

Bekanntmachungen des Robert Koch-Instituts

Stellungnahme des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit

In seiner Sitzung am 16. September 1998 hat der Arbeitskreis Blut des Bundesministeriums für Gesundheit die folgende Stellungnahme verabschiedet:

Filtration von zellulären Blutpräparaten

Die indikationsbezogene Leukozytendepletion zellulärer Blutpräparate, z. B. durch Anwendung von Filtrationstechniken, ist medizinisch unumstritten. Aufgrund der Einführung einer generellen Filtration zellulärer Blutpräparate in mehreren europäischen Ländern, z. B. Frankreich, Irland und Portugal sowie der wissenschaftlichen Diskussion um die potentielle Übertragbarkeit von Prionen durch Blutpräparate via Lymphozyten ist die Einführung der generellen Filtration politisch auch in der Bundesrepublik Deutschland in zunehmender Diskussion. Aus Sicht des pharmazeutischen Herstellers sowie aus wissenschaftlicher und medizinisch/ärztlicher Sicht ergeben sich hierzu nach derzeitigem Wissensstand folgende Pro- und Contra-Aspekte für die Einführung der Filtration.

◆ Pro

Argumente für die Einführung einer Filtration

1. Die Methode der Filtration zellulärer Blutpräparate führt zu einer effektiven Abreicherung von Leukozyten. Sie hat sich indikationsbezogen klinisch, z. B. bei der Transfusion immunsupprimierter und chronisch transfusionsbedürftiger Patienten, bewährt.
2. Technisch stehen mit den modernen Systemen effektive und schonende Verfahren zur Leukozytendepletion zur Verfügung. Sie erbringen eine gleichmäßigere Arzneimittelqualität als die verschiedenen konventionellen Verfahren zur Herstellung der buffy coat-freien Erythrozyten- bzw. Thrombozytenkonzentrate. Die Qualität der Zellpräparate sowie die Lagerbeständigkeit bleiben erhalten. Vorübergehend unterschiedliche Einflüsse auf die Zellqualität wie eine initial erhöhte Hämolyserate bzw. geringgradig verstärkte Komplementaktivierung bei der Filtration werden im Verlauf der Lagerung der Präparate wieder ausgeglichen.
3. Studien an perioperativ transfusionspflichtigen Patienten zeigen eine niedrigere Infektionsrate mit leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten im Vergleich zu konventionell hergestellten

Präparaten. Dies deutet darauf hin, daß die Reduktion der Leukozytenkontamination zu einer verringerten Transfusions-assoziierten Infektionsrate führen kann.

4. Die Herstellung zellulärer Blutpräparate ist Arzneimittelherstellung. Ziel des pharmazeutischen Unternehmers muß es sein, die therapeutisch gewünschte Zellfraktion in der bestmöglichen Reinheit zu präparieren, wie dies nach dem aktuellen technischen Stand der Wissenschaft durchführbar ist. Aus dieser allgemeinen Feststellung ergibt sich die Notwendigkeit, nicht zum Arzneimittel zugehörige Blutbestandteile wie im Falle von Erythrozyten- oder Thrombozytenkonzentraten Leukozyten z. B. Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten aus dem Präparat möglichst zu eliminieren. Im Hinblick auf die Qualität und Wirksamkeit der Arzneimittelwirkstoffe und aus medizinisch-ärztlicher

Dieses Papier wurde vom Arbeitskreis Blut am 16.9.1998 verabschiedet. Es wurde erarbeitet von den Mitgliedern der Untergruppe „Filtration von zellulären Blutprodukten“ des Arbeitskreises Blut: Prof. Dr. Biscopio, Dr. Brügggen, Dr. Heiden, Prof. Dr. Kretschmer, Prof. Dr. Seifried (Federführung), Prof. Dr. Seitz, Prof. Dr. Dr. Schramm, Prof. Dr. Trobisch
Für den Arbeitskreis Blut: Prof. Dr. R. Burger, Vorsitzender, Prof. Dr. R. Kroczeck, Geschäftsführer

Sicht ist im Regelfall kein negativer Einfluß der Leukozytendepletion bekannt.

5. Theoretische Überlegungen, klinische Studien und die klinische Erfahrung ergeben eine Fülle bewiesener und potentieller Vorteile gegenüber nicht-filtrierten Blutpräparaten bei der generellen Anwendung:

- ▶ Bessere Verträglichkeit
- ▶ Weniger allergische Reaktionen
- ▶ Geringere Alloimmunisierung
- ▶ Reduktion der Übertragung leukozytenständiger Bakterien und Viren, wie z. B. HTLV-1/-2 sowie der Herpesviren CMV, HHV-8

6. Erste Hinweise aus der Forschung ergeben derzeit eine wissenschaftliche Einschätzung, nach der weder positiv noch negativ entschieden werden kann, ob Prionen beim Menschen mit blutständigen Lymphozyten assoziiert sind, im peripheren Blut zirkulieren und somit eine Übertragung durch zellhaltige Blutpräparate möglich ist. Insoweit könnte die Entfernung von Lymphozyten aus Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten dazu beitragen, das theoretische Risiko der Übertragung von Prionen zu reduzieren.

7. Die Filtration leistet, daß an Leukozyten assoziierte Viren, wie die oben genannten HTLV-1/-2, CMV und HHV-8 oder andere Herpesviren weitgehend aus dem Arzneimittel entfernt werden können. Eine eventuell einzuführende generelle Testung des Spenderblutes bezüglich HTLV-1/-2 bzw. CMV könnten gegebenenfalls entfallen. Ansonsten ohne die Einführung der Filtration zusätzlich entstehende neue Testkosten könnten durch Einführung der Filtration entfallen.

◆ Contra

Argumente gegen die Einführung einer Filtration

1. Bei Einführung einer generellen Filtration zellulärer Blutpräparate muß der Produktionsprozeß zur Herstellung der Präparate völlig umgestellt werden; es sind wesentliche technische und logistische Veränderungen erforderlich. Wichtige Herstellungsverfahren und -bedingungen müssen noch abgeklärt werden. Beispielsweise müßten in Einrichtungen, in denen Random-Thrombozytenkonzentrate hergestellt werden, unterschiedliche Herstellungsverfahren (Vollblutfiltration, Erythrozytenfiltration, Thrombozytenfiltration) etabliert werden. Weitere technische Erfordernisse wie z. B. der Zeitpunkt der Filtration oder die Temperatur (Kaltfiltration) müssen definiert werden.

2. Das Handling von mit Inline-Filtern versehenen Blutbeutelssystemen ist komplizierter als bei konventioneller Herstellung. Es ist nicht auszuschließen, daß beim Herstellungsprozeß unter Verwendung integrierter Filter häufiger Leckagen mit dem Risiko bakterieller Kontaminationen vorkommen können. Zur Klärung dieser Problematik müßten die Hersteller integrierter Blutbeutelssysteme entsprechende Daten liefern.

3. Lange Lagerzeit (18 Stunden) von Vollblut vor der Filtration bei 4°C bewirkt nach ersten Untersuchungen eine Abnahme des hochmolekularen Anteils des von-Willebrand-Faktors (vWF) im filtrierten Plasma. Obwohl aus klinischer Sicht eine geringgradige Verminderung der vWF-Aktivität die bisherige indikationsbezogene Verwendung des GFP nicht beeinträchtigen dürfte, müßte geprüft werden, ob die Lagerbedingungen vor der Filtration optimiert werden könnten und müßten. Nach Warmlagerung bei 22°C über vier Stunden geht die vWF-Aktivität nach jetzigem Kenntnisstand nicht verloren.

4. In der Literatur sind hypotensive Reaktionen nach bed-site-Filtration von Plättchenkonzentraten bei Patienten be-

schrieben, die mit ACE (Angiotensin converting enzyme)-Hemmern behandelt werden. Dieser Effekt wurde auf die Akkumulation von Bradykinin zurückgeführt, das durch die Aktivierung des Kontaktsystems an negativ geladenen Filteroberflächen gebildet wird. Offenbar kommt es zu dieser Bradykininanreicherung in Gegenwart von ACE-Hemmern nur nach bed-site-Filtration. In-vitro-Messungen an Thrombozytenkonzentraten, die an Polyesterwatte mit negativ geladener Oberfläche filtriert wurden, ergaben einen raschen Bradykininabbau durch das ACE. Basierend auf den In-vitro-Messungen und auf den Erfahrungen mit der Transfusion filtrierter Thrombozytenkonzentrate kann davon ausgegangen werden, daß im Herstellungsprozeß filtrierte Blutkomponenten nicht zu hypotensiven Nebenwirkungen führen.

Schlußfolgerung

1. Vorausgesetzt, die angeführten möglichen medizinischen Nachteile wie Bradykinin-induzierte Hypotension und der Verlust an von-Willebrand-Faktor-Aktivität erweisen sich im Vergleich zum medizinischen Nutzen als unerheblich, ist eine generelle Einführung der Leukozytendepletion aus medizinisch/ärztlicher Sicht und aus Sicht des Arzneimittelherstellers wünschenswert. Die mit der Filtration verbundenen technischen und logistischen Schwierigkeiten sind bedeutend, jedoch nicht unlösbar.

2. Die Notwendigkeit einer generellen Leukozytendepletion erscheint nach heutigem Wissensstand wissenschaftlich nicht ausreichend belegt. Es gibt gesicherte und noch nicht gesicherte Indikationsbereiche. Unter Berücksichtigung der derzeit verfügbaren wissenschaftlichen Literatur und der transfusionsmedizinisch klinischen Empirie ergibt sich zum jetzigen Zeitpunkt die in Tabelle 1 angeführte Beurteilung. Die in der Tabelle in den Punkten A-C angeführten Indikationen werden für klinisch notwendig erachtet. Erforderlich für die nicht ausreichend belegten möglichen Indikationen, bei denen plausible Gründe für den Einsatz einer Leukozy-

tendepletion sprechen, sind multizentrische klinische Studien an gut definierten Patientenkollektiven zur endgültigen Klärung, inwieweit der in Pilotstudien beschriebene Nutzen der Filtration tatsächlich erreicht werden kann.

3. Durch eine generelle Einführung der Filtration zellulärer Präparate entstehen erhebliche Kosten für das Gesundheitswesen. Die kalkulierte Größenordnung der zusätzlichen Filterkosten wird auf circa DM 150 Mio/Jahr geschätzt. Hinzu gerechnet werden müssen zusätzliche Personal- und Logistikaufwendungen. Für eine aussagefähige, gesundheitsökonomische Betrachtung liegen momentan noch keine ausreichenden Daten vor; sie müssen in absehbarer Zeit vorrangig erarbeitet werden.

4. Grundsätzlich soll keine bed-site-Filtration unter Einbeziehung ständig wechselnder Personen und unter nicht-standardisierbaren Bedingungen stattfinden. Für die Regelversorgung ist daher die Filtration beim Arzneimittelhersteller vorzunehmen. In begründeten Einzelfällen kann davon abgewichen werden. Diese Fälle sind durch die jeweilige Transfusionskommission gemeinsam mit der arzneimittelherstellenden Institution festzulegen. □

Tabelle 1

Indikationen zur Leukozytendepletion von Erythrozyten- oder Thrombozytenkonzentraten vor Transfusion

A	<p>Gesicherte Indikationen</p> <p>Ungeborene bei intrauteriner Transfusion</p> <p>Unreif Geborene</p> <p>Schwangere</p> <p>Patienten mit erforderlicher Langzeittransfusion (insbesondere hämato-onkologische Patienten)</p> <p>Patienten nach Immunisierung gegen leukozytäre Antigene</p> <p>Vorausgegangene febrile nicht-hämolytische Transfusionsreaktion (FNHTR)</p> <p>Stark immunsupprimierte Empfänger CMV-ungetesteter oder CMV-positiver zellulärer Blutpräparate¹</p> <p>Patienten vor, während oder nach autologer oder allogener Knochenmark- oder Blutstammzelltransplantation (Hochdosis-Chemotherapie)¹</p> <p>Leukämiepatienten¹</p> <p>Patienten mit aplastischer Anämie¹</p> <p>Patienten mit schweren angeborenen Immundefekten¹</p> <p>Patienten vor, während und nach Organtransplantation¹</p> <p>HIV-Patienten¹</p> <p>Patienten mit Morbus Hodgkin oder Non-Hodgkin-Lymphom¹ (ohne Hochdosis-Chemotherapie)</p>
B	<p>Empfohlen</p> <p>Patienten mit vorausgegangenen unklaren Transfusionsreaktionen</p>
C	<p>Empfohlene, nicht ausreichend belegte Indikationen</p> <p>CMV-negative Kinder während Operationen an der Herz-Lungenmaschine und anderen Einsätzen einer extrakorporalen Membranoxygenierung</p> <p>CMV-positive Patienten mit angeborenem oder (auch medikamentös) erworbenem Immundefekt zur Prävention der Reaktivierung latenter CMV-Infektionen</p> <p>HIV-infizierte Patienten zur Prävention der Reaktivierung einer latenten HIV-Infektion</p>
D	<p>Mögliche, nicht ausreichend belegte Indikationen</p> <p>Perioperative Transfusion bei Patienten mit Kolonkarzinom oder septischer Operation zur Vermeidung postoperativer Infektionen</p>
E	<p>Keine Daten</p> <p>Gering immunkompromittierte Patienten¹</p> <p>Patienten mit soliden Tumoren (ohne Hochdosis-Chemotherapie)¹</p> <p>Patienten unter immunsuppressiver Therapie bei Autoimmunerkrankungen¹</p> <p>Verbrennungspatienten¹</p> <p>Polytraumapatienten¹</p>
F	<p>Keine Indikationen</p> <p>Patienten mit kolorektalem oder Prostata-Karzinom zur Vermeidung von transfusionsassoziierten Tumorrezidiven</p> <p>Vermeidung postoperativer transfusionsassoziierter Infektionen bei aseptischen operativen Eingriffen</p> <p>Prophylaxe einer Graft versus Host Disease (GvHD)</p> <p>Prophylaxe einer Epstein-Barr-Virus (EBV)-Infektion bei EBV-negativen erwachsenen und kindlichen Transfusionsempfängern</p>

¹ Patienten mit negativem oder unbekanntem CMV-Status

Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS)

Stellungnahme der ZKBS zur Einstufung der *Salmonella* Typhimurium Stämme MvP101 und MvP103 (HH104) mit Mutationen in den Genen *sseD* bzw. *sseC*

Salmonella Typhimurium wird gemäß § 5 Abs. 2 und 6 i.V.m. Anhang I Teil B GenTSV der Risikogruppe 2 zugeordnet, da dieser Organismus für den Menschen und verschiedene Tiere obligat pathogen ist.

Die Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS) hat bereits verschiedene *S. Typhimurium*-Mutantenstämme als Empfängerorganismen in die Risikogruppe 1 eingeordnet (siehe Stellungnahmen der ZKBS zur „Einstufung von *S. Typhimurium* LT2-Stämmen und von *S. Typhimurium*-Stämmen mit stabilen Mutationen in den Genen *aroA*, *galE* oder *cya* und *crp* als Empfängerorganismen bei gentechnischen Arbeiten“ sowie zur „Einstufung von zwei *Salmonella* „enterica“-Serovar *Typhimurium*-Impfstämmen für Hühner (Impfstoffe Zoosaloral H bzw. TAD *Salmonella vac T*), einem *Salmonella* „enterica“-Serovar-*choleraesuis*-Impfstamm für Schweine (Impfstoff Suisaloral) sowie einem *Salmonella* „enterica“-Serovar-*dublin*-Impfstamm für Rinder (Impfstoff Bovisaloral) als Empfängerorganismen bei gentechnischen Arbeiten“).

Die *S. Typhimurium*-Stämme MvP101 und MvP103 (HH104) enthalten stabile Mutationen in den Genen *sseD* bzw. *sseC*, die für Proteine des Typ III Sekretionssystems kodieren. Diese und weitere Gene, die für die systemische Infektion in Mäusen notwendig sind, sind in der Pathogenitätsinsel SPI2 lokalisiert. Homologien zu bekannten Genen von enteropathogenen *E. coli*- und *Yersinia enterocolitica*-Stämmen lassen den Schluß zu, daß es sich bei den *sseC*- und *sseD*-Genprodukten offenbar um Transmembranproteine handelt.

Für die gezielte Herstellung der Mutantenstämme wurden die Gene *sseD* und *sseC* isoliert und mit Hilfe der Vektoren pUC18 bzw. pKS+ in *E. coli* K12 kloniert. Die Kanamycin-Resistenz-Kassette *aphT* wurde in das jeweilige Gen inseriert, wodurch im Gen *sseD* zusätzlich eine Deletion von ca. 40 bp entstand. Nach Subklonierung der mutierten Gene wurden die resultierenden Konstrukte in *E. coli* S17-1 transferiert und anschließend durch Konjugation auf den Wildstamm *S. Typhimurium* NCTC12023 (ATCC 14028s) übertragen. Durch Selektion auf Kanamycin-Resistenz entstanden Klone, die durch homologe Rekombination das intakte Gen gegen das mutierte Gen ausgetauscht hatten. Die Mutanten wurden durch PCR und Southern-Analyse charakterisiert. Beide Stämme sind in ihrer Virulenz stark ab-

geschwächt. Die LD₅₀ bei intraperitonealer Injektion von Balb/c-Mäusen liegt bei 2–3×10⁶, bei oraler Gabe liegt sie bei über 10⁹ Bakterien, im Vergleich zu dem Wildtyp-Stamm mit einer LD₅₀ von 6 (i.p.) bzw. 6,9×10⁵ (oral) Bakterien.

Die beiden *S. Typhimurium* Stämme, die Mutationen in den Genen *sseC* oder *sseD* tragen, werden aufgrund ihrer stabilen Attenuierung in die Risikogruppe 1 eingeordnet, wenn sie bei gentechnischen Arbeiten als Empfängerorganismen eingesetzt werden. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß die Mutanten durch Klonierung von FremddNA, die auch in einem Gemisch von DNA Sequenzen (z.B. Genbanken) vorliegen kann, zum Wildtyp komplementiert werden können. Gentechnische Arbeiten, bei denen bakterielle Nukleinsäuresequenzen in die Mutanten eingeführt werden, die die Überlebensfähigkeit der Bakterien erhöhen können oder die für Virulenzfaktoren anderer pathogener Bakterien kodieren, sind zur Einstufung der ZKBS vorzulegen. □