



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
—ΙΔΡΥΘΗΝ ΤΟ 1837—



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ
ΑΤΤΙΚΟΝ



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΑΙΜΟΔΟΣΙΑΣ ΤΟΥ Π.Γ.Ν «ΑΤΤΙΚΟΝ»

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΤΙΤΛΟΣ:

**ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΥ ΝΑΓΕΟΤΤΕ ΣΤΗΝ
ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΩΝ ΛΕΥΚΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ
ΛΕΥΚΑΦΑΙΡΕΜΕΝΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΑΙΜΑΤΟΣ
ΠΡΙΝ ΤΗΝ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΤΟΥΣ**

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΝΕΑΡΧΑΚΟΣ
Νοσηλευτής, MSc

Επιβλέπων Καθηγητής:
ΤΣΑΝΤΕΣ ΑΡΓΥΡΙΟΣ
ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΑΘΗΝΑ ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2020

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ

Ὅμιμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανίκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἵστωρας ποιέμενος, ἐπιτελέα ποιήσων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὄρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε, ἡγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηζέοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ αὐτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηζέωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγελάς τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι νιοῖσι τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισι τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἡτρικῶ, ἄλλω δὲ οὐδενί. Διαιτήμασι τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίᾳ εἴρξω. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιον, οὐδὲ ὑψηγήσομαι ξυμβουλήν τοῖνδε, ὁμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόρον δώσω. Ἀγνώως δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμὴν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τήσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἔων πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθοράς, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σαμμάτων καὶ ἀνδράων, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἦ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἂ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἡγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ ξυγχέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρ' ἀπῶν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον, παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιωρκούντι, τὰ ναντία τουτέων.

Ορισμός τριμελούς επιτροπής:

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:

- 1) Τσαντές Αργύριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Εργαστηριακής Αιματολογίας-Αιμοδοσίας, ΕΚΠΑ, τμήμα Ιατρικής Σχολής (επιβλέπων)
- 2) Γιαλεράκη Αργυρή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, ΕΚΠΑ, τμήμα Ιατρικής Σχολής
- 3) Κοκόρη Στυλιανή, Επίκουρη Καθηγήτρια Αιματολογίας, ΕΚΠΑ, τμήμα Ιατρικής Σχολής

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Το ερευνητικό μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε στη Νοσοκομειακή Υπηρεσία Αιμοδοσίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου «Αττικόν» στην Αθήνα. Για την ολοκλήρωση της διατριβής συνέβαλλαν πολλά στελέχη της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών και του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου «Αττικόν», με τα οποία είχα την τύχη και τη χαρά να συνεργαστώ.

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή της διατριβής τον κ. Αργύριο Τσαντέ, Αναπληρωτή Καθηγητή Εργαστηριακής Αιματολογίας – Αιμοδοσίας στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών και Διευθυντή του Αιματολογικού Εργαστηρίου – Μονάδα Αιμοδοσίας στο Π.Γ.Ν «Αττικόν», για την δυνατότητα που μου έδωσε και την εμπιστοσύνη του, αναθέτωντάς μου την συγκεκριμένη διατριβή, για το συνεχές ενδιαφέρον του και για την καθοδήγησή του σε όλα τα στάδια της εκπόνησής της.

Πολλές ευχαριστίες οφείλω στα άλλα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, την κ. Γιαλεράκη Αργυρή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών και την κ. Κοκόρη Στυλιανή, Επίκουρη Καθηγήτρια Αιματολογίας, στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών, για τη συνεισφορά τους στην εκπόνηση της διατριβής.

Θα ήθελα να εκφράσω τη μεγάλη μου ευγνωμοσύνη στον κ. Ηλία Κυριάκου, Αιματολόγο, Επιμελητή Α΄ ΕΣΥ στο Π.Γ.Ν «Αττικόν» για τη σημαντική συμβολή του στο σχεδιασμό και στη διεξαγωγή των αποτελεσμάτων της διατριβής.

Οφείλω πολλές ευχαριστίες στην κ. Ευσταθία Μακρή, Τεχνολόγο Ιατρικών Εργαστηρίων στη Μονάδα Αιμοδοσίας του Π.Γ.Ν «Αττικόν» για τη συμβολή της στην ολοκλήρωση των εργαστηριακών δοκιμών στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	9
Κατάλογος Εικόνων	10
Κατάλογος Πινάκων.....	11
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	12
1. Μετάγγιση αίματος.....	13
2. Παράγωγα του αίματος	15
3. Επιπλοκές της μετάγγισης	18
4. Λευκαφαίρεση.....	33
4.1 Εισαγωγή	33
4.2 Φίλτρα Λευκαφαίρεσης	34
4.3 Μέθοδοι Λευκαφαίρεσης	36
4.3.1 Γενικά	36
4.3.2 Προ Αποθήκευσης (Pre Storage) Λευκαφαίρεση	37
4.3.3 Μετά την αποθήκευση (post storage).....	40
4.3.4 Κυτταραφαίρεση	40
4.4 Κλινικά Οφέλη Λευκαφαίρεσης	41
4.4.1 Μειωμένη συχνότητα και σοβαρότητα των πυρετικών μη αιμολυτικών αντιδράσεων	42
4.4.2 Μείωση του κινδύνου μετάδοσης του κυτταρομεγαλοϊού CMV	43
4.4.3 Ελάττωση του κινδύνου αλλοανοσοποίησης εναντίον των αντιγόνων HLA και των ερυθροκυτταρικών αντιγόνων	44
4.5 Πιθανά Κλινικά Οφέλη Λευκαφαίρεσης	45
4.6 Μειονεκτήματα Καθολικής Λευκαφαίρεσης	47
4.7 Καθολική Λευκαφαίρεση Και Προβληματισμοί	48
5. Μέθοδοι Καταμέτρησης των Υπολλειμματικών Λευκών Αιμοσφαιρίων	50
5.1 Μικροσκοπικές μέθοδοι- Αιμοκυττόμετρα	52
5.1.1 Γενικά	52

5.1.2	Ιστορική Αναδρομή.....	52
5.1.3	Εφαρμογές.....	53
5.1.4	Μειονεκτήματα.....	54
5.2	Κυτταρομετρία Ροής.....	55
5.2.1	Γενικά.....	55
5.2.2	Ιστορική Αναδρομή.....	56
5.2.3	Αρχή Λειτουργίας.....	58
5.2.4	Πλεονεκτήματα.....	61
5.2.5	Εφαρμογές της Κυτταρομετρίας Ροής.....	62
5.3	Ραδιοανοσοδοκιμασίες.....	64
5.4	Μέθοδοι Ενίσχυσης του DNA των Λευκοκυττάρων.....	64
5.5	Ποιοτική Μέθοδος με Φίλτρα Πολυανθρακικού.....	65
	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	66
1.	Σκοπός.....	67
2.	Υλικά Και Μέθοδοι.....	69
2.1	Κυτταρομετρία Ροής.....	69
2.2	Μέθοδος Nageotte.....	72
3.	Στατιστικές Μέθοδοι.....	73
3.1	Περιγραφική Στατιστική.....	73
3.2	Συμφωνία Μεθόδων.....	73
3.3	Στατιστική Σημαντικότητα.....	74
3.4	Στατιστικό Πρόγραμμα.....	74
4.	Αποτελέσματα.....	75
4.1	Ακρίβεια Μεθόδων.....	75
4.2	Συμφωνία Μεθόδων.....	76
5.	Συζήτηση.....	79
6.	Δημοσίευση.....	83
7.	Βιογραφικό Σημείωμα.....	84
8.	Βιβλιογραφία.....	91

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Η κυτταρομετρία ροής (FC) και η αιμοκυττομετρία Nageotte αντιπροσωπεύουν τις πιο ευρέως αποδεκτές μεθόδους για τη μέτρηση των υπολειπόμενων λευκών αιμοσφαιρίων (rWBCs) στα λευκαφαιρεμένα (LR) παράγωγα αίματος. Στόχος μας ήταν να μελετήσουμε τη συμφωνία μεταξύ των δύο μεθόδων, υπό πραγματικές συνθήκες παραγωγής αίματος.

Υλικά και μέθοδοι: 94 πρόσφατα παραχθείσες λευκαφαιρεμένες (LR) μονάδες συμπυκνωμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC) εξετάστηκαν ως προς τις συγκεντρώσεις των υπολειπόμενων λευκών αιμοσφαιρίων (rWBCs) με κυτταρομετρία ροής (FC) και αιμοκυττομετρία Nageotte. Για να εκτιμήσουμε την ακρίβεια κάθε μεθόδου, υπολογίσαμε τους συντελεστές μεταβλητότητας (CV) και εν συνεχεία για να μελετήσουμε τη συμφωνία μεταξύ των δύο μεθόδων χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία Bland-Altman.

Αποτελέσματα: Οι συντελεστές μεταβλητότητας (CV) ήταν 18,5% και 26,2% για τις μεθόδους Nageotte και FC, αντίστοιχα. Ωστόσο, η συμφωνία των διπλών μετρήσεων των δύο μεθόδων χρησιμοποιώντας το ποιοτικό διαγνωστικό όριο 1×10^6 λευκοκύτταρα (WBCs) ανά μονάδα για να οριστούν τα αποτελέσματα ως “pass” ή “fail”, ήταν 71,9% για τη μέθοδο Nageotte και 93,3% για τη μέθοδο FC. Η ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης δεν έδειξε καμία συσχέτιση ($R\text{-squared} = 0,01$, $p = 0,35$) μεταξύ των δύο μεθόδων, ενώ η ανάλυση Bland-Altman όσον αφορά τη συμφωνία των μετρήσεων κατέδειξε τάση προς την κατεύθυνση της μέτρησης περισσότερων λευκοκυττάρων (WBCs) με τη μέθοδο Nageotte κατά $0,77 \times 10^6$ ($p < 0,001$) ανά μονάδα, με το 95% ($d \pm 2\text{ sd}$) των ορίων συμφωνίας να κυμαίνεται μεταξύ $-0,40 \times 10^6$ έως $1,94 \times 10^6$ λευκοκυττάρων ανά μονάδα.

Συμπέρασμα: Η απουσία συμφωνίας μεταξύ των δύο μεθόδων Nageotte και FC, με τις διαφορές των μετρήσεων μεταξύ $d \pm 2\text{ sd}$, που έχει μεγάλη κλινική σημασία, υποδηλώνει ότι οι δύο μέθοδοι δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ισοδύναμες για κλινικούς σκοπούς. Η μέθοδος Nageotte φαίνεται ακατάλληλη για τον ποιοτικό

έλεγχο λευκαφαιρέμενων παραγώγων αίματος ακόμη και με κριτήριο «pass-fail», υπό πραγματικές συνθήκες παραγωγής αίματος.

ABSTRACT

Background: Flow cytometry (FC) and Nageotte hemocytometry represent the most widely accepted methods for counting residual white blood cells (rWBCs) in leucocyte-reduced (LR) blood components. Our aim was to study the agreement between the two methods, under real working blood bank conditions.

Materials and methods: 94 freshly produced LR red blood cell (RBC) units were tested for rWBC concentrations by FC and Nageotte. To assess the precision of each method, we calculated the intra-assay coefficients of variation (CV), and followed the Bland-Altman methodology to study the agreement between the two methods.

Results: CV was 18.5% and 26.2% for the Nageotte and the FC, respectively. However, the agreement between the duplicate observations, using the binary cut-off threshold of 1×10^6 WBCs per unit to define the results as “pass/fail”, was 71.9% for the Nageotte and 93.3% for the FC. Linear regression analysis did not show any correlation (R-squared=0.01, $p=0.35$) between the two methods, while the Bland-Altman analysis for the measuring agreement showed a bias toward a higher Nageotte count of 0.77×10^6 leucocytes per unit ($p < 0.001$) with the 95% limits of agreement ($d \pm 2$ sd) ranging from -0.40×10^6 to 1.94×10^6 leucocytes per unit.

Conclusion: The absence of agreement between Nageotte and FC method, with the differences within $d \pm 2$ sd being of high clinical importance, suggests that the two methods cannot be used for clinical purposes interchangeably. The Nageotte seems unsuitable for quality control even with a pass-fail criterion, under real working blood bank conditions.

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1. Προϊόντα που μπορούν να ληφθούν από μια μονάδα πλήρους αίματος..	16
Εικόνα 2. Φίλτρα λευκαφαίρεσης.....	35
Εικόνα 3. Μέθοδοι λευκαφαίρεσης.....	39
Εικόνα 4. Εξέλιξη διαφόρων τεχνολογιών μέτρησης και ανίχνευσης κυττάρων	51
Εικόνα 5. Αρχή αιμοκυττομέτρου	54
Εικόνα 6. Σχηματική επισκόπηση μιας τυπικής εγκατάστασης κυτταρομετρητή ροής	60
Εικόνα 7. Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής.....	71
Εικόνα 8. Διάγραμμα διασποράς των ζευγών-μετρήσεων των λευκών αιμοσφαιρίων (WBCs) ανά μονάδα ($\times 10^6$).	77
Εικόνα 9. Ανάλυση Bland-Altman για τη μέτρηση της συμφωνίας μεταξύ της αιμοκυττομετρίας Nageotte και της κυτταρομετρίας ροής (FC).	78

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1. 2 πίνακες που λήφθηκαν με τη χρήση του διχοτόμου διαγνωστικού ορίου 1×10^6 λευκών αιμοσφαιρίων (WBC) ανά μονάδα για τον χαρακτηρισμό των αποτελεσμάτων ως «pass» ή «fail»..... 75

Πίνακας 2. Περιγραφικά στατιστικά στοιχεία των δειγμάτων της μελέτης, που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία και ανάλυση ($n = 94$). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως οι μέσες τιμές $\pm SD$, οι διάμεσες τιμές και τα διατεταρτημοριακά διαστήματα (interquartile ranges, IQR) ή ποσοστά, όπου κρίθηκε κατάλληλο..... 76

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Μετάγγιση αίματος

Μετάγγιση αίματος ονομάζεται η ενδοφλέβια χορήγηση αίματος ή παραγώγων του αίματος από ένα άτομο που λέγεται **αιμοδότης** σε ένα άλλο άτομο που λέγεται **λήπτης**. Όταν ο δότης και ο λήπτης είναι το ίδιο πρόσωπο, τότε η μετάγγιση αυτή λέγεται **αυτομετάγγιση ή αυτόλογη μετάγγιση**. Προϋπόθεση για την επιτυχία της μετάγγισης είναι η συμβατότητα του αίματος του λήπτη και του δότη. Δύο είναι οι στόχοι της μετάγγισης, η διατήρηση της δυνατότητας μεταφοράς οξυγόνου και η αποκατάσταση αιμορραγικών διαταραχών και διαταραχών της πήξης του αίματος.

Η μετάγγιση αίματος είναι η πρώτη επιτυχημένη μεταμόσχευση οργάνου που πραγματοποιήθηκε. Πρωτοαναφέρεται από τον Όμηρο, ενώ περιστασιακές προσπάθειες μετάγγισης αίματος αναφέρονται στα χρόνια της Βυζαντινής Αυτοκρατορίας και κατά το Μεσαίωνα. Το 1628 ο Harvey ανακάλυψε την κυκλοφορία του αίματος ενώ, η πρώτη επιτυχής μετάγγιση αίματος έγινε το 1818 από τον Άγγλο μαϊευτήρα James Blundell, ο οποίος επισήμανε ότι η μετάγγιση αίματος πρέπει να γίνεται μόνο σε πολύ επείγοντα περιστατικά καθώς οι μισοί από τους δέκα πρώτους ασθενείς που μεταγγίσθηκαν πέθαναν. Τις πρώτες αυτές προσπάθειες μετάγγισης αίματος ακολούθησε η ανακάλυψη του συστήματος ABO από τον Landsteiner το 1901 που αποτελεί και το σημαντικότερο σταθμό στην ιστορία της μετάγγισης, γεγονός που συνέβαλε σημαντικά στην ασφάλεια των μεταγγίσεων. Για την ανακάλυψη αυτή ο Landsteiner τιμήθηκε το 1930 με το βραβείο Nobel. Κατά τη διάρκεια του Α΄ Παγκοσμίου πολέμου προκειμένου να αντιμετωπισθούν οι αυξημένες ανάγκες σε αίμα έγιναν προσπάθειες συλλογής και αποθήκευσης του. Έτσι για πρώτη φορά το 1917 συλλέχθηκε αίμα ομάδος O σε ειδικό συντηρητικό διάλυμα. Η «ποιότητα» αυτών των ερυθρών δεν γνωρίζουμε ποια ήταν, σίγουρα όμως οι μεταγγίσεις αυτές κατά τη διάρκεια του πολέμου έσωσαν ζωές [1], [2].

Η μετάγγιση του αίματος και των παραγώγων αποτελεί σωτήρια αντιμετώπιση πολλών κλινικών καταστάσεων, όπως καρδιοχειρουργικών και ορθοπεδικών, μαϊευτικών και νεογνικών επιπλοκών, αιματολογικών και νεοπλασματικών νοσημάτων. Άμεσος ιατρικός στόχος είναι η επίτευξη της βέλτιστης χρήσης του

αίματος, και γι' αυτό το λόγο θα πρέπει να υπάρχει πλήρης γνώση των παρενεργειών κατά τη μετάγγιση[2].

Στο παρελθόν, οι μεταγγίσεις βασίζονταν σε μεγάλο βαθμό στη χρήση ολικού αίματος. Σήμερα δεν υπάρχει ένδειξη ότι το ολικό αίμα προσφέρει κλινικά πλεονεκτήματα κατά τη χορήγησή του. Μετά από συντήρηση 24-48 ωρών ορισμένοι παράγοντες πήξης καταστρέφονται, επίσης τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια υφίστανται μορφολογική και λειτουργική αλλοίωση. Βιόσιμα καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης του ολικού αίματος διατηρούνται μόνον τα λεμφοκύτταρα. Το ολικό αίμα εξακολουθεί να χρησιμοποιείται σήμερα σε συγκεκριμένες, περιορισμένες, καταστάσεις, αλλά η σύγχρονη τάση στις μεταγγίσεις συνίσταται στη χρήση του συγκεκριμένου συστατικού του αίματος για το οποίο έχει τεθεί η κλινική ένδειξη της μετάγγισης.

Το αίμα, λοιπόν, 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 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. 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 [3], [4].

2. Παράγωγα του αίματος

Ως **παράγωγο αίματος (blood product)** ορίζεται οποιοδήποτε παράγωγο αίματος ή πλάσματος του ανθρώπου που προορίζεται για θεραπευτική χρήση.

Ως **προϊόν αίματος (blood component)** ορίζεται το συστατικό του αίματος που παρασκευάζεται με χρήση συμβατικής μεθοδολογίας (φυγοκέντρηση, διήθηση, κατάψυξη) των Υπηρεσιών Αιμοδοσίας για θεραπευτική χρήση [5].

Ασταθή (labile) προϊόντα ανθρώπινου αίματος

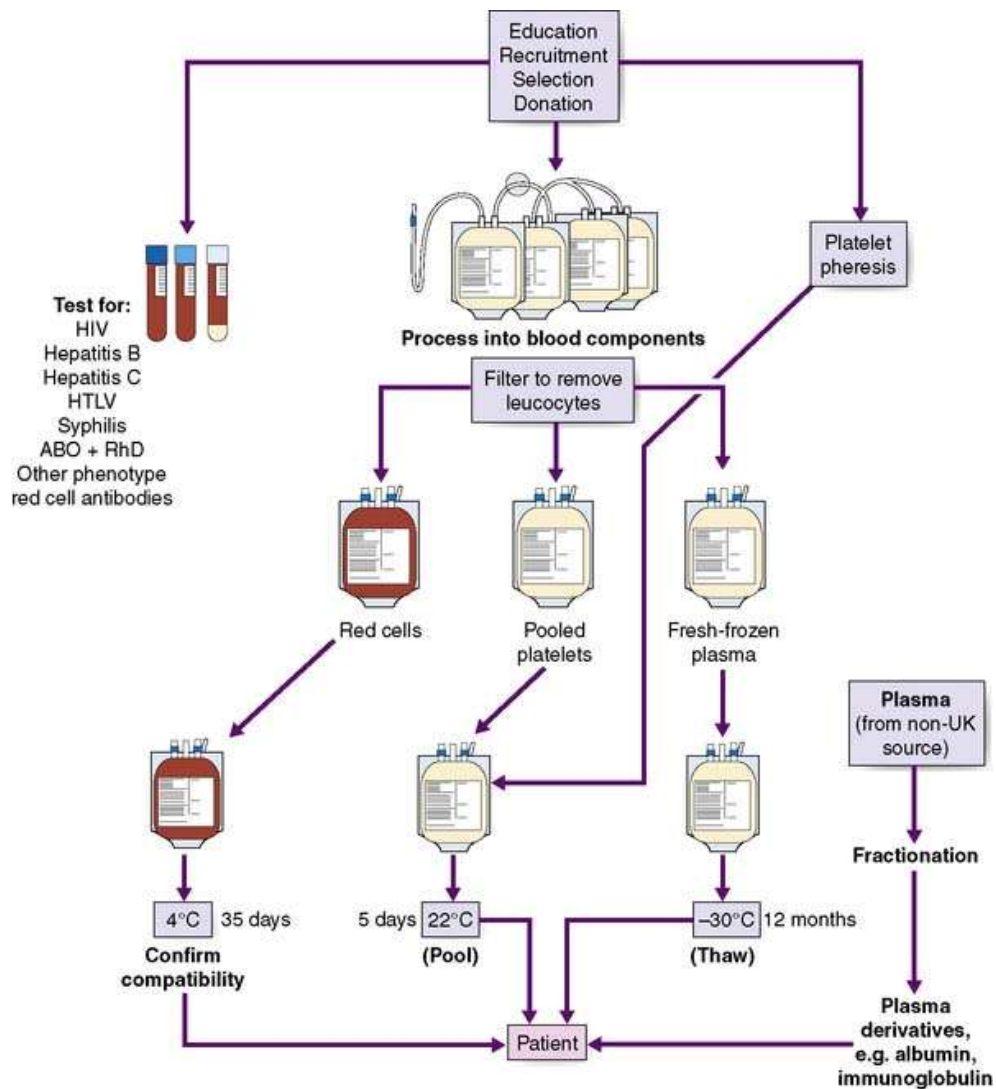
Είναι τα θεραπευτικά συστατικά που απομονώνονται από το ολικό αίμα.

- Ολικό αίμα
- Συμπυκνωμένα ερυθρά
- Συμπυκνωμένα αιμοπετάλια
- Πρόσφατα κατεψυγμένο πλάσμα
- Κοινό πλάσμα
- Προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα

Σταθερά κλασματοποιημένα παράγωγα ανθρώπινου αίματος

- Λευκωματίνη
- Συμπυκνωμένοι παράγοντες πήξεως και αντιπρωτεάσες
- Ανοσοσφαιρίνες ενδομυϊκές και ενδοφλέβιες
- Προθρομβινικό σύμπλεγμα
- Συμπύκνωμα αντιθρομβίνης
- Αναστολείς πήξεως
- Συμπύκνωμα ινωδογόνου

Σήμερα, τα προϊόντα αίματος μπορούν να ληφθούν και κατευθείαν από τον αιμοδότη χρησιμοποιώντας ειδικές συσκευές αφαίρεσης.



Εικόνα 1. Προϊόντα που μπορούν να ληφθούν από μια μονάδα πλήρους αίματος[6].

Η μετάβαση από τη συλλογή αίματος σε γυάλινες φιάλες στα συστήματα πολλαπλών πλαστικών ασκών στα μέσα της δεκαετίας του 1960 συνέβαλε σημαντικά στην παρασκευή παραγώγων αίματος υψηλής ποιότητας με αποτέλεσμα να επικεντρωθεί πλέον η προσοχή στη θεραπεία των ασθενών με τα παράγωγα του αίματος. Έτσι κάθε άρρωστος που έχει ανάγκη μετάγγισης λαμβάνει όχι όλο το αίμα αλλά μεμονωμένα το συστατικό που χρειάζεται.

Ο πρωταρχικός λόγος της δημιουργίας των παραγώγων αίματος είναι η απώλεια κατά τη διάρκεια συντήρησης του ολικού αίματος (24-48 ώρες) των λειτουργικών

στοιχείων του, δηλαδή η απώλεια λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων και της δραστικότητας των παραγόντων πήξης V και VIII.

Το γεγονός ότι οι βέλτιστες συνθήκες αποθήκευσης και, συνεπώς, η διάρκεια ζωής είναι διαφορετικές για κάθε συστατικό του αίματος (ερυθρά, πλάσμα, αιμοπετάλια) αποτελούν τον δεύτερο λόγο δημιουργίας τους για την προώθηση της χρήσης των επιμέρους συστατικών του αίματος. Η λειτουργικότητα των ερυθρών αιμοσφαιρίων διατηρείται καλύτερα σε συνθήκες απλής ψύξης. Για τη διατήρηση της ποιότητας των συστατικών του πλάσματος απαιτείται κατάψυξη, ενώ η αποθήκευση των αιμοπεταλίων πρέπει να γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και υπό συνεχή ανακίνηση. Επομένως η διατήρηση του ολικού αίματος σε συνθήκες ψύξης ικανοποιεί μόνο τις απαιτήσεις των ερυθροκυττάρων, ενώ η θεραπευτική αποτελεσματικότητα των περισσοτέρων από τα άλλα συστατικά του μειώνεται.

Τρίτος λόγος, είναι η εξειδίκευση της μεταγγισιοθεραπείας για την αντικατάσταση του στοιχείου που χρειάζεται ο κάθε ασθενής. Οι ασθενείς πρέπει να λαμβάνουν το παράγωγο που απαιτείται για τη διόρθωση της συγκεκριμένης ανεπάρκειας. Με τον τρόπο αυτό αποφεύγεται η περιττή και δυνητικά επιβλαβής χορήγηση πλεοναζόντων συστατικών.

Τελευταίος και εξίσου βασικός λόγος είναι η αντιμετώπιση περισσοτέρων από έναν ασθενή από μία μονάδα ολικού αίματος. Για όλους αυτούς τους λόγους είναι σημαντική η Παρασκευή παραγώγων αίματος από το ολικό αίμα που λαμβάνεται από τον Αιμοδότη [1], [3], [4], [7].

3. Επιπλοκές της μετάγγισης

Επιπλοκή μετάγγισης είναι κάθε ατυχές συμβάν, το οποίο συνδέεται με την συλλογή, τον έλεγχο, την επεξεργασία, την αποθήκευση και την διανομή αίματος και συστατικών αίματος και το οποίο θα μπορούσε, να απειλήσει τη ζωή των μεταγγιζόμενων, να προκαλέσει αναπηρία ή ανικανότητα των ασθενών και να αυξήσει τη νοσηρότητα, με αποτέλεσμα την παράταση της νοσηλείας.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ- WHO) κρίνεται απαραίτητος ο εντοπισμός και η πρόληψη των ανεπιθύμητων επιπλοκών από τη μετάγγιση, ενώ κρίνεται επιτακτική η αύξηση της ασφάλειας, της αποτελεσματικότητας και της αποδοτικότητας της μετάγγισης από τον δότη (λήψη) έως τον λήπτη (χορήγηση). Θα πρέπει λοιπόν, να γίνεται παρακολούθηση, αναγνώριση, υποβολή εκθέσεων, έρευνα και ανάλυση των ανεπιθύμητων παρενεργειών και των αντιδράσεων που σχετίζονται με τη μετάγγιση [8].

Η μετάγγιση συχνά θεωρείται ως ασφαλής θεραπεία με ελάχιστες έως καθόλου παρενέργειες. Στην πραγματικότητα είναι και θα πρέπει να θεωρείται ως μια προσωρινή μεταμόσχευση ιστού.

Η μετάγγιση αίματος ή παραγώγων μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες αντιδράσεις. Ωστόσο, η ακριβής εκτίμηση των αντιδράσεων δεν είναι πάντα εφικτή λόγω διαφόρων παραγόντων.

Πρωτίστως, πολλές αντιδράσεις -λανθασμένα -αποδίδονται στην υποκείμενη νόσο και τη γενική κλινική κατάσταση του ασθενή και δεν αναφέρονται. Δευτερευόντως, το 50% του συνόλου των μεταγγίσεων γίνονται στο χειρουργείο, σε ασθενείς υπό αναισθησία όπου οι αντιδράσεις δύσκολα αναγνωρίζονται και τέλος πολλές αντιδράσεις δεν αναφέρονται λόγω της έλλειψης εφαρμογής ενός αυστηρού συστήματος αναφοράς αιμοεπαγρύπνησης.

Οι αντιδράσεις της μετάγγισης διαχωρίζονται σε ανοσολογικές και μη ανοσολογικές ως προς την παθογένεια και σε άμεσες και απώτερες ως προς τον χρόνο παρουσίασης. Οι άμεσες ή οξείες επιπλοκές μετάγγισης συμβαίνουν μέσα σε λίγα λεπτά έως 24 ώρες από τη μετάγγιση, ενώ οι καθυστερημένες ή απώτερες επιπλοκές μπορεί να εμφανιστούν μετά από μέρες, μήνες ή και χρόνια ύστερα από τη μετάγγιση [3], [4]

▪ **Άμεσα συμβάματα ανοσολογικής αιτιολογίας:**

- ✓ Οξεία αιμολυτική αντίδραση (ασυμβατότητα ABO ή Rh)
- ✓ Πυρετική (μη αιμολυτική αντίδραση)
- ✓ Αλλεργικές αντιδράσεις
- ✓ Μη καρδιογενές πνευμονικό οίδημα (σύνδρομο TRALI)

▪ **Άμεσα συμβάματα μη ανοσολογικής αιτιολογίας:**

- ✓ Οξεία αιμολυτική αντίδραση (βακτηριακή επιμόλυνση)
- ✓ Κυκλοφορική επιβάρυνση
- ✓ Υπασβεστιαϊμία, υπερκαλιαιμία, ελάττωση pH, τοξικότητα από κιτρικά και αραίωση των αιμοπεταλίων και των παραγόντων της πήξης

▪ **Απώτερα συμβάματα ανοσολογικής αιτιολογίας:**

- ✓ Όψιμη αιμολυτική αντίδραση
- ✓ Αλλοανοσοποίηση
- ✓ Πορφύρα μετά από μετάγγιση αιμοπεταλίων
- ✓ Αντίδραση μοσχεύματος κατά ξενιστού μετά από μετάγγιση (GvHD)

▪ **Απώτερα συμβάματα μη ανοσολογικής αιτιολογίας:**

- ✓ Υπερφόρτιση με σίδηρο
- ✓ Μετάδοση νοσημάτων [Ηπατίτιδες, HIV, Σύφιλη, HTLV, κ.ά.]

Οξεία Αιμολυτική Αντίδραση (σπάνια και δυνητικά θανατηφόρος)

Είναι μια επιπλοκή της μετάγγισης που εκδηλώνεται από τα πρώτα λεπτά έως και εντός του 24ώρου μετά την έναρξη της διαδικασίας μετάγγισης ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Ο βασικός λόγος εμφάνισης οξείας αιμολυτικής αντίδρασης είναι η ABO ασυμβατότητα που συνήθως οφείλεται σε λάθος στην ταυτοποίηση του ασθενούς ή σε σφάλμα (clerical error) στη σήμανση του δείγματος ή της μονάδας αίματος. Σπανιότερα οφείλεται σε αλλοαντισώματα.

Τα βασικά συμπτώματα της παραπάνω αντίδρασης είναι ο πυρετός, τα ρίγη, το άγχος, το shock, η oligουρία, η δύσπνοια, το θωρακικό και οσφυϊκό άλγος, η αιμοσφαιριναιμία και η αιμοσφαιρινουρία, η αγγειοκινητική αστάθεια, η νεφρική ανεπάρκεια, το καρδιοαναπνευστικό collapsus και η ΔΕΠ.

Μόλις παρατηρηθεί έστω και ένα από τα παραπάνω συμπτώματα από το νοσηλευτικό προσωπικό, θα πρέπει να διακοπεί άμεσα η μετάγγιση, να διατηρηθεί η φλέβα με NaCl 0,9%, να ειδοποιηθεί αμέσως ο θεράπων ιατρός κι η Αιμοδοσία και να αποσταλεί η μεταγγιζόμενη μονάδα ΣΕ και δείγμα αίματος του ασθενή στην αιμοδοσία. Όσον αφορά την αντιμετώπιση του ασθενή, θα πρέπει να ξεκινήσει άμεσα η διούρηση, να του χορηγηθούν υγρά, ώστε να διατηρηθεί η ποσότητα των ούρων στα 1-2ml/kg/ώρα, να χορηγηθούν άμεσα 100ml μαννιτόλης 20% ή φουροσεμίδης και διττανθρακικά και ενδεχομένως χαμηλές δόσεις ντοπαμίνης και να γίνει προσεκτικός έλεγχος για ανάπτυξη ΔΕΠ. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί στην ποσότητα των ούρων, διότι επί oligουρίας ή ανουρίας θα πρέπει να γίνει θεραπεία για οξεία νεφρική ανεπάρκεια.

Για την πρόληψη των παραπάνω επιπλοκών και για άμεση αντιμετώπιση των αντιδράσεων της μετάγγισης, συνιστάται στενή παρακολούθηση του ασθενή τα πρώτα 10-15 λεπτά της μετάγγισης από το νοσηλευτικό και ιατρικό προσωπικό [3], [9].

Βακτηριδιακή Επιμόλυνση (σηψαιμία)

Ανήκει στις οξείες μη ανοσολογικές αντιδράσεις της μετάγγισης. Είναι η συχνότερη λοιμώδης επιπλοκή των μεταγγίσεων αίματος και παραγώγων στις ανεπτυγμένες χώρες. Εμφανίζεται άμεσα μετά την έναρξη της μετάγγισης.

Η μόλυνση των ασκών συλλογής αίματος μπορεί να συμβεί:

- Κατά την διάρκεια της συλλογής του αίματος ,από το χέρι του αιμοδότη λόγω ανεπαρκούς αποστείρωσης (donor arm derived).
- Στη διάρκεια της παρασκευής και επεξεργασίας του παραγώγου.
- Από τον ίδιο τον δότη λόγω βακτηριαιμίας του, και ιδιαίτερα όταν ανευρίσκεται στην περίοδο ανάρρωσης και είναι ασυμπτωματικός.
- Μη τήρηση στείρων συνθηκών αποθήκευσης και μεταφοράς των ασκών συλλογής.

Η επιμόλυνση των συμπυκνωμένων ερυθρών (ΣΕ) οφείλεται κυρίως σε Gram(-) βακτηρίδια που μπορούν να αναπτύσσονται σε θερμοκρασία 1-6⁰ C(ψυχρόφιλα), όπως η *Yersinia enterocolitica* (που είναι υπεύθυνη για τις γαστρεντερίτιδες), ψευδομονάδες κ.α. Για τα αιμοπετάλια ενοχοποιούνται τα Gram(+) μικρόβια της φυσιολογικής χλωρίδας του δέρματος (*Staphylococcus epidermidis*) και σπανιότερα τα Gram(-).

Τα συμπτώματα που παρατηρούνται είναι ρίγος, υψηλός πυρετός, έμετος, διάρροια, υπόταση και ΔΕΠ από ενδοτοξίνες Gram(-) βακτηριδίων και shock.

Η μετάγγιση διακόπτεται άμεσα, διατηρείται η φλέβα με φυσιολογικό ορό και ειδοποιείται ο θεράπων ιατρός και η αιμοδοσία. (Blajchman, 2002). Για να προληφθεί η βακτηριδιακή επιμόλυνση του αίματος και των παραγώγων, θα πρέπει να γίνει πολύ προσεκτική επιλογή του αιμοδότη, να τηρηθούν οι κανόνες ασφαλείας για αντισηψία στη διαδικασία της φλεβοκέντησης, να απορριφθούν τα πρώτα 20ml του αίματος του αιμοδότη και να περιορισθεί η έκθεση των ασθενών σε πολλαπλούς δότες [3], [10], [11].

Πυρετικές μη –Αιμολυτικές αντιδράσεις (FNHTRs)

Ως FNHTR ορίζεται η άνοδος της θερμοκρασίας του ασθενή τουλάχιστον κατά 1°C κατά την διάρκεια της μετάγγισης αίματος ή παραγώγων του. Η αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να παρουσιαστεί όχι μόνο κατά την διάρκεια της μετάγγισης αλλά και μέσα σε διάστημα 6 ωρών από την μετάγγιση.

Την τελευταία δεκαετία έχει διαπιστωθεί ότι οι περισσότερες πυρετικές αντιδράσεις από μετάγγιση συμπυκνωμένων ερυθρών οφείλονται σε αντισώματα του δέκτη έναντι HLA- αντιγόνων και λευκοκυτταρικών αντιγόνων του δότη. Οι αντιδράσεις αντιγόνου αντισώματος προκαλούν απελευθέρωση ενδοτοξινών που προκαλούν πυρετό. Οι πυρετικές μη –αιμολυτικές αντιδράσεις μετά από μετάγγιση αιμοπεταλίων οφείλονται στη απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτταροκινών (TNF- α , IL-1b, IL-6 και IL-8) που παράγονται από τα λευκά αιμοσφαίρια του δότη κατά την διάρκεια αποθήκευσης των αιμοπεταλίων και ιδιαίτερα μετά την 3η μέρα αποθήκευσης.

Σαν αιτία εμφάνισης της αύξησης της θερμοκρασίας μετά από μετάγγιση ορίζεται η πυρετική μη-αιμολυτική αντίδραση εφόσον έχει αποκλειστεί σαν αιτία η μικροβιακή επιμόλυνση και η αιμολυτική αντίδραση.

Η πυρετική μη αιμολυτική αντίδραση συνοδεύεται από:

- Πυρετό με ρίγος
- Κεφαλαλγία, μυαλγία και γενική αδιαθεσία

Σπάνια μπορεί να παρουσιαστούν τα παρακάτω συμπτώματα

- Αναπνευστική δυσχέρεια
- Δύσπνοια και υπόταση
- Έμετος

Άμεση αντιμετώπιση θεωρείται η διακοπή της μετάγγισης, η χορήγηση αντιπυρετικών και η παρεντερική χορήγηση υγρών.

Αποτελεί τον πιο κοινό τύπο αντίδρασης μετάγγισης αίματος, αφού κυμαίνεται στο 43-75% των αντιδράσεων μετά μετάγγιση αίματος και παραγώγων του, ενώ είναι συχνότερη σε πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς, καθώς και μετά μετάγγιση ΑΜΠ. Εμφανίζεται σε χαμηλότερη συχνότητα μετά τη χορήγηση παραγώγων που έχουν υποστεί λευκαφαίρεση πριν την αποθήκευση, καθώς και μετά τη χορήγηση πρόσφατων παραγώγων [9], [10], [12].

Οξεία πνευμονική βλάβη συνδεόμενη με τη μετάγγιση (TRALI- Transfusion Related Acute Lung Injury)

Ως TRALI ορίζεται το μη καρδιογενές πνευμονικό οίδημα που σχετίζεται με μετάγγιση αίματος ή και παραγώγων και εμφανίζεται κατά την διάρκεια της μετάγγισης ή σε διάστημα 1-6 ωρών από την έναρξη της μετάγγισης. Κλινικά δεν διαφέρει από το σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS). Το σύνδρομο περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1957. Σε αναπτυγμένες χώρες το TRALI αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου από μετάγγιση. Επίσης, έχει περιγραφεί και μετά από χορήγηση κρουιζήματος, κοκκιοκυττάρων, αλλά και ενδοφλέβιας ανοσοσφαιρίνης.

Η εμφάνιση του συνδρόμου προκαλείται από αντιλευκοκυτταρικά αντισώματα στα παράγωγα του αίματος, (ΣΕ,FFP,PLT) τα οποία υπάρχουν στο δότη (πολύτοκες γυναίκες ή άτομα που έχουν μεταγγισθεί) και αντιδρούν με τα αντιγόνα των λευκοκυττάρων του δέκτη. Το πλάσμα σε σχέση με τα αιμοπετάλια τα οποία ενοχοποιούνται συχνότερα για το σύνδρομο, εμπλέκεται στις μισές από τις συνολικές περιπτώσεις που έχει κατηγορηθεί. TRALI έχει περιγραφεί και μετά από χορήγηση κρουιζήματος, κοκκιοκυττάρων και ενδοφλέβιας ανοσοσφαιρίνης. Στις ανεπτυγμένες χώρες το σύνδρομο TRALI είναι η πρώτη αιτία θανάτου εξαιτίας της μετάγγισης [13], [14].

Τα συμπτώματα της αντίδρασης TRALI αρχίζουν μέσα σε (4) ώρες από τη μετάγγιση και είναι δύσπνοια, ταχύπνοια, κυάνωση, πυρετός, ταχυκαρδία και υπόταση που συνοδεύονται από υποξαιμία. Ακτινολογικά παρατηρούνται αμφοτερόπλευρα διηθήματα στους πνεύμονες χωρίς σημεία υπερφόρτωσης της κυκλοφορίας, που λύνονται σχετικά γρήγορα(<96 ώρες). Από τις εξετάσεις , το

μοναδικό εύρημα μπορεί να είναι η παροδική λευκοπενία που οφείλεται στον μαζικό εγκλωβισμό αυτών στην πνευμονική κυκλοφορία. Η πλειοψηφία των αντιδράσεων είναι σοβαρές και απειλητικές για τη ζωή του πάσχοντος. Η θνητότητα κυμαίνεται στο 5-15%.

Το πρώτο και πιο βασικό βήμα ώστε να αντιμετωπιστεί η αντίδραση αυτή είναι η άμεση διακοπή της μετάγγισης. Ακολουθούν η διατήρηση της φλέβας με φυσιολογικό ορό και η άμεση ειδοποίηση του θεράποντος ιατρού, η ταχεία αναπνευστική και αιμοδυναμική υποστήριξη [14]–[16].

Υπερφόρτωση κυκλοφορίας σχετιζόμενη με τη μετάγγιση (Transfusion Associated Circulatory Overload- TACO)

Ανήκει στις άμεσες μη ανοσολογικές αντιδράσεις της μετάγγισης. Το TACO αφορά την οξεία αναπνευστική δυσχέρεια λόγω υπερφόρτωσης της κυκλοφορίας και το εξ' αυτής καρδιογενές πνευμονικό οίδημα στα πλαίσια της μετάγγισης αίματος και παραγώγων. Εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της μετάγγισης ή αμέσως μετά το τέλος της σε άτομα με καρδιακή δυσλειτουργία, ενώ είναι συχνότερο στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες.

Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν:

- Δύσπνοια
- Κυάνωση
- Ορθόπνοια
- Ξηρός βήχας
- Έντονη κεφαλαλγία, ταραχή
- Αλλοιώσεις στο ΗΚΓ
- Διόγκωση σφαγίτιδων
- Αύξηση τροπονίνης
- Συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια

Ακόμα, η θεραπευτική αντιμετώπιση επιβάλλει τη:

- Διακοπή της μετάγγισης
- Διατήρηση φλέβας,
- Διούρηση και χορήγηση οξυγόνου [14], [17]

Αλλεργικές- αναφυλακτικές αντιδράσεις

Κατηγοριοποιούνται ως εξής :

i. Οι ελάχιστονες αλλεργικές αντιδράσεις, οι οποίες είναι ήπιες και περιλαμβάνουν κνησμό, ουρτικάρια (κνιδωτικές βλάβες), ερύθημα, έξαψη και αγγειοοίδημα. Αφορούν το 1-3% όλων των μεταγγίσεων αίματος και παραγώγων του (ΑΜΠ, FFP, ΣΕ).

ii. Οι μείζονες αλλεργικές αντιδράσεις, οι οποίες είναι σοβαρές αλλά και σπάνιες και περιλαμβάνουν τις αναφυλακτικές, όπου συμμετέχει η ανοσοσφαιρίνη IgE και οι αναφυλακτοειδείς, όπου δεν συμμετέχει η IgE.

Οι μεν ελάχιστονες αλλεργικές αντιδράσεις εμφανίζονται σε 20-30' από την έναρξη της μετάγγισης και οφείλονται στην ύπαρξη αντισωμάτων στο πλάσμα του ασθενούς έναντι πρωτεϊνών, τροφών ή και φαρμάκων που ευρίσκονται στο πλάσμα του δότη. Ερύθημα, κνησμός και κνίδωση με ή χωρίς πυρετική κίνηση είναι από τα πιο κοινά χαρακτηριστικά της αντίδρασης. Σε περίπτωση σοβαρού αναφυλακτικού επεισοδίου πρέπει να γίνεται διακοπή της μετάγγισης, και αντιμετώπιση του περιστατικού με χορήγηση αντιϊσταμινικών και κορτικοειδών. Εάν υπάρξει υποχώρηση των συμπτωμάτων και δεν υφίσταται θέμα καρδιαγγειακής αστάθειας, μπορεί να συνεχιστεί η μετάγγιση μετά από εντολή ιατρού.

Οι αναφυλακτικές αντιδράσεις είναι πιο σπάνιες και εκδηλώνονται σε ασθενείς που στερούνται ανοσοσφαιρίνης IgA και έχουν ευαισθητοποιηθεί από προηγούμενη μετάγγιση ή εγκυμοσύνη. Συχνότερα εμφανίζονται σε ασθενείς με

ανεπάρκεια IgA. Ο υψηλός τίτλος αντισωμάτων αντι-IgA στα άτομα με έλλειψη IgA προκαλεί ενεργοποίηση του συμπληρώματος και αναφυλαξία.¹⁹ Η αντίδραση λαμβάνει χώρα αμέσως μετά την έναρξη της μετάγγισης. Η πρόληψη των αναφυλακτικών αντιδράσεων σε άτομα με ανεπάρκεια σε IgA επιτυγχάνεται με το πλύσιμο των ερυθρών και με τη μετάγγιση παραγώγων που στερούνται IgA. Η συνεχής παρακολούθηση του ασθενή στα πρώτα 15 λεπτά της μετάγγισης είναι ένας τρόπος πρόληψης της αντίδρασης [10], [18], [19].

Νόσος από την αντίδραση του μοσχεύματος κατά του ξενιστή που συνδέεται με τη μετάγγιση (Transfusion Associated Graft versus Host Disease, TA- GvHD)

Είναι μια σπάνια αντίδραση και συναντάται σε ορισμένες ομάδες ασθενών που παρουσιάζουν μεγάλη θνητότητα. Η ακριβής συχνότητα εμφάνισης της αντίδρασης είναι άγνωστη. Έχει παρατηρηθεί αυξημένη συχνότητα εμφάνισης της TA- GvHD στην Ιαπωνία λόγω ύπαρξης μεγαλύτερης ομοιογένειας HLA στον πληθυσμό.

Εμφανίζεται 2-30 ημέρες μετά τη μετάγγιση. Οφείλεται σε αδυναμία απόρριψης από ανοσοκατεσταλμένο δέκτη των T- αλλογενών λεμφοκυττάρων του δότη. Σε άτομα που δεν υφίστανται ανοσοκαταστολή μπορεί η αντίδραση να συμβεί όταν ο δότης και ο δέκτης είναι HLA απλοταυτόσημοι ή ο δότης είναι ομόζυγος ως προς ένα απλότυπο του δέκτη.

Η κλινική εικόνα του ασθενή μετά τη μετάγγιση περιλαμβάνει πυρετό, κηλιδοφουσαλιδώδες εξάνθημα και ερυθρότητα του δέρματος, ανορεξία, κοιλιακό άλγος και διάρροια, διαταραχές της ηπατικής λειτουργίας, καθώς και καταστολή της αιμοποίησης με αποτέλεσμα την πανκυτταροπενία.

Η θνητότητα είναι πολύ υψηλή, με ποσοστά >90%, με τελικό αίτιο θανάτου τη λοίμωξη. Το γεγονός αυτό συμβαίνει γιατί, εκτός από το ήπαρ, το δέρμα, το γαστρεντερικό σύστημα και ο μυελός των οστών είναι ο κύριος στόχος των T- λεμφοκυττάρων του δότη [3], [4], [20].

Επιβραδυνόμενη Αιμολυτική Αντίδραση (DHTR)

Η επιβραδυνόμενη αιμολυτική αντίδραση είναι η ανοσολογική απάντηση του δέκτη σε μεταγγιζόμενα αντιγόνα, στα οποία ο δέκτης έχει εκτεθεί στο παρελθόν (μετάγγιση ή εγκυμοσύνη). Το αντιερυθροκυτταρικό αλλοαντίσωμα έχει χαμηλό τίτλο και συνήθως δεν ανιχνεύεται κατά τον προμεταγγισιακό έλεγχο (έμμεσος Coombs και δοκιμασία συμβατότητας). Με την είσοδο του αντιγόνου παράγεται αναμνηστική απάντηση που παράγει αντισώματα τα οποία έχουν έναρξη από 1-28 μέρες και συνήθως εμφανίζονται την 7η μέρα από την μετάγγιση.

Γενικά, η κλινική εικόνα είναι ήπια και αρκετές φορές δεν αναγνωρίζεται. Επειδή τα αντισώματα προκαλούν καταστροφή των μεταγγιζόμενων ερυθρών παρατηρείται μη αναμενόμενη πτώση της αιμοσφαιρίνης μετά τη μετάγγιση με παρουσία σφαιροκυττάρων, αύξηση των δικτυοερυθροκυττάρων, της LDH, της έμμεσης χολερυθρίνης και ελάττωση των απτοσφαιρινών. Επίσης, παρατηρείται θετική άμεση και έμμεση Coombs, με την άμεση Coombs να είναι θετική για μικρό χρονικό διάστημα. Σπανιότερα έχουμε αιμοσφαιριναιμία και αιμοσφαιρινουρία και αύξηση της κρεατινίνης.

Επί υποψίας επιβραδυνόμενης αιμολυτικής αναιμίας, ενημερώνεται άμεσα η Αιμοδοσία, έτσι ώστε αν χρειαστούν επιπλέον μονάδες για μετάγγιση να γίνει προσεκτική επιλογή του αίματος, το οποίο θα πρέπει να είναι αρνητικό ως προς το αντιγόνο έναντι του οποίου έχει αναπτυχθεί το αντίσωμα και να γίνει σωστά η δοκιμασία της διασταύρωσης. Σπάνια απαιτείται ειδική θεραπεία [21]–[23].

Μετά Μετάγγιση Πορφύρα (Post Transfusion Porpura, PTP)

Αποτελεί μια σπάνια επιπλοκή της μετάγγισης αίματος ή παραγώγων του. Η συχνότητα εμφάνισής της είναι 0,3/100000 μεταγγίσεις.

Χαρακτηρίζεται από βαριά θρομβοπενία, η οποία εμφανίζεται 7-12 ημέρες μετά τη μετάγγιση. Πρόκειται για θρομβοπενία ανοσολογικού τύπου που προκαλείται από αντιαιμοπεταλιακά αντισώματα (HPA) λόγω αλλοανοσοποίησης του δέκτη. Σε

νέα μετάγγιση προάγεται η αναμνηστική απάντηση και τα αλλοαντισώματα καταστρέφουν τόσο τα αιμοπετάλια που μεταγγίστηκαν, όσο και τα αιμοπετάλια του ίδιου του οργανισμού. Στο 60% των περιπτώσεων η αλλοανοσοποίηση αφορά το αντιγόνο HPA- 1a και είναι αποτέλεσμα μετάγγισης ή κύησης.

Μετά από 6-8 ημέρες και μετά από μετάγγιση ερυθρών, πλάσματος ή αιμοπεταλίων, οι ασθενείς εμφανίζουν ραγδαία πτώση των αιμοπεταλίων και αιμορραγική διάθεση. Στο 85% των περιπτώσεων τα αιμοπετάλια μειώνονται κάτω από 10000/μL, ενώ το 1/3 των ασθενών εμφανίζει ρίγος ή πυρετό.

Για να αντιμετωπιστεί η PTP χορηγείται ενδοφλέβια ανοσοσφαιρίνη (1g/kg) για 2 ημέρες, χρησιμοποιείται η μέθοδος της πλασμαφαίρεσης, ενώ σε απειλητική για τη ζωή αιμορραγία γίνεται μετάγγιση HPA-1a αρνητικά αιμοπετάλια [4], [19], [24].

Αλλοανοσοποίηση έναντι αντιγόνων των ερυθρών και αιμοπεταλίων του δέκτη (ανάπτυξη αντιερυθροκυτταρικών και αντιαιμοπεταλιακών αντισωμάτων)

Ως αλλοανοσοποίηση χαρακτηρίζεται η ανάπτυξη αντισωμάτων έναντι αντιγόνων της επιφανείας των ερυθρών ,των αιμοπεταλίων ή των λευκών αιμοσφαιρίων όταν αυτά εισέλθουν στην κυκλοφορία του λήπτη μετά από μετάγγιση. Η εμφάνιση των αντισωμάτων αυτών μπορεί να γίνει μετά από εβδομάδες ή και μήνες από την μετάγγιση.

Ο κίνδυνος αλλοανοσοποίησης για τα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως το υποκείμενο νόσημα του μεταγγιζόμενου ασθενή και η ανοσολογική του κατάσταση, η γενετική του προδιάθεση, η διάρκεια της αντιγονικής έκθεσης (συνολικός αριθμός μεταγγίσεων) και ο βαθμός αντιγονικής διαφοράς δότη-λήπτη.

Κλινικά η αλλοανοσοποίηση εκδηλώνεται ως ήπια επιβραδυνόμενη αιμολυτική αντίδραση μετά την μετάγγιση ή είναι κλινικά σιωπηλή. Η ύπαρξη αντιερυθροκυτταρικών αντισωμάτων γίνεται γνωστή σε μεταγενέστερο έλεγχο συμβατότητας του ασθενή ή σε έλεγχο ρουτίνας σε περίπτωση εγκυμοσύνης. Η

ανάπτυξη αντιερυθροκυτταρικών αντισωμάτων μπορεί να επιφέρει δυσκολία στην ανεύρεση συμβατού αίματος σε επόμενες μεταγγίσεις , ή αιμολυτική νόσο του νεογνού σε επόμενες κυήσεις. Η πρωτογενής αλλοανοσοποίηση κατά κανόνα δεν σχετίζεται με αιμόλυση. Όταν ανευρίσκονται τα αντισώματα στον ασθενή, τα ερυθρά της μετάγγισης που προκάλεσαν την παραγωγή των αντισωμάτων δεν υπάρχουν στην κυκλοφορία για να προκαλέσουν αιμόλυση. Η ανεύρεση των αντισωμάτων γίνεται με έμμεσο Coombs και ταυτοποιούνται με panel.

Αλλοανοσοποίηση μπορεί να προκληθεί μετά από ευαισθητοποίηση του λήπτη σε αντιγόνα των αιμοπεταλίων ή των λευκοκυττάρων του δότη (αντισώματα κατά των λευκοκυτταρικών αντιγόνων HLA και του αντιγόνου HPA1a).

Η ύπαρξη αλλοαντισωμάτων εναντίον των αιμοπεταλίων δύναται να προκαλέσει ανθεκτικότητα στην μετάγγιση των αιμοπεταλίων ή πορφύρα μετά την μετάγγιση.

Η ύπαρξη αλλοαντισωμάτων έναντι των πολυμορφοπύρηνων δύναται να προκαλέσει πυρετική αιμολυτική αντίδραση ή TRALI [3], [4], [23].

Ανοσοτροποποίηση από Μετάγγιση (TRIM)

Το TRIM αναφέρεται στις ανοσορυθμιστικές επιδράσεις του μεταγγιζόμενου αίματος. Η μετάγγιση αίματος προκαλεί ανοσολογικές μεταβολές στον λήπτη, είτε προς την πλευρά της ανοσοδιέγερσης, είτε προς την πλευρά της ανοσοκαταστολής.

Στην παθογένεια του συνδρόμου TRIM κεντρικό ρόλο διαδραματίζουν τα υπολειπόμενα λευκά του ασκού, τα οποία απομακρύνονται με την εφαρμογή της λευκαφαίρεσης. Έχει παρατηρηθεί ότι προκαλείται παραγωγή κυτταροκινών, πρασταγλανδινών, ιντερλευκινών και συμπληρώματος. Παραμένει ασαφές στη βιβλιογραφία αν οι μεταβολές αυτές έχουν κλινική σημασία.

Κατά την τελευταία δεκαετία μια σειρά από μελέτες ενοχοποιούν την ανοσοκαταστολή της μετάγγισης στις μετεγχειρητικές λοιμώξεις και την υποτροπή νεοπλασμάτων στους ασθενείς που μεταγγίζονται περιεγχειρητικά. Για το λόγο αυτό, σε αυτές τις περιπτώσεις συνιστάται σαν μέτρο πρόληψης η καθολική

λευκαφαίρεση όλων των προς μετάγγιση παραγώγων. Επίσης, η καλύτερη στρατηγική θεωρείται ο περιορισμός των μεταγγίσεων για την αποφυγή παρουσίας του TRIM [4], [9], [25], [26].

Μετάδοση νοσημάτων

Η μετάγγιση αίματος μπορεί να είναι μια σωτήρια διαδικασία, αλλά ενέχει κινδύνους συμπεριλαμβανομένων των λοιμωδών επιπλοκών. Ο κίνδυνος μετάδοσης των νοσημάτων ποτέ δεν είναι μηδενικός. Καμία εξέταση δεν έχει ευαισθησία 100%. Ακόμη και οι γνωστοί ιοί δεν ανιχνεύονται σε όλες τις περιπτώσεις διότι πάντα υπάρχει η «περίοδος του παραθύρου» μεταξύ μόλυνσης και ανίχνευσης του ιού.

Με την εφαρμογή σύγχρονων μεθόδων μοριακής τεχνικής NAT μειώνεται η «περίοδος του παραθύρου». Οι μονάδες αίματος σήμερα στην Ελλάδα ελέγχονται για την ύπαρξη μόλυνσης από συγκεκριμένους ιούς και παράσιτα. Με την πάροδο των ετών, έχει υπάρξει μια σημαντική μείωση στη συχνότητα εμφάνισης λοιμώξεων που μεταδίδονται με τη μετάγγιση.

Στις δύο τελευταίες δεκαετίες υπήρξε ανάδυση νέων και επανεμφανιζόμενων λοιμώξεων. Ως εκ τούτου, παρά τα αυστηρά κριτήρια επιλογής των αιμοδοτών, το βελτιωμένο έλεγχο του δότη και την εισαγωγή της προηγμένης τεχνολογίας, η μετάδοση μόλυνσης με μετάγγιση συνεχίζει να είναι πρόκληση για τους ειδικούς που ασχολούνται με τη μετάγγιση.

Μεταδιδόμενες με τη μετάγγιση λοιμώξεις αποτελούν:

Ιογενείς λοιμώξεις

- ✓ Λοίμωξη από HBV
- ✓ Λοίμωξη από HCV
- ✓ Λοίμωξη από HIV
- ✓ Λοίμωξη από HTLV I & II

- ✓ Λοίμωξη από CMV
- ✓ Λοίμωξη από EBV
- ✓ Λοίμωξη από παρβοϊό B19
- ✓ Ιός του Δυτικού Νείλου(WNV)

Βακτηριακές λοιμώξεις

- ✓ Οφειλόμενες στις συνθήκες λήψης και συντήρηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων.

Παρασιτικές λοιμώξεις

- ✓ Ελονοσία
- ✓ Νόσος Chagas
- ✓ Μπαμπεσίωση
- ✓ Λοιμώξεις από prions
- ✓ Λοιμώξεις από prions- Νόσος του Creutzfeldt-Jakob(CJD) [3], [4], [27]

Μεταβολικές επιδράσεις μαζικής μετάγγισης

Μια μετάγγιση θεωρείται μαζική όταν ο ενήλικας ασθενής μεταγγισθεί με ποσότητα αίματος ίση ή μεγαλύτερη του συνολικού όγκου αίματός του σε διάστημα 24ωρών.

Οποιαδήποτε αιτία μαζικής καταπληξίας μπορεί να χρειαστεί μαζική μετάγγιση όπως:

- Πολυτραυματίας
- Αιμορραγία πεπτικού
- Μαιευτικά συμβάντα (ρήξη εξωμήτριας κύησης)
- Μεγάλες χειρουργικές επεμβάσεις
 - i. Καρδιοχειρουργικές
 - ii. Αγγειοχειρουργικές(ανεύρυσμα αορτής)
 - iii. Ήπατος (ηπατεκτομή)

Η μαζική μετάγγιση μπορεί να προκαλέσει διάφορες επιπλοκές:

- Δηλητηρίαση από κιτρικά
- Ηλεκτρολυτικές διαταραχές
- Διαταραχές της αιμόστασης
- Υποθερμία
- Εμβολή αέρα [3], [4]

4. Λευκαφαίρεση

4.1 Εισαγωγή

Οι συνεχώς αυξανόμενες ανάγκες για μετάγγιση επιβάλλουν την εφαρμογή τεχνολογικών μεθόδων βελτίωσης των προϊόντων του αίματος, οι οποίες έχουν σκοπό την αύξηση της ασφάλειας και της ποιότητας του προς μετάγγιση προϊόντος.

Ο συνδυασμός του ελέγχου των μονάδων αίματος και η αυστηρή επιλογή των αιμοδοτών έχουν μειώσει σημαντικά τον κίνδυνο μετάδοσης ιών και άλλων λοιμογόνων παραγόντων, μέσω της μεταγγισιοθεραπείας. Καθώς υπολειπόμενοι κίνδυνοι μετάδοσης νοσημάτων εξακολουθούν να υφίστανται, παρά τα μέτρα προστασίας, νέες στρατηγικές ασφαλείας εφαρμόζονται για τη διασφάλιση της ποιότητας των προϊόντων του αίματος, μία εκ των οποίων είναι η τεχνική της λευκαφαίρεσης.

Αρχικά είχε δοθεί μικρή σημασία στα λευκοκύτταρα που υπάρχουν στα συστατικά του αίματος και στο ρόλο που διαδραματίζουν, καθώς αποτελούν αλλογενή ανοσοαντιδρώντα κύτταρα τα οποία δεν έχουν κανένα κλινικό όφελος για τον παραλήπτη-ασθενή. Ωστόσο, η παρουσία των λευκών αιμοσφαιρίων στο αίμα και στα παράγωγα του έχει πλέον ενοχοποιηθεί ότι ευθύνεται για διάφορες άμεσες αλλά και απώτερες παρενέργειες στο λήπτη, όπως η πυρετική μη αιμολυτική αντίδραση, η μεταφορά ενδοκυττάρων λοιμογόνων παραγόντων, η αλλοανοσοποίηση στα HLA και στα αιμοπεταλιακά αντιγόνα, και η ανοσοτροποποίηση. Η διαδικασία απομάκρυνσης των λευκών αιμοσφαιρίων από το αίμα και τα παράγωγα του καλείται λευκαφαίρεση και επιτυγχάνεται με τη χρήση ειδικών φίλτρων κατακράτησης λευκών.

Η λευκαφαίρεση ξεκίνησε να εφαρμόζεται από τη δεκαετία του 1980 αρχικά επιλεκτικά σε ομάδες ασθενών πολυμεταγγιζόμενων, οι οποίες είχαν αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης επιπλοκών από τα μεταγγιζόμενα λευκά. Ο τύπος αυτός της λευκαφαίρεσης καλείται «επιλεκτική λευκαφαίρεση».

Η επιλεκτική λευκαφαίρεση εφαρμόζεται μετά από την επεξεργασία του ολικού αίματος, το διαχωρισμό σε παράγωγα και την αποθήκευση (poststorage). Η

απομάκρυνση των λευκών επιτυγχάνεται, είτε με τη χρήση “bedside”(πρακτική που τείνει να εγκαταληφθεί), είτε με τη χρήση ειδικών εργαστηριακών φίλτρων (πρακτική που κυρίως εφαρμόζεται). Οι μονάδες παραγώγων (συνήθως συμπυκνωμένα ερυθρά) που λευκαφαιρούνται εργαστηριακά πρέπει να χορηγούνται εντός 24ώρου και τούτο διότι παραβιάζεται η στειρότητα του ασκού και υπάρχει κίνδυνος ανάπτυξης μικροβίων.

Στη χώρα μας εξακολουθεί να εφαρμόζεται η επιλεκτική λευκαφαίρεση παραγώγων αίματος σε ασθενείς με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης παρενεργειών από τη μετάγγιση των λευκών αιμοσφαιρίων. Αντίθετα σε αρκετές χώρες της Ευρώπης, όπως στο Ηνωμένο Βασίλειο, στη Γαλλία, στην Ελβετία και στην Αυστρία εφαρμόζεται από το 1999 η καθολική λευκαφαίρεση, δηλαδή η απομάκρυνση των λευκών αιμοσφαιρίων από όλες τις μονάδες του ολικού αίματος και των παραγώγων του, λόγω της εμφάνισης νέων παθογόνων οργανισμών με βασικό εκπρόσωπό τους την πρωτεΐνη prion PrP , η οποία είναι υπεύθυνη για τη νόσο του Creutzfeldt-Jakob (CJD). Η μέθοδος της καθολικής λευκαφαίρεσης εφαρμόζεται πριν την αποθήκευση του αίματος (pre-storage) ή μετά την αποθήκευση αυτού (post storage) [28].

4.2 Φίλτρα Λευκαφαίρεσης

Η έννοια της αφαίρεσης των λευκοκυττάρων από το αίμα εισήχθη αρχικά από τον Fleming το 1920 και μετέπειτα από τον Swank το 1961. Αργότερα, στην δεκαετία του 80 η πρόοδος στην τεχνολογία οδήγησε στην ανάπτυξη των φίλτρων οξικής κυτταρίνης πρώτης γενιάς με μια αποδοτικότητα αφαίρεσης των λευκοκυττάρων 98%. Οι μέθοδοι αυτές, παρά το γεγονός ότι είχαν κλινικά αποδεκτά αποτελέσματα, παρουσίασαν δυο σημαντικούς περιορισμούς. Αρχικά, φάνηκε να προκαλούν ενεργοποίηση του συμπληρώματος C3, με επακόλουθη αγγειοσυστολή και αυξημένη διαπερατότητα των τριχοειδών, καθώς επίσης, η αποτελεσματικότητα της αφαίρεσης των λευκοκυττάρων εξαρτήθηκε έντονα από τη ροή κατά μήκος του φίλτρου, με αποτέλεσμα η συνολική διαδικασία διήθησης να είναι αργή.

Τα φίλτρα τρίτης και τέταρτης γενιάς έχουν συμβάλει στην αποτελεσματικότερη διασφάλιση της ποιότητας του αίματος και των παραγώγων του με τη γρήγορη ροή και την αποτελεσματική αφαίρεση των λευκοκυττάρων σε ποσοστό 99,99% σε σύγκριση με τα φίλτρα πρώτης και δεύτερης γενιάς (90-98%) [17] (Εικ. 2)



Εικόνα 2. Φίλτρα λευκαφαίρεσης [29].

4.3 Μέθοδοι Λευκαφαίρεσης

4.3.1 Γενικά

Τις τελευταίες δεκαετίες τα μεταγγιζόμενα λευκοκύτταρα ενοχοποιούνται διαρκώς για μια σειρά αντιδράσεων, μεταδόσεις ιών, ανοσοτροποποίησης, αλλοανοσοποίησης και άλλες επιβλαβείς επιπτώσεις. Προκειμένου να αποφευχθούν οι αντιδράσεις που προκαλούνται από την παρουσία των λευκοκυττάρων, είναι απαραίτητη η λευκαφαίρεση υψηλού βαθμού, η οποία μπορεί να επιτευχθεί με την εφαρμογή ειδικού φίλτρου. Η χρήση ειδικού φίλτρου είναι ένας από τους πλέον αποτελεσματικούς τρόπους λευκαφαίρεσης. Τα χαρακτηριστικά ενός φίλτρου λευκαφαίρεσης είναι:

- Να είναι βιοσυμβατό, εύχρηστο
- Σχετικά μικρού κόστους
- Η κατακράτηση των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων να είναι υψηλή
- Η απώλεια των ερυθρών να είναι χαμηλή (ανάκτηση ερυθρών >90%)
- Να υπάρχει ικανοποιητική ροή των ερυθρών μέσω του φίλτρου

Επιπλέον, χαρακτηριστικό των φίλτρων που είναι ενσωματωμένα στα συστήματα συλλογής είναι ότι φέρουν δικτυωτή επιφάνεια, η οποία είναι φορτισμένη με θετικό ή αρνητικό φορτίο. Στο φορτίο αυτό αποδίδεται η ικανότητα τους να κατακρατούν τα λευκά αιμοσφαίρια, είτε άμεσα λόγω του φορτίου, είτε έμμεσα μέσω της προσκόλλησης τους σε αιμοπετάλια που έχουν κατακρατηθεί. Τα φίλτρα που χρησιμοποιούνται για τη λευκαφαίρεση των αιμοπεταλίων υπόκεινται σε ειδική επεξεργασία ώστε να αποτρέπεται η προσκόλληση των αιμοπεταλίων σε αυτά και να απομακρύνονται μόνον λευκά αιμοσφαίρια.

Με τη χρήση ειδικών φίλτρων κατακράτησης των λευκοκυττάρων επιτυγχάνεται υψηλότερου βαθμού λευκαφαίρεση. Για καλύτερα αποτελέσματα ως προς την ποιότητα των λευκαφαιρεμένων προϊόντων του αίματος, πρέπει να εφαρμόζεται ποιοτικός έλεγχος σε όλα τα στάδια της λευκαφαίρεσης, από την αρχική συλλογή

του ολικού αίματος μέχρι την τελική μορφή αυτού πριν την αποθήκευσή του. Η αξιολόγηση ενός φίλτρου λευκαφαίρεσης επιτυγχάνεται με τη μέτρηση του υπολειμματικού αριθμού των λευκοκυττάρων.

Οι μέθοδοι που εφαρμόζονται για την αφαίρεση των λευκών αιμοσφαιρίων είναι:

- ✓ Προ αποθήκευσης (pre storage).
- ✓ Μετά την αποθήκευση (post storage).
- ✓ Κυτταραφαίρεση [17], [28], [30]

4.3.2 Προ Αποθήκευσης (Pre Storage) Λευκαφαίρεση

Η πιο κοινή μορφή λευκαφαίρεσης που χρησιμοποιείται στην Ευρώπη και στις ΗΠΑ είναι η προ αποθήκευσης λευκαφαίρεση, κατά την οποία αφαιρούνται τα λευκοκύτταρα πριν την αποθήκευση, κατά την διάρκεια της επεξεργασίας μέσα στο πρώτο 24ωρο από την συλλογή και το τελικό προϊόν αποθηκεύεται χωρίς λευκά και χωρίς αιμοπετάλια. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η παρουσία των λευκών αιμοσφαιρίων είναι επιθυμητή για τις πρώτες ώρες μετά τη λήψη του αίματος, αφού μέσω της φαγοκυττάρωσης έχει φανεί ότι μειώνουν την πιθανότητα βακτηριακής επιμόλυνσής του. Έτσι ανεξάρτητα από το σύστημα συλλογής που θα χρησιμοποιηθεί, το φιλτράρισμα θα πρέπει να γίνεται μετά την πάροδο τουλάχιστον 2 ωρών από την αιμοληψία.

Η αποτελεσματικότητα της λευκαφαίρεσης εξαρτάται από μια σειρά παραγόντων όπως ο τύπος του φίλτρου, η αρχική συγκέντρωση των λευκοκυττάρων στο ολικό αίμα, ο ρυθμός φιλτραρίσματος καθώς και η θερμοκρασία. Στην κατηγορία αυτής της λευκαφαίρεσης υπάρχουν τρία είδη συστημάτων ασκών-φίλτρων:

- 1) Λευκαφαίρεση σε ολικό αίμα.
- 2) Σε ερυθροκύτταρα.

3) Ασκοί συλλογής αίματος με ενσωματωμένο φίλτρο (in line filter) το οποίο παρεμβάλλεται σε διάφορα σημεία (λευκαφαιρεμένα ερυθρά, πλάσμα, αιμοπετάλια).

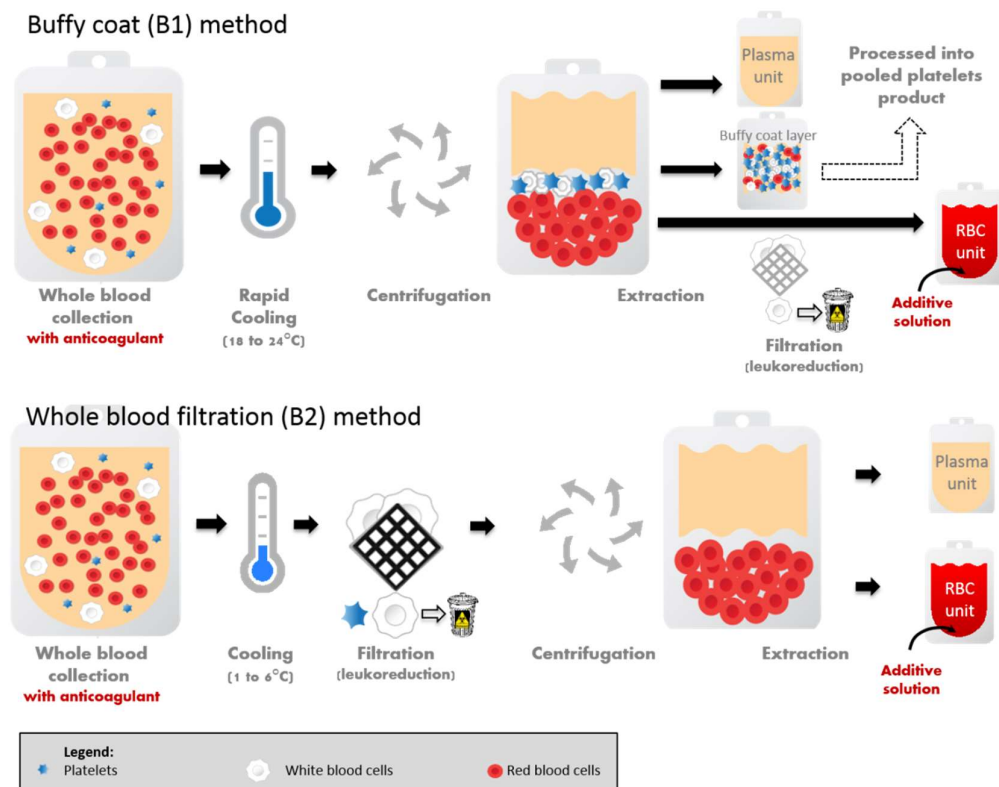
Τα παραπάνω συστήματα καλούνται «κλειστά», διότι ενσωματώνουν το φίλτρο στους ασκούς αιμοληψίας.

Για την παραγωγή λευκαφαιρεμένου ολικού αίματος χρησιμοποιείται τεχνική διήθησης. Η λευκαφαίρεση σε ολικό αίμα γίνεται πριν την επεξεργασία διαχωρισμού του παραγώγου και σε διάστημα 24 ωρών από την αιμοληψία, ώστε να ολοκληρωθεί η φαγοκυττάρωση. Στα συστήματα αυτά το ολικό αίμα περνά από το φίλτρο το οποίο κατακρατά αιμοπετάλια και λευκά. Στην συνέχεια, αποκόβουμε το φίλτρο και τον αρχικό ασκό συλλογής αίματος και προχωράμε στο διαχωρισμό του αίματος μέσω της φυγοκέντρησης και κατ' αυτόν τον τρόπο έχουμε λευκαφαιρεμένα ερυθροκύτταρα και πλάσμα. Το μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η κατακράτηση των αιμοπεταλίων. Το λευκαφαιρεμένο ολικό αίμα περιέχει, φυσιολογικά, λιγότερα από 1×10^6 λευκοκύτταρα.

Στο δεύτερο τύπο λευκαφαίρεσης, τα λευκαφαιρεμένα ερυθροκύτταρα μπορούν να παραχθούν με α) διήθηση των λευκοκυττάρων από ολικό αίμα με επακόλουθη φυγοκέντρηση και αφαίρεση του πλάσματος β) διήθηση των λευκοκυττάρων από ένα προϊόν ερυθροκυττάρων. Η διαδικασία της λευκαφαίρεσης εφαρμόζεται εφόσον έχει γίνει πρώτα ο διαχωρισμός του αίματος σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια και ερυθροκύτταρα μέσω της φυγοκέντρησης, όπου το παράγωγο των ερυθρών περνά από το φίλτρο και επιτελείται η λευκαφαίρεση. Τα συστήματα αυτά παράγουν λευκαφαιρεμένα ερυθροκύτταρα και μη λευκαφαιρεμένο πλάσμα και αιμοπετάλια.

Ο τρίτος τύπος λευκαφαίρεσης για όλα τα παράγωγα είναι με δυο φίλτρα, ένα για τα ερυθρά και ένα για πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια. Στην περίπτωση αυτή έχουμε λευκαφαιρεμένα ερυθρά ,πλάσμα και αιμοπετάλια.

Μια άλλη μέθοδος λευκαφαίρεσης είναι η διαδικασία του «buffy coat». Μετά από φυγοκέντρηση του ολικού αίματος σ' ένα σύστημα τετραπλού ασκού, ο όγκος των λευκοκυττάρων (buffy coat) αποχωρίζεται από το πλάσμα και από τα κύτταρα και μεταφέρεται σ' ένα συνοδό ασκό. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την απομάκρυνση των λευκοκυττάρων κατά 85% (Εικ.3)



Εικόνα 3. Μέθοδοι λευκαφαίρεσης [31].

Η εφαρμογή της λευκαφαίρεσης που αφορά τα αιμοπετάλια, τα οποία προέρχονται από ολικό αίμα, επιτυγχάνεται με τη χρήση φίλτρων ανάλογα με αυτά που χρησιμοποιούνται για τα συμπυκνωμένα ερυθρά, εφόσον έχουν υποστεί ειδική επεξεργασία για να αποφεύγεται η προσκόλληση των αιμοπεταλίων. Ο υπολειμματικός αριθμός των λευκών ανά μεταγγιζόμενο ασκό αιμοπεταλίων θα πρέπει να είναι στο 10^4 - 10^6 . Η αποτελεσματικότητα της λευκαφαίρεσης εξαρτάται από το ρυθμό του φιλτραρίσματος, από την ηλικία των αιμοπεταλίων, από τη συγκέντρωση των λευκών καθώς και από το επίπεδο ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων [17], [28], [30], [32].

4.3.3 Μετά την αποθήκευση (post storage)

Αφαίρεση των λευκοκυττάρων στα παράγωγα του αίματος μπορεί να πραγματοποιηθεί και μετά την επεξεργασία και αποθήκευση των παραγώγων του αίματος . Στην περίπτωση αυτή τα παράγωγα αποθηκεύονται με τα λευκοκύτταρα και η λευκαφαίρεση πραγματοποιείται είτε μέσα στο εργαστήριο της Αιμοδοσίας πριν την μετάγγιση με την χρήση εργαστηριακού φίλτρου (laboratory filters), είτε με φίλτρα παρά τη κλίνη (bed side) κατά την διάρκεια της μετάγγισης. Μια μονάδα συμπυκνωμένων ερυθρών, που έχει λευκαφαιρεθεί με ημιανοικτό σύστημα λευκαφαίρεσης πρέπει να χορηγείται σε διάστημα 24 ωρών. Η διαδικασία της μετά από αποθήκευση (post storage) λευκαφαίρεσης προϋποθέτει εφαρμογή αυστηρών προδιαγραφών για το επιθυμητό αποτέλεσμα. Απαραίτητος είναι ο συχνός ποιοτικός έλεγχος, ο οποίος μπορεί να γίνει κατά τη χρήση εργαστηριακών φίλτρων. Το προσδοκώμενο αποτέλεσμα από τη χρήση φίλτρων (post storage) εξαρτάται από την εφαρμοζόμενη τεχνική λευκαφαίρεσης.

Η λευκαφαίρεση παρά την κλίνη (bed side) μπορεί να επιφέρει θετικό αποτέλεσμα ως προς το γεγονός της απομάκρυνσης των ανεπιθύμητων παραγόντων που συσσωρεύονται κατά την διάρκεια της αποθήκευσης των ερυθρών. Έχει ωστόσο συσχετισθεί με την εμφάνιση υποτασικών επεισοδίων στους μεταγγιζόμενους. Έχει επίσης συσχετιστεί και με το σύνδρομο red eyes που είναι άγνωστης αιτιολογίας και παρουσιάζεται με πόνο, οίδημα στα μάτια, πονοκέφαλο, αρθραλγίες και λοίμωξη του αμφιβληστροειδή χιτώνα [28], [33].

4.3.4 Κυτταραφαίρεση

Λευκαφαιρεμένα είναι και τα προϊόντα που συλλέγονται με την μέθοδο της κυτταραφαίρεσης, με την χρήση ειδικών μηχανημάτων τα οποία μετά τη συλλογή ερυθρών ή αιμοπεταλίων ή πλάσματος συλλέγουν μόνο το επιθυμητό προϊόν χωρίς πρόσμιξη λευκών. Η μέθοδος αυτή απαιτεί χρόνο και έχει υψηλό κόστος [28], [30].

4.4 Κλινικά Οφέλη Λευκαφαίρεσης

Σήμερα η πιο ενδεδειγμένη μορφή λευκαφαίρεσης που εφαρμόζεται στην Ευρώπη και στις ΗΠΑ είναι η λευκαφαίρεση προ της αποθήκευσης, γιατί τα λευκοκύτταρα που περιέχονται στα συμπυκνωμένα ερυθρά έχουν ενοχοποιηθεί για μια σειρά από ανεπιθύμητες αντιδράσεις κατά τη μετάγγιση. Τα λευκά κατά την αποθήκευσή τους αποκοκκιώνονται, κατακερματίζονται και απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους, δηλαδή τις κυτοκίνες οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε μια σειρά από ανεπιθύμητες ενέργειες κατά την μετάγγιση.

Έχει αποδειχθεί ότι η λευκαφαίρεση που πραγματοποιείται αρκετές ώρες μετά την συλλογή του αίματος και προ της αποθήκευσης, επιτρέπει το φαγοκυτταρικό θάνατο των μικροοργανισμών που βρίσκονται στο αίμα και βελτιώνει μ' αυτόν τον τρόπο την ασφάλεια του προϊόντος. Η αφαίρεση των λευκοκυττάρων κάτω από ένα συγκεκριμένο επίπεδο έχει δείχθει να συμβάλλει στην πρόληψη ή τη μείωση των βραχυπρόθεσμων και μακροπρόθεσμων δυσμενών επιδράσεων στη μετάγγιση, όπως η φλεγμονώδης αντίδραση και η αλλοανοσοποίηση του αντιγόνου των ανθρώπινων λευκοκυττάρων (HLA). Η απομάκρυνση πάνω από το 99,9% των λευκοκυττάρων από τα παράγωγα ερυθροκυττάρων και αιμοπεταλίων μπορούν επίσης να ελαχιστοποιήσουν σημαντικά τη δυνητική μετάδοση ιών όπως ο κυτταρομεγαλοϊός και την αντίδραση μοσχεύματος κατά ξενιστού μετά από μετάγγιση (GvHD) [34].

Τα κλινικά οφέλη που προκύπτουν από την εφαρμογή της καθολικής λευκαφαίρεσης είναι:

1. Μειωμένη συχνότητα και σοβαρότητα των πυρετικών μη αιμολυτικών αντιδράσεων.
2. Μείωση του κινδύνου μετάδοσης του κυτταρομεγαλοϊού CMV.
3. Ελάττωση του κινδύνου αλλοανοσοποίησης εναντίον των αντιγόνων HLA και των ερυθροκυτταρικών αντιγόνων.

4.4.1 Μειωμένη συχνότητα και σοβαρότητα των πυρετικών μη αιμολυτικών αντιδράσεων

Η πυρετική μη αιμολυτική αντίδραση οφείλεται στην παρουσία λευκοκυτταρικών αντισωμάτων του δέκτη έναντι HLA αντιγόνων και λευκοκυτταρικών αντιγόνων του δότη. Επιπλέον σημαντική θεωρείται και η συμμετοχή κυτταροκινών στις αντιδράσεις κατά τη μετάγγιση. Οι κυτταροκίνες συμμετέχουν με δύο τρόπους :

- 1) Απελευθερώνονται από τα λευκοκύτταρα (συνήθως από τα μονοκύτταρα) in vivo, μετά από μετάγγιση ασύμβατων ερυθροκυττάρων ή λευκοκυττάρων και
- 2) απελευθερώνονται από τα λευκοκύτταρα in vitro κατά τη συντήρησή τους, προκαλώντας έτσι αντίδραση ακόμη και εάν τα μεταγγιζόμενα κύτταρα είναι συμβατά [35].

Οι κυτοκίνες που παράγονται από τα λευκά αιμοσφαίρια κατά την αποθήκευση του αίματος είναι ο αιτιολογικός παράγοντας των εμπύρετων αντιδράσεων. Η λευκαφαίρεση προ-αποθήκευσης είναι αποτελεσματικότερη στην πρόληψη της παραγωγής κυτοκινών σε σχέση με την μετά την αποθήκευση λευκαφαίρεση, η οποία εμφανίζει περιορισμένη αποτελεσματικότητα όσον αφορά τη μείωση του ποσοστού και της σοβαρότητας των πυρετικών μη αιμολυτικών αντιδράσεων.

Είναι γνωστό ότι τα λευκά αιμοσφαίρια, τα ερυθρά και τα αιμοπετάλια παράγουν προφλεγμονώδεις και προθρομβωτικούς διαμεσολαβητές κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης συμβάλλοντας στο φαινόμενο που είναι γνωστό ως «βλάβη αποθήκευσης». Με την καθολική λευκαφαίρεση αποτρέπεται η συσσώρευση των πρωτεϊνών που απελευθερώνονται από τα λευκά κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης που δρουν άμεσα ή έμμεσα ως πυρετογόνα [36].

Ως εκ τούτου για την αποτελεσματικότερη πρόληψη και μείωση της συχνότητας των πυρετικών μη αιμολυτικών αντιδράσεων, η λευκαφαίρεση θα πρέπει να πραγματοποιείται κατά το χρόνο της συλλογής του αίματος ή αμέσως μετά σε όλα τα παράγωγα του αίματος. Επιπροσθέτως, έχει βρεθεί ότι η μείωση του χρόνου

αποθήκευσης των παραγώγων του αίματος συμβάλλει στην ελάττωση των πυρετικών μη αιμολυτικών αντιδράσεων [37].

4.4.2 Μείωση του κινδύνου μετάδοσης του κυτταρομεγαλοϊού CMV

Η παρουσία λευκοκυττάρων στα παράγωγα του αίματος που προορίζονται για μετάγγιση μπορούν να μεταδώσουν τον ιό-CMV. Με την εφαρμογή όμως της καθολικής λευκαφαίρεσης επιτυγχάνεται ελαχιστοποίηση του κινδύνου μετάδοσης των λευκοτρόπων ιών (CMV, EBV, HHN-6, HHN-8). Στα άτομα που έχουν έρθει σε επαφή με τον κυτταρομεγαλοϊό, ο ιός βρίσκεται σε λανθάνουσα κατάσταση στα μονοπύρηννα κύτταρά τους δια βίου. Όταν ένας ασθενής βρίσκεται σε ανοσοκαταστολή με μειωμένη δραστικότητα των Τ λεμφοκυττάρων, ο ιός μπορεί να επανεμφανιστεί και να προκαλέσει λοίμωξη η οποία είναι απειλητική για τη ζωή του.

Η χορήγηση λευκαφαιρεμένου αίματος μπορεί να αποτρέψει μια πιθανή τέτοια έκβαση. Έχει βρεθεί ότι μια λευκαφαιρεμένη μονάδα αίματος είναι το ίδιο ασφαλής αναφορικά με την μετάδοση του CMV με αυτήν που προέρχεται από οροαρνητικό δότη ως προς τον CMV. Παρ'όλα αυτά, ασθενείς που βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο λοίμωξης από CMV καλό είναι να μεταγγίζονται με λευκαφαιρεμένα προϊόντα αίματος από CMV οροαρνητικούς δότες.

Ιδιαίτερη σημασία έχει η πρόληψη μετάδοσης της λοίμωξης στους ασθενείς που βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή και διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης CMV λοίμωξης από μετάγγιση. Ασθενείς που κινδυνεύουν από μετάδοση CMV είναι τα άτομα που λαμβάνουν χημειοθεραπεία, βρέφη κάτω των 2 ετών, νεογνά χαμηλού βάρους γέννησης και οι λήπτες μοσχευμάτων μυελού των οστών. Με την εφαρμογή της λευκαφαίρεσης δεν καθυστερεί η μετάγγιση σε περιπτώσεις που απαιτείται μετάγγιση με CMV αρνητική μονάδα αίματος [17], [38].

4.4.3 Ελάττωση του κινδύνου αλλοανοσοποίησης εναντίον των αντιγόνων HLA και των ερυθροκυτταρικών αντιγόνων

Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι η λευκαφαίρεση των παραγώγων του αίματος μειώνει την μετά μετάγγιση αλλοανοσοποίηση. Η αλλοανοσοποίηση των HLA αντιγόνων τάξεως I είναι ένα συχνό φαινόμενο (10%) που εμφανίζεται μετά τη μετάγγιση παραγώγων του αίματος. Η πιο κοινή αιτία της ανθεκτικότητας των αιμοπεταλίων στην μετάγγιση είναι η αλλοανοσοποίηση των HLA τάξεως I αντιγόνων, η οποία θεωρείται ότι συμβάλλει στην μειωμένη αποτελεσματικότητα των μεταγγιζομένων αιμοπεταλίων.

Επιπλέον, η καθολική λευκαφαίρεση ελαχιστοποιεί την μετάγγιση των δυνητικά ανοσογόνων «υπολειμμάτων» λευκών αιμοσφαιρίων (WBC), τα οποία συσσωρεύονται κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης.

Η χορήγηση λευκαφαιρεμένων προϊόντων του αίματος είναι αναγκαία για τους ασθενείς που υποβάλλονται σε πολλαπλές μεταγγίσεις ή έχουν κάνει ή πρόκειται να κάνουν μεταμόσχευση οργάνων. Οι ασθενείς αυτοί επωφελούνται από τη λήψη λευκαφαιρεμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων λόγω κινδύνου σχηματισμού αντι-HLA αντισωμάτων. Τα HLA αντισώματα μπορούν να προκαλέσουν απόρριψη αλλομοσχεύματος σε λήπτες μοσχευμάτων συμπαγών οργάνων και ανθεκτικότητα στη μετάγγιση αιμοπεταλίων σε ασθενείς με αιματολογικές ασθένειες.

Η καθολική λευκαφαίρεση συμβάλλει στην βελτίωση της ποιότητας των παρεχόμενων ερυθρών καθώς και των παραγώγων, η οποία επιτυγχάνεται με την λευκαφαίρεση προ της αποθήκευσης, από τις μονάδες συμπυκνωμένων ερυθρών με υπολειμματικό αριθμό λευκών μικρότερο του 1×10^6 . Μ' αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται καλύτερη βιωσιμότητα των ερυθροκυττάρων και περιορισμό των αντιδράσεων που δημιουργούνται από τη λύση των λευκών κατά την διάρκεια της αποθήκευσης [39], [40].

4.5 Πιθανά Κλινικά Οφέλη Λευκαφαίρεσης

Εκτός από τα κλινικώς αποδεδειγμένα οφέλη της καθολικής λευκαφαίρεσης υφίστανται και τα πιθανά κλινικά οφέλη που προκύπτουν από την τεχνική της λευκαφαίρεσης και συνδέονται με την μεταγγισιοθεραπεία.

➤ Η μείωση του άμεσου κινδύνου μετάδοσης των βακτηρίων μέσω της μετάγγισης, η οποία έχει σαν άμεσο αποτέλεσμα τη σήψη.

Η μόλυνση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων από βακτήρια είναι μια από τις θανατηφόρες επιπλοκές των μεταγγίσεων. Για τα μεν ερυθρά το πιο κοινό βακτήριο είναι η *Yersinia enterocolitica*, ενώ για τα αιμοπετάλια είναι ο επιδερμικός σταφυλόκοκκος. Τα αιμοπετάλια επιμολύνονται πιο συχνά σε σχέση με τα ερυθρά λόγω της αποθήκευσης των αιμοπεταλίων σε θερμοκρασία δωματίου. Η σηψαιμία από βακτήρια σχετίζεται με σημαντική νοσηρότητα και θνησιμότητα. Σήμερα υπάρχουν αρκετές τεχνικές υπό διερεύνηση που αποσκοπούν στην μείωση του κινδύνου της βακτηριδιακής επιμόλυνσης. Η λευκαφαίρεση μπορεί να διασφαλίζει την ανάπτυξη της βακτηριαμίας. Στα ερυθρά τα βακτήρια απομακρύνονται αποτελεσματικά με την διήθηση προ αποθήκευσης. Στα αιμοπετάλια, όμως, η λευκαφαίρεση μπορεί να παρέχει κάποια ασφάλεια αλλά δεν αγγίζει το ποσοστό αποτελεσματικότητας που έχει η απομάκρυνση με διήθηση στα ερυθρά [12], [37].

➤ Σε ορισμένες μελέτες που αφορούν καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις υπάρχουν στοιχεία που επιβεβαιώνουν ότι η χορήγηση λευκαφαιρεμένων παραγώγων του αίματος συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο βακτηριακής λοίμωξης και πολυοργανικής ανεπάρκειας. Επίσης, η χορήγηση λευκαφαιρεμένων συστατικών του αίματος, σύμφωνα με τις μελέτες, μειώνει σημαντικά την θνησιμότητα καθώς και το χρόνο παραμονής στο νοσοκομείο [41], [42].

➤ Η χορήγηση λευκαφαιρεμένων προϊόντων του αίματος υποστηρίζεται ότι πιθανόν συμβάλλει στην αποφυγή μετάδοσης της νόσου του CJD. Σε πολλές χώρες της Ευρώπης καθιερώθηκε κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών η τεχνική της

καθολικής λευκαφαίρεσης, προκειμένου να μειωθεί ο κίνδυνος της μετάδοσης της νόσου του VCJD μέσω της μετάγγισης [43].

➤ Μια πειραματική μελέτη από τον Gregory et.al έδειξε ότι η λευκαφαίρεση συσχετίστηκε με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης της μεταδοτικής σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας. Το ποσοστό μειώθηκε με τη λευκαφαίρεση από 48.1% σε 31.5%. Με τη μελέτη αυτή οι συγγραφείς έδειξαν ότι η λευκαφαίρεση με διήθηση σχετίστηκε με μειωμένη μολυσματικότητα της μεταδοτικής σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας αλλά αυτό δεν φαίνεται να είναι αρκετό για την πρόληψη της νόσου [43].

➤ Η καθολική λευκαφαίρεση έχει συνδεθεί με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης του συνδρόμου οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας σε ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση. Η παρουσία υπολειμματικών λευκοκυττάρων στα αποθηκευμένα ερυθρά μπορούν να συμβάλλουν στην εμφάνιση του συνδρόμου. Η ύπαρξη λευκοκυττάρων προκαλεί αύξηση των λιπιδίων και των φλεγμονωδών κυτοκινών (IL- 6, IL-8, TNF-a) που συσσωρεύονται κατά την διάρκεια της αποθήκευσης [8].

➤ Η νόσος μοσχεύματος κατά ξενιστή είναι μια σπάνια επιπλοκή της μετάγγισης που προκαλείται από την παρουσία βιώσιμων λευκοκυττάρων του δότη. Η εφαρμογή της λευκαφαίρεσης με φίλτρα 3ης και 4ης γενιάς μπορεί θεωρητικά να μειώσει το ποσοστό των υπολειπόμενων λευκοκυττάρων. Μια μελέτη στο Ηνωμένο Βασίλειο ανέφερε μείωση της συχνότητας εμφάνισης του συνδρόμου μετά την εφαρμογή της λευκαφαίρεσης. Η καθολική όμως λευκαφαίρεση δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν εναλλακτική λύση αντί της ακτινοβόλησης για την πρόληψη της νόσου σε ασθενείς που διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο [44].

➤ Η εφαρμογή της λευκαφαίρεσης στην κλινική πράξη, υποστηρίζεται ότι πιθανόν συμβάλλει στην μείωση του ιού του EBV και του HTLV I και II. Δεν υπάρχουν αρκετές μελέτες που να αποδεικνύουν ότι η λευκαφαίρεση είναι ένας αποτελεσματικός παράγοντας για την μειωμένη μετάδοση των παραπάνω λεμφοτρόπων ιών , όπως στην περίπτωση του CMV. Μερικές πειραματικές μελέτες

έδειξαν σημαντική μείωση του ιού του HTLV I από τα παράγωγα του αίματος με την προ αποθήκευσης λευκαφαίρεση, χωρίς όμως αυτό να είναι κλινικά αποδεδειγμένο. Ανεξάρτητα όμως από το γεγονός αυτό, δεν παύει η λευκαφαίρεση να προσθέτει μεγαλύτερη ασφάλεια κατά την μεταγγισιοθεραπεία [45].

4.6 Μειονεκτήματα Καθολικής Λευκαφαίρεσης

Τα μειονεκτήματα της καθολικής λευκαφαίρεσης περιλαμβάνουν:

➤ ***Το μειονέκτημα του υψηλού κόστους χρήσης***

Η κύρια ανησυχία από την εφαρμογή της καθολικής λευκαφαίρεσης είναι το υψηλό κόστος χρήσης. Πολλοί αντιτίθενται στην εφαρμογή της καθολικής λευκαφαίρεσης και υποστηρίζουν ότι το κόστος δεν αξίζει το όφελος. Η μείωση των λευκοκυττάρων επιφέρει τη μείωση μερικών επιπλοκών της μετάγγισης καθώς και οικονομικό όφελος που συνδέεται με την μειωμένη εμφάνιση FNHTRs, CMV μετάδοσης, αλλοανοσοποίησης, ανθεκτικότητας στη μεταγγιση των αιμοπεταλίων και μετεγχειρητικών λοιμώξεων. Οι ασθενείς που εμφανίζουν επιπλοκές είναι πιθανό να έχουν μεγαλύτερη παραμονή στο νοσοκομείο, η οποία σχετίζεται με την αύξηση του κόστους νοσηλείας.

➤ ***Την απώλεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων της τάξης του 2%.***

Με την εφαρμογή της λευκαφαίρεσης παρατηρείται μια απώλεια του όγκου των ερυθρών σε ποσοστό 2%, γεγονός, το οποίο είναι απίθανο να προκαλέσει αυξημένη ζήτηση για μεταγγίσεις ερυθρών [12], [37].

4.7 Καθολική Λευκαφαίρεση Και Προβληματισμοί

Τα λευκοκύτταρα, που υπάρχουν στα παράγωγα ερυθροκυττάρων και αιμοπεταλίων έχουν θεωρηθεί ως ισχυρός παράγοντας κινδύνου για σοβαρή νοσηρότητα, ακόμη και θνησιμότητα, σε επιλεγμένη ομάδα παραληπτών. Οι ανεπιθύμητες αντιδράσεις από τα υπολειπόμενα λευκοκύτταρα περιλαμβάνουν τη μετάδοση μολυσματικών παραγόντων, τις πυρετικές μη αιμολυτικές αντιδράσεις μετάγγισης, την ανθεκτικότητα σε μετάγγιση αιμοπεταλίων, τη νόσο μοσχεύματος κατά ξενιστή, τη γενικευμένη ανοσοκαταστολή και ένα αυξημένο ποσοστό απόρριψης μυελού των οστών ή μοσχευμάτων νεφρού [46].

Η σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας από την εφαρμογή της καθολικής λευκαφαίρεσης του αίματος και των συστατικών του παραμένει ασαφής. Ωστόσο, σε συγκεκριμένους πληθυσμούς ασθενών, όπως στους CMV οροαρνητικούς ασθενείς, στους ανοσοκατασταλμένους ασθενείς, ασθενείς με HLA ανοσοποίηση, ογκολογικούς και αιματολογικούς ασθενείς όπου ο αριθμός των μεταγγίσεων είναι μεγάλος, καθώς και στους ασθενείς που πάσχουν από συγγενή ή επίκτητη αναιμία με τακτικές μεταγγίσεις καθώς και ασθενείς που έχουν ιστορικό εμφάνισης πυρετικής μη-αιμολυτικής αντίδρασης, η λευκαφαίρεση έχει αποδεδειγμένη σχέση κόστους – αποτελεσματικότητας.

Η τρέχουσα τάση που επικρατεί σε πολλές δυτικές χώρες είναι η εφαρμογή της λευκαφαίρεσης σε όλους τους ασθενείς, δηλαδή η καθολική λευκαφαίρεση. Ο δυνητικός κίνδυνος μετάδοσης της νόσου Creutzfeldt-Jakob μέσω της μετάγγισης αίματος και ο φόβος που συνδέεται με τον κίνδυνο αυτό ευνόησε την υιοθέτηση της καθολικής λευκαφαίρεσης.

Παρόλο που οι μεταγγίσεις με λευκαφαιρεμένες μονάδες, έχει αναφερθεί ότι μειώνουν τη συχνότητα εμφάνισης μετεγχειρητικών μολύνσεων σε μεταμοσχευμένους ασθενείς, τα στοιχεία παραμένουν αδύνατα και αμφιλεγόμενα για τα οφέλη της λευκαφαίρεσης για αυτούς τους ασθενείς. Η μόνη κλινική κατάσταση στην οποία η χρήση των λευκαφαιρεμένων παραγώγων ερυθροκυττάρων έχει αποδειχθεί με συνέπεια ότι μειώνει τη βραχυπρόθεσμη

θνησιμότητα είναι σε ασθενείς στη καρδιολογική χειρουργική. Παρομοίως, έχει αναφερθεί ότι η καθολική λευκαφαίρεση έχει ως αποτέλεσμα λιγότερη χρήση αντιβιοτικών, λιγότερο χρόνο παραμονής των ασθενών στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας και μικρότερη συνολική διαμονή στο νοσοκομείο, αλλά αυτά τα ευρήματα δεν έχουν ακόμη επιβεβαιωθεί. Η καθολική λευκαφαίρεση έχει επίσης το θεωρητικό πλεονέκτημα ότι μπορεί να αποφύγει τη μετάδοση άγνωστων ή γνωστών ιών που σχετίζονται με τα λευκοκύτταρα, για τα οποία δεν πραγματοποιείται επί του παρόντος εξέταση. Η κλινική σημασία αυτής της μείωσης των κινδύνων εξακολουθεί να συζητείται. Καθώς λοιπόν, έγκυρες επιστημονικές ενδείξεις που να υποστηρίζουν τη σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας και τα κλινικά οφέλη αυτής της στρατηγικής εκλείπουν, ορισμένες χώρες της Ευρώπης εφάρμοσαν τη στρατηγική της λευκαφαίρεσης μόνο στην περίπτωση καλά καθιερωμένων ενδείξεων, κυρίως ως μέσο για τον περιορισμό του κόστους.

Η καθολική λευκαφαίρεση αποτελεί ένα παράδειγμα της επιτακτικής ανάγκης για αξιόπιστη και τεκμηριωμένη εφαρμογή κατευθυντήριων οδηγιών για τον καθορισμό κοινών πρακτικών σε όλες τις πτυχές της ιατρικής των μεταγγίσεων, συμπεριλαμβανομένων της συλλογής, προετοιμασίας, προμεταγγισιακού ελέγχου και των τεστ για μεταδιδόμενες ασθένειες μέσω μετάγγισης. Οι υπηρεσίες αιμοδοσίας θα πρέπει να είναι υπεύθυνες για τη βέλτιστη ασφάλεια του αίματος, όπως καθορίζεται από τις αντικειμενικές ανάγκες, τα κλινικά αποτελέσματα και την αποτελεσματικότητα του κόστους. Τέλος, πρέπει να τονιστεί ότι η ασφάλεια του αίματος είναι ένα θέμα αλληλεπίδρασης μεταξύ κόστους-αποτελεσματικής υλοποίησης των παρεμβάσεων ασφάλειας του αίματος και της κατάλληλης χρήσης των συστατικών του αίματος [46].

Συμπερασματικά, η καθολική λευκαφαίρεση θα πρέπει να θεωρηθεί ένα σημαντικό βήμα επεξεργασίας των συστατικών του αίματος, που θα συμβάλλει στην βελτίωση της ασφάλειας και της καθαρότητας των συστατικών του. Η εφαρμογή της λευκαφαίρεσης μπορεί να θεωρηθεί ένα σημαντικό και απαραίτητο προκαταρκτικό στάδιο επεξεργασίας για την παροχή ασφαλέστερων προϊόντων του αίματος για τους αποδέκτες [47], [48].

5. Μέθοδοι Καταμέτρησης των Υπολλειμματικών Λευκών Αιμοσφαιρίων

Τα τελευταία χρόνια έχει αναγνωρισθεί ότι τα λευκά αιμοσφαίρια (WBC) που υπάρχουν στο αίμα και τα συστατικά του αίματος μπορούν να προκαλέσουν μια σειρά σημαντικών παρενεργειών στους αποδέκτες. Αυτό ευνόησε την ανάπτυξη μεθόδων για την απομάκρυνση των λευκοκυττάρων από τα παράγωγα συμπυκνωμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC) και αιμοπεταλίων (PC) και οδήγησε στον εντοπισμό των συνθηκών όπου ενδείκνυται η χρήση των λευκαφαιρεμένων συστατικών του αίματος (Leukodepleted Blood Components, LDBC)[49].

Τα διεθνώς αποδεκτά πρότυπα ποιότητας των λευκαφαιρεμένων προϊόντων αίματος ορίζεται ως $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ λευκά αιμοσφαίρια (WBC) ανά μονάδα, ελέγχονται στο 1% των παραγόμενων μονάδων και το 90% έως 95% των μονάδων πληρούν τις απαιτήσεις. Ανάλογα με τον αριθμό των παραγόμενων προϊόντων αίματος, οι απαιτήσεις αυτές δημιουργούν ένα βαρύ φόρτο εργασίας για το εργαστήριο ελέγχου ποιότητας και είναι απαιτητικές όσον αφορά τους ανθρώπινους, τεχνικούς και οικονομικούς πόρους. Η ιδανική τεχνική καταμέτρησης των κυττάρων πρέπει να πληρεί μία πληθώρα σαφώς καθορισμένων χαρακτηριστικών, όπως υψηλή επαναληψιμότητα και ακρίβεια, να είναι μια εύκολη και απλή διαδικασία και να επιτρέπει την ανάλυση πολλαπλών δειγμάτων. Άλλα σημαντικά ζητήματα είναι η δυνατότητα επαναλαμβανόμενης ανάλυσης των δεδομένων και αποθήκευσης αυτών καθώς και η σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας. Οι περισσότερες από τις τεχνικές που διατίθενται σήμερα πληρούν πολλές από αυτές τις απαιτήσεις, αλλά καμία από αυτές δεν τις πληρεί στο σύνολο [50].

Η πρόοδος στην τεχνολογία έχει οδηγήσει σε νεότερες μεθόδους για την καταμέτρηση των υπολλειμματικών λευκών αιμοσφαιρίων (rWBC) τα οποία δεν ανιχνεύονται στους πιο συνηθισμένους αυτοματοποιημένους αιματολογικούς αναλυτές. Για να εξασφαλιστεί η καλή ποιότητα των λευκαφαιρεμένων προϊόντων, είναι επιτακτική η τακτική παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της διαδικασίας της λευκαφαίρεσης. Νέες μέθοδοι καταμέτρησης κυττάρων, όπως η

κυτταρομετρία ροής τείνουν να αντικαταστήσουν τις χειροκίνητες μεθόδους, όπως το αιμοκυττόμετρο Nageotte και τη μικροσκοπία [51].

Οι διαθέσιμες μέθοδοι καταμέτρησης μπορούν να χωριστούν σε πέντε κατηγορίες:

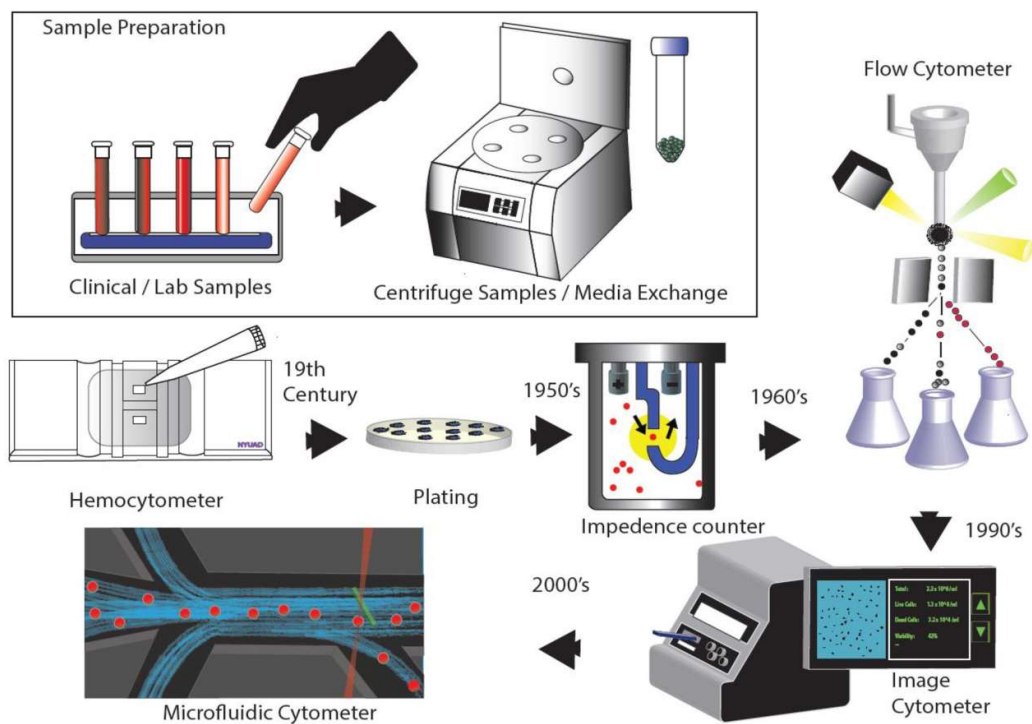
(1) Μικροσκοπικές μέθοδοι, που εκτελούνται με παραδοσιακούς ή μεγάλου όγκου θαλάμους μέτρησης,

(2) Μέθοδοι Κυτταρομετρία Ροής, που χρησιμοποιούν τεχνικές σκέδασης φωτός ή/και χρώσης DNA,

(3) Ραδιοανοσοδοκιμασίες,

(4) Μέθοδοι που βασίζονται στην ενίσχυση του DNA των λευκοκυττάρων και

(5) Μια ποιοτική μέθοδος, που βασίζεται στην παγίδευση των υπολειπόμενων λευκοκυττάρων σε φίλτρα πολυανθρακικού [49].



Εικόνα 4. Εξέλιξη διαφόρων τεχνολογιών μέτρησης και ανίχνευσης κυττάρων [52].

5.1 Μικροσκοπικές μέθοδοι- Αιμοκυττόμετρα

5.1.1 Γενικά

Η μικροσκοπική καταμέτρηση των κυττάρων του αίματος με χρήση θαλάμου είναι μια παραδοσιακή τεχνική που προσαρμόστηκε με πολλούς τρόπους για κλινικές και εργαστηριακές εφαρμογές. Μετά την αραιώση του δείγματος, τη βελτιστοποιημένη *in vitro* αιμολύση και τη χρώση των κυττάρων, τα καταβυθισμένα λευκά αιμοσφαίρια καταμετρούνται μικροσκοπικά σε έναν καθορισμένο όγκο, ο οποίος δίνεται από τους διάφορους διαθέσιμους θαλάμους (Nageotte, Neubauer, Ballast). Με την γνώση του εξεταζόμενου όγκου, του συντελεστή αραιώσης και του αριθμού των παρατηρούμενων κυττάρων, μπορεί να υπολογιστεί η τελική συγκέντρωση των υπολλειμματικών κυττάρων στο προϊόν. Ο όγκος του θαλάμου καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την ευαισθησία της μεθόδου. Ωστόσο, λόγω των ανεπαρκώς τυποποιημένων σταδίων προετοιμασίας, της υποκειμενικής απόκτησης δεδομένων και των εγγενών στατιστικών σφαλμάτων ως επακόλουθο της ποσοτικοποίησης του χαμηλού αριθμού γεγονότων, το μεθοδολογικό σφάλμα είναι εξαιρετικά υψηλό στα συγκεκριμένα όρια. Επιπλέον, οι μέθοδοι είναι χρονοβόρες, απαιτούν ανθρώπινο δυναμικό και πιθανώς να μην συμβαδίζουν με τις απαιτήσεις των στατιστικών διεργασιών ελέγχου. Στο πλαίσιο της καθολικής απομάκρυνσης των λευκοκυττάρων, οι τεχνικές μέτρησης του θαλάμου δεν μπορούν να θεωρηθούν ως το «χρυσό» πρότυπο και θα πρέπει να αντικατασταθούν από άλλες τεχνικά πιο εξελιγμένες μεθόδους [50].

5.1.2 Ιστορική Αναδρομή

Μετά την αρχική εφεύρεση του σύγχρονου αιμοκυττομέτρου στα τέλη του 19ου αιώνα, έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για την απαρίθμηση κυττάρων. Η συσκευή εξελίχθηκε από το να χρησιμοποιείται από κλινικούς ιατρούς για την ανάλυση δειγμάτων αίματος, σε ένα κοινό εργαλείο σε εργαστήρια και κλινικές σε όλο τον κόσμο. Χρησιμοποιείται ακόμη συχνά για την καταμέτρηση κυττάρων λόγω του χαμηλού κόστους και της ευελιξίας του.

Η ιστορία του αιμοκυττομέτρου συνδέεται με την αιματολογία, καθώς η μελέτη ασθενειών που σχετίζονται με το αίμα ήταν στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος των γιατρών. Η πρώτη τέτοια συσκευή που μοιάζει με το σύγχρονο αιμοκυττόμετρο επινοήθηκε από τον Louis Charles Malassez το 1874. Δημιούργησε έναν θάλαμο μέτρησης κολλημένο στη γυάλινη πλάκα με σημάσεις που συσχετίζουν το μήκος προς τον όγκο του δείγματος. Η συγκέντρωση των κυττάρων θα μπορούσε να προσδιοριστεί μετρώντας τα και πολλαπλασιάζοντας με τον συντελεστή αραιώσης.

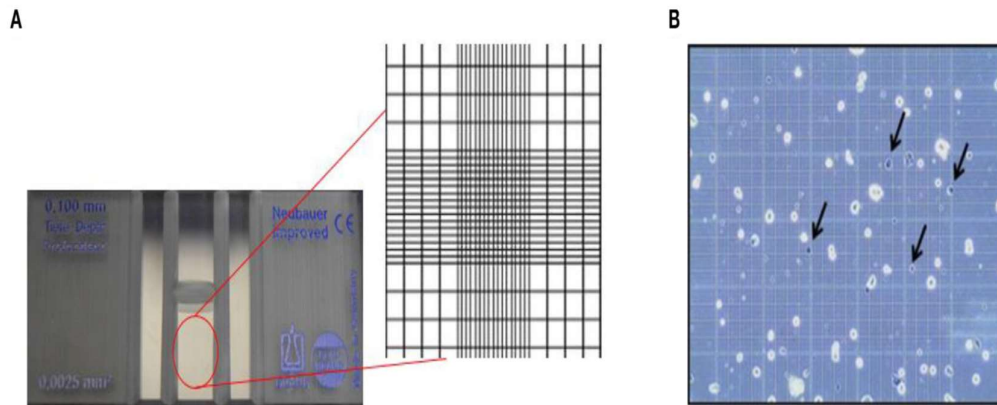
Η πιο σημαντική βελτίωση στην αποτελεσματικότητα μέτρησης προτάθηκε από τον Karl Burkner (1872-1957), ο οποίος έφτιαξε τη συσκευή χρησιμοποιώντας μια βαριά γυάλινη πλάκα και τρεις τσιμεντοειδείς πλατφόρμες γυαλιού στην επιφάνεια μαζί με το πλέγμα. Με την πάροδο του χρόνου, το αιμοκυττόμετρο και το πλέγμα μέτρησης εξελίχθηκαν για να εκπληρώνουν ποικίλες απαιτήσεις, καθώς ο αρχικός σχεδιασμός έγινε για την καταμέτρηση μικρότερων κυττάρων, όπως τα RBC, και δεν ήταν κατάλληλος για άλλα είδη κυττάρων.

5.1.3 Εφαρμογές

Τα αιμοκυττόμετρα που είναι σήμερα διαθέσιμα κατασκευάζονται μαζικά με πλέγματα χαραγμένα με λέιζερ. Είναι πιο ακριβή και πιο εύχρηστα σε σύγκριση με τους προκατόχους τους. Η συσκευή είναι κατασκευασμένη έτσι ώστε να εξασφαλίζεται ότι η περιοχή που καλύπτεται από τις γραμμές καθώς και ο όγκος του θαλάμου είναι γνωστά. Η περιοχή πλέγματος του αιμοκυττομέτρου αποτελείται από τετράγωνα 1×1 mm, τα οποία υποδιαιρούνται και πάλι σε μικρότερα τμήματα (Εικ. 5A). Το κυτταρικό εναιώρημα φορτώνεται μέσω τριχοειδούς δράσης στο θάλαμο και τα κύτταρα μετριοούνται χειροκίνητα. Ο αριθμός των κυττάρων μπορεί περαιτέρω να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ή της πυκνότητας των κυττάρων.

Παραδοσιακά, ένα αιμοκυττόμετρο χρησιμοποιείται, επίσης, για την ενίσχυση της καταμέτρησης των κυττάρων με την ανάλυση της βιωσιμότητας (Εικ. 5B). Η βιωσιμότητα των κυττάρων, η οποία είναι απαραίτητη για την εκτίμηση της

κινητικής της ανάπτυξης, πραγματοποιείται με την επιλεκτική χρώση του δείγματος χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές χρώσης.



Εικόνα 5. Αρχή αιμοκυττομέτρου. (A) Μεγενθυμένο ένθετο αιμοκυττομέτρου που δείχνει το θάλαμο Neubauer με πλέγμα μέτρησης. (B) Κύτταρα CT-26 του καρκινώματος του παχέως εντέρου χρησιμοποιώντας χρωστική ουσία trypan blue όπου τα βέλη υποδεικνύουν νεκρά κύτταρα [52].

Το αιμοκυττόμετρο δεν περιορίζεται σε συγκεκριμένες μεθόδους χρώσης και επιτρέπει όλες τις τεχνικές χρώσης σύμφωνα με τον σκοπό των αναλύσεων. Οι παραλλαγές της συσκευής, όπως το αιμοκυττόμετρο Nageotte, επιτρέπουν την ανάλυση της χαμηλής συγκέντρωσης κυττάρων πέρα από τις δυνατότητες του πρότυπου αιμοκυττομέτρου. Το αιμοκυττόμετρο Nageotte έχει αποδειχθεί ότι πραγματοποιεί ακριβείς μετρήσεις χαμηλών συγκεντρώσεων λευκοκυττάρων χρησιμοποιώντας χρώση κρυσταλλικού ιώδους.

5.1.4 Μειονεκτήματα

Η μέθοδος εξακολουθεί να υπόκειται σε αρκετές εγγενείς ελλείψεις λόγω του σχεδιασμού της. Οι μετρήσεις και οι παραλλαγές των υλικών, όπως ο τύπος του ρυθμιστικού διαλύματος και η πιπέτα που χρησιμοποιούνται, μπορούν να προσθέσουν ανεπιθύμητα σφάλματα στο αποτέλεσμα. Δεδομένου ότι το αιμοκυττόμετρο εξακολουθεί να εξαρτάται από τη χειροκίνητη μέτρηση, το ανθρώπινο σφάλμα είναι αναπόφευκτο στα διάφορα στάδια της διαδικασίας (ανάμειξη, χειρισμός και αραιώση). Αν ο αναλυτής δεν έχει κάποιο επίπεδο

εμπειρίας για τη χρήση του αιμοκυττομέτρου, μπορεί να οδηγήσει σε λιγότερη ακρίβεια και υψηλά σφάλματα λειτουργικότητας.

Απαιτούνται συνήθως πολλές μετρήσεις δειγμάτων για να διασφαλιστεί ότι τα αποτελέσματα είναι συνεπή και αντιπροσωπευτικά του αρχικού δείγματος. Η διαδικασία μη αυτόματης καταμέτρησης είναι επίσης χρονοβόρα και επομένως δεν είναι αποτελεσματική για να εφαρμοστεί για αναλύσεις μεγάλης κλίμακας. Παρά τις ελλείψεις, στα χέρια ενός έμπειρου χρήστη, συνεχίζει να είναι ένα χρήσιμο εργαλείο να διακρίνει και να απαριθμεί έναν ετερογενή πληθυσμό κυττάρων [52].

5.2 Κυτταρομετρία Ροής

5.2.1 Γενικά

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry-FC) είναι γενικά μια μεθοδολογία μέτρησης και ανάλυσης των σημάτων που παράγονται καθώς μια μονήρης σωματιδιακή διάταξη διέρχεται δια μέσου μιας φωτεινής δέσμης.

Στη κλινική πράξη θα μπορούσε να ορισθεί ως μία αυτοματοποιημένη μέθοδος μέτρησης κυττάρων ή γενικότερα σωματιδίων (μικροοργανισμών, σφαιριδίων αδρανούς υλικού), με βάση συγκεκριμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους που προσδιορίζονται άμεσα και ξεχωριστά για κάθε ένα κύτταρο ή σωματίδιο του υπό εξέταση δείγματος (αίμα ή άλλα βιολογικά υγρά) καθώς διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο στο οποίο προσπίπτει μια ακτίνα LASER [53].

Τα μηχανήματα στα οποία πραγματοποιείται η FC ονομάζονται κυτταρόμετρα ροής (ή FACS, fluorescence-activated cell sorter), θεωρούνται αυτοματοποιημένα μικροσκόπια ανοσοφθορισμού και μπορούν να εξετάζουν τα κύτταρα με πολύ μεγαλύτερο ρυθμό, γεγονός που επιτρέπει τη μελέτη πολύ μικρών κυτταρικών πληθυσμών. Επιπλέον, οι υπό μελέτη κυτταρικές παράμετροι (μέχρι και 12) μετρούνται ταυτόχρονα και επί ενός εκάστου των κυττάρων, ενώ είναι δυνατή η απομόνωση και ο διαχωρισμός ομάδων κυττάρων με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά (cell sorting)[54].

5.2.2 Ιστορική Αναδρομή

Η ιστορία της κυτταρομετρίας είναι άμεσα συνδεδεμένη με την εξέλιξη της αναλυτικής κυτταρολογίας. Η πρώτη χρήση οργάνου για την παρατήρηση κυττάρων έγινε τον 17ο αιώνα όταν ένας Ολλανδός έμπορος ο Antony Van Leeuwenhoeck ανακάλυψε με τη χρήση φακών τους μικροοργανισμούς και κατασκεύασε το πρώτο απλό μικροσκόπιο. Η εξέλιξη της τεχνολογίας οδήγησε στο να χρησιμοποιούνται σήμερα μικροσκόπια ανοσοφθορισμού, ηλεκτρονικά μικροσκόπια και μικροσκόπια σάρωσης που επιτρέπουν την ευκρινέστερη παρατήρηση πολύ μικρότερων μικροοργανισμών. Γνωρίζοντας ότι ο ανοσοφθορισμός συντελεί στην αναγνώριση και μέτρηση κυττάρων του αίματος με τη χρήση ειδικού μικροσκοπίου και μονοκλωνικών αντισωμάτων σημασμένων με φθοριοχρώματα έναντι διαφόρων αντιγόνων των κυττάρων αυτών, αναφέρεται ότι η κυτταρομετρία ροής αναπτύχθηκε στην προσπάθεια αντικειμενικής εκτίμησης του ανοσοφθορισμού [55].

Τα πρώτα σημαντικά βήματα στην ανάπτυξη των κυτταρομετρητών έγιναν το 1930 από την ομάδα του T. Caspersson στο ινστιτούτο Karolinska της Στοκχόλμης. Ο Caspersson ανέπτυξε την μικροφασματοφωτομετρία (microspectrophotometry), που χρησιμοποιούσε μετρήσεις απορρόφησης, και τα πρώτα συστήματα κυτταρομετρίας σάρωσης (scanning cytometry), που αποτέλεσαν τη βάση για την ανάπτυξη της κυτταρομετρίας ροής (flow cytometry) και της κυτταρομετρικής ανάλυσης εικόνας (image cytometry, image analysis)[56], [57].

Στη συνέχεια με την εξέλιξη της τεχνολογίας το ενδιαφέρον μετατοπίστηκε στη μελέτη του περιφερικού αίματος και στη διάκριση και ανάλυση των λευκοκυτταρικών πληθυσμών. Ερευνητές, πρωτοπόροι στην κυτταρομετρία ροής, εφάρμοσαν νέα πειραματικά συστήματα για την διάκριση των λευκοκυτταρικών πληθυσμών, τα οποία βρήκαν εφαρμογή στη διάκριση και ανάλυση ετερογενών κυτταρικών πληθυσμών.

Το 1965 ο Fulwyler και ο van Dilla από το Los Alamos (Los Alamos National laboratory) και ο Kantempsky από την IBM (IBM's Watson Laboratory at Columbia University) τελειοποίησαν τους πρώτους κυτταροδιαχωριστές σαν πρόσθετα

τμήματα στα ήδη υπάρχοντα συστήματα κυτταροανάλυσης βασιζόμενοι στην αρχή του εκτυπωτή ψεκασμού μελάνης, οπότε ήταν πλέον εφικτός ο εξειδικευμένος διαχωρισμός κυτταρικών πληθυσμών με την τεχνολογία της κυτταρομετρικής διαλογής (cell sorting) [58]–[60].

Στα τέλη της δεκαετίας του '60 ο Herzenberg και οι συνεργάτες του από το Πανεπιστήμιο του Stanford στις ΗΠΑ (Stanford University Medical School, California) χρησιμοποίησαν το σύστημα ροής που είχαν κατασκευάσει οι Fulwyler και van Dilla και πρόσθεσαν επιπλέον ένα σύστημα ανίχνευσης φθορισμού συνδυάζοντας την κυτταρομετρία με τον ανοσοφθορισμό (φθοριοκυτταρομερία). Ήταν αυτοί που χρησιμοποίησαν για πρώτη φορά αεροψύκτη LASER αργού δημιουργώντας ένα κυτταρομετρητή ροής FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter). Το 1976 η ομάδα του Herzenberg που απαρτιζόταν από ιατρούς, βιολόγους και μηχανικούς κατόρθωσε τελικά να κάνει το FACS ένα πλήρως λειτουργικό όργανο, η βασική δομή του οποίου παρέμεινε η ίδια για τα επόμενα 30 χρόνια με την προσθήκη περισσότερων ακτίνων LASER [55], [61], [62].

Μετά το 1960 η εξέλιξη της πληροφορικής και της κυτταρομετρίας ροής συνδέθηκαν οριστικά. Η ψηφιοποίηση των σημάτων που προκύπτουν από τις μετρήσεις και η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με ειδικά λογισμικά ηλεκτρονικού υπολογιστή άρχισε να παρέχει νέες αναλυτικές δυνατότητες σε ελάχιστο χρόνο.

Η πρόοδος που συντελέστηκε πειραματικά στο εργαστήριο από ερευνητές μετά το 1979 μετατοπίστηκε από κατασκευαστικές εταιρείες [Bio/Physics (Ortho), Becton-Dickinson, Coulter] στις κλινικές εφαρμογές με τη δημιουργία αναλυτών που διαθέτουν μία ή δύο ακτίνες LASER και ανιχνεύουν δύο έως τέσσερις συγχρόνως φθορισμούς. Επίσης η ανάπτυξη της τεχνολογίας των φθοριοχρωμάτων και η ανακάλυψη των υβριδωμάτων και των μονοκλωνικών αντισωμάτων συνέβαλαν καθοριστικά στην πρόοδο και εξέλιξη της κυτταρομετρίας ροής και συντέλεσαν στη διεύρυνση των εφαρμογών της [55].

5.2.3 Αρχή Λειτουργίας

Το κυτταρόμετρο ροής διαθέτει ως βασικό στοιχείο του ένα υδροδυναμικό σύστημα με το οποίο επιτυγχάνεται μια μονήρης κυτταρική διάταξη, η οποία επιτρέπει την επί ενός εκάστου των κυττάρων πρόσπτωση της δέσμης LASER και μέτρηση των υπό μελέτη παραμέτρων (Εικ. 6)

Το υδροδυναμικό σύστημα αποτελείται από μια χοανοειδή κατασκευή (κυψέλη ροής), μέσα στην οποία διοχετεύεται ένα υγρό υπό πίεση (ρυθμιστικό διάλυμα, sheath fluid), το οποίο έχει μεγάλη ταχύτητα, ενώ το προς εξέταση κυτταρικό εναιώρημα διοχετεύεται κατά μήκος του κεντρικού άξονα της ροής του ρυθμιστικού διαλύματος, έτσι ώστε η διάμετρος ροής του κυτταρικού εναιωρήματος να αντιστοιχεί στη διάμετρο των κυττάρων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να αναγκάζει τα κύτταρα να διατάσσονται το ένα κατόπιν του άλλου και τελικά να διέρχονται από το ρύγχος του υδροδυναμικού συστήματος με ταχύτητα 3.000 -10.000 κυττάρων/sec.

Καθώς τα κύτταρα διέρχονται από το ρύγχος της κυψέλης ροής, μια δέσμη φωτός LASER προσπίπτει κάθετα πάνω σε αυτά. Εάν προηγηθεί σύνδεση ορισμένων μεμβρανικών ή ενδοκυτταρικών συστατικών των κυττάρων με φθοριοσημασμένα μονοκλωνικά αντισώματα, η πρόσπτωση της φωτεινής δέσμης προκαλεί διέγερση των φθοριοχρωμάτων και εκπομπή αντίστοιχων σημάτων φθορισμού.

Από την πρόσπτωση της δέσμης LASER πάνω στα κύτταρα προκαλείται σκεδασμός του φωτός, αφενός ευθύγραμμος (FSC) και αφετέρου πλάγιος (SSC). Ο πρώτος δίνει πληροφορίες σχετικά με το μέγεθος των κυττάρων, ενώ ο δεύτερος για την περιεκτικότητά τους σε κοκκία.

Με ένα πολύπλοκο σύστημα φακών, κατόπτρων και φίλτρων, επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός και η εκτροπή των παραπάνω φωτεινών σημάτων σε θέσεις όπου βρίσκονται φωτοανιχνευτές.

Οι τελευταίοι είναι φωτοδίοδοι για τα σήματα του ευθυγράμμου σκεδασμού και φωτοπολλαπλασιαστές (Photomultipliers, PHTs) για τα υπόλοιπα σήματα. Οι φωτοανιχνευτές μετατρέπουν τα φωτεινά σήματα σε ηλεκτρικούς παλμούς, η ένταση των οποίων είναι ανάλογη εκείνης του φωτεινού σήματος που δέχονται. Στη

συνέχεια, οι ηλεκτρικοί παλμοί υποβάλλονται σε ενίσχυση (γραμμική ή λογαριθμική) από κατάλληλους ενισχυτές, ενώ με τη βοήθεια ειδικών μετατροπών τα ενισχυμένα αυτά σήματα μετατρέπονται σε ψηφιοποιημένα και με τη μορφή αυτή πλέον μπορούν να προβληθούν στην οθόνη του ηλεκτρονικού υπολογιστή του κυτταρόμετρου ή να αποθηκευτούν για μετέπειτα ανάκληση και μελέτη.

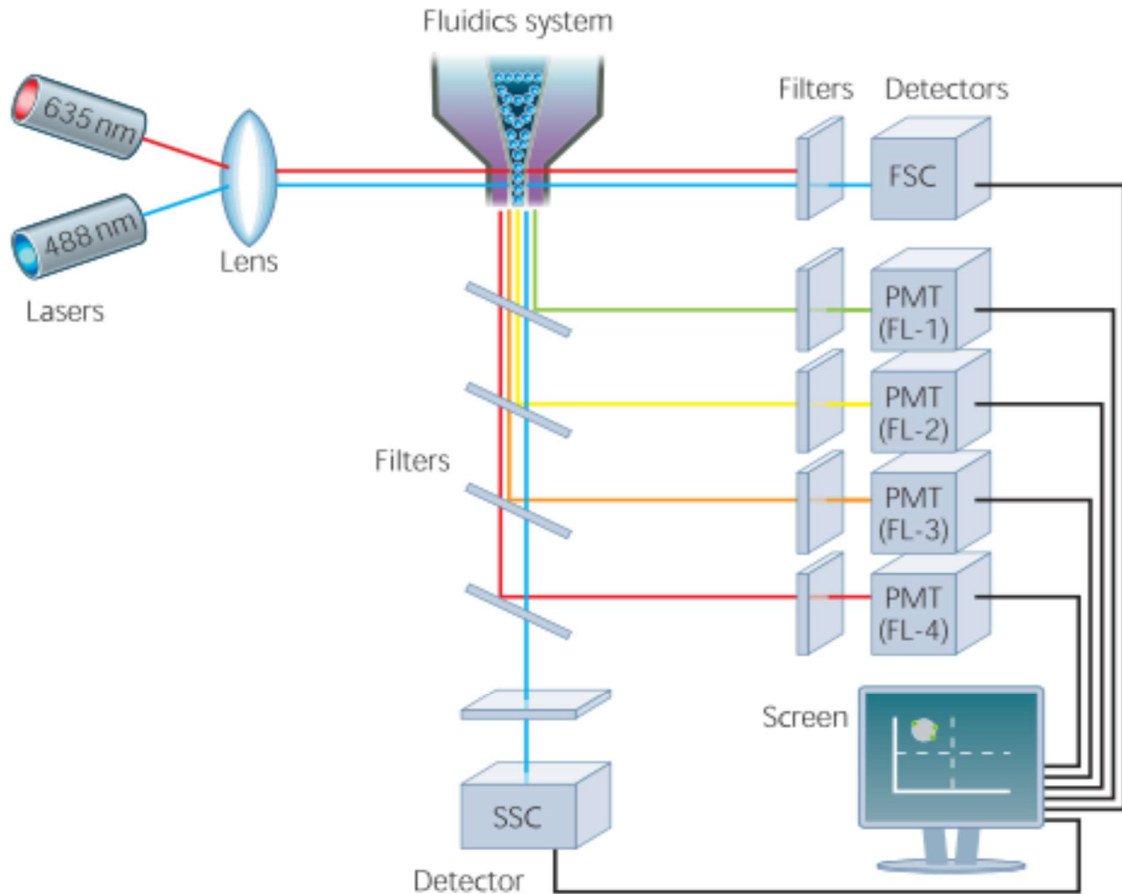
Η παρουσίαση και η ανάλυση των σημάτων μπορεί να γίνει υπό μορφή ιστογράμματος, στικτογράμματος (dot plot) ή περιμετρικού διαγράμματος (contour plot). Δεδομένα που προέρχονται από απλές σημάνσεις συνήθως απεικονίζονται με τις δυο πρώτες μορφές, ενώ πολλαπλές κυτταρικές σημάνσεις μπορούν να απεικονιστούν καλύτερα με τις δυο τελευταίες μορφές.

Το λογισμικό των FACS επιτρέπει τη χάραξη περιοχής (gate) γύρω από τον κυτταρικό υποπληθυσμό που ενδιαφέρει, για περαιτέρω ανάλυση και μελέτη, με βάση τα μονοκλωνικά αντισώματα και τα φθοριοχρώματα με τα οποία έχει σημανθεί. Επίσης, είναι δυνατός ο διαχωρισμός των στικτογραμμάτων σε τεταρτημόρια που περιλαμβάνουν τα θετικά και τα αρνητικά για καθένα από δυο σημάνσεις, καθώς και τα θετικά και τα αρνητικά και για τις δυο σημάνσεις που συνεξετάζονται.

Η στατιστική ανάλυση των μετρήσεων εκτελείται βασιζόμενη είτε στο ιστόγραμμα (μετά το δέσιμο των δεικτών) είτε στο στικτόγραμμα ή στο περιμετρικό διάγραμμα (μετά τον ορισμό των τεταρτημορίων) [53], [54].

Σήμανση των Κυττάρων

Η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιείται, κατά κύριο λόγο, για τον προσδιορισμό του κυτταρικού ανοσοφαινότυπου με χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων, τα οποία είναι σημασμένα με ένα φθοριόχρωμα. Τα σημασμένα αυτά μονοκλωνικά αντισώματα συνδέονται με το αντίστοιχο κυτταρικό αντιγόνο (συνήθως αντιγόνο διαφοροποίησης), ενώ η φωτεινή ακτίνα LASER του κυτταρόμετρου, που προσπίπτει πάνω στο φθοριόχρωμα, το αναγκάζει να εκπέμψει φως, το οποίο ανιχνεύεται από τους φωτοανιχνευτές του κυτταρομέτρου.



Εικόνα 6. Σχηματική επισκόπηση μιας τυπικής εγκατάστασης κυτταρομετρητή ροής [52].

Για τη σήμανση των κυττάρων εφαρμόζονται οι παρακάτω μέθοδοι:

- α) Άμεσος ανοσοφθορισμός
- β) Έμμεσος ανοσοφθορισμος
- γ) Μονή σήμανση
- δ) Διπλή ή πολλαπλή σήμανση
- ε) Μάρτυρες [54]

Φθορίζουσες Χρωστικές ή Φθοριοχρώματα

Οι φθορίζουσες χρωστικές ή φθοριοχρώματα που χρησιμοποιούνται στην κυτταρομετρία χαρακτηρίζονται από:

- ✓ Το μήκος κύματος από το οποίο διεγείρονται και το μήκος κύματος στο οποίο εκπέμπουν (Stoke's Shift)
- ✓ Την ικανότητα κβάντωσης (quantum efficiency)
- ✓ Την εκλεκτική χρωστική τους ιδιότητα (σχηματισμός ομοιοπολικών δεσμών με μονοκλωνικά αντισώματα ή χρωστικές όπως το Propidium iodide (PI) που συνδέονται εκλεκτικά με το DNA)
- ✓ Την τεχνική μονιμοποίησης των κυττάρων (fixation) πριν τη χρώση
- ✓ Την ικανότητα να μην είναι επιβλαβείς για τις φυσικές λειτουργίες των κυττάρων (ζωϊκές χρώσεις) που είναι πολύ σημαντικό όταν γίνεται διαλογή (sorting) ζωντανών κυττάρων για μελέτη.

Η φλουορεσκεΐνη στην ισοθειοκυανική της μορφή (fluorescein isothiocyanate, FITC) είναι η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη φθορίζουσα χρωστική με περιοχή διεγέρσεως στα 488nm (με πράσινο φθορισμό) που συμπίπτει με το μήκος κύματος του LASER αργού που βρίσκεται στα περισσότερα όργανα κυτταρομετρίας [63].

5.2.4 Πλεονεκτήματα

Η κυτταρομετρία ροής επιτρέπει την πολυπαραμετρική ανάλυση ενός μεγάλου αριθμού κυττάρων και έχει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις συμβατικές τεχνικές, όπως :

- ✓ Μεγάλη ταχύτητα μέτρησης (500-10.000 κύτταρα/sec)
- ✓ Επαναληψιμότητα των μετρήσεων
- ✓ Υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια
- ✓ Ελάχιστη ποσότητα δείγματος (100μl αίματος)
- ✓ Εύκολη προετοιμασία του δείγματος

- ✓ Σύγχρονη ανάλυση πολλών ανεξάρτητων παραμέτρων στο ίδιο κύτταρο (πολυπαραμετρική ανάλυση)
- ✓ Μεγάλη αναλυτική ικανότητα και αξιοπιστία σε σύγκριση με την μικροσκοπία
- ✓ Δυνατότητα ανίχνευσης μικρού αριθμού μορίων (όριο 3000-5000 μόρια) ανά κυτταρική επιφάνεια
- ✓ Δυνατότητα αποτύπωσης και αποθήκευσης των αποτελεσμάτων στη μνήμη του υπολογιστή.

Ο ταχύς ρυθμός με τον οποίο η κυτταρομετρία ροής εξετάζει τις κυτταρικές παραμέτρους δίνει τη δυνατότητα ελέγχου μεγάλου αριθμού κυττάρων και προσδιορισμού σπάνιων κυτταρικών χαρακτηριστικών (heterogeneity subpopulation) και κατά συνέπεια τον εντοπισμό και τη μελέτη πολύ μικρών κυτταρικών πληθυσμών.

Σε αντίθεση με το σύνολο σχεδόν των αναλυτικών μεθόδων όπου οι κυτταρικές παράμετροι προσδιορίζονται ως ο μέσος όρος των τιμών στον αντίστοιχο κυτταρικό πληθυσμό, στην κυτταρομετρία ροής, ο προσδιορισμός των παραμέτρων γίνεται σε κάθε ένα κύτταρο μεμονωμένα.

Επιπλέον, οι κυτταρομετρητές ροής δεν είναι αυτόματοι αναλυτές αλλά η λειτουργία τους επιδέχεται σημαντική υποκειμενική παρέμβαση, με αποτέλεσμα να εξαρτάται καθοριστικά από την κατάρτιση και την εμπειρία του χρήστη [64].

5.2.5 Εφαρμογές της Κυτταρομετρίας Ροής

Η κυτταρομετρία ροής ξεκίνησε σαν εργαλείο κυτταρικής ανάλυσης στο πεδίο της βασικής έρευνας, αλλά γρήγορα άρχισαν να αναπτύσσονται πρακτικές εφαρμογές της και στο κλινικό επίπεδο.

Το πεδίο εφαρμογών της κυτταρομετρίας ροής είναι ευρύ και περιλαμβάνει διάφορους κλάδους της επιστήμης (εφαρμοσμένη μηχανική, ιατρική, κτηνιατρική, φυτολογία, μοριακή βιολογία, κυτταρική βιολογία, γενετική). Η εφαρμογή της

κυτταρομετρίας ροής στη μελέτη των ανοσολογικών, αιματολογικών και νεοπλασματικών νοσημάτων άνοιξε καινούριες προοπτικές στην κλινική έρευνα.

Τα δείγματα που μελετώνται σήμερα με κυτταρομετρία ροής είναι κυρίως περιφερικό αίμα, άλλα βιολογικά υγρά όπως ENY, πλευριτικό υγρό, αρθρικό υγρό, δείγμα από βιοψία μυελού των οστών, δείγμα από συμπαγείς όγκους είτε σε εναιώρημα κυττάρων μετά από ειδική κατεργασία είτε σε νωπό υλικό πρόσφατης βιοψίας ιστού ή ιστού εγκλεισμένου σε παραφίνη και εκπλύματα οργάνων όπως της ουροδόχου κύστης και των βρόγχων (BAL) [65], [66].

Οι κυριότερες εφαρμογές της FC είναι:

α) **Ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των κυττάρων.** Βασίζεται σε μόρια που εκφράζονται στην κυτταρική μεμβράνη, τα οποία σχετίζονται με το είδος και τη διαφοροποίηση του κυττάρου.

β) **Η εξέταση και ταυτοποίηση αντισωμάτων άγνωστης ειδικότητας.** Αυτή επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση πολύ καλά φαινοτυπικώς χαρακτηρισμένων κυτταρικών πληθυσμών.

γ) **Προσδιορισμός κυτταροπλασματικών συστατικών ενός κυτταρικού πληθυσμού.**

δ) **Εκτίμηση της διαφοροποίησης και της ενεργοποίησης ενός κυτταρικού πληθυσμού.** Αυτό επιτυγχάνεται με ειδικά αντιδραστήρια που αναγνωρίζουν μόρια στην κυτταρική μεμβράνη, η έκφραση των οποίων σχετίζεται με τη διαφοροποίηση ή την ενεργοποίηση του κυττάρου.

ε) **Υπολογισμός του DNA που περιέχει το κύτταρο.** Αυτό επιτρέπει την αναγνώριση του σταδίου του κυτταρικού κύκλου

στ) **Διαχωρισμός ετερογενών κυτταρικών πληθυσμών,** οι οποίοι μπορούν να καλλιεργηθούν ή να χρησιμεύσουν για μελέτες λειτουργικές ή ενεργοποίησης (in vitro).

ζ) Διαφοροποίηση μεταξύ ζώντων και νεκρών κυττάρων και

η) Μέτρηση του κυτταρικού Ca^{2+} .

Η FC βρίσκει, επίσης, εφαρμογή στον έλεγχο των ανοσοεπαρκειών, την παρακολούθηση μεταμόσχευσης ή θεραπείας, τα αυτοάνοσα νοσήματα, τον ποιοτικό έλεγχο των προϊόντων αίματος, τον προσδιορισμό ένζυμων, καθώς και την εκτίμηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης [54].

5.3 Ραδιοανοσοδοκιμασίες

Έχουν δημοσιευθεί τεχνικές, οι οποίες απαριθμούν τα λευκά αιμοσφαίρια καθώς και θραύσματα αιμοπεταλίων σε λευκαφαιρεμένα παράγωγα ερυθροκυττάρων. Ωστόσο, η χρήση ραδιοανοσομετρικών μεθόδων υπό συνθήκες ρουτίνας δεν είναι πρακτική και γενικά δεν ενδείκνυται για περιβαλλοντικούς λόγους [49].

5.4 Μέθοδοι Ενίσχυσης του DNA των Λευκοκυττάρων

Η ενίσχυση του DNA μέσω της αλυσωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) έχει χρησιμοποιηθεί σε μέθοδο καταμέτρησης των υπολειμματικών λευκοκυττάρων σε λευκαφαιρεμένα προϊόντα αίματος. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί μια τεχνική ανίχνευσης του HLA-DQ άλφα γονιδίου. Ομοίως σε περιοριστικούς προσδιορισμούς αραιώσης. Ο αρχικός αριθμός αντιγράφων στο μη αραιωμένο δείγμα υπολογίζεται έπειτα από την παραδοχή, υποστηριζόμενη από δεδομένα μίας τυπικής καμπύλης βαθμονόμησης, ότι το τελικό σημείο της τιτλοδότησης περιέχει ένα αντίγραφο DNA. Αυτή η μέθοδος απαιτεί λεπτομερή τυποποίηση και στατιστική προσέγγιση στην τελική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων [49].

5.5 Ποιοτική Μέθοδος με Φίλτρα Πολυανθρακικού

Σε αυτή τη μέθοδο λευκαφαιρεμένα προϊόντα ερυθροκυττάρων διέρχονται μέσω ενός πολυανθρακικού φίλτρου. Τα υπολειμματικά λευκοκύτταρα παγιδεύονται στους πόρους του φίλτρου και η παρουσία τους ανιχνεύεται με μικροσκοπική εξέταση των φίλτρων μετά από χρώση με MayGrunwald-Giemsa ή ανοσοκυτταροχημεία χρησιμοποιώντας ένα μονοκλωνικό αντίσωμα προς κάποιο κοινό αντιγόνο των λευκοκυττάρων [49].

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Σκοπός

Η παρουσία υπολειπόμενων λευκών αιμοσφαιρίων (residual WBCs, rWBCs) στα παράγωγα αίματος μπορεί να οδηγήσει σε πολλαπλές ανεπιθύμητες ενέργειες από μετάγγιση, λόγω της παρουσίας των αλλογενών λευκοκυττάρων. Μεταξύ αυτών είναι οι πυρετικές μη αιμολυτικές αντιδράσεις, οι αλλεργικές και αναφυλακτικές αντιδράσεις, η μετάδοση ενδοκυττάρων μικροοργανισμών (π.χ. του ιού CMV), η αντοχή στη μετάγγιση αιμοπεταλίων και η ανοσοτροποίηση. Ως εκ τούτου, η καθολική αφαίρεση των λευκοκυττάρων από τα προϊόντα του αίματος έχει καθιερωθεί ως κοινή πρακτική σε αρκετές χώρες. Η αποτελεσματικότητα της λευκαφαίρεσης όμως θα πρέπει να επιβεβαιώνεται αφενός με τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας, αφετέρου με τη μέτρηση των rWBCs στα παράγωγα, στα πλαίσια του μηνιαίου δειγματοληπτικού ποιοτικού ελέγχου των λευκαφαιρεμένων ερυθρών (LR-RBCs). Η συγκέντρωση των WBCs όμως σε παράγωγα αίματος που έχουν υποστεί λευκαφαίρεση (Leukoreduction, LR) είναι σε επίπεδα χαμηλότερα από αυτά που επιτρέπουν ακριβή μέτρησή τους με πρότυπους αιματολογικούς αναλυτές και η μέτρησή τους για το λόγο αυτό αποτελεί διαχρονικά μια τεχνική πρόκληση. Για να θεωρείται ένα παράγωγο αίματος επαρκώς λευκαφαιρεμένο, θα πρέπει ο συνολικός αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων στο παράγωγο αυτό να μην υπερβαίνει τα 1×10^6 , και αυτός ο αριθμός αποτελεί επί του παρόντος το όριο επαρκούς-ανεπαρκούς λευκαφαίρεσης, όπως έχει καθοριστεί από το Συμβούλιο της Ευρώπης [67].

Διάφορες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για να μετρήσουν τις χαμηλές συγκεντρώσεις των rWBCs στα λευκαφαιρεμένα παράγωγα αίματος [68]. Μεταξύ των δημοσιευμένων μεθόδων, η αιμοκυττομετρία Nageotte είναι η ευρύτερα αποδεκτή και χρησιμοποιούμενη [69]–[71]. Οι Masse et al παρουσίασαν και συνέκριναν αρκετές παραλλαγές αυτής της τεχνικής. Το κατώτερο όριο της ακριβούς ανίχνευσης με τη μέθοδο Nageotte εκτιμήθηκε κατά προσέγγιση στα 2 WBC/μl. Ο αριθμός αυτός είναι χαμηλότερος από τα 3,3 WBC/μl, που αποτελούν και το όριο απόρριψης ενός παραγώγου αίματος ως μη λευκαφαιρεμένο. Έτσι, η μέθοδος Nageotte θεωρήθηκε κατάλληλη για χρήση σε ποιοτικούς ελέγχους παραγώγων

αίματος [70]. Ωστόσο, αυτή η τεχνική μέτρησης που είναι βασισμένη στη μικροσκόπηση είναι αρκετά κοπιώδης, χρονοβόρα και εξαρτάται από την ατομική εκπαίδευση των παρατηρητών, η οποία μπορεί να επηρεάσει την αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων. Αυτό οδήγησε στην ανάπτυξη πολλών άλλων ειδικών αυτόματων μεθόδων για τον υπολογισμό των rWBCs, όπως αυτή του αυτοματοποιημένου τριχοειδούς κυτταρομέτρου μέτρησης όγκου, των μεθόδων κυτταρομετρίας ροής (Flow Cytometry, FC) και των τεχνικών αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) [72]–[75]. Εξαιτίας της έλλειψης μιας επίσημης “gold standard” μεθόδου, η αποτελεσματικότητα της μέτρησης των rWBCs είναι δύσκολο να εκτιμηθεί και στις περισσότερες περιπτώσεις οι μετρήσεις για τα rWBCs στα λευκαφαιρέματα παράγωγα του αίματος αξιολογήθηκαν με *in vitro* μελέτες αραιώσης [70], [71], [76]–[80]. Αυτές οι μελέτες απέδειξαν όχι μόνο τη δυνατότητα εφαρμογής αυτοματοποιημένων τεχνικών για τον έλεγχο της διαδικασίας λευκαφαίρεσης σε Υπηρεσίες Αιμοδοσίας, αλλά και την υπέρτερη ακρίβειά τους σε σχέση με τη μέθοδο Nageotte. Έτσι, οι μέθοδοι κυτταρομετρίας ροής, παρά το αυξημένο κόστος τους, θεωρούνται σήμερα προτιμότερες από τις μικροσκοπικές μεθόδους μέτρησης rWBCs [76], [78], [81]. Ωστόσο, λίγες μελέτες έχουν αξιολογήσει παράλληλα την απόδοση της κυτταρομετρίας ροής (FC) και της αιμακυτταρομετρίας Nageotte στη μέτρηση rWBCs σε πρόσφατα παραχθέντα λευκαφαιρέματα παράγωγα αίματος και σε κανονικές συνθήκες εργασίας μιας Υπηρεσίας Αιμοδοσίας [82].

Σκοπός, λοιπόν, της μελέτης αυτής είναι ο καθορισμός της συμφωνίας μεταξύ των δύο ευρύτερα αποδεκτών μεθόδων μέτρησης υπολειπόμενων λευκών αιμοσφαιρίων (residual WBCs, rWBCs) στα λευκαφαιρέματα παράγωγα αίματος (LR-RBCs), που είναι η αιμοκυττομετρία Nageotte και η κυτταρομετρία ροής (FC), υπό πραγματικές συνθήκες παραγωγής αίματος.

2. Υλικά Και Μέθοδοι

Η μελέτη αυτή διεξήχθη στη Νοσοκομειακή Υπηρεσία Αιμοδοσίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου «Αττικών» στην Αθήνα. Συγκεντρώθηκαν μετρήσεις rWBCs σε 94 πρόσφατα παραχθείσες μονάδες λευκαφαιρεμένων συμπυκνωμένων ερυθρών (LR-RBCs), στα πλαίσια του μηνιαίου ποιοτικού ελέγχου που διενεργείται δειγματοληπτικά σε όλα τα παράγωγα αίματος. Τα LR-RBCs συλλέχθηκαν σε διαφορετικά συστήματα ασκών με ενσωματωμένο φίλτρο λευκαφαίρεσης, στο διάστημα Ιουλίου 2016 - Ιουλίου 2017. Τριάντα μονάδες συλλέχθηκαν σε ασκούς Haemonetics (Haemonetics SA, Signy, Ελβετία), 10 σε ασκούς αίματος MacoPharma (MacoPharma - Rue Lorthiois, Mouvoux, France), 20 σε ασκούς αίματος Fresenius (Fresenius Hemocare, Modena) και 45 με το σύστημα επεξεργασίας και παραγωγίσης ολικού αίματος Atreus (Terumo BCT, Europe NV Zaventem, Βέλγιο).

Σε όλες τις μονάδες LR-RBCs έγινε μέτρηση των rWBC με αυτοματοποιημένη μέθοδο FC (Kit LeukoFinder™, CYTOGNOS SL, Salamanca, Spain), καθώς και με τη μέθοδο Nageotte, εντός 24 ωρών από τη συλλογή τους.

2.1 Κυτταρομετρία Ροής

Οι μετρήσεις των κυττάρων με την κυτταρομετρία ροής έγιναν με το Kit LeukoFinder™ και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Χρησιμοποιήθηκαν βαθμονομημένες και διακριβωμένες πιπέτες με ακρίβεια [+/- 5%] του καθορισμένου όγκου, δεδομένου ότι η Υπηρεσία Αιμοδοσίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου «Αττικών» πληρεί τις απαιτήσεις του συστήματος ποιότητας EN ISO 15189:2012.

Το Kit LeukoFinder™ είναι μία τεχνική ακριβούς μέτρησης rWBCs με τη μέθοδο FC, η οποία συνδυάζει την ανίχνευση του σήματος φθορισμού από έναν δείκτη DNA, ενσωματωμένο στον πυρήνα των rWBC επιτρέποντας τη διάκρισή τους και με τη χρήση του Perfect-Count Microspheres™, την ακριβή εκτίμηση του απόλυτου αριθμού τους. Η επισήμανση των rWBCs με τον δείκτη DNA επιτρέπει να

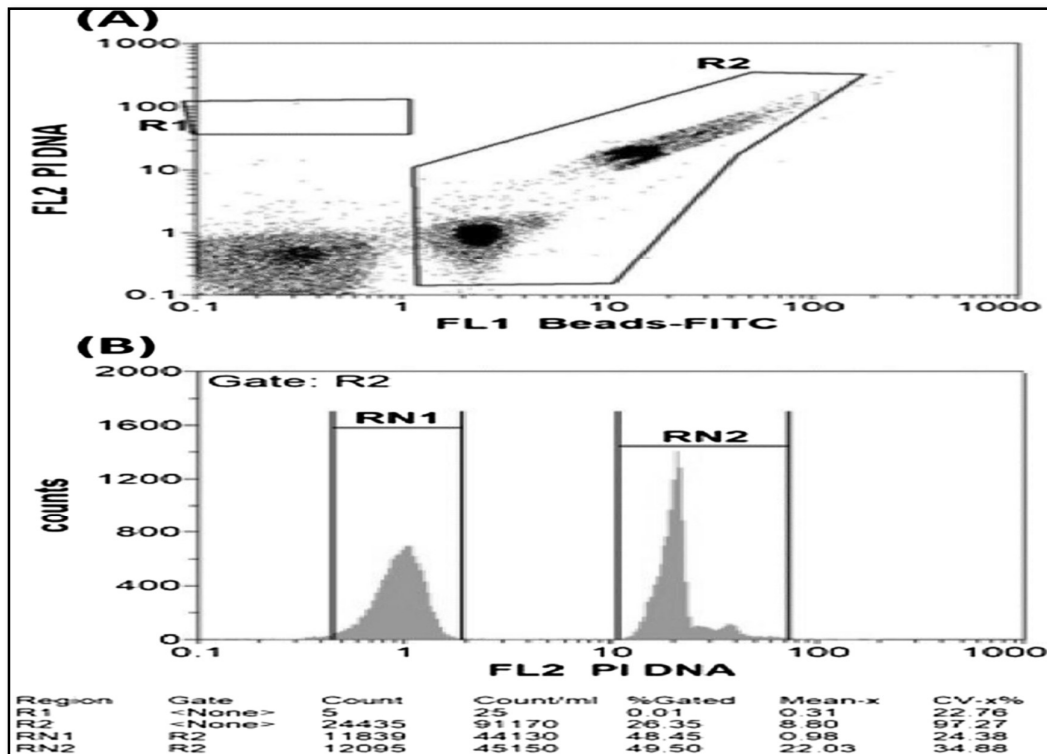
αναγνωριστούν και να διακριθούν από απύρνηνα κύτταρα όπως ερυθροκύτταρα και αιμοπετάλια.

Το Perfect-Count Microspheres TM είναι μία μέθοδος βασισμένη σε μικροσφαιρίδια, η οποία εξασφαλίζει την ακρίβεια των αποτελεσμάτων απόλυτης μέτρησης. Το μοναδικό σύστημα εσωτερικού ελέγχου ποιότητας περιέχει δύο τύπους σφαιριδίων (που ορίζονται ως σφαιρίδια A και σφαιρίδια B) με πυκνότητες γύρω από την ανώτερη και χαμηλότερη πυκνότητα των περιφερικών αιμοκυττάρων. Μεταβολές της αναλογίας μεταξύ των σφαιριδίων τύπου A και B προειδοποιούν για προβλήματα κατά την προετοιμασία ή/και την ανάλυση του δείγματος, τα οποία θα μπορούσαν να θέσουν υπό αμφισβήτηση τις τελικές μετρήσεις. Το σύστημα αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διπλό πρότυπο αναφοράς, το οποίο, αφενός, εξασφαλίζει την ακρίβεια της ανάλυσης και, αφετέρου, εξασφαλίζει τον ακριβή υπολογισμό του αριθμού rWBCs ανά μL.

Εν συντομία, 100 μL από κάθε δείγμα μεταφέρθηκαν χρησιμοποιώντας την τεχνική αντίστροφης παροχής με πιπέτα σε σωλήνα κυτταρομετρίας ροής. Τα κύτταρα χρωματίστηκαν με 100 μL ιωδιούχου προπιδίου, διαλύματος επισήμανσης του DNA, που περιλαμβάνεται στο Kit, αναμείχθηκε ήπια και επώαστηκε στο σκοτάδι για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, 100 μL των μικροσφαιριδίων Perfect-Count που περιλαμβάνονται στο Kit προστέθηκαν στο παραπάνω μίγμα και ακολούθησε η προσθήκη 550 μl ρυθμιστικού διαλύματος, PBS. Μετά από ήπια ανάμιξη με τη βοήθεια της πιπέτας, τα αποτελέσματα του δείγματος συνολικού όγκου 850 μL αποκτήθηκαν, αναλύθηκαν και αποθηκεύτηκαν χρησιμοποιώντας το κυτταρόμετρο CyFlow Space (Sysmex-Partec GmbH, Münster, Germany)

Για την ανάλυση κυτταρομετρίας ροής, οι παράμετροι FSC (εμπρόσθια σκέδαση) και SSC (πλευρική σκέδαση) ρυθμίστηκαν σε γραμμική διεύρυνση, ενώ οι παράμετροι FL1 και FL2 ρυθμίστηκαν σε λογαριθμική διεύρυνση. Το σήμα φθορισμού που εκπέμπεται από τα κύτταρα που χρωματίζονται από το DNA διάλυμα επισήμανσης ανιχνεύθηκε στον δίαυλο FL2 στην περιοχή πύλης R1 και τα σφαιρίδια διαφορετικού μεγέθους A και B ανιχνεύθηκαν στον δίαυλο FL1 στην περιοχή πύλης R2 (Εικ. 7Α).

Οι απόλυτοι αριθμοί λευκοκυττάρων και μικροσφαιρών προσδιορίστηκαν από το μοναδικό χαρακτηριστικό TVAC (True Volumetric Absolute Count) του κυτταρομέτρου CyFlow Space. Η οριοθετημένη περιοχή R1 στο σημείο γραφικής παράστασης δίνει τον απόλυτο αριθμό των χρωματισμένων rWBCs και οι περιοχές RN1 και RN2 στο ιστόγραμμα παρέχουν τον απόλυτο αριθμό κάθε σφαιριδίου στην οριοθετημένη περιοχή R2 (Εικ. 7B). Ο υπολογισμός του απόλυτου αριθμού rWBCs στα LR-RBCs βασίστηκε στον ακόλουθο τύπο: Απόλυτη τιμή (rWBC / μl) = [Αριθμός rWBCs, που καταμετρήθηκε / Αριθμός μικροσφαιριδίων, που μετρήθηκαν (A + B)] × Αριθμός μικροσφαιριδίων Perfect-Count/μl (γνωστή συγκέντρωση). Πολλαπλασιασμός του αριθμού rWBC/μL με τον όγκο του παραγώγου (σε μL) δίνει τον συνολικό αριθμό των rWBC σε ολόκληρο τον ασκό.



Εικόνα 7. Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής. (A) Η πύλη R1 χρησιμοποιήθηκε για την επιλογή των υπολειμματικών λευκοκυττάρων (rWBC) και η πύλη R2 χρησιμοποιήθηκε για την επιλογή των ολικών μικροσφαιριδίων. (B) Το εύρος του ιστογράμματος, RN1 και RN2, δείχνει την απόλυτη μέτρηση της πύλης R2.

2.2 Μέθοδος Nageotte

Για το αιμοκυττόμετρο Nageotte, εφαρμόστηκε η ακόλουθη διαδικασία [83]: Χρησιμοποιήθηκε θάλαμος αιμοκυττομετρητή τελικού όγκου μέτρησης 50μl, που δημιουργήθηκε με την εφαρμογή καλυπτρίδας σε βαθμονομημένη πλάκα Nageotte σε συνθήκες υγρασίας. Αρχικά 100μl των LR-RBCs αραιώθηκαν 1:5 με το διάλυμα Leucoplate (Sobioda, Saint-Martin, France), που προκαλεί λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Το τελικό διάλυμα των 500μl επώασθηκε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και στη συνέχεια 50μl από αυτό τοποθετήθηκαν στην ίσου όγκου περιοχή μέτρησης του αιμοκυττόμετρου Nageotte (Nageotte BriteLine Chamber, Hausser Scientific, Horsham, PA).

Η μέτρηση των rWBCs έγινε εντός 15-30 λεπτών με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου και σε μεγέθυνση 20x. Η συγκέντρωση των λευκοκυττάρων υπολογίστηκε ως ακολούθως: $WBCs / \mu L = (\text{κύτταρα που μετρήθηκαν} / 50 \mu L) \times 5$, όπου 50 μl είναι ο μετρημένος όγκος και 5 είναι ο συντελεστής αραιώσης που προκύπτει από την προσθήκη του παράγοντα λύσης. Στη συνέχεια, ο συνολικός αριθμός τους στο παράγωγο υπολογίστηκε ως εξής: $[rWBCs \text{ παραγώγου}] = [WBCs/\mu L] \times [1000\mu L/mL] \times [\text{Όγκος σε mL του παραγώγου}]$.

3. Στατιστικές Μέθοδοι

3.1 Περιγραφική Στατιστική

Για την περιγραφική στατιστική χρησιμοποιήθηκαν οι μέσες τιμές $\pm SD$, οι διάμεσες τιμές και τα διατεταρτημοριακά διαστήματα (interquartile ranges, IQR) ή ποσοστά, όπου κρίθηκε κατάλληλο. Για να αξιολογήσουμε την ακρίβεια κάθε μεθόδου, υπολογίστηκαν οι συντελεστές μεταβλητότητας (CV). Οι συντελεστές μεταβλητότητας των διπλών παρατηρήσεων αντανακλούν τη διακύμανση που παρατηρείται όταν υποβάλλονται σε επεξεργασία και αναλύονται δείγματα ίδιας προέλευσης.

3.2 Συμφωνία Μεθόδων

Η συμφωνία μεταξύ των δύο μεθόδων εκτιμήθηκε με τη χρήση της στατιστικής μεθόδου kappa και των αντίστοιχων τιμών p. Ως διαγνωστικό όριο για τον χαρακτηρισμό των αποτελεσμάτων ως «pass» ή «fail» χρησιμοποιήθηκε ο υπολειπόμενος αριθμός 1×10^6 WBCs ανά μονάδα, που καθορίζεται από το Συμβούλιο της Ευρώπης ως όριο απόρριψης για τα λευκαφαιρεμένα συστατικά του αίματος.

Οι κατευθυντήριες οδηγίες για τη συνδυασμένη γραφική/στατιστική αξιολόγηση της συμφωνίας μεταξύ των δύο μεθόδων κλινικής μέτρησης περιλαμβάνει ένα διάγραμμα διασποράς (συσχέτιση συντεταγμένων) σε συνδυασμό με ανάλυση συσχέτισης και παλινδρόμησης και ένα διάγραμμα διαφοράς συνδυασμένο με τον υπολογισμό των ορίων 2 sd των διαφορών μεταξύ των δύο μεθόδων (το λεγόμενο 95% διάστημα εμπιστοσύνης)[84]. Συνεπώς, έγινε συλλογή των δεδομένων και πραγματοποιήθηκε ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης για να αξιολογηθεί η συσχέτιση μεταξύ των δύο μεθόδων.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε το διάγραμμα Bland-Altman για να αξιολογηθεί η συμφωνία μεταξύ της μεθόδου Nageotte και της FC. Ο άξονας x δείχνει τον μέσο όρο των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων $([A+B]/2)$, ενώ ο άξονας y

αντιπροσωπεύει την απόλυτη διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων ([B-A]). Επιπλέον, το διάγραμμα περιλαμβάνει τη γραμμή για τη μέση διαφορά (bias) και τα παρατηρούμενα 2 sd όρια των διαφορών (precision) μεταξύ των δύο μεθόδων. Οι Bland και Altman προτείνουν ότι εφόσον οι διαφορές που βρίσκονται εντός του $d \pm 2 \text{ sd}$ (δηλαδή 95% διάστημα εμπιστοσύνης) δεν είναι σημαντικές, και οι δύο μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά. Το paired Student's t test χρησιμοποιήθηκε για να καθοριστεί εάν η μέση διαφορά (bias) ήταν σημαντικά διαφορετική από μηδέν.

3.3 Στατιστική Σημαντικότητα

Για τον έλεγχο της στατιστικής υπόθεσης, επίπεδα πιθανότητας $<0,05$ ορίστηκαν ως στατιστικά σημαντικά. Όλες οι στατιστικές δοκιμασίες ήταν διπλής κατεύθυνσης.

3.4 Στατιστικό Πρόγραμμα

Το στατιστικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για όλες τις στατιστικές αναλύσεις είναι το Stata 14 (Stata Corp., College Station, TX, U.S.A).

4. Αποτελέσματα

4.1 Ακρίβεια Μεθόδων

Ο εκτιμώμενος εντός του προσδιορισμού συντελεστής μεταβλητότητας ήταν 18,5% για την αιμοκυττομετρία Nageotte (32 διπλές παρατηρήσεις) και 26,2% για τη μέθοδο FC (15 διπλές παρατηρήσεις).

Η συμφωνία μεταξύ των διπλών παρατηρήσεων, χρησιμοποιώντας το διαγνωστικό όριο (cut-off) 1×10^6 WBC ανά μονάδα, για τον καθορισμό των αποτελεσμάτων ως «pass» ή «fail», ήταν 71,9% για τη μέθοδο Nageotte (Πίνακας 1A) και 93,3% για τη μέθοδο FC (Πίνακας 1B).

Πίνακας 1. 2 πίνακες που λήφθηκαν με τη χρήση του διχοτόμου διαγνωστικού ορίου 1×10^6 λευκών αιμοσφαιρίων (WBC) ανά μονάδα για τον χαρακτηρισμό των αποτελεσμάτων ως «pass» ή «fail».

A. Αιμοκυττόμετρο Nageotte (32 διπλές παρατηρήσεις): Συμφωνία=71.9%			
		1^η Μέτρηση	
		«pass»	«fail»
2^η Μέτρηση	«pass»	19	4
	«fail»	5	4

B. Κυτταρομετρία Ροής (15 διπλές παρατηρήσεις): Συμφωνία=93.3%			
		1^η Μέτρηση	
		«pass»	«fail»
2^η Μέτρηση	«pass»	14	0
	«fail»	1	0

4.2 Συμφωνία Μεθόδων

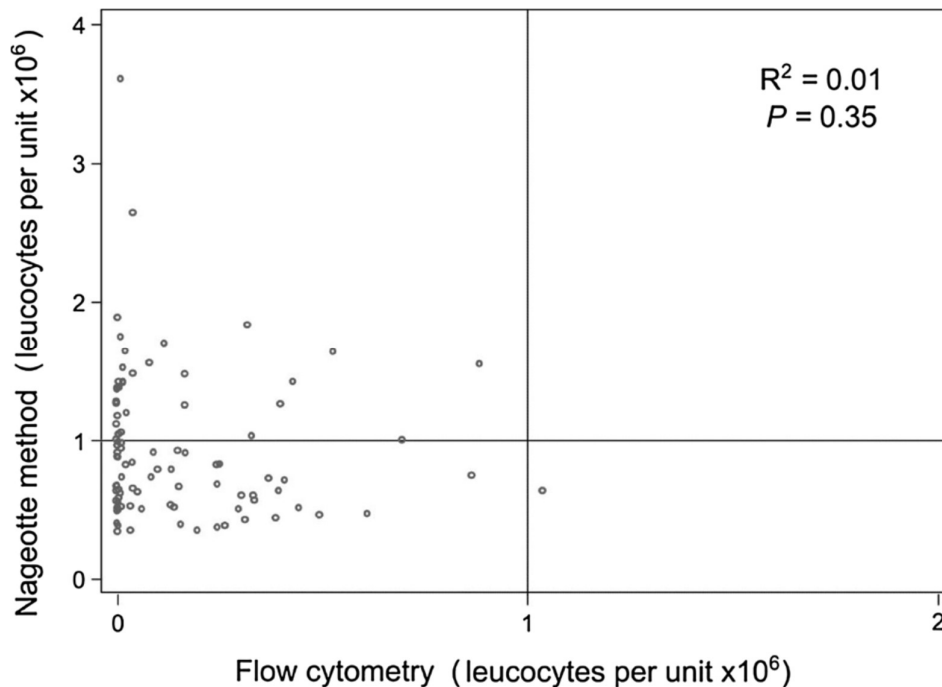
Τα περιγραφικά στατιστικά στοιχεία των δειγμάτων της παρούσας μελέτης, τα οποία υποβλήθηκαν σε επεξεργασία και αναλύθηκαν (n = 94), παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Περιγραφικά στατιστικά στοιχεία των δειγμάτων της μελέτης, που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία και ανάλυση (n = 94). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως οι μέσες τιμές \pm SD, οι διάμεσες τιμές και τα διατεταρτημοριακά διαστήματα (interquartile ranges, IQR) ή ποσοστά, όπου κρίθηκε κατάλληλο.

Nageotte method (leucocytes per unit $\times 10^3$)	922 \pm 523; 784 (542–1248)
Nageotte method (pass/fail)	63/94 (67.0%) vs. 31/94 (33.0%)
Flow cytometry (leucocytes per unit $\times 10^3$)	150 \pm 217; 37 (4–246)
Flow cytometry (pass/fail)	93/94 (98.9%) vs. 1/94 (1.1%)

Η συμφωνία μεταξύ των δύο μεθόδων μέτρησης των κυττάρων, όπως προσδιορίστηκε από την στατιστική μέθοδο Kappa, ήταν φτωχή (συμφωνία= 66,0%, kappa= -0,02, p= 0.76).

Το διάγραμμα διασποράς των ζευγών-μετρήσεων των WBCs ανά μονάδα ($\times 10^6$) όπως προσδιορίστηκε με τις μεθόδους Nageotte και FC, για όλα τα δείγματα της μελέτης (n = 94), παρουσιάζεται στην Εικόνα 8.

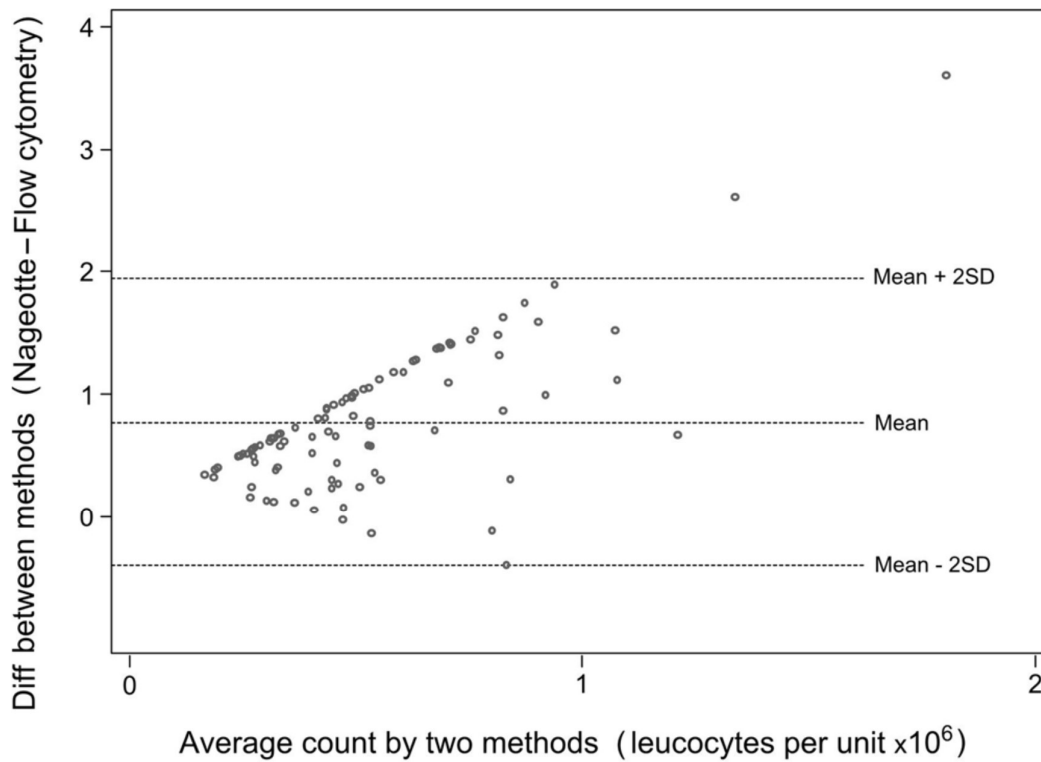


Εικόνα 8. Διάγραμμα διασποράς των ζευγών-μετρήσεων των λευκών αιμοσφαιρίων (WBCs) ανά μονάδα ($\times 10^6$) όπως προσδιορίζεται με κυτταρομετρία ροής και αιμοκυττομετρία Nageotte, για όλα τα δείγματα μελέτης ($n = 94$).

Ο οπτικός έλεγχος της γραφικής παράστασης δείχνει ανεπαρκή συμφωνία μεταξύ των δύο μεθόδων. Επιπλέον, η ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης δεν έδειξε καμία συσχέτιση ($R^2 = 0,01$, $p = 0,35$).

Συμπερασματικά, οι δύο μέθοδοι έδειξαν όχι μόνο φτωχή συμφωνία (όπως φαίνεται από τη στατιστική μέθοδο kappa), αλλά επίσης απουσία συσχέτισης (όπως φαίνεται στην ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης).

Η ανάλυση Bland-Altman για τη συμφωνία των δύο μεθόδων παρουσιάζεται στην Εικόνα 9. Παρουσιάζει απόκλιση προς μια υψηλότερη, με τη μέθοδο Nageotte, μέτρηση των $0,77 \times 10^6$ λευκοκυττάρων ανά μονάδα ($p < 0,001$), με τα όρια συμφωνίας 95% ($d \pm 2sd$) να κυμαίνονται από $-0,40 \times 10^6$ έως $1,94 \times 10^6$ λευκοκύτταρα ανά μονάδα.



Εικόνα 9. Ανάλυση *Bland-Altman* για τη μέτρηση της συμφωνίας μεταξύ της αιμοκυττομετρίας *Nageotte* και της κυτταρομετρίας ροής (*FC*).

Δεδομένου ότι οι διαφορές εντός του $d \pm 2sd$ (δηλ. Από $-0,40 \times 10^6$ έως $1,94 \times 10^6$ λευκοκύτταρα ανά μονάδα) είναι κλινικά σημαντικές, φαίνεται ότι οι δύο μέθοδοι δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά για κλινικούς σκοπούς.

5. Συζήτηση

Σε αυτή τη μελέτη, συγκρίναμε τις επιδόσεις της αιμοκυττομετρίας Nageotte και της μεθόδου FC, όσον αφορά την μέτρηση των χαμηλών συγκεντρώσεων WBCs σε λευκαφαιρεμένες μονάδες RBCs, υπό πραγματικές συνθήκες παραγωγής αίματος.

Εξαιτίας της έλλειψης μιας επίσημης “gold standard” μεθόδου και πειραμάτων αραίωσης, εκτιμήθηκε η ακρίβεια κάθε ανάλυσης, καθώς επίσης η συσχέτιση και η συμφωνία μεταξύ των δύο μεθόδων.

Δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ της αιμοκυττομετρίας Nageotte και της FC, ενώ οι δύο μέθοδοι έδειξαν φτωχή συμφωνία σε τέτοιο βαθμό, ώστε η χρήση τους εναλλάξ στην κλινική πρακτική είναι πιθανώς ακατάλληλη.

Η αιμοκυττομετρία Nageotte ήταν η πρώτη πρακτική μέθοδος για την απαρίθμηση των rWBCs σε λευκαφαιρεμένα παράγωγα αίματος και θεωρήθηκε κατάλληλη για δοκιμές ελέγχου ποιότητας ρουτίνας. Ωστόσο, απαιτούσε εντατική εργασία, παρουσίαζε χαμηλή ακρίβεια και απαιτούσε τόσο τεχνική κατάρτιση όσο και αξιοσημείωτη εμπειρία [48]. Προκειμένου να ξεπεραστούν αυτές οι δυσκολίες, έχουν αναπτυχθεί εναλλακτικές μέθοδοι μέτρησης των κυττάρων.

Αρκετές μεμονωμένες και πολυκεντρικές μελέτες συνέκριναν τις μετρήσεις των WBCs, που λήφθηκαν με αυτοματοποιημένες μεθόδους με τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από τη αιμοκυττομετρία Nageotte [75], [76], [85]. Η εμπειρία με μελέτες αραίωσης κατέδειξε ότι η ακρίβεια και η ευαισθησία του αιμοκυττομέτρου Nageotte ήταν φτωχές στη τιμή απόρριψης των λευκαφαιρεμένων παραγώγων αίματος και έδειξε μια προδιάθεση να υποτιμηθεί σε σύγκριση με τα αποτελέσματα που λήφθηκαν με τις αυτοματοποιημένες μεθόδους [78], [79], [81]. Η υποεκτίμηση των συγκεντρώσεων των λευκοκυττάρων στα εξεταζόμενα δείγματα συμπυκνωμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων ενδέχεται να οφείλεται εν μέρει στην ατελή λύση των ερυθροκυττάρων, η οποία εμποδίζει την καθίζηση των λευκοκυττάρων ενώ λευκοκύτταρα μπορεί να καταστραφούν επίσης κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας του δείγματος [78].

Ωστόσο, στοιχεία σχετικά με την απόδοση των μεθόδων καταμέτρησης σε πρόσφατα παραγόμενα συστατικά του αίματος υπό συνθήκες εργασίας ρουτίνας στις μονάδες Αιμοδοσίας είναι σπάνια και υπάρχουν ενδείξεις ότι σε τέτοια δείγματα το σύστημα χειροκίνητης μέτρησης μπορεί να επιδείξει υψηλότερους απόλυτους αριθμούς κυττάρων από τα αυτοματοποιημένα συστήματα [82]. Στη μελέτη μας, η καταμέτρηση με τη μέθοδο Nageotte έδωσε σημαντικά υψηλότερα αποτελέσματα rWBCs συγκριτικά με την FC. Ο εκτιμώμενος εντός του προσδιορισμού συντελεστής μεταβλητότητας για τη μέθοδο Nageotte ήταν ελαφρώς καλύτερος από αυτόν της FC.

Παρ' όλα αυτά, εξαιτίας της υπερεκτίμησης των συγκεντρώσεων των λευκοκυττάρων με το αιμοκυττόμετρο Nageotte σε σύγκριση με την FC, περίπου το ένα τρίτο (9/32) των μετρήσεων των διπλών επαναλήψεων από το ίδιο δείγμα με τη τεχνική Nageotte ήταν εκατέρωθεν του ορίου απόρριψης, οδηγώντας σε ανακόλουθα «pass» ή «fail» αποτελέσματα, με συνέπεια αδυναμία αξιόπιστης επισήμανσης της μονάδας των RBC ως λευκαφαιρεμένη.

Κατά συνέπεια, η συμφωνία μεταξύ των διπλών παρατηρήσεων ήταν μόνο 71,9%, γεγονός που υποδηλώνει κακή απόδοση για τη μέθοδο Nageotte σε επίπεδο γύρω από το διαγνωστικό όριο, που υπαγορεύει το ισχύον πρότυπο. Όσον αφορά την FC, παρά την ελαφρώς χαμηλότερη ακρίβειά της σε σχέση με το αιμοκυττόμετρο Nageotte, όλα, εκτός ενός, τα ζευγάρια μέτρησης έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα για να προσδιορίσουν εάν μια μονάδα πληρεί ή όχι τα υπάρχοντα πρότυπα, επιδεικνύοντας μια πολύ καλή συμφωνία μεταξύ των διπλών παρατηρήσεων με την μέθοδο FC.

Σε προηγούμενη μελέτη για τα παράγωγα αιμοπεταλίων, αν και βρέθηκαν υψηλότεροι απόλυτοι αριθμοί rWBCs με την μέθοδο Nageotte, όλα τα αποτελέσματα ήταν κάτω από το επίπεδο απόρριψης για τα rWBCs/προϊόν αιμοπεταλίων [82]. Η υπερεκτίμηση των συγκεντρώσεων των λευκοκυττάρων με το αιμοκυττόμετρο Nageotte σε πρόσφατα παρασκευασμένα συστατικά του αίματος

αποδόθηκε εν μέρει σε διαφορετικές μεθοδολογικές προσεγγίσεις μεταξύ των χειροκίνητων θαλάμων μέτρησης και των πλήρως αυτοματοποιημένων συστημάτων [82]. Εκτός από τη μεταβλητότητα της ανάλυσης της καταμέτρησης, τα αντιφατικά ευρήματα μεταξύ των προπαρασκευασμένων (in vitro) και των πρόσφατα παραγόμενων δειγμάτων (in vivo) μπορεί επίσης να οφείλονται στις συνθήκες παρασκευής των αραιωμένων δειγμάτων. Ακόμα, οι μετρήσεις σε δείγματα με πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις κυττάρων επηρεάζονται από σφάλματα κατά την διαδικασία της δειγματοληψίας [86]. Επειδή η μεταβλητότητα της υπολογιζόμενης τιμής είναι αντιστρόφως ανάλογη με την τετραγωνική ρίζα του αριθμού των κυττάρων που μετρήθηκαν, πρέπει να μετρηθεί ένας ελάχιστος αριθμός κυττάρων για να επιτευχθεί μεγαλύτερη ακρίβεια. Λόγω του σταθερού όγκου του θαλάμου του αιμοκυττομέτρου Nageotte, ο όγκος του δείγματος που αναλύθηκε ανά δοκιμή θα μπορούσε επίσης να επηρεάσει αρνητικά την απόδοση της μεθόδου [68].

Στην ανάλυσή μας, όταν χρησιμοποιήθηκε ένας τύπος μέτρησης «pass/fail», διαπιστώθηκε κακή συμφωνία μεταξύ των δύο μεθόδων. Επιπλέον, οι δύο τεχνικές δεν συσχετίστηκαν, αν και υποθετικά μετράνε την ίδια ποσότητα. Αυτό συμβαδίζει με την απουσία οποιασδήποτε συσχέτισης μεταξύ της ανάλυσης με κυτταρομετρία ροής και του θαλάμου καταμέτρησης του αιμοκυττομέτρου Nageotte για τη διερεύνηση των rWBCs σε συμπυκνωμένα αιμοπετάλια [82].

Η προηγούμενη κυρίαρχη μεθοδολογία, η μέθοδος Nageotte, αντικαταστάθηκε πρόσφατα από την FC, η οποία σήμερα αναφέρεται ως η κύρια μέθοδος μέτρησης των υπολειπόμενων λευκοκυττάρων (rWBCs). Ωστόσο, η μέθοδος Nageotte εξακολουθεί να θεωρείται αξιόπιστη εναλλακτική λύση για τους σκοπούς επικύρωσης διεργασιών [75], παρά τα πολλά μειονεκτήματα. Εκτός του ότι είναι χρονοβόρα και επίπονη διαδικασία, πάσχει, επίσης, από μεταβλητότητα λόγω υποκειμενικότητας. Επιπλέον, στην ανάλυσή μας, η απόδοση της μεθόδου Nageotte σε πρόσφατα παραχθέντα λευκαφαιρέμενα παράγωγα RBCs διαπιστώθηκε ότι είναι αναξιόπιστη γύρω από το κρίσιμο διαγνωστικό όριο και οι μονάδες θα μπορούσαν να απορριφθούν λανθασμένα ως μη λευκαφαιρέμενες ή να θεωρηθούν λανθασμένα ως λευκαφαιρέμενες. Παρόλο που δεν χρησιμοποιήθηκαν δείγματα-στόχοι για την εκτίμηση της ορθότητας των αναλύσεων, εάν η τάση υπερεκτίμησης

της μεθόδου Nageotte είναι πραγματική, μπορεί ένας αυξημένος αριθμός μονάδων να απορριφθεί λανθασμένα ως μη λευκαφαιρεμένες με τη χρήση του αιμοκυττομέτρου Nageotte σε ένα πρόγραμμα ελέγχου για τη διαδικασία της λευκαφαίρεσης. Υπό αυτές τις συνθήκες, το αιμοκυττόμετρο Nageotte είναι πιθανόν ακατάλληλο για την αξιολόγηση νέων διαδικασιών λευκαφαίρεσης.

Η μελέτη μας είχε αρκετούς περιορισμούς, που πρέπει να αναγνωριστούν. Αν και σε απουσία μιας «gold standard» μεθόδου, οι μέθοδοι μέτρησης συνήθως αξιολογούνται με μελέτες αραιώσης, στην δική μας μελέτη δεν αναλύθηκαν τέτοια δείγματα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι επιδόσεις και των δύο μεθόδων έχουν διερευνηθεί εκτενώς σε προηγούμενες *in vitro* μελέτες αραιώσης, ενώ ο στόχος μας ήταν η αξιολόγηση των δύο μεθόδων υπό πραγματικές συνθήκες παραγωγής του αίματος. Επιπλέον, λόγω της απουσίας δειγμάτων με γνωστές συγκεντρώσεις λευκοκυττάρων, δεν μπορούσαμε να εκτιμήσουμε την ακρίβεια και την ευαισθησία των δύο μεθόδων και μπορεί να υποστηριχθεί ότι υπάρχει αβεβαιότητα σχετικά με το ποιάς μεθόδου, οι μετρήσεις είναι πιο κοντά στις πραγματικές τιμές.

Συμπερασματικά, η απουσία οποιασδήποτε συμφωνίας ή συσχέτισης μεταξύ των δύο μεθόδων, Nageotte και FC, υποδηλώνει ότι οι δύο μέθοδοι δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά για κλινικούς σκοπούς. Επιπλέον, η μέτρηση του θαλάμου του αιμοκυττομέτρου Nageotte φαίνεται ακατάλληλη για ποιοτικό έλεγχο με το κριτήριο «pass/fail» ή με προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε λευκοκύτταρα της μονάδας των RBCs, κάτω από πραγματικές συνθήκες παραγωγής του αίματος. Για να τεκμηριωθεί ότι αυτά τα ευρήματα μπορούν να γενικευθούν, απαιτείται δοκιμή μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων. Σε μια τέτοια περίπτωση, το αιμοκυττόμετρο Nageotte δεν θα μπορούσε να προτείνεται ως αξιόπιστη μέθοδος για τον έλεγχο της διαδικασίας μέτρησης των λευκαφαιρεμένων RBCs, εν αντιθέση με την κυτταρομετρία ροής.

6. Δημοσίευση

“Comparison between Nageotte and flow cytometric counting of residual leucocytes in freshly prepared leucocyte-reduced red blood cell components”

Kyriakou E, Nearchakos N, Bonovas S, Makri E, Pantavou K, Nikolopoulos GK, Kottaridi C, Gialeraki A, Douramani P, Taichert M, Kapsimali V, Tsantes AE. Comparison between Nageotte and flow cytometric counting of residual leucocytes in freshly prepared leucocyte-reduced red blood cell components. *Transfus Apher Sci.* 2018 Aug;57(4):544-548. doi: 10.1016/j.transci.2018.06.002. Epub 2018 Jun 7. PMID: 29903416.

7. Βιογραφικό Σημείωμα

Προσωπικά στοιχεία:

Όνοματεπώνυμο: **ΝΕΑΡΧΑΚΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ**

Τίτλοι σπουδών:

Βασικοί τίτλοι σπουδών

Τίτλος: Νοσηλευτής Τεχνολογικής Εκπαίδευσης (ΤΕ), Εκπ. Ίδρυμα: Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Πάτρας

Μεταπτυχιακοί τίτλοι

A) Τίτλος: "Health Management", Εκπ.Ίδρυμα: Διεθνές Τηλεματικό Πανεπ/μιο Uninettuno

B) Τίτλος: "Θρόμβωση – Αιμορραγία, Ιατρική των Μεταγγίσεων", Εκπ. Ίδρυμα: Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Ιατρικής Σχολής .

Πρόσθετοι τίτλοι σπουδών:

- Απόκτηση Χειρουργικής Νοσηλευτικής ειδικότητας στο Εκπαιδευτικό Ίδρυμα: Γενικό Νοσοκομείο Νίκαιας «Άγιος Παντελεήμων»
- Εξειδίκευση σε όλους τους τομείς Αιμοδοσίας και Ανοσοαιματολογίας στο Εκπαιδευτικό Ίδρυμα: Γενικό Νοσοκομείο Νίκαιας «Άγιος Παντελεήμων»

Επαγγελματική Εμπειρία:

- **03/1990 – 01/2004** Γενικό Νοσοκομείο Νίκαιας «Άγιος Παντελεήμων»
- **01/2004 - σήμερα** ΠΓΝ «Αττικόν»

Υπηρεσιακές μονάδες στις οποίες έχει διατελέσει προϊστάμενος: Τμήμα Αιμοδοσίας ΠΓΝ «Αττικόν»

Επιμόρφωση - Μετεκπαίδευση

- **"Νεώτερες Τεχνικές στην Αιματολογία"** , Αθήνα 28 - 31 Μαΐου 1992
- **Εκπαιδευτικό σεμινάριο με θέμα "Άριστη Εφαρμογή του Αίματος και των Παραγώγων του"** που οργανώθηκε από την Ελληνική Αιματολογική Εταιρεία και το European School of Transfusion Medicine, Αθήνα 25 - 26 Φεβρουαρίου 1994
- **"Αιμόσταση"**, ΝΙΜΤΣ 9 - 11 Μαΐου 1994
- **"Συμβουλευτική Αιμοδοτών για την Λοίμωξη του Ιού της Ανθρώπινης Ανοσοανεπάρκειας (HIV)" ,**Αθήνα 12 Μαΐου 1997
- Συμμετοχή στο πρόγραμμα : **Advanced Trauma Life Support (ATLS)** που οργάνωσε η Α΄ Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών (Δ/ντής καθ. Γ. Ανδρουλάκης), Αθήνα 20 - 22 Νοεμβρίου 1998
- Συμμετοχή στο **HemoCue Spring Seminar**, Angelholm, Sweden : B-Hemoglobin Screening in Blood Banks, Σουηδία, 8 - 9 Μαΐου 2000.
- **«Μεσογειακή αναιμία και Ηπατίτιδα C»** Υπό την αιγίδα του ΥΥΠ & ΚΕΕΛ, Αθήνα 12 Απριλίου 2002
- Εκπαιδευτικό σεμινάριο με θέμα **«Ολική Ποιότητα (ISO)»** διάρκειας 20 ωρών, που διοργανώθηκε από το ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ», Χαϊδάρι, Φεβρουάριος 2004
- Εκπαιδευτικό σεμινάριο με θέμα **«Διοίκηση Ανθρώπινου Δυναμικού»** διάρκειας 15 ωρών, που διοργανώθηκε από το ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ», Χαϊδάρι, Μάρτιος 2004
- Εκπαιδευτικό σεμινάριο με θέμα **«Επείγοντα θέματα υγιεινής στο χώρο του Νοσοκομείου»** που διοργανώθηκε από την Επιτροπή Νοσοκομειακών Λοιμώξεων του ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ» σε συνεργασία με τη Διεύθυνση Νοσηλευτικής Υπηρεσίας, Χαϊδάρι, Ιούνιος 2004.

Δημοσιεύσεις

1. Σύγχρονες εξελίξεις στη Μεταγγισιοθεραπεία - Λευκαφαίρεση. Δημοσιεύθηκε στο " Έμφυση Ζωής " Διμηνιαίο Επιστημονικό Περιοδικό υπό την αιγίδα του Πανελληνίου συλλόγου Νοσηλευτών Ε.Σ.Υ. σελ. 22 -24 , Αρ. Τεύχους 7, Ιανουάριος 2002
2. Η αφαιμαξομετάγγιση (ΑΦΜ). Δημοσιεύθηκε στο " Έμφυση Ζωής " Διμηνιαίο Επιστημονικό Περιοδικό υπό την αιγίδα του Πανελληνίου συλλόγου Νοσηλευτών Ε.Σ.Υ.
3. Καταγραφή των αιτήσεων χορήγησης αίματος σε Νοσοκομείο τριτοβάθμιας περίθαλψης. Δημοσιεύθηκε στο περιοδικό ΠΕΡΙΕΓΧΕΙΡΗΤΙΚΗ ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗ του συλλόγου διπλωματούχων Νοσηλευτών/τριών χειρουργείου, σελ. 8-10, τεύχος 2^ο , 2003.
4. Intergration in groups of donors may modify towards blood donation, έγινε ανάρτηση στο BLOOD TRANSFUSION, 29 Οκτωβρίου 2014 (DOI:10.2450/2014.0153-14).
5. Kyriakou E, **Nearchakos N**, Bonovas S, Makri E, Pantavou K, Nikolopoulos GK, Kottaridi C, Gialeraki A, Douramani P, Taichert M, Kapsimali V, Tsantes AE., «Comparison between Nageotte and flow cytometric counting of residual leucocytes in freshly prepared leucocyte-reduced red blood cell components», Transfus Apher Sci. 2018 Aug;57(4):544-548. doi: 10.1016/j.transci.2018.06.002. Epub 2018 Jun 7.

Διαλέξεις

1. «Blood Therapy and Nursing staff», **Nearchakos N.**, Frangiadakis G., International Nursing Congress , Athens 6 - 9 June 1995 (Διάλεξη)
2. «Μετάγγιση αίματος και παραγώγων του - Η συνεχής επιμόρφωση των Νοσηλευτών απαραίτητη για ασφαλή μεταγγισιοθεραπεία», Φραγκιαδάκης Γ., **Νεαρχάκος Ν.** , Ελευθερίου Ε. , Κουφού Α., 21^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Νοσηλευτικό Συνέδριο, Αθήνα 17 - 19 Μαΐου 1994 (Διάλεξη)
3. Συμμετοχή σε στρογγυλό τραπέζι με θέμα: «Αιμοδοσία και Νοσηλευτική» (Πρόεδρος Δρ. Μ. Μέριανου) στα πλαίσια του 2^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου ΠΑ.ΣΥ.ΝΟ με τίτλο: Αφαιμαξομετάγγιση, Γλυφάδα Αττικής - Μάιος 1999 (Διάλεξη)
4. «Σύγχρονες εξελίξεις στη μεταγγισιοθεραπεία: Λευκαφαίρεση», στο 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο ΠΑ.ΣΥ.ΝΟ, Πάτρα - 18 - 20 Οκτωβρίου 2000 (Διάλεξη)
5. Προφορική ανακοίνωση με θέμα: «Blood order practices in a tertiary hospital» στο European Congress for operating Room nurses: «From Myth to Evidence...», 10-13 April 2003, Crete-Greece

6. Ομιλία με θέμα: «Διαχωρισμός αίματος σε παράγωγα». Ημερίδα, Οργάνωση Αιματολογικό Εργαστήριο - Μονάδας Αιμοδοσίας, ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ». Χαϊδάρη, Απρίλιος 2004.
7. Ομιλία με θέμα: «Ασφαλής μετάγγιση. Ο ρόλος του νοσηλευτή», Ημερίδα για τους Νοσηλευτές, Τεχνολόγους, Βιολόγους, Γιατρούς,..., που ασχολούνται με τον Αιματολογικό Ασθενή.
8. Ομιλία με θέμα: «Αιμοεπαγρύπνηση», 2^ο Πανελλήνιο και 1^ο Πανευρωπαϊκό Επιστημονικό και Επαγγελματικό Νοσηλευτικό Συνέδριο, 12-15 Μαΐου 2009, Ρόδος.

Αναρτημένες ανακοινώσεις

- **«Η ΑΙΜΟΔΟΣΙΑ ΜΠΡΟΣΤΑ ΣΤΑ ΝΕΑ ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ»**, Κ. Σταμούλης, Γ. Καλέμη, Λ. Φουντουλάκη, **N. Νεαρχάκος**, Β. Παναγόπουλος, Κ. Σωφρονιάδου, 10^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Ρόδος 28 - 31 Οκτωβρίου 1999
- **«ΑΙΤΙΑ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ ΑΠΟ ΑΙΜΟΔΟΣΙΑ ΣΕ ΑΙΜΟΔΟΤΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ»**, Κ. Σταμούλης, **N. Νεαρχάκος**, Α. Μιχαλάκου, Γ. Λυράκος, Κ. Σωφρονιάδου 1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Μεταγγισιοθεραπείας, Αθήνα 17 - 18 Μαρτίου 2000
- **«ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΑΙΤΗΣΕΩΝ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΑΙΜΑΤΟΣ ΣΕ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΤΡΙΤΟΒΑΘΜΙΑΣ ΠΕΡΙΘΑΛΨΗΣ»**, Κ. Σταμούλης, Μ. Παπακωνσταντίνου, Λ. Φουντουλάκη, Β. Φακίτσα, **N. Νεαρχάκος**, Ε. Δεσύλλα, Ε. Χαιδευτοπούλου, Κ. Χασανάκου, Κ. Σωφρονιάδου, 2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Μεταγγισιοθεραπείας, Πάτρα 18 - 20 Απριλίου 2002
- **«Η ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΜΟΝΑΔΑΣ ΑΙΜΟΔΟΣΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟΥ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ "ΑΤΤΙΚΟΝ" ΚΑΤΑ ΤΟΝ ΠΡΩΤΟ ΧΡΟΝΟ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΗΣ. ΥΠΕΡΒΑΣΕΙΣ ΕΜΠΟΔΙΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ»**, Τζιώκα Α., Δαμιανίδου Σ., **Νεαρχάκος N**, Γεωργιάδου Χ., Κουλουκάκου Ε., Καραγκούνη Μ., Μαντάς Π., Αραπίνη Κ., Τραυλού Α, 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Μεταγγισιοθεραπείας, Λουτράκι 14-16 Οκτωβρίου 2004
- **«ΟΙ ΠΡΩΤΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΗΣ ΑΙΜΟΕΠΑΓΡΥΠΝΗΣΗΣ ΣΤΟ ΠΓΝ "ΑΤΤΙΚΟΝ"»**, Τζιώκα Α., Φουντουλάκη Λ., Δαμιανίδου Σ., Ντουραμάνη Π.,

Μητροσούδης Κ., Μάντζιος Γ., Κοζανίτου Μ., Καλαντζής Δ., **Νεαρχάκος Ν.**, Γεωργιάδου Χ., Κουλουκάκου Ε., Καραγκούνη Μ., Μαντάς Π., Στύλος Δ., Μαντζούκα Ν., Πολίτου Μ., Τραυλού Α, 6^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη 2005

▫ **«Η ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΑΛΛΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΣΤΗ ΜΕΤΑΓΓΙΣΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ»**, Π.Ντουραμάνη, Ε.Γρουζή, Δ.Καλαντζής, Γ.Μπόλλας, Μ.Πολίτου, Α.Τσαντές, **Ν.Νεαρχάκος**, Α.Τζιώκα, Α.Τραυλού, 5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μεταγγισιοθεραπείας, 8-10 Μαΐου 2008, Κέρκυρα.

▫ **«ΑΣΦΑΛΗΣ ΜΕΤΤΑΓΙΣΗ. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΝΟΣΗΛΕΥΤΗ»**, Κ.Εμμανουηλίδης, **Ν. Νεαρχάκος**, Μ. Βόγια, Ημερίδα της Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας με θέμα «Μια ημερίδα για τους νοσηλευτές, τεχνολόγους, βιολόγους, γιατρούς, που ασχολούνται με τον αιματολογικό ασθενή», Καμμένα Βούρλα, 11 Οκτωβρίου 2008.

▫ **«ΑΝΕΠΙΘΥΜΗΤΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΠΟΥ ΣΥΝΔΕΟΝΤΑΙ ΜΕ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΦΑΙΡΕΣΗ: ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ»**, Π.Ντουραμάνη, Λ.Φουντουλάκη, Ε.Γρουζή, Γ.Μπόλλας, Η.Κυριάκου, Π.Μαντάς, **Ν.Νεαρχάκος**, Α.Τζιώκα, Α.Τραυλού, 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο ΑΙΜΑΦΑΙΡΕΣΗΣ, 18-20 Ιουνίου 2010, Ναύπλιο.

▫ **«ΑΙΜΟΕΠΑΓΡΥΠΝΗΣΗ»**, Η.Λουκοπούλου, **Ν.Νεαρχάκος**, Δ.Αντωνιάδου, 5^ο Πανελλήνιο και 4^ο Πανευρωπαϊκό Επιστημονικό και Επαγγελματικό Νοσηλευτικό Συνέδριο.10-13 Μαΐου 2012, Κέρκυρα.

▫ **«ΜΕΛΕΤΗ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΑΙΜΟΔΟΤΩΝ»**, Η.Λουκοπούλου, **Ν.Νεαρχάκος**, Χρ.Γεωργιάδου, Χρ.Τσέλιος, Μ.Καραγκούνη, Κ.Λυσσανδροπούλου, Ν.Γομάτου, 6^ο Πανελλήνιο και 5^ο Πανευρωπαϊκό Επιστημονικό και Επαγγελματικό Νοσηλευτικό Συνέδριο. Λευκάδα 23-25 Μαΐου 2013.

▫ **«ΜΕΛΕΤΗ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΑΙΜΟΔΟΤΩΝ»**, Λουκοπούλου Ηλέκτρα, **Νεαρχάκος Νικόλαος**, Γεωργιάδου Χρυσή, Τσέλιος Χρήστος, Καραγκούνη Μαρία, Λυσσανδροπούλου Κων/να, Γομάτου Νικολέτα, προφορική ανακοίνωση, 6^ο Πανελλήνιο & Πανευρωπαϊκό Επιστημονικό και Επαγγελματικό Νοσηλευτικό Συνέδριο, Λευκάδα 23-26 Μαΐου 2013

▫ **«ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΑΝΕΠΙΘΥΜΗΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ: Η ΕΝΝΙΑΕΤΗΣ ΕΜΠΕΙΡΙΑ ΜΙΑΣ ΝΕΟΣΥΣΤΑΤΗΣ Ν.Υ.ΑΙΜΟΔΟΣΙΑΣ ΚΑΙ Η ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΠΑΝΕΛΛΑΔΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΕΘΝΗ ΔΕΔΟΜΕΝΑ»**, Δημήτριος Στύλος,

Ηλέκτρα Λουκοπούλου, Νίκη Μαντζούκα, Πασχαλιά Τσενέ, Ευσταθία Μακρή, **Νικόλαος Νεαρχάκος**, 7^ο Πανελλήνιο & 6^ο Πανευρωπαϊκό Επιστημονικό & Επαγγελματικό Νοσηλευτικό Συνέδριο της Ε.Ν.Ε., Ιωάννινα, 2014

▫ **«ΟΡΘΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΑΧΕΙΡΗΣΗ ΑΙΜΑΤΟΣ : ΜΕΛΕΤΗ ΣΧΕΣΗΣ ΜΕΤΑΞΥ ΑΙΤΟΥΜΕΝΩΝ ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΕΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΓΓΙΖΟΜΕΝΩΝ ΜΟΝΑΔΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ»**, Ηλέκτρα, Δημήτρης Στύλος, Ευλαμπία Κωνσταντινίδου, Μαρία Καραγκούνη, Μαγδαληνή Σουσουγιάνη, **Νικόλαος Νεαρχάκος**, 7^ο Πανελλήνιο & 6^ο Πανευρωπαϊκό Επιστημονικό & Επαγγελματικό Νοσηλευτικό Συνέδριο της Ε.Ν.Ε., 8-11 Μαΐου, 2014

▫ **«Μελέτη της σχέσης μεταξύ αιτούμενων διασταυρώσεων και μεταγγιζόμενων συμπυκνωμένων ερυθρών στη Ν.Υ. Αιμοδοσίας του ΠΓΝ "ΑΤΤΙΚΟΝ": Ο ρόλος της σωστής εφαρμογής των κατευθυντήριων οδηγιών μετάγγισης στην εξοικονόμηση πόρων και επάρκειας αίματος στην Αιμοδοσία»**, Ηλέκτρα Λουκοπούλου, **Νικόλαος Νεαρχάκος**, 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μεταγγισιοθεραπείας, 8-10 Μαΐου 2014, Καλαμάτα

▫ **«Καταγραφή της δεκαετούς εξέλιξης της επάρκειας αίματος και παραγώγων του στην ΝΥ Αιμοδοσίας του ΠΓΝ "ΑΤΤΙΚΟΝ" : Ο ρόλος της διαφώτισης και της προσέλευσης Εθελοντών Αιμοδοτών**, Ηλέκτρα Λουκοπούλου, **Νικόλαος Νεαρχάκος**, 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μεταγγισιοθεραπείας, 8-10 Μαΐου 2014, Καλαμάτα

▫ **«Αιτίες προσωρινής και μόνιμης απόρριψης αιμοδοτών κατά την διάρκεια ενός έτους στην ΝΥ Αιμοδοσίας του ΠΓΝ "ΑΤΤΙΚΟΝ": Πως η διαφώτιση και η επανένταξη των πρώτων μπορεί να επηρεάσει θετικά την επάρκεια αίματος»**, Βασιλική Τσιρώνη, **Νικόλαος Νεαρχάκος**, 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μεταγγισιοθεραπείας, 8-10 Μαΐου 2014, Καλαμάτα

▫ **«Καταγραφή ανεπιθύμητων αντιδράσεων από μετάγγιση αίματος και παραγώγων του: Η 9 ετής εμπειρία μιας νεοσύστατης Ν.Υ. Αιμοδοσίας και η σύγκριση με πανελλαδικά και Διεθνή Δεδομένα»**, Δημήτριος Στύλος, **Νικόλαος Νεαρχάκος**, 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μεταγγισιοθεραπείας, 8-10 Μαΐου 2014, Καλαμάτα

- **«Καταγραφή των αιτιών και της συχνότητας καταστροφής παραγώγων το 2013 στην Αιμοδοσία του ΠΓΝ “ΑΤΤΙΚΟΝ”.** Πως η στρατηγική περιορισμού των δυνητικά αποφευκτέων καταστροφών μπορεί να επηρεάσει θετικά την επάρκεια αίματος», Ευσταθία Μακρή, **Νικόλαος Νεαρχάκος**, 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μεταγγισιοθεραπείας, 8-10 Μαΐου 2014, Καλαμάτα
- **Εκπαιδευτικό πρόγραμμα Διεύθυνσης Νοσηλευτικής Υπηρεσίας, Π.Γ.Ν. «ΑΤΤΙΚΟΝ» με θέμα «Βασικές αρχές μεταγγισιοθεραπείας», ομιλία 12 Μαρτίου 2015, Χαϊδάρι, Νεαρχάκος Νικόλαος**
- **«Καταγραφή και μελέτη των ανεπιθύμητων αντιδράσεων αιμοδοτών σε Νοσοκομειακή Υπηρεσία Αιμοδοσίας»,** Λουκοπούλου .Η, Καραγκούνη Μ., Σουσουγιάννη Μ., Τσιρώνη Β., Τσέλιος Χ., **Νεαρχάκος .Ν.**, 8^ο Πανελλήνιο Νοσηλευτικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη, 7-10 Μαΐου 2015
- **«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΙΚΑΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΙΜΟΔΟΤΩΝ ΣΕ ΑΙΜΟΔΟΣΙΑ ΤΡΙΤΟΒΑΘΜΙΟΥ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ»,** Η.Λουκοπούλου, **Ν.Νεαρχάκος**, Χρ.Γεωργιάδου, Δ.Στύλος, Γ.Κορκιδάκη, Α.Αντωνοπούλου, Π.Μπουρβάνη, Β.Τσιρώνη, 26^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 12-14 Νοεμβρίου 2015, Αθήνα.
- **«ΟΡΘΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΑΙΜΑΤΟΣ: ΜΕΛΕΤΗ ΣΧΕΧΗΣ ΜΕΤΑΞΥ ΑΙΤΟΥΜΕΝΩΝ ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΕΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΓΓΙΖΟΜΕΝΩΝ ΜΟΝΑΔΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ»,** Η.Λουκοπούλου, **Ν.Νεαρχάκος**, Χρ.Γεωργιάδου, Α.Κυπραίου, Μ.Ευαγγέλου, Η.Κυριάκου, Α.Τσαντές, 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μεταγγισιοθεραπείας, 13-15 Μαΐου 2016, Καβάλα.
- **«Πενταετής καταγραφή χαρακτηριστικών δοτών αιμοπεταλίων»,** Ηλέκτρα Λουκοπούλου, Γεωργία Κορκιδάκη, Βασιλική Τσιρώνη,, Χρήστος Τσέλιος, **Νικόλαος Νεαρχάκος**, αναρτημένη ανακοίνωση, 10^ο Πανελλήνιο -9^ο Πανευρωπαϊκό, Επιστημονικό & Επαγγελματικό Νοσηλευτικό Συνέδριο, 27-30 Απριλίου 2017 Ηράκλειο, Κρήτης
- **«Πενταετής καταγραφή χαρακτηριστικών αιμοδοτών»,** Ηλέκτρα Λουκοπούλου, Βασιλική Γκουγκούτση, Βασιλική Τσιρώνη, Χρήστος Τσέλιος,, Ανθή Αντωνοπούλου, **Νικόλαος Νεαρχάκος**, Αναρτημένη ανακοίνωση. 11^ο Πανελλήνιο και 10^ο Πανευρωπαϊκό Επιστημονικό και Επαγγελματικό Νοσηλευτικό Συνέδριο, 3-6 Μαΐου 2018, Ζάκυνθος

8. Βιβλιογραφία

- [1] Γ. Ε., “Ενημερωτικό φυλλάδιο του Ιδρύματος της ΕΑΕ με θέμα: « το αίμα και τα παράγωγα του»,” 2010.
- [2] P. Borzini, P. Nembri, and F. Biffoni, “The evolution of transfusion medicine as a stand alone discipline,” *Transfus. Med. Rev.*, vol. 11, no. 3, pp. 200–208, Jul. 1997.
- [3] ΚΑΛΛΙΝΙΚΟΥ-ΜΑΝΙΑΤΗ ΑΛΙΚΗ, ΚΑΛΛΙΝΙΚΟΥ-ΜΑΝΙΑΤΗ ΑΛΙΚΗ “ΊΑΤΡΙΚΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΓΙΣΕΩΝ” ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ “ ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ ΑΕ” .pdf. ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ Α.Ε., 2001.
- [4] ΓΕΩΡΓΟΥΛΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ, ΓΕΩΡΓΟΥΛΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑ 2012 ΡΟΤΟΝΤΑ. ΡΟΤΟΝΤΑ, 2012.
- [5] ΚΑΒΑΛΛΙΕΡΟΥ ΛΙΛΙΑΝ, Παράγωγα αίματος : Μορφές παραγώγων - Διαδικασίες παρασκευής και συντήρησης - Έλεγχος ποιότητας. 2013.
- [6] “Transfusion of blood components and plasma products | Basicmedical Key.” [Online]. Available: <https://basicmedicalkey.com/transfusion-of-blood-components-and-plasma-products/>. [Accessed: 05-Apr-2020].
- [7] B. H. Shaz, C. J. Dente, R. S. Harris, J. B. MacLeod, and C. D. Hillyer, “Transfusion management of trauma patients,” *Anesthesia and Analgesia*, vol. 108, no. 6. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 1760–1768, 2009.
- [8] C. C. Silliman *et al.*, “The association of biologically active lipids with the development of transfusion-related acute lung injury: a retrospective study,” *Transfusion*, vol. 37, no. 7, pp. 719–26, Jul. 1997.
- [9] R. B. Weiskopf *et al.*, “Fresh and stored red blood cell transfusion equivalently induce subclinical pulmonary gas exchange deficit in normal humans,” *Anesth. Analg.*, vol. 114, no. 3, pp. 511–519, Mar. 2012.
- [10] M. J. Maxwell and M. J. A. Wilson, “Complications of blood transfusion,” *Contin. Educ. Anaesth. Crit. Care Pain*, vol. 6, no. 6, pp. 225–229, Dec. 2006.
- [11] G. Walther-Wenke, “Incidence of bacterial transmission and transfusion reactions by blood components,” *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 46, no. 7, pp. 919–925, Jan. 2008.
- [12] W. Y. Bassuni, M. A. Blajchman, and M. A. Al-Moshary, “Why implement universal leukoreduction?,” *Hematol. Oncol. Stem Cell Ther.*, vol. 1, no. 2, pp. 106–23.
- [13] F. Hirayama, “Current understanding of allergic transfusion reactions: Incidence, pathogenesis, laboratory tests, prevention and treatment,” *British Journal of Haematology*, vol. 160, no. 4. pp. 434–444, Feb-2013.
- [14] N. Blumberg *et al.*, “An association between decreased cardiopulmonary complications (transfusion-related acute lung injury and transfusion-associated circulatory overload) and implementation of universal leukoreduction of blood transfusions,” *Transfusion*, vol. 50, no. 12, pp. 2738–2744, Dec. 2010.
- [15] C. C. Silliman, Y. L. Fung, J. Bradley Ball, and S. Y. Khan, “Transfusion-related acute

- lung injury (TRALI): Current concepts and misconceptions," *Blood Rev.*, vol. 23, no. 6, pp. 245–255, Nov. 2009.
- [16] H. I. Tsai, A. H. Chou, and M. W. Yang, "Perioperative transfusion-related acute lung injury: A retrospective analysis," *Acta Anaesthesiol. Taiwanica*, vol. 50, no. 3, pp. 96–100, Sep. 2012.
- [17] R. R. Sharma and N. Marwaha, "Leukoreduced blood components: Advantages and strategies for its implementation in developing countries," *Asian Journal of Transfusion Science*, vol. 4, no. 1. pp. 3–8, 01-Jan-2010.
- [18] M. Stolla *et al.*, "Platelet transfusion - The new immunology of an old therapy," *Frontiers in Immunology*, vol. 6, no. FEB. Frontiers Media S.A., 2015.
- [19] B. M. Gilliss, M. R. Looney, and M. A. Gropper, "Reducing noninfectious risks of blood transfusion," *Anesthesiology*, vol. 115, no. 3. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 635–649, Sep-2011.
- [20] G. F. Leparc, "Safety of the Blood Supply," *Cancer Control*, vol. 22, no. 1, pp. 7–15, Jan. 2015.
- [21] S. Sahu, Hemlata, and A. Verma, "Adverse events related to blood transfusion," *Indian Journal of Anaesthesia*, vol. 58, no. 5. Indian Society of Anaesthetists, pp. 543–551, 01-Sep-2014.
- [22] S. K. Syed, D. A. Sears, J. B. Werch, M. M. Udden, and J. D. Milam, "Delayed hemolytic transfusion reaction in sickle cell disease," *Am. J. Med. Sci.*, vol. 312, no. 4, pp. 175–181, 1996.
- [23] D. A. M. A. Babker, "Red cell alloimmunization in blood transfusion dependent Patients with Sickle Cell Disease in El-Obied city, Sudan," *IOSR J. Dent. Med. Sci.*
- [24] O. P. Arewa, S. Nahirniak, and G. Clarke, "Anti-HPA-1b Mediated Posttransfusion Purpura: A Case Report," *Case Rep. Med.*, vol. 2013, 2013.
- [25] Y. M. Bilgin and L. Van De Watering, "Complications after Cardiac Surgery due to Allogeneic Blood Transfusions," *J Clin Exp Cardiol.*, p. 7, 2013.
- [26] A. B. Benson, "Pulmonary Complications of Transfused Blood Components," *Critical Care Nursing Clinics of North America*, vol. 24, no. 3. NIH Public Access, pp. 403–418, Sep-2012.
- [27] P. Kaur and S. Basu, "Transfusion-transmitted infections: Existing and emerging pathogens," *Journal of Postgraduate Medicine*, vol. 51, no. 2. pp. 146–151, Jun-2005.
- [28] Ε.ΘΕΟΔΩΡΗ, "Επιλεκτική / Καθολική Λευκαφαίρεση.," *12ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο Η Αιμοδοσία στον αιώνα που άρχισε .(Haema 2001 167-172)*, 2001.
- [29] -, "-." [Online]. Available: <https://www.eae.gr/images/files/aimodosia/drastiriotites/2015/parousiaseis/03.leivada.pdf>. [Accessed: 05-Apr-2020].
- [30] Γεώργιος Θεοδοσιάδης, "Καθολική λευκαφαίρεση: Γενική θεώρηση των προβλημάτων και αποκτηθείσα γνώση.," *Πρακτικά ημερίδας του τμήματος Αιμοδοσίας-Αφαίρεσης της Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας με θέμα «Μετάγγιση*

ερυθρών αιμοσφαιρίων κατευθυντήριες οδηγίες», Αθήνα 13 Δεκεμβρίου 2008, σελ.30-38., 2008.

- [31] -, "cgtt_ch2_fig1.png | Professional Education." [Online]. Available: <https://professionaleducation.blood.ca/en/file/cgttch2fig1png>. [Accessed: 05-Apr-2020].
- [32] M. Masse, "Universal leukoreduction of cellular and plasma components: Process control and performance of the leukoreduction process," in *Transfusion Clinique et Biologique*, 2001, vol. 8, no. 3, pp. 297–302.
- [33] J. Lavee and Y. Paz, "Hypotensive reactions associated with transfusion of bedside leukocyte-reduction filtered blood products in heart transplanted patients.," *J. Heart Lung Transplant.*, vol. 20, no. 7, pp. 759–61, Jul. 2001.
- [34] N. Blumberg, J. M. Heal, and G. L. Phillips, "Platelet transfusions: Trigger, dose, benefits, and risks," *F1000 Medicine Reports*, vol. 2, no. 1. p. 5, 27-Jan-2010.
- [35] R. D. Davenport, "Pathophysiology of hemolytic transfusion reactions," *Semin. Hematol.*, vol. 42, no. 3, pp. 165–168, Jul. 2005.
- [36] B. Ghezalbash, A. Azarkeivan, A. A. Pourfathollah, M. Deyhim, E. Hajati, and A. Goodarzi, "Comparative evaluation of biochemical and hematological parameters of pre-storage leukoreduction during RBC storage," *Int. J. Hematol. Stem Cell Res.*, vol. 12, no. 1, pp. 35–42, 2018.
- [37] K. L. Lannan, J. Sahler, S. L. Spinelli, R. P. Phipps, and N. Blumberg, "Transfusion immunomodulation - the case for leukoreduced and (perhaps) washed transfusions," *Blood Cells, Mol. Dis.*, vol. 50, no. 1, pp. 61–68, Jan. 2013.
- [38] Y. M. Bilgin, L. M. G. van de Watering, and A. Brand, "Clinical effects of leucoreduction of blood transfusions," *Neth. J. Med.*, vol. 69, no. 10, pp. 441–450, Oct. 2011.
- [39] Y. Mishima *et al.*, "Effects of universal vs bedside leukoreductions on the alloimmunization to platelets and the platelet transfusion refractoriness," *Transfus. Apher. Sci.*, vol. 52, no. 1, pp. 112–121, Feb. 2015.
- [40] M. D. Seftel *et al.*, "Universal prestorage leukoreduction in Canada decreases platelet alloimmunization and refractoriness," *Blood*, vol. 103, no. 1, pp. 333–339, Jan. 2004.
- [41] M. K. Fung, N. Rao, J. Rice, M. Ridenour, W. Mook, and D. J. Triulzi, "Leukoreduction in the setting of open heart surgery: A prospective cohort-controlled study," *Transfusion*, vol. 44, no. 1, pp. 30–35, Jan. 2004.
- [42] M. K. Fung, K. Moore, M. Ridenour, W. Mook, and D. J. Triulzi, "Clinical effects of reverting from leukoreduced to nonleukoreduced blood in cardiac surgery," *Transfusion*, vol. 46, no. 3, pp. 386–391, Mar. 2006.
- [43] "Review of guidelines for prevention of Creutzfeldt-Jakob disease transmission in medical settings in EU Member States and Norway."
- [44] L. M. Williamson *et al.*, "The impact of universal leukodepletion of the blood supply on hemovigilance reports of posttransfusion purpura and transfusion-associated graft-versus-host disease," *Transfusion*, vol. 47, no. 8, pp. 1455–1467, Aug. 2007.

- [45] R. Césaire *et al.*, "Evaluation of HTLV-I removal by filtration of blood cell components in a routine setting," *Transfusion*, vol. 44, no. 1, pp. 42–48, Jan. 2004.
- [46] A. E. Tsantes *et al.*, "Cost-effectiveness of leucoreduction for prevention of febrile non-haemolytic transfusion reactions," *Blood Transfus.*, vol. 12, no. 2, pp. 232–237, Apr. 2014.
- [47] I. Cleemput, M. Leys, D. Ramaekers, and L. Bonneux, "Balancing evidence and public opinion in health technology assessments: The case of leukoreduction," *Int. J. Technol. Assess. Health Care*, vol. 22, no. 4, pp. 403–407, Oct. 2006.
- [48] S. Dzik *et al.*, "Leukocyte reduction of blood components: Public policy and new technology," *Transfus. Med. Rev.*, vol. 14, no. 1, pp. 34–52, 2000.
- [49] J. Sweeney, A. Heaton, G. Sirchia, and P. Rebullà, "Enumeration of Low White Cells," in *Clinical Benefits of Leukodepleted Blood Products*, Springer Berlin Heidelberg, 1995, pp. 17–27.
- [50] M. F.-B. Beat M Frey, "Enumeration of residual cells in leucodepleted blood products: techniques and pitfalls," *Univers. leucodepletion Eur. Exp. Ed. SIMTI*, pp. 105–116, 2003.
- [51] R. Javed, S. Basu, and D. Mishra, "Evaluation of two methods for counting residual leukocytes in leuko-reduced platelets: Nageotte's method and flow cytometry," *Glob. J. Transfus. Med.*, vol. 1, no. 2, p. 43, 2016.
- [52] A. Vembadi, A. Menachery, and M. A. Qasaimeh, "Cell Cytometry: Review and Perspective on Biotechnological Advances," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 7, no. JUN. Frontiers Media S.A., p. 147, 18-Jun-2019.
- [53] H. M. Shapiro, *Practical Flow Cytometry*. Wiley, 2003.
- [54] R. A. Papadogiannakis E.I., Kontos V.I. , Tamamidou M., "Flow cytometry and its applications," *J. Hell. Vet. Med. Soc.*, vol. 56, no. 1, pp. 71–77, 2005.
- [55] H. Shapiro, "A History of Flow Cytometry and Sorting," in *The Microflow Cytometer*, Pan Stanford Publishing, 2010.
- [56] T. Caspersson and J. Schultz, "Nucleic acid metabolism of the chromosomes in relation to gene reproduction [11]," *Nature*, vol. 142, no. 3589. Nature Publishing Group, pp. 294–295, 1938.
- [57] T. H. MILROY, "Histology of the Blood: Normal and Pathological," *Nature*, vol. 62, no. 1609, pp. 410–411, Aug. 1900.
- [58] M. J. Fulwyler, "Electronic separation of biological cells by volume," *Science (80-.)*, vol. 150, no. 3698, pp. 910–911, 1965.
- [59] M. A. Van Dilla, T. T. Trujillo, P. F. Mullaney, and J. R. Coulter, "Cell microfluorometry: A method for rapid fluorescence measurement," *Science (80-.)*, vol. 163, no. 3872, pp. 1213–1214, 1969.
- [60] L. A. Kamensky, M. R. Melamed, and H. Derman, "Spectrophotometer: New instrument for ultrarapid cell analysis," *Science (80-.)*, vol. 150, no. 3696, pp. 630–631, 1965.

- [61] H. R. Hulett, W. A. Bonner, J. Barrett, and L. A. Herzenberg, "Cell sorting: Automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence," *J. Immunol.*, vol. 193, no. 5, pp. 2045–2047, Sep. 2014.
- [62] W. A. Bonner, H. R. Hulett, R. G. Sweet, and L. A. Herzenberg, "Fluorescence activated cell sorting," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 43, no. 3, pp. 404–409, 1972.
- [63] L. A. Herzenberg, "FACS innovation: a view from Stanford.," *Clin. Invest. Med.*, vol. 27, no. 5, pp. 240–52, Oct. 2004.
- [64] D. F. Gebhard, A. Mittelman, C. Cirrincione, H. T. Thaler, and B. Koziner, "Comparative analysis of surface membrane immunoglobulin determination by flow cytometry and fluorescence microscopy.," *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 34, no. 4, pp. 475–481, Apr. 1986.
- [65] A. Scheffold and F. Kern, "Recent developments in flow cytometry.," *J. Clin. Immunol.*, vol. 20, no. 6, pp. 400–7, Nov. 2000.
- [66] M. Rieseberg, C. Kasper, K. F. Reardon, and T. Scheper, "Flow cytometry in biotechnology," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 56, no. 3–4, pp. 350–360, 2001.
- [67] RDQM, *Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components.* .
- [68] S. Dzik, "Principles of counting low numbers of leukocytes in leukoreduced blood components," *Transfus. Med. Rev.*, vol. 11, no. 1, pp. 44–55, Jan. 1997.
- [69] P. van der Meer and R. Pietersz, "Processing and storage of blood components: strategies to improve patient safety," *Int. J. Clin. Transfus. Med.*, vol. 3, p. 55, Aug. 2015.
- [70] C. NAEGELEN, N. PELLEGRINI, J. M. SEGIER, N. MARPAUX, and F. BEAUJEAN, "Validation of a simple method to count very low white cell concentrations in filtered red cells or platelets," *Transfusion*, vol. 32, no. 6, pp. 565–571, Jul. 1992.
- [71] W. H. Dzik, "Large-volume hemocytometer chamber for accurate counting of white cells (WBCs) in WBC-reduced platelets: validation and application for quality control of WBC-reduced platelets prepared by apheresis and filtration," *Transfusion*, vol. 33, no. 5, pp. 409–412, May 1993.
- [72] M. P. Busch, R. Stromberg, J. Heitman, and K. Tran, "Quantitation of residual white cells in filtered blood components by polymerase chain reaction amplification of HLA DQ-A DNA," *Transfusion*, vol. 34, no. 11, pp. 986–994, 1994.
- [73] R. Barclay *et al.*, "Flow cytometric determination of residual leucocytes in filter-depleted blood products: An evaluation of Becton-Dickinson's LeucoCOUNT system," *Transfus. Sci.*, vol. 19, no. 4, pp. 399–403, 1998.
- [74] E. R. Burns, V. Lee, and W. K. Miller, "A rare-event analysis model for quantifying white cells in white cell- depleted blood," *Transfusion*, vol. 31, no. 2, pp. 156–159, Feb. 1991.
- [75] M. R. Adams, D. K. Johnson, M. P. Busch, C. T. Schembri, T. P. Hartz, and W. A. Heaton, "Automatic volumetric capillary cytometry for counting white cells in white cell-reduced plateletpheresis components," *Transfusion*, vol. 37, no. 1, pp. 29–37, Jan. 1997.

- [76] P. Rebutta and W. H. Dzik, "Multicenter Evaluation of Methods for Counting Residual White Cells in Leukocyte-Depleted Red Blood Cells," *Vox Sang.*, vol. 66, no. 1, pp. 25–32, Jan. 1994.
- [77] D. Prati *et al.*, "Multicenter evaluation of the 3% paraformaldehyde method for white cell counting in leukocyte-reduced red blood cells. BEST (Biomedical Excellence for Safer Transfusion) Working Party of the International Society of Blood Transfusion," *Vox Sang.*, vol. 70, no. 4, pp. 241–245, 1996.
- [78] P. F. Van Der Meer *et al.*, "Comparison of five platforms for enumeration of residual leucocytes in leucoreduced blood components," *Br. J. Haematol.*, vol. 115, no. 4, pp. 953–962, Dec. 2001.
- [79] P. Szufiad and W. H. Dzik, "A general method for concentrating blood samples in preparation for counting very low numbers of white cells," *Transfusion*, vol. 37, no. 3, pp. 277–283, Mar. 1997.
- [80] S. Dzik, G. Moroff, and L. Dumont, "A multicenter study evaluating three methods for counting residual WBCs in WBC-reduced blood components: Nageotte hemocytometry, flow cytometry, and microfluorometry," *Transfusion*, vol. 40, no. 5, pp. 513–520, May 2000.
- [81] S. Dzik, G. Moroff, and L. Dumont, "A multicenter study evaluating three methods for counting residual WBCs in WBC-reduced blood components: Nageotte hemocytometry, flow cytometry, and microfluorometry," *Transfusion*, vol. 40, no. 5, pp. 513–520, May 2000.
- [82] T. Tonn, M. Schmidt, H. P. Spengler, B. Lambrecht, M. K. Hourfar, and E. Seifried, "A new one-platform flow cytometric method for residual cell counting in platelet concentrates," *Transfusion*, vol. 49, no. 12, pp. 2604–2611, Dec. 2009.
- [83] J. D. Roback and AABB., *Technical manual*. AABB, 2011.
- [84] J. Martin Bland and D. G. Altman, "STATISTICAL METHODS FOR ASSESSING AGREEMENT BETWEEN TWO METHODS OF CLINICAL MEASUREMENT," *Lancet*, vol. 327, no. 8476, pp. 307–310, Feb. 1986.
- [85] L. J. Dumont and D. F. Dumont, "Enhanced flow cytometric method for counting very low numbers of white cells in platelet products," *Cytometry*, vol. 26, no. 4, pp. 311–316, Dec. 1996.
- [86] L. J. Dumont, "Sampling errors and the precision associated with counting very low numbers of white cells in blood components," *Transfusion*, vol. 31, no. 5, pp. 428–432, Jun. 1991.