

Disminución de la actividad de los factores de la coagulación en el plasma fresco inactivado con azul de metileno

Alejandro Zamanillo Sainz¹, Ascensión Ramos Garrido², Enrique Moreno Cebeira³

Med Mil (Esp) 2002; 58 (1): 16-18

RESUMEN

Antecedentes y objetivos: Para reducir el riesgo de transmisión viral por la transfusión de componentes plasmáticos, se emplean métodos de inactivación viral. Se estudia si el proceso de fotoinactivación del Plasma Fresco Congelado (PFC) con Azul de Metileno disminuye la actividad de los factores de coagulación del mismo, valorando el cumplimiento de los criterios de calidad y si pueden ser utilizados como materia prima para la producción de crioprecipitados. **Material y métodos:** Se preparan 24 "pooles" de dos unidades de plasma, separándose cada uno en dos alícuotas, una se somete a fotoinactivación y la otra es congelada y reservada como "control". Se determina la actividad de los factores de coagulación FV, FVIIIc y Fibrinógeno en las dos muestras de PFC. Para el análisis de datos se empleó el paquete estadístico SPSS 9.0, realizándose la prueba "t" Student para datos apareados de la actividad de los factores. **Resultados:** La disminución de los factores del PFC inactivado frente a PFC control fue significativa ($p < 0,01$), siendo esta disminución de 28 UI/dl para FVIIIc, 26 UI/dl para FV y 32 mg/dl para el Fibrinógeno. **Conclusiones:** 1º. Existe una pérdida significativa de actividad del factor VIIIc en el plasma fotoinactivado. 2º No debería ser utilizado el PFC fotoinactivado para la obtención de Crioprecipitado.

PALABRAS CLAVE: Plasma fresco congelado, inactivación viral, azul de metileno, factores de coagulación. Crioprecipitado.

INTRODUCCIÓN

El Plasma Fresco Congelado (PFC) es un componente sanguíneo que se obtiene a partir de la congelación rápida del plasma procedente de la centrifugación y posterior separación de una unidad de sangre total. Este componente contiene unos niveles normales de factores de coagulación estables (albúmina e inmunoglobulinas) y un mínimo del 70% de los otros factores de coagulación lábiles.

Al contener este PFC todos los factores de coagulación de la sangre, sus indicaciones terapéuticas principales son las alteraciones de la coagulación, sobre todo en aquellas donde existe un déficit múltiple de factores y especialmente en aquellas donde el factor deficiente no puede elaborarse por la industria farmacéutica. Actualmente el único factor de coagulación que no se produce industrialmente es el factor V.

El PFC sirve también como materia prima para la obtención de otro componente sanguíneo, el crioprecipitado. Este último contiene la mayoría del factor VIII coagulante (FVIIIc), factor von Willebrand, Fibrinógeno, factor XIII y fibronectina, presentes en el plasma original.

El PFC no empleado en la transfusión ni en la preparación de crioprecipitado se utiliza como materia prima en el fraccionamiento industrial para la producción de concentrados de factores. Una Unidad de plasma fresco debe contener 0,7 U.I. de factor VIII por mililitro. De todos modos, una unidad de plasma con un contenido inferior, puede utilizarse igualmente para la producción de concentrados de factores de coagulación (1).

La legislación española determina que a toda donación de sangre se le practiquen unas pruebas obligatorias de cribado de aquellos virus transmisibles por la sangre o hemoderivados (2). Estos incluyen la determinación del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), anticuerpos contra los virus de la hepatitis C (VHC) y anticuerpos contra los virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1 y VIH-2). De este modo no se elimina de forma completa el riesgo de transmisión de una enfermedad vírica, ya que, además de estos virus, existen otros con una importancia relevante, como el caso del virus linfotrópico humano de células T (HTLV), Citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, parvovirus B19, etc... Además, con estas pruebas de cribado, resulta imposible detectar la presencia del anticuerpo (caso del VIH y del VHC) o del antígeno (caso del HBsAg) si nos encontramos en lo que se conoce como «período ventana».

La duración del período ventana si se utilizan pruebas de cribado de segunda generación se estima en la actualidad en 22 días para el VIH-I/II (rango de 6-38 días) (3), de 59 días para el VHB (rango de 37-87 días) (4), de 82 días para el VHC (rango de 54-192 días) (5). La duración del período de ventana con pruebas de tercera generación es de 70 días (6).

La probabilidad de que una unidad de sangre infectada sea donada durante el «período ventana», ha sido estimada en 1 de cada 103.000 transfusiones para el virus de la hepatitis C, 1 cada 63.000 transfusiones para el VHB y 1 cada 493.000 transfusiones para el VIH (7).

¹ Comandante farmacéutico. Doctor en Farmacia. Servicio Central de Hematología y Hemoterapia (Hospital Militar Central "Gómez Ulla"). Madrid.

² Capitán médico. Alumna de la Especialidad de Hematología y Hemoterapia. Servicio Central de Hematología y Hemoterapia (Hospital Militar Central "Gómez Ulla"). Madrid.

³ Teniente Coronel médico Diplomado en Hematología y Hemoterapia. Servicio Central de Hematología y Hemoterapia (Hospital Militar Central "Gómez Ulla"). Madrid.

Dirección para correspondencia: Capitán Médico D^a Ascensión Ramos Garrido. Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Militar Central "Gómez Ulla". Glorieta del Ejército, s/n. 28047 Madrid. Tel. 91 422 80 00. Ext. 8059.

Aceptado: 16 de febrero de 2000.

En el año 1998 se establecen en España (8) los "Principios de actuación dirigidos a aumentar la seguridad del plasma para uso transfusional", determinándose la utilización del plasma según los siguientes criterios:

- Plasma procedente de la misma donación que el concentrado de hematíes o concentrado de plaquetas ya transfundido a un paciente.
- Plasma mantenido en cuarentena. Es aquel plasma procedente de donación que tras un primer control inicial, es almacenado durante un período de tiempo variable suficiente para cubrir el "período ventana" habitual de los marcadores virales conocidos. Tras este tiempo el plasma es nuevamente sometido a control. Si sigue siendo negativo, esta unidad puede ser "liberada" y utilizada.
- Plasma inactivado. El que proviene de plasma sometido a técnicas estandarizadas de reducción de carga viral. Los dos métodos utilizados en la actualidad son el "solvente detergente" y la inactivación fotodinámica con azul de metileno.

MÉTODOS DE INACTIVACIÓN DEL PLASMA

SOLVENTE-DETERGENTE

Las unidades de plasma son descongeladas y mezcladas en lotes de 250 a 400 litros. Se adiciona tri(n-butil)fosfato (solvente) y Tritón X-100 (detergente) durante 4 horas a 30°C (9). Los reactivos se eliminan, siendo el plasma recongelado posteriormente. Es una técnica con una eficacia demostrada para los virus encapsulados (HIV, HCV y HBV), siendo poco efectiva para virus no encapsulados, como el virus de la hepatitis A, parvovirus B o virus de la encefalomiocarditis (10).

INACTIVACIÓN FOTODINÁMICA

La técnica consiste en añadir azul de metileno en baja concentración (1 mM) a las unidades individuales de plasma fresco, y colocarlas bajo la acción de luz visible (50.000 lux) durante 60 minutos. El azul de metileno muestra una elevada afinidad por los ácidos nucleicos y estructuras virales de superficie. Al someter al plasma a una energía luminosa entre 600 y 660nm, el azul de metileno es capaz de generar un radical libre de oxígeno que causa la destrucción de los ácidos nucleicos víricos (11) El procedimiento es eficaz en la eliminación de los virus encapsulados (12-14). Los virus sin cápsula lipídica son resistentes al proceso de inactivación (9,15), con excepción del parvovirus B19 que parece ser sensible (16). El método no inactiva virus intracelulares como el HTLV-I y II, pero como el plasma es sometido a congelación y descongelación, cualquier diseminación de partículas virales por leucocitos contaminados es eliminada. Su ventaja sobre el solvente-detergente es que se puede realizar sobre la unidad original de plasma fresco, evitando las mezclas de plasma procedente de diferentes donantes. Un inconveniente de esta técnica es la hipotética toxicidad del colorante (17), aunque las concentraciones utilizadas en la inactivación están muy por debajo de las empleadas en clínica para el tratamiento de metahemoglobinemia (9).

Durante el proceso de fotoinactivación viral se produce además una pérdida de actividad de los factores de coagulación (15,18-19).

Se trata de estudiar si el efecto que produce dicho proceso modifica de manera significativa la actividad de los factores de coagulación, comprobándose si el PFC inactivado cumple los requisitos de los estándares de calidad y si este componente sanguíneo puede ser utilizado como materia prima para la preparación de crioprecipitado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se extrae 450 ml \pm 10% de sangre de donante voluntario en un sistema de bolsas cuádruple (BB*AGQ456S7. Teruflex) conteniendo como anticoagulante-conservante 63 ml de CPD: 206 mg Acido cítrico (hidro) USP, 166 mg Citrato sódico (hidro) USP, 140 mg Bifosfato sódico (hidro) USP y 1,46 g Glucosa (anhidra) USP.

La bolsa de sangre se centrifuga a 3931 g, 12 minutos a 4°C (Cryofuge 6000. Heraeus Sepatech), separándose el plasma sobrenadante y la capa leucoplaquetaria con el sistema de fraccionamiento automático (T ACE-Terumo).

Se preparan 24 "pools" de dos unidades de plasma isogrupo, separándose cada "pool" en dos alícuotas. Inmediatamente después de la separación, se congelan los plasmas de forma rápida hasta -60°C (VM 07/100. Heraeus Vötsch), almacenándose posteriormente en un congelador (UCV 40560. Koxka) a -40°C.

Uno de los grupos se envía para ser fotoinactivado con azul de metileno por el laboratorio BIOMAT S.A., mientras que el otro grupo permanece almacenado en nuestro Servicio a -40°C, considerándose grupo control. El plasma fotoinactivado se recibe nuevamente en nuestro Servicio al cabo de 40 días, almacenándose en el congelador de -40°C.

Después de un período de tiempo comprendido entre 60 y 75 días se analiza la actividad de los factores de coagulación V, factor VIII coagulante (FVIIIc) y Fibrinógeno. Para esta determinación se utiliza el autoanalizador de coagulación STA (Boehringer Mannheim-Roche) y reactivos STA (Diagnóstica Stago, Boehringer Mannheim-Roche). La determinación del fibrinógeno se realiza por el método de von Claus.

Se realiza un estudio comparativo con datos apareados referentes a los factores de coagulación del grupo de PFC fotoinactivado con azul de metileno frente al grupo control. Los datos se procesan con el paquete estadístico SPSS 9.0., comprobándose el supuesto de normalidad de la distribución de la diferencia de medias con la prueba de Shapiro-Wilks. Se realiza la prueba "t" Student para datos apareados de la actividad de los factores de coagulación en el PFC control y en el PFC inactivado.

RESULTADOS

La disminución de los factores del PFC inactivado en relación con el PFC control fueron de 28 UI/dl ($p < 0,01$) para el FVIII, 26 UI/dl ($p < 0,01$) para el FV, y 32 mg/dl ($p < 0,01$) para el Fibrinógeno (Tabla 1).

En el caso del factor VIII coagulante, los valores medios y el intervalo de confianza para un 95% (Tabla 2) son de 70,4 UI/dl (62,2; 78,6) para el PFC inactivado y 97,9 UI/dl (86,2; 109,6) para el PFC control.

Tabla 1. Análisis estadístico de la disminución de los factores de coagulación en el plasma fresco fotoinactivado.

	Diferencias de las medias	Grado de Significación	Disminución de los factores de coagulación para un 95% de I.C.
Fibrinógeno	31,8	p<0.01	(27,9; 35,7)
Factor V	25,6	p<0.01	(21,5; 29,8)
Factor VIIIc	27,5	p<0.01	(20,3; 34,7)

Tabla 2. Medias e intervalos de confianza para un 95% de los factores de coagulación en el PFC (plasma control) y en el PFC fotoinactivado.

	Plasma Control	Plasma Fotoinactivado
Fibrinógeno	231,9 (219,7; 244,2)	200,1 (186,2; 213,9)
Factor V	96,6 (91,7; 101,5)	71 (65,2; 76,8)
Factor VIIIc	97,9 (86,2; 109,6)	70,4 (62,2; 78,6)

DISCUSIÓN

Existe una pérdida significativa de actividad del factor VIIIc en el PFC fotoinactivado. Aunque la media de la actividad cumple las recomendaciones del Consejo de Europa (20), un número elevado de estas unidades presentan un nivel de FVIIIc inferior a las 70UI/dl, incumpliendo de este modo los estándares de calidad (21).

Una forma de conseguir que todos los plasmas inactivados cumplan con los estándares de calidad es utilizar plasmas de los grupos A, B y AB, excluyendo los del grupo O, ya que éstos presentan unas tasas de factor VIIIc inferiores a las del resto de los grupos (22).

La "Guía para la preparación, uso y control de calidad de los componentes sanguíneos" (20) exige en los crioprecipitados producidos un mínimo de 70 UI de FVIIIc y 140 mg de fibrinógeno por unidad de crioprecipitado.

Dado que encontramos una disminución significativa en la actividad de los factores anteriormente comentados en el PFC fotoinactivado, en el caso de necesitar obtener crioprecipitados no debería utilizarse éste como materia prima.

Al no estar contemplada legalmente la posibilidad de fotoinactivar los crioprecipitados, la única posibilidad de obtener crioprecipitados seguros para la transfusión es su obtención a partir de PFC cuarentenado. La ausencia de manipulaciones en el plasma fresco cuarentenado (descongelación, incubación, irradiación lumínica, etc.) permitiría obtener unos crioprecipitados con unos niveles de factores de coagulación superiores a los obtenidos a partir del PFC fotoinactivado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Real Farmacopea Española. Ministerio de Sanidad y Consumo. Primera Edición. 1997:1458-9.
2. Real Decreto 1854/93, del 22 de octubre de 1993, por el que se determina con carácter general los requisitos técnicos y condiciones mínimas de la hemodonación y bancos de sangre. Ministerio de Sanidad y Consumo. BOE 1993; 278: 32630-6.
3. Busch MP, Lee LLL, Satten GA, Henrard DR, Farzadegan H, Nelson KE, et al. Time course of detection of viral and serologic markers preceding human immunodeficiency virus type I seroconversion: implications for screening of blood and tissue donors. *Transfusion* 1995; 35: 91-97.
4. Mimms LT, Mosley JW, Hollinger FB, Aach RD, Stevens CE, Cunningham M, et al. Effect of concurrent acute infection with hepatitis C virus on acute hepatitis B virus infection. *BMJ* 1993; 307:1095-7.
5. Lelie PN, Cuypers HT, Reesink HW, van der Poel CL, Winkel Y, Bakker E, et al. Patterns of serological markers in transfusion-transmitted hepatitis C virus infection using second-generation HCV assays. *J Med Virol* 1992; 37: 203-9.
6. Busch MP, Korelitz JJ, Kleinman SH, Lee SR, Aubuchin JP, Schreiber GB. Declining value of alanine aminotransferase in screening of blood donors to prevent posttransfusion hepatitis B and C virus infection. *Transfusion* 1995;35:903-10.
7. Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, Korelitz JJ. The risk of transfusion-transmitted viral infections. *N Engl J Med* 1996; 334:1685-90.
8. Orden 13741 de 2 de junio de 1998 por la que se establecen principios de actuación dirigidos a la seguridad del plasma para uso transfusional. Ministerio de Sanidad y Consumo. BOE 1998; 139: 19293-4.
9. Williamson LM, Allain JP. Virally inactivated fresh frozen plasma. *Vox-Sang*. 1995; 69: 159-65.
10. Horowitz B, Bonomo R, Prince Am, Chin SN, Brotman B, Shulman RW. Solvent/Detergent-treated plasma: a virus-inactivated substitute for fresh frozen plasma. *Blood* 1992;79:826-831.
11. Muller-Breitkreutz K, Mohr H, Briviva K, Sies H. Inactivation of viruses by chemically and photochemically generated singlet molecular oxygen. *J Photochem Photobiol B* 1995; 30: 63-70.
12. Muller-Breitkreutz K, Mohr H. Hepatitis C and human immunodeficiency virus RNA degradation by methylene blue/light treatment of human plasma. *J Med Virol* 1998; 56: 239-45.
13. Bachmann B; Knuver-Hopf J; Lambrecht B; Mohr H. Target structures for HIV-1 inactivation by methylene blue and light. *J Med Virol* 1995; 47: 172-8.
14. Lambrecht B, Norley SG, Kurth R, Mohr H. Rapid inactivation of HIV-1 in single donor preparations of human fresh frozen plasma by methylene blue/light treatment. *Biologicals* 1994; 22: 227-31.
15. Lambrecht B, Mohr H, Knüver-Hopf, Schmitt H. Photoinactivation of viruses in human fresh plasma by phenothiazine dyes in combination with visible light. *Vox Sang* 1991; 60: 207-213.
16. Mohr H, Bachmann B, Struckmeier-Klein A, Lambrecht B. Virus inactivation of blood products by phenothiazine dyes and light. *Photochem Photobiol* 1997;65: 441-5.
17. Wagner SJ; Cifone MA; Murli H; Dodd RY; Myhr B. Mammalian genotoxicity assessment of methylene blue in plasma: implications for virus inactivation. *Transfusion* 1995; 35: 407-13.
18. Mohr H, Lambrecht B, Selz A. Photodynamic virus inactivation of blood components. *Immunological Investigations*. 1995; 24: 73-85.
19. Zeiler T, Riess H, Wittmann G, Hintz G, Zimmermann R, Muller C, et al. The effect of methylene blue phototreatment on plasma proteins and in vitro coagulation capability of single-donor fresh-frozen plasma. *Transfusion*. 1994; 34: 685-9.
20. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 5th edition Council of Europe Publishing. 1999.
21. Estándares en Transfusión. Comité de Acreditación en Transfusión. Enero 1998.
22. Aznar JA, De Miguel A, Franco E, Hernández JM, Tascón A, Vesga MA. Indicaciones terapéuticas del plasma fresco fotoinactivado con azul de metileno. *Rev Iberoamer Tromb Hemostasia* 1998;11: 60-62.