

---

# Köldökszínórvér feldolgozásának minőségbiztosítási aspektusai a KRIO Intézetben

SZÁRAZ L., KOCSIS A., FÜRÉSZ K., VÉGH G., KALAPOS M., BRINDZÁNÉ MOLNÁR M., SZÉNÁSI D., HEGEDŰS E., TAKÁCS A., ALADICS Á., ZSIGRI V., IMRE E., BALOGH I.

KRIO Intézet Zrt., Budapest, Hungary

Levelezési cím: KRIO Intézet Zrt., 1026 Budapest, Kelemen László u. 12.

Tel.: +36-1/416-7453

E-mail: szaraz.leonora@krio.hu

---

A KRIO Intézet 2005 óta auditált minőségirányítási rendszerrel (ISO 9001:2008 és ISO 14001:2004), 2010 óta AABB (American Association of Blood Banks) akkreditációs háttérrel látja el köldökszínórvér-feldolgozási és -tárolási tevékenységét. Az AABB akkreditáció révén egy olyan nemzetközi szövetség jóváhagyását bírja, amely azokat a személyeket és intézeteket felügyeli és támogatja tevékenységükben, amelyek vérátomlesztéssel, ill. sejterápiával foglalkoznak. Az AABB akkreditációs programjának célja, hogy javítsa a vér gyűjtésének, feldolgozásának, mélyfagyasztásának, tárolásának, és így terápiákban történő felhasználásának biztonságát és hatékonyságát.

A családi köldökszínórvér-bankokkal kapcsolatban gyakran hangzik el, hogy gyakorlatilag válogatás nélkül tárolnak el bármilyen mintát, függetlenül attól, alkalmas-e hatásos terápia indítására vagy sem.<sup>1-3</sup> A feldolgozási és minősítési folyamatunk, valamint egy 3500 minta alapján készült statisztikai elemzés bemutatásával az a célunk, hogy bepillantást engedjünk a nálunk megvalósuló minőségbiztosítási eljárásokba és – a sikeres transzplantációink mellett – adatokkal is alátámasszuk, hogy olyan mintákat tárolunk, amelyek terápiára minden szempontból alkalmasak.

## AABB ÁLTAL AKKREDITÁLT KÖLDÖKSZÍNÓRVÉR-FELDOLGOZÁS, -FAGYASZTÁS, -TÁROLÁS

Az Intézetünkbe szállított köldökszínórvér minta átvételi protokollja során születik meg a döntés a minta feldolgozhatóságáról. Egy minta abban az esetben kerülhet azonnali feldolgozásra, ha a következő három feltétel teljesül: (1) az átvételig 4–30 °C között tárolták, (2) az alvadásgátló készítménnyel kiegészített térfogata eléri az 50 ml-t és (3) eredete megfelelően dokumentált.

Bár a hőmérsékleti intervallum viszonylag tág, ennek ellenére törekedünk arra, hogy tudatosítsuk a hűtés fontosságát, tekintettel

egyrészt a minta biológiai jellegére, másrészt abból a gyakorlati tapasztalatból kiindulva, hogy a feldolgozási paraméterek számottevően javulnak hűtött minták esetén.<sup>4-5</sup>

A feldolgozásra elfogadott mintákból natív vérkép készül, majd több lépésben a térfogat redukciója zajlik, mely révén a vörösvértestek és a plazma nagy része eltávolításra kerül. A feldolgozás nélküli teljes vér fagyasztása azért is elavult technológia, mert nem számol azzal, hogy a vér sejtes elemei eltérő módon reagálnak a fagyasztással-felengedetetéssel járó stresszre, valamint nem veszi figyelembe a Nemzetközi Transzplantációs Bizottság 2010 júniusában kibocsátott figyelmeztetését a teljes vért tartalmazó minták mellékhatásait illetően.<sup>6</sup>

A feldolgozási folyamat minőségbiztosítási eljárása előírja, hogy több ponton is mintavétel történjen, amely egyrészt mikrobiológiai szempontból minősíti a folyamatot, másrészt követi a volumenredukció lépéseit, és képet ad a tárolásra kerülő minták minőségéről. A volumenredukció után kapott mintákról a következő paraméterek adnak információt:

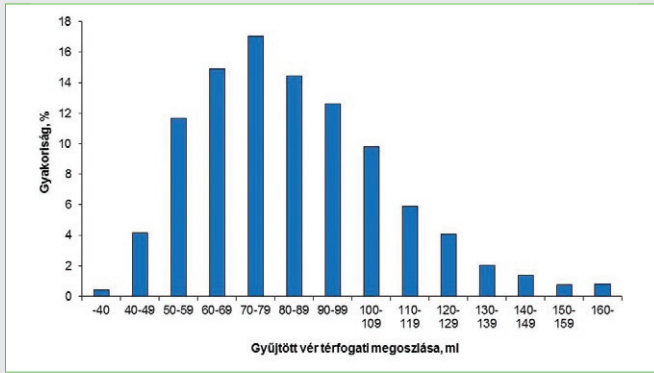
- WBC R (redukált vér fehérvérsejt-koncentrációja, amelyből a tárolt minta TNC értéke (összes magvas sejtek száma) kerül meghatározásra,
- % CD34+ (CD34+, CD45+ sejtek aránya a WBC R-re vonatkoztatva),
- % életképesség.

Intravénás terápiákban azoknak a mintáknak javasolt a felhasználása, amelyek TNC értéke eléri a minimálisan  $2 \times 10^7$  TNC/testtömeg kg értéket.<sup>7</sup> A minimum elvárásokat nem teljesítő mintákról hematológus-transzplantológus készít szakvéleményt a terápiás felhasználhatóság szempontjából, amelynek ismeretében a család írásban nyilatkozik a minta további sorsáról.

---

A közlemény megjelenését a KRIO Intézet Zrt. tette lehetővé.

---



1. ábra. 3500 köldökzsínórvér minta térfogati megoszlása

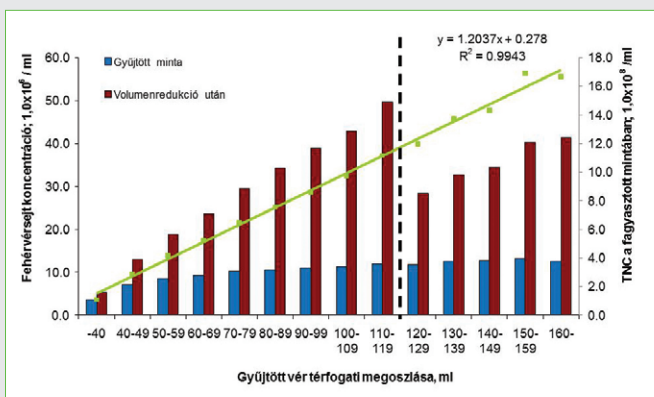
## TÁROLÁSRA KERÜLT MINTÁK MINŐSÍTŐ PARAMÉTEREINEK BEMUTATÁSA

Az 1. ábra 3500 darab feldolgozott és fagyaszttva tárolt köldökzsínórvér minta térfogat-intervallumait mutatja, függőleges tengelyen a százalékos arányukat feltüntetve.

A feldolgozott minták átlagos térfogata 84 ml (legnagyobb minta 211 ml) volt, az eloszlás aszimmetrikus jellege 70–79 ml intervallumban mutat maximumot, amely a minták 17%-át jelentette. A 120 ml-t meghaladó térfogatú köldökzsínórvér minták két fagyasztószákbán kerülnek tárolásra, amely a minták 9%-a esetén valósult meg.

50 ml alatti térfogatú mintákat abban az esetben dolgozunk fel, ha azt a család írásban kéri és megfelelő tájékoztatást kapott arról, hogy a feldolgozott mintát minősítő paraméterek elmaradhatnak az elfogadási határértékektől.

A 2. ábra a gyűjtött minták további minősítő paramétereit, a fehérsejt (fvs)-koncentráció feldolgozás előtti és volumenredukció utáni értékeit, valamint a fagyasztás előtti minta TNC értékeit mutatja a kiindulási mintatérfogat függvényében. Az ábra jól szemlélteti, hogy a kis (50 ml alatti) térfogatú minták esetén tapasztalt, legfeljebb 80%-os fvs-koncentráció növekedéshez képest már 80 ml-től is több



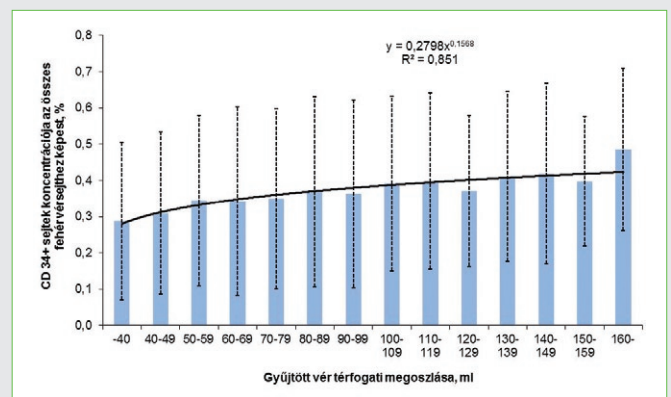
2. ábra. Volumenredukció hatása a köldökzsínórvér minták fvs-koncentrációjára. A szaggatott függőleges vonal az eltérő tárolási módra utal, amelynek magyarázatát ld. a szövegben.

mint 200%-os átlagos dúsítás érhető el – más szóval, a nagyobb mintatérfogat együtt jár a minőség javulásával. A 120–129 ml-nél tapasztalható törés nem a feldolgozás minőségének drasztikus romlását mutatja, hanem éppen ellenkezőleg, azt reprezentálja, hogy pl. egy 140–149 ml-es tartományba eső minta olyan fvs-koncentrációval kerül feldolgozásra és tárolásra, mintha két 80–89 ml-es minta került volna gyűjtésre, hiszen 120 ml felett a mintákból két egységet tárolunk. Az ábráról leolvasható továbbá, hogy már egy 50–59 ml-es minta is olyan TNC értékkel kerül tárolásra, amely 20 kg-ig megfelel a minimálisan elvárt  $2 \times 10^7$  TNC/testtömeg kg határértéknek.

A 3. ábra az egyes térfogati intervallumokhoz tartozó, százalékban kifejezett CD34+ arányokat mutatja a redukált vér fvs-koncentrációjára vonatkoztatva. A növekvő tendencia egyezést mutat azokkal a közleményekkel és ajánlásokkal, amelyek a kisebb térfogatú mintákat nem kizárólag a mennyiségük alapján tekintik meg nem felelőnek, hanem abból fakadóan is, hogy arányaiban kevesebb CD34+ markerrel jellemezhető hematopoetikus őssejtet (HSC) tartalmaznak.<sup>8</sup> Az illesztett trendvonal olyan telítési görbére emlékeztet, amelynek maximuma 0,4% CD34+-nél várható, bár a görbe egyes pontjai – a minták jellegéből fakadóan – jelentős szórással bírnak.

## AZ ANYAI VÉR VIZSGÁLATÁNAK JELENTŐSÉGE

A gyermek születésekor levett anyai vér mikrobiológiai vizsgálatát elsődlegesen az AABB írja elő, tekintettel arra, hogy az anyát tekinti donornak a köldökzsínórvér-gyűjtés folyamata során. Az anyától közvetlenül a szülést megelőzően, vagy a szülést követően levett vérből a következő vizsgálatok kerülnek elvégzésre: szifilisz (szerológia), Hepatitis B, Hepatitis C, HIV (szerológia és DNS alapú vizsgálat), valamint CMV (szerológia). A felsorolt vizsgálatok részben a terhesgondozás részét képezik hazánkban – kivételt a HCV- és CMV-vírusok vizsgálata jelenti. Ezért olyan fontos számunkra, hogy 2010 és 2012 között három anyának szűrtük ki a HCV-fertőzöttségét.



3. ábra. Volumenredukció után kapott CD34+ sejtek százalékos aránya a fvs-koncentrációra vonatkoztatva, a kiindulási mintatérfogat függvényében

A közlemény megjelenését a KRIO Intézet Zrt. tette lehetővé.

## KÖLDÖKZSINÓRVÉREK TENYÉSZTÉSES MIKROBIOLÓGIAI VIZSGÁLATÁNAK EREDMÉNYEI

A feldolgozott mintaszám (n=3500) esetében az infekciók aránya mindössze 0,3% volt, ami szignifikánsan alacsonyabb a nemzetközi átlagnál.<sup>9</sup> A fertőzött minták felénél – a felszálló fertőzések kapcsán is gyakran emlegetett – *Escherichia coli*, 20–20%-ban *Enterococcus faecalis* és *Enterobacter aerogenes* okozta a szennyezést. Egy-egy esetben *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* és *Candida albicans* jelenléte is kimutatható volt.

A fertőzött minták nem feltétlenül kerülnek elutasításra, ugyanis a redukált köldökszinórvér TNC értéke, % CD34+ értéke, valamint az adott mikroba antibiotikumrezisztencia-profilja is mérlegelésre kerül a hematológus szakvéleményében.

### „VSEL SAFE TECHNOLOGY”

15 éve biológiai minták mélyfagyasztásával foglalkozó céggént folyamatosan követjük és magunk is fejlesztjük a minták feldolgozásának és fagyasztásra történő előkészítésének technológiáját.<sup>10</sup> Tekintettel arra, hogy egyes vérfeldolgozási lépések kedvezőtlenül befolyásolhatják a tárolt mintákban fellelhető érzékenyebb sejtformák mennyiségét, ezért számunkra fontos, hogy olyan technológiát alkalmazzunk, amelynek segítségével valamennyi értékes sejtforma a lehető legnagyobb számban kerüljön megőrzésre.

A VSELS (very small embryonic like stem cells) olyan pluripotens őssejtek, amelyek számottevő mennyiségben a vöröscsontvelőben és a köldökszinórvérben vannak jelen. Ún. „vésztartalék” sejtekként – rendkívüli képlékenységüknek köszönhetően – az önregeneráció forrásai, amelyek bizonyos patológiás/fiziológias stimulusokra – feltételezhetően bármilyen – szöveti sejté differenciálódhatnak. Jelenlegi ismereteink szerint ezek a sejtek lehetnek az alapkövei a súlyos oxigénhiánnyal született gyermekek köldökszinórvérrel történő hatásos kezelésének (USA).<sup>11-12</sup>

Egy vizgálatosorozatunk arra irányult, milyen arányban kerülnek a VSEL őssejtek megőrzésre az általunk alkalmazott feldolgozási technológia során. A kapott eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a felületi markereik alapján azonosított (CD34+, CD184+, CD45–, lin–) VSEL sejtek a redukált vérben kb. ötszörös dúsulást mutatnak, amelynek mértéke a vérképző őssejtek dúsulását is meghaladja.

### ÖSSZEFOGLALÁS

A KRIO Intézet Zrt. Európa egyik legnagyobb őssejtbankhálózatának, a FamiCord csoportnak tagja, amely együttesen több mint 70 000 köldökszinórvér minta – Budapesten és Miskolcon összesen 16 000 minta – tárolását végzi. Tevékenysége nem korlátozódik kizárólag a köldökszinórvér és szövet tárolására, hiszen spermabankként, ill. donor spermabankként további 25 000 mintát tárol mélyfagyasztott állapotban.<sup>13-14</sup>

Az Intézetben megvalósított, és az AABB nemzetközi szervezet által is akkreditált technológia segítségével már 7 sikeres (3 vér eredetű és 4 mezenchymalis) transzplantációt végeztek az elmúlt években. Az Intézet minőségügyi politikájának megfelelően a beérkezett minták az egész folyamat alatt – beleértve a levételt, szállítást, átvételt, fagyasztást, tárolást és esetleges kibocsátást is – a lehető legszigorúbb kontroll alatt vannak, ezért a fertőzött minták aránya <1%, ami jelentősen jobb a nemzetközi átlagnál. A feldolgozás során a beérkezett mintából az őssejtekben gazdag frakció kerül fagyasztásra, ugyanis így el lehet kerülni a teljes vér fagyasztása során bekövetkező hibákat (vörösvértestek lizálása, transzplantációkor bekövetkező mellékhatások). A manuális eljárásnak köszönhetően lehetőség nyílik az esetleges levételi eltérések kiküszöbölésére, ugyanakkor valamennyi hasznos sejt, így pl. a VSEL sejtek is nagy számban kerülnek megőrzésre a mélyfagyasztott mintában. A FamiCord Csoport által kifejlesztett technológiának köszönhetően a Csoportban a legmagasabb az egy darab tárolt mintára eső transzplantációs arány Európában.

### HIVATKOZÁSOK

1. Wagner JE, Gluckman E. Umbilical cord blood transplantation: the first 20 years. *Semin Hematol.* 2010;47:3–12.
2. Butler MG, Menitove JE. Umbilical cord blood banking: an update. *J Assist Reprod Genet.* 2011;28:669–676.
3. Sun J, Allison J, McLaughlin C, et al. Differences in quality between privately and publicly banked umbilical cord blood units: a pilot study of autologous cord blood infusion in children with acquired neurologic disorders. *Transfusion.* 2010;50:1980–1987.
4. Hunt CJ. Cryopreservation of human stem cells for clinical application: a review. *Transfus Med Hemother.* 2011;38:107–123.
5. Louis I, Wagner E, Dieng MM, et al. Impact of storage temperature and processing delays on cord blood quality: discrepancy between functional in vitro and in vivo assays. *Transfusion.* 2012;52:2401–2405.
6. CIBMTR tájékoztató adatlap – hozzáférés időpontja: 2013.03.14. [http://marrow.org/HD/MedEd/Cord\\_Blood\\_Licensure/Documents/A00499\\_2011\\_04\\_21\\_Study\\_0264\\_CB\\_IND\\_Investigator\\_Brochure\\_.aspx](http://marrow.org/HD/MedEd/Cord_Blood_Licensure/Documents/A00499_2011_04_21_Study_0264_CB_IND_Investigator_Brochure_.aspx)
7. Superior Health Council tájékoztató adatlap – hozzáférés időpontja: 2013.03.18. <http://www.health.belgium.be/internet2Prd/groups/public/@public/@shc/documents/ie2divers/19081964.pdf>
8. Pope B, Mitsakos K, Bilgin A, et al. Predicting overall viability of cord blood harvests. *Transfusion.* 2012;52:1079–1085.
9. Jaime-Perez JC, Monreal Robles R, Colunga-Pedraza J, et al. Cord blood banking activities at a university hospital in northeast Mexico: an 8-year experience. *Transfusion.* 2012;52:2606–2613.
10. Balogh I, Végh G, Imre E, et al. Köldökszinórvér eredetű őssejtek fagyasztása szubletális HHP előkezeléssel. *Nőgyógyászati és Szülészeti Továbbképző Szemle* 2012;12(2):93–95.
11. Zuba-Surma EK, Klich I, Greco N, et al. Optimization of isolation and further characterization of umbilical cord blood-derived very small embryonic/epiblast-like stem cells (VSELS). *Eur J Haematol.* 2009;84:34–46.
12. Bhartiya D, Shaikh A, Nagvenkar P, et al. Very small embryonic-like stem cells with maximum regenerative potential get discarded during cord blood banking and bone marrow processing for autologous stem cell therapy. *Stem Cells Dev.* 2012;21:1–6.
13. Balogh I, Imre E, Végh G, et al. Donorminták összehasonlító elemzése a KRIO Intézetben. *Magyar Andrológia.* 2009;14:87–90.
14. Száraz L, Kocsis A, Fűrész K, et al. A KRIO Intézet spermium donor szűrés eredményei. *Magyar Andrológia.* 2013;18 (megjelenés alatt).

A közlemény megjelenését a KRIO Intézet Zrt. tette lehetővé.