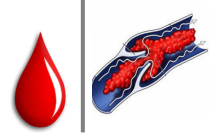




ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ



Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
ΘΡΟΜΒΩΣΗ – ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΑ – ΙΑΤΡΙΚΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΤΤΙΣΕΩΝ
Επιστημονική Υπεύθυνη: Ομότιμη Καθηγήτρια Ωρ. Σ. Τραυλού

Διπλωματική Εργασία
«ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ»

ΟΝΟΜΑ : ΑΝΔΡΕΑΔΑΚΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ
ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ : ΓΙΑΛΕΡΑΚΗ ΑΡΓΥΡΗ

Ακαδημαϊκό Έτος : 2012-2013

Συντομογραφίες	IV
Περίληψη	V
Abstract	VI
Ευχαριστίες	VII
Κεφάλαιο 1°	
1.1 Αδρανοποίηση-ορισμός	5
1.1.1 Φυσικές τεχνικές αδρανοποίησης παθογόνων	5
1.1.1.1 Παστερίωση	5
1.1.1.2 Ξηρή Θέρμανση προϊόντων (Dry heat).	6
1.1.1.3 Θέρμανση δι' ατμού (Vapor heating)	6
1.1.1.4 Λευκαφαίρεση (Leukoreduction)	7
1.1.1.5 Νανοδιήθηση (Nanofiltration)	8
1.1.2 Χημικές τεχνικές αδρανοποίησης παθογόνων.	12
1.1.2.1 Επεξεργασία με Solvent-Detergent (S/D).	12
1.1.2.2 Low pH (χαμηλό pH)	12
1.1.3 Βιολογικές-Φωτοδυναμικές τεχνικές αδρανοποίησης παθογόνων.	14
1.1.3.1 Επεξεργασία με Methylene Blue (MB)	14
1.1.3.2 Ψωραλένια-Αμοτοσαλένιο (S-59) + UVA	15
1.1.3.3 Ριβοφλαβίνη + UV	16
1.1.3.4 S-303	17
1.1.3.5 UVC ακτινοβολία	17
1.1.3.6 γ- ακτινοβολία	18
Κεφάλαιο 2°	
2.1. Αποτελεσματικότητα σε σταθερά παράγωγα αίματος.	21
2.1.1 Παστερίωση	21
2.1.2 Ξηρή θέρμανση (Dry Heat)	21
2.1.3 Θέρμανση δι' ατμού (Vapour Heating)	26
2.1.4 Solvent/Detergent (S/D)	27
2.1.5 Χαμηλό pH	29
2.1.6 Νανοδιήθηση	30
2.2 Αποτελεσματικότητα σε ασταθή παράγωγα αίματος.	33
2.2.1 Πλάσμα	33
2.2.1.1 Methylene Blue (MB)	33
2.2.1.2 Υδροχλωρικό αμοτοσαλένιο + UVA	37
2.2.1.3 Ριβοφλαβίνη+ UVA	39
2.2.1.4 UVC ακτινοβολία	41
2.2.2 Αιμοπετάλια	41
2.2.2.1 Υδροχλωρικό αμοτοσαλένιο+UVA	41
2.2.2.2 Ριβοφλαβίνη+UVA	46
2.2.2.3 UVC ακτινοβολία	48
2.2.2.4 γ-ακτινοβολία	51
2.2.3 Ερυθρά αιμοσφαίρια/ολικό αίμα	52
2.2.3.1 Λευκαφαίρεση	52
2.2.3.2 γ-ακτινοβολία	53
2.2.3.3 Μέθοδοι σε εξέλιξη	53

2.2.3.4 Μέθοδοι που διεκόπησαν σε αρχικά στάδια	56
2.3 Ασφάλεια σε σταθερά παράγωγα αίματος.	59
2.3.1 Παστερίωση	59
2.3.2 Ξηρή Θερμότητα (Dry Heat)	59
2.3.3 Solvent/Detergent	59
2.3.4 Νανοδιήθηση	61
2.4. Ασφάλεια σε ασταθή παράγωγα αίματος.	62
2.4.1 Πλάσμα.	62
2.4.1.1 Methylene Blue (MB)+ ορατό φώς	62
2.4.1.2 Υδροχλωρικό αμοτσοαλένιο+UVA	66
2.4.1.3 Ριβοφλαβίνη+UVA	68
2.4.2 Αιμοπετάλια	69
2.4.2.1 Υδροχλωρικό αμοτσοαλένιο+UVA	69
2.4.2.2 Ριβοφλαβίνη+UVA	71
2.4.2.3 UVC ακτινοβολία	71
2.4.2.4 Λευκαφαίρεση	73
2.4.3 Ερυθρά αιμοσφαίρια/Ολικό αίμα	74
2.4.3.1 Λευκαφαίρεση	75
2.4.3.2 γ-ακτινοβολία	78
2.4.3.3 S-303	78
2.4.3.4 Ριβοφλαβίνη+UVA	80
Κεφάλαιο 3°	
3.1 οικονομικές παράμετροι- κόστος.	81
Κεφάλαιο 4°	
4.1 Νεότερα δεδομένα	87
Κεφάλαιο 5°	
5.1 Συμπεράσματα	87
Βιβλιογραφία	89

Συντομογραφίες

ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
ADP	Adenosine 5- Diphosphate
BVDV	Bovine Viral Diarrhoea Virus
BHV	Bovine Herpesvirus
BPV	Bovine Papilloma Virus
CHV	Canine Herpes Virus
CPV	Canine Parvovirus
CMV	Cytomegalovirus
DHBV	Duck Hepatitis Virus
EMC	Encephalomyocarditis
ECHO	Enteric Cytopathic Human Orphan
ERV	Endogenous Retrovirus
EEV	Equine Encephalosis Virus
F	Factor
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HAV	Hepatitis A Virus
HEV	Hepatitis E Virus
HTLV	H T-cell Leukemia Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HBV	Hepatitis B Virus
HSV	Herpes Simplex Virus
HLA	Human Leukocyte Antigen
HPA	Human Platelets Antigen
MVM	Minute Virus of Mice
MLV	Murine Leukemia Virus
PPV	Porcine Parvovirus
PRV	Pseudorabies Virus
SINV	Sindbis Virus
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome
TBEV	Tick-Borne Encephalitis Virus
TTP	Thrombotic Thrombocytopenic Purpura
TRALI	Transfusion Related Acute Lung Injury
TRAP-6	Thrombin Receptor Activating Peptide
YFV	Yellow Fever Virus
VSV	Vesicular Stomatitis Virus
VCJD	Variant Creutzfeldt Jakob Disease
WNV	West Nile Virus

Η πρόκληση για βέλτιστη, αποδοτική και ασφαλής χρήση του μεταγγιζόμενου αίματος αποτελεί πρωταρχικό στόχο ενός συστήματος υγείας και έχει οδηγήσει στην βελτίωση των τρεχουσών εργαστηριακών τεχνικών αλλά και στην ανάπτυξη νέων. Η παρούσα διπλωματική εργασία αναφέρεται στην αδρανοποίηση παραγώγων αίματος. Παρουσιάζονται οι τεχνικές αδρανοποίησης που έχουν ήδη αδειοδοτηθεί και εφαρμόζονται τόσο στην Ελλάδα όσο και διεθνώς καθώς και τεχνικές που βρίσκονται σε εξέλιξη, ταξινομημένες σύμφωνα την αρχή μεθόδου (φυσικές, χημικές, βιολογικές-φωτοδυναμικές) και την εφαρμογή τους σε σταθερά και ασταθή παράγωγα αίματος.

Τα τέσσερα βασικά σκέλη που αναπτύσσονται στην εργασία είναι η αρχή μεθόδου κάθε τεχνικής, η αποτελεσματικότητα σε κάθε παράγωγο, δηλαδή η ανάκτηση των πρωτεϊνών, των παραγόντων πήξης και η ελάττωση του ιού φορτίου των ιών, βακτηρίων, παρασίτων μετά την επεξεργασία, η ασφάλεια που αξιολογείται με την εμφάνιση ή όχι ανεπιθύμητων ενεργειών, την ανάπτυξη νέο-αντιγόνων, την πιθανότητα τοξικότητας, καρκινογένεσης, ανάπτυξης ανοσιακής απάντησης, μετά τη μετάγγιση των επεξεργασμένων παραγώγων, αλλά και οι οικονομικές συνέπειες και το κόστος που προκύπτει από τη χρήση κάθε μεθόδου.

Για την συγγραφή της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν πηγές από την σύγχρονη βιβλιογραφία και περιλαμβάνονται βιβλία, άρθρα καθώς και επιστημονικές έρευνες με στόχο να παρατεθούν νέα επιστημονικά στοιχεία και μελέτες που βρίσκονται σε εξέλιξη.

ABSTRACT

The challenge for optimal, effective and safe use of transfused blood is a primary goal of a health system and has led to the improvement of current laboratory techniques and the development of new ones. This thesis refers to the pathogen reduction technologies. It presents inactivation techniques that were already licensed and implemented both in Greece and internationally, and techniques that are in progress, classified according to the mechanism of action (physical, chemical, biological-photodynamic) and their application in stable and unstable blood derivatives.

There are four main parts which are developed, firstly, the mechanism of action of each technique, secondly, the effectiveness on each derivative-after the procedure step- such as the recovery of proteins and coagulation factors, the viral, bacterial and parasites reduction thirdly, the safety assessed with the occurrence or not of adverse events, developing of neo-antigens, the potential of toxicity, carcinogenesis, developing immune response after transfusion of the possessed derivatives and finally, the cost and the financial consequences arising of the use of these techniques.

The outcome of this project is based on sources by recent literature including books, articles and scientific researches to cite new scientific evidence and studies which are being developed.

Ευχαριστίες

Θέλω να ευχαριστήσω θερμά την ομότιμη καθηγήτρια Ωρ. Σ. Τραυλού που μου εμπιστεύτηκε το θέμα της εργασίας και την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου Γιαλεράκη Αργυρή για την πολύτιμη προσοχή και καθοδήγηση της. Επιπλέον, την κυρία Λάρδα Όλγα, Business Unit Manager στην εταιρεία Rontis Hellas S.A για τις πληροφορίες που μου παραχώρησε, την κυρία Κατσούγκρη Αναστασία, φιλόλογο για την φιλολογική επιμέλεια, τον κύριο Ανδρεαδάκη Δημήτρη φυσικό, για την τεχνική επιμέλεια της εργασίας που συντέλεσαν στην συγγραφή της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Acknowledgements

I would like to thanks the emeritus professor Mrs Oeanthi S. Travlou who entrusted me the issue of this thesis, my supervisor Dr. Dialeraki Argiri who helped the guidance of the author of this thesis. Moreover, Larda Olga, Business Unit Manager on Rontis Hellas S.A, for the information she provided to me, Mrs Katsougkri Anastasia for the literary corrections, Mr. Andreadakis Dimitrios for the technical supervision.

Εισαγωγή

Το αίμα είναι ένας ανθρώπινος ιστός, ένας εξαιρετικά πολύτιμος και σπάνιος πόρος. Η μετάγγιση αίματος ήταν η πρώτη επιτυχημένη μεταμόσχευση οργάνου που πραγματοποιήθηκε και αποτέλεσε σωτήρια λύση για ασθενείς με σοβαρές αιμορραγίες, καθώς και ατόμων με αιματολογικές διαταραχές. Το αίμα διαχωρίζεται σε επιμέρους συστατικά και, ανάλογα με την εκάστοτε ανάγκη, μεταγγίζονται τα ερυθρά αιμοσφαίρια, το πλάσμα ή τα αιμοπετάλια.

Στόχος ενός συστήματος υγείας είναι η επίτευξη της βέλτιστης χρήσης του αίματος. Με τον όρο αυτό εννοείται η κλινική αποτελεσματικότητα, δηλαδή ο ασθενής να ωφελείται από αυτό, η αποδοτική χρήση δηλαδή να γίνεται εξοικονόμηση μονάδων αίματος, λόγω προβλήματος επάρκειας, και πάνω απ' όλα η ασφάλεια του μεταγγιζόμενου αίματος ώστε ο ασθενής να μην εκτίθεται σε κίνδυνους. Συνεπώς η χρήση του αίματος πρέπει να γίνεται επί καλά καθορισμένων και επιστημονικά τεκμηριωμένων ενδείξεων, και με βάση κατευθυντήριων οδηγιών.

Η μετάγγιση αίματος συνεπάγεται με έκθεση του οργανισμού σε αλλογενές αίμα. Για πολλά χρόνια δεν είχε τεθεί ζήτημα σοβαρών ανεπιθύμητων συνεπειών ή μετάδοσης νοσογόνων παραγόντων κατά την μετάγγιση αίματος. Ο αριθμός των δοτών ήταν μικρός, η επιλογή περιορισμένη και τα διαγνωστικά μέσα υπερβολικά περιορισμένα. Ωστόσο, οι μεγάλες πληθυσμιακές μετακινήσεις, η ανάπτυξη νέων μικροβιακών στελεχών, οι πόλεμοι αποτέλεσαν την αιτιολογική βάση για την εμφάνιση νέων λοιμογόνων παραγόντων. Πέραν όμως των λοιμογόνων παραγόντων, υπάρχουν κι άλλες ανεπιθύμητες συνέπειες που μπορεί να εμφανιστούν κατά τη διάρκεια ή μετά την μετάγγιση αίματος, οι οποίες όμως έχουν άλλη αιτιολογική βάση. [1]

Οι παθογόνοι παράγοντες που απασχολούν την αιμοδοσία ταξινομούνται σε *υπάρχοντες*, *αναδυόμενους* και *επανεμφανιζόμενους* (πίνακας 1). Σχεδόν παγκοσμίως έχει καθιερωθεί ο συστηματικός έλεγχος του αίματος για την ηπατίτιδα Β και C, τον ιό της επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (HIV) τύπου 1 και τύπου 2, το *treponema pallidum* που προκαλεί τη σύφιλη και τον HTLV τύπου 1 και τύπου 2. Επιπλέον έλεγχοι γίνονται για λοιμώδεις παράγοντες που εμφανίζονται σε περίπτωση επιδημιών με χαρακτηριστικό παράδειγμα τον Ιό του δυτικού Νείλου (WNV). [2]

ΥΠΑΡΧΟΝΤΕΣ	ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΟΙ	ΕΠΑΝΑΝΑΔΥΟΜΕΝΟΙ
HIV	VCJD	WNV
HCV	SARS	ΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑ
HBV	CDW	T. CRUZI
ΣΥΦΙΛΗ	BIRD FLU	BORELLIA
HLTV		BABESIA
CMV		ERLICHIA
		PLASMODIUM

Πίνακας 1: Ταξινόμηση παθογόνων που μεταφέρονται με το αίμα

Ο συνήθης εργαστηριακός έλεγχος γίνεται με ορολογικές μεθόδους. Η ορολογική διάγνωση των Ηπατίτιδων Β και C, HIV και HTLV, στηρίζεται στον έλεγχο των αντιγόνων κάθε ιού και των αντίστοιχων αντισωμάτων που αναπτύσσει ο οργανισμός έναντι αυτών. Τα τελευταία χρόνια όμως, η πρόοδος της τεχνολογίας έχει εισάγει, επιτυχώς, μοριακές τεχνικές για τον έλεγχο του αίματος, οι οποίες παρέχουν μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα με σημαντικότερο πλεονέκτημα την μείωση της λεγόμενης «περίοδος παραθύρου»¹. Με την τεχνική NAT (nucleic acid techniques) ελέγχονται οι συνήθως εξεταζόμενοι ιοί, HBV, HCV, HIV και ο WNV. Η εφαρμογή της NAT, βοήθησε στην μείωση της περιόδου παραθύρου για τον HIV από 21 μέρες σε 5,6, για τον HBV από 53 μέρες σε 24,5 και για τον HCV από 58,3 μέρες σε 4,9. Ο καθιερωμένος εργαστηριακός έλεγχος που ακολουθείται παρατίθεται συνοπτικά στον πίνακα 2.

ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ	ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ- NAT
Ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA)	WESTERN BLOT	HIV-RNA, HBV-RNA, HCV-RNA
Τεχνικές χημειοφωταύγειας (EIA-MEIA-CMIA)	RIBA	NAT-TMA
RPR (Rapid plasma regain)	INNOLIA	NAT/ RT-PCR
	FTA-TRHA	

Πίνακας 2: Καθιερωμένος εργαστηριακός έλεγχος που ακολουθείται.

Είναι πρακτικά και οικονομικά ανέφικτο να γίνεται έλεγχος για κάθε είδους λοιμογόνο παράγοντα. Ωστόσο, πέραν από τους συνήθεις εργαστηριακούς ελέγχους των τεσσάρων κλασσικών παθογόνων παραγόντων, ανάλογα με την περιοχή οι έλεγχοι γίνονται πιο εξειδικευμένοι και περιλαμβάνουν επιπρόσθετους παράγοντες όπως τα παράσιτα. Για παράδειγμα, σε ενδημικές χώρες στην υποσαχάρια Αφρική όλα τα παράγωγα του αίματος θα έπρεπε να εξετάζονται για Μαλάρια, [4] για Dengue virus σε άτομα από Ασία, Νότια και κεντρική Αμερική, τέλος στην λατινική Αμερική οι περισσότερες χώρες εφαρμόζουν έλεγχο για αντισώματα έναντι του *Trypanosoma cruzi* που προκαλεί τη νόσο Chagas. [5], [6]. Επιπλέον, υπάρχουν ομάδες ληπτών αίματος υψηλού κινδύνου για ανάπτυξη λοιμώξεων από CMV (Cytomegalovirus), όπως έμβρυα, ανοσοκατασταλμένοι ασθενείς, άτομα που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση οργάνου κτλ, οπότε είναι σημαντικό ανάλογα την περίπτωση, να γίνεται και αντίστοιχος έλεγχος. [7]

¹ Περίοδος Παραθύρου Είναι ο χρόνος που μεσολαβεί από τη στιγμή που κάποιος μολυνθεί από έναν ιό μέχρι την στιγμή που αυτός ο ιός μπορεί να ανιχνευθεί εργαστηριακά. Ο αιμοδότης σε αυτή την περίοδο φαίνεται να είναι "αρνητικός" ενώ ο ιός βρίσκεται το αίμα του και θεωρητικά μπορεί να μεταδοθεί μέσω της μετάγγισης σε άλλο άτομο.

Ένα σημαντικό μέρος όσον αφορά τον έλεγχο των μονάδων αίματος που προορίζονται για μετάγγιση, είναι η βακτηριακή μόλυνση. Πλέον, αποτελούν την πιο συχνή επιπλοκή της μετάγγισης αίματος και προϊόντων του, και έχουν αναδειχθεί ως η κύρια αιτία που σχετίζεται με νοσηρότητα και θνησιμότητα, συγκριτικά με τον κίνδυνο μετάδοσης των ιών και άλλων παθογόνων παραγόντων στον δυτικό κόσμο.

Οι βακτηριακές μολύνσεις εμφανίζονται πιο συχνά στα αιμοπετάλια, κυρίως λόγω των συνθηκών φύλαξης στους 20-24° C, όπου μπορούν εύκολα να επιβιώσουν και να διαδοθούν. Στα ερυθρά αιμοσφαίρια αντίστοιχα η πιθανότητα ανάπτυξης βακτηρίων είναι μικρότερη, αφού αποθηκεύονται σε θερμοκρασία 1-6° C, περιβάλλον που δεν ευνοεί ιδιαίτερα την ανάπτυξη αυτών. [8]

Ως αποτέλεσμα της αυξημένης ευαισθητοποίησης και του κλινικού ενδιαφέροντος για την βακτηριακή μόλυνση των συστατικών του αίματος, η AABB² δημιούργησε μεθόδους για να μειωθεί η μετάδοση βακτηρίων κατά τη μετάγγιση. [9] Πιο συγκεκριμένα, τα βακτηριακά τεστ των αιμοπεταλίων συστήθηκαν ως ένα αποτελεσματικό μέτρο για την βελτίωση της ασφάλειας των μεταγγίσεων.

Προκειμένου όμως να σχεδιαστούν αποτελεσματικές στρατηγικές, οι βακτηριακές μολύνσεις ταξινομούνται με βάση την προέλευση των μικροοργανισμών, δηλαδή αν προέρχονται από το περιβάλλον, από το δέρμα του ατόμου που μεταγγίζεται, ή ακόμα και από τον ίδιο τον δότη. Συνήθως οι περισσότερες επιμολύνσεις συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της αιμοδοσίας ή κατά τον χειρισμό των παραγώγων αίματος. [10]

Δεδομένα από τον Αμερικανικό Ερυθρό Σταυρό σχετικά με την ανίχνευση βακτηριδιακών επιμολύνσεων στα αιμοπετάλια έδειξαν ότι η πλειοψηφία των βακτηρίων που απομονώθηκαν ήταν Gram (+) αερόβια (περίπου το 75%). [11] Όσον αφορά τα ερυθρά αιμοσφαίρια λίγοι μικροοργανισμοί μπορούν να επιβιώσουν στις συνθήκες φύλαξης τους κυρίως εντεροβακτηρίδια όπως η *Yersinia enterocolitica* και η *Serratia liquefaciens*, και προκαλούν μετά-μετάγγιση σηψαιμία (1 στις 40,000 μεταγγίσεις.) Συνολικά, το 70% των περιπτώσεων σήψης που σχετίζεται με μετάγγιση είναι Gram (+) μικροοργανισμοί προερχόμενοι από την περιοχή φλεβοκέντησης και την χλωρίδα του δέρματος. Ωστόσο, σημαντικό να αναφερθεί είναι ότι πάνω από το 80% των θανάτων που σχετίζονται με τη μετάγγιση προκλήθηκαν από Gram (-) μικροοργανισμούς, που κυκλοφορούσαν παροδικά στο αίμα των υγιών δωτών. [12]

Τρία συστήματα ελέγχου³ έχουν πιστοποιηθεί στην Αμερική και χρησιμοποιούνται σε πολλά κέντρα αίματος στον κόσμο. Παρόλα αυτά κανένα από αυτά δεν φαίνεται να εντοπίζει όλες τις βακτηριακές επιμολύνσεις, γι αυτό είναι απαραίτητα τα επιπρόσθετα μέτρα ελέγχου, ώστε να βελτιωθεί περαιτέρω η πιθανότητα της σωστής ταυτοποίησης του προϊόντος αίματος με βακτηριακή μόλυνση.

Η πρόκληση για την ασφάλεια του αίματος αποτελεί το επίκεντρο της διεθνούς προσπάθειας, με την δημιουργία κατάλληλων πολιτικών υγείας και την θέσπιση μέτρων ασφαλείας. Οι διάφορες πρακτικές ασφαλείας του αίματος, οι εργαστηριακές μέθοδοι που ολοένα βελτιώνονται, εκσυγχρονίζονται και

² American Association of Blood Banks

³ Αυτοματοποιημένη μέθοδος καλλιέργειας βακτηρίων (Bac/ALERT system, bioMerieux), Άμεση βακτηριακή χρώση, μέθοδοι για ανίχνευση ενδοτοξίνης και ριβωσώματος, τεχνικές νουκλεϊνικών οξέων για ανίχνευση βακτηριακού DNA, μέτρα για την κατανάλωση O₂ ή την παραγωγή CO₂

εφαρμόζονται στις ανεπτυγμένες χώρες έχουν μειώσει σημαντικά τον κίνδυνο μετάδοσης παθογόνων μέσω αίματος. Επιπλέον, η αξιολόγηση των δοτών μέσω της συμπλήρωσης του ερωτηματολογίου και της προσεκτικής λήψης ατομικού ιστορικού είναι εξαιρετικά σημαντική διαδικασία η οποία προσδιορίζει την καταλληλότητα του εκάστοτε αιμοδότη.

Θεωρητικά και ιδανικά θα έπρεπε κάθε μονάδα αίματος να ελέγχεται για κάθε είδους λοιμογόνο παράγοντα που είναι γνωστός και που θα μπορούσε να προκαλέσει λοίμωξη. Στην πράξη αυτό όμως δεν είναι εφικτό, αφού δεν υπάρχει κάποια μέθοδος ή τεχνική που να παρέχει ασφαλή αποτελέσματα στο 100% των περιπτώσεων. Για την μεγαλύτερη δυνατή ελαχιστοποίηση του κινδύνου μετάδοσης παθογόνων παραγόντων έχουν θεσμοθετηθεί κριτήρια επιλογής αιμοδοτών που στοχεύουν σε δύο βασικά σημεία. Πρώτον, στην καταλληλότητα του υποψηφίου αιμοδότη, όσον αφορά την υγεία του και την προστασία του και δεύτερον, στην προστασία του δέκτη από κάποια πιθανή μετάδοση νοσήματος ή οποιασδήποτε άλλης επιπλοκής, που μπορεί να προκύψει από την μετάγγιση.

Η επιλογή ή αποκλεισμός του δότη (προσωρινός ή μόνιμος), στηρίζεται αρχικά στην προσεκτική λήψη ατομικού ιατρικού ιστορικού και στην σύντομη φυσική εξέταση. Για παράδειγμα, για την ελονοσία δεν υπάρχει τεστ για έλεγχο ρουτίνας στους αιμοδότες, έτσι ο έλεγχος γίνεται με βάση το ιστορικό του υποψηφίου αιμοδότη (πρόσφατα ταξίδια σε μη-ενδημικές περιοχές) και ανάλογα κρίνεται ο αποκλεισμός ή όχι αυτού. [3]

Η αναζήτηση των δυνητικά παθογόνων παραγόντων για τον λήπτη αίματος αποτελεί πρωταρχική και απόλυτη προϋπόθεση ασφάλειας της αιμοθεραπείας και κάθε μεταγγισιακής πρακτικής. Η θέσπιση κανόνων ελέγχου των υποψηφίων αιμοδοτών και ο αποκλεισμός των ατόμων που βρίσκονται σε ομάδα υψηλού κινδύνου, είναι το πρώτο σημαντικό μέτρο. Ο αυστηρός και προσεκτικός εργαστηριακός έλεγχος όλων των δειγμάτων αποτελεί το δεύτερο σημαντικό μέτρο. Ωστόσο, παρά την εφαρμογή των μέτρων αυτών, ο κίνδυνος -παρότι ελάχιστος- δεν μπορεί να εξαλειφθεί εντελώς.

Με βάση αυτά τα δεδομένα προέκυψε η ανάγκη ανάπτυξης τεχνολογιών με ιδιότητες, είτε αδρανισμού των παθογόνων που παραμένουν (βακτήρια, ιοί, πρωτόζωα) είτε με οριστική απομάκρυνση αυτών από το αίμα και τα παράγωγα του. Οι τεχνικές φέρονται με τον όρο Τεχνολογίες Μείωσης Παθογόνων (Pathogen Reduction Technology, PRT) και με την πάροδο του χρόνου και τις συνεχείς μελέτες και έρευνες βελτιώνονται, εξελίσσονται και κερδίζουν συνεχώς έδαφος έναντι των άλλων παραδοσιακών τεχνικών. Στόχος των τεχνολογιών αυτών είναι να μειώσουν τα μεταδιδόμενα παθογόνα χωρίς να διακυβεύεται η θεραπευτική αποτελεσματικότητα και να παρουσιάζονται δευτερογενείς κίνδυνοι.

Η παρούσα εργασία έχει ως σκοπό να παρουσιάσει τις τεχνολογίες αυτές, να αναλύσει τα χαρακτηριστικά τους και να τις συγκρίνει με τις παραδοσιακές μεθόδους ελέγχου του αίματος και των παραγώγων του, με την βοήθεια της διαθέσιμης βιβλιογραφίας αναφορικά με τις ήδη εγκατεστημένες και τις υπό μελέτη τεχνικές.

1.1 Αδρανοποίηση-ορισμός

Αδρανοποίηση ονομάζεται η διαδικασία κατά την οποία το ιϊκό φορτίο ελαττώνεται σε τέτοιο επίπεδο, ώστε να αποτρέπεται η μετάδοση. Η αδρανοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών εφαρμόζεται περίπου μια εικοσαετία και είναι μια προληπτική διαδικασία, η οποία όμως αυξάνει την ασφάλεια των μεταγγίσεων. Στις αρχές του 1990 η πρώτη μέθοδος αδρανοποίησης εφαρμόστηκε για το πλάσμα, μέχρι σήμερα στην κλινική πράξη έχει αναπτυχθεί ένας αριθμός μεθόδων αδρανοποίησης τόσο για το πλάσμα όσο και για τα αιμοπετάλια, ενώ όσον αφορά το ολικό αίμα και τα ερυθρά αιμοσφαίρια γίνονται συνεχώς πρόοδοι. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα επεξεργασμένα προϊόντα αίματος επιλέγονται ολοένα και περισσότερο για χρήση, όπου έχουν λάβει σχετική άδεια. Οι τεχνικές αδρανοποίησης ταξινομούνται σε *φυσικές*, *χημικές* και *βιολογικές-φωτοδυναμικές* και ανάλογα με το παράγωγο που χρήζει επεξεργασίας (σταθερό ή ασταθές παράγωγο), χρησιμοποιείται η αντίστοιχη μέθοδος. Κάθε μέθοδος διαφέρει σε αρχή λειτουργίας, φάσμα μικροοργανισμών καθώς και απόδοση και αποτελεσματικότητα της αδρανοποίησης, γι' αυτό το λόγο οι συγκρίσεις είναι πολλές φορές δύσκολες.

1.1.1 Φυσικές τεχνικές αδρανοποίησης παθογόνων.

Η παστερίωση δι' ατμού και η δια θέρμανσης αποστείρωση υπήρξαν για χρόνια μέθοδοι επιλογής για την επεξεργασία και την ασφαλή κλασματοποίηση του πλάσματος σε βιομηχανικό επίπεδο [13]. Πιο αναλυτικά:

1.1.1.1 Παστερίωση

Η παστερίωση χρησιμοποιείται στην βιομηχανία, κυρίως για την επεξεργασία την αλβουμίνης αλλά και άλλων πρωτεϊνών. Η αλβουμίνη θερμαίνεται στους 60°C για 10 με 11 ώρες, συνήθως ακολουθεί αποστειρωμένη διήθηση και διανομή του τελικού προϊόντος σε γυάλινα δοχεία. Για να αποφευχθεί η μετουσίωση της αλβουμίνης χρησιμοποιούνται σταθεροποιητικά υλικά. Έπειτα από αυτή την επεξεργασία, το προϊόν είναι ασφαλές όσον αφορά τις ηπατίτιδες και τον ιό HIV [14]. Όπως αναφέρθηκε, πολλές πρωτεΐνες μετουσιώνονται στους 60°C. Προκειμένου λοιπόν να διατηρηθεί η βιολογική λειτουργία τους χρησιμοποιούνται σταθεροποιητές, όπως αμινοξέα, σάκχαρα ή κιτρικά. Μετά το πέρας της επεξεργασίας, αυτές οι ουσίες πρέπει να απομακρυνθούν με διήθηση ή χρωματογραφία. Όσον αφορά την επεξεργασία της αλβουμίνης, σε πολλές χώρες, οι κατασκευαστές δεν χρειάζεται να επικυρώσουν την αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας, αφού οι συνθήκες επεξεργασίας με παστερίωση είναι καλά εδραιωμένες, ωστόσο είναι απαραίτητο να αποδείξουν ότι οι πληρούνται

απόλυτα οι παράμετροι της θερμοκρασίας και του χρόνου. Η ομοιογένεια της θερμοκρασίας επιτυγχάνεται με βύθιση της γυάλινης φιάλης σε υδατόλουτρο ή τοποθετώντας την σε κλίβανο με αέρα. Για την επεξεργασία του παράγοντα VIII γίνεται θέρμανση στους 60° C για 10 ώρες, παρουσία υψηλής συγκέντρωσης γλυκίνης και σουκρόζης ή αλάτων. Πριν από την θέρμανση, το διάλυμα διηθείται για την εξάλειψη σωματιδίων που μπορεί να παγιδεύσουν και να σταθεροποιήσουν τυχών ιούς .

1.1.1.2 Ξηρή Θέρμανση προϊόντων (Dry heat).

Η χρήση της υψηλής θερμοκρασίας (dry heat) επέφερε αμφισβητούμενα αποτελέσματα. Οι πρωτεΐνες μπορούν να αντέξουν σε θερμοκρασίες 60-80°C ή και υψηλότερες, αν πρώτα αφαιρούσαν το νερό από μέσα, δηλαδή να λυοφιλοποιηθούν. Επιπλέον η ίδια η λυοφιλοποίηση παρέχει κάποιο βαθμό αδρανοποίησης ιών. Η χρήση της ξηρής θερμότητας χρησιμοποιήθηκε κυρίως ως δεύτερο στάδιο ιικής αδρανοποίησης. Ένα πρωτόκολλο επεξεργασίας λυοφιλοποιημένων παραγόντων πήξης από 60° C στους 68° C για 24 και 72 ώρες έδειξε ότι δεν εμπόδιζε την μετάδοση των ιών της ηπατίτιδας Β, C και του HIV [15,16]. Αυξάνοντας την θερμοκρασία στους 80°C για 72 ώρες καταστρέφονταν οι παραπάνω ιοί, ωστόσο ένα σημαντικό μειονέκτημα ήταν ότι οι ιοί χωρίς περίβλημα, ειδικά η ηπατίτιδα Α και ο παρβοϊός Β19, δεν αδρανοποιούνταν αποτελεσματικά [17,18]. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η αδρανοποίηση των ιών κατά την επεξεργασία λυοφιλοποιημένων παραγόντων, επηρεάζεται από παράγοντες, όπως η υπολειπόμενη υγρασία, η σύνθεση (περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, σάκχαρα, αμινοξέα) και από τους κύκλους ψύξης-λυοφιλοποίησης.

Η απενεργοποίηση των ιών είναι ευαίσθητη στην υπολειπόμενη περιεκτικότητα υγρασίας, ο καθορισμός των ανώτερων και κατώτερων ορίων πρέπει να βασίζεται σε μελέτες επικύρωσης και η ποικιλομορφία της υγρασίας μεταξύ των φιαλιδίων πρέπει να βρίσκεται εντός των ορίων που έχουν τεθεί. Για να επιβεβαιώνεται η επαναληψιμότητα, ένας κατασκευαστής διευκρίνισε ότι κατά την διάρκεια την διαδικασίας ψύξης-θέρμανσης, η θερμοκρασία σε τρία ή περισσότερα παραγόμενα φιαλίδια, η θερμοκρασία του ψυκτικού υγρού και η πίεση του θαλάμου πρέπει να παραμένουν εντός καθορισμένων ορίων για κάθε φάση του κύκλου λυοφιλοποίησης για κάθε παρτίδα που κατασκευάζεται. Μετά την διαδικασία ψύξης θέρμανσης τα φιαλίδια πωματίζονται υπό στείρες συνθήκες. Επιπλέον, σε κάθε κύκλο λυοφιλοποίησης η υπολειπόμενη περιεκτικότητα σε υγρασία μετριέται και ακολουθείται θερμική επεξεργασία.

1.1.1.3 Θέρμανση δι' ατμού (Vapor heating)

Σε ισοδύναμες θερμοκρασίες, μπορούν να επιτευχθούν υψηλά επίπεδα αδρανοποίησης με την προσθήκη ατμού, πριν από τον αρχικό κύκλο θέρμανσης. Για να εξασφαλιστεί η σωστή εφαρμογή αυτής της μεθόδου, τα υλικά πρέπει να θερμαίνονται, η προσθήκη υγρασίας και ο κύκλος θερμότητας πρέπει να ελέγχονται αυστηρά. Σε μια περίπτωση, το λυοφιλοποιημένο ενδιάμεσο προϊόν ομογενοποιείται με

συνδυασμό κοσκινίσματος και άλεσης. Μετά από τον προσδιορισμό της εναπομένουσας περιεκτικότητας νερού περνάει σε δεξαμενή ανοξειδωτού χάλυβα και προστίθεται αργά μια προκαθορισμένη ποσότητα νερού με ατμό. Μετά την περίοδο εξισορρόπησης, η περιεκτικότητα του νερού μετριέται και πάλι μέχρι το προϊόν να είναι έτοιμο για θέρμανση με ατμό. Έπειτα μεταφέρεται σε ανοξειδωτο κύλινδρο, ο οποίος καθαρίζεται με ξηρό άζωτο, για να απομακρυνθεί το οξυγόνο και μετά εκτελείται δοκιμή πίεσης, για να εξασφαλιστεί ότι ο κύλινδρος είναι αεροστεγής.

Στην συνέχεια, ο κύλινδρος μεταφέρεται σε θάλαμο θέρμανσης εξοπλισμένο με ηλεκτρικό θερμαντήρα και ανεμιστήρα, για να γίνεται σωστή διανομή θερμοκρασίας μέσα στον κύλινδρο. Το προϊόν θερμαίνεται σύμφωνα με καθορισμένες συνθήκες. Ο κύλινδρος υποβάλλεται σε ταλαντευμένη περιστροφή και αλλάζει κατεύθυνση ανά μισή ώρα μέχρι το τέλος της διαδικασίας. Μετά το πέρας της διαδικασίας το προϊόν υποβάλλεται σε περαιτέρω επεξεργασία, αφού μεταφερθεί σε διαφορετική απομονωμένη περιοχή, για να αποφευχθεί επιμόλυνση από μη αδρανοποιημένο προϊόν. Η αναλογία του βάρους των προϊόντων σε σχέση με τον όγκο του κυλίνδρου εξατομικεύεται για κάθε περίπτωση. Κατά τη διάρκεια της θέρμανσης, η θερμοκρασία του προϊόντος, η θερμοκρασία του αέρα καθώς και η πίεση μέσα στον κύλινδρο υπόκεινται σε μέτρηση συνεχώς και πρέπει να συμμορφώνονται με τις προδιαγραφές που προορίζονται για το καθένα. Στο τέλος, η περιεκτικότητα νερού του προϊόντος μετριέται ξανά.

1.1.1.4 Λευκαφαίρεση (Leukoreduction)

Η Λευκαφαίρεση είναι μια μέθοδος απομάκρυνσης από τα προϊόντα αίματος. Επισημαίνεται ότι κατά την συλλογή του ολικού αίματος, υπάρχουν περίπου 10^9 λευκά αιμοσφαίρια, μετά την διαδικασία της λευκαφαίρεσης πρέπει να υπάρχουν λιγότερα από $5 \cdot 10^6$ ανά μονάδα αίματος (μείωση $3 \log 99,9\%$). Οι οδηγίες του ευρωπαϊκού συμβουλίου ορίζουν ότι τα υπολειπόμενα λευκά αιμοσφαίρια πρέπει να είναι λιγότερα από $1 \cdot 10^6$ ανά μονάδα αίματος. Αρχικά, είχαν χρησιμοποιηθεί φίλτρα που περιείχαν βαμβάκι, ως μέσο διήθησης [20]. Στην πορεία ανακάλυψαν ότι η οξική κυτταρίνη ήταν πιο κατάλληλη. Άλλες μέθοδοι λευκαφαίρεσης περιλαμβάνουν το πλύσιμο των ερυθρών αιμοσφαιρίων, φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του Buffy coat, κατάψυξη και απογλυκερινοποίηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων [21]. Οι σύγχρονοι τρόποι λευκαφαίρεσης περιλαμβάνουν φίλτρα τρίτης και τέταρτης γενιάς. τα οποία έχουν εξαιρετική αποτελεσματικότητα (99,99%) σε σύγκριση με τα φίλτρα πρώτης και δεύτερης γενιάς (90-96%).

Η λευκαφαίρεση μπορεί να γίνει είτε την στιγμή της συλλογής και επεξεργασίας του αίματος, (pre-storage) ή με παρακλίνια φίλτρα (post-storage). Επί του παρόντος, για διάφορους λόγους, που θα αναφερθούν παρακάτω, ευνοείται η προ-αποθήκευσης λευκαφαίρεση, είτε με την μορφή της καθολικής λευκαφαίρεσης για όλους τους ασθενείς, είτε ως επιλεγμένο πρωτόκολλο για συγκεκριμένη ομάδα ασθενών. Το μεγαλύτερο μειονέκτημα με την καθολική λευκαφαίρεση, είναι το κόστος που προκύπτει. Παγκοσμίως, 19 χώρες έχουν εφαρμόσει την καθολική λευκαφαίρεση ως μέρος της πολιτικής για

ασφαλές αίμα. Μερικές ακόμα χώρες κινούνται προς αυτή την κατεύθυνση, συμπεριλαμβανομένων της Σουηδίας, Δανίας, Ιταλίας, Βέλγιου, Κύπρου και Ιαπωνίας [30]. Το κίνητρο για την εφαρμογή της λευκαφαίρεσης είναι διαφορετικό από χώρα σε χώρα. Κάποιες χώρες, όπως το Ηνωμένο Βασίλειο και η Πορτογαλία, αποφάσισαν την καθολική λευκαφαίρεση ως μέτρο για την αποφυγή πιθανού κινδύνου μετάδοσης TA-v CJD. Ο κύριος λόγος που δεν έχει εφαρμοστεί λευκαφαίρεση παγκοσμίως φαίνεται να είναι οι χρηματοοικονομικές συνθήκες. Άλλοι λόγοι στηρίζονται στην άποψη ότι δεν υπάρχουν ακόμα αρκετά στοιχεία για να δικαιολογήσουν την πολιτική αυτή [31,32].

1.1.1.5 Νανοδιήθηση (Nanofiltration)

Η νανοδιήθηση είναι μια τεχνική σχεδιασμένη ειδικά για την απομάκρυνση των ιών. Κατά την τεχνική αυτή χρησιμοποιούνται μεμβράνες, οι οποίες με διήθηση μπορούν να συγκρατήσουν διάφορους ιούς, ανάλογα με το μέγεθος τους. Οι περισσότερες τέτοιες μεμβράνες χαρακτηρίζονται από μεσαίου μεγέθους πόρους των λίγων νανόμετρων, γι' αυτό η διαδικασία αυτή ονομάστηκε νανοδιήθηση, για να διαχωριστεί από άλλες μεθόδους διήθησης που χρησιμοποιούσαν μεμβράνες με μεγαλύτερου μεγέθους πόρους και δεν ήταν σχεδιασμένες για απομάκρυνση των ιών.

Η νανοδιήθηση των παραγώγων του πλάσματος έχει εφαρμογή στην κλίμακα παραγωγής από το 1990, ώστε να βελτιώσει τα περιθώρια για την ασφάλεια έναντι των ιών, χωρίς περίβλημα και να παρέχει πιθανή ασφάλεια έναντι νέων παθογόνων παραγόντων που εισέρχονται στην δεξαμενή πλάσματος. Η τεχνολογία αυτή έχει το μεγάλο πλεονέκτημα να είναι ευέλικτη και να συνδυάζει την αποτελεσματική και σε μεγάλο βαθμό απομάκρυνση (τάξεως 4 έως 6 log) μεγάλου φάσματος ιών χωρίς να παρουσιάζουν μετουσίωση οι πρωτεΐνες του πλάσματος. Η απόδοση της απομάκρυνσης των ιών και η πρωτεϊνική διαπερατότητα εξαρτάται από την δομή κάθε μεμβράνης. Σε κάθε κύκλο, είναι απαραίτητη η προσεκτική παρακολούθηση επίδοσης του κάθε νάνο-ηθμού. Η ακεραιότητα του κάθε φίλτρου πρέπει να εξακριβώνεται πριν και μετά από κάθε χρήση και κάθε κατασκευαστής οφείλει να παρέχει μεθόδους δοκιμών που έχουν αναπτυχθεί για τη συγκεκριμένη χρήση. Αν κάποιο φίλτρο δεν περάσει την δοκιμασία ακεραιότητας μετά τη χρήση, τότε το στάδιο διήθησης είναι απαραίτητο να επαναληφθεί. Υπάρχουν τέσσερις τύποι μεμβρανών που χρησιμοποιούνται:

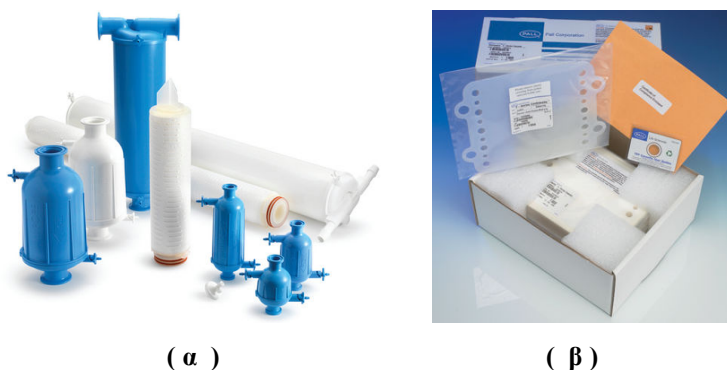
- Συσσκευή διήθησης εγκάρσιας (εφαπτόμενης) ροής (Cross-Flow)

A) *Viresolve*^{R4}: Τα πρωτεϊνικά διαλύματα φιλτράρονται με ένα τρόπο εγκάρσιας ροής. Η χρήση του είναι για μικρά (70 kDa) και μεσαία μεγέθη (180 kDa) πρωτεϊνικών παραγώγων. Μελέτες που έγιναν με ρυθμιστικό διάλυμα εμπλουτισμένο με ιούς έδειξαν ότι για τους ιούς SV-40, sindbis, reovirus, murine

⁴ Millipore Corporation (USA)

leukaemia virus και HIV η απομάκρυνση ήταν > 5 log, όσον αφορά τον ρολιονίγους η απομάκρυνση ήταν 2 log και 4 log για την HAV [33].

B) *Omega VR*⁵: Οι μεμβράνες 300K σχεδιάστηκαν για μακρομόρια μικρότερα από 200 kDa και μπορούν να παρέχουν μείωση > 4,5 log για τους ρετροϊούς. Οι μεμβράνες 100K χρησιμοποιούνται για πρωτεΐνες 80 kDa ή μικρότερες και απομακρύνουν > 4,5 log των παρβοϊών. Η προεπιλογή της παρτίδας της μεμβράνης από τον κατασκευαστή περιλαμβάνει δοκιμή των μικρών κασετών της μεμβράνης με ιούς. Πριν την αποστολή, δοκιμάζεται η ακεραιότητα των φίλτρων.



Εικόνα 1: Η εικόνα (α) παρουσιάζει το φίλτρο Virsolve^R, η εικόνα (β) παρουσιάζει το σετ φίλτρων OMEGA VRTM.
(πηγή: www.merckmillipore.com, www.pall.com)

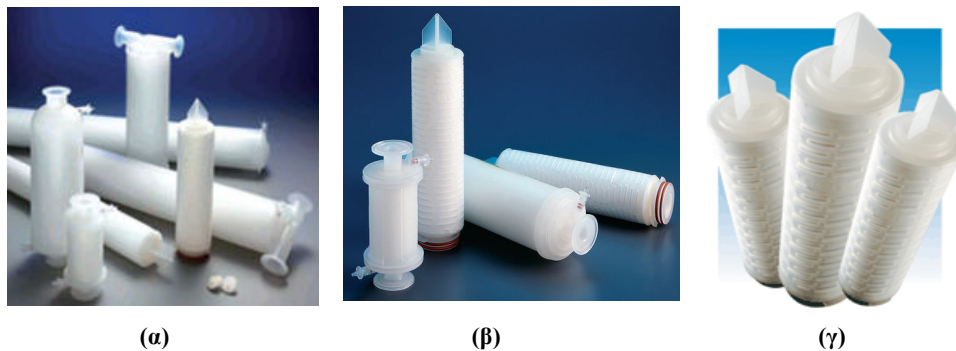
- Συσκευές διήθησης εσωτερικής ροής (Flow-through).

A) *Planova*^R: Η εταιρεία Asahi Kasei στην Ιαπωνία, έφτιαξε το πρώτο φίλτρο το 1989, το οποίο ήταν ειδικά σχεδιασμένο για την απομάκρυνση των ιών από βιοφαρμακευτικά παράγωγα [34]. Το εν λόγω φίλτρο αποτελείται από μικροπορώδη μεμβράνη από φυσικό υδρόφιλο χαλκαμμόνιο και κυτταρίνη μέσα σε πολυανθρακικό σώμα [35]. Οι μεμβράνες έχουν μέσο μέγεθος πόρων 15, 35,72 nm (*Planova*^R 15N, 35N και 75N αντίστοιχα). Πρόσφατα εισήχθη ένα νέο φίλτρο με μέγεθος πόρων 19nm και φέρεται να επιτρέπει πάνω από 3 έως 7 log κάθαρση σε μικρούς ιούς χωρίς περίβλημα όπως ο ραβονίγους και ο HAV από επεξεργασία IgG και FVIII προερχόμενα από πλάσμα [36]. Η διήθηση μπορεί να γίνει με την χρήση μονής συσκευής (εικόνα 1) ή να ενισχυθεί με την συναρμολόγηση πολλών φίλτρων του ίδιου ή διαφορετικού μεγέθους του πόρου, σε σειρά ή παράλληλα (εικόνα 2). Αυτά τα φίλτρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν με τρόπο εγκάρσιας ροής, αλλά οι περισσότεροι κατασκευαστές προτιμούν την μέθοδο Flow-through.

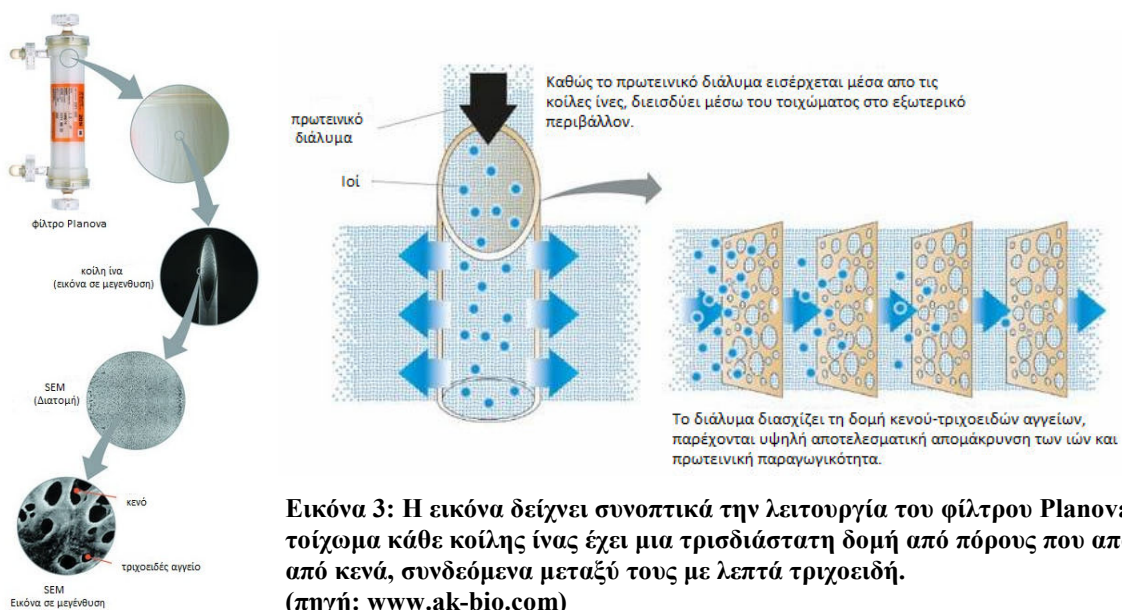
⁵ Pall Filtron, Northborough MA, USA

B) *Viresolve^R NFP και NFR*: Η *Viresolve Normal Flow Parvovirus (NFP)* μεμβράνη είναι κατασκευασμένη από σύνθετη PVDF μεμβράνη. Εφαρμόζεται σε πρωτεΐνες με μοριακό βάρος έως 160 kDa. Είναι σχεδιασμένη να απομακρύνει τους μικρούς ιούς, όπως ο παρνονίριος πάνω από 4 log σε υψηλής καθαρότητας πρωτεϊνικά διαλύματα [37]. Το *Viresolve Normal Flow Retrovirus* είναι από πολυμερές υλικό και αναπτύχθηκε για την απομάκρυνση των ρετροϊών με μέγεθος 80-120 nm, οι οποίοι μπορεί να μολύνουν καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή πρωτεϊνών με ανασυνδυασμένες και υβριδικές κυτταρικές καλλιέργειες.

Γ) *Ultipor VF*: Η *Ultipor Virus Filtration DV50 και DV20* είναι μια υδροφιλική τροποποιημένη PVDF πτυχωτή μεμβράνη (Pall corporation, USA). Η DV50 μπορεί να επιτύχει > 6 log αφαίρεση ιών μεγέθους μεγαλύτερου από 50nm και κατά περίπτωση μικρότερων από 50nm. Επίσης έχει παρουσιαστεί απομάκρυνση τάξεως 5 log για την HBV και 2 έως 3 log για την HCV. Όσον αφορά το DV20 μπορεί να απομακρύνει πάνω από 3 log, ιούς μεγαλύτερους από 20nm [38].



Εικόνα 2: Η εικόνα 2.α παρουσιάζει το φίλτρο *Viresolve NFP*, η εικόνα 2.β παρουσιάζει το φίλτρο *Viresolve NFR*, και η εικόνα 2.γ το φίλτρο *Ultipor VF* (πηγές: www.merckmillipore.com, www.pall.com).



Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται συνοπτικά οι φυσικές μέθοδοι αδρανοποίησης παθογόνων μικροοργανισμών, ενώ στον πίνακα 4 οι εφαρμογές των μεθόδων σε ασταθή και σταθερά παράγωγα αίματος.

Είδος Επεξεργασίας	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Παστερίωση	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Αδρανοποιεί ιούς με περίβλημα και μερικούς χωρίς περίβλημα συμπεριλαμβανομένης της HAV ➤ Δεν είναι τοξικό 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Το υλικό σταθεροποίησης μπορεί επίσης να προστεθεί τους ιούς ➤ Δεν αδρανοποιεί τον B19 ➤ Απαιτείται επικύρωση της διαδικασίας ➤ Η HBV είναι σχετικά σταθερή στην θερμότητα.
Dry Heat	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Αδρανοποιεί ιούς με περίβλημα και μερικούς χωρίς περίβλημα συμπεριλαμβανομένης της HAV ➤ Η επεξεργασία γίνεται στο τελικό δοχείο. ➤ Δεν είναι τοξικό 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Δεν αδρανοποιεί τον B19 ➤ Απαιτούνται τουλάχιστον 80°C για την εξάλειψη των ιών της ηπατίτιδας ➤ Απαιτείται αυστηρός έλεγχος στην περιεκτικότητα της υγρασίας ➤ Οι διαδικασίες κατάψυξης και λυοφιλοποίησης απαιτούν εκτενείς αξιολογήσεις
Vapour Heat	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Αδρανοποιεί ιούς με περίβλημα και μερικούς χωρίς περίβλημα συμπεριλαμβανομένης της HAV ➤ Δεν είναι τοξικό 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Δεν αδρανοποιεί τον B19 ➤ Οι διαδικασίες κατάψυξης και λυοφιλοποίησης απαιτούν εκτενείς αξιολογήσεις ➤ Σχετικά πολύπλοκη εφαρμογή.
Λευκαφαίρεση	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Αποτελεσματικό έναντι των ν CJD , CMV και HTLV ➤ Προλαμβάνει δυσμενή συμβάντα που μπορεί να προκύψουν από μετάγγιση σε ομάδες υψηλού κινδύνου εξαιτίας των υπολειπόμενων λευκών αιμοσφαιρίων ➤ Δεν είναι τοξικό. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Δεν αδρανοποιεί τον B19 και HAV ➤ Υψηλό κόστος για καθολική εφαρμογή.
Nanofiltration	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Αποτελεσματική έναντι στους ιούς με και χωρίς περίβλημα συμπεριλαμβανομένων των HAV και B19 ➤ Δεν προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών ➤ Υψηλή ανάκτηση όσον αφορά τις «μικρές» πρωτεΐνες όπως ο FIX ➤ Περιορισμένος κίνδυνος μεταγενέστερης μόλυνσης. ➤ Δεν είναι τοξικό. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Ο βαθμός της απομάκρυνσης των ιών εξαρτάται από το μέγεθος των πόρων του φίλτρου. ➤ Η εξάλειψη των μικρών ιών μπορεί να είναι ημιτελής ➤ Τα ελαττωματικά φίλτρα μπορεί να μην ανιχνευτούν με τους ελέγχους ακεραιότητας.

Πίνακας 3: Συνοπτικά οι φυσικές μέθοδοι αδρανοποίησης με τα βασικά χαρακτηριστικά τους (πηγή: WHO, Guidelines on viral inactivation and removal procedures, 2004)

Τεχνική	Ασταθή Παράγωγα			Σταθερά παράγωγα
	RBC	PLT	FFP	
Παστερίωση	X	X	✓	✓
Dry Heat	X	X	✓	
Vapour Heat	X	X	✓	
Λευκαφαίρεση	✓	✓	✓	
Νανοδιήθηση	X	X	✓	

Πίνακας 4: Εφαρμογές των φυσικών μεθόδων αδρανοποίησης σε ασταθή και σταθερά παράγωγα αίματος.

1.1.2 Χημικές τεχνικές αδρανοποίησης παθογόνων.

1.1.2.1 Επεξεργασία με Solvent-Detergent (S/D).

Είναι η μέθοδος που χρησιμοποιείται περισσότερο και είναι πολύ καλά αξιολογημένη. Αναπτύχθηκε στην αρχή του 1980 και αδρανοποιεί αποτελεσματικά ιούς με περίβλημα [39,40]. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται σε δεξαμενές 500-2500 πλασμάτων.

Με την μέθοδο αυτή λύεται το λιπιδικό περίβλημα των ιών καταστρέφοντας λιπίδια από την μεμβράνη και έτσι εμποδίζεται η πρόσδεσή τους στα κύτταρα και ο πολλαπλασιασμός τους. Χρησιμοποιείται το TNBP (tri-(N-butyl)-phosphate) που λειτουργεί σαν οργανικός διαλύτης και αφαιρεί λιπίδια από την μεμβράνη των μικροοργανισμών, και το Triton X-100, ένα μη ιονικό απορρυπαντικό, το οποίο σταθεροποιεί το TNBP και διασπά τις λιπιδικές στοιβάδες, διευκολύνοντας έτσι την εκχύλιση των λιπιδίων [41]. Μετά από μελέτες παρατηρήθηκε ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης του TNBP από 0,3 σε 1% και της θερμοκρασίας στους 30°C για τέσσερις ώρες επιτυγχάνεται η βέλτιστη αδρανοποίηση των ιών [42]. Επιπλέον το συνηθισμένο απορρυπαντικό χολικό νάτριο (sodium cholate) αντικαταστάθηκε από 1% Triton X-100 (polyoxyethylene-p-t-octylphenol), επειδή μπορεί εύκολα να απομακρυνθεί μαζί με το TNBP με υδροφοβική χρωματογραφία [43]. Σε μερικές διαδικασίες υπάρχει ένα τελικό βήμα με προσθήκη soybean ή castor oil για την απομάκρυνση του διαλύτη-απορρυπαντικού [44]. Πριν την επεξεργασία με S/D προηγείται διήθηση με φίλτρο 1μm για να απομακρυνθούν κύτταρα και υπολείμματα, έπειτα ακολουθείται αποστειρωμένη διήθηση μέσα σε ασκούς ή δοχεία με την χρήση 0,2μm φίλτρου και άσηπτης κατάθεσης [45]. Για μονήρη πλάσματα εφαρμόζεται 1% ή 2% TNBP και Triton X-45 σε πλαστικούς ασκούς υπό άσηπτες συνθήκες, τα οποία αφαιρούνται με 7,5% Castor oil.

1.1.2.2 Low pH (χαμηλό pH)

Η επεξεργασία με χαμηλό pH ήταν αρχικά σχεδιασμένη για την μείωση της συσσώρευσης των IgG ανοσοσφαιρινών και για την αντι-συμπληρωματική δραστηριότητα. Μελέτες έδειξαν ότι η παρουσία ιχνών από συγκεντρώσεις πεψίνης που είχε προστεθεί για τη μείωση της αντι-συμπληρωματικής δραστηριότητας, συνεισέφερε στην αδρανοποίηση των ιών. Έτσι, η μέθοδος αυτή απέκτησε έναν αριθμό παραλλαγών και παρατηρήθηκε ότι αρκετοί ιοί με περίβλημα αδρανοποιούνται σε χαμηλό pH όπως 5-5.5. Ωστόσο, κάθε κατασκευαστής πρέπει να επικυρώνει τη διαδικασία ξεχωριστά, αφού η αδρανοποίηση των ιών εξαρτάται από το pH, το χρόνο, τη θερμοκρασία, την περιεκτικότητα της πεψίνης, την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και την περιεκτικότητα της διαλυμένης ουσίας[42].

Ο πίνακας 5 παρουσιάζει τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα των χημικών μεθόδων αδρανοποίησης, και ο πίνακας 6 την εφαρμογή των μεθόδων στα ασταθή και σταθερά παράγωγα αίματος.

Τεχνική	Ασταθή Παράγωγα			Σταθερά παράγωγα
	RBC	PLT	FFP	
Solvent/Detergent	X	X	✓	✓
Low pH	X	X	✓	

Πίνακας 5: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα κάθε χημικής μεθόδου αδρανοποίησης παραγώγων αίματος.

Είδος Επεξεργασίας	Πλεονεκτήματα		Μειονεκτήματα	
	Solvent-Detergent	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Η περισσότερο χρησιμοποιούμενη και αξιολογημένη μέθοδος ➤ Αδρανοποιεί αποτελεσματικά ιούς με περίβλημα ➤ Έχει χαμηλή τοξικότητα και μη ανιχνεύσιμα υπολειμματικά επίπεδα 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Χρήση κυρίως για δεξαμενές πλάσμάτων. ➤ Ακατάλληλη μέθοδος για κυτταρικά παράγωγα λόγω διάλυσης των λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών. ➤ Δεν αδρανοποιεί ιούς χωρίς περίβλημα. 	
Low PH	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Κατάλληλη για επεξεργασία ανοσοσφαιρινών ➤ Αδρανοποίηση ορισμένων ιών με περίβλημα. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Η έκθεση σε χαμηλό PH καταστρέφει πολλές πρωτεΐνες. ➤ Δεν αδρανοποιεί ιούς χωρίς περίβλημα. 		

Πίνακας 6: Εφαρμογές χημικών μεθόδων αδρανοποίησης σε ασταθή και σταθερά παράγωγα αίματος.

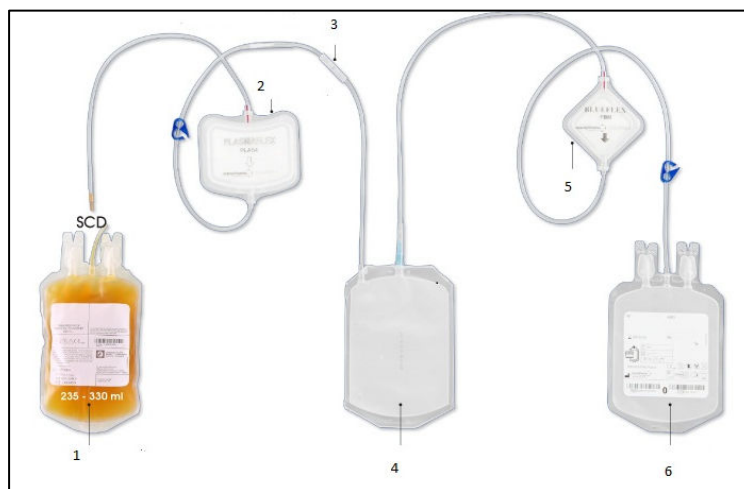
1.1.3 Βιολογικές-Φωτοδυναμικές τεχνικές αδρανοποίησης παθογόνων.

1.1.3.1 Επεξεργασία με Methylene Blue (MB)

Το κυανούν του μεθυλενίου είναι μια φωτοδραστική χρωστική φαινοθειαζίνης θετικά φορτισμένη με υψηλή συγγένεια για αρνητικά φορτισμένα συστατικά, όπως τα νουκλεϊκά οξέα και η επιφάνεια των ιών. Η δράση της βασίζεται στην παραγωγή ριζών οξυγόνου. Το ορατό φως καταλύει τον σχηματισμό οξυγόνου μέσω μεταφοράς ενέργειας με αποτέλεσμα την οξείδωση της γουανοσίνης (εικόνα 8) [46].

Δύο μέθοδοι είναι που χρησιμοποιούνται. Η αρχική μέθοδος “SPRINGE”, που αναπτύχθηκε στο κέντρο αίματος του Γερμανικού Ερυθρού Σταυρού, και η τροποποιημένη μέθοδος, που έχει διατεθεί στο εμπόριο με την ονομασία Theraflex MB plasma από την MacoPharma. Η μέθοδος SPRINGE απαιτεί ψύξη και απόψυξη του προϊόντος, ώστε να λυθούν τα λευκά αιμοσφαίρια και να απελευθερωθούν οι ενδοκυττάριοι ιοί, αφού το διάλυμα κυανού του μεθυλενίου διεισδύει μερικώς στην κυτταρική μεμβράνη. Έπειτα προστίθεται μια ποσότητα διαλύματος MB, για να επιτευχθεί μια τελική συγκέντρωση 1 $\mu\text{mol/L}$ και μετά φωτίζεται με λάμπα φθορισμού για 1 ώρα. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται σε εργοστασιακό επίπεδο. Το σύστημα TMB plasma (Theraflex Methylene Blue) είναι κατάλληλο για εφαρμογή μικρής κλίμακας όπως σε νοσοκομεία (εικόνα 4). Γίνεται χρήση φίλτρου 0.65 μm (Plasmafex PLAS4, MacoPharma) το οποίο απομακρύνει υπολειπόμενα λευκοκύτταρα, ερυθρά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια και συσσωματώματα και ελαχιστοποιεί τυχόν μικροσωματίδια [47]. Και στις δύο μεθόδους η τελική συγκέντρωση MB που χρησιμοποιείται είναι 1 μmol . Στην μέθοδο SPRINGE γίνεται προσθήκη διαλύματος MB (50 $\mu\text{mol/L}$), ενώ στην TMB τοποθετείται σε μορφή χαπιού (0,227 μmol) στο σωλήνα ανάμεσα στο φίλτρο της μεμβράνης και στον ασκό ακτινοβολήσης. Μετά την προσθήκη MB στην μέθοδο SPRINGE η ακτινοβολία γίνεται στον ασκό με το προϊόν το οποίο τοποθετείται σε μια διάφανη γυάλινη πλάκα φωτιζόμενη με μια συστοιχία από λαμπτήρες φθορισμού, ώστε να επιτευχθεί περίπου $17 \times 10^3 \text{ lux}$ σε απόσταση περίπου 8 cm για μια ώρα. Στην TMB μέθοδο η ακτινοβολία γίνεται με μια συσκευή ελεγχόμενη με μικροεπεξεργαστή και η επεξεργασία εξασφαλίζεται με συνθήκες GMP⁶, όπου η δόση και η ένταση του φωτισμού παρακολουθούνται συνεχώς αλλά και η θερμοκρασία διατηρείται $< 22^\circ\text{C}$. Η χρήση λαμπτήρων νατρίου χαμηλής πίεσης με μήκος κύματος 590 nm, αντί για τις λάμπες φθορίου που χρησιμοποιούνται κανονικά, μειώνει τον χρόνο ακτινοβολίας από τη μια ώρα στα είκοσι λεπτά κι έτσι επιτυγχάνεται η απαιτούμενη δόση των 180 J/cm^2 . Στο τέλος της επεξεργασίας, πάνω από το 90% του υπολειπόμενου MB απομακρύνεται με ειδικά σχεδιασμένο φίλτρο (Blueflex, MacoPharma).

⁶ Good Manufacturer Practice

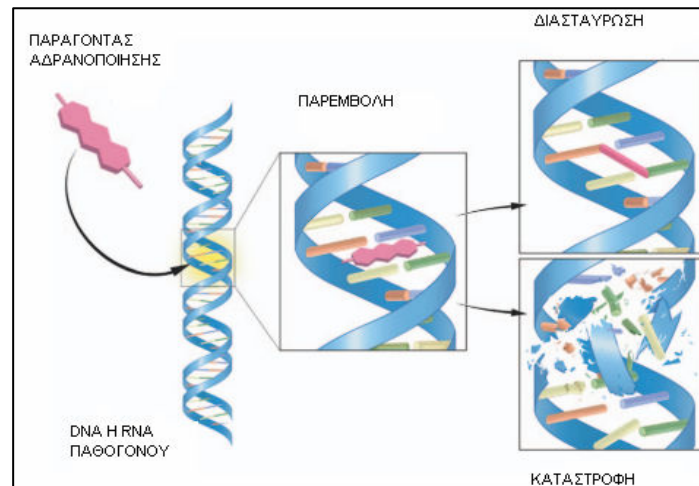


Εικόνα 4: Το σύστημα Theraflex περιλαμβάνει τον ασκό με το προϊόν που θα γίνει η επεξεργασία (1), φίλτρο για διήθηση (2), προσθήκη του Methylene blue (3), ασκός για ακτινοβολία (4), φίλτρο για την απομάκρυνση του MB, Blueflex (5), ασκός για αποθήκευση τελικού επεξεργασμένου προϊόντος (6). (Πηγή: <http://blood-safety.macopharma.com/>)

1.1.3.2 Ψωραλένια-Αμοτοσαλένιο (S-59) + UVA

Τα ψωραλένια είναι μικρά επίπεδα μόρια-ενώσεις που έχουν απομονωθεί από τα φυτά και είναι γνωστά ως φωτο-ευαίσθητοποιητές. Διασχίζουν τις κυτταρικές μεμβράνες και τα ιικά καψίδια και παρεμβάλλονται ανάμεσα στις βάσεις των νουκλεϊνικών οξέων (εικόνα 6). Πιο συγκεκριμένα, με την επίδραση της UVA ακτινοβολίας (320-400 nm) (εικόνα 8) τα ψωραλένια αντιδρούν με τις βάσεις πυριμιδίνης DNA ή RNA και συνδέονται ομοιοπολικά. Με αυτό τον τρόπο εμποδίζεται η αντιγραφή και η μεταγραφή του DNA και RNA και τα κύτταρα οδηγούνται σε θάνατο (εικόνα 5) [48,49].

Το υδροχλωρικό αμοτοσαλένιο ή S-59 είναι μια συνθετική ένωση ψωραλενίου και εκτεταμένες μελέτες έχουν αποδείξει την ικανότητά του όσον αφορά την αδρανοποίηση των παθογόνων (INTERCEPT blood system, Cerus corporation). Το S-59 επιλέχθηκε γιατί απαιτείται μικρότερη δόση υπεριώδους ακτινοβολίας και έτσι προστατεύονται τα προϊόντα από UVA βλάβη [50]. Μετά την επεξεργασία με το S-59 το υπολειπόμενο αμοτοσαλένιο και τα φώτο-προϊόντα του αφαιρούνται μέσω επώασης με συσκευή προσρόφησης ενώσεων (CAD), ώστε να αποφευχθεί πιθανή τοξικότητα. Η τεχνολογία διατίθεται με την εμπορική ονομασία INTERCEPT blood system από την εταιρεία Cerus και αποτελείται από ένα αποστειρωμένο σύστημα τριών ασκών αποθήκευσης, έναν περιέκτη 15 ml υδροχλωρικού αμοτοσαλενίου 6 mM και μια συσκευή απομάκρυνσης της ουσίας και μια συσκευή ακτινοβολίας.



Εικόνα 5: Ο μηχανισμός λειτουργίας των ψωραλενίων για την καταστροφή του DNA ή RNA των παθογόνων. Η επίπεδη δομή επιτρέπει την παρεμβολή του παράγοντα αδρανοποίησης στις ελικοειδείς περιοχές του νουκλεϊκού οξέος. Η ενεργοποίηση με πηγή φωτός ή η αλλαγή στο περιβάλλον pH έχει ως αποτέλεσμα την διασταυρούμενη σύνδεση του DNA ή RNA, καταστρέφοντας και εμποδίζοντας έτσι την αντιγραφή και μεταγραφή του νουκλεϊκού οξέος. (Bryant & Klein 2007)

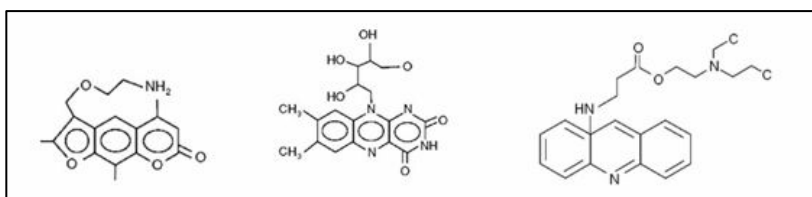
1.1.3.3 Ριβοφλαβίνη + UV

Η Ριβοφλαβίνη είναι μια βιταμίνη απαραίτητης σημασίας για τον ανθρώπινο οργανισμό, η οποία χρησιμοποιείται για την αδρανοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών. Είναι μια επίπεδη δομή με τρεις δακτυλίους που συνδέεται με τα νουκλεϊκά οξέα και παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων DNA και RNA (εικόνα 6). Με την επίδραση φωτός UVA ή ορατού φωτός οξειδώνει την γουανοσίνη, μέσω μεταφοράς ηλεκτρονίων και αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σπάσιμο της αλυσίδας (εικόνα 8). Ο μηχανισμός δράσης της διαδικασίας είναι τριπλός: άμεση μεταφορά ηλεκτρονίων από την οξείδωση της γουανοσίνης, παραγωγή ριζών οξυγόνου, παραγωγή υπεροξειδίων [51]. Τελικά, η αποκατάσταση και η αντιγραφή του DNA δεν είναι δυνατή.

Η ριβοφλαβίνη και τα παράγωγά της παρουσιάζονται σε πολλά τρόφιμα και φυσικά προϊόντα αλλά και στο αίμα. Επιπλέον χρησιμοποιούνταν για τη θεραπεία του νεογνικού ίκτερου, ως φωτοθεραπεία. Σύμφωνα με αυτά, η απομάκρυνσή τους από τα επεξεργασμένα προϊόντα δεν είναι απαραίτητη, αφού δεν παρουσιάζει τοξικότητα, και ο αμερικανικός οργανισμός τροφίμων και φαρμάκων την έχει χαρακτηρίσει ως «γενικά χαρακτηρισζόμενη ως ασφαλές προϊόν» [52]. Το σύστημα που χρησιμοποιεί την παραπάνω μέθοδο κυκλοφορεί με την εμπορική ονομασία Mirasol PRT System από την εταιρεία TerumoBCT.

1.1.3.4 S-303

Το S-303 είναι ένα μικρό μόριο προερχόμενο από τους αλκυλιούντες παράγοντες, είναι παράγωγο της μουστάρδας (quinacrine mustard) και ανήκει στην κατηγορία των FRALE (frangible anchor linker effector). Οι ενώσεις FRALE περιέχουν μια ομάδα παρεμβολής που εισάγεται στις ελικοειδείς περιοχές των DNA και RNA, μια ομάδα που επιτρέπει την ομοιοπολική σύνδεση στα νουκλεϊκά οξέα και ένα κεντρικό ευαίσθητο δεσμό που συμβάλλει στην αποικοδόμηση της ένωσης. Το S-303 είναι θετικά φορτισμένο και παρεμβάλλεται εύκολα στις ελικοειδείς περιοχές των αρνητικά φορτισμένων νουκλεϊκών οξέων (εικόνα 6). Η διαδικασία δεν εξαρτάται από την παρουσία φωτός, αντιθέτως η ενεργοποίηση συμβαίνει με την αλλαγή του pH από το χαμηλότερο του περιβάλλοντος αποθήκευσης στο ουδέτερο των ερυθρών κυττάρων και προκαλείται υδρόλυση και παραγωγή του S-300 που είναι ένα πρωτογενές προϊόν αποικοδόμησης. Το S-300 μεταβολίζεται και στη συνέχεια απεκκρίνεται. Τα υπολειπόμενα προϊόντα αποικοδόμησης απομακρύνονται με ένα στάδιο προσρόφησης (CAD). Το S-303 ενώνεται και με άλλες πρωτεΐνες και κυτταρικές μεμβράνες, ενώ το 20% μπορεί να παραμείνει στα ερυθρά αιμοσφαίρια [53].



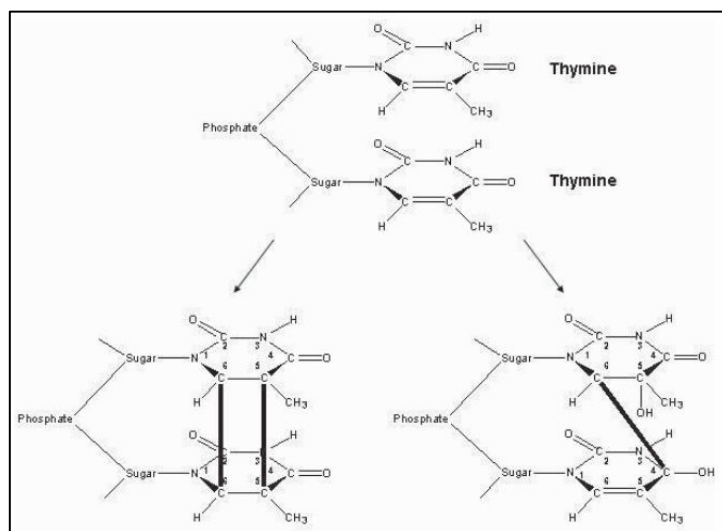
Εικόνα 6: Δομή τριών μοριακών ενώσεων. Από τα αριστερά προς τα δεξιά: S-59, riboflavin, S-303 (πηγή: Arch Pathol Lab Med. 2007;131;719-733)

1.1.3.5 UVC ακτινοβολία

Πρόσφατα βρίσκεται υπό ανάπτυξη μια νέα μέθοδος αδρανοποίησης παθογόνων με την χρήση αποκλειστικά UVC ακτινοβολίας χωρίς κάποια άλλη φωτο-ενεργό ουσία. Η τεχνολογία αυτή καλείται THERAFLEX UV και αναπτύχθηκε από την υπηρεσία αιμοδοσίας του γερμανικού ερυθρού σταυρού σε συνεργασία με την MacoPharma με σκοπό την αδρανοποίηση παθογόνων οργανισμών και λευκοκυττάρων στα αιμοπετάλια και το πλάσμα. Η συσκευή ακτινοβολίας (Macotronic UV) καθώς και ο ασκός του συστήματος έχουν πάρει έγκριση CE-mark από το 2009. Μετά απο επιτυχή ολοκλήρωση των μελετών φάση I για ασφάλεια και ανεκτικότητα, αναμένεται έγκριση για κλινικές δοκιμές φάσης III.

Είναι γνωστό ότι η UVC ακτινοβολία έχει ιοκτόνο και μικροβιοκτόνο δράση [225,226]. Η εφαρμογή βραχέων κυμάτων UVC ακτινοβολίας (200-280 nm) (εικόνα 7) αδρανοποιεί εύρος παθογόνων μικροοργανισμών κυρίως με άμεση αλληλεπίδραση με το νουκλεϊκό οξύ. Αυτό οδηγεί πρωτίστως στο σχηματισμό κυκλοβουτανίου πυριμιδίνης και διμερών πυριμιδίνης-πυριμιδόνης, τα οποία εμποδίζουν την

διαδικασία της μεταγραφής [227,228]. Τα περισσότερα από τα φωτοπροϊόντα παράγονται ανάμεσα στις παρακείμενες πυριμιδίνες. Επιπλέον, μεταλλάξεις που προκαλούνται περιλαμβάνουν βάσεις που βρίσκονται σε διαφορετικούς κλώνους DNA. Η έκθεση των κυττάρων σε UVC πυροδοτεί μια συνολική απάντηση, η οποία μπορεί, είτε να αντισταθμίσει τα επιβλαβή αποτελέσματα ενεργοποιώντας την επιδιόρθωση του DNA , είτε να οδηγήσει σε κυτταρική απόπτωση [229,230]. Πιο συγκεκριμένα, το προϊόν αίματος μεταφέρεται αρχικά σε διαπερατό ασκό διαστάσεων 19 X 38cm. Έπειτα, η UVC ακτινοβολία λαμβάνει χώρα σε χρονικό διάστημα 30 min έως 24 h από την στιγμή της προετοιμασίας. Η ακτινοβολία γίνεται και από τις δύο πλευρές του ασκού, ο οποίος τοποθετείται σε πλάκα χαλαζία και αναδεύεται σε 110 rpm. Ο ασκός είναι στερεωμένος στις δύο άκρες προκειμένου να αποφευχθεί η κίνηση εκτός της περιοχής ακτινοβολίας ,παράλληλα όμως, επιτρέπεται η ελεύθερη κίνηση του διαλύματος μέσα στον ασκό.



Εικόνα 7: Μηχανισμός λειτουργίας της UVC ακτινοβολίας. Η αδρανοποίηση βασίζεται στην απορρόφηση της UVC από το νουκλεϊκό οξύ. Αυτό προκαλεί τον σχηματισμό κυκλοβουτανίου πυριμιδίνης και διμερών πυριμιδίνης-πυριμιδόνης τα οποία εμποδίζουν την μεταγραφή του νουκλεϊκού οξέος. Τα περισσότερα διμερή σχηματίζονται ανάμεσα στις παρακείμενες πυριμιδίνες. (πηγή: 13,14)

1.1.3.6 γ- ακτινοβολία

Η γ-ακτινοβολία έντασης 20-25 Gy χρησιμοποιείται κυρίως για την προστασία από την GVHD αλλά και για την αδρανοποίηση άλλων παθογόνων οργανισμών. Η επαγόμενη από φωτόνια ακτινοβολία προκαλεί αλλαγές σε μοριακό επίπεδο. Πιο συγκεκριμένα, προκαλείται μετατόπιση ηλεκτρονίων εσωτερικά και στη συνέχεια προκύπτει η δημιουργία ελεύθερων ριζών, οι οποίες βοηθούν στην διάσπαση χημικών δεσμών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή του DNA των παθογόνων οργανισμών, την αδυναμία πολλαπλασιασμού και την αδρανοποίηση των λεμφοκυττάρων του ασκού που προορίζεται για μετάγγιση. Η γ-ακτινοβολία εφαρμόζεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα αιμοπετάλια και τα ουδετερόφιλα.

Στους πίνακες 7 και 8 παρουσιάζονται τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα κάθε μεθόδου καθώς και η εφαρμογή τους σε ασταθή και σταθερά παράγωγα αίματος.

Είδος Επεξεργασίας	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Methylene blue+ UV	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Αδρανοποιεί αποτελεσματικά τους ιούς με περίβλημα ➤ Αδρανοποιεί τον B19 ➤ Με τη χρήση φίλτρου απομακρύνονται τα υπολείμματα και τα λευκά αιμοσφαίρια. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Δεν είναι κατάλληλο για κυτταρικά παράγωγα αφού καταστρέφει τις κυτταρικές πρωτεΐνες. ➤ Δεν αδρανοποιεί ενδοκυττάριους ιούς, παράσιτα και πρωτόζωα.
Riboflavin+ UV	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Δεν χρειάζεται απομάκρυνση των υπολειμμάτων αφού είναι φυσικό προϊόν. ➤ Αδρανοποιεί αποτελεσματικά ιούς με περίβλημα και αρκετούς χωρίς περίβλημα. ➤ Εφαρμόζεται σε κυτταρικά παράγωγα. ➤ Αντικαθιστά την γ-ακτινοβολία, αδρανοποιεί τα λευκά αιμοσφαίρια. ➤ Αδρανοποιεί τις HAV και HEV 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Δεν εφαρμόζεται ακόμα σε ολικό αίμα και ερυθρά αιμοσφαίρια.
HCL Amotosalen (S-59)+ UV	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Αδρανοποιεί ιούς με και χωρίς περίβλημα, βακτήρια, λευκά, πρωτόζωα. ➤ Προφυλλάσει από TA-GVHD ➤ Εφαρμόζεται και σε κυτταρικά παράγωγα. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Υψηλό κόστος ➤ Δημιουργίας ανησυχίας για απώτερες μεταλλαξιογόνες επιπτώσεις σε ασθενείς αφού ο στόχος είναι το κυτταρικό DNA και RNA.
S-303	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Δρά ανεξάρτητα από την παρουσία φωτός. ➤ Δεν απαιτείται ειδικός εξοπλισμός. ➤ 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Σε κλινικές δοκιμές φάσης III στα ερυθρά αιμοσφαίρια αναπτύχθηκαν ανπερυθροκυτταρικά αντισώματα.
UCV ακτινοβολία	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Δεν απαιτείται απομάκρυνση περίσσειας φωτο-προϊόντων αφού δεν χρησιμοποιεί φωτο/ενεργά αντιδραστήρια. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Δεν αδρανοποιεί αποτελεσματικά τον HIV. ➤ Δεν έχει ερευνηθεί εκτενών για χρήση σε πλάσμα.
γ-ακτινοβολία	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Προφυλλάσει από την TA-GVHD 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Μεγάλο κόστος.

Πίνακας 7: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των βιολογικών-φωτοδυναμικών μεθόδων αδρανοποίησης.

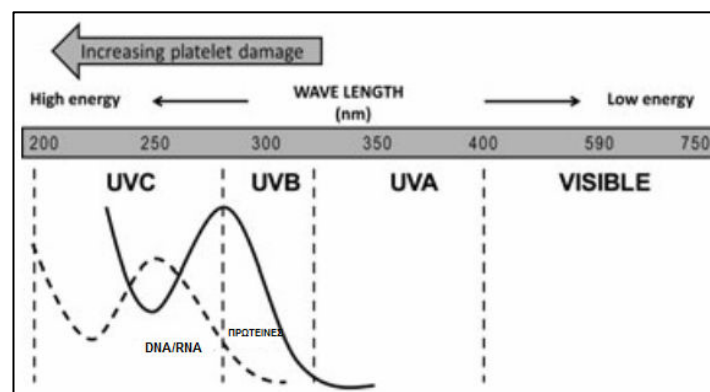
Τεχνική	Ασταθή Παράγωγα			Σταθερά παράγωγα
	RBC	PLT	FFP	
Methylene blue+UV	X	X	✓	
Riboflavin+ UVA	*Κλινικές δοκιμές	✓	✓	X
S-59 + UVA	*Κλινικές δοκιμές	✓	✓	
S-303	*Κλινικές δοκιμές	X	X	
UVC ακτινοβολία	*Κλινικές δοκιμές	*Κλινικές δοκιμές	*Κλινικές δοκιμές	X
Γ-ακτινοβολία	✓	✓	X	X

Πίνακας 8: Εφαρμογή τεχνικών σε ασταθή και σταθερά παράγωγα αίματος.

Τέλος παρατίθεται ένας συνοπτικός πίνακας με το σύνολο των μεθόδων αδρανοποίησης που βρίσκονται σε χρήση:

Παράγωγο	Τεχνολογία	Στόχος	Μέθοδος	Κλινικές Μελέτες	Απομάκρυνση δραστικής ουσίας
Πλάσμα	Amotosalen+UVA light INTERCEPT (Cerus)	Νουκλεικά Οξέα	Βιολογική-Φωτοχημική	CE Marked Nov 2006 (Class III)	Με συσκευή απορρόφησης δραστικής ουσίας
	Riboflavin+UV light Mirasol (Terumo BCT)	Νουκλεικά Οξέα	Βιολογική-Φωτοχημική	CE Marked Aug 2008 (Class IIb)	Δεν χρήζει
	Methylene Blue+visible light THERAFLEX (MacoPharma)	Νουκλεικά Οξέα	Βιολογική-Φωτοχημική	CE Marked 2001 (Class IIb) 2004 (Class III)	Με ειδικό φίλτρο
	Solvent/Detergent Octaplas (Octapharma)	Μεμβράνες Λιπιδίων	Χημική δεξαμενοποίηση	Licensed 1998 (UK)	Ναι
	Solvent/Detergent (Colombier, Swicherland)	Μεμβράνες Λιπιδίων	Χημική δεξαμενοποίηση	CE Marked 2009	Ναι
Αιμοπετάλια	Riboflavin+UVA light (Terumo BCT)	Νουκλεικά Οξέα	Βιολογική-Φωτοχημική	CE Marked Oct 2007 (class IIB)	Ναι
	Amotosalen+UVA light INTERCEPT (Cerus)	Νουκλεικά Οξέα	Βιολογική-Φωτοχημική	CE Marked May 2002 (Class III)	Ναι
	UCV light THERAFLEX (Macopharma)	Νουκλεικά Οξέα	Βιολογική-Φωτοχημική	CE marked 2009 (class IIB) at phase II/III trial	Δεν χρήζει
RBC Ολικό αίμα	S-303 INTERCEPT (Cerus)	Νουκλεικά Οξέα	Βιολογική-Φωτοχημική	Phase III initiated (κλινική αξιολόγηση)	Ναι
	Riboflavin+UV light Mirasol	Νουκλεικά Οξέα	Βιολογική-Φωτοχημική	Phase I ολοκληρώθηκε (Κλινική αξιολόγηση)	Ναι

Πίνακας 9: Στον πίνακα παρατίθενται τα συστήματα αδρανοποίησης, τα παράγωγα αίματος που επεξεργάζονται καθώς και ο στόχος, η μέθοδος που χρησιμοποιείται αλλά και οι κλινικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί έως σήμερα και η ανάγκη για απομάκρυνση της δραστικής ουσίας (πηγή: Peter Schlenke, Pathogen inactivation technologies for cellular blood components, 2014)



Εικόνα 8: Σύγκριση του φάσματος των ενεργειών που χρησιμοποιούνται στις τεχνολογίες αδρανοποίησης των παθογόνων. Λόγω του φάσματος απορρόφησης των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων, η UVC ακτινοβολία προκαλεί καταστροφή των προϊόντων αίματος σε υψηλές δόσεις. Το φαινόμενο αυτό σταδιακά μειώνεται όσον αφορά τις UVB, UVA και το ορατό φως. (πηγή: Vox Sanguinis, 2012).

2.1. Αποτελεσματικότητα σε σταθερά παράγωγα αίματος.

Στα σταθερά παράγωγα αίματος εντάσσονται οι λευκωματίνη, οι παράγοντες πήξης και οι ανοσοσφαιρίνες. Όλα τα παραπάνω παράγονται σε βιομηχανικό-βιοφαρμακευτικό επίπεδο.

Οι τεχνικές αδρανοποίησης διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την αποτελεσματικότητα τους έναντι των διαφόρων παθογόνων, την επίδραση που ασκούν στις διάφορες πρωτεΐνες και παράγοντες πήξης του πλάσματος ή ακόμα και στην κλινική ανταπόκριση από τους λήπτες. Γι' αυτό το λόγο οι συγκρίσεις της αποτελεσματικότητας είναι δύσκολες, γιατί τα αποτελέσματα της αδρανοποίησης αναφέρονται σε διαφορετικές μεθοδολογίες υπολογισμού της μείωσης των μολυσματικών παραγόντων. Το όριο στόχος που έχει τεθεί για την ελάττωση των λοιμογόνων τίτλων είναι τα 6 log/mL και δυνητικά εμποδίζει την μετάδοση πολλών γνωστών ιών σχετιζόμενων με την μετάγγιση. Ωστόσο η μείωση αυτή της τάξεως δεν προφυλλάσει από μερικούς ιούς όπως τον B19 που κατά την οξεία φάση έχει τίτλους $> 10^7$, ενώ για τα βακτήρια απαιτείται < 6 log μείωση. Βάσει στοιχείων όλες οι τεχνικές φαίνεται να αδρανοποιούν αποτελεσματικά τους ιούς με περίβλημα, με εξαιρετική αποτελεσματικότητα έναντι του ιού HIV –για τον οποίο αρχικά αναπτύχθηκαν- και έναντι του ιού της ηπατίτιδας C, όπως επίσης και έναντι του πρόσφατα εμφανιζόμενου ιού WNV. Όσον αφορά τους ιούς χωρίς περίβλημα λιπιδίων, εκεί φαίνεται να παρουσιάζουν ποικίλη αποτελεσματικότητα όπως επίσης και έναντι διαφόρων βακτηρίων.

2.1.1 Παστερίωση

Στην βιομηχανία η *παστερίωση* έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε αρκετά σταθερά παράγωγα (προϊόντα) πλάσματος, όπως οι παράγοντες πήξης και διαλύματα ανοσοσφαιρινών [54]. Κατά την παστερίωση, η προσθήκη σταθεροποιητών προστατεύει τη λειτουργικότητα των πρωτεϊνών του πλάσματος και περιορίζει τις μοριακές τροποποιήσεις. Ο σταθεροποιητής που χρησιμοποιείται για την αλβουμίνη προστατεύει από την μετουσίωση και τη δημιουργία συσσωματωμάτων κατά την επεξεργασία. Όσον αφορά τους παράγοντες πήξης μπορεί να παρατηρηθεί μια απώλεια 10-30% της βιολογικής δραστηριότητας. Επιπλέον, ο πιθανός κίνδυνος της παστερίωσης –όπως και κάθε άλλης επεξεργασίας με θερμότητα- πρέπει να είναι επιστημονικά σταθμισμένος και αξιολογημένος έναντι του κινδύνου των αλλαγών της διαμόρφωσης των πρωτεϊνών του πλάσματος και την πιθανής πρόκλησης νεο-αντιγονικών δομών.

Η παστερίωση της αντιθρομβίνης με την παρουσία κιτρικών ιόντων έχει αποδειχθεί ότι επάγει μερική απώλεια της δραστηριότητας του συμπαραγόντα της ηπαρίνης, της ικανότητας δέσμευσης της

ηπαρίνης αλλά και αλλαγή του ενεργού φυσικού μορίου προς ανενεργό λανθάνουσα κατάσταση, ωστόσο η κλινική σημαντικότητα της λανθάνουσας αυτής κατάστασης είναι αβέβαιη. Στη συνέχεια, η παστερίωση του παράγοντα VIII -ως πρόσθετο βήμα αδρανοποίησης ιών μετά από την επεξεργασία με S/D- φαίνεται να έχει αρνητικές επιπτώσεις, όπως πιο αργή πρωτεόλυση της θρομβίνης, πιο γρήγορο ρυθμό παραγωγής FXa, καθώς και μεγαλύτερη δέσμευση φωσφολιπιδίων. Κλινικά, υπήρξε μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης αναστολέα σε ασθενείς με Αιμορροφιλία

Κατά την ετοιμασία ανοσοσφαιρίνης επιτυγχάνεται αποτελεσματική αδρανοποίηση των HIV, CHV, VCV, ECHO, HCV, mumps και vaccinia, όταν γίνεται θέρμανση στους 60° για μία ώρα [55]. Σε σπάνιες περιπτώσεις έχει αναφερθεί περιστατικό μετάδοσης ηπατίτιδας Β. Κατά τη διάρκεια της παστερίωσης οι ιοί με περίβλημα αδρανοποιούνται μέσα σε μια ώρα σε ποσοστό σχεδόν 90% των ιών, ενώ οι ιοί χωρίς περίβλημα EMC και PPV αδρανοποιήθηκαν σταδιακά μέσα σε χρονικό διάστημα άνω των 10 ωρών. Ο πίνακας που ακολουθεί παρουσιάζει το σύνολο των ιών που αδρανοποιούνται με τη μέθοδο της παστερίωσης.

Ιοί που ελέγχονται για αδρανοποίηση με την χρήση της παστερίωσης		
BVDV	ECHO	HSV
BHV	EMC	Mumps
CHV	ERV	MVM
CMV	HAV	Polio
Coxsackievirus	HCV	PPV
DHBV	HIV	PRV
Parvovirus	SIN	SV
TBEV	Vaccinia	Visna
VSV	VFV	

Πίνακας 10: Ιοί που αδρανοποιούνται με την μέθοδο της παστερίωσης.
(πηγή: Gail Sofer, BioPharm's, 2002).

Όσον αφορά την ανοσοσφαιρίνη G (IgG) έγινε παστερίωση στους 60° C για 10 ώρες μετά την απομάκρυνση της αιθανόλης και την προσθήκη 33% σορβιτόλης ως σταθεροποιητή. Ο δείκτης κάθαρσης ήταν > 5,3 log για τον HIV-1, > 4,7 για τον BVDV, > 7,3 για τον BHV, 2.9 για τον EMC και 3,4 για τον PPV. Κατά την χρωματογραφική διαδικασία παραγωγής λευκωματίνης από πλάσμα, η αδρανοποίηση του ιού DHBV αξιολογήθηκε και φαίνεται ότι παρέχει μείωση > 6.5 log [56], αντίστοιχα η HAV φαίνεται να έχει μια μείωση 4.4 log για ένα διάλυμα αλβουμίνης 5% και > 3.9 log για διάλυμα αλβουμίνης 20% [57]. Ακολούθως, η παστερίωση κατά την διαδικασία κάθαρσης την αντιθρομβίνης από πλάσμα, παρέχει μείωση της τάξεως $\geq 5,5$ log για τον HIV (σε 15 λεπτά), $\geq 6,6$ για τον BHV (σε 1 έως 2,5 ώρες), $\geq 5,0$ για τον BVDV (σε τριάντα λεπτά) και 6,0 για τον EMC (σε 2,5 ώρες) [58]. Γενικά η HAV είναι θερμικά πολύ πιο σταθερή από τον HIV-1 και τον TBEV. Η HAV αδρανοποιείται κατά 5,8 log μετά από πέντε ώρες στους 60° C, ενώ μέσα σε είκοσι λεπτά ο HIV-1 αδρανοποιείται κατά 6,2 log. Για τον ιό

PRV απαιτούνται τριάντα λεπτά για αδρανοποίηση 6,6 log και 7,3 log για τον TBEV σε διάστημα τριών ωρών. Αντιθέτως ο ιός MVM φαίνεται να μην παρουσιάζει σημαντική μείωση αφού μετά από 10 ώρες παστερίωσης η μείωση είναι μόνο 3,2 log [59].

Η αδρανοποίηση του ιού της ηπατίτιδας Α με την μέθοδο της αδρανοποίησης μελετήθηκε και στον παράγοντα FVIII. Η HAV αδρανοποιήθηκε αισθητά αλλά οι σταθεροποιητές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της παραγωγής καθυστέρησαν την αδρανοποίηση και βρέθηκαν εναπομείναντα επίπεδα μολυσματικής HAV ακόμα και μετά από 10 ώρες επεξεργασίας [60].

Η αδρανοποίηση του παρβο-ιού B19 σε πλάσμα στους 60° C φαίνεται να είναι χρόνο-εξαρτώμενη. Ο B19 δεν ανιχνευόταν μετά από 12 λεπτά, ωστόσο οι συγγραφείς της μελέτης αυτής επισήμαναν ότι δεν σημαίνει πως η επεξεργασία με θερμότητα αδρανοποίησε εντελώς τον ιό [61]. Όσον αφορά διάφορες σταθεροποιημένες πρωτεΐνες του πλάσματος (FVIII, AT, ενδομυϊκή ανοσοσφαιρίνη, ενδοφλέβια ανοσοσφαιρίνη) η αδρανοποίηση με θέρμανση στους 60° C των YFV, TBEV, και BVDV έδειξε ότι και οι τρεις ιοί αδρανοποιήθηκαν μέσα σε έξι ώρες. Μικρές διαφορές βέβαια παρατηρήθηκαν εξαρτώμενες από το δείγμα της πρωτεΐνης στο οποίο αδρανοποιήθηκαν οι ιοί. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι ο ιός BVDV είναι πιο σταθερός σε σχέση με τους άλλους δύο [62].

Η παστερίωση του σταθεροποιημένου υγρού του αναστολέα της α1 πρωτεΐνης από πλάσμα στους 60° C είναι αποτελεσματική για αδρανοποίηση των ιών κάτω από το όριο ανίχνευσης. Για τους HIV, HSV, VSV, CMV απαιτείται χρονικό διάστημα μιας ώρας. Ο ιός polio χρειάζεται 5 ώρες επεξεργασίας ενώ ο ιός της ευλογιάς πέντε έως δέκα ώρες. Τέλος, ο ιός PPV αδρανοποιείται σε διάστημα δέκα ωρών ενώ ο *Visna virus* χρειάζεται περίπου μισή ώρα [63].

Μια τροποποιημένη διαδικασία παστερίωσης χρησιμοποιήθηκε για αδρανοποίηση ιών σε ενδιάμεσο παράγοντα VIII (63° C για δέκα ώρες). Σύμφωνα με αυτό το πρωτόκολλο αδρανοποιήθηκαν ιοί με περίβλημα (HIV, SIN, HSV, PRV) και χωρίς περίβλημα (polio, coxackievirus, HAV). Τα επίπεδα αδρανοποίησης σε log ήταν: > 9,9 για τον HIV, > 8,4 για τον SIN, > 7,7 για τον HIV-1, > 5,3 για τον PRV, > 5.6 για την HAV, > 9,8 για τον polio-1, > 4.7 για τον coxackievirus-B6 και > 1,1 για τον SV40. Η θερμοκρασία αυξήθηκε από τους 60 στους 63° C, γιατί κατά την βιβλιογραφία παρατηρήθηκε ότι ήταν ιδανικότερη θερμοκρασία για την αδρανοποίηση των *ricornaviruses* [64-65]. Τέλος, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι αυτή η θερμοκρασία είναι αποτελεσματική και για αδρανοποίηση ιών πάνω από 4,5 log σε παρασκευάσματα FVIII υψηλής καθαρότητας σταθεροποιημένα με τον παράγοντα Von Willebrand.

Ο παρακάτω πίνακας δείχνει την αδρανοποίηση των ιών σε πλάσμα και παράγωγα πλάσματος χρησιμοποιώντας την μέθοδο της παστερίωσης παρουσιάζοντας ως παράδειγμα την αδρανοποίηση του FVIII.

Ιός	Ευρος αδρανοποίησης (σε log ID50)	Χρόνος που απαιτήθηκε (ώρα)
HIV	≥5.0	1.0
CMV	≥6.0	8
EBV	≥3.3	0.5
HSV	≥5.9	4
Poliovirus	≥7.1	10
Vaccinia virus	6.2	10

Πίνακας 11: Επεξεργασία διαλύματος παράγοντα πήξεως VIII με τη μέθοδο της παστερίωσης.
(πηγή: Hilfenhaus et al.)

Συμπερασματικά, η παστερίωση χρησιμοποιείται επιτυχώς σε σταθερά παράγωγα με την προσθήκη σταθεροποιητών για την αποφυγή μοριακών τροποποιήσεων/μετουσιώσεων. Οι ιοί με περίβλημα αδρανοποιούνται αποτελεσματικά μέσα σε 1h ενώ οι ιοί χωρίς περίβλημα σε χρονικό διάστημα >10 h. Αναφέρεται ότι ο ιός MVM δεν παρουσίασε σημαντική μείωση σε επεξεργασία της αντιθρομβίνης III, ομοίως και η HAV σε επεξεργασία του FVIII

2.1.2 Ξηρή θέρμανση (Dry Heat)

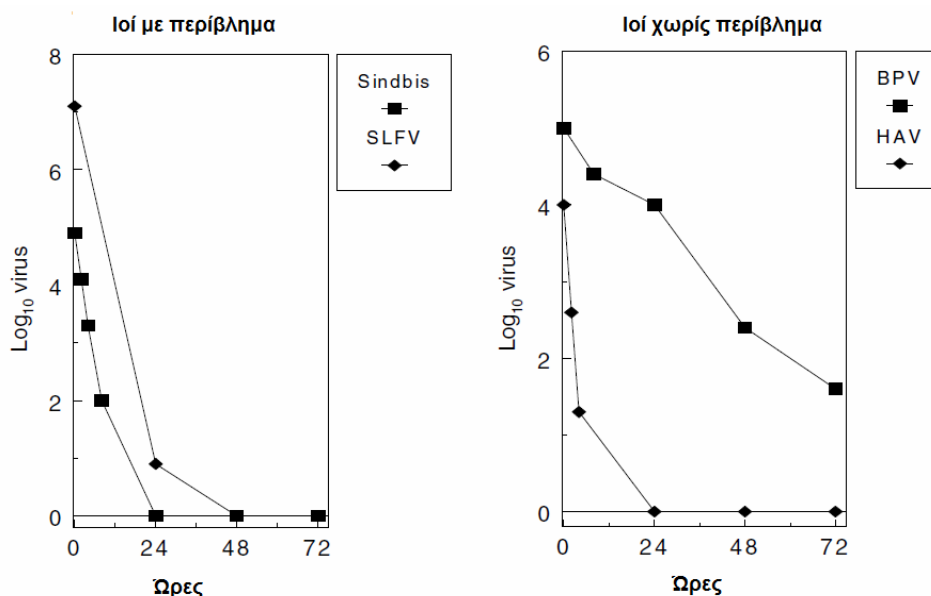
Σε μια μελέτη που πραγματοποίησαν οι Kim, In Seop και συν, το 2008, αξιολογήθηκε η ικανότητα της μεθόδου της *Dry Heat* (ξηρής θέρμανσης) να ενισχύει την ασφάλεια του FVIII. Η απώλεια της δραστηριότητας του FVIII κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας με ξηρή θέρμανση ήταν περίπου 5%, ενώ καμιά σημαντική μεταβολή δεν σημειώθηκε στα φυσικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά (όπως χρώμα και διαλυτότητα της σκόνης) του FVIII σε σύγκριση με αντίστοιχο παράγοντα που δεν επεξεργάστηκε με ξηρή θερμότητα. Επιπλέον, η περιεκτικότητα σε υγρασία επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της αδρανοποίησης των ιών κατά την επεξεργασία του λυοφιλοποιημένου FVIII. Όταν τα επίπεδα υγρασίας είναι $\geq 0,8\%$, ο μέσος όρος αδρανοποίησης για την HAV είναι $\geq 4,54$ log. Όταν η υγρασία βρίσκεται σε επίπεδα $\leq 0,8\%$ ο μέσος όρος αδρανοποίησης είναι 0,12 log. Για τον PPV αντίστοιχα, όταν τα επίπεδα υγρασίας είναι $\geq 0,8\%$ ο μέσος όρος αδρανοποίησης είναι 3,72 και ακολούθως 2,5 για επίπεδα $\leq 0,8\%$. Τέλος, οι συγγραφείς της μελέτης αναφέρουν ότι η ελάχιστη περιεκτικότητα σε υγρασία πρέπει να είναι ίση ή μεγαλύτερη από 0,7%, αφού είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την αδρανοποίηση των HAV, PPV και PRV κατά 4 log [66].

Δύο ακόμα υψηλής καθαρότητας παράγοντες πήξης υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με Dry Heat, ο FVIII και ο FIX. Παρατηρήθηκε ότι μετά από 24 ώρες στους 80° C η μολυσματικότητα της HAV μειώθηκε κατά $\geq 4,3$ log. Η ίδια μείωση επιτεύχθηκε σε χρονικό διάστημα μεταξύ δύο ωρών και λιγότερο από 6 ώρες στους 90° C. Η HAV αδρανοποιήθηκε επίσης κατά τη διάρκεια της λυοφιλοποίησης περίπου 2 log, ωστόσο ο CPV δεν επηρεάστηκε από την λυοφιλοποίηση αλλά ο υπολειπόμενος CPV δεν ανιχνεύθηκε μετά από θέρμανση 48 ωρών στους 80° C ή 10 ωρών στους 90° C [67].

Εξετάζοντας άλλο προϊόν του FVIII, παρατηρούμε ότι η αδρανοποίηση κατά τη διάρκεια της λυοφιλοποίησης και επεξεργασίας σε θερμοκρασία 80° C για 72 ώρες οδηγεί σε μείωση της μολυσματικότητας του ιού SIN κατά $\geq 7,6 \log$, και του ιού HIV-1 κατά $\geq 6,4 \log$ [68]. Σε μια μελέτη 26 αιμορροφιλικοί ασθενείς έλαβαν παράγοντες VIII και IX οι οποίοι λυοφιλοποιήθηκαν και θερμάνθηκαν στους 100° C για μισή ώρα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μέθοδος dry heat ήταν επαρκής, ώστε να αδρανοποιηθεί η HAV, αλλά όχι επαρκής για την αδρανοποίηση του parvovirus B19, ο οποίος εξακολουθούσε να μολύνει τα συμπυκνώματα των παραγόντων πήξης [69].

Τέλος, η λυοφιλοποίηση και η θέρμανση των τελικών προϊόντων του συμπυκνώματος FVIII στους 100° C για μισή ώρα, φαίνεται ότι αδρανοποιεί την HAV κάτω από το όριο ανίχνευσης μετά από λίγα λεπτά ($> 5,3 \log$). Με τη χρήση θερμότητας επιπλέον αδρανοποιούνται κι άλλοι RNA ιοί κάτω από το όριο ανίχνευσης όπως ο HIV $> 6.6 \log$, ο BVDV $> 6.6 \log$, Ο PRV και ο reo-3 5,7 και 6,0 log αντίστοιχα. Από την άλλη πλευρά, ο SV-40 και ο BPV εμφανίζουν μεγάλη αντίσταση σε αυτή τη μέθοδο αδρανοποίησης [70].

Η εικόνα και ο πίνακας που ακολουθούν παρουσιάζουν ένα παράδειγμα επεξεργασίας του παράγοντα VIII με την μέθοδο Dry Heat.



Εικόνα 9: Επίπεδα αδρανοποίησης ιών με και χωρίς περίβλημα κατά τη διάρκεια επεξεργασίας του παράγοντα VIII στους 80° C με την μέθοδο dry heat. (πηγή: National Blood Transfusion Service)

Ιός	Εύρος αδρανοποίησης (log ID50)	Χρόνος που απαιτείται (ώρες)
Sindbis virus	8	72
HIV	≥ 6.4	72
Vaccinia virus	2.6-3.3	72
HSV	2.2	48
Semliki forest virus	≥ 6.9	24
HAV	≥ 4.3	24
Canine parvovirus	≥ 2.1	48

Πίνακας 12: Επεξεργασία λυοφιλοποιημένου παράγοντα VIII στους 80° C για 72 ώρες (πηγή: Knevelman et al, Winkelman et al, Hart et al.)

2.1.3 Θέρμανση δι' ατμού (Vapour Heating)

Με την μέθοδο θέρμανσης δι' ατμού (*vapour heating*) επεξεργάστηκαν ορισμένοι παράγοντες πήξης (συμπυκνώματα FVIII, FIX, fibrin sealant, lys-plasminogen και ινωδογόνο) και αξιολογήθηκε η ικανότητα αδρανοποίησης της ηπατίτιδας Α. Παρόλο που η μέθοδος ποικίλλει και εξαρτάται από την σταθερότητα των διαφόρων προϊόντων, όλοι οι παράγοντες προυπέθεταν επεξεργασία 10 ωρών στους 60° C με πίεση που κυμαίνεται από 190 έως 385 mbar. Στην περίπτωση του ινωδογόνου χρησιμοποιήθηκε μια δυνατή μέθοδος με πίεση 200 mbar, ακολουθούμενη από θέρμανση τριών ωρών στους 80° C με πίεση 385 mbar. Η διαδικασία ενός σταδίου αδρανοποιούσε τους ιούς με εύρος από 5,9 έως > 6,3 log. Η διαδικασία δύο σταδίων είχε εύρος αδρανοποίησης >8,7 έως 10,4 log [71].

Σε μελέτη συμπυκνώματος παράγοντα FVII αξιολογήθηκε η ικανότητα αδρανοποίησης των HAV, HIV-1, TBEV, PRV και MVM. Η HAV αδρανοποιήθηκε αποτελεσματικά μέσα σε διάστημα μιας ώρας στους 60° C, για τον ιό TBEV χρειάστηκαν έξι ώρες για μια μείωση της τάξεως των 6,6 log, τρεις ώρες για 6,2 και 6,9 log για τους HIV-1 και PRV αντίστοιχα. Σημειώνεται ότι για τον ιό MVM απαιτήθηκε επεξεργασία δέκα ώρες στους 60 C και ακολούθησε ακόμα μια ώρα στους 80° C για αδρανοποίηση 4.8 log, αφού ήταν αρκετά σταθερός [72].

Τέλος, αναφέρεται ότι με τη μέθοδο θέρμανσης στους 60° C και την προσθήκη ατμού επιτεύχθηκε μείωση μεγαλύτερη από 6,0 log για τον ιό HIV-1 κατά την επεξεργασία εμπορικών συμπυκνωμάτων παραγόντων πήξης [73]. Ο πίνακας 13 που ακολουθεί παραθέτει ένα παράδειγμα αδρανοποίησης ιών με την μέθοδο vapour heating.

Παράγωγο	Ιός	Εύρος Αδρανοποίησης (log ID50)	Χρόνος που απαιτήθηκε (ώρες)
FVIII ενδιάμεση καθαρότητα	HAV	>3.3	8
	HIV	>6.8	10
	PRV	5.9	10
FVIII υψηλή καθαρότητα	HAV	3.9	10
	HIV	6.7	10
	PRV	5.6	10
FIX ενδιάμεση καθαρότητα	HAV	>5.7	6
	HIV	>6.5	6
	PRV	>7.1	8
FIX υψηλή καθαρότητα	HAV	>6.7	3
	HIV	>7.9	8
	PRV	>6.8	8

Πίνακας 13: τυπικό παράδειγμα αδρανοποίησης ιών με την μέθοδο Vapour Heating στους 60° C για δέκα ώρες (πηγή: courtesy of Baxter/immuno, also, Barrett et al., Dorner and Barrett.)

Συμπερασματικά, η μέθοδος Dry Heat είναι αποτελεσματική για την αδρανοποίηση των ιών όπως η HAV όχι όμως επαρκής για τον παρνο-B19. Σημαντική είναι η περιεκτικότητα της

υγρασίας, αφού επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της αδρανοποίησης των HAV, PPV, PRV. Παρόμοια συμπεράσματα προκύπτουν και για την επεξεργασία με τη μέθοδο Varour Heat, αν και η μέθοδος ποικίλλει και εξαρτάται από τη σταθερότητα των διαφόρων προϊόντων.

2.1.4 Solvent/Detergent (S/D)

Η μεθοδολογία με S/D είναι πολύ αποτελεσματική έναντι των ιών με περίβλημα και έναντι των ευκαρυωτικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων και ορισμένων παρασίτων, ενώ δεν αδρανοποιούνται ιοί χωρίς περίβλημα. Ο ρυθμός αδρανοποίησης των ιών με περίβλημα είναι εξαιρετικά υψηλός και το ιικό φορτίο βρίσκεται κάτω από τα όρια ανίχνευσης σε λιγότερο από 2 λεπτά, με εξαίρεση τον ιό της ευλογιάς που χρειάζεται δέκα λεπτά [74,75]. Έως τώρα, όλοι οι ιοί με περίβλημα που ελέγχονται συμπεριλαμβανομένου του πρόσφατα αναδυόμενου ιού του δυτικού Νείλου (WNV), του Chikungunya, του νέου στελέχους της γρίπης και του κοροναϊνός (που προκαλεί οξύ αναπνευστικό σύνδρομο), είναι ευάλωτοι στην δράση του S/D. Η επεξεργασία με S/D δεν έχει επίδραση στους ιούς χωρίς περίβλημα, ωστόσο αναφέρεται ότι τα αντισώματα του ανοσοποιητικού που βρίσκονται συνήθως στο πλάσμα προσφέρουν προστασία έναντι των ιών χωρίς περίβλημα, που συναντώνται συχνότερα, όπως η HAV και ο ραβδονοϊνός B19 [76].

Ο Pamphilon D. δημοσίευσε μια μελέτη το 2000 στην οποία δήλωσε ότι ο πιο συνηθισμένος συνδυασμός για την μέθοδο S/D είναι 1% TNBP και 1% Triton X-100 [77] και παρείχε τα αποτελέσματα αδρανοποίησης των ιών. Αντίστοιχα, οι Horowitz et. al, δημοσίευσαν μελέτη, στην οποία ανέφεραν ότι όλοι οι ιοί με περίβλημα που εξετάστηκαν αδρανοποιήθηκαν αποτελεσματικά (πίνακας 13). Η εφαρμογή της μεθόδου S/D αξιολογήθηκε επίσης κατά την επεξεργασία κεκαθαρμένου FVIII και παρατηρήθηκε ότι η αδρανοποίηση του VSV ήταν ταχύτερη με τη χρήση 1% ή 2% Triton X-100 παρά με τη χρήση 0,2% χολικού νατρίου ή 1% Tween 80 [78]. Σε άλλη μελέτη, αξιολογήθηκε η κινητική αδρανοποίησης στο ολικό πλάσμα. Η επεξεργασία με S/D οδήγησε σε παντελή καταστροφή των ιών μέσα σε χρονικό διάστημα 15 λεπτών από τις τέσσερις ώρες της διαδικασίας [79]. Τα αποτελέσματα της μελέτης παρατίθενται στον πίνακα που ακολουθεί.

Ιός	LRV
VSV	>7.5
SIN	>6.9
HBV	>6
BVDV	>6.1
HCV	>5
HIV	>7.2
DHBV	>7.3
*Log ₁₀ reduction value	

Πίνακας 14: αδρανοποίηση ιών με την μέθοδο S/D κατά την επεξεργασία ολικού πλάσματος (1% TNBP/ 1% Triton X-100, 30⁰ C) (πηγή : Horowitz, B. et al)

Ιός	LRV ^A	LRV ^B
CMV	>6	>6
DHBV	>7.3	>7.3
HBV (in vitro σε χιμπατζήδες)	>6	>6.
HCV (in vitro σε χιμπατζήδες)	>5	>5
HIV-1	>6	>11
HIV-2	>6	>6
HSV-1	>5.8	>5.8
MuLV	>6.5	>6
PI-1		>4
PRV	>6.5	
Rauscher MuLV, ecotropic		>2
SIN	>3.6	>8.8
Sendai		>6
VEE		>6
VSV	>6.2	>9.2
XMuLV		>4
^A : Αξιολογήσεις από την μελέτη D. Pamphilon 2000		
^B : Αξιολογήσεις από την μελέτη των Horowitz et al. 1993		

**Πίνακας 15: Αδρανοποίηση ιών με την μέθοδο S/D. Αποτελέσματα από δύο διαφορετικές μελέτες. (χρήση 1% TNBP και 1% Triton X-100)
(πηγή: Pamphilon, Horowitz et al.)**

Οι Eriksson και συν. παρατήρησαν από μελέτη ότι κατά την παραγωγή ανοσοσφαιρίνης από πλάσμα η επεξεργασία με S/D (0.3% TNBP και 1% Tween 80) αδρανοποιεί τον ιό HIV-1 > 5.0 log, τον ιό VSV > 4,0 log και τον ιό SIN > 5,2 log. Επιπλέον, συνέκριναν τη μέθοδο S/D με τη μέθοδο της παστερίωσης για την ικανότητα αδρανοποίησης των HIV-1 και SIN. Όσον αφορά τον ιό HIV-1 με τη μέθοδο S/D υπήρχε ακαριαία αδρανοποίηση, ενώ αντίθετα η μέθοδος της παστερίωσης με θέρμανση στους 60° C χρειαζόταν περίπου μισή ώρα, για να επιτευχθεί το ίδιο επίπεδο αδρανοποίησης. Ακολουθώντας, ο ιός SIN αδρανοποιήθηκε μέσα σε λίγα λεπτά από τη στιγμή της έκθεσης του στο S/D, σε αντίθεση με τις δύο ώρες που χρειάστηκε, με τη μέθοδο της παστερίωσης [80].

Τέλος, κατά την παραγωγή ενδοφλέβιας ανοσοσφαιρίνης, η επεξεργασία επέφερε εξαιρετική αδρανοποίηση των ιών. Πιο αναλυτικά, η μείωση σε log είναι: HIV-1 >10 και HIV-2 > 6 , SIN 5.9, VSV 5.5, HCV 3. Αυτή η μελέτη έδειξε ότι ολοκληρωτική αδρανοποίηση μπορεί να επιτευχθεί, είτε σε 30 είτε σε 180 λεπτά. Να σημειωθεί ότι ο ιός της ευλογιάς δεν αδρανοποιήθηκε ολοκληρωτικά με τη μέθοδο S/D [55].

Στην Ευρώπη το 1991 κυκλοφόρησε από την εταιρεία Octapharma το OctaplasLG, το οποίο προερχόταν από πλάσμα αφαίρεσης ή ανάκτησης και είχε ψυχθεί μέσα σε 4 έως 8 ώρες από τη συλλογή του. Είχε 10-20% μειωμένα επίπεδα παραγόντων πήξης και δραστηριότητα αναστολέα, ωστόσο η τελική σύνθεση του ήταν παρόμοια με αυτή του FFP. Επιπλέον, η δραστηριότητα του FVIII ήταν περίπου 20% χαμηλότερη από αυτή του FFP, ενώ η δραστηριότητα της πρωτεΐνης S ήταν μειωμένη κατά 35%. Το 1998 ξεκίνησε στην Αμερική παραγωγή επεξεργασμένου πλάσματος μεγάλης κλίμακας από την εταιρεία Vitex

(Watertown, MA, USA) με την ονομασία PLAS+SD. το οποίο προερχόταν από πλάσμα ανάκτησης και είχε ψυχθεί μέσα σε 15 ώρες από τη συλλογή, ωστόσο η πρωτεΐνη S, ο αναστολέας της πλασμίνης, ο αναστολέας ενεργοποίησης της πλασμίνης και η αντιθρυψίνη είχαν εντυπωσιακά χαμηλότερα δραστηριότητα σε σχέση με το Octaplas [151]. Τα δύο αυτά προϊόντα αν και έχουν παρόμοιο τρόπο παρασκευής, διαφέρουν ως προς την προέλευση του πλάσματος (ολικό αίμα και αφαίρεσης αντίστοιχα) και στο διάστημα που μεσολαβεί μέχρι την κατάψυξή τους. Ως εκ τούτου δεν θεωρούνται ισοδύναμα, αφού διαφέρουν τόσο στο αρχικό υλικό, όσο και στη μορφή του τελικού προϊόντος (πίνακας 14).

Παράμετρος	Τιμή αναφοράς	Octaplas	PLAS+SD
Αρχικό προϊόν		Πλάσμα αφαίρεσης ή ανάκτησης με βέλτιστη κατάψυξη μέσα σε 4-6 ώρες	Πλάσμα ανάκτησης με κατάψυξη μετά από 15 ώρες από τη συλλογή
Μέγεθος παρτίδας		60-380 L	600-1500 L
Αναστολέας Πλασμίνης U/dL	72-132	24 (20-27)	14 (5-18)
Δραστηριότητα Αντιθρυψίνης g/L	0.95-1.30	0.83 (0.73-0.92)	0.48/0.54
Δραστηριότητα πρωτεΐνης S U/dL	56-168	64 (55-71)	24 (14-37)
Συνολικό αντιγόνο πρωτεΐνης S U/mL	0.92 (0.76-1.18)	0.78 (0.65-1.00)	1.14/0.94
Λιποπρωτεΐνη A mg/dL	0.3-34.1	5.5 (2.8-8.6)	13.3/12.2
Μονομερή του Ινώδους mg/mL	0-22	34 (29-40)	56/44
Κιτρικά mM		17.5 (14.2-20.9)	9.3 (8.8-9.6)

Πίνακας 16:Κύριες διαφορές μεταξύ των δύο τύπων πλάσματος (Ευρωπαϊκού Octaplas και Αμερικανικού PLAS+SD) που έχουν υποστεί επεξεργασία με τη μέθοδο S/D.

(πηγή: Solheim BG and Hellstern P. Transfusion 2003;43:1176-77, Salge-Bartels U. Transfusion Medicine 2006;16:266-75)

Συμπερασματικά, η επεξεργασία με S/D επιφέρει εξαιρετικά αποτελέσματα υψηλού ρυθμού αδρανοποίησης για ιούς με περίβλημα αλλά όχι για ιούς χωρίς περίβλημα. Κυκλοφόρησαν δύο βιοφαρμακευτικά προϊόντα, τα οποία όμως δεν είναι ισοδύναμα, αφού διαφέρουν τόσο στο αρχικό υλικό όσο και στη μορφή του τελικού προϊόντος.

2.1.5 Χαμηλό pH

Συνεχίζοντας, μελέτες έχουν δείξει ότι η χρήση *χαμηλού pH*, περίπου 4, είναι αποτελεσματική για την αδρανοποίηση ορισμένων ιών με περίβλημα κατά την επεξεργασία ανοσοσφαιρινών. Όπως αναφέρθηκε στο παραπάνω κεφάλαιο, η αδρανοποίηση κάθε ιού εξαρτάται από το pH, τη θερμοκρασία, την ώρα κλπ. Με βάση αυτό, ένας κατασκευαστής επωάζει το παρασκεύασμα ανοσοσφαιρίνης σε pH 4, στους 37°C για τουλάχιστον 6 ώρες, ενώ άλλος κατασκευαστής επωάζει το παρασκεύασμα σε pH 4,25 για 21 μέρες στους 20°C και ακολουθεί επεξεργασία με solvent/detergent. Επειδή υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός παραλλαγών της μεθόδου, οι συνθήκες που απαιτούνται για την αποτελεσματική αδρανοποίηση ενός ιού συνεχίζουν να αποτελούν αντικείμενο μελέτης.

2.1.6 Νανοδιήθηση

Η νανοδιήθηση, έχει την ικανότητα να απομακρύνει υψηλούς τίτλους ιών με και χωρίς περίβλημα. Το εύρος της απομάκρυνσης εξαρτάται από το μέγεθος των πόρων της μεμβράνης και το μέγεθος των ιών. Η πρώτη προσπάθεια εφαρμογής της νανοδιήθησης ήταν σε υψηλής καθαρότητας παρασκεύασμα παράγοντα πήξης με μοριακό βάθος περίπου 60 kDa. Σταδιακά, η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε και για προϊόντα μεγαλύτερου μοριακού βάρους. Το 1994, αξιολογήθηκε η χρήση φίλτρων 35 nm και 15 nm [81]. Ο FIX, εξαιτίας του μικρού μοριακού βάρους του (57 kDa) ήταν ανάμεσα στα προϊόντα που υποβλήθηκαν σε νανοδιήθηση επιτυχώς. Το προϊόν προετοιμάστηκε με τρία στάδια χρωματογραφίας και η αδρανοποίηση των ιών έγινε με την μέθοδο Solvent\Detergent [82]. Το τελικό έκλουμα χρησιμοποιήθηκε ως υλικό για νανοδιήθηση. Σε μελέτες επικύρωσης των ιών παρατηρήθηκε ότι και οι δύο μεμβράνες απομάκρυναν κατά 5,7-7,8 log τους ιούς HIV, BVDV, SV40, PPV, reovirus type 3, αλλά και μικρότερους ιούς, χωρίς περίβλημα, όπως ο poliovirus Sabin τύπος 1 και bovine parvovirus. In vitro μελέτες δεν έδειξαν καμιά αλλαγή στο προϊόν που υποβλήθηκε σε νανοδιήθηση, ενώ τα χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης του προϊόντος και η ειδική δραστηριότητα του παράγοντα IX παρέμειναν αμετάβλητα.

Η ικανότητα εφαρμογής σε δεξαμενές πλάσματος έδειξε ότι 10-20 L διαλύματος FIX κεκαθαρμένο από 1000-2000 L πλάσματος, μπορεί να διηθηθεί σε 2-3 ώρες από φίλτρο planova 15 nm. Η ανάκτηση του FIX ήταν πάνω από 95%. Μεταγενέστερα, σε ελεγχόμενες μελέτες σε ασθενείς με αιμορροφιλία Β έδειξε φυσιολογικό χρόνο ημιζωής και ανάκτηση καθώς και απουσία θρομβογονικότητας [83,84]. Αποτελέσματα από άλλες μελέτες επιβεβαίωσαν τα ανωτέρω ευρήματα. Τυπικά, παντελής απομάκρυνση παρατηρείται σε ιούς, οι οποίοι έχουν μεγαλύτερο μέγεθος από τους πόρους της μεμβράνης. Συντελεστές απομάκρυνσης μεγαλύτεροι των 5,2 παρατηρούνται για τον ιό canine parvovirus μεγέθους 18-26 nm κατά τη διάρκεια διήθησης από φίλτρο Planova 15nm [85]. Σε άλλη μελέτη, ένας υψηλής καθαρότητας συμπυκνωμένος παράγοντας IX μετά από χρωματογραφία και επεξεργασία με S/D, πέρασε από διήθηση από φίλτρο Planova 15 nm. Τα αποτελέσματα έδειξαν απομάκρυνση > 7 log για ορισμένους ιούς με λιπιδικό περίβλημα, όπως ο HSV-1, Sindbis virus και Semliki Forest virus. Όσον αφορά τους ιούς χωρίς περίβλημα επιτεύχθηκε απομάκρυνση >6 log για τον bovine parvovirus και HAV, >5,6 log για τον poliovirus και 5,7 log για τον ιό EMC. Να σημειωθεί ότι για τον ιό BPV υπήρξε απομάκρυνση >5,7 log με το φίλτρο planova 35nm [81]. Σε κλινικές δοκιμές δεν ανιχνεύθηκαν επιπτώσεις συμπεριλαμβανομένης της θρομβογονικότητας.

Η νανοδιήθηση του προθρομβινικού συμπλέγματος ήταν πιο δύσκολο να επιτευχθεί, αφού αυτός ο τύπος του προϊόντος ήταν αρκετά πολύπλοκος και περιείχε υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης, παραγόντων πήξης (με μοριακό βάρος μεταξύ 55-72 kDa) και πρωτεΐνες με υψηλό μοριακό βάρος όπως το HMW kininogen (110 kDa) [86]. Η πρώτη διαδικασία νανοδιήθησης περιγράφηκε στην Γερμανία. Το προϊόν, αφού παστεριώθηκε, πέρασε από φίλτρο planova 35nm με αποτέλεσμα να απομακρυνθούν > 7 log ιοί μεγάλου μεγέθους με περίβλημα όπως HIV-1 και HSV-1 και περίπου 4 log ιοί μέτριου μεγέθους, όπως HBV και BVDV. Ωστόσο το φίλτρο δε συγκράτησε τον ιο poliovirus. Τα χαρακτηριστικά του

προϊόντος δεν επηρεάστηκαν από την νανοδιήθηση και η θρομβογονικότητα δεν αυξήθηκε. Στην Αυστρία, το προθρομβινικό σύμπλεγμα που παρασκευάζεται, επεξεργάζεται με την μέθοδο S/D για την αδρανοποίηση των ιών και μετά περνάει από τη διαδικασία νανοδιήθησης [87]. Κατά τη διάρκεια κλινικών μελετών και πειραμάτων σε ζώα δεν έχει εμφανιστεί θρομβογονικότητα. Στην Ολλανδία, το προθρομβινικό σύμπλεγμα που παρασκευάζεται νανοδιηθείται από δύο φίλτρα planona 15 nm σειριακά συνδεδεμένα, ώστε να αυξηθεί η ικανότητα απομάκρυνσης των ιών. Οι μελέτες επικύρωσης για το σύστημα διπλής νανοδιήθησης αναφέρουν απομάκρυνση του ιού canine parvovirus πάνω από 5,9 logs [88].

Στην Ιαπωνία έχει λάβει άδεια χρήσης ο κεκαθαρμένος μονοκλωνικά- FVIII, ο οποίος έχει υποβληθεί σε αδρανοποίηση με τη μέθοδο S/D και έπειτα σε νανοδιήθηση με το φίλτρο Planona 35nm [89]. Ο επεξεργασμένος FVIII σε μελέτες in vitro έχει παρόμοια χαρακτηριστικά με τον μη επεξεργασμένο αντίστοιχο παράγοντα και είναι σταθερός. Τα δεδομένα επικύρωσης αποδεικνύουν καλή απομάκρυνση μεσαίων και μεγάλων μεγεθών ιών αλλά όχι των μικρών ιών χωρίς περίβλημα EMC, HAV και B19. Ωστόσο, όταν η νανοδιήθηση εισήχθη συστηματικά, το περιεχόμενο DNA του B19 στο τελικό συμπύκνωμα του FVIII μειώθηκε χαρακτηριστικά, αποδεικνύοντας ότι το φίλτρο των 35 nm συνείσφερε σε μερική μείωση.

Στην Γαλλία, έχει άδεια χρήσης ένα προϊόν αδρανοποιημένο με την μέθοδο S/D, καθαρισμένο με χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων και έχει υποστεί νανοδιήθηση μέσα από φίλτρα τοποθετημένα εν σειρά Planona 35 και 15 nm [90]. Για να επιτευχθεί η νανοδιήθηση με το φίλτρο 15 nm, ένα μέρος του παράγοντα Von Willebrand αποσυντίθεται κατά την διάρκεια της χρωματογραφίας ανταλλαγής ανιόντων. Έπειτα, το έκλουμα του παράγοντα VIII νανο-διηθείται στους 37ο C για μερικές ώρες. Οι μελέτες επικύρωσης δείχνουν απομάκρυνση των ιών BVDV, HIV, HAV, PPV κατά >4.06, > 3.77, > 3.72, > 6.08 log αντίστοιχα κατά τη διάρκεια της διπλής διήθησης. Η υπολειπόμενη συγκέντρωση του vWF στο τελικό προϊόν είναι η μισή από αυτή που υπάρχει στο μη διηθημένο προϊόν [90]. In vitro μελέτες παρουσιάζουν ότι ο FVIII δεν ενεργοποιείται ούτε υποβαθμίζεται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας. Επιπλέον δοκιμές ανοσογονικότητας σε κουνέλια δεν δείχνουν σχηματισμό νεοαντιγόνων, ενώ τα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά ασθενών με αιμοροφιλία A είναι τα ίδια με τα μη-διηθημένα προϊόντα. Η κλινική αποτελεσματικότητα αξιολογήθηκε ως "Αρίστη" ή "καλή" στο 94% των αιμορραγικών επεισοδίων και στο 100% των χειρουργείων. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν εμφανίστηκε αντι-FVIII αναστολέας ούτε ιική ορομετατροπή, κυρίως έναντι του B19 [91].

Όπως είναι γνωστό, όλα τα προϊόντα ενδοφλέβιας ανοσοσφαιρίνης G αδρανοποιούνται με μεθόδους όπως η παστερίωση, η ξηρή θερμότητα ή η χρήση S/D. Με την χρήση της νανο-διήθησης ενισχύεται η ασφάλεια των προϊόντων IgG. Για τους ιούς με περίβλημα και για ορισμένους χωρίς περίβλημα επιτυγχάνονται καλά επίπεδα απομάκρυνσης με τη μεμβράνη των 35 nm, ενώ για τις μεμβράνες των 15 nm έχει αναφερθεί συνεπής απομάκρυνση ιών χωρίς περίβλημα, χωρίς επιβλαβείς επιδράσεις στα μοριακά χαρακτηριστικά της IgG και στη δραστηριότητα σύνδεσης των αντισωμάτων. Η επίδραση του φίλτρου Planona στην απομάκρυνση των ιών με και χωρίς περίβλημα επικυρώθηκε για

διάλυμα IVIG 7%. Το διάλυμα πέρασε από ένα προ-ηθμό 75 nm και έπειτα από δύο φίλτρα μεγέθους 35 nm συνδεδεμένα στη σειρά. Το προ-φίλτρο χρησιμοποιήθηκε για να αυξήσει την ικανότητα του φίλτρου αφαίρεσης των 35 nm και επιτρέπει να εκτιμηθεί η απομάκρυνση των ιών με το παραπάνω φίλτρο, ανεξάρτητα από την πιθανότητα προσκόλλησης των ιών. Ολοκληρωτική απομάκρυνση παρατηρείται για όλους τους ιούς με μέγεθος μεγαλύτερο των 35 nm ($> 5,4 \log$) μετά από ένα στάδιο διήθησης με το φίλτρο Planova 35 N. Επίσης επιτυγχάνεται απομάκρυνση 4,3 και $> 4,7 \log$ για τους ιούς EMC και HAV αντίστοιχα και 2,6 log για τον ιο PPV. Ωστόσο κατά τη διαδικασία διήθησης IgG με φίλτρο 35 nm παρατηρήθηκε μη ολοκληρωμένη απομάκρυνση της HCV, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι απαιτείται ο συνδυασμός μιας ακόμα μεθόδου αδρανοποίησης, για να επιτευχθεί ένα ικανοποιητικό επίπεδο ασφάλειας.

Ικανοποιητική διήθηση έχει αναφερθεί και για προϊόντα υπεράνοσης αντι-D σφαιρίνης [92]. Το προϊόν κεκαθαρμένο με μέθοδο χρωματογραφίας διηθείται με φίλτρο Planova 35 nm. Παρατηρήθηκε ολοκληρωτική απομάκρυνση για τους ιούς με περίβλημα ($> 7,3 \log$ για τον BVDV, $> 6,77 \log$ για τον RPV και $> 6,02 \log$ για τον HIV), ενώ για μερικούς ιούς χωρίς περίβλημα η απομάκρυνση δεν ήταν επαρκής (4,3 log για τον poliovirus, 4.14 log για τον porcine parvovirus και 3,2 log για τον ιο TMEV).

Μέσα από επιδημιολογικές και πειραματικές μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η νόσος Creutzfeldt-Jakob (CJD) δε μεταδίδεται μέσω των προϊόντων αίματος. Ωστόσο, η εμφάνιση περιστατικών νέων τύπων ασθενειών που σχετίζονται με τα prions έχουν ως αποτέλεσμα τον ιό BSE και τη σχετική παραλλαγή της CJD στους ανθρώπους [93,94]. Παρόλο όμως που δεν έχει εμφανιστεί κάποιο κρούσμα μετάδοσης της νόσου οι ανησυχίες για πιθανή μετάδοση -μέσω παραγώγων πλάσματος- παραμένει, ιδιαίτερα, όταν ο επιπολασμός στον πληθυσμό είναι υψηλότερος απ' ό,τι θεωρείτο μέχρι σήμερα [95]. Η νανοδιήθηση φαίνεται να είναι ένα ικανοποιητικό εργαλείο για την απομάκρυνση των prions. Σε πειραματικές μελέτες, ανθρώπινη παθογόνος TSE (transmissible spongiform encephalopathy), σε αραιωμένο προϊόν ομογενοποίησης εγκεφάλου, απομακρύνθηκε με φίλτρο Millipore 0,025 μm που χρησιμοποιούνταν κατά τη διάρκεια παραγωγής αυξητικής ορμόνης.

Όσον αφορά την προσρόφηση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη φαίνεται να είναι ελάχιστη στις περισσότερες συσκευές, εκτός αν η περιεχόμενη πρωτεΐνη ή ο όγκος των πρωτεϊνών είναι εξαιρετικά χαμηλός σε σχέση με την επιφάνεια του φίλτρου. Απώλειες των πρωτεϊνών μπορεί επίσης να προκύψουν, όταν ένα διάλυμα που περιέχει πρωτεΐνες υψηλού μοριακού βάρους περάσει μέσα από φίλτρο με μικρότερο μέγεθος πόρων. Η ικανότητα διήθησης μιας πρωτεΐνης μπορεί να βελτιωθεί με την επιλογή κατάλληλου φίλτρου για την εκάστοτε πρωτεΐνη, με τη μείωση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών όπως επίσης και με την αλλαγή του pH, της θερμοκρασίας ή των ιονικών δυνάμεων. Στις περισσότερες περιπτώσεις η ανάκτηση των αντιγόνων των πρωτεϊνών, καθώς και η φυσιολογική δραστηριότητα, είναι πάνω από 90-95%. In vitro αναλύσεις δείχνουν ότι η διαδικασία την νανοδιήθησης των παραγώγων πλάσματος δε σχετίζεται με αλλαγή της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών ή παραγωγή νέο-αντιγόνων και δεν επηρεάζει τα χαρακτηριστικά του προϊόντος. Σήμερα, η νανοδιήθηση

είναι αναγνωρισμένη ως ένα σημαντικό βήμα προόδου για την παραγωγή ασφαλών προϊόντων πλάσματος, με την προϋπόθεση να συνδυάζεται με άλλες εδραιωμένες μεθόδους αδρανοποίησης.

Συμπερασματικά, η χρήση χαμηλού Ph είναι αποτελεσματική για την αδρανοποίηση ορισμένων ιών, αν και η μέθοδος αποτελεί ακόμα αντικείμενο μελέτης. Η νανοδιήθηση απομακρύνει υψηλούς τίτλους ιών με και χωρίς περίβλημα, ενώ in vitro μελέτες δεν έδειξαν αλλαγή στο προϊόν που υποβλήθηκε σε νανοδιήθηση. Επιπλέον σε κλινικές δοκιμές δεν ανιχνεύτηκαν περιπτώσεις θρομβογονικότητας. Τέλος φαίνεται να είναι ένα ικανοποιητικό μέσο για την απομάκρυνση των prions.

2.2 Αποτελεσματικότητα σε ασταθή παράγωγα αίματος.

Στην κατηγορία των ασταθών παραγώγων αίματος ανήκουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λευκά αιμοσφαίρια, τα αιμοπετάλια, το απλό πλάσμα και το φρέσκο κατεψυγμένο πλάσμα (FFP).

2.2.1 Πλάσμα

Όσον αφορά την επεξεργασία πλάσματος στην Ευρώπη έχουν αδειοδοτηθεί (CE mark) και είναι σε κλινική χρήση 4 μέθοδοι αδρανοποίησης: Η μέθοδος S/D διαλύτη/Απολυμαντικού που εφαρμόζεται σε δεξαμενές πλάσματος και αναφέρθηκε παραπάνω, και τρεις βιολογικές-φωτοδυναμικές, το κυανούν του μεθυλενίου, το υδροχλωρικό αμοτοσαλένιο και η ριβοφλαβίνη που εφαρμόζονται σε μονήρη πλάσματα.

2.2.1.1 Methylene Blue (MB)

Η επεξεργασία με *Methylene blue (MB)* είναι αποτελεσματική για ιούς με περίβλημα και για λίγους χωρίς περίβλημα. Τα επίπεδα μείωσης είναι τουλάχιστον 5 log για τον HIV, HBV, HCV, ενώ είναι επίσης αποτελεσματική για τον WNV [96]. Όσον αφορά τους ιούς χωρίς περίβλημα, η αποτελεσματικότητα ποικίλλει. Για παράδειγμα, υπάρχει μείωση περίπου ≥ 4 log για τους ιούς calicivirus και simian virus 40, ενώ αντίθετα δεν παρουσιάζει αποτελεσματικότητα για την ηπατίτιδα A και τον porcine parvovirus [97]. Σημειώνεται ότι για τον παρβοϊό B19 επιτυγχάνεται μείωση της τάξης των >5 log [98]. Νεότερα στοιχεία παρουσιάζουν ότι το MB ακόμα και χωρίς την ακτινοβολία έχει μια ικανότητα μείωσης 1-2 log, ενώ με την ακτινοβολία ενισχύεται η ικανότητα αυτή κατά 3-4 log [99]. Όσον αφορά άλλα παθογόνα, πέρα των ιών, μελέτες για το trypanosoma cruzi σε in vitro καλλιέργειες και σε ποντίκια, έδειξαν ότι η επεξεργασία με MB παρέχει μια μείωση $> 3,4$ και 4,9-5,8 log αντίστοιχα, υποδεικνύοντας ότι μπορεί να εμποδίζει δυνητικά την -μεταφερόμενη με τη μετάγγιση- νόσο του Chagas. Όσον αφορά το ενδοκυτταρικό παράσιτο μαλάρια, η διήθηση των λευκοκυττάρων, καθώς και η διαδικασία ψύξης-απόψυξης καταστρέφει και απομακρύνει τα κύτταρα που περιέχουν το παράσιτο, εμποδίζοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό του. Αυτό το πλεονέκτημα εφαρμόζεται επίσης για τον CMV και τον HTVL τύπου 1 και 2 [100]. Η επεξεργασία με MB δεν είναι δραστική για ενδοκυτταριούς ιούς, όπως η ηπατίτιδα A, βακτήρια, πρωτόζωα και λευκά, γιατί δεν μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη. Αναφορές παρουσιάζουν ότι, λόγω διήθησης μέσω φίλτρου, μπορεί να είναι αποτελεσματικό έναντι των prions, ωστόσο η συνολική επίδραση του συστήματος είναι ακόμα σε διερεύνηση. Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει την αδρανοποίηση που επιτυγχάνεται σε ορισμένους ιούς.

	Μείωση σε log
<i>Ιοί με περίβλημα</i>	
HCV	≥ 3.83
HIV-1	≥ 5.45
WNV	≥ 5.78
CMV	≥ 4.08
Herpes simplex	≥ 5.50
Influenza H3N2	≥ 4.40
Influenza	≥ 5.1
Duck hepatitis B (μοντέλο για τον ανθρώπινο HBV)	≥ 6.0
Avian infectious bronchitis virus (μοντέλο για SARS)	≥ 4.90
Sindbis virus (μοντέλο για Chikungunya virus)	≥ 9.73
Vesicular stomatitis virus (μοντέλο για rabies virus)	≥ 4.89
<i>Ιοί χωρίς περίβλημα</i>	
HAV	0
Polio	> 1
Parvo B19	≥ 5.0
Porcine parvo	0
Simian vacuolating virus 40	≥ 4.0

Πίνακας 17: Αδρανοποίηση ιών που επιτυγχάνεται με την μέθοδο Methylene Blue (πηγή: Seghtchian j et al, Steinmann E, et al.)

Κατά την επεξεργασία με MB επηρεάζονται ορισμένοι παράγοντες πήξης, κυρίως το ινωδογόνο και ο παράγοντας VIII στα οποία υπάρχει μια απώλεια από 10 εως 35%. Η δραστηριότητα των άλλων παραγόντων πήξης επηρεάζεται λιγότερο και μερικές πρωτεΐνες, όπως οι φυσιολογικοί αναστολείς της πήξης και οι παράγοντες του συμπληρώματος δεν επηρεάζονται καθόλου [101]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε από την Octapharma, κατά την οποία η παραγωγή θρομβίνης -στο πλάσμα που ήταν επεξεργασμένο με την μέθοδο THERAFLEX Methylene Blue- ήταν αρκετά χαμηλότερη από το μη επεξεργασμένο πλάσμα (μείωση 40%), ενώ οι μονάδες που ήταν επεξεργασμένες με την μέθοδο Springe παρουσίαζαν αντίστοιχη μείωση μόνο 9,8% [102]. Ωστόσο, η σφαιρική δοκιμασία αποτίμησης αιμοστατικού αποτυπώματος (περιστροφική θρομβοελαστογραφία) καταδεικνύει ότι η επεξεργασία με MB σε συνδυασμό με ακτινοβολία δεν επηρεάζει την ταχύτητα σχηματισμού του θρόμβου και αυξάνει την σταθερότητα του θρόμβου κατά 20% σε σύγκριση με το μη επεξεργασμένο πλάσμα [103].

Παρ'όλη την ευρεία χρήση, μεγάλες τυχαιοποιημένες δοκιμές που να χρησιμοποιούν κλινικώς σχετικές παραμέτρους, όπως απώλεια αίματος ή έκθεση σε άλλα παράγωγα αίματος, λείπουν. Οι περισσότερες μελέτες σε ασθενείς είναι μικρές ή/και έχουν χρησιμοποιήσει εργαστηριακά δεδομένα και όχι κλινικές παραμέτρους. Πρώιμες μελέτες έχουν περιγράψει επιτυχή χρήση του πλάσματος επεξεργασμένο με MB, είτε ατομικά είτε σε ομάδες ασθενών με ανεπάρκεια παραγόντων V ή XI ή θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα, καθώς και σε αφαιμαξομεταγγίσεις σε νεογνά. Μια προοπτική τυχαιοποιημένη μελέτη που έχει δημοσιευτεί μόνο ως περίληψη εξετάζει την επίδραση του πλάσματος επεξεργασμένου με MB ή S/D σε 71 ασθενείς που υποβάλλονται σε καρδιοχειρουργική επέμβαση. Η μελέτη έδειξε καλύτερη αναπλήρωση της πρωτεΐνης S και την α₂ αντιπ्लाσμίνης με το πλάσμα που ήταν επεξεργασμένο με MB. Ακολούθως, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές in vitro στο χρόνο ροής,

στον αριθμό αιμοπεταλίων και στην απώλεια αίματος [104,105]. Πρόσφατα σε μια μελέτη έγινε σύγκριση της κλινικής αποτελεσματικότητας μεταξύ του πλάσματος επεξεργασμένου με MB, του πλάσματος επεξεργασμένου με S/D και του συμβατικού πλάσματος σε ασθενείς που υποβάλλονται σε μεταμόσχευση ήπατος. Ως κύρια παράμετρος χρησιμοποιήθηκε ο όγκος του πλάσματος που χορηγήθηκε. Σε σύγκριση με το συμβατικό πλάσμα, ο όγκος του πλάσματος επεξεργασμένου με MB ήταν 25% υψηλότερος και αντίστοιχα 6% υψηλότερος ο όγκος του πλάσματος επεξεργασμένου με S/D. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η στατιστική διαφορά δεν ευνοεί το πλάσμα επεξεργασμένο με MB και προτείνουν τη χρήση μεγαλύτερου όγκου πλάσματος -όταν συγκρίνεται με το συμβατικό πλάσμα και το πλάσμα επεξεργασμένο με S/D- ώστε να υπάρχει παρόμοια κλινική αποτελεσματικότητα. Εντούτοις, οι διαφορές κατά την προετοιμασία του όγκου πλάσματος ανά μονάδα, καθώς και η έλλειψη ισορροπίας στους παράγοντες κινδύνου αιμορραγίας αποκλείουν οριστικά το συμπέρασμα που αφορά την διαφορική αποτελεσματικότητα ανάμεσα στα τρία είδη πλάσματος στην περίπτωση της μεταμόσχευσης ήπατος [106].

Δεδομένης της μείωσης ορισμένων παραγόντων πήξης που προκαλείται από την επεξεργασμένο με MB πλάσμα, υπάρχουν ανησυχίες σχετικά με τη δυνητική αύξηση στον αριθμό των μονάδων πλάσματος που μεταγγίζονται. Πιο συγκεκριμένα, οι Atance και συν, ανέφεραν το 2001 σε νοσοκομείο στην Καταλονία της Ισπανίας ότι η χρήση του πλάσματος επεξεργασμένου με MB σχετίζεται με την αύξηση στη συνολική ζήτηση πλάσματος κατά 56%, ενώ οι μεταγγίσεις με μη αδρανοποιημένο κρουϊζήμα αυξήθηκαν στο διπλάσιο τον πρώτο χρόνο και στο τριπλάσιο τον δεύτερο χρόνο [107]. Επιπλέον στην Βαλένθια της Ισπανίας γίνονται μεταγγίσεις με πλάσμα επεξεργασμένο με MB από το 1998 και δεν έχει παρατηρηθεί αυξημένη κατανάλωση πλάσματος μετά την εφαρμογή της συγκεκριμένης μεθόδου αδρανοποίησης.

Άλλη μελέτη σχετικά την κλινική αποτελεσματικότητα του πλάσματος επεξεργασμένου με MB εστιάζει στη χρήση του σε ασθενείς με θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα (ΘΘΠ). Το 2008 δημοσιεύτηκε μια πολυκεντρική μελέτη που έλαβε χώρα στην Ισπανία και συνέκρινε την χρήση του πλάσματος επεξεργασμένου με MB και του συμβατικού πλάσματος στη θεραπεία της ΘΘΠ. Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 102 περιστατικά ιδιοπαθούς ΘΘΠ. Το MB πλάσμα χρησιμοποιήθηκε σε 63 περιστατικά, ενώ το συμβατικό πλάσμα σε 39. Οι ασθενείς που έλαβαν το επεξεργασμένο με MB πλάσμα χρειάστηκαν περισσότερες μεταγγίσεις (κατά μέσο όρο 11 σε αντίθεση με το συμβατικό πλάσμα που χρειάστηκαν 5) καθώς και μεγαλύτερο όγκο πλάσματος (κατά μέσο όρο 485 mL/Kg σε αντίθεση με το συμβατικό πλάσμα που χρειάστηκαν 216 mL/Kg), για να υπάρξει αποτέλεσμα. Η θνησιμότητα στην ομάδα του πλάσματος επεξεργασμένου με MB ήταν περίπου 3% σε σύγκριση με την ομάδα του συμβατικού πλάσματος που ήταν 5%. Επιπλέον, περισσότερες υποτροπές διαπιστώθηκαν στους ασθενείς της πρώτης ομάδας σε αντίθεση με τους ασθενείς που έλαβαν μετάγγιση με συμβατικό πλάσμα. Ο συγγραφέας προσπαθώντας να εξακριβώσει τα παραπάνω αποτελέσματα εξέτασε τα επίπεδα της ADAMTS-13 στους δύο τύπους πλάσματος και παρατήρησε ότι η δραστηριότητα της πρωτεΐνης ήταν αμετάβλητη, είτε κατά την επεξεργασία με MB και ακτινοβολία είτε κατά την χρήση της

μεθόδου Springe [108]. Παρόλο που οι μελέτες στην Ισπανία ήταν μελέτες παρατήρησης τα ευρήματα έδειξαν ότι το πλάσμα επεξεργασμένο με MB ήταν λιγότερο αποτελεσματικό από το μη επεξεργασμένο πλάσμα κατά την θεραπεία της ΘΘΠ.

Οι Castrillo και συν, δημοσίευσαν δεδομένα από δοκιμές ελέγχου ποιότητας που πραγματοποιούνταν πάνω από πέντε χρόνια σύμφωνα με τις οποίες περισσότερες από 110,000 μονάδες φρέσκου κατεψυγμένου πλάσματος -από τυχαίους δότες και δότες αφαίρεσης- επεξεργάστηκαν με MB. Τα δεδομένα έδειξαν, ότι παρ' όλη την απώλεια που υπήρχε στον παράγοντα VIII κατά την επεξεργασία, τα επίπεδά του πληρούσαν τα κριτήρια του συμβουλίου των Ευρωπαϊκών κατευθυντηρίων οδηγιών για το FFP (Fresh Frozen Plasma). Επιπροσθέτως, μετά την αρχική απώλεια των πρωτεϊνών του πλάσματος, κατά την αποθήκευση στους -30° C, τα επίπεδα παρέμεναν σταθερά για τουλάχιστον 27 έως και 39 μήνες [109]

Όσον αφορά τη μέθοδο αδρανοποίησης με Methylene Blue η προσοχή έχει στραφεί κυρίως στην χρήση του σε συνδυασμό με ακτινοβολία για την επεξεργασία πλάσματος. Ωστόσο το Methylene blue είναι μια χρωστική με μεγάλο εύρος χρήσης στην ιατρική πρακτική. Σε αυτό συμπεριλαμβάνονται η θεραπεία της μεθαιμοσφαιριναιμίας, δείκτης λεμφικού όζου στον καρκίνο του μαστού, χρωμοενδοσκοπία για τον εντοπισμό μεταπλασίας στον οισοφάγο, θεραπεία σηπτικού σοκ, όπου χορηγείται η χρωστική σε ενδοφλέβιες δόσεις 1,5-2 mg/kg ανα σωματικό βάρος [110]. Η ανασταλτική επίδραση του MB στην συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου και στην γουανυλική κυκλάση μπορεί να εξηγήσει τα ωφέλιμα αποτελέσματα σε διάφορες μορφές καταπληξίας.

Συμπερασματικά, παρατηρείται ότι με εξαίρεση το ινωδογόνο και τον FVIII που παρουσιάζουν μια απώλεια δραστηριότητας, οι άλλοι παράγοντες και πρωτεΐνες δεν επηρεάζονται καθόλου. Επιπλέον, αν και δεν υπάρχουν ακόμα αρκετές μεγάλες τυχαίοποιημένες μελέτες με χρήση κλινικών παραμέτρων (και όχι μόνο εργαστηριακών δεδομένων), φαίνεται ότι το επεξεργασμένο πλάσμα είναι σχεδόν ισοδύναμο με το συμβατικό.

2.2.1.2 Υδροχλωρικό αμοτοσαλένιο + UVA

Το υδροχλωρικό αμοτοσαλένιο με την UVA ακτινοβολία αδρανοποιεί ένα ευρύ φάσμα παθογόνων μικροοργανισμών. Επιτυγχάνει υψηλά επίπεδα λογαριθμικής μείωσης των ιών με περίβλημα και σε μικρότερο βαθμό ιών χωρίς περίβλημα. Πιο συγκεκριμένα, ελαττώνει τον ενδοκυτταρικό και εξωκυτταρικό HIV κατά 5-6 log, όπως επίσης και τον BVDV, duck hepatitis B virus και τον CMV. Παρότι η μόλυνση από βακτήρια δεν είναι κοινή στο πλάσμα, έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες, στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν αντιπροσωπευτικοί gram θετικοί και gram αρνητικοί οργανισμοί, οι οποίες κατέδειξαν αποτελεσματικότητα στη βακτηριακή αδρανοποίηση. Επιπλέον, μελέτες κατέδειξαν την αδρανοποίηση δυο βακτηριών του γένους των σπειροchetών, του *Treponema pallidum* (για το οποίο το αίμα ελέγχεται) και του *Borellia burgdorferi*. Μελέτες διεξήχθησαν με αυτούς τους οργανισμούς, γιατί είναι γνωστό ότι

υπάρχουν ασυμπτωματικά στο αίμα κατά τη διάρκεια χρόνιων μολύνσεων. Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι αδρανοποιεί παράσιτα που προκαλούν μόλυνση καθώς και λευκοκύτταρα. Ο παρακάτω πίνακας (πίνακας 16) παρουσιάζει τα παθογόνα που αδρανοποιούνται με την μέθοδο του υδροχλωρικού αμοτοσαλενίου.

Παθογόνα	Μείωση σε Log
Ιοί	
HIV-1, cell-associated	≥6.2
HIV-1, cell-free	≥6.1
DHBV (model virus for HBV)	4.4 to 4.5
BVDV (model virus for HCV)	≥4.5
HTLV-I	≥4.1
HTLV-II	≥4.7
West Nile Virus (WNV)	≥6.7
SARS-Associated Coronavirus	≥4.0
Chikungunya Virus (CHIKV)	6.5
Influenza A virus (H5N1 Avian Influenza)	≥5.7
Parvovirus B19	1.8
Bluetongue Virus	≥4.0
Adenovirus-5	≥5.6
Βακτήρια	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	≥6.7
<i>Yersinia enterocolitica</i>	≥6.6
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	≥6.6
<i>Treponema pallidum</i> (syphilis)	≥5.4
<i>Borrelia burgdorferi</i> (Lyme disease)	≥9.9
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	≥3.6
Πρωτόζωα	
<i>Plasmodium falciparum</i> (malaria)	≥5.9
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Chagas disease)	≥5.0
<i>Babesia microti</i> (babesiosis)	≥4.9
Λευκοκύτταρα	
Human T-Cells	4.0

Πίνακας 18: Παθογόνα που αδρανοποιούνται κατά την επεξεργασία πλάσματος με υδροχλωρικό αμοτοσαλένιο και UVA. (Πηγή: www.cerus.com)

Μετά την επεξεργασία η λειτουργικότητα των παραγόντων πήξης ήταν διατηρημένοι σε επίπεδα 73-98% σε σχέση με τα αρχικά. Τα επίπεδα του παράγοντα VIII μειώθηκαν στο 78% σε σχέση με τα αρχικά επίπεδα αλλά εντούτοις η ανάκτηση αυτή ήταν επαρκής για θεραπευτική χρήση. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην ποσότητα και λειτουργικότητα του von Willebrand, στο σχήμα και την κατανομή των πολυμερών του von Willebrand ή στη δραστικότητα της ADAMTS-13. Η λειτουργική δραστηριότητα του ινωδογόνου διατηρήθηκε σε ποσοστό περίπου 87%. Επιπλέον, η πρωτεΐνη C και S, όπως και η αντιθρομβίνη διατήρησαν την δραστικότητά τους σε ποσοστό πάνω από 95%. Δεν υπάρχουν ενδείξεις ενεργοποίησης της θρομβίνης, του συμπληρώματος, ή του συστήματος επαφής, όπως μετρείται από τα D-dimers, τα κλάσματα προθρομβίνης 1 και 2, του συμπλέγματος θρομβίνης-αντιθρομβίνης, του αντιγόνου του αναστολέα της C1 εστεράσης και του παράγοντα XIIa.

Σε μια διασταυρούμενη μελέτη (cross sectional) εξετάστηκε η κινητική του παράγοντα VII μετά από μετάγγιση και έγινε σύγκριση πλάσματος επεξεργασμένου με υδροχλωρικό αμοτοσαλένιο και μη επεξεργασμένου πλάσματος. Πιο συγκεκριμένα, συλλέχθηκε αυτόλογο πλάσμα από αφαίρεση και το ένα μέρος επεξεργάστηκε με υδροχλωρικό αμοτοσαλένιο και UVA, ενώ το άλλο μέρος χρησιμοποιήθηκε χωρίς επεξεργασία ως μάρτυρας. Τα άτομα που μεταγγίστηκαν έπαιρναν αγωγή με βαρφαρίνη για 4 μέρες και έπειτα τους χορηγήθηκε 1L, είτε από το επεξεργασμένο πλάσμα, είτε από το μη επεξεργασμένο πλάσμα. Δύο εβδομάδες αργότερα η μελέτη επαναλήφθηκε και τα άτομα έλαβαν μετάγγιση αντίθετη από αυτή που είχαν λάβει την πρώτη φορά. Και οι δύο κατηγορίες πλάσματος είχαν συγκρίσιμη κινητική του παράγοντα VII, ενώ τα επίπεδα του παράγοντα επέστρεψαν σε τιμές ίδιες με τις αρχικές πριν τη λήψη της βαρφαρίνης [111].

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μια ανοιχτή κλινική μελέτη μιας ομάδας για την αξιολόγηση της δραστικότητας και της ασφάλειας του πλάσματος επεξεργασμένου με αμοτοσαλένιο σε ασθενείς με εκ γενετής ανεπάρκεια των παραγόντων πήξης I (ινωδογόνο), II, V, VII, X, XI και XIII καθώς και της πρωτεΐνης C. Τα αποτελέσματα αυτής της δοκιμής, στην οποία συμμετείχαν 34 ασθενείς, κατέδειξαν ότι για τους περισσότερους παράγοντες που αξιολογήθηκαν, το επεξεργασμένο πλάσμα παρείχε ανάκτηση του παράγοντα πήξης και είχε φαρμακοκινητική συγκρίσιμη με το συμβατικό πλάσμα, όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία και αποκρίσεις PT και PTT επαρκείς για ικανοποιητική αιμόσταση [112]. Σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξε και τυχαιοποιημένη μελέτη που πραγματοποιήθηκε για τη θεραπεία της επίκτητης διαταραχής της πήξης που συναντάται σε νόσο του ήπατος και σε μεταμόσχευση ήπατος [113]. Επιπλέον, έλαβε χώρα μια τυχαιοποιημένη, διπλή-τυφλή κλινική δοκιμή, προκειμένου να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια του πλάσματος επεξεργασμένου με αμοτοσαλένιο σε σύγκριση με το συμβατικό πρόσφατα κατεψυγμένο πλάσμα για τη θεραπευτική ανταλλαγή πλάσματος σε ασθενείς με θρομβωτική θρομβοκυτταρική πορφύρα. Τα αποτελέσματα αυτής της κλινικής δοκιμής, στην οποία συμμετείχαν 35 ασθενείς, κατέδειξαν ότι η θεραπευτική απόκριση στην ανταλλαγή πλάσματος με τη χρήση του επεξεργασμένου πλάσματος δε διέφερε από την απόκριση στο συμβατικό πρόσφατα κατεψυγμένο πλάσμα σε ό,τι αφορά την ύφεση και υποτροπή της ΘΘΠ καθώς και το χρόνο ύφεσης και υποτροπής [114].

Τέλος, κρουίζημα μπορεί να παρασκευαστεί από πλάσμα επεξεργασμένο με αμοτοσαλένιο και UVA ακτινοβολία. Προκαταρκτικές μελέτες δείχνουν ότι το κρουίζημα παρασκευασμένο με τον παραπάνω τρόπο είναι αποδεκτό, ωστόσο δεν έχουν γίνει έλεγχοι σε κλινικές δοκιμές.

Συμπερασματικά, από τυχαιοποιημένες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν παρατηρήθηκε ότι η δραστηριότητα των παραγόντων πήξης καθώς και οι διάφορες πρωτεΐνες παρέμειναν σε ικανοποιητικά επίπεδα- μετά από σύγκριση του επεξεργασμένου και του συμβατικού πλάσματος-, όπως επίσης και η θεραπευτική απόκριση μετά από ανταλλαγή πλάσματος σε ασθενείς με ΘΘΠ.

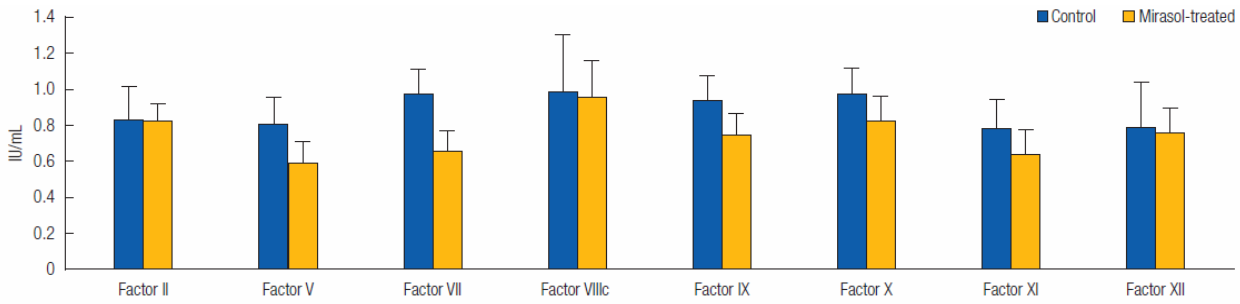
2.2.1.3 Ριβοφλαβίνη+ UVA

Η επεξεργασία με ριβοφλαβίνη είναι αποτελεσματική έναντι μεγάλου φάσματος ιών με περίβλημα ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων και μερικών χωρίς περίβλημα. Μέχρι στιγμής είναι το μόνο σύστημα αδρανοποίησης που φαίνεται να αδρανοποιεί την ηπατίτιδα Α, η οποία είναι πολύ ανθεκτική στις χημικές και θερμοκρασιακές παρεμβάσεις. Επιπλέον, αδρανοποιούνται βακτήρια (gram θετικά και αρνητικά), παράσιτα και λευκοκύτταρα πράγμα που σημαίνει ότι προφυλλάσει από την TA-GVHD.

Η επεξεργασία του πλάσματος με ριβοφλαβίνη και ακτινοβολία σχετίζεται με απώλεια της δραστηριότητας των παραγόντων πήξης, ωστόσο εξωτερικές μελέτες επικύρωσης έχουν επιβεβαιώσει ότι τα λειτουργικά επίπεδα των θεραπευτικών πρωτεϊνών συγκρατούνται στο FFP. Συγκεκριμένα, υπάρχει μια μέση απώλεια της τάξης του 32% για τον παράγοντα XI, και πάνω από 21% για τον παράγοντα VIII, το ινωδογόνο, και τους παράγοντες V, VII, IX, και X. Ακολούθως η ανάκτηση των αντιγόνου vWF, vWF: ristocetin cofactor και η ADAMTS-13 είναι σε ποσοστό 87%, 85% και 73% αντίστοιχα ενώ η πρωτεΐνη C εμφανίζει ανάκτηση 83%. Στις περισσότερες μονάδες παρατηρείται απώλεια των υψηλού μοριακού βάρους πολυμερών του vWF. Μελέτες επίσης δείχνουν ότι η πρωτεΐνη C, η αντιθρομβίνη και ο αναστολέας της πλασμίνης εμφανίζουν ανάκτηση πάνω από 90%. Μελέτες in vitro αναφέρουν ότι το πλάσμα επεξεργασμένο με ριβοφλαβίνη διατηρεί την ποιότητα των πρωτεϊνών σε επίπεδα σύμφωνα με τις προδιαγραφές των ευρωπαϊκών προτύπων για το FFP. Συμπληρωματική μελέτη διεξήχθη επίσης για να αξιολογήσει την δραστηριότητα των πρωτεϊνών του επεξεργασμένου πλάσματος και του πλάσματος από αφαίρεση μετά από αποθήκευση ενός έτους [115]. Ο πίνακας και η εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζουν συνοπτικά τα αποτελέσματα.

IU/ml	Συμβατικό πλάσμα από ολικό αίμα	Επεξεργασμένο πλάσμα από ολικό αίμα	Συμβατικό πλάσμα από αφαίρεση	Επεξεργασμένο πλάσμα από αφαίρεση	Εύρος τιμών αναφοράς
Παράγοντας II	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.65–1.54
Παράγοντας V	0.8 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.54–1.45
Παράγοντας VII	1.0 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.62–1.65
Παράγοντας VIIIc	1.1 ± 0.4	1.1 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.45–1.68
Παράγοντας IX	0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.45–1.48
Παράγοντας X	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.68–1.48
Παράγοντας XI	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.42–1.44
Παράγοντας XII	0.7 ± 0.3	0.7 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.40–1.52

Πίνακας 19: δραστηριότητα παραγόντων πήξης πλάσματος επεξεργασμένο με ριβοφλαβίνη και συμβατικού πλάσματος (από ολικό αίμα και από αφαίρεση αντίστοιχα), μετά από 52 εβδομάδες αποθήκευσης. (πηγή: Caridian BCT).



Εικόνα 10: Στο διάγραμμα συγκρίνεται η δραστηριότητα των παραγόντων πήξης. Το επεξεργασμένο πλάσμα σημαίνεται με κίτρινο χρώμα ενώ το συμβατικό πλάσμα με μπλέ χρώμα. (πηγή: Caridian BCT).

Παρατηρητικές κλινικές δοκιμές βρίσκονται σε εξέλιξη για να αποκτήσουν πρόσβαση σε τρεις ευρωπαϊκές χώρες. Ορισμένες τράπεζες αίματος στην Πολωνία έχουν εφαρμόσει σε πάνω από 100.000 μονάδες πλάσματος επεξεργασία με την παρούσα μέθοδο, ενώ το ινστιτούτο μετάγγισης αίματος στην Σερβία αξιολογεί την κλινική απόδοση των επεξεργασμένων προϊόντων σε ασθενείς με υποπροθρομβιναιμία με τη χρήση του δείκτη INR. Μετά τη μετάγγιση με το επεξεργασμένο πλάσμα παρατηρήθηκε μια μείωση του INR της τάξης του 0,49 (εύρος από 0,33-0,80) [116].

Συμπερασματικά, η επεξεργασία πλάσματος με ριβοφλαβίνη επιτυγχάνει αδρανοποίηση της ηπατίτιδας A, καθώς και προφύλαξη από την TA-GVHD. Επιπλέον το επεξεργασμένο πλάσμα διατηρεί την ποιότητα των πρωτεϊνών και των παραγόντων πήξης σε ικανοποιητικά επίπεδα.

2.2.1.4 UVC ακτινοβολία

Όσον αφορά την UVC ακτινοβολία είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα δεδομένα για την επεξεργασία του πλάσματος με βρίσκονται σε αρχικά στάδια, αφού η διαδικασία δεν έχει επικυρωθεί/αξιολογηθεί πλήρως ακόμα. Για τις μονάδες πλάσματος είναι απαραίτητη η εφαρμογή μεγαλύτερης έντασης UVC ακτινοβολίας σε σχέση με τα παρασκευάσματα αιμοπεταλίων, ώστε να επιτευχθεί αδρανοποίηση παρόμοιου επιπέδου. Δεδομένου ότι η θεραπευτική αποτελεσματικότητα της μετάγγισης πλάσματος βασίζεται στις πρωτεΐνες που είναι λιγότερο ευαίσθητες στην ακτινοβολία, είναι κατανοητό ότι η

εφαρμογή υψηλότερης δόσης UVC ακτινοβολίας δεν θα επηρεάσει την λειτουργικότητα τους. Ομοίως στις μονάδες πλάσματος, όλοι οι ιοί με εξαίρεση τον HIV-1 αδρανοποιούνται αποτελεσματικά με δόση 1 J/cm².

2.2.2 Αιμοπετάλια

Όσον αφορά την επεξεργασία των αιμοπεταλίων, έχουν πάρει έγκριση CE mark και είναι σε κλινική χρήση οι μέθοδοι αδρανοποίησης με υδροχλωρικό αμοτοσαλένιο και με ριβοφλαβίνη.

Για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της μετάγγισης αιμοπεταλίων, ώστε να αποφασιστεί η περαιτέρω ή όχι μετάγγιση, απαιτείται η μέτρηση του αριθμού αιμοπεταλίων πριν τη μετάγγιση, μια ώρα και 20-24 ώρες μετά, δηλαδή ο υπολογισμός του δείκτη διόρθωσης της αύξησης του αριθμού των αιμοπεταλίων (Corrected Count Increment, CCI).

$$CCI = PC-POST^7 - PC-PRE^8 / N \text{ μεταγγισθέντων AMΠ} (\times 1011) \times BSA^9$$

Ο παραπάνω όρος χρησιμοποιείται και στις κλινικές μελέτες για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των αιμοπεταλίων μετά από μετάγγιση¹⁰.

2.2.2.1 Υδροχλωρικό αμοτοσαλένιο+UVA

Η επεξεργασία αιμοπεταλίων με *υδροχλωρικό αμοτοσαλένιο* έχει αποδειχθεί ότι αδρανοποιεί μια σειρά ιών από τους ιούς που έχουν ελεγχθεί έως σήμερα, μόνον ο ιός της ηπατίτιδας Α (HAV) και ο ιός ΡΡV (Plum Pox Virus) παραμένουν ανθεκτικοί στην αδρανοποίηση, ενώ έχει αποδειχθεί ότι αδρανοποιούνται μια σειρά βακτηρίων σε προϊόντα αιμοπεταλίων. Μελέτες αδρανοποίησης στις οποίες χρησιμοποιήθηκε ένα εύρος gram θετικών και gram αρνητικών παθογόνων βακτηρίων, κατέδειξαν αδρανοποίηση οργανισμών κατά περίπου 6 logs, με εξαίρεση των *P. aeruginosa* και *B. cereus* (συμπεριλαμβανομένων των σπόρων), στους οποίους σημειώθηκε μείωση της τάξης των 4,5 και 3,6 logs αντίστοιχα. Οι σπόροι των βακτηρίων είναι ανθεκτικοί στην αδρανοποίηση. Ωστόσο, τα βακτήρια που σχηματίζουν σπόρους είναι ευαίσθητα στην αδρανοποίηση, όταν βρίσκονται στο στάδιο βλαστικής ανάπτυξης. Επιπλέον αδρανοποιεί μολυσματικά παράσιτα, αφού διάφορες *in vitro* μελέτες κατέδειξαν αναστολή στον πολλαπλασιασμό παρασίτων, κατόπιν φωτοχημικής επεξεργασίας. Τέλος αδρανοποιεί μολυσματικά λευκοκύτταρα του δότη συμπεριλαμβανομένων των Τ-κυττάρων σε παράγωγα των

⁷ αριθμός AMΠ μετά τη μετάγγιση (AMΠ/ml)

⁸ : αριθμός AMΠ πριν τη μετάγγιση (AMΠ/ml)

⁹ : επιφάνεια σώματος σε m²

¹⁰ CCI> 7.5x10⁹/l σε 1 h και CCI> 4.5x10⁹/l σε 20-24 h.

αιμοπεταλίων. Διάφορες in vitro μελέτες κατέδειξαν αναστολή στον πολλαπλασιασμό των λευκοκυττάρων καθώς και αναστολή στη σύνθεση κυτταροκινών από τα λευκοκύτταρα μετά από τη φωτοχημική επεξεργασία. Οι πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζουν το εύρος αδρανοποίησης ιών, βακτηρίων και παρασίτων που επιτυγχάνεται με την παρούσα μέθοδο.

παράσιτα που ελέγχθηκαν	Βαθμός αδρανοποίησης	
	Αιμοπετάλια σε πλάσμα/ Προσθετικό Διάλυμα	Αιμοπετάλια σε πλάσμα
<i>Plasmodium falciparum</i> (ελονοσία)	≥6,0	≥6,9
<i>Trypanosoma cruzi</i> (νόσος του Chagas)	>5,3	>5,0
<i>Leishmania mexicana</i> (στάδιο μετακυκλικού προμαστιγωτού)	>5,0	-
<i>Leishmania major</i> Jish (στάδιο αμαστιγωτού)	>4,3	-
<i>Babesia microti</i> (μπαμπεσίωση)	>5,3	>5,3

Πίνακας 20(α): Παράσιτα που ελέγχθηκαν με την μέθοδο αδρανοποίησης υδροχλωρικού αμοτοσαλενίου για αιμοπετάλια (πηγή:www.cerus.com).

οί που ελέγχθηκαν	Βαθμός αδρανοποίησης*	
	Αιμοπετάλια σε πλάσμα/ Προσθετικό Διάλυμα	Αιμοπετάλια σε πλάσμα
<i>Ιοί με περίβλημα</i>		
HIV-1 (κυτταρικός)***	>6,1	>6,7
HIV-1 (μη-κυτταρικός)	>6,2	≥4,7
Κλινικά απομονωμένος ιός HIV-1	>3,4	-
Κλινικά απομονωμένος ιός HIV-2	>2,5	-
Λανθάνων προϊός HIV-1	αδρανοποιήθηκε στο όριο ανίχνευσης	-
HBV (στέλεχος MS-2)	>5,5	>4,5
HCV (στέλεχος Hutchinson)	>4,5	>4,5
HTLV-I (Ανθρώπινος λεμφοτρόπος ιός T κυττάρων) ***	4,7**	≥4,5
HTLV-II (Ανθρώπινος λεμφοτρόπος ιός T κυττάρων) ***	5,1**	>5,7
Κυτταρομεγαλοϊός που σχετίζεται με τα κύτταρα (CMV) ***	>5,9	-
Ιός βόειας ιογενούς διάρροιας (BVDV, ιός μοντέλο του ανθρώπινου HCV)	>6,0	≥5,4
Ιός ηπατίτιδας Β της πάπιας (DHBV, ιός μοντέλο του ανθρώπινου HBV)	>6.2	4.4 έως 4.5

PRV (ιός Pseudorabies, μοντέλο για CMV)	-	≥4,7
Ιός του δυτικού Νείλου (WNV)	>6,0	≥6,8
SARS-CoV (Ανθρώπινος Κοροναϊός)	-	≥5,5
Ιός Chikungunya	>6,4	≥7,6
Ιός της γρίπης A H5N1 (γρίπη των πτηνών)	>5,9	>5,7
<i>Ιοί χωρίς περίβλημα</i>		
Ιός της νόσου Bluetongue, τύπος 11	>5,0	5,1
Ιός Calicivirus	1,7 έως 2,4	-
Ανθρώπινος αδενοϊός-5	>5,9	≥6,9
Parvo (Ιός Parvo B19)	-	1,8
<p>* ">" αναφέρεται σε αδρανοποίηση κάτω από το όριο ανίχνευσης της δοκιμασίας. Σε ορισμένες περιπτώσεις οι δοκιμασίες έχουν ένα πολύ μικρό δυναμικό εύρος λόγω των περιορισμών στους επιτούς τίτλους ιών.</p> <p>** εγγενές υπόβαθρο χαμηλού επιπέδου σε μη μολυσμένα κύτταρα-δείκτες αποκλείει τιμή ">" για τον HTLV</p> <p>*** ενδοκυττάριος ενοφθαλμισμός</p> <p>"-" σημαίνει ότι δεν ελέγχθηκε</p>		

Πίνακας 20 (β): Ιοί που ελέγχθηκαν με την χρήση του υδροχλωρικού αμοτοσαλενίου κατά την επεξεργασία των αιμοπεταλίων (πηγή: www.cerus.com)

Βακτήρια που ελέγχθηκαν	Βαθμός αδρανοποίησης	
	Αιμοπετάλια σε πλάσμα/ Προσθετικό Διάλυμα	Αιμοπετάλια σε πλάσμα
Gram αρνητικά βακτήρια		
Escherichia coli	>6,4	≥7,3
Serratia marcescens	>6,7	-
Klebsiella pneumoniae	>5,6	≥6,7
Pseudomonas aeruginosa	4,5	-
Salmonella choleraesuis	>6,2	-
Yersinia enterocolitica	>5,9	>7,3
Enterobacter cloacae	5,9	-
Anaplasma phagocytophilum (παρόντας HGF) **	-	>4,2
Gram θετικά βακτήρια		
Staphylococcus epidermidis	>6,6	>7,4
Staphylococcus aureus	6,6	>7,6
Streptococcus pyogenes	>6,8	-
Listeria monocytogenes	>6,3	-
Corynebacterium	>6,3	-
Bacillus cereus (περιλαμβάνει	3,6	-
Bacillus cereus (βλαστικό)	>6,0	-
Bifidobacterium adolescentis	>6,5	-
Propionibacterium acnes	>6,7	-
Είδη Lactobacillus	>6,9	-
Clostridium perfringens	>7,0	-
Βακτήρια γένους		

Treponema pallidum (σύφιλη)	≥6,8 έως ≤7,0	>5,9
Borrelia burgdorferi (νόσος)	>6,8	>10,6
* “>” αναφέρεται σε αδρανοποίηση κάτω από το όριο ανίχνευσης της δοκιμασίας και		
“≥” αναφέρεται σε αδρανοποίηση μικρότερη ή ίση του ορίου ανίχνευσης της δοκιμασίας		
** ενδοκυττάριος ενοφθαλμισμός		
“-” σημαίνει ότι δεν ελέγχθηκε		

Πίνακας 20(γ): Είδη βακτηρίων που ελέγχθηκαν με την μέθοδο αδρανοποίησης υδροχλωρικού αμοτοσαλενίου για αιμοπετάλια (πηγή:www.cerus.com)

Τα αιμοπετάλια, τα οποία εναιωρούνται σε 35% πλάσμα και 65% προσθετικό διάλυμα και έχουν υποστεί επεξεργασία με το αμοτοσαλένιο, μπορούν να συντηρηθούν έως και για 7 ημέρες από τη στιγμή της συλλογής, σε θερμοκρασία 20°C έως 24°C, με συνεχή ήπια ανακίνηση, σύμφωνα με τις ισχύουσες διαδικασίες της Αιμοδοσίας. Τα αιμοπετάλια επεξεργασμένα με αμοτοσαλένιο που έχουν συντηρηθεί έως και για 7 ημέρες έχει αποδειχθεί ότι αποτρέπουν και ελέγχουν επαρκώς την αιμορραγία. Ακολούθως, τα αιμοπετάλια που εναιωρούνται σε 100% πλάσμα και έχουν υποστεί επεξεργασία μπορούν να φυλαχτούν έως και για 5 ημέρες από τη στιγμή της συλλογής, σε θερμοκρασία 20°C έως 24°C, με συνεχή ήπια ανακίνηση. Η επεξεργασία αιμοπεταλίων με το αμοτοσαλένιο δεν επιφέρει σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με μη επεξεργασμένα προϊόντα αιμοπεταλίων ως προς το pH του προϊόντος αιμοπεταλίων, τη συγκέντρωση γαλακτικού, τον αριθμό των αιμοπεταλίων, τη μορφολογία, τη συγκέντρωση γλυκόζης, τη συσσώρευση, την εκκριτική και ολική συγκέντρωση τριφωσφορικής αδενοσίνης, την έκταση της μεταβολής του σχήματος ή την αντίδραση των αιμοπεταλίων σε υποτονικό σοκ. Οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί χρησιμοποιούν ως παραμέτρους -για την κλινική αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας-, το αιμοστατικό/αιμορραγικό αποτέλεσμα (haemostatic/bleeding score) ή τον όρο CCI (corrected count increment). Προς το παρόν δεν υπάρχουν μελέτες σύγκρισης αποτελεσματικότητας των δύο τεχνολογιών όμως υπάρχουν δύο μεγάλες μελέτες σύγκρισης με τα συμβατικά αιμοπετάλια.

Η πρώτη μελέτη που πραγματοποιήθηκε με την ονομασία EUROSPRITE [117] ήταν μια τυχαιοποιημένη, ελεγχόμενη, διπλή-τυφλή κλινική δοκιμή προκειμένου να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα των αιμοπεταλίων που παρασκευάζονται με τη μέθοδο του buffy coat (εναιωρημένα σε 35% πλάσμα/65% InterSol) και κατόπιν υποβάλλονται σε επεξεργασία με το αμοτοσαλένιο και ακτινοβολία. **Τα αποτελέσματα αυτής της κλινικής δοκιμής στην οποία συμμετείχαν 103 ασθενείς έδειξαν ότι τα επεξεργασμένα αιμοπετάλια του buffy coat μπορούν να χρησιμοποιηθούν με τον ίδιο τρόπο, όπως και τα μη επεξεργασμένα αιμοπετάλια για την υποστήριξη ασθενών με θρομβοκυταροπενία.** Ισόποσες δόσεις επεξεργασμένων αιμοπεταλίων του buffy coat παρείχαν ανάλογη αύξηση τιμών έπειτα από μία και έπειτα από 24 ώρες μετά τη μετάγγιση. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσίασαν και οι Slichter και συν. [118] σε μελέτη όπου συμμετείχαν 10

ασθενείς στην οποία υπήρχε συγκρίσιμος διορθωμένος χρόνος ροής για τα συμβατικά και τα επεξεργασμένα αιμοπετάλια. Επιπλέον η διαφορά αύξησης τιμών έπειτα από 1 ώρα δεν ήταν σημαντική.

Η μελέτη SPRINT [119] μια τυχαιοποιημένη, ελεγχόμενη, διπλή-τυφλή κλινική δοκιμή προκειμένου να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα της αιμόστασης μετά μετάγγιση συμπυκνωμένων αιμοπεταλίων από αφαίρεση που συλλέχθηκαν σε επεξεργασία με αμοτοσαλένιο σε 645 ασθενείς με θρομβοκυτταροπενία. Οι παράμετροι που επιβεβαίωναν την «μη-κατωτερότητα» ήταν αρχικά ο βαθμός αιμορραγίας σταδίου 2 (58,5% για τα επεξεργασμένα και 57,5% για τα συμβατικά αιμοπετάλια) και έπειτα σταδίου 3 και 4 (4,1% για τα επεξεργασμένα και 6,1% για τα συμβατικά αιμοπετάλια). **Τα αποτελέσματα αυτής της μεγάλης δοκιμής κατέδειξαν την ισοδυναμία των επεξεργασμένων αιμοπεταλίων από αφαίρεση συγκριτικά με τα συμβατικά αιμοπετάλια από αφαίρεση στην πρόληψη και θεραπεία αιμορραγίας 2ου ή υψηλότερου βαθμού, σύμφωνα με τα κριτήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO).** Κατά την σύγκριση των επεξεργασμένων με τα συμβατικά αιμοπετάλια διαφορές βρέθηκαν στο CCI έπειτα από 1 ώρα (11,100 και 16,000 αντίστοιχα), στο χρονικό διάστημα που χρειάστηκε ξανά μετάγγιση (1,9 και 2,4 μέρες αντίστοιχα) καθώς και στον μέσο αριθμό των μεταγγίσεων αιμοπεταλίων (8,4 και 6,2 αντίστοιχα).

Στη μελέτη TESSI (Lozano et al.) που συμμετείχαν 201 ασθενείς, συγκρίθηκαν μεταγγίσεις με συμβατικά αιμοπετάλια σε T-SOL ή προσθετικό διάλυμα SSP και επεξεργασμένα αιμοπετάλια αποθηκευμένα 6-7 ημέρες. Ο μέσος όρος αύξησης τιμής στην πρώτη ώρα ήταν 8,163 για τα επεξεργασμένα αιμοπετάλια και 9,383 για τα συμβατικά αιμοπετάλια **καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι υπάρχει κλινική ισοδυναμία.** Ακολούθως, ο μέσος όρος αύξησης τιμής έπειτα από 24 ώρες ήταν 4,589 και 6,549 για τα επεξεργασμένα και τα συμβατικά αιμοπετάλια αντίστοιχα. Οι παραπάνω μελέτες έχουν κοινό παρονομαστή την άποψη ότι δεν θεωρούν αυτές τις διαφορές μεγάλης κλινικής σημασίας, αντίθετα συμπεραίνουν ότι τα επεξεργασμένα με αμοτοσαλένιο αιμοπετάλια είναι κατάλληλα για κλινική χρήση.

Η πρόσφατα δημοσιευμένη πολυκεντρική μελέτη HOVON [120] συγκρίνει την κλινική αποτελεσματικότητα των λευκαφαιρεμένων αιμοπεταλίων σε πλάσμα ή προσθετικό διάλυμα με ή χωρίς αδρανοποίηση με αμοτοσαλένιο [121]. Το συμπέρασμα είναι ότι η κλινική αποτελεσματικότητα των αιμοπεταλίων επεξεργασμένων με αμοτοσαλένιο είναι κατώτερη των συμβατικών αιμοπεταλίων σε εναιώρημα πλάσματος αν και αρκετές μεταγγίσεις της μελέτης ήταν χωρίς σαφή ένδειξη. Στο σκέλος των αδρανοποιημένων αιμοπεταλίων η συχνότητα αιμορραγίας ήταν μεγαλύτερη, ενώ η ανταπόκριση στην μετάγγιση ήταν κατώτερη.

2.2.2.2 Ριβοφλαβίνη+UVA

Ο όγκος των δεδομένων και τα αποδεικτικά στοιχεία για την αποτελεσματικότητα και ασφάλεια των αιμοπεταλίων επεξεργασμένα με ριβοφλαβίνη είναι περιορισμένος. Είναι κρίσιμης σημασίας ότι τα επεξεργασμένα αιμοπετάλια παραμένουν βιώσιμα και έχουν αιμοστατική αποτελεσματικότητα. Μια σειρά μελετών *in vitro* έχουν πραγματοποιηθεί για να αξιολογηθεί η ποιότητα των επεξεργασμένων αιμοπεταλίων με ριβοφλαβίνη, και έχει επίσης καθοριστεί συσχέτιση ανάμεσα στις *in vitro* παραμέτρους και *in vivo* αποδόσεις [124]. Στις προαναφερθείσες μελέτες, το pH και ο ρυθμός παραγωγής γαλακτικού οξέος φαίνεται να παρουσιάζουν ισχυρή συσχέτιση με την *in vivo* ανάκτηση και επιβίωση των επεξεργασμένων αιμοπεταλίων [124]. Ο ρυθμός κατανάλωσης γλυκόζης και ο στροβιλισμός (*swirl*) επίσης δείχνουν να έχουν μια συσχέτιση με τις *in vivo* παραμέτρους έως ένα μικρό βαθμό. Από την άλλη μεριά, η P-σελεκτίνη, το pO₂ και το pCO₂ στα επεξεργασμένα αιμοπετάλια δείχνουν να έχουν φτωχή σχέση με την *in vivo* ανάκτηση και επιβίωση. Αυτές οι σχέσεις σχημάτιζαν τη βάση για την αξιολόγηση της ποιότητας των επεξεργασμένων αιμοπεταλίων κατά την διάρκεια της ανάπτυξης των αρχικών πεδίων αξιολόγησης. Οι ικανότητες συγκόλλησης και συσσωμάτωσης των επεξεργασμένων αιμοπεταλίων υπό συνθήκες ροής ήταν παρόμοιες με αυτές των συμβατικών, παρ' όλα αυτά οι δείκτες ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, μετά από 5 μέρες αποθήκευσης, ήταν σημαντικά υψηλότεροι στα επεξεργασμένα απ' ό,τι στα συμβατικά αιμοπετάλια [125]. Επιπλέον, μελέτες με ραδιο-σημασμένα αιμοπετάλια σε υγιή άτομα έδειξε ότι η επεξεργασία με ριβοφλαβίνη σε αιμοπετάλια αφαίρεσης σχετίζεται με σημαντικά μειωμένα επίπεδα ανάκτησης (50 έναντι 66,5%) και επιβίωσης (104 έναντι 142 ώρες) σε σχέση με τα συμβατικά αιμοπετάλια [126].

Στην τυχαίοποιημένη ελεγχόμενη κλινική μελέτη MIRACLE, αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα και ασφάλεια των επεξεργασμένων αιμοπεταλίων με ριβοφλαβίνη. Κατά την διάρκεια της μελέτης, στην οποία συμμετείχαν 110 ασθενείς (56 ασθενείς έλαβαν επεξεργασμένα αιμοπετάλια και 54 ασθενείς έλαβαν συμβατικά αιμοπετάλια), πραγματοποιήθηκαν συνολικά 678 μεταγγίσεις αιμοπεταλίων. Ο μέσος όρος αύξησης τιμής της πρώτης ώρας (1h CCI) των 8 πρώτων μεταγγίσεων μέσα σε διάστημα 28 ημέρων ήταν $11,725 \pm 1,140$ στην κατηγορία των επεξεργασμένων αιμοπεταλίων και $16,939 \pm 1,149$ στην κατηγορία των συμβατικών. Συμπερασματικά, η μελέτη απέτυχε να επιβεβαιώσει υποθετική «μη κατωτερότητα», αφού η απόλυτη διαφορά μεταξύ των δύο σκελών έπρεπε να είναι λιγότερη από 2,940. Ως δευτερεύον καταληκτικό σημείο χρησιμοποιήθηκε η αύξηση τιμής στις 24 ώρες (24h CCI) όπου για τα επεξεργασμένα αιμοπετάλια ήταν $6,676 \pm 883$ και αντίστοιχα για τα συμβατικά ήταν $9,889 \pm 915$, δείχνοντας μια συγκρίσιμη τάση. Συνεχίζοντας, το 71,3% των επεξεργασμένων αιμοπεταλίων οδήγησαν σε επιτυχή μετάγγιση σε σύγκριση με το 84,1% των συμβατικών. Επιπλέον όταν αξιολογήθηκαν οι 24 ώρες μετά την μετάγγιση η επιτυχία ήταν σε ποσοστό 58,9% και 68,1% για τα επεξεργασμένα και τα συμβατικά αιμοπετάλια αντίστοιχα [127]. Αυτά τα ποσοστά είναι μέσα στα όρια που ανέφεραν και άλλες μελέτες. **Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ανάμεσα στις δύο ομάδες δεν εντοπίστηκαν ιδιαίτερες**

διαφορές σχετικά με τον μέσο όρο των ημερών ανάμεσα στις μεταγγίσεις, στον μέσο όρο του αριθμού των μεταγγίσεων των αιμοπεταλίων ανα ασθενή καθώς και της δόσης κάθε μετάγγισης.

Οι Ostrowski και συν, πραγματοποίησαν μια *in vitro* δοκιμή για να αξιολογήσουν την ποιότητα του κυττάρου και την αιμοστατική λειτουργία των αιμοπεταλίων σε buffy coat (BCP) εναιωρημένα σε πλάσμα και επεξεργασμένα με ριβοφλαβίνη συγκρινόμενο με τα συμβατικά αιμοπετάλια σε πλάσμα. **Η προσθήκη της ριβοφλαβίνης δεν επηρέασε την μορφολογία των αιμοπεταλίων, η οποία ήταν μειωμένη και στις δύο ομάδες. Η αιμοστατική λειτουργία των αιμοπεταλίων σε buffy coat σε απουσία ερυθρών αιμοσφαιρίων και πλάσματος ήταν σημαντικά επηρεασμένη μετά την επεξεργασία με ριβοφλαβίνη.** Αυτό το αποτέλεσμα ήταν πιο έντονο για την επαγόμενη απόκριση των TRAP-6 και ADP. Ωστόσο, η επαγόμενη συσσωμάτωση των προαναφερθέντων έγινε συγκρίσιμη και στις δύο ομάδες με την προσθήκη ερυθρών αιμοσφαιρίων και πλάσματος. Κατά την διάρκεια της μελέτης, υπήρχε μια σταδιακή μείωση στην επαγόμενη συσσωμάτωση κολλαγόνου και αραχιδονικού οξέος με αξιοσημείωτη πτώση στην συσσωμάτωση που παρατηρήθηκε και στις δύο ομάδες στο τέλος της περιόδου αποθήκευσης. Με την προσθήκη ερυθρών αιμοσφαιρίων και πλάσματος η επαγόμενη συσσωμάτωση βελτιώθηκε στα επεξεργασμένα αιμοπετάλια.

Έως σήμερα, έχουν πραγματοποιηθεί μόνο μικρές μελέτες παρατήρησης ή βρίσκονται ακόμα σε εξέλιξη σε Ισπανία, Λουξεμβούργο, Λιθουανία και Σερβία. Μέσα σε άλλους, οι Antic και συν, έδειξαν ότι δε υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα που έλαβε επεξεργασμένα αιμοπετάλια και στην ομάδα με τα συμβατικά αιμοπετάλια, οι Yanez και συν, δημοσίευσαν μελέτη όπου συμμετείχαν 11 ασθενείς και έλαβαν 26 μεταγγίσεις, με αύξηση τιμής της πρώτης ώρας (1h CCI) 12.000 και αύξηση τιμής στις 24 ώρες (24h CCI) 4,900, ενώ ο Coen και συν παρουσίασε επίσης συγκρίσιμες τιμές στο 1h CCI και 24h CCI (9.900 ±5.700 και 5.900± 2.900) σε μελέτη με 21 μεταγγίσεις σε 8 ασθενείς. Στην Ιταλία, έχει ξεκινήσει μια πολυκεντρική τυχαίοποιημένη ελεγχόμενη μελέτη (IPTAS) που συμμετέχουν πάνω από 400 ασθενείς, χρησιμοποιώντας αιμοπετάλια επεξεργασμένα με ριβοφλαβίνη εναιωρημένα σε PAS για την αντιμετώπιση της ανησυχίας των κλινικά σημαντικών αιμορραγιών. Επιπροσθέτως, η μελέτη PREPAREs (κοινοπραξία Δανίας, Νορβηγίας και Καναδά) βρίσκεται σε εξέλιξη με στόχο να συμπεριληφθούν 600 ασθενείς που λαμβάνουν αιμοπετάλια επεξεργασμένα με τη μέθοδο της ριβοφλαβίνης εναιωρημένα σε 100% πλάσμα. Και οι δύο αναφερθείσες κλινικές μελέτες δεν θα έχουν ολοκληρωθεί πριν από το 2015.

2.2.2.3 UVC ακτινοβολία

Ορισμένες έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί για την αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας των αιμοπεταλίων με εφαρμογή UVC ακτινοβολίας. Όσον αφορά την αδρανοποίηση των βακτηρίων, διερευνάται ένα εύρος βακτηριακών ειδών με διαφορετικές ιδιότητες: gram (+), gram (-), αερόβια και αναερόβια καθώς και είδη που σχηματίζουν σπόρια. Σημειώνεται ότι τα επιλεγμένα είδη σχετίζονται με μεταδιδόμενες με μετάγγιση λοιμώξεις. Η διαδικασία ακτινοβολίας με UVC έδειξε ότι αδρανοποιήθηκαν

αποτελεσματικά τα διαφορετικά στελέχη, με μια μείωση το λιγότερο 4 log [217]. Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο βακτηριακός τίτλος είναι αρκετά χαμηλός στα μολυσμένα αιμοπετάλια στην αρχή της αποθήκευσης (<1 CFU/ml), ο ρυθμός μείωσης των >4 log μπορεί να εξασφαλίσει επαρκή βακτηριακή αδρανοποίηση [223].

Όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενα κεφάλαια, σύμφωνα με τις αντίστοιχες εθνικές κατευθυντήριες γραμμές, τα συμπυκνώματα αιμοπεταλίων αποθηκεύονται από 4 έως 7 ημέρες μετά την προετοιμασία πριν μεταγγισθούν. Λόγω των συνθηκών συντήρησης κατά την αποθήκευση (θερμοκρασία περιβάλλοντος με συνεχή ανακίνηση) ευνοείται η ανάπτυξη βακτηρίων, έτσι αυξάνεται ο τίτλος των υπολειπόμενων βακτηρίων κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, αν η διαδικασία αδρανοποίησης είναι ημιτελής. Ως εκ τούτου, διεξήχθη μια μελέτη που διερεύνησε την αποστείρωση των αιμοπεταλίων μετά από εφαρμογή ακτινοβολίας και αποθήκευση για 5-7 ημέρες [218] και έδειξε ότι τα αιμοπετάλια αποστειρώθηκαν αποτελεσματικά μετά από εμβολιασμό με 10-100 CFU/ml με διάφορα βακτηριακά στελέχη όπως *Clostridium perfringens*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Propionibacterium acnes*, *Pseudomonas aeruginosa* ή *S. epidermitis*. **Όσον αφορά το βακτήριο *Bacillus cereus*, που σχηματίζει σπόρια, η διαδικασία φαίνεται να παρουσιάζει περιορισμένη αποτελεσματικότητα.** Περαιτέρω πειράματα πρέπει να επιδείξουν αν η μόλυνση των παρασκευασμάτων των αιμοπεταλίων οφείλεται σε βακτήρια που σχηματίζουν σπόρια και είναι λιγότερο επιρρεπή στην UVC ακτινοβολία ή σε άλλης κατηγορίας βακτήρια [219]. Αξίζει να αναφερθεί ότι μελέτες δείχνουν ότι και άλλες τεχνολογίες αδρανοποίησης δεν μπορούν να αδρανοποιήσουν αποτελεσματικά των *B. cereus* [220].

Σχετικά με την αδρανοποίηση των ιών, χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι ιοί καθώς και μοντέλα για κοινούς μεταδιδόμενους με την μετάγγιση ιούς, οι οποίοι επιλέχθηκαν σύμφωνα με τις τρέχουσες κατευθυντήριες οδηγίες που αφορούν τις μελέτες επικύρωσης. Σύμφωνα με τα παραπάνω, ιοί όπως ο vesicular stomatitis virus, ο porcine parvovirus (μοντέλο για το parvo B19), ο encephalomyocarditis virus (μοντέλο για την ηπατίτιδα A) και ο Sindbis virus (μοντέλο για την ηπατίτιδα C) αδρανοποιούνταν κατά 4 ή και περισσότερα log. Αντίθετα, ο pseudorabies virus (μοντέλο για την ηπατίτιδα B) και ο West Nile virus παρουσίασαν λιγότερη αποτελεσματικότητα στην αδρανοποίηση με μείωση περίπου 2-3 και 3,5-4 log αντίστοιχα. **Όσον αφορά τον ιό HIV φαίνεται ότι παρουσιάζει μεγάλη αντίσταση στην UVC ακτινοβολία με αποτέλεσμα να μειώνεται περίπου κατά 1 log.** Η διπλή φύση του γονιδιώματος του ιού και η αντίστροφη μεταγραφάση που σχετίζεται με τον HIV, που δεν επηρεάζονται από την ακτινοβολία, μπορεί να παρέχουν την βάση για έναν αποτελεσματικό μηχανισμό επιδιόρθωσης του ιού [221]. Για τον ιό HIV, όπως και για άλλους παράγοντες που γίνονται έλεγχοι, η εφαρμογή της ακτινοβολίας UVC μπορεί να εξαλείψει ή τουλάχιστον να μειώσει περαιτέρω τον κίνδυνο της μετάδοσης των ιών κατά τη διάρκεια της περιόδου παραθύρου πριν από τον έλεγχο με NAT. Σε συνδυασμό λοιπόν με τους τρέχοντες ελέγχους ρουτίνας που πραγματοποιούνται για τους ιούς HIV, HBV, HCV, η εφαρμογή της ακτινοβολίας UVC μπορεί να συμβάλλει στην βελτίωση της ασφάλειας έναντι των ιών σε σύγκριση με τα συμβατικά μη επεξεργασμένα αιμοπετάλια.

Προκαταρκτικά αποτελέσματα από μελέτες για τα πρωτόζωα παρουσιάζουν ότι η ακτινοβολία UVC έχει τη δυνατότητα να αδρανοποιεί την *Leishmania infantum* και το *Trypanosoma cruzi* [224]. Μελλοντικές μελέτες ωστόσο, πρέπει να επιβεβαιώσουν ότι η επεξεργασία παρασκευασμάτων αιμοπεταλίων με UVC ακτινοβολία προσθέτουν μεγαλύτερη ασφάλεια στα προϊόντα αίματος σχετικά με τα παράσιτα.

Η *in vitro* ποιότητα των πρωτεϊνών του πλάσματος και των αιμοπεταλίων επηρεάζονται σε μέτριο βαθμό από την UVC ακτινοβολία. Σε ακτινοβολία 1 J/cm² η δραστηριότητα των παραγόντων πήξης του πλάσματος μειώθηκε περίπου 10-20% συγκρινόμενη με το μη επεξεργασμένο πλάσμα με μεγαλύτερη ευαισθησία να παρουσιάζει ο FXI του οποίου η δραστηριότητα μειώθηκε κατά 23%. Κατά την αποθήκευση του επεξεργασμένου πλάσματος για 3 μήνες στους -30°C δεν παρατηρήθηκαν περαιτέρω μειώσεις [206]. Σημειώνεται ότι ενώ η επεξεργασία του πλάσματος με UVC ακτινοβολία είναι μια τεχνική που ακόμα αναπτύσσεται, οι σχετιζόμενες μειώσεις στην δραστηριότητα των παραγόντων πήξης είναι παρόμοιες με εκείνες των ήδη εγκατεστημένων τεχνολογιών αδρανοποίησης που χρησιμοποιούνται για το πλάσμα [207,208].

Τα επεξεργασμένα με UVC ακτινοβολία αιμοπετάλια, χαρακτηρίζονται από ελαφρώς αυξημένη μεταβολική δραστηριότητα (κατανάλωση γλυκόζης, συσσώρευση γαλακτικού) σε σχέση με τα συμβατικά αιμοπετάλια, ενώ επίσης παρουσιάστηκαν αυξημένες τιμές στην έκφραση του CD62, στην δέσμευση της ανεξίνης και στην δέσμευση PAC-1. Η παράμετρος που *in vitro* παρουσίασε τη μεγαλύτερη ευαισθησία ήταν η αντίδραση υποτονικού σοκ (Hypotonic Shock Reaction, HSR) η οποία είχε μια μείωση κατά 20-30% αμέσως μετά την εφαρμογή της UVC ακτινοβολίας, αλλά ωστόσο γινόταν μια μερική ανάκτηση κατά την αποθήκευση. Γενικότερα, *in vitro* παράμετροι δείχνουν ότι η UVC ακτινοβολία επηρεάζει σε μέτριο βαθμό την λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων. Στον πίνακα που ακολουθεί (πίνακας 21) παρουσιάζεται συνοπτικά δεδομένα ποιοτικού ελέγχου που πραγματοποιήθηκαν σε αιμοπετάλια διαχωρισμένα από Buffy Coat 6 μέρες μετά την ακτινοβολία.

Δεδομένα *in vitro* ποιότητας των επεξεργασμένων αιμοπεταλίων είναι συγκρίσιμα με την ποιότητα άλλων τεχνολογιών αδρανοποίησης. Η σχέση μεταξύ της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων μετά την μετάγγιση αλλά και την επίδρασης, όσον αφορά την μετά-μετάγγιση ανάκτηση και επιβίωση του λήπτη, είναι αμφιλεγόμενη [209-211]. Επιπλέον τα αποτελέσματα της συσχέτισης άλλων παραμέτρων, όπως η HSR ή το γαλακτικό με την *in vivo* λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων ποικίλλει [212-214]. Με βάση τα παραπάνω είναι σημαντικό να γίνουν κλινικές μελέτες, ώστε να καθοριστούν η λειτουργικότητα και η κλινική αποτελεσματικότητα των επεξεργασμένων αιμοπεταλίων. Προκαταρκτικά αποτελέσματα από μελέτη ραδιοσήμανσης σε υγιείς δότες δείχνουν μείωση στην ανάκτηση και επιβίωση αυτόλογων επεξεργασμένων αιμοπεταλίων, η οποία είναι ίδιου εύρους με αυτή των ήδη εγκατεστημένων τεχνολογιών αδρανοποίησης [215].

Παράμετροι	Μέρες μετά την UVC ακτινοβολία					
	Μέρα 1η		Μέρα 4η		Μέρα 6η	
	Control PC	PC UVC	Control PC	PC UVC	Control PC	PC UVC
PLT συγκεντρωση X 10 ⁹ /ml	1,19±0,07	1,15±0,04	1,15±0,03	1,13±0,004	1,13±0,04	1,11±0,05
Swirling	ok	ok	ok	ok	ok	ok
pH	7,17±0,03	7,15±0,05	7,34±0,07	7,31±0,08	7,34±0,06	7,21±0,04
Γλυκόζη, mmol/l	5,9±0,5	5,9±0,5	4,4±0,4	4,1±0,6	3,4±0,6	2,6±0,8
Γαλακτικό, mmol/l	8,5±1,2	8,5±1,0	10,8±0,6	11,6±1,1	12,6±0,8	14,1±1,3
HSR, %	79±3	68±8	62±0	56±7	57±3	51±1
CD62, %	44±13	49±3	38±10	44±2	47±7	53±4
Ανεξίνη V, %	4±1	3±1	6±2	6±2	7±2	9±2
Δεύσμηση PAC-1	571±127	727±169	412±115	488±128	530±193	610±220

Πίνακας 21: Δεδομένα ποιοτικού ελέγχου που πραγματοποιήθηκαν σε αιμοπετάλια διαχωρισμένα από Buffy Coat, έξι μέρες μετά την ακτινοβολία. (πηγή: Axel Seltsam, Thomas H. Muller)

Η αλλαγή που προκαλείται από την UVC ακτινοβολία στις πρωτεΐνες των αιμοπεταλίων μπορεί να είναι αναμενομένη για τις μεμβρανικές όσο και για τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες. Σε μια πρόσφατη βιοχημική μελέτη που πραγματοποίησαν οι Verhaar και συν [216], ανέφεραν ότι η UVC ακτινοβολία ασκεί μια άμεση επίδραση στην ιντεγκρίνη αIIbβ3, τροποποιώντας εξωκυτταρικούς δισουλφιδικούς δεσμούς που ρυθμίζουν την διαμόρφωση της ιντεγκρίνης. Αυτή η άμεση ενεργοποίηση του αIIbβ3, υποδοχέα του ινοδωγόνου, μπορεί να οδηγήσει σε συσσωμάτωση των αποθηκευμένων αιμοπεταλίων και να επηρεάσει την αιμοστατική δραστηριότητα. Αν υποθεθεί ότι η UVC ακτινοβολία “καίει” τα αιμοπετάλια αυτό πιθανώς να περιορίζει την εφαρμογή του για αδρανοποίηση παθογόνων στα προϊόντα αίματος. Πράγματι, η καταστροφή των δισουλφιδικών δεσμών της αIIbβ3 μπορεί να ευθύνεται για την αύξηση της συσσωμάτωσης και την δέσμηση του PAC-1 που παρατηρείται στα επεξεργασμένα αιμοπετάλια.

Για μια πιο κατανοητή ανάλυση για την επίπτωση της UVC ακτινοβολίας στην ακεραιότητα των αιμοπεταλίων, διεξήχθη μια πιλοτική μελέτη στις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες [217]. Μελετήθηκαν δείγματα από συμβατικά αιμοπετάλια, από UVC, UVB επεξεργασμένα αιμοπετάλια και από αιμοπετάλια επεξεργασμένα με γάμα ακτινοβολία, μία μέρα μετά την επεξεργασία. Οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες σημάνθηκαν με διαφορετικές χρωστικές και διαχωρίστηκαν ανάλογα το βάρος τους και το μέγεθός του. Η ποσοτική πρωτεομική ανάλυση κατέδειξε ότι η UVC ακτινοβολία παρουσιάζει λιγότερη επίδραση των πρωτεώμα των αιμοπεταλίων σε σχέση με την UVB και γάμα ακτινοβολία. Η ανάλυση επίσης αποκάλυψε ένα κοινό σύνολο 92 πρωτεϊνών (από τις 793) που επηρεαστήκαν και από τα τρία είδη ακτινοβολίας, με την γάμα ακτινοβολία να “ενοχοποιείται” για τις περισσότερες αλλοιώσεις (45 σημεία), στη συνέχεια η UVB ακτινοβολία (11 σημεία) και τελευταία η UVC ακτινοβολία (2 σημεία). Περαιτέρω πρωτεωμικές μελέτες αιμοπεταλίων είναι σε εξέλιξη και εστιάζουν επιπλέον στις μεμβρανικές πρωτεΐνες αλλά και στην παρακολούθηση των αλλαγών που συμβαίνουν στα αιμοπετάλια επεξεργασμένα με UVC και γάμα ακτινοβολία κατά την διάρκεια της αποθήκευσης

Συμπερασματικά, η UCV ακτινοβολία είναι μια τεχνική που βρίσκεται υπό μελέτη ακόμα, ωστόσο φαίνεται ότι αδρανοποιεί ένα εύρος βακτηρίων, με εξαίρεση τον *Bacillus Cereus*, όπως επίσης κι ένα εύρος ιών, με εξαίρεση τον HIV. Προκαταρκτικές έρευνες με θετικά αποτελέσματα έχουν γίνει και για τα πρωτόζωα, ενώ, όσον αφορά τα υπολειπόμενα λευκοκύτταρα, *in vitro* πειράματα δείχνουν αποτελεσματική αδρανοποίηση. Τέλος, η ποιότητα των πρωτεϊνών του πλάσματος και των αιμοπεταλίων φαίνεται ότι επηρεάζονται σε μέτριο βαθμό και τα αιμοπετάλια χαρακτηρίζονται από ελαφρώς αυξημένη μεταβολική δραστηριότητα.

2.2.2.4 γ-ακτινοβολία

Σχετικά με την εφαρμογή γ-ακτινοβολίας, δόση κάτω από 50 Gy δεν φαίνεται να προκαλεί σημαντικές κλινικές αλλαγές στην λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων (*Patrone et al., 1979, Haidenberger et al., 2003*).

2.2.3 Ερυθρά αιμοσφαίρια/ολικό αίμα

Η αδρανοποίηση/απομάκρυνση ουσιών από τα ερυθρά αιμοσφαίρια και το ολικό αίμα αποτελεί μια ακόμα πρόκληση, αφού για την εφαρμογή τους είναι απαραίτητο να εκπληρώνονται ειδικά κριτήρια. Η λευκαφαίρεση χρησιμοποιείται ως τρέχουσα μέθοδος απομάκρυνσης και η χρήση ακτινοβολίας-γ για την προστασία από την TA-GVHD, ενώ βρίσκονται σε ερευνητικό στάδιο μέθοδοι που χρησιμοποιούν ακτινοβολία ως μέσο ενεργοποίησης, αφού πρέπει να προσαρμόζουν το μήκος κύματος σε περιοχή, ώστε να μην απορροφάτε από την αιμοσφαιρίνη αλλά ούτε και να σκεδάζεται. Επιπλέον, σε κάθε περίπτωση, μια μέθοδος πρέπει να μην προκαλεί αιμόλυση, ανάπτυξη νέο αντιγόνων αλλά και να μην επηρεάζεται η επιβίωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Μέχρι στιγμής έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα προϊόντα αλλά κανένα από αυτά δεν πληρεί τις προϋποθέσεις, λόγω προβλημάτων που παρουσιάζονται στις κλινικές δοκιμές.

2.2.3.1 Λευκαφαίρεση

Η παρουσία λευκοκυττάρων στις μονάδες συμπυκνωμένων ερυθρών και αιμοπεταλίων έχει ενοχοποιηθεί για διάφορες άμεσες και απώτερες παρενέργειες αλλά και για μεταφορά ενδοκυτταρικών λοιμωδών παραγόντων, για παράδειγμα η *Y. Enterocolitica* είναι ένα βακτήριο που προκαλεί ασυμπτωματική βακτηριαιμία ή και μόλυνση του δότη και έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε χαμηλές θερμοκρασίες και σε περιβάλλον πλούσιο σε σίδηρο. Ως εκ τούτου το καθιστούν ως το πιο κοινό βακτηρίδιο που προκαλεί σοβαρές βακτηριακές λοιμώξεις που σχετίζονται με την μετάγγιση ερυθρών αιμοσφαιρίων [141]. Έχει αποδειχθεί ότι η απομάκρυνση των λευκών αιμοσφαιρίων από τα προϊόντα αίματος ελαχιστοποιεί κινδύνους που σχετίζονται περιπτώσεις μολύνσεων και μετάδοσης

παθογόνων. Σήμερα, η *λευκαφαίρεση* αποτελεί μια αποτελεσματική μέθοδο για την μείωση του κινδύνου μεταφοράς ενδοκυτταρικών ιών που μεταδίδονται με τα λευκά συμπεριλαμβανομένων των ιών CMV, ν CJD, HTLV I/II, EBV, αλλά και για ανάπτυξη μη αιμολυτικών πυρετικών αντιδράσεων, HLA-αλλοανοσοποίησης και θνητότητας GVHD, TRALI καθώς και οργανικής δυσλειτουργίας στους καρδιοχειρουργικούς ασθενείς [19]. Σημειώνεται βέβαια ότι η λευκαφαίρεση δεν εμποδίζει την βακτηριακή ανάπτυξη αλλά παρολα αυτά μπορεί να μειώσει τα επίπεδα την μόλυνσης σε ορισμένους μικροοργανισμούς.

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ο επιπολασμός του μετά-μετάγγιση CMV χωρίς την χρήση κάποιας τεχνολογίας απομάκρυνσης, αναμένεται να είναι πάνω από 30% ανά ασθενή ανάλογα με την συχνότητα μετάγγισης συστατικών αλλογενούς αίματος [128]. Η μέθοδος αυτή είναι σημαντική για ασθενείς που ανήκουν στην κατηγορία υψηλού κινδύνου όπως οι ογκολογικοί ασθενείς, άτομα που υποβάλλονται σε μεταμόσχευση μυελού των οστών, λιποβαρή νεογνά και ιδιαίτερα τα ανοσοκατασταλμένα άτομα. Έχει αποδειχθεί ότι η χρήση ορο-αρνητικών CMV προϊόντων μετάγγισης σε αυτούς τους ασθενείς μειώνει τον κίνδυνο μόλυνσης μετά μετάγγισης από CMV περίπου κατά 1,3% [129]. Με την πάροδο των ετών, υπήρξε ένας μεγάλος αριθμός μελετών που εξέταζαν τρόπους για την αποτροπή του σχετιζόμενου με μετάγγιση CMV. Η ερμηνεία πολλών από αυτές ήταν δύσκολη αφού δεν ήταν τυχαιοποιημένες, δεν χρησιμοποιούσαν ομάδα ελέγχου ή ήταν αναδρομικές, ωστόσο η ασφάλεια από το CMV μπορεί να επιτευχθεί με την προ-αποθήκευση λευκαφαίρεση.

Πρόσφατες επίσης έρευνες παρέχουν ισχυρά στοιχεία ότι ο Human Herpes Virus (HHV-8) μπορεί να μεταδοθεί με αλλογενή μετάγγιση, ιδιαίτερα σε γεωγραφικές περιοχές με υψηλό επιπολασμό. Με βάση τα στοιχεία για τον CMV είναι πιθανό ότι η προ-αποθήκευση λευκαφαίρεση μπορεί να εμποδίσει την μετάδοση του HHV-8. Σχετικά με άλλους ιούς όπως ο Epstein-Barr και ο HTLV δεν υπάρχουν τεκμηριωμένες μελέτες που να παρουσιάζουν παρόμοια αποτελεσματικότητα απομάκρυνσης ιών με λευκαφαίρεση όμοια με τον CMV. Μερικές πειραματικές μελέτες *in vitro* δείχνουν σημαντική μείωση του HTLV-I από παράγωγα αίματος με προ-αποθήκευση λευκαφαίρεση, όμως η πρόληψη της κλινικής μόλυνσης από HTLV-I με τη μέθοδο αυτή δεν έχει αποδειχθεί ακόμα [130]. Εντούτοις είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η μέθοδος της λευκαφαίρεσης παρέχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην μετάγγιση προϊόντων αίματος.

2.2.3.2 γ-ακτινοβολία

Αναφορικά με τη χρήση *γ-ακτινοβολίας*, η ανάκτηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων μετά από 24 ώρες από την ακτινοβόληση, μετά την αποθήκευση, φαίνεται να είναι χαμηλότερη σε σχέση με τα ερυθρά αιμοσφαίρια ελέγχου. Δημοσιευμένα δεδομένα από διάφορα εργαστήρια παρουσιάζουν ότι τα επεξεργασμένα με ακτινοβολία-γ ερυθροκύτταρα, μέσα σε 24ώρες από την συλλογή, διατηρούν ικανοποιητική βιωσιμότητα μέχρι και 28 μέρες σε αντίθεση με τα ερυθροκύτταρα που αποθηκεύονται για 42 μέρες [231]. Άλλα στοιχεία υποστηρίζουν ότι τα ερυθρά που επεξεργάζονται μέσα σε 24 ώρες από τη

συλλογή τους μπορούν να αποθηκευτούν ικανοποιητικά έως 35 ημέρες, ενώ τα ερυθρά που επεξεργάζονται μέχρι και 14 μέρες μετά τη συλλογή μπορούν να αποθηκευτούν ικανοποιητικά για ακόμα 28 ημέρες. Ωστόσο, επεξεργασμένες μονάδες ερυθρών φαίνεται να περιέχουν διπλάσια ποσότητα εξωκυτταρικού καλίου μετά από ισοδύναμες περιόδους αποθήκευσης συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου [232-234], ενώ αυξάνεται το ποσοστό διαρροής ιόντων καλίου κατά την αποθήκευση. Τέλος, τα επεξεργασμένα ερυθρά φαίνεται να περιέχουν υψηλότερα επίπεδα ελεύθερης αιμοσφαιρίνης –έως και 50%- σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου σε ισοδύναμο χρόνο αποθήκευσης (323,234).

2.2.3.3 Μέθοδοι σε εξέλιξη

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο, το S-303 ανήκει στην κατηγορία των FRALE και είναι ένα μόριο που αδρανοποιεί μεγάλο φάσμα ιών, βακτηρίων και πρωτόζωων χωρίς να έχουν περιγραφεί περιπτώσεις τοξικότητας. Οι βλάβες των ερυθρών κατά την αποθήκευση φαίνεται να είναι συγκρίσιμες με των ερυθρών ελέγχου όπως προκύπτει από μετρήσεις του καλίου, ATP, ελεύθερης αιμοσφαιρίνης, 2,3 DPG, γλυκόζης και γαλακτικού οξέος. Στις κλινικές δοκιμές φάσης III σε τυχαίοποιημένη ελεγχόμενη μελέτη στην οποία συμμετείχαν ασθενείς με χρόνια αναιμία παρατηρήθηκε η ανάπτυξη χαμηλών τίτλων αντισωμάτων έναντι της ομάδας της ακριδίνης με αποτέλεσμα την εμφάνιση θετικής διασταυρούμενης αντίδρασης *in vitro*. Παρ όλα αυτά αυτή η φάση III και μια παράλληλη μελέτη με καρδιοχειρουργικούς ασθενείς έληξε πρόωρα για τον ίδιο λόγο. Στη συνέχεια δημιουργήθηκε το τροποποιημένο S-303 δεύτερη γενιάς με προσθήκη γλουταθειόνης, ώστε να μειωθεί η ποσότητα του προσκολλάται στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων και διεξήχθη νέα μελέτη φάσης I στην οποία συμμετείχαν 26 υγιείς εθελοντές που μεταγγίστηκαν με ερυθρά επεξεργασμένα με S-303. Το S-303 δεύτερης γενιάς δεν προκάλεσε σχηματισμό αντισωμάτων. Η ανάκτηση μετά από 24 ώρες την 35^η μέρα ήταν εξαιρετική με μέσο όρο 88%±8,5% και παρουσίασε ισοδυναμία με τα συμβατικά ερυθροκύτταρα (90%±6,9%). Ωστόσο, ο μέσος όρος διάρκειας ζωής ήταν σημαντικά μειωμένος (32,8 έναντι 39,5 των συμβατικών ερυθροκυττάρων), ενώ *in vitro* αξιολόγηση μετά από 35 μέρες αποθήκευσης έδειξε ισοδυναμία στην αιμόλυση, στο εξωκυτταρικό κάλιο, στη μέση περιεκτικότητα σε αιμοσφαιρίνη ,στον μέσο όγκο ερυθρών καθώς και στη σταδιακή απώλεια αιμοσφαιρίνης.

Όσον αφορά την αδρανοποίηση παθογόνων με το S-303 δεύτερης γενιάς, μονάδες ερυθρών αιμοσφαιρίων μολύνθηκαν με επιλεγμένους παθογόνους μικροοργανισμούς και μελετήθηκε ο τίτλος του πριν και μετά την επεξεργασία. Τα είδη βακτηρίων που επιλέχθηκαν για την μελέτη ήταν οι *staphylococcus aureus*, επειδή είναι ένα αντιπροσωπευτικό gram (+) βακτήριο και φαίνεται ότι μολύνει μονάδες ερυθρών αιμοσφαιρίων κατά τη διάρκεια της αιμοληψίας, η *Yersinia enterocolitica*, *Serratia marcescens* και *E. Coli* τα οποία είναι επίσης αντιπροσωπευτικά gram (-) βακτηρίδια. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε ο HIV, αφού αποτελεί έναν αντιπροσωπευτικό RNA ιό με περίβλημα . Πρόσφατες μελέτες έδειξαν μείωση πάνω από 4 λογάριθμους για τον ιό XMRV που σχετίζεται με το σύνδρομο χρόνιας κόπωσης και καρκίνου του προστάτη [137]. Συνεχίζοντας, οι bluetongue virus και human

adenovirus type 5 επιλέχθηκαν ως πρότυπα RNA και DNA ιών αντίστοιχα, ενώ ο BVDV είναι ένας ιός πρότυπο για την ηπατίτιδα C και άλλων φλαβιϊών όπως ο West Nile Virus και ο Dengue virus (πίνακας 20).

Σήμερα, ετοιμάζεται να λάβει χώρα μια ανανεωμένη μεσαίου μεγέθους κλινική δοκιμή φάσης III στην Ευρωπαϊκή Ένωση στην οποία θα συμμετέχουν πάνω από 100 ασθενείς που έχουν προγραμματισμένη καρδιοχειρουργική επέμβαση με οξεία απώλεια αίματος και ασθενείς με θαλασσαιμία με χρόνιες απαιτήσεις μετάγγισης. Η κλινική αυτή μελέτη εστιάζει στην περιεκτικότητα της αιμοσφαιρίνης αλλά και στην ενδεχόμενη εμφάνιση ανοσογονικότητας με επανειλημμένη έκθεση.

Η μέθοδος αδρανοποίησης παθογόνων με ριβοφλαβίνη έχει αξιολογηθεί επιτυχώς για το πλάσμα και τα αιμοπετάλια. Σήμερα αναπτύσσεται για την εφαρμογή της στο ολικό αίμα/ερυθρά αιμοσφαίρια. Αν και δεν έχουν γίνει ακόμα εκτενείς έρευνες η αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας με ριβοφλαβίνη έχει αξιολογηθεί με ελέγχους αδρανοποίησης παθογόνων μικροοργανισμών και λευκοκυττάρων. Αξιολογήθηκε η αδρανοποίηση ιών με περίβλημα (vesicular stomatitis virus, infectious bovine rhinotracheitis virus) και ιών χωρίς περίβλημα (blue tongue virus, HAV, canine parvovirus). Όλοι οι ιοί παρουσιάζουν αδρανοποίηση που κυμαίνεται από 1,2 log/ml για την HAV έως 4,5 log/ml για τον vesicular stomatitis virus [139]. Η επεξεργασία ήταν 100% αποτελεσματική ενάντια στα βακτήρια που συνήθως βρίσκονται στις μονάδες των ερυθρών αιμοσφαιρίων (*S. Liquefaciens* και *Y. enterocolitica*) (πίνακας 22).

Όπως φάνηκε από μελέτη σε μπαμπούνους, η ριβοφλαβίνη δεν προκαλεί χημική τροποποίηση στην επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Σε μια έρευνα που διεξήχθη στην Αμερική τα ερυθροκύτταρα επεξεργάστηκαν με ριβοφλαβίνη με σταδιακή αυξανόμενη δόση UV ακτινοβολίας (22,33,44 J/ml), το αποτέλεσμα έδειξε υψηλή διακύμανση στην ανάκτηση και την ημιζωή των ερυθρών αιμοσφαιρίων την 42^η μέρα αποθήκευσης [138]. Πέντε από τα έντεκα άτομα συνάντησαν τα κριτήρια που όριζε ο FDA για την επιτυχή επεξεργασία. Ο ρυθμός της αιμόλυσης την 42^η μέρα ήταν μεταξύ 1,0-1,5% και η οσμωτική ευθραυστότητα αυξήθηκε από 0,8-4,1% εξαρτώμενη από την UV ακτινοβολία που είχε επιλεγεί [138].

Ιοί με περίβλημα	S-303	Ριβοφλαβίνη
HIV-1, cell-associated	> 6.2	4.5
HIV-1, cell free	>6.5	
HBV	>6.3	*σε εξέλιξη
HCV		*σε εξέλιξη
HTLV-I		
HTLV-II		
CMV, cell free		
CMV, cell associated		*σε εξέλιξη
BVDV	>4.8	
WNV		

Herpes simplex virus	>6.0	
Vesicular stomatitis virus	5.7	>4.5
Chikungunya		
Influenza A virus		
SARS-CoV		
Dengue-virus		
Ιοί χωρίς περίβλημα		
HAV		1.7
Parvo B19		4.0
Bluetongue virus	>6.0	1.5
Adenovirus type 5	>7.4	
Gram (-) βακτήρια		
<i>Escherichia coli</i>	7.4	
<i>Enterobacter cloacae</i>		
<i>Klebsiella pneumonia</i>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4.5	
<i>Salmonella choleraesuis</i>	4.8	
<i>Serratia marsescens</i>	4.1	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	7.4	
Βακτηρίδια gram (+)		
<i>Bacillus cereus</i> (incl. spores)		
<i>Bacillus subtilis</i> (vegetative)	>6.3	
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>		
<i>Clostridium perfringens</i> (vegetative)		
<i>Corynebacterium minutissimum</i>		
<i>Listeria monocytogenes</i>	>7.1	
<i>Propionobacterium acnes</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i>	>5.1	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	>6.9	
<i>Streptococcus pyogenes</i>		
Παράσιτα		
<i>Babesia microti</i>	>5.5	>5.0
<i>Babesia divergens</i>		>7.2
<i>Plasmodium falciparum</i>	>6.8	>6.4
<i>Trypanozoma cruzi</i>	>5.4	>3.5
<i>Leishmania major</i>		2.3

Πίνακας 22: Αποτελεσματικότητα αδρανοποίησης παθογόνων μικροοργανισμών στα ερυθρά αιμοσφαίρια και το ολικό αίμα με την χρήση του S-303 και της ριβοφλαβίνης.

Το 2008 ξεκίνησε η μελέτη IMPROVE I η οποία αξιολογούσε την ανάκτηση και την επιβίωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων έπειτα από επεξεργασία με ριβοφλαβίνη και ακτινοβολία. Έγινε ραδιοσήμανση των ερυθροκυττάρων και έπειτα αυτόλογη έγχυση για να αξιολογηθεί η κυκλοφορία των ερυθροκυττάρων in vivo. Με την μέτρηση των επιπέδων των ραδιο-ισοτόπων αξιολογείται το ποσοστό των ερυθροκυττάρων που παραμένουν στην κυκλοφορία του αίματος μετά από 24 ώρες καθώς και η διάρκεια παραμονής (επιβίωση). Η μελέτη ολοκληρώθηκε το 2010. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε και ολοκληρώθηκε στην Αμερική η IMPROVE II μια τυχαίοποιημένη ελεγχόμενη η οποία αξιολογούσε την ανάκτηση και επιβίωση των ραδιοσημασμένων ερυθροκυττάρων που προέρχονται από ολικό αίμα επεξεργασμένο με ριβοφλαβίνη, και στη συνέχεια αποθηκεύονται ως λευκαφαιρεμένα και χορηγούνται σε υγιείς ενήλικες. Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει μια πρόσθετη μελέτη που έλαβε χώρα στην Γκάνα το 2014 με περισσότερους από 200 ασθενείς ώστε να αξιολογηθεί κλινική αποτελεσματικότητα του ολικού αίματος επεξεργασμένου με ριβοφλαβίνη στην πρόληψη της Ελονοσίας [140].

2.2.3.4 Μέθοδοι που διεκόπησαν σε αρχικά στάδια

Το *PEN 110* είναι μια χημική ένωση ινακτίνης, χαμηλού μοριακού βάρους, διαλύεται γρήγορα και είναι θετικά φορτισμένο ολιγομερές της αιθυλεναμίνης με υψηλή εκλεκτικότητα για τα νουκλεϊκά οξέα και τις βάσεις γουανίνης. Ενώνεται με τις φωσφορικές ρίζες, ενεργοποιείται και το ενεργό μόριο ενώνεται ομοιοπολικά με την N-7 θέση της γουανίνης, περαιτέρω αλκάλωση οδηγεί σε σπάσιμο της αλυσίδας και διακοπή της αντιγραφής και της μεταγραφής. Πριν από την προσθήκη του PEN110 τα ερυθροκύτταρα έχουν υποστεί λευκαφαίρεση. Το PEN110 αδρανοποιεί ένα ευρύ φάσμα παθογόνων συμπεριλαμβανομένων των ιών, βακτηρίων, πρωτόζωων και μυκοπλασμάτων [131]. Μετά την επεξεργασία, οι ιοί με περίβλημα όπως ο HIV, καθώς και ο ενδοκυτταρικός HIV μειώνονται κατά 4-5 λογάριθμους, επιπλέον αδρανοποιεί ορισμένους ιούς χωρίς περίβλημα συμπεριλαμβανομένου του porcine parvovirus. Σημειώνεται επίσης ότι κατά την διάρκεια αποθήκευσης 42 ημερών δεν εμφανίστηκε βακτηριακή ανάπτυξη των gram (-) βακτηρίων *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas fluorescens* και *P. Putida* καθώς και του gram (+) βακτηρίου *Staphylococcus epidermidis* [131]. Κατά την χρήση του, η μεμβράνη των ερυθρών φαίνεται να διατηρεί την ακεραιότητα της και η αιμόλυση ήταν λιγότερο από 1% μετά από 42 μέρες αποθήκευσης στους 4°C. Σε μια τυχαίοποιημένη διασταυρωμένη κλινική μελέτη, στην φάση I, επεξεργασμένα και συμβατικά ερυθρά αιμοσφαίρια μεταγγίστηκαν σε 12 υγιείς ασθενείς μετά από 28 μέρες αποθήκευσης [132]. Η ανάκτηση των ερυθροκυττάρων ήταν συγκρίσιμη και για τις δύο ομάδες. Δεν εντοπίστηκαν αλλαγές στα αντιγόνα επιφάνειας και δε δημιουργήθηκαν νέο-αντιγόνα. Ωστόσο, στην φάση III των κλινικών δοκιμών αναπτύχθηκαν αντισώματα σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία με αποτέλεσμα η έρευνα να σταματήσει.

Μια ακόμα χρωστική φαινοθειαζίνης παρόμοια με το MB χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των ερυθρών αιμοσφαιρίων [133,134]. Το *Dimethylmethlene Blue* (DMMB) είναι πιο υδρόφοβη και με μεγαλύτερη συγγένεια για τα νουκλεϊκά οξέα σε σχέση με το MB. Σε συνδυασμό με το ορατό φως φαίνεται να αδρανοποιεί DNA και RNA ιούς σε λευκοκύτταρα και ερυθρά αιμοσφαίρια. Μελέτες έδειξαν μικρή μείωση της τριφωσφορικής αδενοσίνης και των επιπέδων του 2,3 DPG μετά-μετάγγιση, ωστόσο το ποσοστό της αιμόλυσης ήταν > 1% και σε μερικές φορές έφτανε και το 40%. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι η σύνθεση του -μετά την επεξεργασία- προσθετικού διαλύματος έχει μεγάλη επίδραση στην ακεραιότητα των ερυθρών αιμοσφαιρίων μετά την φωτοχημική επεξεργασία.

Στην συνέχεια, έγιναν δοκιμές με τις εύκαμπτες φωτοευαίσθητες χρωστικές. Θεωρητικά, αυτές οι χρωστικές διεισδύουν στις ιικές μεμβράνες και παρεμβάλλονται στο DNA και RNA των ιών, ενώ δεν επηρεάζουν τα απύρνα ερυθρά. Στην πράξη, συνδέονται με τις μεμβράνες των ερυθρών αιμοσφαιρίων, τα λιπίδια, τις γλυκοπρωτεΐνες και τις πρωτεΐνες. Οι προσδεμένες χρωστικές μαζί με τις ελεύθερες στο διάλυμα μπορούν να προκαλέσουν παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου και βλάβη στην μεμβράνη των ερυθροκυττάρων κατά τη διάρκεια της φωτοθεραπείας. Οι περισσότερες

φωτοευαίσθητες χρωστικές είναι άκαμπτες και περιέχουν ένα αρωματικό δακτύλιο που απελευθερώνει ρίζες οξυγόνου κατά την φωτοθεραπεία, ανεξάρτητα από το αν είναι συνδεδεμένες σε κάποιο υπόστρωμα ή είναι ελεύθερες στο διάλυμα. Μια νέα ομάδα τέτοιων χρωστικών περιέχουν ένα αρωματικό δακτύλιο συνδεδεμένο με απλό δεσμό που μπορεί να περιστρέφεται. Όταν είναι ελεύθερες μετατρέπουν την ενέργεια του φωτός σε κίνηση και δεν προκαλείται παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου. Αντίθετα, όταν είναι συνδεδεμένες γίνονται άκαμπτες και παράγουν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου.

Το *Thiopyrylium (TP)* είναι μια χρωστική που ενεργοποιείται σε κατάσταση δέσμησης [135]. Παρόλο που το TP έχει ισχυρή συγγένεια με την ερυθροκυτταρική μεμβράνη, χρησιμοποιείται ένα χημικό πρόσθετο, η διπυριδαμόλη, με παρόμοια δομή ως αναστολέας και περιορίζει την προσκόλληση του TP στα ερυθρά, αλλά και ως αντιοξειδωτικός παράγοντας ελαττώνει την φωτοχημική βλάβη των ερυθρών. Ο συνδυασμός αυτός φαίνεται να αδρανοποιεί τον ενδοκυτταρικό HIV κατά 6.2 log και αρκετά gram αρνητικά και θετικά βακτηρίδια από 5,4-7,1 log. Τα επεξεργασμένα ερυθροκύτταρα παρουσιάζουν αποδεκτά επίπεδα εξωκυτταρικού pH, παραγωγής γαλακτικού οξέος, γλυκόζης, τριφωσφορικής αδενοσίνης, και μορφολογίας μετά από 42 μέρες. Ωστόσο, τα επίπεδα του καλίου ήταν αυξημένα σε σχέση με τα ερυθρά ελέγχου [135].

Το *thiazole orange (TO)* είναι μια άλλη χρωστική της κυανίνης, ασύμμετρο μόριο, το οποίο είναι φωτοενεργό μόνο σε κατάσταση σύνδεσης. Επειδή μόνο το 21% περίπου δεσμεύεται στα ερυθροκύτταρα δεν είναι απαραίτητη η χρήση αναστολέα. Αδρανοποιεί ενδοκυττάρους και εξωκυττάρους ιούς με περίβλημα, βακτήρια, το τρυπανόσωμα cruzi και την λεισμάνια. Μετά από 42 μέρες αποθήκευσης τα επεξεργασμένα ερυθρά παρουσίασαν αποδεκτά επίπεδα ATP σε σύγκριση με τα μη επεξεργασμένα ερυθρά αλλά παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση της αιμόλυσης (0,77%) και του καλίου [136]. Μέχρι σήμερα, έχουν δημοσιευτεί μελέτες και για τις δύο χρωστικές που έχουν γίνει σε μικρά δείγματα ερυθρών αιμοσφαιρίων. Είναι απαραίτητο όμως να διευρυνθεί το φάσμα των ιών που αδρανοποιούνται, συμπεριλαμβανομένων πιο ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών. Ωστόσο οι εύκαμπτες φωτοευαίσθητες χρωστικές είναι πολλά υποσχόμενες.

Ο πίνακας που ακολουθεί παραθέτει συνοπτικά τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και τους λόγους που σταμάτησαν οι κλινικές δοκιμές.

Όνομα ουσίας	Προέλευση	Λόγος διακοπής	Βιβλιογραφία
PEN110	Χημική ένωση ινακτίνης	Ανάπτυξη αντισωμάτων σε ασθενείς στην κλινική φάση III	132
Dimethylmethlene blue (DMMB)	Χρωστική φαινοθειαζίνης	Αυξημένο ποσοστό αιμόλυσης (>1% έως 40%)	133
Thiopyrilium (TP)	Εύκαπτη φωτοευαίσθητη χρωστική	Αυξημένα επίπεδα καλίου	135
Thiazole Orange (TO)	Χρωστική κυανίνης	Αύξηση αιμόλυσης (0,77%) και καλίου	136
S-303	FRALE	Ανάπτυξη χαμηλών τίτλων αντισωμάτων έναντι της ομάδας της ακριδίνης.	137

Πίνακας 23: Μέθοδοι που ερευνήθηκαν για την αδρανοποίηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και λόγοι διακοπής των κλινικών δοκιμών.

Συμπερασματικά, σε χρήση βρίσκονται μέχρι στιγμής η λευκαφαίρεση, ως μέθοδος απομάκρυνσης και η γ-ακτινοβολία για την προστασία έναντι του TA-GVHD. Έχουν γίνει κατά καιρούς μελέτες πάνω σε ουσίες για την αδρανοποίηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και του ολικού αίματος. Ωστόσο όλες σταμάτησαν λόγω επιπλοκών που προέκυψαν κατά την διάρκεια των κλινικών μελετών.

2.3 Ασφάλεια σε σταθερά παράγωγα αίματος.

Η Εφαρμογή ενός πλαισίου κανονισμών για τη συλλογή πλάσματος, η ορθή κατασκευαστική πρακτική (GMP), οι ιογενείς επικυρώσεις και η διαμόρφωση ενός επαγγελματικού περιβάλλοντος εργασίας παρέχουν μια μεγάλη ασφάλεια, όσον αφορά τα παράγωγα του αίματος που επεξεργάζονται σε βιομηχανικό επίπεδο.

2.3.1 Παστερίωση

Όσον αφορά την παστερίωση, σε μια μελέτη στην οποία συμμετείχαν 12 ασθενείς με ανεπάρκεια ινωδογόνου, αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα και ανεκτικότητα της χορήγησης παστεριωμένου ινωδογόνου. Όλες οι εγχύσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν καλά ανεκτές, εκτός από έναν ασθενή ο οποίος κατά την 56η έγχυση ανέπτυξε αναφυλακτική αντίδραση. Επιπλέον, ένας ακόμα ασθενής ανέπτυξε εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση και μη-θανατηφόρα πνευμονική εμβολή, κατά την θεραπεία για οστεοσύνθεση, μετά από κάταγμα στον αυχένα. Η χορήγηση του ινωδογόνου δεν θα μπορούσε να αποκλεισθεί ως παράγοντας που συνείσφερε στην περίπτωση αυτού του ασθενή υψηλού κινδύνου [142]. Τέλος, η αλβουμίνη που έχει επεξεργαστεί με τη μέθοδο της παστερίωσης παρουσιάζει καλή ανεκτικότητα. Ωστόσο, δύναται να προκύψουν άμεσες αλλεργικές αντιδράσεις κατά τη χορήγησή της όπως πυρετός, ρίγη, ναυτία, εμετός, αυξημένη σιελορροια, ουρτικάρια, υπόταση καθώς και επιπτώσεις στην αναπνοή και στον καρδιακό ρυθμό [143].

2.3.2 Ξηρή Θερμότητα (Dry Heat)

Στην μελέτη των Kim, In Seop και συν, για την επεξεργασία με ξηρή θερμότητα εμφανίστηκαν σημεία τοξικότητας και οι πυρετογόνες ουσίες παρέμειναν αμετάβλητες. Τέλος, ο επεξεργασμένος FVIII ήταν σταθερός για 24 μήνες στους 4°C [144].

2.3.3 Solvent/Detergent

Όσον αφορά την επεξεργασία με την μέθοδο Solvent/Detergent, Η Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία ανέφερε ότι το υπολειμματικό ποσό του S/D που υπάρχει στο πλάσμα δεν ξεπερνάει τα 2μg/ml για το TNBP και τα 5 μg/ml για το Triton X-100. Σημειώνεται ότι αυτές οι τιμές είναι αρκετά μακριά από τα επίπεδα τοξικότητας [145]. Περαιτέρω τεκμηρίωση της ασφάλειας του επεξεργασμένου με S/D πλάσματος αποδεικνύεται από τη μεταγγιση περίπου δέκα εκατομμυρίων μονάδων πλάσματος χωρίς να έχει αναφερθεί περίπτωση τοξικότητας ούτε σχηματισμός νέο-αντιγόνων.

Η κλινική εμπειρία από τη χρήση του S/D πλάσματος τεκμηρίωσε την ασφάλεια του προϊόντος. Στη Γαλλία έχουν μεταγγιστεί πάνω από 1,9 εκατομμύρια μονάδες επεξεργασμένου πλάσματος από το 1994, στην Νορβηγία πάνω από 660.000 χιλιάδες μονάδες από το 1993 και στην Φινλανδία πάνω από 150.000 μονάδες από το 2005. Σύμφωνα με αυτά, παρατηρείται ότι όλες οι ομάδες των ασθενών που μεταγγίστηκαν συμπεριλαμβανομένων των πρόωρων νεογνών και των ασθενών με μεταμόσχευση ήπατος μπορούν να μεταγγιστούν ασφαλώς με το S/D πλάσμα. Παρόμοια εμπειρία αναφέρει και η Ιρλανδία όπου χορήγησαν περίπου 200.000 μονάδες Octaplas μετά το 2002, με εξαίρεση κάποια αιμορραγικά επεισόδια σε μεταμόσχευση ήπατος [146,147]. Αυτά τα αιμορραγικά επεισόδια θα μπορούσαν να αποδοθούν στην ανάκτηση αμερικανικών μονάδων πλάσματος που χρησιμοποιούνταν για την παραγωγή παρτίδων πλάσματος Octaplas [148].

Στο πανεπιστημιακό νοσοκομείο του Όσλο έχουν πραγματοποιηθεί περισσότερες από 700 μεταμοσχεύσεις ήπατος με καλά αποτελέσματα. Δεν έχουν αναφερθεί περιστατικά θρομβοεμβολικών επεισοδίων που να αποδίδονται στη χρήση του επεξεργασμένου πλάσματος. Εξαιτίας της χαμηλής περιεκτικότητας σε αναστολέα πλασμίνης στο Octaplas χρησιμοποιούνταν συχνά η απροτινίνη σε περιπτώσεις σοβαρής ηπατικής ανεπάρκειας περιπλέκοντας έτσι επαναλαμβανόμενες καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις [149]. Σήμερα η απροτινίνη έχει αντικατασταθεί με το τρανεξαμικό οξύ σε καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις και μεταμοσχεύσεις ήπατος, εκτός από λίγες εξαιρέσεις μεταμοσχευμένων ασθενών που απαιτούν ένα ευρύ φάσμα αναστολέα πρωτεάσης της σερίνης [150]. Την περίοδο 2005-2009 μελετήθηκαν 250 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε μεταμόσχευση ήπατος. Δεν αναφέρθηκε κανένα επεισόδιο TRALI ή άλλων σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών, ενώ οι περιπτώσεις ινοδύλωσης αντιμετωπίζονται με χορήγηση τρανεξαμικού οξέος και δεν θεωρούνταν κλινικά σημαντικό πρόβλημα.

Έχουν πραγματοποιηθεί 18 μελέτες και αναδρομικές αναλύσεις που καλύπτουν όλες τις ενδείξεις για το πλάσμα, αποδεικνύοντας την εξαιρετική κλινική αποτελεσματικότητα και ανοχή του Octaplas και ενώ δεν έχουν στατιστική ισχύ για την ανίχνευση μικρών διαφορών, δείχνουν ότι η απώλεια των παραγόντων πήξης και των αναστολέων δεν οδηγούν σε μείωση της αποτελεσματικότητας και ασφάλειας. Τα δεδομένα αιμοεπαγρύπνωσης από Γαλλία, Νορβηγία, Αυστρία και Φινλανδία παρουσιάζουν σημαντική μείωση των ανεπιθύμητων ενεργειών της τάξης του 85% (πίνακας 24). Όσον αφορά το TRALI δεν έχουν αναφερθεί περιστατικά που να σχετίζονται με τη μετάγγιση επεξεργασμένου πλάσματος. Στο Ηνωμένο Βασίλειο μετά την εισαγωγή του συστήματος αναφοράς σοβαρών κινδύνων από μετάγγιση μεταγγίστηκαν περισσότερες από 350.000 μονάδες πλάσματος χωρίς να αναφερθούν σοβαρά προβλήματα.

Όσον αφορά το πλάσμα PLAS+SD , το 2002-2003 η παραγωγή σταμάτησε εξαιτίας σοβαρών θρομβοεμβολικών επεισοδίων (εν τω βάθει φλεβικές θρομβώσεις, πνευμονική εμβολή) που προκλήθηκαν σε άτομα που είχαν υποβληθεί σε μεταμόσχευση ήπατος και είχαν λάβει μεγάλη ποσότητα πλάσματος.

Χώρα	Περίοδος	Αριθμός μεταγγίσεων	Αριθμός ανεπιθύμητων ενεργειών	Ποσοστό ανα 100.000
Αυστρία				
FFP	2003-2009	112,600	93	82,6
Octaplas	2003-2009	267,000	12	4,5
Φιλανδία				
FFP	2005-2007	90,372	22	24,3
Octaplas	2007-2011	239,359	14	5,8
Ηνωμένο Βασίλειο				
FFP	2009-2011	902,826	132	14,6
Octaplas	2009-2011	173,664	6	3,5
Νορβηγία				
Octaplas	2004-2011	350,751	6	1,7

Πίνακας 24: Σύγκριση ανεπιθύμητων ενεργειών από μεταγγίσεις μεταξύ FFP και Octaplas πλάσματος όπως αναφέρθηκαν από το σύστημα αιμοεπαγρύπνησης τεσσάρων χωρών.¹¹

2.3.4 Νανοδιήθηση

Η εφαρμογή της νανοδιήθησης πρόσφερε ακόμα μεγαλύτερη ασφάλεια και αποτελεσματικότητα στην αδρανοποίηση των παραγώγων του πλάσματος. Η νανοδιήθηση δεν παρουσιάζει ιδιαίτερα θέματα τοξικότητας σε αντίθεση με άλλες μεθόδους αδρανοποίησης που χρησιμοποιούν τοξικές ή μεταλλαξιγόνες χημικές ουσίες οι οποίες πρέπει να απομακρυνθούν από το διάλυμα πριν τη χρήση. Είναι μια ήπια διαδικασία η οποία λαμβάνει χώρα κάτω από φυσιολογικές συνθήκες pH, θερμοκρασίας, οσμωτικής πίεσης. Για μεγαλύτερη ασφάλεια των παραγόμενων προϊόντων, γίνονται δοκιμές ακεραιότητας των φίλτρων, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι δεν υπάρχει περίπτωση αλλοίωσης του φίλτρου κατά την μεταφορά, την αποθήκευση ή τη χρήση του.

Συμπερασματικά, αναφορικά με την παστερίωση έχουν γίνει μελέτες για την αποτελεσματικότητα και ανεκτικότητα χορήγησης ινοδωγόνου με καλή έκβαση. Στην περίπτωση της μεθόδου Dry Heat οι πυρετογόνες ουσίες παράμεναν. Όσον αφορά την επεξεργασία με S/D δεν έχει αναφερθεί περιστατικό τοξικότητας ούτε σχηματισμός νέο-αντιγόνων. Επιπλέον κατά την χρήση του προϊόντος Octaplas δεν αναφέρθηκαν περιστατικά θρομβοεμβολικών επεισοδίων, σε αντίθεση με το προϊόν PLAS+SD το οποίο αποσύρθηκε λόγω ανάπτυξης σοβαρών θρομβοεμβολικών περιστατικών.

¹¹ Μητρώο αιμοεπαγρύπνησης Αυστραλίας (www.bmfg.gv.at), υπηρεσία αίματος φιλανδικού ερυθρού σταυρού (μη δημοσιευμένα στοιχεία, SHOT Ηνωμένου Βασιλείου (www.shotuk.org/home/), Υπηρεσία αιμοεπαγρύπνησης Νορβηγίας (www.hemovigilance.no))

2.4. Ασφάλεια σε ασταθή παράγωγα αίματος.

Η ασφάλεια που παρέχει μια μέθοδος αδρανοποίησης παθογόνων αξιολογείται από συγκεκριμένες παραμέτρους που προκύπτουν από μελέτες. Κύρια παράμετρος είναι η παρουσία ανεπιθύμητων ενεργειών, οι οποίες μπορεί να είναι άμεσες και να εμφανίζονται τη στιγμή της μετάγγισης παραγώγων αίματος ή απώτερες και να εμφανίζονται μελλοντικά. Επιπλέον σημαντικές παράμετροι είναι η τοξικότητα που μπορεί να εμφανίζει ένα επεξεργασμένο παράγωγο, η δημιουργία νέο-αντιγόνων μετά την λήψη μονάδος αίματος, τα οποία θα αναφερθούν αναλυτικά παρακάτω.

2.4.1 Πλάσμα.

2.4.1.1 Methylene Blue (MB)+ ορατό φώς

Η χρήση της μεθόδου αδρανοποίησης με *Methylene Blue* έχει ποικίλες κριτικές. Τα νεότερα στοιχεία που αναφέρονται στην ασφάλεια του MB πλάσματος υποστηρίζουν ότι είναι ίδια με το συμβατικό πλάσμα. Όταν οι Simonsen και Sorensen πραγματοποίησαν μια διασταυρούμενη τυχαιοποιημένη μελέτη όπου συμμετείχαν 12 υγιείς εθελοντές, οι οποίοι έλαβαν μετάγγιση με αυτόλογο επεξεργασμένο πλάσμα και με συμβατικό πλάσμα, ανέφεραν ότι και οι δύο κατηγορίες πλάσματος δεν σχετίστηκαν με καμιά ανεπιθύμητη ενέργεια ή διαμαρτυρία κατά τη διάρκεια των μεταγγίσεων ή των επισκέψεων παρακολούθησης [152]. Έπειτα από τις αρχικές αναφορές, το επεξεργασμένο με MB πλάσμα είχε ευρεία εφαρμογή στην Ευρώπη όπου περισσότερες από 4,4 εκατομμύρια μονάδες μεταγγίστηκαν τα τελευταία είκοσι χρόνια χωρίς να αναφερθούν ανεπιθύμητες ενέργειες που να σχετίζονται με τη χρήση του και συγκρινόμενο με το συμβατικό πλάσμα.

Σε διάφορες ευρωπαϊκές χώρες στις οποίες γίνεται χρήση του επεξεργασμένου με MB πλάσματος για αρκετό χρονικό διάστημα δεν έχουν παρατηρηθεί αυξημένες αλλεργικές αντιδράσεις. Το διάστημα μεταξύ 1992 και 1995 περίπου 484.000 μονάδες πλάσματος κατασκευάστηκαν με την μέθοδο Springe και διανεμήθηκαν σε νοσοκομεία στην Γερμανία. Περίπου 75 ανεπιθύμητες ενέργειες που σχετίζονται με αλλεργικές αντιδράσεις αναφέρθηκαν για τα συγκεκριμένα προϊόντα ενώ κατά την διάρκεια της ίδιας περιόδου σημειώθηκαν 14 ανεπιθύμητες ενέργειες από 120.000 μονάδες συμβατικού πλάσματος. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες ήταν συγκρίσιμες από ποιοτική και ποσοτική άποψη με αναλογία 1/6.300 για το επεξεργασμένο πλάσμα και περίπου 1/8.500 για το συμβατικό πλάσμα [157].

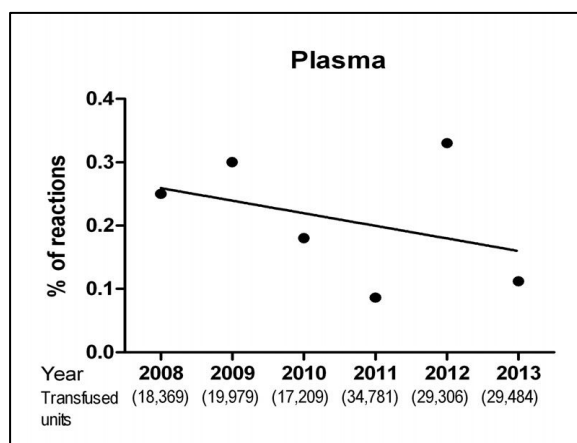
Το 2012 έγινε μια δοκιμή σύγκρισης επεξεργασμένου με MB πλάσματος και συμβατικού πλάσματος στην Αυστρία. Ανάμεσα στο χρονικό διάστημα Ιανουαρίου 2009 και Δεκεμβρίου 2011 μεταγγίστηκαν 11.069 μονάδες επεξεργασμένου πλάσματος και 21.539 μονάδες συμβατικού πλάσματος. Οι συγγραφείς ανέφεραν 1 ανεπιθύμητη ενέργεια ανά 1580 μεταγγίσεις στην περίπτωση του επεξεργασμένου πλάσματος και αντίστοιχα 1 στις 633 στην περίπτωση του συμβατικού. Όλες οι

ανεπιθύμητες ενέργειες που αναφέρθηκαν για το επεξεργασμένο πλάσμα κατηγοριοποιήθηκαν ως αλλεργικές και καμιά από αυτές δεν ήταν σοβαρή [158].

Στον Ηνωμένο Βασίλειο το επεξεργασμένο πλάσμα μεταγγίζεται σε ασθενείς κάτω των 16 ετών και βρέθηκε ότι η αναλογία αναφυλακτικών/σοβαρών αλλεργικών αντιδράσεων για το συμβατικό πλάσμα ήταν 3,4 ανά 100.000 μονάδες, ενώ αντίστοιχα για το επεξεργασμένο πλάσμα το ποσοστό ήταν 2,4 ανά 100.000 μονάδες. Επιπλέον, το συνολικό ποσοστό αντιδράσεων και για τις δύο κατηγορίες πλάσματος ήταν παρόμοιο [159].

Στην περίπτωση της Ισπανίας, περίπου το 60% των FFP υπόκεινται σε επεξεργασία με MB και το 40% είναι συμβατικά. Κατά τη διάρκεια των ετών 2009 έως 2011 μεταγγίστηκαν συνολικά 630.274 μονάδες πλάσματος εκ των οποίων τα 211.266 ήταν συμβατικό πλάσμα και τα 419.008 ήταν επεξεργασμένα με MB (50% με την μέθοδο springe και 50% με το σύστημα Theraflex MB). Το συμβατικό πλάσμα προκάλεσε 1 αλλεργική αντίδραση στις 17.606 ενώ στο επεξεργασμένο πλάσμα 1 στις 20.950. Στην Ελλάδα από το 2007 έως το 2011 η αναφερόμενη εμφάνιση αλλεργικών αντιδράσεων ήταν σημαντικά υψηλότερη στην περίπτωση του συμβατικού πλάσματος (1 στις 6.222) σε σύγκριση με το επεξεργασμένο πλάσμα (1 στις 63.741) [160].

Τέλος, τα δεδομένα αιμοεπαγρύπνησης της Καταλονίας την περίοδο 2008-2013 αποκαλύπτουν ότι οι σοβαρές αλλεργικές αντιδράσεις όχι μόνο δεν αυξήθηκαν αλλά αντιθέτως τείνουν να μειωθούν (εικόνα 11) επισημαίνοντας ότι το συνολικό ποσοστό των αντιδράσεων μειώθηκε από 0,105% των συνολικών μονάδων το 2008 στο ένα τέταρτο το 2013 (0,025%).



Εικόνα 11: Διάγραμμα που απεικονίζει την πτωτική τάση των αλλεργικών αντιδράσεων από μετάγγιση επεξεργασμένου πλάσματος την χρονική περίοδο 2008-2013 (πηγή: Σύστημα αιμοεπαγρύπνησης Καταλονίας).

Κύρια ανεπιθύμητη ενέργεια είναι οι αλλεργικές αντιδράσεις που προκαλούνται μετά από την μετάγγιση πλάσματος επεξεργασμένο με MB. Είναι δύσκολο να γίνει σύγκριση της συχνότητας των αλλεργικών αντιδράσεων που παρουσιάστηκαν σε κάθε χώρα, αφού τα συστήματα αιμοεπαγρύπνησης κάθε κράτους αναφέρονται σε διαφορετικές ηλικιακές ομάδες ασθενών και σε διαφορετικό όγκο μονάδων που χορηγήθηκε σε κάθε περίπτωση. Ωστόσο, μελλοντικά θα ήταν σημαντικό να υπάρξουν πιο

τυποποιημένες διαδικασίες, ώστε να γίνεται εύκολα σύγκριση των δεδομένων των συστημάτων αιμοεπαγρύπνωσης των χωρών, ούτως ώστε η παρακολούθηση των αντιδράσεων να είναι πιο αποτελεσματική. Παρόλαυτα σημειώνεται ότι τα τελευταία δύο χρόνια υπήρξαν ορισμένες αναφορές, που πηγάζουν από τα συστήματα αιμοεπαγρύπνωσης κάθε χώρας, και παρουσίασαν περιστατικά σοβαρών αλλεργικών αντιδράσεων σε ασθενείς που μεταγγίζονταν με επεξεργασμένο πλάσμα. Οι σημαντικότερες αναφορές ανεπιθύμητων ενεργειών περιγράφονται κατωτέρω.

Οι Dubret και συν, ανέφεραν περιστατικό δύο ασθενών, οι οποίοι έλαβαν μετάγγιση με επεξεργασμένο πλάσμα εξαιτίας αιμορραγίας που παρουσίασαν έπειτα από χειρουργείο αορτοστεφανιαίας παράκαμψης. Αμέσως μετά το πέρας της μετάγγισης οι ασθενείς εμφάνισαν καρδιαγγειακή κατάρρευση με εμφάνιση γενικευμένου εξανθήματος στον έναν ασθενή και γενικευμένων ουρτικαριών στον δεύτερο ασθενή, καθώς και πτώση του κορεσμού οξυγόνου. Τα εργαστηριακά τεστ (επίπεδα ισταμίνης και τρυπτάσης) που πραγματοποιήθηκαν επιβεβαίωσαν την αναφυλακτική αντίδραση που εμφανίστηκε. Την ίδια χρονιά, οι Dewachter και συν, ανέφεραν παρόμοιο περιστατικό με άνδρα 22 ετών που παρουσίασε αναφυλακτική αντίδραση μετά από μετάγγιση του πρώτου ασκού επεξεργασμένου πλάσματος. Σε μετέπειτα μελέτες ο ασθενής ήταν θετικός σε ενδοδερμικό τεστ για ευαισθησία στο MB αλλά και στην δοκιμή ενεργοποίησης των βασεόφιλων [153].

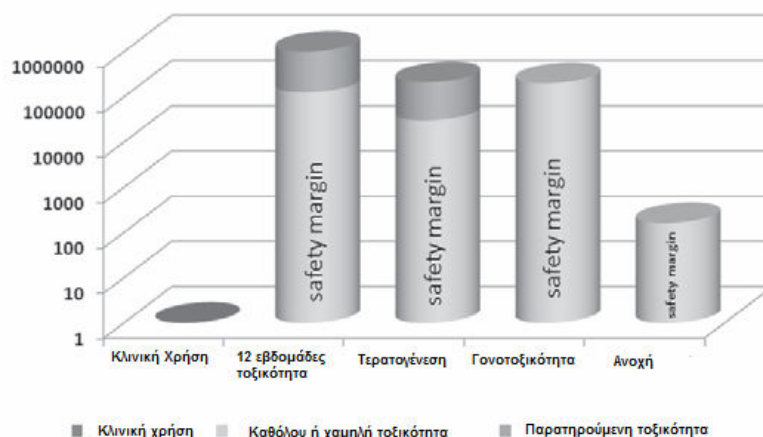
Οι Mertes και συν, δημοσίευσαν μελέτη όπου ερευνήθηκαν οι αλλεργικές αντιδράσεις που αναφέρθηκαν στο AFSSAP (French Agency for the Safety of Health Products) σχετικά με μεταγγίσεις επεξεργασμένου πλάσματος που μεταγγίστηκε στην Γαλλία το διάστημα μεταξύ 2005 έως Δεκέμβρη 2009 και παρατηρήθηκαν από τον Ιούνιο του 2008 έως τον Δεκέμβρη του 2009. Αυτές οι αντιδράσεις υποβλήθηκαν σε τυποποιημένους αλλεργικούς ελέγχους που περιλάμβαναν: λεπτομερές κλινικό ιστορικό, ενδοδερμικά τεστ με MB σε διάφορες αραιώσεις καθώς και ελέγχους ενεργοποίησης των βασεόφιλων με κυτταρομετρία ροής. Επιπλέον γινόταν μέτρηση της συγκέντρωσης της IgA στον ορό συστηματικά. Ερευνήθηκαν 34 περιστατικά αντιδράσεων από 263,539 μονάδες που μεταγγίστηκαν, ενώ 3 από τα 17 περιπτώσεις είχαν θετική την ενδοδερμική δοκιμή. Τέλος, σε 2 περιπτώσεις επιβεβαιώθηκε η ευαισθησία στο Methylene Blue από θετικό αποτέλεσμα που είχε η δοκιμασία ελέγχου ενεργοποίησης των βασεόφιλων με κυτταρομετρία ροής [154]. Οι συγγραφείς ανέφεραν ότι η συχνότητα των αλλεργικών αντιδράσεων μεταξύ του συμβατικού πλάσματος (1 στις 117.049 μονάδες) και του πλάσματος επεξεργασμένου με S/D (1 στις 41.195 μονάδες) ήταν παρόμοιες, ενώ στην περίπτωση του πλάσματος επεξεργασμένου με MB το ποσοστό ήταν υψηλότερο (1 στις 18.824 μονάδες). Πρέπει να επισημανθεί ότι τα δεδομένα που συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση ήταν από το χρονικό διάστημα 2005 έως 2009, ενώ στην πραγματικότητα το επεξεργασμένο με MB πλάσμα ήταν διαθέσιμο μόνο από τον Ιούνιο του 2008 έως το 2009. Όταν τα δεδομένα που αντιστοιχούν στο έτος 2010 προστέθηκαν στην ανάλυση και περιόρισε το χρονικό διάστημα, οι σοβαρές αλλεργικές αντιδράσεις που οφείλονται στο πλάσμα επεξεργασμένο με MB (1/21.250) ήταν παρόμοιες με αυτές που οφείλονταν στο πλάσμα επεξεργασμένο με S/D (1/27.942) [155]. Ως αποτέλεσμα των αυξανόμενων αλλεργικών αντιδράσεων που προκαλούνται από τη χρήση του επεξεργασμένου πλάσματος με MB, η AFSSAP ανακοίνωσε τον Οκτώβριο του 2011

ότι η άδεια για παραγωγή επεξεργασμένου με MB πλάσματος θα ακυρωθεί και σταδιακά θα αντικατασταθεί με άλλους τύπους πλάσματος έως το Μάρτιο του 2012 [156]

Από κλινικά πειράματα υποστηρίζεται η άποψη ότι το Methylene Blue έχει χαμηλή τοξικότητα. Σε μια πρόσφατη έρευνα που έγινε σε αρουραίους, μετά από ενδοφλέβια έγχυση 20 mg/kg, το Methylene Blue παρουσίασε μια διφασική εξάλειψη ημίσειας ζωής με αρχική ημιζωή ζωή 3 λεπτά και τελική ημιζωή 12 ώρες. Η αποβολή της χρωστικής στα ούρα και τα κόπρανα σχεδόν ολοκληρώθηκε 96 ώρες μετά την έγχυση, ενώ στα διάφορα όργανα βρέθηκε λιγότερο από 1% υπολειπόμενης χρωστικής. Επιπροσθέτως, το Methylene Blue που είχε χορηγηθεί από το στόμα είχε μια καλή απορρόφηση παρέχοντας μια συστηματική βιοδιαθεσιμότητα περίπου 50%. Ως εκ τούτου τα αποτελέσματα από πρόσφατες τοξικολογικές μελέτες που χρησιμοποιούν τη στοματική οδό μπορούν να βρουν εφαρμογή και στην ενδοφλέβια οδό [161,162]. Χρόνια έκθεση στη χρωστική με δόσεις 200 gm/kg/ημέρα- από του στόματος χορήγηση- για 13 εβδομάδες δεν έδειξε ενδείξεις τοξικότητας σε πειράματα που έγινε σε ποντίκια και αρουραίους. Σε περαιτέρω μελέτες πάνω σε ζώα , η ενδοφλέβια έγχυση έδειξε ότι το Methylene Blue παρέχει πολύ μεγάλη ασφάλεια σε μέγεθος από 160 έως 200,000 φορές των κλινικών δόσεων όσον αφορά το επεξεργασμένο πλάσμα (εικόνα 12). Επιπλέον τα φωτοπροϊόντα ελέγχονται για τοξικολογικές επιδράσεις.

Στους ανθρώπους, η ενδοφλέβια δόση 1-5 mg/kg χρησιμοποιείται κυρίως σε περιπτώσεις μεθαιμοσφαιριναιμίας και σε δηλητηρίαση με κυανιούχα, χωρίς να έχει αναφερθεί κάποια σοβαρή ανεπιθύμητη ενέργεια. Το ποσό της χρωστικής που χρησιμοποιείται στο σύγχρονο σύστημα αδρανοποίησης είναι 85 μg ανά μονάδα πλάσματος. Αν υποθεθεί ότι ο όγκος κάθε μονάδας είναι περίπου 250 ml, τότε έναν ενήλικα 70 kg μεταγγίζεται με 1000 ml πλάσματος επεξεργασμένο με MB που σημαίνει ότι θα λάβει περίπου 0,005 mg/kg χρωστικής. Με τη χρήση φίλτρων αφαίρεσης μειώνεται αρκετά η ποσότητα MB και προϊόντων του και τελικά η υπολειπόμενη ποσότητα είναι περίπου 0,00003 mg/kg ή 0,5 μg ανά μονάδα πλάσματος. Το παράδειγμα αυτό δείχνει ότι η ποσότητα της χρωστικής που παραμένει στον οργανισμό μετά την μετάγγιση είναι αρκετά χαμηλότερη από την απαιτούμενη όπως ορίζουν οι κατευθυντήριες οδηγίες για τις υπηρεσίες μετάγγιση αίματος σε Ηνωμένο Βασίλειο και Γαλλία (κάτω από 30 μg ανά μονάδα πλάσματος) [163].

Τελικά, με βάση τα διαθέσιμα στοιχεία μπορεί να υποστηριχθεί η άποψη ότι το πλάσμα επεξεργασμένο με MB έχει περιορισμένη τοξικότητα και μέχρι στιγμής δεν έχουν αναφερθεί εμφάνιση νέο-αντιγόνων και γονο-τοξικότητα. Μελέτες που έγινε σε ποντίκια δείχνουν ότι δεν υπάρχει υποδόρια αναφυλαξία, ακόμα κι αν γίνει έκθεση σε δεκαπλάσια συγκέντρωση MB. Επιπλέον, δεν ανιχνεύθηκε σχηματισμός αντισωμάτων σε κουνέλια τα οποία για παρατεταμένο χρονικό διάστημα είχαν επανειλημμένα ανοσοποιηθεί με αυτόλογο αδρανοποιημένο πλάσμα [164].



Εικόνα 12: Όρια ασφαλείας για το επεξεργασμένο πλάσμα με MB όπως προέκυψε από πειράματα σε ζώα. Η συγκέντρωση στην στήλη της κλινικής χρήσης βασίζεται στην δόση 0,1 μg/kg (πηγή: MacoPharma)

Συμπερασματικά, παρατηρείται ότι η επεξεργασία πλάσματος με MB έχει ποικίλες κριτικές. Από μελέτες φαίνεται ότι το επεξεργασμένο πλάσμα είναι ίδιο με το συμβατικό και τα τελευταία είκοσι χρόνια δεν έχουν αναφερθεί σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες. Κύρια ανεπιθύμητη ενέργεια είναι η πρόκληση αλλεργικών αντιδράσεων που επιβεβαιώθηκαν από αντίστοιχη κλινική εικόνα και εργαστηριακά τέστ. Χαρακτηριστική είναι η σταδιακή διακοπή της χρήσης του επεξεργασμένου με MB πλάσματος στη Γαλλία, λόγω αυξημένων αλλεργικών αντιδράσεων. Το επεξεργασμένο πλάσμα έχει πολύ χαμηλή τοξικότητα και μέχρι στιγμής δεν έχουν αναφερθεί περιπτώσεις εμφάνισης νέο-αντιγόνων και γονοτοξικότητας.

2.4.1.2 Υδροχλωρικό αμοτοσαλένιο+UVA

Από τις μέχρι τώρα μελέτες που αφορούν το πλάσμα επεξεργασμένο με υδροχλωρικό αμοτοσαλένιο και ακτινοβολία, δε φαίνεται να υπάρχει τοξικότητα από το ΚΝΣ, καρδιά, φωτο-τοξικότητα, μεταλλαξιογόνος δράση, καρκινογένεση και τοξικότητα σχετιζόμενη με αναπαραγωγή. Επιπλέον δεν έχει αναφερθεί ο σχηματισμός νέο-αντιγόνων. Πιο συγκεκριμένα μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε ποντίκια, αρουραίους και σκύλους για να αξιολογηθεί η πιθανή τοξικότητα από μια έως και επαναλαμβανόμενες εκθέσεις σε υδροχλωρικό αμοτοσαλένιο. Μια μονή ενδοφλέβια δόση αμοτοσαλενίου προκάλεσε θάνατο σε αρουραίο η οποία ήταν 35.000 φορές μεγαλύτερη από την αναμενόμενη που εκτίθεται ο άνθρωπος. Χαμηλότερες δόσεις (4.000 και 20.000 φορές περισσότερο από αυτή που εκτίθεται ο άνθρωπος) δεν ήταν θανατηφόρες αλλά προκάλεσαν παροδική τοξικότητα και παρενέργειες σε δοκιμές που έγιναν σε σκύλους (υπερβολική έκκριση σιέλου, σπασμοί, μη θανατηφόρα καρδιακή αρρυθμία) και σε αρουραίους (αδράνεια, κυρτή στάση, μη φυσιολογική αναπνοή). Κατά τη νεκροψία δεν αναφέρθηκε τοξικότητα σε όργανα-στόχους [165].

Μελέτες που έγιναν σε σκύλους έδειξαν ότι δεν εμφανίστηκαν δείγματα τοξικότητα μετά τη λήψη πλάσματος επεξεργασμένο με αμοτοσαλένιο, παρόλο που η συγκέντρωση του αμοτοσαλενίου ήταν 6000 φορές μεγαλύτερη από την αναμενόμενη που εκτίθεται ο άνθρωπος. Επιπλέον οι επαναλαμβανόμενες καθημερινές δόσεις επεξεργασμένου πλάσματος για 28 μέρες σε σκύλους και αρουραίους δεν έδειξε στοιχεία τοξικότητας, παρόλο που η συγκέντρωση του αμοτοσαλενίου ήταν 5000 φορές μεγαλύτερη από την αναμενόμενη [166]. Συνεχίζοντας, το αμοτοσαλένιο εξαλείφεται ταχέως, μετά από ενδοφλέβια χορήγηση, με αρχικό χρόνο ημιζωής λιγότερο από μια ώρα και δεν υπήρξαν στοιχεία συσσώρευσής του μετά από επανειλημμένη έκθεση σε διάστημα 13 εβδομάδων. Σημειώνεται ότι η κύρια οδός απέκκρισης του αμοτοσαλενίου και των φωτο-προϊόντων του είναι μέσω των κοπράνων.

Όσον αφορά την αναπαραγωγή, δεν υπάρχουν επιπτώσεις στην ικανότητα της γονιμότητας μετά από έκθεση σε αμοτοσαλένιο αρσενικών και θηλυκών αρουραίων. Επιπλέον, σε έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε κυοφορούντα κουνέλια και νεογέννητους αρουραίους για την αξιολόγηση των επιπτώσεων της έκθεσης σε αμοτοσαλένιο, δεν υπάρχουν στοιχεία τερατογένεσης ή εμφάνιση αναπαραγωγικής ή αναπτυξιακής τοξικότητας [167].

Η ασφάλεια της χρήσης του αμοτοσαλενίου επιβεβαιώθηκε από κλινικά δεδομένα προερχόμενα από τη συνεχή εφαρμογή σε πλάσμα που χορηγήθηκε σε ασθενείς για θεραπευτικούς σκοπούς. Σε μια μη ελεγχόμενη μελέτη παρατήρησης αξιολογήθηκε η μετάγγιση 57.171 μονάδων επεξεργασμένου πλάσματος σε 9,669 ασθενείς. Η πρώτη παράμετρος αξιολόγησης ήταν ο αριθμός των μεταγγίσεων που περιείχαν τουλάχιστον μια οξεία αντίδραση οφειλούμενη στην μετάγγιση επεξεργασμένου πλάσματος, 32 άτομα (0,3%) ανέπτυξαν ATR (acute transfusion reaction) μετά από 41 ξεχωριστές συνεδρίες μετάγγισης. Τα πιο κοινά σημεία και συμπτώματα των αντιδράσεων ήταν ουρτικάρια, ρίγη, εξανθήματα και κνησμός. Οι περισσότερες από τις αντιδράσεις ήταν ήπιες. Έξι από τις αντιδράσεις αξιολογήθηκαν ως σοβαρές και τα συμπτώματα αυτών των αντιδράσεων ήταν σύμφωνα με αναγνωρισμένες αντιδράσεις μετάγγισης και περιλάμβαναν τρεις περιπτώσεις αλλεργικής αντίδρασης ή συμπτώματα αλλεργικής αντίδρασης, δύο περιπτώσεις υπερφόρτωσης υγρών και μια περίπτωση αναπνευστικής δυσχέρειας.

Σημειώνεται επίσης ότι έπειτα από 3 χρόνια επεξεργασίας πλάσματος με υδροχλωρικό αμοτοσαλένιο στην Γαλλία, τα ποσοστά των οξέων αντιδράσεων που προκαλούνται από τη μετάγγιση φαίνεται να είναι συγκρίσιμα με το συμβατικό πλάσμα (0,4 περιστατικά ανά 1000 μονάδες πλάσματος).

Τέλος, σε μια μικρή μελέτη που πραγματοποίησαν οι de Alarcon και συν, όπου συμμετείχαν 34 ασθενείς με συγγενείς διαταραχές πήξης αναφέρθηκε η συχνότητα των οξέων αντιδράσεων μετά από μετάγγιση επεξεργασμένου πλάσματος. Οι αντιδράσεις αυτές χαρακτηρίστηκαν ως ήπιες, μέτριας σοβαρότητας και σοβαρές. Η πλειοψηφία των αντιδράσεων ήταν ήπιες, με μια να θεωρείται σοβαρή. Παρόλο που το συμβάν ήταν σοβαρό και θεωρήθηκε επείγον ιατρικό περιστατικό, κανείς ασθενής δεν κατέληξε. Ο συγγραφέας της μελέτης επισήμανε ότι κανένας ασθενής δεν είχε δείγμα ορού το οποίο να ήταν θετικό για αντισώματα στο επεξεργασμένο με αμοτοσαλένιο πλάσμα.

Η μετα-ανάλυση είναι ένα χρήσιμο εργαλείο το οποίο επιτρέπει το συνδυασμό των διαφόρων μελετών, με στόχο τόσο την καταγραφή όσο και την αξιολόγηση/σύγκριση των μελετών, ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα και πιθανές πηγές διαφωνιών καθώς και άλλες σχέσεις. Μέχρι στιγμής, έχουν πραγματοποιηθεί και δημοσιευτεί τρεις μετά-αναλύσεις σχετικά με τα συστήματα αδρανοποίησης παθογόνων [122,123]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει αναδρομική μελέτη ενός κέντρου που συνέκρινε την συχνότητα HLA και HPA αλλοανοσοποίησης πριν και μετά την επεξεργασία των αιμοπεταλίων. Η έρευνα αναφέρει ότι υπήρξε χαρακτηριστική μείωση ορομετατροπής των HLA αντιγόνων (3,7% έναντι 1,1% των συμβατικών αιμοπεταλίων) και μείωση ορομετατροπής των HPA (2,6 έναντι 0,4% των συμβατικών αιμοπεταλίων) σε αιματολογικούς ασθενείς που έλαβαν αιμοπετάλια μετά από επεξεργασία με αμοτοσαλένιο (*Osselaer et al*).

Συμπερασματικά, από τις μέχρι τώρα μελέτες που έχουν γίνει σχετικά με την χρήση του επεξεργασμένου πλάσματος με αμοτοσαλένιο, δεν φαίνεται να υπάρχουν σημάδια τοξικότητας, φωτο-τοξικότητας, μεταλλαξιογόνου δράσης, καρκινογένεσης και τοξικότητας σχετιζόμενης με την αναπαραγωγή. Επιπλέον οι αντιδράσεις που προκαλούνται από την μετάγγιση είναι συγκρίσιμες με αυτές του συμβατικού πλάσματος.

2.4.1.3 Ριβοφλαβίνη+UVA

Η ριβοφλαβίνη είναι μια υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη που απεκκρίνεται ταχέως από τον οργανισμό. Ταξινομείται από τον οργανισμό φαρμάκων και τροφών ως ένα γενικώς αναγνωρισμένο ασφαλές προϊόν. Η ασφάλεια του προϊόντος έχει παρουσιαστεί μέσα από ενδοφλέβιες, υποδόριες, ενδοπεριτοναϊκές και από του στόματος οδούς χορήγησης [168] αλλά και είναι γνωστή και από την χρήση της στην θεραπεία του νεογνικού ίκτερου. Παρόλο που έχουν δημιουργηθεί ανησυχίες σχετικά με τις μακροπρόθεσμες επιπτώσεις της χρήσης της ριβοφλαβίνης καθώς και της απευθείας χρήσης της στην φωτο-θεραπεία στα νεογνά, δεν έχουν αναφερθεί ανεπιθύμητες ενέργειες στις κλινικές δοκιμές. Σε μια μεγάλη ανάλυση στην οποία συμμετείχαν 55.000 νεογνά που είχαν υποβληθεί σε φωτο-θεραπεία, κανένα από αυτά δεν εμφάνισε λευχαιμία παιδικής ηλικίας παρακολουθούμενα ένα χρονικό διάστημα 9 ετών [169]. Τα φυσιολογικά επίπεδα ριβοφλαβίνης στον ανθρώπινο οργανισμό κυμαίνονται από 100-400 ng/ml (ισοδυναμούν με 0,5-2 mg σε 5 λίτρα αίματος). Επί του παρόντος τα ανώτερα όρια των «μη τοξικών επιπέδων» παραμένουν άγνωστα. Επιπλέον, όπως περιγράφεται στην βιβλιογραφία δεν έχουν αναφερθεί τοξικές επιπτώσεις από την θεραπευτική δόση των 30 mg/ημέρα που ορίζεται για έναν ενήλικα, ενώ υπάρχουν αναφορές που έπαιρναν πάνω από 200 mg ανα ημέρα για 6 μήνες χωρίς να υπάρχουν προβλήματα [170,171].

Ωστόσο, ενώ η ριβοφλαβίνη θεωρείται ένα ασφαλές προϊόν, έχουν γίνει εκτεταμένες τοξικολογικές μελέτες -in vivo και in vitro- ώστε να εδραιωθεί αυτή η ασφάλεια και κατά την επεξεργασία του πλάσματος. Σύμφωνα με αυτές, δεν παρατηρήθηκε κανένα τοξικολογικό σημαντικό εύρημα.

Σημειώνεται ότι η παρατεταμένη και επαναλαμβανόμενη έκθεση ριβοφλαβίνης σε σκύλους καθώς και η χορήγηση μεγάλων ποσοτήτων επεξεργασμένου πλάσματος μέσω πλασμαφαίρεσης δεν ανέφερε καμιά τοξικότητα [172,173].

Συμπερασματικά, η χρήση της ριβοφλαβίνης ως μέσο αδρανοποίησης θεωρείται ασφαλής. Δεν έχουν παρατηρηθεί τοξικολογικά ευρήματα μετά από εκτεταμένες μελέτες in vivo και in vitro.

2.4.2 Αιμοπετάλια

Μετά την έγκριση για χορήγηση πιστοποίησης CE, ξεκίνησε ένα πρόγραμμα αιμοεπαγρύπνησης για την τεκμηρίωση και το χαρακτηρισμό του προφίλ ασφάλειας των αιμοπεταλίων επεξεργασμένων με αμοτοσαλένιο στη συνηθισμένη χρήση. Ο αντικειμενικός στόχος του μη τυχαιοποιημένου, μη ελεγχόμενου προγράμματος αιμοεπαγρύπνησης που βασίζεται σε παρατηρήσεις ήταν να αποκτηθούν περισσότερες εμπειρίες σχετικά με την ασφάλεια αυτών των αιμοπεταλίων, όπως να παρασκευάζονται και να μεταγγίζονται υπό τυπικές συνθήκες Αιμοδοσίας και υπό κλινικές συνθήκες, αντίστοιχα, και η απόκτηση περισσότερων εμπειριών σχετικά με ευρύτερες ομάδες πληθυσμού.

2.4.2.1 Υδροχλωρικό αμοτοσαλένιο+UVA

Οι Osselaer και συν, σε ένα πολυκεντρικό πρόγραμμα αιμοεπαγρύπνησης (συμμετείχαν Βέλγιο, Γαλλία, Ισπανία) με 5.106 μεταγγίσεις την πρώτη περίοδο και 7.437 μεταγγίσεις την δεύτερη περίοδο, ερεύνησαν τις ανεπιθύμητες ενέργειες που σχετίζονται με την μετάγγιση των επεξεργασμένων αιμοπεταλίων με *αμοτοσαλένιο*. Σημειώνεται ότι σ' αυτή τη μελέτη συμμετείχαν ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες που υποβάλλονταν σε χημειοθεραπείες ή μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων ή υποβάλλονταν σε καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις ή μεταμοσχεύσεις συμπαγών οργάνων. Οι εγκυμονούσες γυναίκες και τα παιδιά που περιλάμβανε η μελέτη μεταγγίζονταν με τα επεξεργασμένα αιμοπετάλια κατά την συνηθισμένη ροή εργασίας. Στην τελευταία περίοδο, ο συγγραφέας ανέφερε ένα πολύ μικρό ποσοστό οξέων ανεπιθύμητων αντιδράσεων της τάξης του 0,7% κυρίως μέτριας σοβαρότητας, και μόνο 5 ανεπιθύμητα συμβάντα που θεωρήθηκαν σοβαρά χωρίς όμως να είναι συναφή με την τρέχουσα μέθοδο αδρανοποίησης. Επιπλέον, οι Cazenave και συν, συνόψισαν τα δεδομένα από την Etablissement Francais du Sang Alsace μετά την εφαρμογή το 2000, συγκρίνοντας την κλινική ασφάλεια και την ανοχή περισσότερων από 13,000 μονάδων επεξεργασμένων αιμοπεταλίων σε περίπου 2000 λήπτες με τα συμβατικά αιμοπετάλια που εναιωρούνται σε 100% πλάσμα ή PASIII. Ο συγγραφέας ανέφερε σημαντική μείωση των οξέων αντιδράσεων από μετάγγιση και δεν υπήρχαν στοιχεία αύξησης της κατανάλωσης ερυθροκυττάρων στους ασθενείς που έλαβαν τα επεξεργασμένα αιμοπετάλια.

Σε μια τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη μελέτη, στην οποία συμμετείχαν 645 ασθενείς με θρομβοκυτταροπενία, ορισμένοι ασθενείς έλαβαν μετάγγιση με συμβατικά αιμοπετάλια και οι υπόλοιποι

μεταγγίστηκαν με επεξεργασμένα αιμοπετάλια. Οι Mc Cullough και συν, (2004) ανέφεραν ότι το 99,7% των ασθενών που έλαβαν συμβατικά αιμοπετάλια και το 98,2% που έλαβαν τα επεξεργασμένα ανέπτυξαν τουλάχιστον 1 ανεπιθύμητη ενέργεια, λιγότερο από το ένα τρίτο αυτών και στις δύο ομάδες θεωρήθηκε ότι σχετιζονταν με την θεραπεία, ενώ δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες. Από τους 28 θανάτους, το 3,5% και 5,2% συνέβη σε ασθενείς που έλαβαν επεξεργασμένα και συμβατικά αιμοπετάλια αντίστοιχα. Οι θάνατοι προέκυψαν κυρίως λόγω λοιμωδών ή αναπνευστικών επιπλοκών και δεν αποδόθηκαν στο πρωτόκολλο θεραπείας. Οι Snyder και συν, (2005) -συμπληρωματικά στα αποτελέσματα του ανωτέρω- αναφέρουν ότι υπήρχαν σημαντικά λιγότερες ανεπιθύμητες αντιδράσεις στην ομάδα που έλαβε επεξεργασμένα αιμοπετάλια σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (3,0% και 4,1% αντίστοιχα). Επιπλέον δεν υπάρχουν διαφορές στις συνολικές ανεπιθύμητες ενέργειες (99,7% και 98,2% αντίστοιχα), στις ανεπιθύμητες ενέργειες σταδίου 3 και 4 (79% και στις δύο ομάδες) ή στις περιπτώσεις θρομβώσεων (3,8% και 3,7% αντίστοιχα). Αξίζει να αναφερθεί επίσης ότι 12 ασθενείς από την ομάδα που έλαβαν τα επεξεργασμένα αιμοπετάλια ανέπτυξαν οξύ σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS) και 7 ανέπτυξαν οξεία πνευμονική βλάβη (TRALI) συγκρινόμενοι με την ομάδα ελέγχου που το νούμερο των ασθενών ήταν 5 και 11 αντίστοιχα. Ο αριθμός των θανάτων αποδόθηκε στην υποκείμενη νοσηρότητα των ασθενών, αφού οι περισσότεροι συνέβησαν εξαιτίας επιπλοκών από τις χημειοθεραπείες, από τις μεταμοσχεύσεις βλαστοκυττάρων ή από την εξέλιξη της υποκείμενης κακοήθειας.

Το 2005 οι Janetzko και συν, πραγματοποίησαν μια μικρή τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη μελέτη σχετικά με την συχνότητα των οξέων αντιδράσεων από την μετάγγιση σε 43 ασθενείς με θρομβοκυτταροπενία. Οι ασθενείς οι οποίοι έλαβαν επεξεργασμένα ή συμβατικά αιμοπετάλια δεν είχαν σημαντικές διαφορές. Μια σειρά περιστατικών με 3,231 νοσοκομειακούς ασθενείς που μεταγγίστηκαν τουλάχιστον μια φορά με επεξεργασμένα αιμοπετάλια αναφέρθηκε ότι ανέπτυξαν ανεπιθύμητες ενέργειες που ταξινομούνται στην κατηγορία των οξέων αντιδράσεων από μετάγγιση. Ο αριθμός των ανεπιθύμητων ενεργειών σ αυτές τις περιπτώσεις είναι μικρός και ποικίλος και η σχέση του με τα επεξεργασμένα με αμοτοσαλένιο αιμοπετάλια είναι αμφισβητήσιμος.

Συνεχίζοντας, το 2011 οι Lozano και συν, πραγματοποίησαν ακόμα μια μελέτη όπου εξέταζαν τον αριθμό και το ποσοστό οποιασδήποτε ανεπιθύμητης ενέργειας που σημειώθηκε σε 242 ασθενείς με θρομβοκυτταροπενία μέσα σε 24 ώρες και 4 μέρες από την μετάγγιση αιμοπεταλίων -σύμφωνα με το πρωτόκολλο εργασίας-. Όλα τα γεγονότα ,που φαίνεται να είναι σχετικά με τις μεταγγίσεις που έγιναν στην μελέτη, έλαβαν χώρα σε ένα διάστημα 24 ωρών μετά το τέλος της μετάγγισης. 10 άτομα εμφάνισαν ανεπιθύμητες ενέργειες που φαίνεται να οφείλονται στην μετάγγιση με επεξεργασμένα αιμοπετάλια, ενώ στην ομάδα με τα συμβατικά αιμοπετάλια ο αντίστοιχος αριθμός είναι 7. Επιπρόσθετα, ο συνολικός αριθμός των ανεπιθύμητων συμβάντων μέσα σε 24 ώρες από τη στιγμή της μετάγγισης είναι 33 για τα άτομα που έλαβαν επεξεργασμένα αιμοπετάλια και 31 για την ομάδα ελέγχου αντίστοιχα. Όσον αφορά τους θανάτους, παρόλο που σημειώθηκαν 5 στην ομάδα ελέγχου, φαίνεται να οφείλονται στην υποκείμενη νοσηρότητα του ασθενή παρά στην μετάγγιση. Στην ομάδα των ατόμων που έλαβαν

επεξεργασμένα αιμοπετάλια σημειώθηκε ένας θάνατος ως αποτέλεσμα σοβαρής HLA αλλοανοσοποίησης. Ο εν λόγω θάνατος θεωρήθηκε πως πιθανώς να συνδέεται με την μετάγγιση επεξεργασμένων αιμοπεταλίων, ωστόσο επειδή το σύστημα αδρανοποίησης παθογόνων με αμοτοσαλένιο έχει το πλεονέκτημα να μειώνει τα υπολειπόμενα λευκά αιμοσφαίρια, είναι πιθανό ο συγκεκριμένος ασθενής να είχε αναπτύξει την οξεία HLA αντίδραση, ακόμα κι αν μεταγγιζόταν με συμβατικά αιμοπετάλια.

Συνοψίζοντας, η πλειοψηφία των στοιχείων από τις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζουν παρόμοια αποτελέσματα για την ασφάλεια, όσον αφορά τους ασθενείς που λαμβάνουν μετάγγιση με επεξεργασμένα αιμοπετάλια.

2.4.2.2 Ριβοφλαβίνη+UVA

Όσον αφορά την επεξεργασία των αιμοπεταλίων με ριβοφλαβίνη, ένα εύρος μελετών αξιολογούν την ανάπτυξη του εμβρύου, την γονοτοξικότητα και την κυτταροτοξικότητα μετά από μετάγγιση επεξεργασμένων αιμοπεταλίων. Σε αυτές, δεν ανιχνεύεται δέσμευση της ριβοφλαβίνης και των φωτοπροϊόντων της στις πρωτεΐνες των αιμοπεταλίων, όπως επίσης και του πλάσματος. Επιπλέον δεν υπάρχουν στοιχεία για σχηματισμό νέο-αντιγόνων [174,175].

Δεδομένα ασφάλειας από την κλινική δοκιμή MIRACLE, **δεν δείχνουν κάποια σημαντική ανεπιθύμητη ενέργεια που να σχετίζεται με μετάγγιση με επεξεργασμένα αιμοπετάλια. Η συχνότητα ανάπτυξης ανεπιθύμητων ενεργειών καθώς και σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών ήταν παρόμοια και για τις δύο ομάδες.** Πιο συγκεκριμένα, δύο ασθενείς από την ομάδα που έλαβαν επεξεργασμένα αιμοπετάλια ανέπτυξαν σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες οι οποίες ήταν «πολύ πιθανό» να σχετίζονται με την μετάγγιση, ενώ αντίστοιχα δύο ασθενείς από την ομάδα ελέγχου είχαν ανεπιθύμητο συμβάν χαρακτηριζόμενο ως «πολύ πιθανό» να σχετίζεται με την μετάγγιση.

2.4.2.3 UVC ακτινοβολία

Είναι γνωστό ότι οι τρέχουσες κλινικά αποδεδειγμένες μέθοδοι αδρανοποίησης που εφαρμόζονται σε συμπυκνώματα αιμοπεταλίων εξαρτώνται από την προσθήκη ενός φωτο-ενεργού αντιδραστήριου όπως αμοτοσαλένιο ή ριβοφλαβίνη και έπειτα εφαρμογή UV ακτινοβολίας [200]. Τα φωτοχημικά αυτά αντιδραστήρια ή τα παράγωγα τους πιθανώς να αυξάνουν τον κίνδυνο ανεπιθύμητων αντιδράσεων όπως η ανοσιακή απάντηση, τοξικότητα ή η καρκινογένεση. Εντούτοις οι ανεπιθύμητες αυτές αντιδράσεις υπολογίζονται να είναι μάλλον χαμηλής συχνότητας [201,202] λαμβανομένου υπόψιν ότι οι μελέτες πάνω στην φαρμακοκινητική και τις παρενέργειες για όλα τα πιθανά φωτο-προϊόντα είναι δύσκολο να εκτελεστούν. Επιπλέον, μόνο με μακροπρόθεσμες μελέτες θα είναι εφικτό να προσδιοριστεί ο κίνδυνος, ιδιαίτερα για την περίπτωση την καρκινογένεσης που μπορεί να προκληθεί από κάθε προϊόν.

Αντίθετα, τεχνολογίες αδρανοποίησης, όπως η χρήση *UVC* ακτινοβολίας, που δεν χρησιμοποιούν φωτο-ενεργά/φωτο-δραστικά αντιδραστήρια και αντιστοίχως δεν υπάρχει απομάκρυνση περίσσιας φωτο-προϊόντων, αποκλείουν την εμφάνιση ανεπιθύμητων αντιδράσεων που να σχετίζονται με αυτά. Με βάση το παραπάνω οι συμβατικές προσεγγίσεις σχετικά με τους τοξικολογικούς ελέγχους που ορίζονται για τα φαρμακευτικά προϊόντα δεν ενδείκνυται για τις μονάδες αιμοπεταλίων που έχουν επεξεργαστεί με αυτή την μέθοδο.

Η *UVC* ακτινοβολία πιθανώς να προκαλεί αλλαγές στις πρωτεΐνες του πλάσματος και των αιμοπεταλίων. Σε μια φαρμακολογική έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε σκύλους σχετικά με την ασφάλεια της *UVC* ακτινοβολίας σε ασκούς αιμοπεταλίων [203,204], παρατηρήθηκαν *in vitro* αλλαγές στην μεταβολική δραστηριότητα στο πρωτέωμα των αιμοπεταλίων. Ωστόσο φυσικές και εργαστηριακές έρευνες δεν εμφάνισαν κάποιο σημάδι τοπικής ή γενικής διαταραχής της ανεκτικότητας μετά από πολλαπλές μεταγγίσεις με επεξεργασμένα αιμοπετάλια [205]. Επιπλέον, δεν υπήρξαν εμφανή σημάδια ενεργοποίησης του ανοσολογικού συστήματος όπως αύξηση του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων, αλλαγές στον αριθμό λεμφοκυττάρων ή λεμφαδενικό οίδημα, στους σκύλους που μεταγγίστηκαν.

Ένας άλλος τύπος τοξικολογικής επίδρασης είναι η πρόκληση ανοσιακής απάντησης από τα επεξεργασμένα αιμοπετάλια. Η *UVC* ακτινοβολία επάγει τροποποιήσεις στα μακρομόρια στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων, έτσι ώστε να δημιουργηθούν νέο-αντιγόνα τα οποία αναγνωρίζονται ως ξένα από τον οργανισμό του λήπτη. Αυτή η κατάσταση οδηγεί σε σχηματισμό αντισωμάτων, τα οποία δεσμεύονται στα τροποποιημένα αιμοπετάλια και τα εξωθεί από την κυκλοφορία. Έως σήμερα, τέτοιου είδους ανοσιακή απάντηση δεν έχει περιγραφεί σε μελέτες για τις τρέχουσες εγκατεστημένες τεχνολογίες αδρανοποίησης. Σε μελέτες που έχουν γίνει σε ζώα δεν έχουν ανιχνευτεί επαγόμενα αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών του πλάσματος και των αιμοπεταλίων, ακόμα και μετά από επαναλαμβανόμενες μεταγγίσεις επεξεργασμένων αιμοπεταλίων, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι πιθανές αλλαγές στα αιμοπετάλια να μην είναι υψηλής ανοσογονικότητας [205].

Τέλος, όπως είναι γνωστό, τα υπολειπόμενα λευκοκύτταρα στα παράγωγα αίματος προκαλούν ποικίλες διαταραχές στους λήπτες-ιδιαίτερα στους ανοσοκατασταλμένους- με σημαντικότερη και σοβαρότερη παρενέργεια, την GvHD. Γι αυτό το λόγο έχουν πραγματοποιηθεί σειρά από *in vitro* πειράματα, ώστε να ερευνηθεί η ικανότητα της *UVC* ακτινοβολίας να αδρανοποιεί λεμφοκύτταρα σε παρασκευάσματα αιμοπεταλίων. Σε μικτές καλλιέργειες κυττάρων, η πολλαπλασιαστική απόκριση των αλλοδραστικών T-λεμφοκυττάρων ανεστάλησαν ήδη από χαμηλές δόσεις *UVC* ακτινοβολίας. Επιπλέον, T-λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από επεξεργασμένα αιμοπετάλια, έδειξαν ξεκάθαρα μειωμένη πολλαπλασιαστική απόκριση μετά από διέγερση από τα μιτογόνα Κονκαβαλίνη Α και φυτοαιμογλουτινίνη (phytohemagglutinin). Προκαταρκτικές μελέτες έδειξαν ότι η βιωσιμότητα των μολυσμένων μονοπύρηνων κυττάρων (Mononuclear Cells, MNCs) χάθηκε καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου αποθήκευσης [222]. Από τα παραπάνω δεδομένα προκύπτει ότι τα υπολειπόμενα MNCs στα παρασκευάσματα αιμοπεταλίων αδρανοποιούνται αποτελεσματικά από την *UVC* ακτινοβολία και υπάρχει δυνατότητα η μέθοδος αυτή να αντικαταστήσει την γ- ακτινοβολία ως μια προηγμένη τεχνολογία

για την αποφυγή της TA-GvHD. Ωστόσο περισσότερες έρευνες βρίσκονται σε εξέλιξη, ώστε να επιβεβαιώσουν αυτά τα αποτελέσματα και να προσδιορίσουν ποσοτικά την ικανότητα αδρανοποίησης των λευκών αιμοσφαιρίων.

Συμπερασματικά, η τεχνολογία αδρανοποίησης με χρήση UVC ακτινοβολίας έχει το πλεονέκτημα ότι δεν χρειάζεται κάποιο πρόσθετο συστατικό για να αναπτύξει πλήρη αποτελεσματικότητα. Παρ όλα αυτά, ένα σημαντικό ζήτημα σε μελλοντικές κλινικές μελέτες είναι ο προσδιορισμός της πιθανής ανοσογονικότητας των επεξεργασμένων αιμοπεταλίων.

Στον πίνακα 25 συγκρίνονται οι τρεις μέθοδοι αδρανοποίησης που αναφέρθηκαν ως προς την ασφάλεια.

Περίπτωση	Αιμοπετάλια επεξεργασμένα με υδροχλωρικό αμοτσαλένιο	Αιμοπετάλια επεξεργασμένα με ριβοφλαβίνη	Αιμοπετάλια επεξεργασμένα με UVC ακτινοβολία
Φωτοτοξικότητα	✓	✓	Δεν απαιτούνται τοξικολογικές αξιολογήσεις αφού δεν χρησιμοποιούνται φωτοενεργά αντιδραστήρια.
Οξεία τοξικότητα	✓	✓	
Γονοτοξικότητα	✓	✓	
Καρκινογένεση	✓	Δεν εφαρμόστηκε**	
Νεογνική τοξικότητα	✓	✓	
ADME* μελέτες	✓	✓	
Επαγγελματική ασφάλεια	✓	✓	
Σχηματισμός νέο-αντιγόνων	Όχι	όχι	όχι
*Απορρόφηση, κατανομή, μεταβολισμός και απέκκριση			
**Η ριβοφλαβίνη είναι βιταμίνη και πρόσθετο τροφίμων. Σε τοξικολογικές μελέτες επαναλαμβανόμενων δόσεων καθώς και σε μελέτες γονοτοξικότητας δεν παρατηρήθηκε περίπτωση καρκινογένεσης.			

Πίνακας 25: Σύγκριση ασφάλειας των δύο μεθόδων αδρανοποίησης παθογόνων που εφαρμόζονται στα αιμοπετάλια. (πηγή: C.V Prowse, Vox Sanguinis).

2.4.2.4 Λευκαφαίρεση

Έχουν αναφερθεί ανεπιθύμητες ενέργειες που σχετίζονται με τη διαδικασία της λευκαφαίρεσης. Ορισμένες από αυτές οφείλονται στην ίδια την διαδικασία και είναι η ύπαρξη υποτασικών αντιδράσεων, ενεργοποίηση του συμπληρώματος από τα φίλτρα, ενεργοποίησης της πήξης και αιμόλυση. Οι υποτασικές αντιδράσεις που σχετίζονται με την λευκαφαίρεση συμβαίνουν τα πρώτα δέκα λεπτά της μετάγγισης ενώ σε μια μελέτη αναφέρεται ότι συμβαίνει μέσα στα πρώτα 4 λεπτά από τη στιγμή της μετάγγισης. Αυτή η πτώση της πίεσης αποτελεί μια ιδιαίτερα σημαντική παρενέργεια και πρώτη αναφορά υπήρξε κατά την μετάγγιση μονάδας αιμοπεταλίων και συγκεκριμένα σε «παρά τη κλίνη» διήθηση [176]. Ωστόσο, η εμφάνιση υποτασικής αντίδρασης που συμβαίνει κατά την διήθηση «παρά κλίνη» οφείλεται στην παραγωγή βραδυκινίνης κατά τη διάρκεια της διήθησης, η οποία έχει μικρό χρόνο ημιζωής και είναι ενεργοποιημένη μόνο σε απευθείας ενδοφλέβια χορήγηση. Έτσι, αν πραγματοποιηθεί μια προ-αποθήκευσης λευκαφαίρεση τότε δεν προκαλείται αυτή η ανεπιθύμητη ενέργεια. Όσον αφορά την ενεργοποίηση του συμπληρώματος, μελέτες δείχνουν ότι εξαρτάται από το εκάστοτε φίλτρο που θα χρησιμοποιηθεί. Αν και είναι δύσκολο να προβλεφθεί, ορισμένα φίλτρα ενεργοποιούν το συμπλήρωμα, ενώ άλλα όχι.

Η μείωση της αλλοανοσοποίησης είναι μια καλά τεκμηριωμένη ευεργετική δράση της λευκαφαίρεσης σε μονάδες παραγώγων αίματος που προορίζονται για μετάγγιση, ιδιαίτερα σημαντική για πολυμεταγγιζόμενα άτομα και λήπτες μοσχευμάτων [177]. Το 1997 η μελέτη TRAP εξέτασε τον σχετικό κίνδυνο για HLA αλλοανοσοποίηση και αποτυχίας επίτευξης των αναμενόμενων επιπέδων των αιμοπεταλίων σε 400 ασθενείς και παρείχε στοιχεία επιπέδου 1 τα οποία ήταν στατιστικώς σημαντικά [178]. Σε μια τυχαίοποιημένη ελεγχόμενη κλινική μελέτη που έγινε στον Καναδά, μελετήθηκε η συμβολή της λευκαφαίρεσης στην μείωση της αλλοανοσοποίησης και στην ικανότητα επίτευξης των κατάλληλων επιπέδων αιμοπεταλίων και έγινε σύγκριση της ασφάλειας στην περίπτωση που έγινε μετάγγιση με μονάδα αίματος λευκαφαιρεμένη πριν από την αποθήκευση και μονάδων αίματος που δεν ήταν λευκαφαιρεμένες. Στην έρευνα συμμετείχαν ασθενείς με οξεία λευχαιμία/ μεταμόσχευση μυελού των οστών. Πιο συγκεκριμένα, αξιολογήθηκαν 1105 ασθενείς που ξεκίνησαν θεραπεία με μεταγγίσεις αιμοπεταλίων και έκαναν χημειοθεραπείες και ακόμα 21 ασθενείς με απλαστική αναιμία ή μυελοδυσπλασία οι οποίοι ακολουθούσαν μόνο υποστηρικτική θεραπεία. Βρέθηκε ότι η συχνότητα αλλοανοσοποίησης ήταν υψηλότερη στην ομάδα που δεν έγινε λευκαφαίρεση σε αντίθεση με την ομάδα που μεταγγίστηκαν με λευκαφαιρεμένα αιμοπετάλια (19% έναντι 7% αντίστοιχα). Σε περαιτέρω ανάλυση παρατηρήθηκε ότι αυτή η διαφορά έμεινε ίδια σε περιπτώσεις που οι ασθενείς έκαναν μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων (18% έναντι 5% αντίστοιχα) και χημειοθεραπεία (22% έναντι 9% αντίστοιχα). Μειωμένο ήταν και το συνολικό ποσοστό ανθεκτικότητας των αιμοπεταλίων (platelets refractoriness)- στη ομάδα με τα λευκαφαιρεμένα αιμοπετάλια- (από 40% στο 23%). Επιπλέον το ποσοστό των ασθενών με αλλοανοσοποιημένα αιμοπετάλια ήταν επίσης μειωμένο στην ίδια ομάδα από 14% σε 4%. Η μείωση αυτής της παραμέτρου βρέθηκε στους ασθενείς που λάμβαναν λευκαφαιρεμένα αιμοπετάλια ανεξάρτητα από το αν είχαν κάνει χημειοθεραπεία ή μεταμόσχευση μυελού των οστών. Τέλος, οι συνολικές περιπτώσεις αιμορραγικών επεισοδίων ήταν ίδιες και στις δύο ομάδες (14% έναντι 13% αντίστοιχα).

2.4.3 Ερυθρά αιμοσφαίρια/Ολικό αίμα

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο κατά καιρούς χρησιμοποιήθηκαν διάφορες τεχνικές για να επιτευχθεί αδρανοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών στα ερυθρά αιμοσφαίρια και το ολικό αίμα. Παρόλα αυτά, πολλές τεχνικές σταματούσαν στις πρώτες κλινικές φάσεις, αφού δημιουργούνταν προβλήματα όπως αυξημένη αιμόλυση ή ανάπτυξη νέο-αντιγόνων. Μέχρι στιγμής βρίσκεται σε χρήση η μέθοδος απομάκρυνσης της λευκαφαίρεσης και η γ-ακτινοβολία, ενώ ελπιδοφόρες προοπτικές υπάρχουν από την επεξεργασία των ερυθρών αιμοσφαιρίων με το τροποποιημένο S-303 με προσθήκη γλουταθειόνης, και με ριβοφλαβίνη.

2.4.3.1 Λευκαφαίρεση

Η pre-storage διαδικασία λευκαφαίρεσης αφαιρεί τα λευκά αιμοσφαίρια του δότη, πριν υποβληθούν σε απόπτωση ή νέκρωση και πριν απελευθερωθούν προϊόντα διάσπασης ή κυτοκίνες. Συνεπώς είναι η πιο διαδεδομένη και αποδεκτή μέθοδος με τα εξής πλεονεκτήματα:

- 1 Ελαχιστοποιεί τις φλεγμονώδεις κυτοκίνες (ιντερλευκίνη-1, ιντερλευκίνη-6, TNF) που οφείλονται στα λευκοκύτταρα κατά την αποθήκευση και ως εκ τούτου είναι αρκετά αποτελεσματική στην εμπόδιση των μη αιμολυτικών πυρετικών αντιδράσεων [22,23].
- 2 Ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο HLA-αλλοανοσοποίησης στους πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς, καθώς αφαιρεί άθικτα τα λευκοκύτταρα, σε σύγκριση με τα παρά κλίνη φίλτρα που θραύσματα λευκών αιμοσφαιρίων μπορεί να περάσουν και να δημιουργήσουν αλλοανοσοποίηση του δέκτη ενάντια στα αντιγόνα του δότη [24,25].
- 3 Η πριν την αποθήκευση λευκαφαίρεση επίσης ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο από μετάδοση λευκοτρόπων ιών, καθώς τα λευκοκύτταρα αποσυντίθενται και απελευθερώνουν ενδοκυτταρικούς οργανισμούς μετά από 72 ώρες αποθήκευσης [26,27].
- 4 Είναι ευκολότερο να γίνουν ποιοτικοί έλεγχοι στα λευκά αιμοσφαίρια όταν βρίσκονται στο εργαστήριο παρά δίπλα στον ασθενή. Έτσι, κατά την διαδικασία αυτή τα κυτταρικά συστατικά του αίματος μπορούν να μελετηθούν σε βάθος και να αξιολογηθούν και ορισμένοι παράγοντες που επηρεάζουν την λευκαφαίρεση ώστε να τροποποιηθούν ανάλογα [28,29].
- 5 Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι οι λευκαφαιρεμένες μονάδες FFP έχουν λιγότερο αριθμό μικροσωματιδίων¹² σε σύγκριση με τις μη λευκαφαιρεμένες μονάδες.

Η λευκαφαίρεση στα ερυθρά αιμοσφαίρια και το ολικό αίμα είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική η οποία προσφέρει μειωμένο κίνδυνο για πυρετικές μη αιμολυτικές αντιδράσεις (non-hemolytic febrile transfusion reactions, NHFR), ανοσοτροποποίηση, και μεταφορά μεταδιδόμενων με το αίμα παθογόνων, ωστόσο ενέχει και κινδύνους ανεπιθύμητων ενεργειών όπως περιγράφηκε και στο κεφάλαιο 2.4.2.3.

Η απομάκρυνση των λευκών αιμοσφαιρίων από τον ασκό μπορεί να αποτρέψει σε σημαντικό ποσοστό κάποιες αλλαγές και να βελτιώσει την ποιότητα των αποθηκευμένων κυττάρων μειώνοντας την αιμόλυση και αυξάνοντας την ανάκτησή τους in vivo. Σε μελέτες παρουσιάζεται αυτή η επίδραση της διήθησης προ της αποθήκευσης σε μονάδες ερυθρών αιμοσφαιρίων [180] και οι επιπτώσεις των πυρετικών αντιδράσεων στα πλαίσια της διήθησης των λευκοκυττάρων. Να σημειωθεί ότι σε όλες τις μελέτες επιτεύχθηκε ένα επίπεδο μείωσης λευκοκυττάρων $< 5 \times 10^6$ στις μεταγγιζόμενες μονάδες ερυθρών αιμοσφαιρίων. Παρόλα αυτά μέχρι πρόσφατα ο ρόλος της λευκαφαίρεσης στην βελτίωση των ποσοστών των πυρετικών μη αιμολυτικών αντιδράσεων δεν ήταν σαφώς καθορισμένος. Δημοσιεύσεις

¹² Μικροσωματίδια: μικρά κυστίδια με φωσφολιπίδια που έχουν προπηκτικές ιδιότητες. Τα μικροσωματίδια πιστεύεται ότι συμβάλλουν στο αιμοστατικό δυναμικό του πλάσματος.

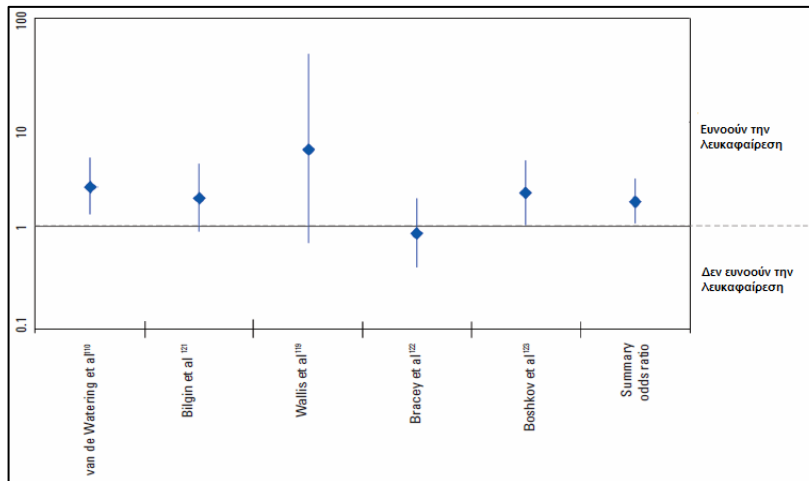
επιπλέον μελετών όμως έδειξαν ξεκάθαρα ότι η λευκαφαίρεση σχετίζεται με σημαντική μείωση του ρυθμού των αντιδράσεων αυτών (πίνακας 26). Πιο συγκεκριμένα, οι πυρετικές μη αιμολυτικές αντιδράσεις από μεταγγίσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων φαίνεται να μειώνονται περίπου 50% από 0,35% σε 0,18% [187,188].

Έρευνα	Ρυθμός μείωσης NHFTR που σχετίζονται με την λευκαφαίρεση
Paglino et al. [187]	Από 0,34% σε 0,18%
Yazer et al. [189]	Από 0,33% σε 0,19%
King et al. [188]	Από 0,37% σε 0,19%

Πίνακας 26: Αναφορές που περιγράφουν ρυθμό μείωσης των μη αιμολυτικών πυρετικών αντιδράσεων που σχετίζονται με εφαρμογή λευκαφαίρεσης σε μονάδες ερυθρών αιμοσφαιρίων πριν την αποθήκευση.

Η αξία της λευκαφαίρεσης για την πρόληψη μετεγχειρητικών επιπλοκών σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε κάποιο χειρουργείο ερευνάται σε αρκετές παρατηρητικές μελέτες. Αντικείμενα μετα-ανάλυσης έγιναν 12 τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες κλινικές δοκιμές οι οποίες σχετίζονται με την μετάγγιση αλλογενούς αίματος και των μετεγχειρητικών επιπλοκών [181,182]. Τέσσερις από αυτές τις μελέτες έδειξαν αυξημένη σχέση ανάμεσα στην μετάγγιση αλλογενούς αίματος και μετεγχειρητικών επιπλοκών ενώ οι άλλες όχι. Μια πιθανή εξήγηση για την έλλειψη συνοχής ανάμεσα στις μελέτες είναι η εμφάνιση του TRIM αλλά σε μικρό όμως ποσοστό (λιγότερο από 10%) [183].

Υπάρχουν επίσης στοιχεία που αναφέρουν ότι η λευκαφαίρεση στις μονάδες αίματος και παραγώγων του σχετίζεται με βελτίωση στην θνησιμότητα και τη νοσηρότητα σε καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις. Τα παραπάνω λεγόμενα επιβεβαιώνει μια τυχαιοποιημένη μελέτη που περιλαμβάνει μια μεγάλη σειρά ασθενών στους οποίους η θνησιμότητα μειώθηκε κατά 50%, όταν έλαβαν λευκαφαιρεμένα ερυθρά αιμοσφαίρια ενώ επίσης αναφέρθηκε σημαντική μείωση του ποσοστού των μετεγχειρητικών λοιμώξεων [184]. Τα ευρήματα αυτής της μελέτης προτείνουν την εφαρμογή της λευκαφαίρεσης σε όλους τους ασθενείς που πρόκειται να υποβληθούν σε καρδιοχειρουργική επέμβαση προκειμένου να βελτιωθούν τα αποτελέσματα των ασθενών. Άλλες πέντε τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες μελέτες διεξήχθησαν σε καρδιοχειρουργικούς ασθενείς, και έγινε σύγκριση της βραχυπρόθεσμης θνησιμότητας σε λήπτες λευκαφαιρεμένων μονάδων ερυθρών έναντι των μη λευκαφαιρεμένων. Η μετα-ανάλυση αυτών των μελετών έδειξε ότι οι μονάδες μη λευκαφαιρεμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων σχετιζόταν με 72% αύξηση στην μετεγχειρητική θνησιμότητα σε σύγκριση με τις μονάδες ερυθρών που υπέστησαν λευκαφαίρεση (εικόνα 13) [185].



Εικόνα 13: Σε τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη κλινική μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις, ερευνήθηκε η σχέση των υπολοιπόμενων λευκοκυττάρων σε μονάδες αίματος που προορίζονταν για μετάγγιση με την βραχυπρόθεσμη θνησιμότητα των ληπτών. Στο διάγραμμα φαίνεται το ποσοστό των πιθανοτήτων (odds ratio, OD) της βραχυπρόθεσμης θνησιμότητας των ατόμων που μεταγγίστηκαν με λευκαφαιρεμένη μονάδα ερυθρών σε σύγκριση με τα άτομα που μεταγγίστηκαν με μη λευκαφαιρεμένη μονάδα.

Οι Αλεξίου και συν, ανέφεραν ότι η λευκαφαίρεση μειώνει τον αριθμό των κυκλοφορούντων ενεργοποιημένων λευκοκυττάρων και την πνευμονική φλεγμονή κατά τη διάρκεια καρδιοπνευμονικού bypass (cardiopulmonary bypass, CPB) [186]. Επιπλέον, με την εφαρμογή της λευκαφαίρεσης βελτιώνεται η πνευμονική λειτουργία και μειώνεται η απαίτηση μηχανικού αερισμού σε ασθενείς με μη φυσιολογική προ-εγχειρητική πνευμονική λειτουργία. Μετα-ανάλυση δέκα τυχαιοποιημένων ελεγχόμενων μελετών αξιολόγησε την αποτελεσματικότητα και ασφάλεια των λευκαφαιρεμένων μονάδων ερυθροκυττάρων και κατέληξε ότι οι ασθενείς που μεταγγίστηκαν με λευκαφαιρεμένα ερυθρά επωφελούνταν από τη μείωση των μετεγχειρητικών λοιμώξεων. Περαιτέρω μείωση της θνητότητας θα είχε πραγματοποιηθεί, εάν είχαν συμμετάσχει περισσότεροι ασθενείς στις διάφορες τυχαιοποιημένες μελέτες [187].

Αρκετές μελέτες επισημαίνουν ότι ο χρόνος που θα γίνει η διήθηση είναι σημαντικός για την πρόληψη των πυρετικών μη αιμολυτικών αντιδράσεων, αφού η «ηλικία» του παραγώγου αίματος είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου. Πιο συγκεκριμένα, τα εναπομείναντα λευκοκύτταρα στον ασκό των συμπυκνωμένων ερυθρών υφίστανται σταδιακές αλλαγές με την αποθήκευση, οι οποίες επιδρούν ποικιλότροπα στη φυσιολογία του ερυθροκυτταρικού πληθυσμού [190]. Η έκθεση των λευκοκυττάρων στη χαμηλή θερμοκρασία και το όξινο περιβάλλον του ασκού επάγει την ενεργοποίησή τους και την παραγωγή κυτταροκινών. Μία κατηγορία συστατικών που προέρχονται από τα λευκοκύτταρα του ασκού, όπως ένζυμα (πρωτεάσες, λιπάσες, γλυκοζιτάσες), κυτταροκίνες, αποπρωτικά κυστίδια, φαίνεται να συσχετίζονται με την εξέλιξη της RCSL (Red cell storage lesion, αποθηκευτική βλάβη ερυθρών). Πράγματι, συγκριτική πρωτεομική ανάλυση λευκαφαιρεμένων και μη ασκών συμπυκνωμένων ερυθρών, έδειξε τη συσσώρευση διάφορων βιοενεργών πρωτεϊνών στα υπερκείμενα μη-λευκαφαιρεμένων ασκών

[191]. Έτσι, ένζυμα που απελευθερώνονται από τα λευκά με τη λύση τους μπορούν άμεσα να χτυπήσουν αντίστοιχους στόχους στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη. Λιπάσες, όπως η φωσφολιπάση, ευθύνονται για την παραγωγή λυσοφωσφολιπιδίων τα οποία σχετίζονται με την εμφάνιση TRALI στους μεταγγιζόμενους δέκτες [192]. Συνεπώς, Όσο μακρύτερη είναι η αποθηκευτική περίοδος τόσο περισσότερα βιολογικά ενεργά λιπίδια συσσωρεύονται στον ασκό και όσο πιο παλαιό είναι ένα παράγωγο τόσο περισσότερες πιθανότητες υπάρχουν για να εμφανιστούν ανεπιθύμητες αντιδράσεις.

Συμπερασματικά η λευκαφαίρεση προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα με ένα από αυτά την μείωση της αλλοανοσοποίησης που αφορά κυρίως πολυμεταγγιζόμενα άτομα και λήπτες μοσχευμάτων. Επιπλέον μειώνει τον κίνδυνο για πυρετικές μη αιμολυτικές αντιδράσεις, ανοσοτροποποίηση και μεταφορά μεταδιδόμενων με το αίμα παθογόνων. Μελέτες δείχνουν ότι η λευκαφαίρεση των μονάδων αίματος σχετίζονται με βελτίωση στη θνησιμότητα και τη νοσηρότητα σε καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις. Όσον αφορά τις ανεπιθύμητες αντιδράσεις επισημαίνονται η ύπαρξη υποτασικών αντιδράσεων, η ενεργοποίηση του συμπληρώματος από τα φίλτρα, ενεργοποίηση της πήξης και η αιμόλυση.

2.4.3.2 γ-ακτινοβολία

Σχετικά με την χρήση της γ-ακτινοβολίας, φαίνεται ότι η ακτινοβολία εμπύρηνων κυττάρων μπορεί να προκαλέσει κακοήθεις μεταλλαγές. Μέχρι στιγμής βέβαια δεν έχει υπάρξει ποσοτική αξιολόγηση του φαινομένου αυτού, αφού ο πιθανός κίνδυνος είναι αρκετά σπάνιος και δεν υπάρχουν αναφορές για μη αυτόλογη κακοήθεια σε λήπτες επεξεργασμένου αίματος.

2.4.3.3 S-303

Έχουν διεξαχθεί και ολοκληρωθεί αξιολογήσεις ασφαλείας για την πιθανή τοξικότητα (πίνακας 27), καρκινογένεση, γενετική και αναπαραγωγική τοξικότητα κατά τη χρήση των επεξεργασμένων ερυθροκυττάρων με S-303. Οι στόχοι των μελετών αυτών είναι να μεταγγιστούν ερυθρά επεξεργασμένα με S-303 σε πειραματόζωα σε πολλαπλές δόσεις για θεραπεία οξείας ή χρόνιας αναιμίας, να χορηγηθούν S-303 ή προϊόντα αποικοδόμησης αυτού σε υψηλές δόσεις σε ζώα, να αξιολογηθεί η ανοσιακή απάντηση μετά από συνήθη έκθεση σε επεξεργασμένα αιμοπετάλια με σκοπό την ύπαρξη νέο-αντιγόνων. Με βάση τα δεδομένα των ολοκληρωμένων πειραμάτων έχουν εδραιωθεί όρια ασφαλείας σχετικά με τη χρήση των επεξεργασμένων ερυθροκυττάρων, ενώ επιπλέον δεν έχει παρατηρηθεί συστηματική τοξικότητα ή ανοσιακή απάντηση σε μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε διάστημα 6 μηνών συνεχούς έκθεσης σε ποντίκια και σε διάστημα 9 μηνών σε σκύλους.

Σε μια πρόσφατη τυχαίοποιημένη ελεγχόμενη κλινική μελέτη εξετάστηκε η ασφάλεια των επεξεργασμένων ερυθρών με S-303 σε σύγκριση με τα συμβατικά ερυθρά αιμοσφαίρια. Στην μελέτη

συμμετείχαν 223 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε καρδιοχειρουργική επέμβαση, εκ των οποίων οι 148 επιλέχθηκαν τυχαία να μεταγγιστούν είτε με συμβατικά ερυθρά αιμοσφαίρια (ομάδα ελέγχου) είτε με ερυθρά επεξεργασμένα με S-303 (ομάδα εξέτασης). Οι 146 ασθενείς ανέπτυξαν τουλάχιστον μια ανεπιθύμητη ενέργεια και δεν υπήρχε διαφορά στο ποσοστό των ανεπιθύμητων ενεργειών ανάμεσα στις δύο ομάδες (100% έναντι 97,3% για την ομάδα εξέτασης με S-303 και για την ομάδα ελέγχου αντίστοιχα). Δύο γεγονότα φαίνεται να έχουν άμεση συσχέτιση με την μετάγγιση με τα ερυθρά επεξεργασμένα με S-303, ενώ 1 γεγονός αναφέρθηκε το οποίο σχετίζεται με την μετάγγιση με τα συμβατικά ερυθρά αιμοσφαίρια. Η νεφρική ανεπάρκεια είναι από το πιο κοινό καταληκτικό σημείο που σημειώθηκε σε 30 ασθενείς, 16 από την ομάδα εξέτασης και 14 από την ομάδα ελέγχου. Δύο ασθενείς από την ομάδα ελέγχου ανέπτυξαν έμφραγμα του μυοκαρδίου τις πρώτες 6 μέρες μετά την επέμβαση ενώ 1 ασθενής από την ίδια ομάδα κατέληξε.

Όσον αφορά τα δευτερογενή καταληκτικά σημεία δεν σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές στις δύο ομάδες. Συνεχίζοντας, οξεία αντίδραση από μετάγγιση αναφέρθηκε σε έναν ασθενή από την ομάδα εξέτασης με παρουσία πυρετού (αντίδραση σταδίου 1) και 2 από την ομάδα ελέγχου με βρογχόσπασμο, ουρτικάρια (αντίδραση σταδίου 2) και ναυτία (αντίδραση σταδίου 3). Παρόλα αυτά δεν αναφέρθηκαν σημαντικές διαφορές ως προς την συχνότητα των ανεπιθύμητων ενεργειών ανάμεσα στις δύο ομάδες. Η μόνη διαφορά που ανιχνεύτηκε ήταν ότι στην ομάδα εξέτασης η χορήγηση επεξεργασμένων ερυθροκυττάρων με S-303 σχετίστηκε με αυξημένο ποσοστό αναφερόμενης δυσκοιλιότητας (55% έναντι 34% της ομάδας ελέγχου) και χαμηλό ποσοστό υπερκοιλιακών έκτακτων συστολών (4,1% έναντι 17,6% της ομάδας ελέγχου.) Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι αυτή η δοκιμή τερματίστηκε πρόωρα εξαιτίας των ανησυχιών για αντιδράσεις του ανοσοποιητικού που συνδέονταν με τα επεξεργασμένα ερυθρά αιμοσφαίρια.

Ανεπιθύμητες ενέργειες
Οξεία τοξικότητα*
Υπο-χρόνια τοξικότητα*
Χρόνια τοξικότητα*
Φαρμακολογική ασφάλεια
Διανομή-μεταβολισμός
Επαγγελματική έκθεση
Αναπαραγωγή
Γενετική τοξικότητα
Καρκινογένεση
Ανοσογονικότητα**
* μελέτες για αξιολόγηση οργανικής τοξικότητας διεξήχθησαν με επεξεργασμένα ερυθρά σε ποντίκια και σκύλους
** Αναπτύχθηκε ένα μοντέλο συνεχώς μεταγγίσεων με επεξεργασμένα ερυθρά σε κουνέλια για την αξιολόγηση της ανοσιακής απάντησης στα επεξεργασμένα ερυθρά.

Πίνακας 27: Μελέτες που διεξήχθησαν σε σκύλους, ποντίκια, αρουραίους και κουνέλια ανάλογα με τους στόχους της μελέτης (πηγή: Reinhard Henshler, 2011).

2.4.3.4 Ριβοφλαβίνη+UVA

Σε μελέτη που πραγματοποίησαν οι Cancelas και συν, σχετικά με την επεξεργασία των ερυθρών αιμοσφαιρίων με ριβοφλαβίνη παρατηρήθηκε ότι η αιμόλυση αυξήθηκε κατά την διάρκεια της αποθήκευσης αλλά ήταν σε επίπεδα κάτω από 1% την 35^η μέρα την αποθήκευσης. Επιπλέον, τα επίπεδα του καλίου αυξήθηκαν και τα επίπεδα του νατρίου μειώθηκαν στα ερυθρά αιμοσφαίρια επεξεργασμένα με ριβοφλαβίνη σε σύγκριση με τα ερυθρά αιμοσφαίρια ελέγχου [178]. Η οσμωτική ευθραυστότητα βρέθηκε παρόμοια στις μονάδες αίματος τις οποίες επεξεργάστηκαν με ριβοφλαβίνη όπως και στις μονάδες ελέγχου μέσα σε 42 μέρες αποθήκευσης [179].

Συμπερασματικά, η χρήση της γ-ακτινοβολίας μπορεί να προκαλέσει κακοήθεις μεταλλαγές, κάτι που ωστόσο δεν έχει αναφερθεί ούτε έχει επιβεβαιωθεί από έρευνες. Σχετικά με την μέθοδο αδρανιοποίησης με S-303 έχουν διεξαχθεί μελέτες οι οποίες δεν επιβεβαιώνουν συστηματική τοξικότητα ή ανοσιακή απάντηση. Επιπλέον, συγκριτικές έρευνες επεξεργασμένων και συμβατικών ερυθρών αιμοσφαιρίων δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφορές. Τέλος, κλινικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για τη χρήση των επεξεργασμένων ερυθρών με ριβοφλαβίνη δείχνουν αυξημένη αιμόλυση κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης αλλά και αύξηση του καλίου και του νατρίου σε σχέση με τα ερυθρά ελέγχου.

3.1 οικονομικές παράμετροι- κόστος.

Η διαδικασία μέτρησης της υγείας γίνεται με σκοπό να προσδιοριστούν οι ανάγκες τις κοινωνίας, να αξιολογηθεί ο βαθμός και το επίπεδο της νοσηρότητας αλλά και της θνησιμότητας των ατόμων. Επομένως, οι γιατροί και οι οικονομολόγοι της υγείας μπορούν να αξιολογήσουν σε κάποιο βαθμό το επίπεδο της υγείας του πληθυσμού καθώς και το επίπεδο των παρεχόμενων υπηρεσιών, να προβούν σε συγκριτικές μελέτες μεταξύ διαφορετικών υγειονομικών συστημάτων και γενικότερα να αποτιμήσουν την αποτελεσματικότητα των παρεχόμενων υπηρεσιών υγείας. Σύμφωνα με τον ΠΟΥ¹³, η υγεία μπορεί να μετρηθεί μέσω ερευνών και πιο συγκεκριμένα με την εξέταση του βαθμού γεννητικότητας, του μέσου προσδόκιμου επιβίωσης ή ακόμα και των προτύπων ζωής του πληθυσμού.

Οι οικονομολόγοι της υγείας διακρίνουν ορισμένους τύπους οικονομικής αξιολόγησης. Δύο από αυτούς είναι η ανάλυση κόστους-αποτελεσματικότητας¹⁴ και η ανάλυση κόστους χρησιμότητας¹⁵. Η ανάλυση κόστους-αποτελεσματικότητας μετρά το όφελος σε μονάδες συγκεκριμένων κλινικών αποτελεσμάτων, πχ ρυθμός θνησιμότητας, επιπρόσθετα έτη ζωής κλπ. Παρότι όμως ο συγκεκριμένο τύπος είναι χρήσιμος μπορεί να αξιολογήσει μόνο προγράμματα με παρόμοια αποτελέσματα. Έτσι η σύγκριση μεταξύ διαφορετικών τύπων παρέμβασης είναι δύσκολη. Η ανάλυση κόστους-χρησιμότητας προέκυψε ως ανταπόκριση στην παραδοχή ότι τα έτη ζωής αποτιμούνται και αξιολογούνται σύμφωνα με την ποιότητα της ζωής. Ο τύπος αυτός θεωρεί τα ποιοτικώς σταθμισμένα έτη ζωής (QALYs) ως μονάδα απόδοσης. Η ανάλυση κόστους-χρησιμότητας δίνει έμφαση στην ποιότητα αλλά και στην 'ποσότητα' της ζωής, τα οποία είναι και τα δύο σημαντικά κριτήρια, έτσι ώστε να αποτιμηθούν τα αποτελέσματα ενός προγράμματος υγειονομικής φροντίδας.

Το αντιπροσωπευτικότερο δείγμα οικονομικών μεθόδων μέτρησης της υγείας αποτελούν τα QALY. τα QALYs¹⁶ αφορούν τα οφέλη που αποκομίζονται από την φροντίδα υγείας ή ακόμη πόσο πρόθυμος είναι ο ασθενής να θυσιάσει ένα ποσοστό από την ποιότητα της ζωής του, έτσι ώστε να κερδίσει ένα ακόμη χρόνο επιβίωσης και αντίστροφα. Ο όρος QALY εκφράζεται ως «χρόνος ζωής σε τέλεια υγεία» ($1 \text{ χρόνος ζωής} \times 1 \text{ χρηστική αξία} = 1 \text{ QALY}$). Αντίστοιχα, μισός χρόνος ζωής σε τέλεια υγεία ισοδυναμεί με 0,5 QALYs ($0.5 \text{ χρόνια} \times 1 \text{ χρησιμότητα}$). Ο όρος μπορεί να ενσωματωθεί με τις ιατρικές δαπάνες ώστε τελικά να καταλήξει σε ένα κοινό παρονομαστή της σχέσης κόστους/QALY.

¹³ Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

¹⁴ CEA, Cost-Effectiveness Analysis.

¹⁵ CUA, Cost-Utility Analysis.

¹⁶ QALY (quality adjusted life year): Ποιότητα ζωής σταθμισμένη ως προς το χρόνο. Είναι ένα μέτρο επιβάρυνσης της ασθένειας. Περιλαμβάνει την ποιότητα και ποσότητα ζωής. Χρησιμοποιείται για να αξιολογήσει την σχέση τιμής και απόδοσης για μια ιατρική παρέμβαση.

Ο δείκτης ICER¹⁷ αντιπροσωπεύει τον λόγο μεταξύ της διαφοράς του κόστους και της διαφοράς του οφέλους μιας παρέμβασης. Μπορεί να υπολογιστεί ως: $ICER = \frac{C_1 - C_0}{E_1 - E_0}$ όπου C_1 , E_1 το κόστος και η αποτελεσματικότητα στην ομάδα εξέτασης και C_0 , E_0 το κόστος και η αποτελεσματικότητα στην ομάδα ελέγχου. Το κόστος συνήθως ερμηνεύεται σε νομισματικές μονάδες, ενώ η αποτελεσματικότητα μπορεί να μετρηθεί σύμφωνα με την κατάσταση της υγείας. Επί παραδείγματι, αν το κόστος και το κέρδος είναι αντίστοιχα \$140.000 και 3.5 QALY, θα αποδοθεί μια τιμή \$40.000/QALY. Αυτές οι τιμές χρησιμοποιούνται από τους υπεύθυνους διαμόρφωσης της πολιτικής και από τους διοικητές των νοσοκομείων για τον προσδιορισμό των προτεραιοτήτων κατά τον καθορισμό μιας θεραπείας για νοσηρές καταστάσεις. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η ανάλυση κόστους-χρησιμότητας μετρά την γενική χρησιμότητα μιας θεραπείας ή μιας παρέμβασης στο γενικό πληθυσμό, έτσι τα αποτελέσματα της δεν παρέχουν απόλυτη ένδειξη της αξίας μιας συγκεκριμένης θεραπείας.

Σε πολλές χώρες λόγω αποφάσεων από την κάθε κυβέρνηση, γίνεται καθολικά χρήση αδρανοποιημένων παραγώγων αίματος, αφού η σχέση κόστους-ωφέλειας της αδρανοποίησης είναι δευτερευούσης σημασίας απέναντι στην νομική δέσμευση διάθεσης του κατάλληλου προϊόντος. Η σχέση κόστους-ωφέλειας της αδρανοποίησης εξαρτάται από ορισμένους παράγοντες, όμως για παράδειγμα από τις ήδη εφαρμοσμένες πρακτικές ασφάλειας έναντι των λοιμωδών κινδύνων, από την αποτελεσματικότητα κάθε μεθοδολογίας καθώς και από τις πιθανές παρενέργειες αυτών.

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 1994 για το SD πλάσμα σε σχέση με το συμβατικό, υπολογίστηκε ότι μια μονάδα SD πλάσματος προσδίδει κέρδος 35 λεπτών QALY με κόστος περίπου 19 δολάρια. Οι Riedler και συν, σε μελέτη που έγινε το 2003 συμπεριέλαβαν στο παραπάνω μοντέλο και την αποφυγή του TRALI λόγω αδρανοποίησης κατέληξαν ότι σε ασθενείς κάτω των 48 ετών κυρίως, το κόστος για το SD είναι ανεκτό [193]. Σε μεταγενέστερη μελέτη αναφέρεται ότι στις ΗΠΑ η εφαρμογή του SD πλάσματος θα κοστίσει 42,5 εκατομμύρια δολάρια ετησίως και οι συγγραφείς απεφάνθησαν ότι το υψηλό κόστος και το μικρό όφελος από την εξάλειψη των γνωστών ιών είναι απαγορευτικό. Σημειώνεται ότι η καθολική εφαρμογή αδρανοποιημένων παραγώγων στις ΗΠΑ θα κοστίσει συνολικά 1,65-2,3 δισεκατομμύρια ετησίως [194].

Σε μια πρόσφατη ανάλυση σχέσης κόστους-αποτελεσματικότητας που πραγματοποιήθηκε στον Καναδά εξετάστηκε η εφαρμογή της μεθόδου αδρανοποίησης με ριβοφλαβίνη σε πλάσμα, αιμοπετάλια και ολικό αιμα. Η μελέτη περιλάμβανε δεδομένα από τρία ηλικιακά μοντέλα: συνολικός πληθυσμός, από 0-39 ετών και από 40 και πάνω.

¹⁷ ICER (Incremental cost effectiveness ratio): Αυξητική σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας. Είναι ο λόγος της μεταβολής του κόστους προς τα στοιχειώδη οφέλη μιας θεραπείας.

Το ICER ανά QALY που εξοικονομείται ήταν παρόμοιο για τους λήπτες άνω των 40 ετών. Η μέθοδος αδρανοποίησης με ριβοφλαβίνη αποδίδει ένα συνολικό ICER \$ 1.276.000 ανά QALY, όταν εφαρμόζεται στο ολικό αίμα και ένα ICER \$ 1.423.000 ανά QALY όταν εφαρμόζεται σε πλάσμα και αιμοπετάλια (Custer et al, 2010). Σε μια μονοδιάστατη μελέτη ευαισθησίας αποκαλύφθηκε ότι το μοντέλο του ολικού αίματος παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία στον κίνδυνο για βακτηριακή μόλυνση, ετήσια θνητότητα και στο κόστος PRT ανά αιμοδοσία. Όταν ο κίνδυνος βακτηριακής επιμόλυνσης είναι χαμηλός τότε ο δείκτης ICER αυξάνεται δραματικά σε \$ 2,2 εκατομμύρια ανά QALY. Αντίθετα, ένας υψηλός κίνδυνος βακτηριακής μόλυνσης έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του δείκτη ICER σε \$ 950.000. Μια χαμηλή ετήσια θνητότητα στον χρόνο των μεταγγίσεων έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του ICER σε \$ 850.000 ανά QALY. Επιπλέον, όταν το κόστος της μεθόδου αδρανοποίησης με ριβοφλαβίνη μειωθεί από \$100 σε 75\$ ανά αιμοδοσία ο δείκτης ICER θα μειωθεί κατά \$0,95 εκατομμύρια ανά QALY, ωστόσο αν η τιμή της μεθόδου αυξηθεί κατά \$125 ανά αιμοδοσία τότε ο δείκτης ICER ανά QALY θα αυξηθεί κατά \$ 1,55 εκατομμύρια.

Το πλάσμα και τα αιμοπετάλια παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στη θνητότητα στον χρόνο της μετάγγισης. Επιπλέον, η μέθοδος συλλογής των αιμοπεταλίων επηρεάζει τον δείκτη ICER. Υπάρχει υψηλότερος υπολειπόμενος κίνδυνος ανάπτυξης βακτηρίων σε παρασκευάσματα πλάσματος πλούσιο σε αιμοπετάλια σε σύγκριση με παρασκευάσματα προερχόμενα από Buffy coat ή αφαίρεσης. Επομένως τα αιμοπετάλια που παρασκευάστηκαν με αυτή την μέθοδο θα αποφέρουν μεγαλύτερο όφελος και πιο ευνοϊκό δείκτη ICER.

Οι Staginnus και Corash το 2004 διεξήγαγαν μια ανάλυση συνέπειας κόστους (cost-consequences analysis) για την χρήση του συστήματος αδρανοποίησης με την μέθοδο του **αμοτοσαλενίου** ως τεχνολογία αντικατάστασης για τη μετάγγιση αιμοπεταλίων στην Ιαπωνία. Το κόστος χρήσης αυτής της τεχνολογίας υπολογίστηκε ¥ 9.495 συμπεριλαμβανομένων των υλικών και των αναλωσίμων που σχετίζονται με το σύστημα, καθώς και το κόστος και τα υλικά για το προσωπικό ώστε να εκτελέσει την διαδικασία. Επιπλέον κόστος μπορεί να προκύψει από την ανάγκη επιπρόσθετης συλλογής αιμοπεταλίων λόγω της πιθανής απώλειας της απόδοσης των αιμοπεταλίων κατά τη διάρκεια της αδρανοποίησης. **Η εξοικονόμηση κόστους προκύπτει από την αντικατάσταση της γάμμα ακτινοβολίας για την αποφυγή του GVHD (¥ 900), από τη χρήση του προσθετικού διαλύματος των αιμοπεταλίων αντί για πλάσμα (¥ 11.014), από την κατάργηση των βακτηριακών τεστ (¥ 3.363) και από την έλλειψη ελέγχου αναδυόμενων παθογόνων, όπως ο ιός του δυτικού Νείλου (¥ 1.631). Επομένως, το καθαρό συνολικό κόστος κατά την επεξεργασία των αιμοπεταλίων με αμοτοσαλένιο υπολογίζεται περίπου ¥ 3.898 με συνέπεια την αύξηση του νοσοκομειακού προϋπολογισμού κατά 0,02%.**

Σε μια ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στην Ολλανδία εξετάστηκε η επίδραση της αδρανοποίησης με αμοτοσαλένιο σε τρεις ομάδες ασθενών (καρδιολογικούς, αιματολογικούς και παιδιατρικούς/ογκολογικούς) που υποβλήθηκαν σε μεταγγίσεις αιμοπεταλίων (23,43 και 4% των

συνολικών μεταγγίσεων αντίστοιχα) (Postma et al, 2005). Μια από τις κύριες υποθέσεις στην ανάλυση ήταν ότι η επεξεργασία με αμοτοσαλένιο είχε 100% αποτελεσματικότητα στην προστασία μετάδοσης του HIV, ηπατίτιδας Β, C και της σήψης. Ωστόσο, παθογόνοι οργανισμοί όπως ο HTLV και ιοί χωρίς περίβλημα δεν περιλήφθηκαν στην ανάλυση. Το κόστος περιλαμβάνει την ίδια την τεχνολογία, καθώς και έξοδα που σχετίζονται με την πιθανή απώλεια της απόδοσης των αιμοπεταλίων (περίπου 10%) και την απαίτηση περισσότερων μεταγγίσεων (15% περισσότερες μεταγγίσεις) για να αντισταθμιστούν οι παραπάνω απώλειες. Η σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας υπολογίζονται περίπου 554.000 ευρώ ανα έτος ζωής που επιτεύχθηκε (life year gained, LYG) στα βασικά δεδομένα (κίνδυνος σήψης 0,0325%). Όταν ο κίνδυνος για σήψη αυξήθηκε κατά 0,04%, η επίδραση της σχέσης κόστους-αποτελεσματικότητας ήταν 476.900 ευρώ ανα LYG. Παρομοίως, όταν ο κίνδυνος για σήψη μειώθηκε κατά 0,025%, η αύξηση στο κόστος ήταν μικρή με περίπου 682,700€ ανα LYG. (πίνακας 28)

Σε μια πρόσφατη μελέτη τέθηκε υπό αμφισβήτηση η εγκυρότητα των προηγούμενων μελετών κόστους-αποτελεσματικότητας. Μέτρα συμπεριλαμβανομένων της τεχνολογίας NAT και των νέων τεχνολογιών αδρανοποίησης είναι αρκετά δαπανηρά για να εφαρμοστούν, ενώ υπολογίζεται ότι ο έλεγχος μονηρών αιμοδοσιών για HIV, HCV, HBV, με την τεχνολογία NAT κοστίζει περίπου US \$ 11,2 εκατομμύρια ανά QALY. Ωστόσο αυτό το ποσοστό βασίζεται σε υποθέσεις γύρω από δεδομένα επιβίωσης που περιλαμβάνουν την επιβίωση των ληπτών αίματος από την πρώτη μετάγγιση μέχρι και πέντε έτη μετά την μετάγγιση καθώς και ένα σταθερό ρυθμό θνητότητας μετά από αυτό το χρονικό διάστημα παρόμοιο με αυτό του γενικού πληθυσμού. Οι Kamper-Jorgensen και συν το 2010 χρησιμοποίησαν στοιχεία από περισσότερους από ένα εκατομμύριο λήπτες αίματος στην Σκανδιναβία και παρακολουθούμενοι για πάνω από 20 χρόνια υπολόγισαν την επιβίωση μετά την πρώτη μετάγγιση η οποία ήταν 15,2 χρόνια σε 1.118 εκατομμύρια λήπτες, ενώ η επιβίωση μετά από οποιαδήποτε άλλη μετάγγιση ήταν 10,4 χρόνια σε 9.979 μεταγγίσεις. Η ανάλυση χρησιμοποίησε την υπόθεση της σπάνιας έκθεσης, σύμφωνα με την οποία τα προσδωκόμενα χρόνια επιβίωσης με μια μεταδιδόμενη μόλυνση από μετάγγιση είναι το άθροισμα της συχνότητας που συμβαίνει μια μετάδοση μόλυνσης μέσω μετάγγισης και της επιβίωσης του λήπτη. Με βάση αυτά τα δεδομένα οι συγγραφείς υπολόγισαν ότι στις προηγούμενες αναλύσεις έγινε μια υποτίμηση του κόστους ανα QALY που κερδίστηκε κατά 32-44%.

Υπολογιζόμενο βασικό κόστος		
INTERCEPT	Μονή δόση αιμοπεταλίων	90 € (A\$ 119)
	Διπλή δόση αιμοπεταλίων	115 € (A\$153) ή 60 € (A\$80) για μια δόση
	πλάσμα	100 € (A\$133) ή 30 € (A\$40) για μια δόση
Mirasol		US\$ 85-100 (A\$80-95)
<i>PRT ως πρόσθετη τεχνολογία</i>		
Custer 2010, Καναδάς		
<u>Πλάσμα και αιμοπετάλια με τη χρήση Mirasol (\$Can/QALY)</u>		
ICER	1.423.000	A\$ 1.360.743
<u>Ολικό αίμα με τη χρήση Mirasol (\$Can/QALY)</u>		
ICER	1.276.000	A\$1.220.142
ICER: κίνδυνος επιμόλυνσης 1:100,000	2,200,000	A\$2,103,754

ICER: κίνδυνος επιμόλυνσης 1:30,000 Staginus & Corash 2004, Ιαπωνία <u>Αιμοπετάλια με χρήση intercept (¥ jpn/QALY)</u>	950,000	A\$908,439
ICER για παιδιατρικούς ασθενείς	99,000,000	A\$1,210,051
ICER: κίνδυνος επιμόλυνσης 1:100,000	84,000,000	A\$1,026,710
ICER: κίνδυνος επιμόλυνσης 1:10,000	35,000,000	A\$427,815
ICER για ασθενείς με εγχείρηση ισχύου	1,076,000,000	A\$13,152,269
ICER: κίνδυνος επιμόλυνσης 1:100,000	1,022,000,000	A\$12,491,089
ICER: κίνδυνος επιμόλυνσης 1:10,000	702,000,000	A\$8,579,985
<u>Αδιευκρίνιστο αν η PRT αντικαθιστά ή είναι πρόσθετη τεχνολογία</u> Postma et al, Ολλανδία <u>Αιμοπετάλια με χρήση INTERCEPT (€/LYG)</u>		
Κόστος/αποτελεσματικότητα (κίνδυνος σήψης 0,0325%)	554,000	A\$735,311
Κόστος/αποτελεσματικότητα (κίνδυνος σήψης 0,04%)	476,900	A\$632,962
Κόστος/αποτελεσματικότητα (κίνδυνος σήψης 0,025%)	682,700	A\$906,108

Πίνακας 28: Σύνοψη κόστους/αποτελεσματικότητας για τις δύο μεθόδους αδρανοποίησης σε αιμοπετάλια, πλάσμα και ολικό αίμα, LYG=Life year gained.(μετατροπή νομισματικών μονάδων: 1 A\$=81.8564 ¥ , 1.04614 \$Can, 0.753909 €, 1.05766 \$US)

Όσον αφορά την μέθοδο της λευκαφαίρεσης, το κόστος παραμένει ένα από τα μεγαλύτερα μειονεκτήματα, αφού είναι αρκετά μεγάλο. Το κόστος που προκύπτει από την καθολική εφαρμογή της λευκαφαίρεσης έχει γίνει αντικείμενο συζήτησης στις ΗΠΑ, αφού αναφέρεται ότι προτείνεται ένα κόστος της τάξεως των \$ 600 εκατομμυρίων το χρόνο χωρίς να έχει εξηγηθεί επαρκώς [195]. Ως εκ τούτου δεν είναι ξεκάθαρο πότε αυτό είναι κόστος κοινότητας ή καθαρό κόστος ή ακαθάριστο κόστος κτλ. Επομένως, για να παρθεί μια αμερόληπτη, πλήρως ενημερωμένη απόφαση είναι απαραίτητο να ποσοτικοποιηθεί το πραγματικό κόστος κοινότητας της εφαρμογής μιας πολιτικής καθολικής λευκαφαίρεσης. Προσφάτως εφαρμόστηκε στην Ρόδο καθολική προ-αποθήκευση λευκαφαίρεση. Όλα τα παρασκευάσματα ερυθρών αιμοσφαιρίων παράχθηκαν από διήθηση “εν σειρά” (in line filtration) από ολικό αίμα ή από συμπυκνώματα ερυθροκυττάρων. Το συνολικό κόστος παραγωγής υπολογίστηκε περίπου \$ 1.466.250 αλλά το καθαρό κόστος ήταν, το πολύ, \$ 1.136.250 . Από το παραπάνω προκύπτει ότι στις ΗΠΑ-με υπολογιζόμενα πληθυσμό 281 εκατομμύρια (το έτος 2001)- το κοινοτικό κόστος παραγωγής είναι περίπου \$ 319 εκατομμύρια, ποσό που αντιστοιχεί στο μισό του συνολικού κόστους που αναφέρθηκε παραπάνω [196,197]. Όσον αφορά την εξοικονόμηση κόστους , σχετίζεται με την βελτίωση της αποτελεσματικότητας των υπηρεσιών μετάγγισης και του νοσηλευτικού προσωπικού, όπου γίνεται περαιτέρω μείωση του καθαρού κοινοτικού κόστους, ωστόσο είναι απίθανο η εξοικονόμηση αυτή σε χρόνο, πόρους και προσπάθεια, να αντισταθμίσει το αυξημένο κατασκευαστικό κόστος που προκύπτει από την κοινότητα.

Ένα σημαντικό ζήτημα είναι αυτό της καθολικής λευκαφαίρεσης προ αποθήκευσης, ως στρατηγική ελαχιστοποίησης του κλινικού κόστους. Έχει υπολογιστεί ότι, αν μόνο το 3% των χειρουργικών ασθενών έχουν επιτυχημένη έκβαση πχ. μείωση των μετεγχειρητικών λοιμώξεων ή μείωση των συμβαμάτων που σχετίζονται με την μετάγγιση, τότε κατά μέσο όρο οι ασθενείς που επωφελούνται πρέπει να επιτύχουν μια εξοικονόμηση κόστους περίπου \$ 4000 ο καθένας, ώστε να εξουδετερώσουν το \$ 1.000.000 που αντιστοιχεί στα έξοδα του καθαρού κόστους παραγωγής. Τα δημοσιευμένα δεδομένα

αναφέρουν ότι αυτός ο πληθυσμός ασθενών που επωφελούνται από την λευκαφαίρεση, είναι η κατά προσέγγιση εξοικονόμηση κόστους που επιτυγχάνεται [198,199].

Το 2005 το εθνικό ινστιτούτο υγείας και κλινικής υπεροχής (National Institute Health and Clinical Excellence, NICE) έθεσε ένα κατώτερο όριο £ 30,000 ανα QALY για το αποδεκτό κόστος θεραπείας. Οι θεραπείες που κοστίζουν λιγότερο από αυτό το κατώτερο όριο ανα QALY θεωρούνται οικονομικά αποδοτικές. Στις ανεπτυγμένες χώρες, όπου ο υπολειπόμενος κίνδυνος μετάδοσης των γνωστών παθογόνων είναι μικρός, η σχέση κόστους/ωφέλειας είναι πολύ μεγαλύτερη από το όριο των 100.000 δολαρίων/ QALY. Το κόστος όμως διαμορφώνεται ανάλογα με τις μεταβλητές που λαμβάνονται υπόψη σε κάθε μελέτη και η σχέση κόστους/οφέλειας κυμαίνεται από 289.000 έως 7.000.000 δολάρια/ QALY. Ωστόσο το μοντέλο μελετών τροποποιείται, αν εισχωρήσουν και παράμετροι που αφορούν:

- τον μη αποκλεισμό των αιμοδοτών για ταξιδιωτικούς ή γεωγραφικούς λόγους.
- Τον περιορισμό ελέγχου για το τρεπόννημα, για τα παθογόνα με μικρό τίτλο και μεγάλη λογαριθμική μείωση, για τους ιούς που είναι ευαίσθητοι στις τεχνολογίες αδρανοποίησης και τα τεστ που είναι υπό αμφισβήτηση όπως οι CMV, και HTLV, για τους παράγοντες που είναι ευαίσθητοι στις τεχνολογίες αδρανοποίησης και τα τεστ δεν έχουν μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα όπως για τα βακτήρια.
- Τις μη λοιμώδεις επιπλοκές όπως TRALI και TA-GVHD.
- Την διακοπή της γ-ακτινοβολίας των προϊόντων.

Ωστόσο, όσον αφορά τις θεραπείες και τις τεχνολογίες που κοστίζουν πάνω από αυτό το όριο είναι απαραίτητο να βρεθεί μια ισορροπία μεταξύ του κόστους και του οφέλους/κινδύνου. Γενικότερα οι τεχνολογίες μείωσης παθογόνων είναι αρκετά αποτελεσματικές όμως όταν χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα μέσα, δεν είναι οικονομικώς αποδοτικές σύμφωνα με τις έρευνες. **Ωστόσο, σε περίπτωση γενικής καθιέρωσης τεχνικών αδρανοποίησης θα μπορούσε να αλλάξει η πολιτική για τον έλεγχο του αίματος αν χρησιμοποιηθούν ως μοναδικές διαδικασίες ελέγχου χωρίς την πρόσθετη χρήση άλλων τεχνολογιών. Με αυτό το τρόπο είναι φανερό ότι το κόστος μειώνεται χαρακτηριστικά με αποτέλεσμα οι τεχνολογίες αδρανοποίησης παθογόνων να γίνουν οικονομικά αποδοτικές.**

4.1 Νεότερα Δεδομένα

Αναφορικά με τα ερυθρά και το ολικό αίμα υπάρχουν ακόμα προβληματισμοί, αφού δεν υπάρχει ιδανική τεχνολογία αδρανοποίησης παθογόνων ακόμα, ωστόσο όσον αφορά την επεξεργασία με υδροχλωρικό αμοτοσαλένιο, έχουν ολοκληρωθεί κλινικές μελέτες φάσης III στην Ευρώπη για τους ασθενείς με οξεία αναιμία και μια ακόμα κλινική μελέτη φάσης III για ασθενείς με χρόνια αναιμία βρίσκεται σε εξέλιξη. Επιπλέον, σχεδιάζεται το δεύτερο μισό του έτους 2016 να ξεκινήσει η ανάπτυξη δραστηριοτήτων καθώς και χημικές, κατασκευαστικές διαδικασίες αλλά και διαδικασίες ελέγχου για να μπορεί να υποστηριχθεί μια προβλεπόμενη έγκριση CE για το σύστημα αδρανοποίησης ερυθρών αιμοσφαιρίων. Σε εξέλιξη βρίσκονται και μελέτες για την εφαρμογή UVC ακτινοβολίας στα αιμοπετάλια και στο πλάσμα όπως αυτά περιγράφονται σε αντίστοιχα κεφάλαια.

5.1 Συμπεράσματα

Οι τεχνολογίες αδρανοποίησης αποτελούν ένα ακόμα επίπεδο προστασίας για την ασφαλή μετάγγιση αίματος. Το ιδανικό προϊόν αδρανοποίησης θα έπρεπε να βρίσκει εφαρμογή σε όλα τα παράγωγα του αίματος, να αδρανοποιεί όλους τους λοιμώδεις παράγοντες, να μην είναι τοξικό, να μην επηρεάζει την δραστηριότητα των στοιχείων του αίματος, να έχει ευκολία στις εφαρμογές, ασφαλές και για τους χειριστές και για τον λήπτη και να έχει ανεκτό κόστος. Αν και μέχρι στιγμής προϊόν με τις παραπάνω προδιαγραφές δεν υπάρχει, ωστόσο κάθε χρόνος που περνάει γίνονται σημαντικά βήματα για την εξέλιξη των τεχνολογιών στο πλάσμα και στα αιμοπετάλια και τα ερυθρά αιμοσφαίρια/ολικό αίμα. Μέχρι τώρα, οι διαθέσιμες τεχνολογίες αδρανοποιούν αποτελεσματικά τους παθογόνους οργανισμούς με εξαίρεση ορισμένους ιούς χωρίς περίβλημα.

Με την πάροδο των χρόνων έχει συγκεντρωθεί αρκετή κλινική εμπειρία μέσω των συστημάτων αιμοεπαγρύπνησης κάθε χώρας ή μέσω φαρμακευτικών εταιρειών, όμως δεν υπάρχουν καλά τεκμηριωμένες συγκριτικές κλινικές μελέτες για τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της κάθε μεθόδου. Ωστόσο, ανησυχίες σχετικά με δυσμενείς τοξικολογικές συνέπειες ή σχηματισμός νεοαντιγόνων δεν έχουν επιβεβαιωθεί όσον αφορά τα παράγωγα που έχουν λάβει άδεια χρήσης. Σε πολλές Ευρωπαϊκές χώρες είναι υποχρεωτική η εφαρμογή των διαδικασιών αδρανοποίησης στο πλάσμα και στα αιμοπετάλια, ως προληπτική ενέργεια έναντι των νέων παθογόνων. Αντίθετα στην Αμερική και τον Καναδά δεν εφαρμόζονται ακόμα. Η επιστημονική κοινότητα κάθε χώρας ξεχωριστά αλλά και σε συνεργασία με άλλες, οφείλει να αξιολογήσει τα δεδομένα των σύγχρονων μεθόδων αδρανοποίησης και

να προωθήσει πολυκεντρικές συγκριτικές κλινικές μελέτες για την αποτελεσματικότητα των αδρανοποιημένων παραγώγων αίματος με στόχο τη σύσταση κατευθυντήριων οδηγιών για τη χρήση των εν λόγω παραγώγων. Τέλος, η επιλογή του εθελοντή μη-αμειβόμενου δότη, η εφαρμογές των τρεχουσών εργαστηριακών δοκιμάσιων και τεχνικών αδρανοποίησης αλλά και η ανάπτυξη νέων τεχνικών αποτελούν τα τρία τείχια για την μέγιστη δυνατή ασφάλεια του μεταγγιζόμενου αίματος.

1. Αιμοδοσία: Ύμνος στην κοινωνία. Θεόδωρος Α. Σπανός,. 2011
2. www.eae.gr
3. Μεταδιδόμενα με το αίμα παθογόνα, Μαγδαληνή Παπέ, 2011
4. emerging pathogen –how safe is blood, Michael Schmidt, wolf-jochen Geilenkeuser, Walid Sireis, et al., 2014 article transfusion medicine an hemotherapy
5. La Ruche G, Souares Y, Armengaud A, Peloux-Petiot F, Delaunay P, Despres P, Lenglet A, Jourdain F, Leparc-Goffart I, Charlet F, Ollier L, Mantey K, Mollet T, Fournier JP, Torrents R, Leitmeyer K, Hilairet P, Zeller H, Van Bortel W, Dejour-Salamanca D, Grandadam M, Gastellu-Etchegorry M. First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Euro Surveill.*2010;15:19676.
6. Wilson LS, Ramsey JM, Koplowicz YB, Valiente-Banuet L, Motter C, Bertozzi SM, Tobler LH. Cost-effectiveness of implementation methods for ELISA serology testing of *Trypanosoma cruzi* in California blood banks. *AmJ Trop Med Hyg.* 2008;79:53–68.
7. screening donated blood for transfusion transmissible infection, recommendations. World health organization.02010
8. illyer CD, Josephson CD, Blajchman MA, Vostal JG, Epstein JS, Goodman JL: Bacterial contamination of blood components: risks, strategies, and regulation: joint ASH and AABB educational session in transfusion medicine. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2003, 575-589.
9. American Association of Blood Banks: Guidance on implementation of new bacteria reduction and detection standards .*AABB Bulletin* 2004., 04(07)
10. Hogman CF, Engstrand L: Serious bacterial complications from blood components--how do they occur? *Transfus Med* 1998, 8(1):1-3
11. Wagner SJ: Transfusion-transmitted bacterial infection: risks, sources and interventions. *Vox Sang* 2004, 86(3):157-163.
12. 12 Brecher ME, Hay SN: Bacterial contamination of blood components. *Clin. Microbiol. Rev* 2005, 18(1):195-204.
13. Kingdom HS, Lundblad RL. An adventure in biotechnology: the development of haemophilia A therapeutics from whole blood transfusion to recombinant DNA to gene therapy. *Biotechnol Appl Biochem* 35: 141-148, 2002
14. Pattison CB et al. An outbreak of type B hepatitis associated with transfusion of plasma protein fraction. *American journal of Epidemiology*, 1976, 103:399-407.

15. Mannucci PM, Colombo M, Rodeghiero F. Non-A, non-B hepatitis after factor VIII concentrate treated by heating and chloroform. *Lancet*. 1985;2:1013.
16. Mariani G, Ghirardini A, Mandelli F, et al. Heated clotting factors and seroconversion for human immunodeficiency virus in three hemophilic patients. *Ann Intern Med*. 1987;107:113.
17. Skidmore SJ, Pasi KJ, Mawson SJ, Williams MD, Hill FG. Serological evidence that dry heating of clotting factor concentrates prevents transmission of non-A, non-B hepatitis. *J Med Virol*. 1990;30:50–52.
18. Azzi A, Ciappi S, Zakvrzewska K, Morfini M, Mariani G, Mannucci PM. Human parvovirus B19 infection in hemophiliacs first infused with two high-purity, virally attenuated factor VIII concentrates. *Am J Hematol*. 1992;39:228–230.
19. Blajchman MA. The clinical benefits of the leukoreduction of blood products. *J Trauma*. 2006 Jun;60(6Suppl):S83:S90
20. Diepenhorst P, Engelfriet CP. Removal of leucocytes from whole blood and erythrocytes suspension by filterations through cotton wool. V, Results after transfusion of, units of filtered erythrocytes. *Vox Sang*. 1975;29:15–8. [PubMed: 1079986]
21. Novotny VM, van Doorn R, Witvliet MD, Claas FH, Brand A, et al. Occurrence of allogenic HLA and non HLA antibodies after transfusions of Prestorage filtered platelets and red blood cells: A Prospective study. *Blood*. 1995;85:1736–41. [PubMed: 7703481]
22. Heddle NM, Blajchman MA, Meyer RM, Lipton JH, Walker IR, Sher GD, et al. A randomized controlled trial comparing the frequency of acute reactions to plasma -removed platelets and Prestorage WBC- reduced platelets. *Transfusion*. 2002;42:556–66. [PubMed: 12084163]
23. Muylle L, Joos M, Wouters E, De Bock R, Peetermans ME. Increased tumor necrosis factor alpha (TNF alpha), interleukin 1, and interleukin 6 (IL-6) levels in the plasma of stored platelet concentrates: Relationship between TNF alpha and IL-6 levels and febrile transfusion reactions. *Transfusion*. 1993;33:195–9. [PubMed: 8438219]
24. Williamson LM, Wimperis JZ, Williamson P, Copplestone JA, Gooi HC, Morgenstern GR, et al. Besides filtration of blood products in the prevention of HLA alloimmunization—a prospective randomized study. *Blood*. 1994;83:3028–35. [PubMed: 8180400]
25. . Sintnicolaas K, van Marwijk Kooij M, van Prooijen HC, van Dijk BA, van Putten WL, Claas FH, et al. Leukocyte depletion of random single- donor platelet transfusions does not prevent secondary human leukocyte antigen- alloimmunization and refractoriness: A randomized prospective study. *Blood*. 1995;85:824–8. [PubMed: 7833483]
26. Dzik WH, Anderson JK, O'Neill EM, Assmann SF, Kalish LA, Stowell CP. A prospective, randomized clinical trial of universal WBC reduction. *Transfusion*. 2002;42:1114–22. [PubMed: 12430666]
27. Paglino JC, Pomper GJ, Fisch GS, Champion MH, Snyder EL. Reduction of febrile but not allergic reactions to red cells and platelets following conversion to universal Prestorage leukoreduction. *Transfusion*. 2004;44:16–24. [PubMed: 14692962]
28. King KE, Shirey RS, Thoman SK, Bensen-Kennedy D, Tanz WS, Ness PM. Universal leukoreduction decreases the incidence of febrile nonhemolytic reactions to red cells. *Transfusion*. 2004;44:25–9. [PubMed: 14692963]

29. Edvardsen L, Taaning E, Mynster T, Hvolris J, Drachman O, Nielsen HJ. Bioactive substance in buffy-coat-derived platelet pools stored in platelet-additive solutions. *Br J Haematol.* 1998;103:445–8. [PubMed: 9827918]
30. Wortham ST, Ortalano GA, Wenz B. A brief history of blood filtration: clot screens, microaggregates removal, and leukocyte reduction. *Transfus Med Rev.* 2003 Jul;17(3):216-22.
31. Engelfriet CP. International forum. Universal leukocyte depletion of blood components: cell concentrates and plasma. *Vox Sang.* 2001;81:56- 77.
32. Thurer RL, Luban NL, AuBuchon JP, Silver H, McCarthy LJ, Dzik S, et al. Universal WBC reduction (letters). *Transfusion.* 2000 Jun;40(6):751-2
33. Viresolve. Virus and Application Filtration Guide, 2002, Millipore.
34. Manabe S, Tsurumi T, Ishikawa G et al. Mechanism of human immunodeficiency virus (HIV) removal by regenerated cellulose hollow fiber (BMM). *Membrane* 1989; 14: 77–83.
35. Manabe SI, Kamata Y, Iijima H, Kamide K. Some morphological characteristics of porous polymeric membranes prepared by micro-phase separation method. *Polymer J* 1987; 19: 391–404.
36. Ide S. Development of new Planova membrane – the Planova 2ON filter. Planova Workshop Japan, A Forum for Exchanging Information on the Latest Developments in Virus Removal Filtration. Tokyo: Asahi Kasei Corporation, November 1, 2000.
37. Viresolve NFP filters. Data Sheet. Millipore 9/1/2001
38. Validation Guide VG-DV20, Pall ULTIPOR VF Grade DV20 AB style virus removal filter cartridges. Pall BioPharmaceuticals, 2000
39. Prince AM, Horowitz B, Brotman B: Sterilization of hepatitis and HTLV-III viruses by exposure to tri(n-butyl)phosphate and sodium cholate. *Lancet* 1986;i:706–710.
40. Dichtelmüller HO, Biesert L, Fabbrizzi F, Gajardo R, Gröner A, von Hoegen I, Jorquera JI, Kempf C, Kreil TR, Pifat D, Osheroff W, Poelsler G: Robustness of solvent/detergent treatment of plasma derivatives: a data collection from Plasma Protein Therapeutics Association member companies. *Transfusion* 2009;49:1931–1943.
41. Pelletier JPR, Transue S, Snyder EL: Pathogen inactivation techniques. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006;19:205–242
42. Hellstern P, Sachse H, Schwinn H, Oberfrank K: Manufacture and in-vitro characterization of solvent/detergent-treated plasma. *Vox Sang* 1992;63: 178–185
43. Bonomo RJ: Removal of process chemicals from labile biological mixtures by hydrophobic interaction chromatography. US Patent 5.094.960. Washington, DC, US Patent Office, 1992

44. Horowitz B: United States: solvent/detergent plasma; in AuBuchon JP, Prowse CV (eds): Pathogen Inactivation: The Penultimate Paradigm Shift. Bethesda, AABB Press, 2010, pp 217–228.
45. Woods KR, Orme TW: Removal of lipid soluble process chemicals from biological materials by extraction with naturally occurring oils or synthetic substitutes thereof. US Patent 4.789.545, Washington, DC, US Patent Office, 1988
46. Γαβαλάκη Μαρία, Μέθοδοι αδρανοποίησης αίματος και παραγώγων.
47. Chabanel A, Sensebé L, Masse M, Maurel JP, Plante J, Hivet D, Kannengiesser C, Naegeken C, Joussemet M, Marchesseau B, Rasongles P, Proust F, David C, Montembault AM, Bergeat P: Quality assessment of seven types of fresh-frozen plasma leucoreduced by specific plasma filtration. *Vox Sang* 2003;84:308–317
48. Hanson CV. Photochemical inactivation of viruses with psoralens: an overview *BloodCells*. 1992;18:7–25
49. Lin L, Cook DN, Wieseahn GP, et al. Photochemical inactivation of viruses and bacteria in platelet concentrates by use of a novel psoralen and long wavelength ultraviolet light. *Transfusion*. 1997;37:423–435.
50. Corash L, Lin L, Wieseahn G. Use of 8-methoxypsoralen and long wavelength ultraviolet radiation for decontamination of platelet concentrates. *Blood Cells*. 1992;18:57–73
- 51 Dardare N, Platz MS. Binding affinities of commonly employed sensitizers of viral inactivation. *Photochem Photobiol*. 2002;75:561–564.,
52. US Food and Drug Administration. Vitamin B, 21 CFR 582.5695 (1998).
53. Corash L. Helinx technology for inactivation of infectious pathogens and leukocytes in labile blood components: from theory to clinical application. *Transfus. Apher Sci*. 2001;25:179–181.
- 54 Brackmann HH, Egli H. Acute hepatitis B infection after treatment with heatinactivated factor VIII concentrate. *Lancet*, 1988, ii:967
- 55, Uemura, Y. et al., “Inactivation and Elimination of Viruses During Preparation of Human Intravenous Immunoglobulin,” *Vox Sang*. 67(3), 246–254 (1994).
- 56 Adcock, W.L. et al., “Chromatographic Removal and Heat Inactivation of Hepatitis B Virus During the Manufacture of Human Albumin,” *Biotechnol. Appl. Biochem*. 28(Pt 2), 169–178 (October 1998).
- 57 Adcock, W.L. et al., “Chromatographic Removal and Heat Inactivation of Hepatitis A Virus During Manufacture of Human Albumin,” *Biotechnol. Appl. Biochem*. 28(Pt 1), 85–94 (August 1998).
- 58 Biescas, H. et al., “Characterization and Viral Safety Validation Study of a Pasteurized Therapeutic Concentrate of Antithrombin III Obtained Through Affinity Chromatography,” *Haematologica* 83(4), 305–311 (April 1998).
- 59 Barrett, P.N. et al., “Determination of the Inactivation Kinetics of Hepatitis A Virus in Human Plasma Products Using a Simple TCID50 Assay,” *J. Med. Virol*. 49(1), 1–6 (May 1996).

- 60 Hilfenhaus, J. and Nowak T., "Inactivation of Hepatitis A Virus by Pasteurization and Elimination of Picornaviruses During Manufacture of Factor VIII Concentrate," *Vox Sang.* 67(Suppl. 1), 62–66 (1994).
- 61 Schwarz, T.F. et al., "Heat Stability of Parvovirus B19: Kinetics of Inactivation," *Zentralbl. Bakteriol.* 277(2), 219–223 (July 1992).
- 62 Nowak, T., Klockman U., and Hilfenhaus, J., "Inactivation of Viruses Related to Hepatitis C Virus by Pasteurization in Human Plasma Derivatives," *Biologicals* 20(1), 83–85 (March 1992).
- 63 Coan, M.H. et al., "Characterisation and Virus Safety of Alpha 1-Proteinase Inhibitor," *Eur. Respir. J. Suppl.* 9, 35s–38s (March 1990).
- 64 Siegl, G., Weit, M., and Kronauer, G., "Stability of Hepatitis A Virus," *Intervirology* 22, 218–226 (1984).
- 65 Biesert, L. et al., "Viral Safety of a New Highly Purified Factor VIII (OCTATE)," *J. Med. Virol.* 48(4), 360–366 (April 1996).
- 66 Savage, M. et al., "Determination of Adequate Moisture Content for Efficient Dry-Heat Viral Inactivation in Lyophilized Factor VIII by Loss on Drying and by Near Infrared Spectroscopy," *Biologicals* 26(2), 119–124 (June 1998).
67. Hart, H.F. et al., "Effect of Terminal (Dry) Heat Treatment on Non-Enveloped Viruses in Coagulation Factor Concentrates," *Vox Sang.* 67(4), 345–350 (1994).
- 68, Knevelman, A. et al., "Development and Small- Scale Production of a Severely Heated Factor VIII Concentrate," *Vox Sang.* 66(2), 89–95 (1994).
- 69 Santagostino, E. et al., "Transmission of Parvovirus B19 by Coagulation Factor Concentrates Exposed to 100 Degrees C Heat After Lyophilization,"
- 70 Dichtelmuller, H. et al., "Improvement of Virus Safety of an S/D-Treated Factor VIII Concentrate by Additional Dry Heat Treatment at 100 Degrees C," *Biologicals* 24(2), 125–130 (June 1996).
- 71, Barrett, P.N. et al., "Inactivation of Hepatitis A Virus in Plasma Products by Vapor Heating," *Transfusion* 37(2), 215–220 (February 1997).
72. Barrett, P.N. et al., "Determination of the Inactivation Kinetics of Hepatitis A Virus in Human Plasma Products Using a Simple TCID50 Assay," *J. Med. Virol.* 49(1), 1–6 (May 1996).
73. Epstein, J.S. and Fricke, W.A., "Current Safety of Clotting Factor Concentrates," *Arch. Pathol. Lab. Med.* 114(3), 335–340 (March 1990).
74. Biesert L, Shartono H: Solvent/detergent treatment of human plasma – a very robust method for virus inactivation. Validation of virus safety of Octaplas. *Vox Sang* 1998;74(suppl 1):207–212.

75. Piquet Y, Janvier G, Selosse P, Doutremepuich C, Jouneau J, Nicolle G, Platel D, Vezon G: Virus inactivation of fresh frozen plasma by a solvent detergent procedure: biological results. *Vox Sang* 1992; 63:251–256
76. Solheim BG, Rollag H, Svennevig JL, Arafa O, Fosse E, Bergerud U: Viral safety of solvent/detergent-treated plasma. *Transfusion* 2000;40:84–90
77. Pamphilon, D., "Viral inactivation of Fresh Frozen Plasma," *Br. J. Haematol.* 109(4), 680–693 (June 2000).
78. Griffith, M., "Ultrapure Plasma Factor VIII Produced by Anti-F VIII C Immunoaffinity Chromatography and Solvent/Detergent Viral Inactivation: Characterization of the Method M Process and Hemofil M Antihemophilic Factor (Human)," *Ann. Hematol.* 63(3), 131–137 (September 1991).
79. Horowitz, B. et al., "Virus Inactivation by Solvent/Detergent Treatment and the Manufacture of SD-Plasma," *Vox Sang.* 74 (Suppl 1), 203–206 (1998).
80. Eriksson, B., Westman L., and Jernberg M. "Virus Validation of Plasma-Derived Products Produced by Pharmacia, with Particular Reference to Immunoglobulins," *Blood Coagul. Fibrinolysis* 5(Suppl. 3), S37–S44 (December 1994).
81. Burnouf-Radosevich M, Appourchaux P, Huart JJ, Burnouf T. Nanofiltration, a new specific virus elimination method applied to high-purity factor IX and factor XI concentrates. *Vox Sang* 1994; 67: 132–8.
82. Burnouf T, Michalski C, Goudemand M, Huart JJ. Properties of a highly purified human plasma factor IX:C therapeutic concentrate prepared by conventional chromatography. *Vox Sang* 1989; 57: 225–32.
83. Goudemand J, Peynet J, Chambost H et al. A crossover pharmacokinetic study of a double viral inactivated factor IX concentrate (15 nm filtration and SD) compared to a SD factor IX concentrate. *Thromb Haemost* 1998; 80: 919–24.
84. Mannucci PM, Tradati F. Preliminary evaluation of a nanofiltered factor IX concentrate. *Thromb Haemost* 1995; 73: 737–8.
85. Yunoki M. Usefulness of Planova_ filtration in virus inactivation/removal. Planova_ Workshop Japan, A Forum for Exchanging Information on the Latest Developments in Virus Removal Filtration. Tokyo: Asahi Kasei Corporation, November 1, 2000.
86. Pejaudier L, Kichenin-Martin V, Boffa MC, Steinbuch M. Appraisal of the protein composition of prothrombin complex concentrates of different origins. *Vox Sang* 1987; 52: 1–9.
87. Josic D, Hoffer L, Buchacher A et al. Manufacturing of a prothrombin complex concentrate aiming at low thrombogenicity. *Thromb Res* 2000; 100: 433–41.
88. Over J. Nanofiltration, the EPFA experience. Planova Workshop, To Meet and Exchange Information on the Latest Developments in Virus Removal Technology. Oslo: Asahi Chemical Industry Co. Ltd, June 27, 1998:5–15.
89. Maeno H. Improvements of viral safety in plasma derivatives by introduction of Planova_ filtration and its remaining problems. Planova_ Workshop Japan, A Forum for Exchanging Information on the Latest Developments in Virus Removal Filtration. Tokyo: Asahi Kasei Corporation, November 1, 2000: 21–37.

90. Burnouf T, Burnouf-Radosevich M, Huart JJ, Goudemand M.A highly purified factor VIII:c concentrate prepared from cryoprecipitate by ion-exchange chromatography. *Vox Sang* 1991; 60: 8–15.
91. Rothschild F, Alcalay M, Bertrand MA et al. Factor VIII SD-35-15: Preliminary Results of a Cross-Over Pharmacokinetic Study of SD and 35–15 nm Filtered Factor VIII Concentrate Compared to Reference Product (SD Factor VIII Concentrate)). XVII Congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis, August 1999. (Abstract)
92. Hong F, Ruiz R, Price H, Griffiths A, Malinoski F, Woloski M. Safety profile of WinRho anti-D. *Semin Hematol* 1998; 35: 9–13.
93. Will RG, Ironside JW, Zeidler M et al. A new variant of Creutzfeldt–Jakob disease in the UK. *Lancet* 1996; 247: 921–5.
94. Bruce ME, Will RG, Ironside JW et al. Transmission to mice indicates that new variant CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 1997; 389: 498–501.
95. Hilton DA, Ghani AC, Conyers L et al. Accumulation of prion protein in tonsil and appendix: review of tissue samples. *Br Med J* 2002; 325: 633–4.
96. Stramer SL, Hollinger FB, Katz LM, Kleinman S, Metzler PS, Gregory KR, Dodd RY: Emerging infectious disease agents and their potential threat to transfusion safety. *Transfusion* 2009;49(suppl 2):1S–29S.
97. Mohr H, Lambrecht B, Selz A: Photodynamic virus inactivation of blood components. *Immunol Invest* 1995;24:73–85.
98. Knuver-Hopf J, Mohr H: Parvovirus B19 is sensitive to photodynamic and photochemical treatment. Abstract Book VIII European Congress of the ISBT. 2003;94.
99. Knuver-Hopf J, Schaefer W, Groener A, Reichenberg S, Möller TH, Seltsam A: Human parvovirus in plasma is highly sensitive to methylene blue/light treatment. *Vox Sang* 2010;99:1–516.
100. O’Shaughnessy DF, Atterbury C, Bolton MP, Murphy M, Thomas D, Yates S, Williamson LM: Guidelines for the use of fresh-frozen plasma, cryoprecipitate and cryosupernatant. *Br J Haematol* 2004;126:11–28.
101. Williamson LM, Cardigan R, Prowse CV. Methylene blue-treated fresh-frozen plasma: what is its contribution to blood safety? *Transfusion* 2003;43:1322–9.
102. Pock K, Heger A, Janisch S, Svae TE, Romisch J. Thrombin generation capacity is impaired in methylene-blue treated plasma compared to normal levels in singledonor fresh-frozen plasma, a licensed solvent/detergent-treated plasma (Octaplas) and a development product (Uniplas). *Transfus Apher Sci* 2007;37:223–31.
103. Cardigan R, Philpot K, Cookson P, Luddington R. Thrombin generation and clot formation in methylene blue-treated plasma and cryoprecipitate. *Transfusion* 2009;49:696–703.

104. Köhler M, Wieding JU, Niehues A, Zenker D, Rathgeber J, Sonntag H, et al. Efficacy and tolerance of methylene blue/light (MB-VIP) versus solvent/detergent virus-inactivated plasma (SD-VIP) in cardiac surgery: clinical results of a prospective, randomized study. 24th International Congress of the ISBT Tokyo Japan. 1996.
105. Wieding JU, Rathgeber J, Zenker D, Pohl U, Koehler M. Prospective, randomized and controlled study solvent/detergent versus methylene blue/light virus inactivated plasma. AABB Annual Meeting. San Francisco, CA. Transfusion 1999;39(Suppl):23S.
106. Bartelmaos T, Chabanel A, Leger J, Villalon L, Gillon MC, Rouget C, et al. Plasma transfusion in liver transplantation: a randomized, double-blind, multicenter clinical comparison of three virally secured plasmas. Transfusion 2013;53: 1335–45.
107. Atance R, Pereira A, Ramirez B. Transfusing methylene blue-photoactivated plasma instead of FFP is associated with an increased demand for plasma and cryoprecipitate. Transfusion 2001;41:1548–52
108. del Río Garma J, Pereira A, Arroyo JL, Mateo J, Alvarez-Larran A, Martinez C, et al. ADAMTS-13 activity and von Willebrand factor levels in methylene-blue photoactivated plasma processed by either the Springe method or an 'in house' system. Vox Sang 2008;95:101–5.
109. Gravemann U, Reichenberg S, Mohr H, Walker WH, Möller TH: Storage stability of methylene blue-treated plasma. Vox Sang 2009;96:63–260.
110. Rodrigues JM, Pazin Filho A, Rodrigues AJ, Vicente WV, Evora PR. Methylene blue for clinical anaphylaxis treatment: a case report. Sao Paulo Med J 2007;125:60–2
111. Hambleton J, Wages D, Radu-Radulescu L, et al. Pharmacokinetic study of FFP photochemically treated with amotosalen (S-59) and UV light compared to FFP in healthy volunteers anticoagulated with warfarin. Transfusion. 2002;42: 1302–1307.
112. De Alarcon P, Benjamin R, Dugdale M, et al. Fresh frozen plasma prepared with amotosalen HCl (S-59) photochemical pathogen inactivation: transfusion of patients with congenital coagulation factor deficiencies. Transfusion. 2005;45:1362–1372.
113. Mintz PD, Bass NM, Petz LD, et al. Photochemically treated fresh frozen plasma for transfusion of patients with acquired coagulopathy of liver disease. Blood. 2006;107:3753–3760.
114. Conlan MG, Corash L, Lin J, et al. vWF cleaving protease activity and inhibitors in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) treated with INTERCEPT FFP vs. conventional FFP: results of a phase III trial. Transfusion. 2005;45:30A.
115. Buytaert-Hoefen KA, Hendrix BK, Gampp D, et al. Protein quality in Mirasol-treated fresh frozen plasma after one year in storage. Presented at the AABB Annual Meeting, Anaheim, USA, 20–23 October, 2007.
116. Antic A, Stanijakovic Z: Clinical performance of buffy coat platelets treated with riboflavin and UV light. Transfusion 2010;50 (suppl):p66A.
117. van Rhenen D, Gulliksson H, Cazenave JP, et al.: Transfusion of pooled buffy coat platelet components prepared with photochemical pathogen inactivation treatment: the euroSPRITE trial. Blood 2003; 101:2426–2433

118. Slichter SJ, Raife TJ, Davis K, et al.: Platelets photochemically treated with amotosalen HCl and ultraviolet A light correct prolonged bleeding times in patients with thrombocytopenia. *Transfusion* 2006; 46:731–740
119. McCullough J, Vesole DH, Benjamin RJ, et al.: Therapeutic efficacy and safety of platelets treated with a photochemical process for pathogen inactivation: the SPRINT Trial. *Blood* 2004; 104:1534–1541
120. Kerkhoffs JL, van Putten WL, Novotny VM, et al.: Clinical effectiveness of leucoreduced, pooled donor platelet concentrates, stored in plasma or additive solution with and without pathogen reduction. *Br J Haematol* 2010; 150:209–217
121. Kerkhoffs JL, van Putten WL, Novotny VM, et al. Clinical effectiveness of leukoreduced, pooled donor platelet concentrates, stored in plasma or additive solution with and without pathogen reduction. *Br J Haematol*. 2010; 150:209-17.
122. Vamvakas EC. Meta analysis of randomised controlled trials of the hemostatic efficacy and capacity of pathogen reduced platelets. *Transfusion* 2011;51:1058-1071
123. Vamvakas EC. Meta analysis of the studies of bleeding complications of platelets pathogen reduced with the Intercept system. *Vox Sang* 2012;102:302-316
124. Goodrich RP, Li J, Pieters h, Crookes R, Roodt J, Heyns A: Correlation of in vitro platelets quality measurements with in vivo platelets viability in human subjects. *Vox Sang* 2006;90:279-285
125. Perez-Pujol S, Tonda R, Lozano M, et al. Effects of a new pathogen reduction technology (Mirasol PRT) on functional aspects of platelets concentrates. *Transfusion* 2005;45:911-919
126. AuBuchon JP, Herscher L, Roger J, et al. Efficacy of apheresis platelets treated with riboflavin and ultra violet light for pathogen reduction . *Transfusion* 2005;45:1335-1341
127. British Committee for standards in haematology, Blood Transfusion Task Force: Guidelines for use of platelets transfusion: *Br J Haematol* 2003;122:10-23
128. Tegtmeier GE. Posttransfusion cytomegalovirus infections. *Arch Pathol Lab Med*. 1989 Mar;113(3):236-45.
129. Leukocyte reduction for the prevention of transfusion transmitted-cytomegalovirus (TT-CMV): Association bulletin 97-2. Bethesda, Md: American Association of Blood Banks. 1997;19:10-12.
130. Cesaire R, Kerob-Bauchet B, Bourdonne O, Amar KO, Halbout P, Dehee A, et al. Evaluation of HTLV-1 removal by filtration of blood cell components in a routine setting. *Transfusion*. 2004;44:42-8.
131. Zavizion B, Serebryanik D, Serebryanik I, Chapman J, Purmal A, Prevention of *Yersinia Enterocolitica*, *Pseudomonas fluorescens* and *pseudomonas putida* outgrowth in deliberately inoculated blood by a novel pathogen reduction process. *Transfusion* 2003;43:135-42
132. AuBuchon JP, Pickard CA, Herschel LH, et al. Production of pathogen-inactivated RBC concentrates using PEN110 chemistry: a phase I clinical study. *Transfusion*. 2002;42:146–152.

133. Wagner SJ. Virus inactivation in blood components by photoactive phenothiazine dyes. *Transfus Med Rev.* 2002;16:61–66.
134. Skripchenko AA, Wagner SJ. Inactivation of WBCs in RBC suspensions by photoactive phenothiazine dyes: comparison of dimethylmethylene blue and MB. *Transfusion.* 2000;40:968–975.
135. Wagner SJ, Skripchenko A, Cincotta L, Thompson-Montgomery D, Awatefe H. Use of a flexible thiopyrylium photosensitizer and competitive inhibitor for pathogen reduction of viruses and bacteria with retention of red cell storage properties *Transfusion.* 2005;45:752–760.
136. Skripchenko A, Wagner SJ, Thompson-Montgomery D, Awatefe H. Thiazole orange, a DNA-binding photosensitizer with flexible structure, can inactivate pathogens in red blood cell suspensions while maintaining red cell storage properties. *Transfusion.* 2006;46:213–219
137. Mikovits JA, Hagen K, Liu W, Hanson D, Sadowski C, Ramani VK, Lee KG, Ruscetti FW, Lin L: Inactivation of XMRV in platelet and RBC components prepared with the INTERCEPT Blood System. *Rev Antiviral Ther Infectious Dis* 2010; 8:36
138. Cancelas JA, Rugg N, Fletcher D, Pratt PG, Worsham DN, Dunn SK, Marschner S, Reddy HL, Goodrich RP: In vivo viability of stored red blood cells derived from riboflavin plus ultraviolet light treated whole blood. *Transfusion* 2011;51:1460–1468.
139. Goodrich RP, Doane S, Reddy HL: Design and development of a method for the reduction of infectious pathogen load and inactivation of white blood cells in whole blood products. *Biologicals* 2010;38:20–30
140. Owusu-Ofori S, Owusu-Ofori A, Freimanis G, Keil SD, Allain J: Riboflavin and UV illumination treatment of whole blood units in a Ghanaian blood center. *Transfusion* 2013;53(suppl): 202A–203A.
141. Dzik W. Use of leukodepletion filters for the removal of bacteria. *Immunol Invest.* 1995;24:95-115.
142. Efficacy and tolerability of a pasteurised human fibrinogen concentrate in patients with congenital fibrinogen deficiency [Wolfhart Kreuz](#), [Esther Meilib](#), [Kristiina Peter-Salonenc](#), [Sabine Haerteld](#), , [Jan Devaye](#), [Udo Krzenskf](#), [Rudolf Egbringg](#)
143. Prinoth O, Strada P. Proposta di linee guida al corretto uso dell'albumina. *Il Servizio Trasfusionale* 2002; 3: 510.
144. Dry-Heat Treatment Process for Enhancing Viral Safety of an Antihemophilic Factor VIII Concentrate Prepared from Human Plasma Kim, In Seop^{1,2*}, Yong Woon Choi^{3,4}, Yong Kang³, Hark Mo Sung^{2,3}, and Jeong Sup Shin^{3,4} *J. Microbiol. Biotechnol.* (2008), 18(5), 997–1003
145. Pelletier JPR, Transue S, Snyder EL: Pathogen inactivation techniques. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006;19:205–242.
146. Andreu G: France: Solvent/detergent plasma; in AuBuchon JP, Prowse CV (eds): *Pathogen Inactivation: The Penultimate Paradigm Shift*. Bethesda, AABB Press, 2010, pp 137–151.

147. Krusius T, Auvinen M-K, Tuimala: Introduction of Octaplas® in clinical use decreased the rate of serious adverse reactions. *Vox Sang* 2010;99(suppl 1): P-1018.
148. Murphy WG, Mikulich O: Ireland: Imported USsource solvent/detergent plasma; in AuBuchon JP, Prowse CV (eds): *Pathogen Inactivation: The Penultimate Paradigm Shift*. Bethesda, AABB Press, 2010, pp 153–167.
149. Solheim BG, Bergan A, Brosstad F, Innes R, Svennevig JL: Fibrinolysis during liver transplant is enhanced by using solvent/detergent virus inactivated plasma (ESDEP/Ocatplas®) (Letter) *Anesth Analg* 2003;96:1230–1231.
150. Solheim BG, Flesland Ψ: Norway: solvent/detergent plasma; in AuBuchon JP, Prowse CV (eds): *Pathogen Inactivation: The Penultimate Paradigm Shift*. Bethesda, AABB Press, 2010, pp 125–135.
151. Solheim BG, Hellstern P: Composition, efficacy, and safety of S/D-treated plasma. *Transfusion* 2003; 43:1176–1178.
152. Simonsen AC, Sorensen H. Clinical tolerance of methylene blue virus-inactivated plasma. A randomized crossover trial in 12 healthy human volunteers. *Vox Sang* 1999;77:210–7.
153. Dewachter P, Castro S, Nicaise-Roland P, Chollet-Martin S, Le BC, Lillo-le-Louet A, et al. Anaphylactic reaction after methylene blue-treated plasma transfusion. *Br J Anaesth* 2011;106:687–9.
154. Mertes PM, Demoly P, Alperovitch A, Bazin A, Bienvenu J, Caldani C, et al. Methylene blue-treated plasma: an increased allergy risk? *J Allergy Clin Immunol* 2012;130:808–12.
155. Seltsam A, Mueller TH. Updated hemovigilance data do not show an increased risk of allergic reaction to methylene blue-treated plasma. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:1253–4.
156. <http://ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/LAfssaps-recommande-l-arret-progressif-de-l-utilisation-du-plasmatherapeutique- traite-par-le-bleu-de-methylene-Point-d-information> Last accessed August 20, 2013.
157. Pohl U, Mohr H. Experiences in the clinical use of plasma photodynamically virus inactivated by the methylene blue/light procedure. 24th International Congress of the ISBT Tokyo Japan. 1996.
158. Nussbaumer W, Mayersbach P, Gächter E, Schennach H, Mayer W. Reduced number of adverse events with methylene blue treated plasma compared with quarantine stored plasma: a single center's 3 year experience. *Vox Sang* 2012;103(Suppl 1):44.
159. New H, Tinegate H, Hunt L, Bolton-Maggs P, Cardigan R. Methylene blue-treated plasma. Joint UKBTS/HPA Professional Advisory Committee/Serious Hazards of Transfusion (SHOT) Position Statement. <http://www.transfusionsguidelines.org.uk/Index.aspx?pageid=7737§ion=12&publication=D> . Last accessed August 20, 2013.
160. Politis C, Hantziara S, Zervou E, Parara M, Katsarou O, Fountouli K, et al. Haemovigilance for the use of methylene blue inactivated fresh frozen plasma versus quarantine plasma over the period 2007–2011 in Greece. *Transfusion* 2012;52(Suppl):174a

161. Little AD: Executive summary of safety and toxicity information: methylene blue. 1990. [http://ntp.niehs.nih.gov/?objectid = 03DB4384-0364-AB0B 5C71EF4A37D6888A](http://ntp.niehs.nih.gov/?objectid=03DB4384-0364-AB0B-5C71EF4A37D6888A)
162. Hejtmancik MR, Ryan MJ, Toft JD, Persing RL, Kurtz PJ, Chhabra RS: Hematological effects in F344 rats and B6C3F1 mice during the 13-week gavage toxicity study of methylene blue trihydrate. *Toxicol Sci* 2002;65:126-134.
163. Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom 7 th ed., 2005, pp 1-358. [www.official-documents.gov.uk/document/other/ 0117033715/0117033715.pdf](http://www.official-documents.gov.uk/document/other/0117033715/0117033715.pdf) /
164. Mohr H, Knuer-Hopf J, Lambrecht B, Scheidecker H, Schmitt H: No evidence for neoantigens in human plasma after photochemical virus inactivation. *Ann Hematol* 1992;65:224-228.
165. Ciaravino V, et al., (2003), *Vox Sanguinis*. 85: p. 171-182.
166. Ciaravino V, et al., (2009), *Transfusion*. 49: p. 985-994.
167. Hayashi M, Kishi M, Sofuni T, Ishidate M Jr: Micronucleus tests in mice on 39 food additives and eight miscellaneous chemicals. *Food Chem Toxicol* 1998;36:487-500
168. Olsen JH, Hertz H, Kjaer SK, Bautz A, Mellemkjaer L, Boice JD Jr: Childhood leukemia following phototherapy for neonatal hyperbilirubinemia (Denmark). *Cancer Causes Control* 1996;7:411-414.
169. Expert Group on Vitamins and Minerals: Revised review of riboflavin. 2002, pp 1-48. www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/reviewriboflavin.
170. BIBRA Working Group: Riboflavin and its derivatives: toxicity profile. Epscm, Surrey, BIBRA, 1990, pp 1-7.
171. Reddy H, Buytaert-Hoefen K, Hovenga N, Gampp D, White J, Goodrich R: Acute toxicity of Mirasol PRT-treated FFP in plasma exchange in dogs. *Transfusion* 2007;47(suppl):P75A.
172. Reddy HL, Dayan AD, Cavagnaro J, Gad S, Li J, Goodrich RP: Toxicity testing of a novel riboflavin-based technology for pathogen reduction and white blood cell inactivation. *Transfus Med Rev* 2008;22:133-153.
173. Ambruso DR, Thurman G, Marschner S, Goodrich RP: Lack of antibody formation to platelet neoantigens after transfusion of riboflavin and ultraviolet light treated platelet concentrates. *Transfusion* 2009;49:2631-2636.
174. Reddy HL, Dayan AD, Cavagnaro J, Gad S, Li J, Goodrich RP: Toxicity testing of a novel riboflavin-based technology for pathogen reduction and white blood cell inactivation. *Transfus Med Rev* 2008;22:133-153.
175. Mair B, Leparc GF. Hypotensive reactions associated with platelet transfusions and angiotensin- converting enzyme inhibitors. *Vox Sang*. 1998;74(1):27-30.
176. Kao KJ, Mickel M, Braine HG, Davis K, Enright H, Gernsheimer T, et al. White cell reduction in platelet concentrates and packed red cells by filtration: a multicenter clinical trial. The Trap Study Group. *Transfusion*. 1995 Jan;35(1):13-9

- 177 Vamvakas EC. Meta-analysis of randomized controlled trails of the efficacy of white cell reduction in preventing HLA-alloimmunization and refractoriness to random-donor platelet transfusions. *Transfus Med Rev.* 1998;12(4):258-270.
178. Cancelas J, Rugg N, Worsham DN, Pratt GP, Dunn SK, Reddy H, Fletcher D, Goodrich RP: Quality assessment of stored RBC after treatment of whole blood with the Mirasol System. *Transfusion* 2010;50(suppl):p71A
179. Goodrich RP, Doane S, Reddy HL: Design and development of a method for the reduction of infectious pathogen load and inactivation of white blood cells in whole blood products. *Biologicals* 2010;38:20–30
180. Dzieczkowski, JS, Barrett BB , Nester D, Campbbell M, Cook J, Surgue M, et al. Characterization of reactions after exclusive transfusion of white cell-reduced cellular blood components. *Transfusion.* 1995 Jan;35(1):20-5.
181. Tartter PI , Mohandas K, Azar P, Endres J, Kaplan J, Spivack M. Randomized trial comparing packed red cell blood transfusion with and without leukocyte depletion for gastrointestinal surgery. *Am J Surg.* 1998 Nov;176(5):4626.
182. Houbiers JG, Brand A, van de Watering LM, Hermans J, Verwey PJ, Bijnen AB, et al. Rrandomized controlled trail comparing transfusion of leukocyte-depleted or buffy-coat-depleted blood in surgery for colorectal cancer. *Lancet.* 1994;344:573-578
183. Blajchman MA. The clinical benefits of the leukoreduction of blood products. *J Trauma.* 2006 Jun;60(6 Suppl):S83:S90.
184. van de Watering LM, Hermans J, Houbiers JG, van den Broek PJ, Bouter H, Boer F, et al. Beneficial effect of leukocyte depletion of transfused blood on postoperative complications in patients undergoing cardiac surgery: a randomized clinical trail. *Circulation.* 1998;97:562-568.
185. Vamvakas EC, Blajchman MA. Transfusionrelated immunomodulation (TRI M): An update. *Blood Rev.* In press. 2007 Sep 3.
186. Alexiou C, Tang AA, Sheppard SB, Smith DC, Livesey SA, Manro JL, et al. The effect of leucodepletion on leucocyte activation, pulmonary inflammation and respiratory index in surgery for coronary revascularisation: a prospective randomised study. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2004 Aug;26(2):294-300.
187. Paglino JC, Pomper GJ, Fisch GS, Champion MH, Snyder EL . Reduction of febrile but not allergenic reactions to RB Cs and platelets after conversion to universal prestorage leukoreduction. *Transfusion.* 2004;44(1):16-24.
- 188 King KE , Shirley RS, Thomas SK, Bensen-Kennedy D, Tanz WS, Ness PM. Universal leukoreduction decreases the incidence of febrile nonhemolytic transfusion reactions to RB Cs. *Transfusion.* 2004 Jan;44(1):25-9.
189. Yazer MH, Podlosky L, Clarke G, Nahimiak SM. The effect of prestorage WB C reduction on the rates of febrile nonhemolytic transfusion reactions to platelet concentrates and RB C. *Transfusion.* 2004 Jan;44(1):10-5.
190. Zimrin AB, Hess JR. Current issues relating to the transfusion of stored red blood cells. *Vox Sang.* Feb 2009;96(2):93-103.

191. Anniss AM, Glenister KM, Killian JJ, Sparrow RL. Proteomic analysis of supernatants of stored red blood cell products. *Transfusion*. 2005; 45:1426-1433.
192. Gajic O, Rana R, Winters JL, et al. Transfusion-related acute lung injury in the critically ill: prospective nested casecontrol study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176:886- 891.
193. Riedler GF, Haycox AR, Duggan AK, Dakin HA. Cost effectiveness of solvent/detergent-treated fresh-frozen plasma. *Vox Sang*. 2003; 85:88-95
194. Webert K, Cserti CM, Hannon J, et al. Proceedings of a consensus conference: pathogen inactivation—making decisions about new technologies. *Transfus Med Rev*. 2008; 22:1–34
195. . Blajchman MA, Goldman M, Freedman JJ, Sher GD. Proceedings of a consensus conference: prevention of post transfusion CMV in the era of universal leukoreduction. *Transfus Med Rev*. 2001 Jan;15(1):1-20
196. Kuehnert MJ, Roth VR, Haley NR , Gregory KR , Elder, KV, Schreiber GB, et al. Bacterial contamination and blood transfusion safety: experience in the United States, 1998 through 2000. *Transfusion* 2001; 41: 1493-1499.
197. United States General Accounting Office. Blood supply: FDA oversight and remaining issues of safety. GAO/PE MD-97-1 (Washington, DC: Feb.25, 1997).
198. Blajchman MA, Goldman M, Freedman JJ, Sher GD. Proceedings of a consensus conference: prevention of post transfusion CMV in the era of universal leukoreduction. *Transfus Med Rev*. 2001 Jan;15(1):1-20
199. Transfusion reactions: Refresher and update AABB Technical/Scientific Workshop, Bethesda, Md. American Association of Blood Banks. 1996.
200. Goodrich RP. The use of riboflavin for the inactivation of pathogens in blood products. *Vox Sang*. 2000;78(suppl2):211-215
201. Reddy HL, Dayan AD, Cavagnaro J, Gad S, Li J, Goodrich RP. Toxicity testing of a novel riboflavin-based technology for pathogen reduction and white blood cell inactivation. *Transfus Med Rev*. 2008;22:133–153.
202. Ciaravino V, McCullough T, Cimino G, Sullivan T. Preclinical safety profile of plasma prepared using the INTERCEPT Blood System. *Vox Sang*. 2003;85:171–182
203. Slichter SJ, Deeg HJ, Kennedy MS. Prevention of platelet alloimmunization in dogs with systemic cyclosporine and by UV-irradiation or cyclosporine-loading of donor platelets. *Blood*. 1987;69:414–418.
204. Slichter SJ, Fish D, Abrams VK, Gaur L, Nelson K, Bolgiano D. Evaluation of different methods of leukoreduction of donor platelets to prevent alloimmune platelet refractoriness and induce tolerance in a canine transfusion model. *Blood*. 2005;105:847–854.
205. Pohler P, Lehmann J, Veneruso V, Lambrecht B, Mohr H, Mueller TH, Seltsam A. THERAFLEX UV-platelets: no evidence for intolerance and antibody formation in dogs during a 10-week safety pharmacology study. *Transfus Med Hemother*. 2009;36(suppl 1):47.

206. Mohr H, Gravemann U, Müller TH. Inactivation of pathogens in single units of therapeutic fresh plasma by irradiation with ultraviolet light. *Transfusion*.2009;49:2144–2151.
207. Solheim BG, Seghatchian J. Update on pathogen reduction technology for therapeutic plasma: an overview. *Transfus Apher Sci*.2006;35:83–90.
208. Garwood M, Cardigan RA, Drummond O, Hornsey VS, Turner CP, Young D, Williamson LM, Prowse CV. The effect of methylene blue photoinactivation and methylene blue removal on the quality of fresh-frozen plasma. *Transfusion*.2003;43:1238–1247.
209. Shanwell A, Diedrich B, Falker C, Jansson B, Sandgren P, Sundkvist L, Svensson L, Vesterinen M, Gulliksson H. Paired in vitro and in vivo comparison of apheresis platelet concentrates stored in platelet additive solution for 1 versus 7 days. *Transfusion*.2006;46:973–979.
210. Dijkstra-Tiekstra MJ, Pietersz RN, Huijgens PC. Correlation between the extent of platelet activation in platelet concentrates and in vitro and in vivo parameters. *Vox Sang*.2004;87:257–263.
211. Berger G, Hartwell DW, Wagner DD. P-Selectin and platelet clearance. *Blood*.1998;92:4446–4452.
212. Cardigan R, Turner C, Harrison P. Current methods of assessing platelet function: relevance to transfusion medicine. *Vox Sang*.2005;88:153–163.
213. Goodrich RP, Li J, Pieters H, Crookes R, Roodt J, Heyns Adu P. Correlation of in vitro platelet quality measurements with in vivo platelet viability in human subjects. *Vox Sang*.2006;90:279–285.
214. Rinder HM, Smith BR. In vitro evaluation of stored platelets: is there hope for predicting post-transfusion platelet survival and function. *Transfusion*.2003;43:2–6
215. Bashir S, Thomas S, Cardigan R, Struff WG, Tolksdorf F, Williamson LM. Pathogen inactivation of platelets using UVC light. *Transfus Med*.2010;20(suppl 1):8.
216. Verhaar R, Dekkers DW, De Cuyper IM, Ginsberg MH, de Korte D, Verhoeven AJ. UV-C irradiation disrupts platelet surface disulfide bonds and activates the platelet integrin α IIb β 3. *Blood*.2008;112:4935–4939
217. Mohr H, Steil L, Gravemann U, Thiele T, Hammer E, Greinacher A, Müller TH, Volker U. A novel approach to pathogen reduction in platelet concentrates using short-wave ultraviolet light. *Transfusion*.2009;49:2612–2624
218. Mohr H, Gravemann U, Bayer A, Muller TH. Sterilization of platelet concentrates at production scale by irradiation with short-wave ultraviolet light. *Transfusion*.2009;49:1956–1963
219. Setlow P. Resistance of spores of *Bacillus* species to ultraviolet light. *Environ Mol Mutagen*.2001;38:97–104.

220. Knutson F, Alfonso R, Dupuis K, Mayaudon V, Lin L, Corash L, Hogman CF. Photochemical inactivation of bacteria and HIV in buffy-coat-derived platelet concentrates under conditions that preserve in vitro platelet function. *Vox Sang.* 2000;78:209–216.
221. Henderson EE, Tudor G, Yang JY. Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by ultraviolet and X irradiation. *Radiat Res.* 1992;131:169–176.
222. Gravemann U, Pohler P, Lambrecht B, Mohr H, Müller TH. Inactivation of peripheral blood mononuclear cells by UVC light using the Theraflex UV-Platelet system. *Transfus Med Hemother.* 2008;35(suppl 1):4.
223. Murphy WG, Foley M, Doherty C, Tierney G, Kinsella A, Salami A, Cadden E, Coakley P. Screening platelet concentrates for bacterial contamination: low numbers of bacteria and slow growth in contaminated units mandate an alternative approach to product safety. *Vox Sang.* 2008;95:13–19.
224. Castro E, Girones N, Guerrero N, Barea L, Fresno M. The effectiveness of UVC pathogen inactivation system on reducing the *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum* burden in platelets. *Vox Sang.* 2008;95:290.
225. Calkins J, Wheeler JS, Keller CI, Colley E, Hazle JD: Comparative ultraviolet action spectra (254–320 nm) of five 'wild-type' eukaryotic microorganisms and *Escherichia coli*. *Radiat Res* 1988;114:307–318
226. Kallenbach NR, Cornelius PA, Negus D, Montgomerie D, Englander S: Inactivation of viruses by ultraviolet light. *Curr Stud Hematol Blood Transfus* 1989:70–82.
227. Cadet J, Sage E, Douki T: Ultraviolet radiation mediated damage to cellular DNA. *Mutat Res* 2005;571:3–17.
228. Sinha RP, Hader DP: UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem Photobiol Sci* 2002;1:225–236
229. Douki T, Laporte G, Cadet J: Inter-strand photoproducts are produced in high yield within A-DNA exposed to UVC radiation. *Nucleic Acids Res* 2003;31:3134–3142.
230. Rodrigo G, Roumagnac S, Wold MS, Salles B, Calsou P: DNA replication but not nucleotide excision repair is required for UVC-induced replication protein A phosphorylation in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 2000;20:2696–2705.
231. Davey RJ, McCoy NC, Yu M, et al. The effect of prestorage irradiation on post-transfusion red cell survival. *Transfusion* 1992; 32:525.
232. Rivet C, Baxter A, Rock G. Potassium levels in irradiated blood. *Transfusion* 1989; 29:185.
233. Ferguson DJ. Potassium levels in irradiated blood. *Transfusion* 1989; 29:749.
234. Ramirez AM, Woodfield DG, Scott R, et al. High potassium levels in stored irradiated blood. *Transfusion* 1987; 27:444-445.