



## Inactivación de Patógenos

### Objetivo General

Conocer la implementación de nuevas tecnologías enfocadas en la inactivación de patógenos, en diferentes componentes sanguíneos.

### Objetivos Específicos

1. Identificar los procesos biológicos y los componentes que se utilizan en cada una de las técnicas descritas.
2. Describir los beneficios y desventajas de cada una de las técnicas.

### Marco Teórico

Como ya se ha mencionado, se reconoce que al momento de transfundir cualquier componente sanguíneo se documenta el riesgo de transmisión de cualquier agente infeccioso. En la actualidad, este riesgo es de baja incidencia, gracias a la implementación de criterios de calidad en la selección de donantes y en la generación de procesos dirigidos por los bancos de sangre con metodologías altamente sensibles. Producto de ello es una morbimortalidad inferior a la de otras reacciones adversas relacionadas con la transfusión, sin embargo, este continúa siendo un riesgo transfusional grave. (1,2,3)



## ¿Qué es inactivación de patógenos?

Los términos inactivación y reducción de patógenos (IP y RP) se utilizan indistintamente, pero muchos autores prefieren el segundo, porque no se puede garantizar la esterilidad total y, aunque esto fuera posible, no se podría demostrar. Los procesos de IP o RP tienen por objeto inactivar virus, bacterias y parásitos presentes en los componentes sanguíneos, que pueden tener efectos nocivos en el receptor de la transfusión, sin comprometer su eficacia terapéutica ni causar efectos adversos. (1)

Como se documenta a lo largo de la guía, aún no se ha encontrado una técnica de inactivación de patógenos en sangre completa, con la cual se puedan obtener componentes sanguíneos inactivados después del fraccionamiento de esta. Es por ello, que a lo largo del documento, se describen las diferentes técnicas de inactivación de patógenos, según el componente sanguíneo. Cabe aclarar que las condiciones físicas y químicas que presentan los distintos componentes sanguíneos condicionan el método que se debe utilizar para la inactivación de patógenos, lo que ha hecho desarrollar métodos distintos para cada componente. (1)

Teniendo en cuenta esta premisa, las primeras técnicas disponibles para su comercialización, fueron los métodos usados en la inactivación de plasma. Posteriormente, han ido apareciendo diversos métodos dirigidos a la inactivación de concentrados de plaquetas. Y con respecto a la inactivación de concentrados de hematíes, a nivel comercial, todavía no se encuentra ningún método disponible. (1,2)

Es importante tener en cuenta que la efectividad de los métodos disponibles varía en función de los agentes a inactivar, siendo muy alta en la mayoría de bacterias y virus, especialmente los encapsulados, y considerablemente inferior en los parásitos. Ninguno de los métodos disponibles es efectivo frente a priones. Otro elemento importante en el uso de métodos de Inactivación de patógenos en componentes sanguíneos es que algunos de estos conllevan la irradiación gamma del componente, para prevenir la enfermedad injerto contra huésped asociada a transfusión. (1)



## 1. Inactivación con solvente-detergente (S-D)

Es el método clásico aplicado desde hace 20 años por la industria farmacéutica para la esterilización de fracciones purificadas de proteínas plasmáticas y adaptado al plasma completo. Consiste en el tratamiento del plasma con una mezcla de un solvente orgánico no volátil y un detergente, causando la ruptura de la cubierta lipídica de los virus encapsulados, como VIH, VHB, VHC, CMV, VEB, HTLV, o herpes, e impidiendo así su capacidad de infección y replicación. (1)

Estos reactivos solvente-detergente potencialmente tóxicos se eliminan con aceites y cromatografía hidrofóbica, dejando trazas en el producto final. Este método no inactiva a los virus no encapsulados, como el parvovirus B19 o el virus VHA, y está por demostrar su grado de eficacia frente a parásitos, bacterias o priones. Debido a que este método se basa en la destrucción de las membranas plasmáticas, este no se puede aplicar a la inactivación de los componentes sanguíneos celulares. (1,2)

Actualmente, existen dos productos de plasma S-D de uso clínico octoplas (plasma ABO específico) comercializado en Europa por la empresa Octapharma (Suiza) y el bioplasma FDP obtenido en Sudáfrica (National Bioproducts Institute). (1)

El método S-D provoca una pérdida moderada (10- 20%) de factores de la coagulación y de otras proteínas plasmáticas, que depende de la fuente de plasma y de las condiciones de tratamiento. (1)

Algunas unidades de plasma S-D en Estados Unidos mostraron una disminución excesiva de proteínas anticoagulantes (proteína S, antitripsina, y antiplasmina), lo que se relacionó con episodios tromboticos en pacientes con púrpura trombótica trombocitopénica (PTT), además de ello se presentaron casos de fallecimiento de pacientes sometidos a trasplante hepático, poniendo en duda su valor clínico en estos contextos. Sin embargo, ensayos clínicos controlados con un número reducido de pacientes, no han confirmado este problema. (1,2)

Una ventaja clínica adicional del plasma S-D es su capacidad para reducir el riesgo de sufrir TRALI y reacciones alérgicas/anafilácticas por el efecto de dilución y neutralización de los anticuerpos y/o sustancias bioactivas implicados en esos efectos adversos. (1,2)



## 2. Inactivación con azul de metileno (AM)

El azul de metileno es un colorante fenotiazina de carga positiva que cuando se activa con luz se produce una reacción fotodinámica y genera compuestos reactivos de oxígeno que atacan las guaninas de los ácidos nucleicos. Este método se aplica a unidades individuales de plasma y el colorante residual se elimina casi por completo del producto tratado mediante un dispositivo de filtración. (1,2)

El método de inactivación AM es eficaz contra la mayoría de virus encapsulados y algunos no encapsulados, pero es básicamente inactivo frente virus intracelulares, bacterias, y parásitos, por su incapacidad para atravesar las membranas. No está probada su validez frente a priones. (1)

Varios estudios han mostrado que el AM causa también una disminución variable (20-35 %) de proteínas plasmáticas, con un efecto negativo sobre el fibrinógeno y el FVIII. (1)

Aunque la experiencia clínica sugiere que el plasma AM es seguro y clínicamente útil, la realidad es que no hay datos sobre su eficacia y seguridad derivados de ensayos aleatorizados amplios y controlados. La dificultad con este método de inactivación se centra en el potencial mutagénico del colorante o de sus derivados, incluso a las bajas dosis que reciben los pacientes transfundidos. (1)

Se documentan al menos dos publicaciones europeas, en las cuales se informa que la transfusión de plasma tratado con azul de metileno se relaciona con severas reacciones transfusionales que requerían múltiples días de hospitalización de los receptores. Durante la investigación de los casos se descubrió una respuesta inmune específica subyacente al azul de metileno. (2)



### 3. Inactivación con psoraleno y luz ultravioleta. Intercept.

Se considera la tecnología líder, la cual obtuvo la aprobación CE (Conformidad Europea) para plaquetas en 2002 y en 2006 para plasma. (2). Estos productos tienen la capacidad de atravesar las membranas celulares y las cápsidas virales. Estas pequeñas moléculas se cruzan entre las bases del ADN y el ARN, y cuando se iluminan con luz ultravioleta (UV)(320-400 nm) reaccionan, formando enlaces covalentes, independiente del oxígeno (reacción fotoquímica) (2). Estos enlaces cruzados, o “cross-linking”, impiden la replicación del ADN (o ARN) y con ello, se pierde la viabilidad del agente infeccioso. (1)

Un psoraleno S-59 o amotosaleno es el compuesto empleado en el sistema de inactivación de plasma y plaquetas denominado Intercept, desarrollado y comercializado en Europa (con licencia desde 2006) por la compañía Cerus (Estados Unidos). Intercept es efectivo contra virus encapsulados, bacterias, parásitos, leucocitos, y algunos virus no encapsulados. Su eficacia frente a priones no está demostrada. Durante el proceso de inactivación, el exceso de psoraleno y sus fotoproductos se eliminan en su mayor parte, mediante un dispositivo de absorción, pero como el S59 también se une a lípidos y a proteínas plasmáticas, un pequeño porcentaje del producto añadido queda retenido y pasa al paciente con la transfusión. (1)

La actividad de los factores de la coagulación está moderadamente reducida en el plasma-amotosaleno (10- 25%) respecto al plasma no tratado. A diferencia del plasma S-D, la fotoinactivación con amotosaleno no afecta de manera relevante a las proteínas antitrombóticas (proteínas C y S, antiplasmina, y antitrombina) (1)

Esta técnica también aplica para los componentes plaquetarios, producto de su mecanismo de acción, el sistema produce una inhibición de la capacidad proliferativa de las células T, siendo una alternativa a la radiación gamma para prevenir la enfermedad injerto contra huésped asociada a la transfusión (EICH-AT). (1,2)

La efectividad para inactivar las bacterias que con más frecuencia contaminan los componentes sanguíneos es alta. Se ha constatado sensibilidad en espiroquetas como *Treponema pallidum*, *Borrelia burgdorferi*, y se han tenido buenos resultados de inactivación, en el caso de algunos protozoos como *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum*, *Leishmania* y *Babesia microti*.

En 2014, el sistema Intercept se convirtió en la primera técnica que logró obtener plaquetas reducidas en patógenos (PRT) y cuyo uso fue aprobado en los Estados Unidos por la FDA. Actualmente, se encuentra en un estudio de vigilancia posterior a su comercialización. En 2018, obtuvo la licencia en Canadá. (3)



#### 4. Inactivación con riboflavina y luz ultravioleta. (Mirasol)

El último método de inactivación de patógenos en plasma y plaquetas con licencia de comercialización en Europa (año 2008) es el sistema Mirasol desarrollado por Navigant (Caridian Bct, Estados Unidos. También se trata de un método de fotoinactivación con luz ultravioleta, pero en este caso, el compuesto inactivador es la vitamina B2 o riboflavina. (1) La tecnología Mirasol “riboflavin plus UV”, utiliza un rango de luz ultravioleta de 265 a 370nm (6.2 J/mL) que abarca el 100 % de regiones UVB, el 20 % de UVC y el 60 % de UVA, y la constante de baja afinidad para la unión al ácido nucleico resultante permite la generación de una cantidad significativa de especies reactivas del oxígeno en solución libre. (2) La riboflavina se intercala entre las bases de los ácidos nucleicos, y cuando se ilumina con luz UV deteriora el ADN/ARN por transferencia de electrones y formación de radicales de oxígeno e hidroxilo, (reacciones fotodinámicas), (2) evitando la replicación de potenciales patógenos y a la vez, inactivando funcionalmente a los leucocitos. Por su acción sobre los leucocitos, esta tecnología puede ser una alternativa a la irradiación gamma, y así está aceptado después de concluir un estudio comparativo entre concentrados plaquetarios tratados con Mirasol y concentrados plaquetarios gammairradiados con respecto al efecto sobre la prevención de la EICH-AT. (1,2)

Dado el perfil de seguridad de un compuesto natural como la riboflavina, no es necesaria la eliminación pretransfusión de los fotoderivados acumulados en el producto inactivado, es por ello que se facilita la implementación de esta estrategia en cuanto a equipamiento y disponibilidad del componente. La riboflavina es clasificada por la FDA como un componente seguro. El sistema Mirasol es efectivo para la inactivación de virus encapsulados, algunos encapsulados, bacterias, parásitos, y leucocitos. Su eficacia contra priones tampoco está demostrada. (1)



## 5. Tratamiento con luz UVC (Theraflex UV Platelets technology)

Theraflex se basa en la corta exposición a luz UVC (0,2 J/cm<sup>2</sup>, 254nm) con un ancho de banda angosto para alcanzar la inactivación de patógenos por la formación de dímeros de pirimidina en los ácidos nucleicos, limitando las reacciones adversas inespecíficas directas o reacciones secundarias mediadas por oxígeno. (2) La aplicación de luz UVC, de longitud de onda corta de 200-280 nm, produce un efecto microbicida y virucida, ello por medio de la interacción con ácidos nucleicos, dando como resultado una serie de fotoproductos que bloquean la replicación de los ácidos nucleicos. La metodología del tratamiento, que se halla en las primeras fases de investigación, es de fácil aplicación, porque consta de un solo paso que incluye iluminación y agitación simultánea, sin adición de ningún compuesto o reactivo fotoactivo. (1)

Es probable que en el futuro surja el uso de otras fuentes de luz con o sin compuestos fotoactivos. Por ejemplo, el uso de luz azul visible para inactivar las moléculas de porfirina que se encuentran en los patógenos es un posible enfoque novedoso para la fabricación de plaquetas reducidas en patógenos (PRP). (3)

Mientras que estos sistemas están muy desarrollados en plasma y plaquetas, las condiciones de los concentrados de hematíes dificultan la aplicación de técnicas específicas. Algunas de las características inherentes a los concentrados de hematíes son su viscosidad, el prolongado periodo de almacenamiento, el espectro de absorción de la hemoglobina y los radicales libres que se forman como consecuencia de las reacciones fotodinámicas y que condicionan alteraciones en su estructura y metabolismo. (1)



## 6. Tratamiento con S-303 o Frale (Frangible Anchor Linker Effector)

El método de reducción de patógenos en hematíes más desarrollado actualmente está basado en la tecnología Helinx™, de Cerus Corporation. Se utiliza un agente que no necesita iluminación, el S-303 o FRALE (Frangible Anchor Linker Effector). Se trata de un sistema en el que una sustancia penetra en las células e inhibe de forma irreversible la replicación de los ácidos nucleicos (AN) del potencial patógeno y/o leucocitos del donante y que no actúa sobre los hematíes maduros, que carecen de ácidos nucleicos (1).

El S-303 es una molécula cargada positivamente que se intercala con facilidad entre las regiones helicoidales de los ácidos nucleicos cargados negativamente. Está constituido por tres componentes, el anclaje (la acridina), el efector y el conector frágil. La acridina, encuentra el ácido nucleico y mediante una unión reversible, lo prepara para que actúe el efector. El efector es el agente alquilante, que induce el entrecruzamiento permanente entre las hebras de AN, formando enlaces covalentes irreversibles, de forma que impide su replicación. El conector frágil une el efector al anclaje. Finalmente, la acridina pierde su afinidad por los AN y se desprende de ellos. Los compuestos Frale llevan a cabo su actividad por un cambio de pH que tiene lugar cuando el S-303 se añade a los hematíes. El S-303 se hidroliza por el cambio de pH, dando lugar a un producto de degradación, el S-300, que es metabolizado y excretado rápidamente. (1)

El S-303 puede reaccionar con el agua, fosfatos y proteínas presentes en los concentrados de hematíes, es por ello que para minimizar la unión con la superficie de los hematíes y las proteínas plasmáticas, el tratamiento incluye glutatión (GSH) que actúa como protector de los hematíes. El glutatión es una sustancia natural que se haya presente en la mayoría de los tejidos para proteger a las células del estrés oxidativo y químico del entorno. Este tratamiento ha sido efectivo contra la mayoría de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como diferentes virus (incluso algunos sin envoltura, como el adenovirus), parásitos y protozoos.

Las experiencias clínicas iniciales con este tipo de tecnología demostraron su eficacia en pacientes sometidos a cirugía cardiovascular y en pacientes con talasemia y anemia drepanocítica, sin embargo, revelaron la formación de anticuerpos antieritrocitarios en dos pacientes politransfundidos, sin consecuencias clínicas. (2)



\*\*\*\*\*

Otros métodos de inactivación, en fase menos avanzada de desarrollo, son los que utilizan como agente inactivador Inactine o el Naranja de Tiazol. El Inactine (PEN 110) realiza el proceso de difusión, a través de las células, uniéndose electrostáticamente a los ácidos nucleicos. Los hematíes se incuban con el compuesto a temperatura ambiente durante 6-24 horas y posteriormente, se lavan, eliminando el Inactine. Varios trabajos han demostrado su efectividad frente a virus, bacterias y parásitos, pero la viabilidad de los hematíes permanece en estudio. El Naranja de Tiazol combinado con luz blanca, ha demostrado efectividad en la inactivación de virus encapsulados y algunos protozoos, sin presentar tanta afinidad por los hematíes como otros colorantes. No obstante, son necesarios más estudios para conocer su toxicidad, inmunogenicidad y el impacto en la supervivencia de los hematíes. (1)

\*\*\*\*\*

A medida que se obtiene más experiencia sobre el uso de las tecnologías en países enteros y que se vaya disponiendo de la inactivación de todos los componentes, los beneficios de la inactivación de patógenos se vuelven más tangibles y ofrece esperanza para un suministro de sangre aún más seguro. Un ejemplo de esto se ve en los informes de hemovigilancia de Francia con casos de sepsis relacionada con la transfusión de plaquetas tratadas por Intercept (0/81 756) entre 2006 y 2010, mientras que se observaron 24 casos, incluyendo cinco muertes en el mismo período en Francia en receptores de plaquetas convencionales (24/1 198 693). (2)

La mayoría de los estudios que evalúan la eficacia clínica de las plaquetas reducidas en patógenos se han realizado en pacientes oncológicos hematológicos adultos. La eficacia terapéutica de los PRP en otras poblaciones de pacientes, como los pacientes pediátricos o los pacientes sometidos a transfusión masiva (MT) en el contexto de un traumatismo, trasplante de órganos o cirugía, no se ha estudiado adecuadamente, pero no existen razones a priori para creer que los PRP no proporcionan una eficacia clínica similar en estas poblaciones. (3)



Teniendo en cuenta la información anteriormente descrita se desea hacer un resumen de ello, por medio de un esquema que da a conocer los tipos de técnicas estudiadas para la inactivación de patógenos en los componentes sanguíneos. (Figura 1.).

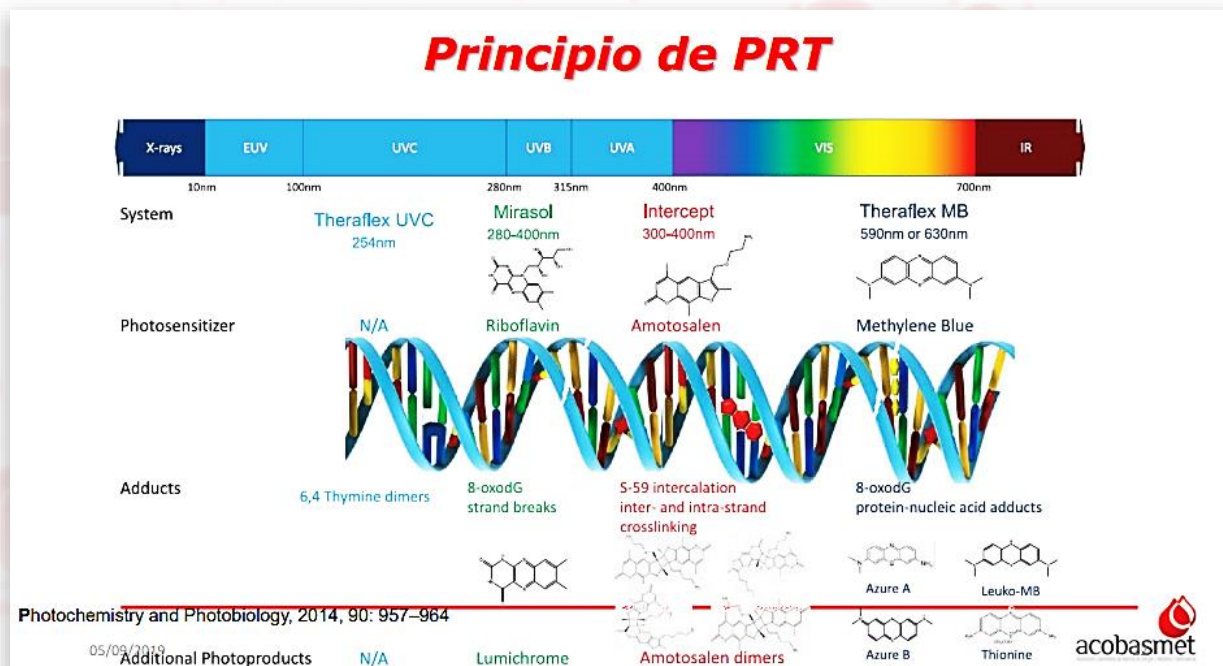


Figura 1. Principio de Tecnologías Reducción de Patógenos.

Fuente: Arnulfo, J. Disponible en:

[https://www.ins.gov.co/Direcciones/RedesSaludPublica/DonacionSangre/Publicaciones/Tecnolog%C3%ADas%20Reduccion%20de%20Pat%C3%B3genos%20\(PRT\).pdf](https://www.ins.gov.co/Direcciones/RedesSaludPublica/DonacionSangre/Publicaciones/Tecnolog%C3%ADas%20Reduccion%20de%20Pat%C3%B3genos%20(PRT).pdf)



## Referencias

1. Callén I. Componentes sanguíneos. Actualización en métodos de inactivación y experiencia disponible. XXI Congreso de la SETS. [Internet] [Junio de 2010]. Disponible en: <http://www.sets.es/index.php/cursos/biblioteca-virtual/congresos-1/congreso-2010/210-ponencias-12-de-junio/file>
2. Prowse C, Stassinopoulos A. Inactivación de patógenos en hemocomponentes. Revisión crítica. Revista Argentina de Transfusión. [Internet] 2014; 43(4): 233-254. Disponible en: <https://www.aahitc.org.ar/rat/RAT042014.pdf>
3. Wen Lu, Mark Fung. Platelets treated with pathogen reduction technology: current status and future direction. Review. F1000Research [Internet] 2020. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6979468/pdf/f1000research-9-22896.pdf>