits currently used for collection, preparation, inactivation and storage. The variety of topics covered at the conference only confirms the determination to constantly upgrade the parameters of the blood components and to provide safer and better quality blood components.

**Conflict of interest:** none declared

## References

1. Seltsam A. Update on pathogen inactivation of whole blood, red blood cells, platelets and plasma. *Vox Sang.* 2023, PA08-L01, doi: 10.1111/vox.13433.
2. Richard P, Thibert J, Malard L et al. Implementation of 100% pathogen-reduced platelet concentrates in France: Impact on manufacturing and issuing of platelet concentrates as well as on the risk of transfusion-transmitted infections. *Vox Sang.* PA08-L02, doi: 10.1111/vox.13433.
3. Hechler B, Brouard N, Rudwill F, Mouriaux C, et al. In vitro biochemical and functional characteristics of stored (double-dose) buffy-coat platelet concentrates treated with amotosalen and a prototype UVA light-emitting diode illuminator. *Vox Sang.* 2023, P202, doi: 10.1111/vox.13433.
4. Krath M, Nahata P, McCormack M, Johnson A, et al. Amotosalen and UVA treatment of enterobacter soli, leclercia adecarboxylata and staphylococcus saerohycticus from a contaminated apheresis platelet unit. *Vox Sang.* 2023, P203, doi: 10.1111/vox.13433.
5. Nahata P, McCormack M, Johnson A, Stafford B, et al. Inactivation of WHO reference bacterial strains in platelet and plasma components using Amotosalen/UVA treatment. *Vox Sang.* 2023, P209, doi: 10.1111/vox.13433.
6. Auvinen M, Löf H, Knutson F. Pathogen reduced plasmas from maxi-pools combined with fast thawing for use in emergency situations. *Vox Sang.* 2023, P207, doi: 10.1111/vox.13433.
7. Van Der Meer P, Groot S, Klei T. Improvement of platelet quality after pathogen inactivation. *Vox Sang.* 2023, P206, doi: 10.1111/vox.13433.
8. Bubiński M, Gronowska A, Lasocka J, Lachert E. Evaluation of CD44, CD47 and annexin V expression in leuko-reduced packed RBCs stored in additive solution obtained from WB subjected to pathogen inactivation and separation. *Vox Sang.* 2023, P212, doi: 10.1111/vox.13433.
9. Malvaux N, Defraigne F, Schuhmacher A. Initial experience of switching pathogen inactivation system with extended platelet shelf life. *Vox Sang.* 2023, P205, doi: 10.1111/vox.13433.
10. Gravemann U, Sumian C, Schulze T. Virus inactivation of plasma by methylene blue/light treatment using a DEHP-free bag system. *Vox Sang.* 2023, P204, doi: 10.1111/vox.13433.
11. Gravemann U, Sumian C, Schulze T. Bacteria elimination from plasma by methylene blue/light treatment using a DEHP-free bag system. *Vox Sang.* 2023, P208, DOU, doi: 10.1111/vox.13433.
12. Handke W, Dresel S, Seltsam A. Implementation of a UVC-based pathogen reduction treatment for apheresis platelets at regional blood service in Germany. *Vox Sang.* 2023, P210, doi: 10.1111/vox.13433.
13. Benjamin RJ, Pitman JP, von Goetz M, et al. A pilot study tracking pathogen reduced RBCs in vivo using Surface acridine and biotin flow cytometric markers. *Vox Sang.* 2023, P211, doi: 10.1111/vox.13433.

# Wybrane zagadnienia dotyczące inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi w świetle doniesień prezentowanych na 33. Regionalnym Kongresie *International Society of Blood Transfusion (ISBT)* w Göteborgu, 17–21 czerwca 2023 roku

Paulina Goczyńska<sup>ORCID</sup>, Joanna Lasocka<sup>ORCID</sup>, Elżbieta Lachert<sup>ORCID</sup>

Zakład Transfuzjologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

## Artykuł jest tłumaczeniem pracy:

Goczyńska P, Lasocka J, Lachert E. Selected issues on pathogen inactivation in blood components; reports presented at the 33<sup>rd</sup> Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion (ISBT) in Gothenburg, June 17–21, 2023. *J Transf Med* 2023; 16 (4): 278–283. DOI: 10.5603/jtm.99304. Należy cytować wersję pierwotną.

## Wstęp

W trakcie 33. Regionalnego Kongresu *International Society of Blood Transfusion (ISBT)*, który odbył się w Göteborgu w dniach 17–21 czerwca 2023 roku, przedstawiono kilkanaście prac dotyczących inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi. Wyniki badań składników krwi poddanych inaktywacji czynników chorobotwórczych przedstawiono podczas sesji równoległej (*Parallel Session 8: Pathogen inactivation*) oraz sesji plakatowej (*Blood products, Pathogen inactivation*).

Podczas prezentacji ustnej Axel Seltsam z Ba-warskiego Czerwonego Krzyża przedstawił aktualny stan wdrożenia metod inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi. Podkreślił, że rozprzestrzenianie się czynników zakaźnych z regionów ich endemicznego występowania na inne obszary, w tym niedawna globalna pandemia COVID-19, nasiliły zainteresowanie metodami inaktywacji, które zwiększając bezpieczeństwo przetaczanych składników krwi, zwiększają także dostępność składników krwi. Metody inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi

ograniczają ryzyko przeniesienia bakterii [szczególnie w przypadku koncentratu krwinek płytkowych (KKP)], pasożytów oraz wirusów, a niektóre z nich inaktywują także limfocyty T, stanowiąc metodę stosowaną w profilaktyce choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (TA-GvHD, *transfusion-associated graft-versus-host-disease*). Obecnie do rutynowego stosowania wprowadzono systemy do inaktywacji czynników chorobotwórczych w osoczu i w KKP, których zasada działania opiera się na reakcjach fotodynamicznych i fotochemicznych. Wprowadzono opracowano kilka metod inaktywacji czynników chorobotwórczych w krwi pełnej (KP) i w koncentracie krwinek czerwonych (KKCz), to nadal żadnej z nich nie wdrożono do rutynowego stosowania. Najbardziej zaawansowane i budzące największe nadzieje na ich wprowadzenie są dwie metody — metoda inaktywacji czynników chorobotwórczych w krwi pełnej przy zastosowaniu systemu Mirasol oraz metoda inaktywacji w KKCz z zastosowaniem amustaliny i glutationu. W czasie prezentacji podkreślono, że zbyt małe zainteresowanie wdrożeniem metod inaktywacji w wielu

**Adres do korespondencji:** mgr Paulina Goczyńska, Zakład Transfuzjologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. Indiry Gandhi 14, 02–776 Warszawa, tel. 22 349 6386, e-mail: pgoczynska@ihit.waw.pl

Nadesłano: 05.09.2023

Przyjęto do druku: 18.09.2023

Data pierwszej publikacji: 31.12.2023

Artykuł jest dostępny bezpłatnie na podstawie licencji Creative Commons Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) umożliwiającej jego pobranie oraz udostępnianie pod warunkiem wskazania autorstwa i wydawcy. Niedopuszczalne jest wprowadzanie jakichkolwiek zmian lub wykorzystanie komercyjne bez zgody wydawcy.

krajach jest spowodowane prawdopodobnie obawą przed potencjalnie obniżoną skutecznością inaktywowanych składników krwi, wzrostem kosztów ich otrzymywania oraz ewentualnymi reakcjami niepożądanymi. Jednakże już wyniki pierwszych badań klinicznych wykazały, że poddane inaktywacji składniki krwi mają wystarczającą skuteczność kliniczną i akceptowalny profil bezpieczeństwa, chociaż w niektórych sytuacjach klinicznych stosowanie inaktywowanych składników krwi może skutkować zwiększoną liczbą przetoczeń. Podczas prezentacji podkreślono, że wprawdzie wprowadzenie inaktywacji wiąże się z większym nakładem pracy, to ostatecznie badania stosunku korzyści do ryzyka oraz oceny ekonomiczne sugerują, że stosowanie inaktywacji w osoczu i w KKP znacznie ograniczyłoby przeniesienie zakażenia w przypadku pojawienia się nowego czynnika chorobotwórczego [1]. W kolejnej ustnej prezentacji przedstawiciel kilku francuskich centrów krwiodawstwa (Paryż, Marsylia, Nantes, Rennes, La Plaine St-Denis) podsumował wpływ wdrożenia 100% inaktywacji czynników chorobotwórczych w KKP/RW (koncentrat krwinek płytkowych w roztworze wzbogacającym) na ich otrzymywanie i wydawanie oraz na ryzyko przeniesienia zakażenia wraz z przetaczanym KKP. We Francji system Intercept wdrożono do rutynowego stosowania w listopadzie 2017 roku. Ryzyko przeniesienia czynników chorobotwórczych porównywano przed wprowadzeniem inaktywacji i po jej wprowadzeniu, obejmując lata 2013–2022. W podsumowaniu stwierdzono, że odsetek otrzymywanych KKP z krwi pełnej (mieszanka z roztworem wzbogacającym) wzrastał z 51% w 2013 roku do 72% w 2022 roku. Wydłużenie czasu przechowywania KKP inaktywowanego do 7 dni wprowadzono w 2019 roku. W 2018 roku odsetek KKP nadających się do podziału stanowił 30%, podczas gdy w 2022 roku stanowił już 96,5%. W przypadku KKP z aferezy jeszcze w 2017 roku preparatów tych nie poddawano dzieleniu, natomiast w 2022 roku odsetek dzielonych KKP z aferezy wynosił 11%. Podkreślono także, że wprowadzenie inaktywacji w KKP zaowocowało wydłużeniem czasu ich przechowywania, a w konsekwencji mniejszym odsetkiem zniszczeń z powodu przeterminowania. Wprawdzie KKP inaktywowane charakteryzowały się zmniejszoną liczbą krwinek płytkowych, a pacjenci wymagali zwiększonej liczby przetoczeń, to całkowita liczba przetoczonych KKP na pacjenta wzrosła nieznacznie. Stwierdzono także istotne ograniczenie przeniesienia bakterii wraz z przetaczanymi KKP [2].

## Sesja plakatowa

W trakcie sesji plakatowej (*Pathogen inactivation*) przedstawiono 11 prac dotyczących metod inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi. Cztery prace odnosiły się do systemu Intercept. Jedna z prac dotyczyła badań KKCz otrzymanych z KP poddanej inaktywacji w systemie Mirasol i jedna — KKP poddanych inaktywacji w systemie Mirasol. Jedna praca dotyczyła badań porównawczych systemu Intercept i systemu Mirasol. Dwa ośrodki przedstawiły badania pilotażowe dotyczące inaktywacji — pierwszy z wykorzystaniem systemu Theraflex UV Platelets, zaś drugi z wykorzystaniem amustaliny i glutationu dla KKCz. Dwie prace dotyczyły systemu Theraflex MB Plasma. Ze względu na fakt, że każda z 11 prac we wprowadzeniu zawierała informacje dotyczące opisywanego systemu inaktywacji, zdecydowano, aby podstawowe informacje dotyczące systemów do inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach zawrzeć w tabeli 1.

## System Intercept

Centrum krwiodawstwa w Strasburgu od lat stosuje system Intercept do inaktywacji czynników chorobotwórczych w KKP. Celem pracy, zaprezentowanej przez przedstawicieli firmy Cerus oraz Centrum Krwiodawstwa w Strasburgu, była ocena *in vitro* KKP otrzymanych z kożuszków leukocytarno-płytkowych poddanych inaktywacji w iluminatorze, w którym zamiast konwencjonalnej lampy UVA zastosowano prototypową lampę LED (*light emitting diode*). W badaniach porównywano 4 grupy KKP (n = 5 dla każdej grupy):

- KKP z PAS-C (InterSol)/osocze (55%/45%) poddane inaktywacji przy zastosowaniu iluminatora z konwencjonalną lampą UVA (INT100 o długości fali 320–400 nm, 3,9 J/cm<sup>2</sup>);
- KKP z PAS-C/osocze (55%/45%) poddane inaktywacji przy zastosowaniu iluminatora z lampą LED (350 nm, 3,3 J/cm<sup>2</sup>);
- KKP z PAS-E (SSP+)/osocze (55%/45%) poddane inaktywacji przy zastosowaniu iluminatora z konwencjonalną lampą UVA;
- KKP z PAS-E/osocze (55%/45%) i poddane inaktywacji przy zastosowaniu iluminatora z lampą LED.

Jakość i funkcję *in vitro* płytek krwi oceniano za pomocą wielu testów biochemicznych i czynnościowych w ciągu 7 dni przechowywania. Liczba płytek krwi była stabilna w trakcie całego okresu przechowywania we wszystkich badanych grupach.

Tabela 1. Systemy inaktywacji czynników chorobotwórczych w KKP i osoczu

System/parametr	Theraflex MB Plasma	Intercept	Mirasol PRT	Theraflex UV Platelets
Rodzaj składnika krwi	Pojedyncza jednostka osocza z krwi pełnej lub z aferezy	Pojedyncza jednostka osocza z krwi pełnej pulowane lub z aferezy; KKP w osoczu lub w PAS (InterSol, SSP+)	Osocze; KKP w osoczu lub w PAS (SSP+)	KKP, osocze w trakcie badań
Oznakowanie CE (rok)	2000	KKP: 2002; osocze: 2006	KKP: 2007; osocze: 2008	KKP: 2009
Fotoczułacz	Błękit metylenowy	Chlorowodorek amotosalenu (S-59)	Ryboflawina (witamina B2)	Nie zastosowano fotoczułacza
Fotoprodukty	Azur A, B, C; tionona	Dimery S-59	Lumichrom, lumiflawina, 2'ketoflawina, 4-ketoflawina, mononukleotyd, flawiny formylo metyloflawina	Brak
Warunki inaktywacji	Światło widzialne (590 lub 630 nm) 180 J/cm <sup>2</sup>	UVA (320–400 nm) 3 J/cm <sup>2</sup>	UV (280–400 nm) 6,24 J/cm <sup>2</sup>	UVC (254 nm) 0,2 J/cm <sup>2</sup>
Dodatkowe etapy	Leukoredukcja (Plasmaflex); usuwanie fotoczułacza i fotoproduktów (Blueflex)	Usuwanie fotoczułacza i fotoproduktów (CAD)	Nie dotyczy	Nie dotyczy

KKP — koncentrat krwinek płytkowych; PAS (*platelet additive solution*) — roztwór wzbogacający; UV (*ultraviolet radiation*) — promieniowanie ultrafioletowe; UVA (*ultraviolet radiation in the UV-A range*) — promieniowanie ultrafioletowe w zakresie UV-A (długość fali: 315–380 nm); UVC (*ultraviolet radiation in the UV-C range*) — promieniowanie ultrafioletowe w zakresie UV-C (długość fali: 100–280 nm); CE — Conformité Européenne

Ekspresja integryny  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  i glikoproteiny VI (GPVI) pozostała stabilna, podczas gdy ekspresja glikoproteiny GPIIb $\alpha$  (receptor dla czynnika von Willebranda) i glikoproteiny V ulegała obniżeniu we wszystkich badanych grupach. Koncentraty krwinek płytkowych poddane naświetlaniu zarówno lampą UVA, jak i diodami LED wykazywały podobne zużycie glukozy, stężenie mleczanu, uwalnianie dehydrogenazy mleczanowej (LDH, *lactate dehydrogenase*) oraz podobną wartość pH. Na podstawie analizy wyników autorzy stwierdzili, że zastąpienie świetlówek UVA lampami LED w iluminatorze INTERCEPT nie miało wpływu na metabolizm, aktywację, żywotność oraz funkcje hemostatyczne krwinek płytkowych w KKP z kożuszków leukocytarno-płytkowych przechowywanych przez 7 dni w PAS-C lub PAS-E/osocze [3]. W 2021 roku w Stanach Zjednoczonych ukazało się doniesienie dotyczące infekcji bakteryjnej przeniesionej przez przetoczenie (TTBI, *transfusion-transmitted bacterial infections*) u biorcy KKP-Af. (KKP otrzymany metodą aferezy), poddanego inaktywacji z zastosowaniem systemu Intercept. Badania przesiewowe z pozostałości KKP po transfuzji wykazały obecność trzech bakterii — *Staphylococcus saprophyticus*, *Leclercia adecarboxylata* i *Enterobacter soli*. Nie ustalono, na którym etapie

doszło do kontaminacji — czy w trakcie pobierania czy preparatyki. Dopuszczając możliwość, że do zanieczyszczenia doszło przed inaktywacją, można by wyciągnąć wniosek, iż inaktywacja przy zastosowaniu systemu Intercept jest nieskuteczna wobec wyżej wymienionych czynników zakaźnych. W związku z powyższym firma Cerus przeprowadziła badania, których celem była ocena skuteczności inaktywacji *E. coli* samodzielnie i w połączeniu z *L. adecarboxylata* i *S. saprophyticus*. W tym celu do jednostki KKP-Af. dodano mieszaninę kultur *E. coli* oraz mieszaninę *E. coli*, *L. adecarboxylata* i *S. saprophyticus* (w stosunku 1:1:1), a następnie poddano inaktywacji z zastosowaniem systemu Intercept. Pobrano próbki przed dodaniem bakterii, po ich dodaniu oraz po inaktywacji. W żadnym badaniu mikrobiologicznym nie zaobserwowano wzrostu bakterii, co wskazuje na skuteczną inaktywację wyżej wymienionych czynników chorobotwórczych [4]. W kolejnej prezentacji plakatowej podkreślono, że w Europie system Intercept rutynowo jest stosowany do inaktywacji czynników chorobotwórczych zarówno w Zl. KKP (zlewany koncentracie krwinek płytkowych), jak i w KKP-Af., a w Stanach Zjednoczonych przede wszystkim do inaktywacji KKP-Af. (TRIMA® w 100% osoczu lub AMICUS® w mieszaninie 65% PAS-3/35%



osocza). W 2015 roku eksperci z komitetu ds. standaryzacji biologicznej (ECBS, *Expert Committee on Biological Standardization*) przy Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) we współpracy z Instytutem Paula Ehrlicha (PEI, *Paul-Ehrlich Institute*) zatwierdzili rozszerzony panel szczepów bakteryjnych stosowanych w celu oceny metod zwiększających bezpieczeństwo mikrobiologiczne składników krwi (*Spindler-Raffel et al, Vox Sang. 2015*). Celem pracy przedstawionej przez przedstawicieli firmy Cerus była ocena inaktywacji szerokiego spektrum szczepów bakteryjnych, które dodano do KKP-Af. w osoczu, do KKP-Af./RW (65% PAS-3/35% osocza) i do jednostki osocza. Stwierdzono, że system Intercept inaktywuje wysokie miana *K. pneumoniae* i *S. aureus* w osoczu. W przypadku KKP stwierdzono skuteczną inaktywację *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli* i *S. epidermidis*. Dane te pokazują, że system Intercept w sposób skuteczny inaktywuje wskazane przez WHO szczepy bakterii, które odpowiadają za infekcje bakteryjne przenoszone przez przetoczenie [5]. Praca przedstawiona przez przedstawicieli szwedzkiego ośrodka transfuzjologicznego dotyczyła opracowanej przez ośrodek własnej metody pulowania i inaktywacji niewykorzystanego osocza. W szpitalu uniwersyteckim w Uppsali zaobserwowano wysoki odsetek zniszczeń osocza (ok. 25% z całych zapasów otrzymanych w 2018 r.), pierwotnie przeznaczonych dla pacjentów z poważnymi obrażeniami (np. wypadki komunikacyjne). Jednostki osocza w przypadku ich niewykorzystania (np. śmierć pacjenta) są ponownie przekazywane do szpitalnego banku krwi i przechowywane do 7 dni w celu ponownego zastosowania. W większości przypadków są one niewykorzystywane i utylizowane. W celu zapobiegania tak wysokim zniszczeniom opracowano metodę opartą na tworzeniu pul osocza z niewykorzystanych jednostek osocza. W tym celu zamrażano 100 jednostek ubogoleukocytarnego osocza (temp.  $\leq -25^{\circ}\text{C}$ ), które po 7 dniach rozmrażano i przygotowywano 10 pul (po 10 jednostek). Każdą z pul dzielono następnie na 4 subpule (po 650 ml). Każdą subpulę poddawano inaktywacji w systemie Intercept, a po inaktywacji dzielono na 3 jednostki w konsekwencji, otrzymując 120 jednostek osocza inaktywowanego o objętości około 200 ml, które zamrażano i rozmrażano w zależności od zapotrzebowania. Na podstawie wykonanych badań kontroli jakości stwierdzono, że o ile samo zamrażanie i rozmrażanie nie wpłynęło znacząco na aktywność czynnika VIII i stężenie fibrynogenu, to wartości te uległy istotnemu statystycznie obniżeniu po procesie inaktywacji, ale nadal akcep-

towalnemu. Wartości te wynosiły odpowiednio 69% i 87% zawartości początkowej czynnika VIII i fibrynogenu. Autorzy pracy stwierdzili, że połączenie 10 jednostek osocza przed inaktywacją standaryzuje objętość i zawartość białka w jednostkach osocza oraz pozwala na zmniejszenie odsetka zniszczeń osocza do 12% [6].

### System Mirasol PRT — inaktywacja czynników chorobotwórczych w koncentracie krwinek płytkowych

Od wprowadzenia w latach 90. XX wieku metod inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi przetoczenia stały się bardziej bezpieczne, ale inaktywacja wpływa negatywnie na jakość otrzymywanych preparatów, co powoduje niższe odzyskanie krwinek płytkowych w krążeniu biorcy, a w konsekwencji konieczność zwiększenia liczby przetoczeń u niektórych pacjentów. W celu poprawienia jakości krwinek płytkowych po inaktywacji KKP holenderscy badacze z *Sanquin Blood Bank* postanowili sprawdzić, czy dodanie do roztworu wzbogacającego PAS-E dodatkowych składników, takich jak pirogronian, glutation oraz witamina C, może korzystnie wpłynąć na jakość KKP po inaktywacji. W tym celu pulę 10 kożuszków leukocytarno-płytkowych podzielono na dwie części. Do pierwszej dodano PAS-E (T-PAS+ firmy Terumo BCT), do drugiej zaś PAS-E wzbogacony o glutation, pirogronian i witaminę C. Obie grupy preparatów poddawano inaktywacji przy zastosowaniu systemu Mirasol PRT i przechowywano do 8 dni. Na podstawie analizy wyników badań stwierdzono, że dodanie pirogronianu prowadzi do mniejszego zużycia glukozy, w konsekwencji czego powstaje mniej mleczanu, co skutkowało lepszym utrzymaniem pH. Zarówno glutation, jak i witamina C powodują obniżenie aktywacji (ekspresja CD62P) i mniejszy poziom apoptozy (aneksyna V). Autorzy podkreślili, że włączenie pirogronianu i przeciwutleniaczy do składu roztworu wzbogacającego może łagodzić niektóre skutki inaktywacji. Konieczne są jednak dalsze badania potwierdzające korzystny wpływ zmiany składu roztworu wzbogacającego na KKP oraz ocena, czy zmiany w składzie nie wpływają na skuteczność inaktywacji oraz skuteczność kliniczną [7].

## System Mirasol PRT — inaktywacja czynników chorobotwórczych w krwi pełnej

Pomimo wieloletnich prac nadal nie wdrożono do rutynowego stosowania metody inaktywacji czynników chorobotwórczych w KKCz, najczęściej przetaczanym składniku krwi. Chociaż system Mirasol PRT do inaktywacji czynników chorobotwórczych w krwi pełnej uzyskał oznakowanie CE w 2015 roku, nie wpłynęło to na zwiększenie zainteresowania tą metodą inaktywacji. Pracownicy Regionalnego Centra Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (RCKiK) w Łodzi oraz Instytutu Hematologii i Transfuzjologii we współpracy z firmą Terumo przedstawili część badań dotyczących jakości ubogoleukocytarnego koncentratu krwinek czerwonych (UKKCz) (PAGSM) otrzymanego metodą automatyczną z KP (*Reveos*), którą uprzednio poddano inaktywacji z zastosowaniem systemu Mirasol PRT (*Terumo BCT*). Do badań przeznaczono 40 jednostek KP, które podzielono na 2 grupy: badaną (B) — poddaną inaktywacji i kontrolną (C), z których otrzymano KKCz, przechowywane następnie w temperaturze 2–6°C do 42 dni. Badano ekspresję antygenów CD 44, CD 47 oraz aneksyny V. Porównując wyniki wyżej wymienionych parametrów w 1. i 42. dniu przechowywania, nie odnotowano istotnych różnic w ekspresji antygenów CD44, CD47 czy aneksyny V, co sugeruje brak wpływu metody inaktywacji czynników chorobotwórczych w KP przy zastosowaniu systemu Mirasol na ekspresję wyżej wymienionych antygenów w KKCz [8].

## System Intercept a system Mirasol PRT

W 2021 roku Luksemburski Czerwony Krzyż wdrożył działania mające na celu zwiększenie samowystarczalności ich oddziały oraz zmniejszenie liczby zniszczeń KKP z powodu przeterminowania. W związku z powyższym przeprowadzono badania, w których porównano jakość KKP poddanych inaktywacji przy zastosowaniu systemu Mirasol z jakością KKP poddanych inaktywacji przy zastosowaniu systemu Intercept. Na podstawie analizy wyników badań wprowadzono system Intercept, a czas przechowywania KKP poddanych inaktywacji wydłużono do 6 dni. Jakość KKP w początkowym okresie wdrożenia systemu Intercept, a w szczególności KKP-Af., nie spełniała zakresu normy parametrów kontroli jakości (QC, *quality control*). W związku z powyższym postanowiono ocenić wpływ wprowadzonych zmian na wyniki QC, określić liczbę składników niespełniających zakresu norm QC oraz

oszacować liczbę zniszczeń z powodu przeterminowania, a także określić średni „wiek” wydawanych KKP. Do porównania użyto danych archiwalnych (KKP inaktywowanych systemem Mirasol) i bieżących (KKP inaktywowanych systemem Intercept). Dodatkowo wyszczególniono podział na KKP zlewany (*system Revos, Terumo BCT*) i KKP z aferezy (*Trima, Terumo BCT*). Na podstawie analizy wyników badań KKP poddanych inaktywacji w systemie Intercept zaobserwowano zwiększoną stratę krwinek płytkowych w Zl. KKP spowodowaną etapem usuwania resztek związku fotocuczulającego i jego fotoproduktów (CAD, *compound adsorption device*). Straty w liczbie krwinek płytkowych nie obserwowano w KKP-Af., ponieważ inaktywacji poddawano KKP z wyższą niż standardowa liczbą krwinek płytkowych. Stwierdzono ponadto, że został wydłużony czas wydania z 2,73–4,03 dnia do 3,31–4,26 dnia (ze względu na konieczność inkubacji z CAD), co przy wydłużeniu czasu ważności i dobrych parametrach QC nie wpływa negatywnie na całość procesu otrzymywania i jakość KKP. Odsetek zniszczeń uległ zmniejszeniu i nie zaobserwowano wzrostu odsetka preparatów niespełniających wymogów QC [9].

## System Theraflex MB Plasma

Podczas kongresu przedstawiono dwie prace plakatowe dotyczące inaktywacji czynników chorobotwórczych w osoczu przy zastosowaniu systemu Theraflex MB Plasma. Prace dotyczyły skuteczności inaktywacji bakterii i wirusów w osoczu przechowywanym w pojemnikach z tworzywa bez ftalanu dwu-2-etyloheksylu (DEHP, *Di(2-ethylhexyl) phthalate*) [10, 11].

## System Theraflex UV-Platelets

Przedstawiciele Bawarskiego Czerwonego Krzyża przedstawili pracę dotyczącą wdrażania inaktywacji czynników chorobotwórczych w KKP przy zastosowaniu systemu Theraflex UV-Platelets, w którym zastosowano wyłącznie promieniowanie ultrafioletowe w zakresie UV-C (długość fali: 100–280 nm) (UV-C, *ultraviolet radiation in the UV-C range*), co powoduje, że biorcy KKP poddanego inaktywacji w tym systemie nie są narażeni na działanie nawet śladowych ilości związków chemicznych. Celem pracy było przeprowadzenie walidacji procesu i ocena jakościowa inaktywowanego KKP. Do tego celu wykorzystano 6 podwójnych jednostek KKP-Af., które podzielono na grupę badaną (B) — inaktywowane z wyko-

rzystaniem systemu *Theraflex UV Platelet* oraz grupę kontrolną (C). Wszystkie jednostki KKP przechowywano w temperaturze 22°C z wytrząsaniem. Wyniki badań kontroli jakości mieściły się w zakresie normy dla poszczególnych parametrów kontroli jakości, średnia zawartość krwinek płytkowych w obu grupach była zbliżona, obie grupy wykazywały także podobne wyniki odpowiedzi na szok hipotoniczny i „swirling”. W grupie badanej stwierdzono wprawdzie większe zużycie glukozy, jednak w obu przypadkach (C i B) glukoza była obecna jeszcze w 9. dniu przechowywania [12].

### System z S-303 (amustaliną) i glutationem

Metody inaktywacji składników krwi zawierających czerwone krwinki są aktualnie w fazie intensywnych badań. Jedną z takich metod jest metoda chemiczna oparta na działaniu amustaliny (S-303) i glutationu (GSH). Amustalina sprawnie przechodzi przez błony komórek i otoczkowych wirusów i wbudowuje się w spiralne regiony kwasów nukleinowych, tworząc wiązania poprzeczne poprzez dialkilującą grupę. Amustalina reaguje także między innymi z fosforanami, białkami i wodą. Aby zapobiec tym niespecyficznym reakcjom, jest dodawany glutation (GSH, *γ-L-glutamyl-L-cysteinylglycyna*). Ze względu na fakt, że w licznych badaniach klinicznych w ostatnich latach stwierdzono tworzenie się neoantygenów i przeciwciał u pacjentów wrażliwych po zastosowaniu KKCz poddanych inaktywacji z zastosowaniem metody chemicznej (amustalina i glutation), naukowcy z Niemiec przeprowadzili badania, których celem było wskazanie optymalnej metody do oznaczania tych przeciwciał. Na podstawie otrzymanych wyników badań stwierdzono, że przeżycie czerwonych krwinek *in vivo* można badać z wykorzystaniem cytometru przepływowego za pomocą testu akrydyny lub biotyny (równorzędne testy). Jednocześnie podkreślono, że test z wykorzystaniem akrydyny nie wymaga dodatkowych etapów przygotowania [13].

### Podsumowanie

Podczas 33. Kongresu ISBT przedstawiono bardzo różnorodne prace dotyczące inaktywacji. Oceniono jakość KKP poddanych inaktywacji w nowym, prototypowym iluminatorze zastosowanym w systemie Intercept, sprawdzono skuteczność systemu Intercept w stosunku do nowych szczepów bakterii w KKP oraz przeprowadzono pilotażowe badania oceniające korzyści z wpro-

wienia nowych związków chemicznych do roztworu wzbogacającego PAS-E, które pozwolą poprawić jakość KKP poddanych inaktywacji w systemie Intercept. Przedstawiono także pracę, kontrowersyjną z punktu widzenia polskich przepisów, której celem było obniżenie zniszczeń jednostek osocza. Przypomniano metodę inaktywacji czynników chorobotwórczych w KKP, w której zastosowano wyłącznie UVC. Wprawdzie metoda zastosowana w systemie Therflex UV Platelets otrzymała oznakowanie CE w 2009 roku, to jej zastosowanie wydaje się ograniczone. Niepokojące jest to, że wbrew oczekiwaniom bardzo mało prac dotyczyło systemów do inaktywacji czynników chorobotwórczych w KP i KKCz, co świadczy o tym, że rutynowe wprowadzenie systemów zwiększających bezpieczeństwo preparatów czerwonych krwinek jest jeszcze odległe w czasie. Skupiono się także na nowych wyzwaniach stawianych przed krwiodawstwem — między innymi na konieczności zmiany plastyfikatora w obecnie stosowanych zestawach do pobierania, przechowywania i preparatyki krwi, w tym do inaktywacji. Tematyka podjętych zagadnień świadczy o nieustannej chęci rozwoju i poprawiania parametrów otrzymywanych składników krwi, a tym samym otrzymywania składników krwi bardziej bezpiecznych i o wyższej jakości.

**Konflikt interesów:** nie zgłoszono

### Piśmiennictwo

1. Seltsam A. Update on pathogen inactivation of whole blood, red blood cells, platelets and plasma. *Vox Sang.* 2023, PA08-L01, doi: 10.1111/vox.13433.
2. Richard P, Thibert J, Malard L et al. Implementation of 100% pathogen-reduced platelet concentrates in France: Impact on manufacturing and issuing of platelet concentrates as well as on the risk of transfusion-transmitted infections. *Vox Sang.* PA08-L02, doi: 10.1111/vox.13433.
3. Hechler B, Brouard N, Rudwill F, Mouriaux C, et al. In vitro biochemical and functional characteristics of stored (double-dose) buffy-coat platelet concentrates treated with amotosalen and a prototype UVA light-emitting diode illuminator. *Vox Sang.* 2023, P202, doi: 10.1111/vox.13433.
4. Krath M, Nahata P, McCormack M, Johnson A, et al. Amotosalen and UVA treatment of enterobacter soli, leclercia adecarboxylata and staphylococcus saerohycticus from a contaminated apheresis platelet unit. *Vox Sang.* 2023, P203, doi: 10.1111/vox.13433.
5. Nahata P, McCormack M, Johnson A, Stafford B, et al. Inactivation of WHO reference bacterial strains in platelet and plasma components using Amotosalen/UVA treatment. *Vox Sang.* 2023, P209, doi: 10.1111/vox.13433.
6. Auvinen M, Löf H, Knutson F. Pathogen reduced plasmas from maxi-pools combined with fast thawing for use in emergency situations. *Vox Sang.* 2023, P207, doi: 10.1111/vox.13433.

7. Van Der Meer P, Groot S, Klei T. Improvement of platelet quality after pathogen inactivation. *Vox Sang.* 2023, P206, doi: 10.1111/vox.13433.
8. Bubiński M, Gronowska A, Lasocka J, Lachert E. Evaluation of CD44, CD47 and annexin V expression in leuko-reduced packed RBCs stored in additive solution obtained from WB subjected to pathogen inactivation and separation. *Vox Sang.* 2023, P212, doi: 10.1111/vox.13433.
9. Malvaux N, Defraigne F, Schuhmacher A. Initial experience of switching pathogen inactivation system with extended platelet shelf life. *Vox Sang.* 2023, P205, doi: 10.1111/vox.1343.
10. Gravemann U, Sumian C, Schulze T. Virus inactivation of plasma by methylene blue/light treatment using a DEHP-free bag system. *Vox Sang.* 2023, P204, doi: 10.1111/vox.13433.
11. Gravemann U, Sumian C, Schulze T. Bacteria elimination from plasma by methylene blue/light treatment using a DEHP-free bag system. *Vox Sang.* 2023, P208, DOI, doi: 10.1111/vox.13433.
12. Handke W, Dresel S, Seltsam A. Implementation of a UVC-based pathogen reduction treatment for apheresis platelets at regional blood service in Germany. *Vox Sang.* 2023, P210, doi: 10.1111/vox.13433.
13. Benjamin RJ, Pitman JP, von Goetz M, et al. A pilot study tracking pathogen reduced RBCs in vivo using Surface acridine and biotin flow cytometric markers. *Vox Sang.* 2023, P211, doi: 10.1111/vox.13433.