

Bożena Bucholc

IMMUNOGLOBULINY ORAZ ZASADY PROFILAKTYKI CZYNNO-BIERNEJ

Zakład Badania Surowic i Szczepionek Państwowego Zakładu Higieny
Kierownik: Janusz Ślusarczyk

W pracy omówiono problemy związane z bezpieczeństwem stosowania dożylnych preparatów immunoglobulin (intravenous immunoglobulins - WIG) oraz podstawy immunologiczne ich skuteczności w zakażeniach bakteryjnych, wirusowych i w chorobach autoimmunizacyjnych.

Słowa kluczowe: WIG, HCV, immunomodulacja

Key words: WIG, HCV, immune regulation

WSTĘP

Oczyszczony preparat ludzkich gammaglobulin uzyskano po raz pierwszy w roku 1940, metodą frakcjonowania białek osocza w niskiej temperaturze, przy użyciu etanolu wg Cohna (1). Osocze przeznaczone do frakcjonowania pochodzi od około 10 000 zdrowych dawców krwi z prawidłową aktywnością aminotransferaz (ALAT), u których nie stwierdzono obecności antygenu HBs, przeciwciał anti-HIV-1/2 i anti-HCV oraz przeciwciał przeciw *Treponema pallidum*. Oprócz badania dawców, badanie puli osocza jest postrzegane jako jeden z licznych etapów, które łącznie z innymi gwarantują zabezpieczenie przed obecnością wirusów w produkcie krwiopochodnym. Pule osocza pochodzące od wielu dawców powinny być zbadane i nie zawierać markerów wirusowych: przeciwciał anti-HIV-1/2, antygenu powierzchniowego wirusa zapalenia wątroby typu B, przeciwciał anti-HCV. Zgodnie z zaleceniami CPMP (Committee for Proprietary Medicinal Products /BWP/390/97) od 1 lipca 1999 r. wprowadzono obligatoryjne badanie RNA *HCV* w mini pulach osocza metodą PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy) (2).

Pule, w których uzyskano dodatni wynik badania któregośkolwiek z wymienionych wyżej markerów wirusowych, muszą być odrzucone, podobnie jak wszystkie produkty pośrednie i inne produkty z nich pochodzące. Ludzkie immunoglobuliny są otrzymywane z osocza, które odpowiada wymaganiom WHO i polskim przepisom z tego zakresu (2-5).

Jednym z głównych problemów w krwiolecznictwie jest problem przenoszenia zakażeń wirusowych drogą krwi i preparatów krwiopochodnych. Wśród potencjalnych czynników zakaźnych należy wymienić: wirusy zapalenia wątroby typu A, B, C, G/GBV-C; wirusy herpes (związane z białymi krwinkami); *CMV* - wirus cytomegalii; *EBV* - wirus

Epsteina-Barr; *HHV8* - ludzki wirus *herpes* związany z mięsakiem Kaposiego; retrowirusy: wirusy ludzkich białaczek *HTLV - I*, *HTLV-II*; wirusy ludzkich niedoborów immunologicznych: *HIV-1*, *HIV-2*. Ludzki parwirus-parvovirus *B19*; TTV circoviridae DNA -*Transfusion Transmitted Virus* (6). Ponadto może dochodzić do zakażeń bakteryjnych i pierwotniakowych, np. *Plasmodium sp*, *Trypanosoma cruzi*, *Babesia microti*, *Toxoplasma gondii*.

Oprócz metod zmierzających do właściwego doboru dawców, opracowano sposoby inaktywacji wirusów potencjalnie występujących w preparatach osoczopochodnych. Najczęściej stosuje się kilkakrotne frakcjonowanie alkoholem, wywodzące się z metody Cohna. Ponadto istnieją metody specjalne do inaktywacji wirusów i stosowane w końcowych etapach produkcji (Beta-propiolakton, rozpuszczalnik/detergent, pepsyna w niskim pH, pasteryzacja, chromatografia, nanofiltracja).

Dodatkową ważną i naturalną barierą przed rozprzestrzenieniem się wielu znanych i nieznanymi wirusów, mogących zanieczyszczać pule osocza przeznaczone do produkcji preparatów, są neutralizujące przeciwciała - zwłaszcza przeciw trudnym do zainaktywowania wirusom zapalenia wątroby typu A i parwirusowi *B 19* (7).

Przeciwciała, głównie klasy IgG, znajdują się w II frakcji Cohna. Oczyszczone immunoglobuliny są stabilizowane glukozą, maltozą, glicyną, sacharozą, mannitolem lub albuminą. Podczas produkcji preparatów immunoglobulin do stosowania dożylnego ważne jest zastosowanie metod ochraniających przed spontanicznym tworzeniem się agregatów cząsteczek IgG. W celu zapobieżenia samoistnej agregacji cząsteczek IgG, a więc i aktywacji komplementu występującej podczas produkcji preparatu IVIG, stosuje się wiele metod chemicznych lub fizycznych. Jednak działanie to może również modyfikować strukturę molekuly w taki sposób, że FcIgG nie wiąże się z receptorem Fc na błonie granulocytów i monocytów/makrofagów co powoduje, że cząsteczka IgG jest niezdolna do wiązania komplementu, opsonizacji patogenu, współdziałania z innymi składnikami układu immunologicznego takimi jak cytokiny i powierzchniowe receptory komórek (8).

Preparaty IVIG używane są w profilaktyce i terapii zakażeń bakteryjnych i wirusowych, powinny przeto zawierać niezmienione cząsteczki IgG biologicznie aktywne. Działanie immunoglobulin w zakażeniach bakteryjnych obejmuje zabijanie bakterii, neutralizację toksycznych produktów bakteryjnych i skuteczne usuwanie z krążenia bakterii i ich produktów, supresję prozapalnych cytokin uwalnianych z aktywowanych komórek przez endotoksyny i superantygeny, wzrost ilości neutrofilów oraz neutralizację superantygenów (9-18). IVIG może stanowić potencjalnie ważne terapeutyczne narzędzie w zakażeniach, w których zwalczaniu ma swój udział dopełniacz ponieważ wykazano, że IVIG nie wpływa na wiązanie C3 do bakterii, a także nie hamuje lizy komórek zależnej od dopełniacza (19).

Ciężkie ogólne zakażenia bakteryjne, pomimo stosowania antybiotyków, są nadal częstą przyczyną zachorowań i zgonów wśród noworodków i dzieci oraz u osób z obniżoną odpornością. Posocznica noworodków jest spowodowana przez infekcje bakteriami, w następstwie których wydzielane są endo- i egzotoksyny aktywujące wiele typów komórek (monocytów, makrofagów, limfocytów), z których uwalniają się cytokiny, mediatory i receptory powodujące stan zapalny (IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α , prostaglandyny, leukotrieny, PAF, IFN γ , składniki dopełniacza, pochodne NO, O $_2$). Stosowanie

terapii jednokierunkowej (antybiotyki) jest skazane na niepowodzenie. Terapia uzupełniająca (IVIG) może wpłynąć na uregulowanie układu immunologicznego.

Zespół wstrząsu toksycznego (*toxic shock syndrome* - TSS) wywołany przez paciorkowce jest najcięższym objawem powodowanym przez *Streptococcus* grupy A i pomimo odpowiedniej antybiotykoterapii śmiertelność jest bardzo wysoka - od 40% do 80%. Wykazano, że objawy infekcji są spowodowane nadmierną przeciwwzpalną odpowiedzią na superantygeny produkowane przez te bakterie. Jedną z klas superantygenów stanowią egzotoksyny pochodzące z Gram-dodatnich bakterii: *Staphylococcus aureus* (SEA, SEB, SEC, SEE) i *Streptococcus pyogenes* (SPEA, SPEC). Superantygeny są białkami zdolnymi do aktywacji wielu komórek immunokompetentnych, które uwalniają cytokiny odpowiedzialne za proces zapalny. Superantygeny stymulują duże ilości łańcuchów Vbeta nieuczulonych komórek T i wydzielanie cytokin. Ich zahamowanie poprzez przeciwciała przeciw superantygenom i przeciwciała przeciw peptydom Vbeta3, Vbeta8, Vbeta17 receptorów na komórkach T ochrania aktywację klonalnej ekspansji cytotoksycznych komórek T pobudzonych superantygenem (20, 21, 22).

Wykazano, że komercyjnie dostępne preparaty IVIG zawierają przeciwciała przeciw głównej grupie superantygenów paciorkowcowych i gronkowcowych i mogą hamować aktywację cytotoksycznych komórek T. Mechanizm, poprzez który IVIG poprawia stan pacjentów, nie jest do końca wyjaśniony. Prawdopodobnie IVIG hamuje proliferację komórek T i produkcję prozapalnych cytokin z komórek aktywowanych przez te białka w wyniku działania przeciwciał neutralizujących superantygeny gronkowców i paciorkowców (14).

Ewentualna skuteczność preparatów immunoglobulin w zakażeniach wirusowych jest wynikiem m.in. neutralizacji wirusów przez przeciwciała klasy IgG, które są obecne w preparatach immunoglobulin i mogą blokować szereg etapów zakażenia komórki przez wirus, począwszy od blokowania wiązania wirusa do komórkowych receptorów, aż do blokowania etapu odpłaszczania wirusa. Część wirusów jest neutralizowana poprzez zablokowanie adsorpcji do komórki gospodarza, a część dopiero po tym etapie, po którym następuje ekspozycja lub formowanie *de novo* epitopów istotnych dla neutralizacji (23, 24).

FDA (Food and Drug Administration) zaleca również użycie IVIG w chorobach autoimmunizacyjnych takich jak: zespół Kawasaki, samoistna płamica małopłytkowa - ITP, przewlekła zapalna demielizacyjna polineuropatia. Preparaty IVIG mogą być także stosowane w: zespole Guillain-Barre, *myasthenii gravis*, zapaleniach skórno-mięśniowych, zapaleniach wielomięśniowych, nieuleczalnych padaczkach, uogólnionym zapaleniu naczyń, stwardnieniu rozsianym. Preparaty IVIG powodują ograniczenie lub remisję objawów niektórych ogólnoustrojowych chorobach zapalnych i autoimmunizacyjnych. Preparaty te wyprodukowane z dużej puli ludzkiego osocza, zawierają przeciwciała skierowane przeciw szerokiemu spektrum ludzkich białek i przeciwciała anty-idiotypowe, które wiążą autoprzeciwciała neutralizując ich działanie i zapobiegają reakcji z autoantygenem (25, 26).

Dotychczas wyodrębniono następujące mechanizmy immunomodulującego działania preparatów IVIG:

- interakcje z komórkowymi receptorami wiążącymi IgG (receptory dla fragmentu FcIgG I, II, III),

- interakcje z receptorami dla dopełniacza,
- modulacje działania cytokin poprzez wpływ na ich: syntezę, wiązanie się z receptorami komórek oraz unieczynnianie.

Wyżej wymienione aktywności regulują szereg reakcji komórkowych takich jak: synteza przeciwciał, komórkowe reakcje cytotoksyczne, proces prezentacji antygeny przez komórki APC.

Wyprodukowane z osocza od tysięcy dawców IVIG posiadają szerokie spektrum przeciwciał, które mogą mieć znaczenie w immunomodulacji. Są to przeciwciała:

- o idiotypowych właściwościach, poprzez które m.in. mogą wpływać na układ immunologiczny gospodarza. Immunoglobuliny mogą reagować z idiotypami autoprzeciwciał i neutralizować je w niektórych chorobach autoimmunizacyjnych oraz zmniejszać syntezę tych autoprzeciwciał produkowanych przez komórki B (25).
- przeciw regionowi zmiennemu receptora komórek T, po podaniu których następuje regulacja funkcji komórek T w chorobach autoimmunizacyjnych (20).
- przeciw cytokinom (przeciw GM-CSF, przeciw interferonowi α , interleukinie-1 α i interleukinie-6).

ZASADY PROFILAKTYKI CZYNNO-BIERNEJ

Immunogenność szczepionek zawierających żywe atenuowane wirusy podane parenteralnie może zostać zmniejszona, jeśli szczepienie nastąpi w krótkim czasie po podaniu preparatu immunoglobuliny. Duże dawki preparatu immunoglobuliny hamują odpowiedź immunologiczną a czas jej zahamowania zależy od zastosowanej dawki.

Czas zahamowania odpowiedzi immunologicznej po podaniu szczepionki przeciw różyczce jest krótszy niż po podaniu szczepionki odrowej. Jeśli immunoglobulina musi być podana w czasie krótszym niż 14 dni po szczepieniu przeciw odrze należy ponownie podać szczepionkę po upływie czasu określonego w tabeli.

Wpływ podawania immunoglobuliny na odpowiedź przeciwciał po szczepionce ospowej, jest nieznan. Nie powinno się jej podawać po preparatach immunoglobulin lub po przetoczeniach krwi - z wyjątkiem przemywanych erytrocytów. Ponadto preparaty immunoglobulin, jeśli to możliwe, nie powinny być podawane do 14 dni po szczepieniu. Jeśli immunoglobulina została podana w tym czasie, należy powtórzyć szczepienie po okresie podanym w tabeli lub ponownie zaszczepić, jeśli badanie wykazało brak przeciwciał.

W przeciwieństwie do szczepionek zawierających żywe atenuowane szczepy wirusów stosowanych paranteralnie, szczepionki inaktywowane i toksoidy powodują pełną odpowiedź immunologiczną po podaniu preparatów immunoglobulin, np. jednoczesne podanie zalecanych dawek HBIG, TIG, RIG i odpowiedniej szczepionki lub toksoidu w po ekspozycyjnej profilaktyce nie osłabia efektywności szczepionek i wywołuje długoterminową odporność. Zalecane są standardowe dawki odpowiednich szczepionek. Nie zaleca się zwiększenia dawek ani objętości szczepionek.

Jednoczesne podanie szczepionki przeciw wzw A i preparatu immunoglobulin zaleca się w sytuacji, w której jest wymagana bezpośrednia i dłużej trwająca ochrona przeciw zakażeniu HAV. Aczkolwiek połączenie aktywno-biernej immunizacji wywołuje niższy

Table I. Proponowany czas między podaniem immunoglobuliny a szczepieniem przeciw odrze*

Table I. Suggested intervals between immunoglobulin administration and measles immunization

Wskazania do stosowania	Droga podania	Dawka		Przerwa (miesiące)
		jedn. lub ml	mg IgG/kg	
Tężec (TIG)	i.m.	250 j.m.	~10	3
Wzw A (IG)				
Po kontakcie	i.m.	0,02 ml/kg	3,3	3
Podróże	i.m.	0,06 ml/kg	10	3
Wzw B (HBIG)	i.m.	0,06 ml/kg	10	3
Wścieklizna (RIG)	i.m.	20 j.m./kg	22	4
Odra (IG)				
Zdrowi	i.m.	0,25 ml/kg	40	5
po immunosupresji	i.m.	0,50 ml/kg	80	6
Ospa (VZIG)	i.m.	125 j.m./10 kg max. 625 j.m.	20-39	5
Transfuzja krwi				
Krwinki przemywane	i.v.	10 ml/kg	Bez znaczenia	0
Krwinki, adenina-sól	i.v.	10 ml/kg	10	3
Koncentrat Krwinek	i.v.	10 ml/kg	20-60	5
Cała krew	i.v.	10 ml/kg	80-100	6
Osocze, płytki	i.v.	10 ml/kg	160	7
Substytucja lub leczenie (IVIG)	i.v.		300-400	8
ITP (IVIG)	i.v.		400	8
ITP	i.v.		1000	10
ITP lub choroba Kawasaki	i.v.		1600-2000	11
RSV-IVIG	i.v.		750	9

i.m. - podanie domięśniowe

i.v. - podanie dożylnie

* - wg Red Book 2000 (27)

poziom przeciwciał niż indukowany samą szczepionką, jest wystarczający do ochrony przez zakażeniem.

Preparat zawierający przeciwciała monoklonalne przeciw-RSV (palivizumab), który jest podawany drogą domięśniową nie interferuje z odpowiedzią na szczepionki.

B Bucholt

IMMUNOGLOBULINS AND RULES OF PASSIVE-ACTIVE PROPHYLAXIS

SUMMARY

This review deals with the safety uses and mechanisms of action intravenous immunoglobulin preparations (IVIG) in prophylaxis and treatment of viruses and bacterial infection and also about the role of immunoglobulins in autoimmune disorders.

The second part contains suggested intervals between immunoglobulin administration and measles immunization.

PIŚMIENNICTWO

1. Cohn EJ, Strong LE, Hughes WL. Preparation and properties of serum and plasma proteins: IV. A system for the preparation into fractions of protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J Am Chem Soc* 1946;68:459-75.
2. CPMP/BWP/390/97. The introduction of Nucleic Acid Amplification Technology (NAT) for the detection of hepatitis C virus RNA in plasma pools.
3. Plasma Humanum ad Separationem, monografia 0853 zawarta w Farmakopei Europejskiej, 1997 r.
4. Requirements for collection, processing and quality control of blood, blood components and plasma derivatives (Requirement for Biological Substances No 27, revised 1992). In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-three report. Geneva, World Health Organization, 1994, Annex 2 (WHO Technical Report Series, No. 840).
5. Sabliński J, Łętowska M. Krwiodawstwo, zbiór przepisów dla placówek służby krwi. Warszawa, PZWL i Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa, 1996.
6. Barbara JAJ. Microbiological Safety of Blood Transfusion. *Vox Sanguinis* 1998;74,suppl 2:11-3.
7. Rollag H, Solheim BG, Svennevig JL. Viral safety of blood derivatives by immune neutralization. *Vox Sang* 1998;74:suppl.1:213-7.
8. Mollnes TE, Andreassen IH, Hogasen K, Hack CE, Harboe M. Effect of whole and fractionated intravenous immunoglobulin on complement in vitro. *Mol Immunol* 1997;34:719-29.
9. Harper TE, Christensen RD, Rothstein G, Hill HR. Effect of intravenous immunoglobulin G on neutrophil kinetics during experimental group B streptococcal infection in neonatal rats. *Rev Infect Dis* 1986;8 Suppl.4:S401-8.
10. Dichtelmuller H, Stephan W. The effect of immunoglobulin M-enriched intravenous immunoglobulins against bacterial infections and on the neutralization of bacterial toxins. *Arzneimittelforschung* 1987;37:1273-6.
11. Van Furth R, Braat AG, Leijh PC, Gardi A. Opsonic and physicochemical characteristics of intravenous immunoglobulin preparations. *Vox Sang* 1987;53:70-5.
12. Berkman SA, Lee ML, Gale RP. Clinical uses of intravenous immunoglobulins. *Ann Intern Med* 1990;112:278-92.
13. Hill HR, Kelsey DK, Gonzales LA, Raff HV. Monoclonal antibodies in the therapy of experimental neonatal group B streptococcal disease. *Clin Immunol Immunopathol* 1992;62:S87-91.
14. Norrby-Teglund A, Kaul R, Low D. Evidence for the presence of Streptococcal-Superantigen-neutralizing antibodies in normal polyspecific immunoglobulin G. *Infection and Immunity* 1996;64:5395-8.
15. Fujiwara T, Taniuchi S, Hattori K, Kobayashi T, Kinoshita Y, Kobayashi Y. Effect of immunoglobulin therapy on phagocytosis by polymorphonuclear leucocytes in whole blood of neonates. *Clin Exp Immunol* 1997;107:435-9.
16. Norrby-Teglund A, Basma H, Andersson J. Varying titers of neutralizing antibodies to streptococcal superantigens in different preparations of normal polyspecific immunoglobulin G: Implications for therapeutic efficacy. *Clin Inf Dis* 1998;26:631-8.
17. Werdan K. Supplement immune globulins in sepsis. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:341-9.
18. Norrby-Teglund A, Ihrndyane N, Kansal R. Relative neutralizing activity in polyspecific IgM, IgA and IgG preparations against group A streptococcal superantigens. *Clin Infect Dis* 2000;31:1175-82.