

Plasmas unitaires viro-inactivés à usage thérapeutique produits par une méthode combinée de déplétion cellulaire et de photo-oxydation par le Bleu de Méthylène.

Résumé

Depuis 2004, le Service du Sang de la Croix-Rouge de Belgique, en accord avec la législation belge et les recommandations du Conseil Supérieur de la Santé (CSS – avis 8339), met à la disposition des patients du plasma frais congelé viro-inactivé. Ce plasma est obtenu à partir de dons **unitaires** et traité par déplétion cellulaire ainsi que par photo-oxydation au Bleu de Méthylène activé par l'absorption d'énergie lumineuse. Ce procédé permet la dénaturation irréversible des acides nucléiques et de certaines protéines avec pour résultat une inhibition de la réplication virale.

La technique comprend une étape de filtration permettant une déplétion de plus de 90% du Bleu de Méthylène et de ses résidus photochimiques.

Les paramètres de coagulation sont significativement affectés par le procédé mais restent dans les normes physiologiques.

Les indications transfusionnelles sont reprises dans l'Arrêté Royal du 23 novembre 2006.

Les avantages sont essentiellement liés à la qualification « **unitaire** » du produit, à la sélection **des donneurs volontaires et non rémunérés prélevés en Belgique**, à la déplétion cellulaire du plasma, et au dépistage des marqueurs infectieux réalisés in vitro.

Les études d'hémovigilance ne montrent pas d'effet secondaire spécifique.

1. Définition : Plasma Frais Congelé (PFC)

Composant sanguin préparé soit à partir de sang total soit à partir de plasma recueilli par aphérèse, congelé dans un laps de temps défini et à une température propre à maintenir fonctionnels les facteurs de coagulation labiles.

Une unité provient **d'un seul donneur volontaire et non rémunéré, prélevé en Belgique** (CSS – avis 8094), contrairement au plasma frais congelé viro-inactivé par une méthode Solvant/Détergent qui provient d'un « pool » de plasmas issus de plusieurs centaines de donneurs. Ce dernier est enregistré comme spécialité pharmaceutique.

2. Principe et intérêt du traitement du PFC par le Bleu de Méthylène (BM)

La sécurité virale du plasma à usage thérapeutique est un objectif affirmé de la Santé Publique. Actuellement en Europe, il existe différentes méthodes reconnues pour sécuriser le plasma. Historiquement « La quarantaine », c'est-à-dire le stockage du plasma jusqu'à la réalisation des tests sur le prélèvement sécurisé suivant du donneur, a été largement utilisée. Par la suite, le traitement physico-chimique de pools de plasma par Solvant/Détergent a fait son apparition. Cependant depuis quelques années, plusieurs méthodes de traitement du plasma unitaire basées sur l'activation d'une molécule photosensible par une énergie lumineuse sont disponibles. C'est le cas de la technique de viro-inactivation par le Bleu de Méthylène (BM).

Cette méthode est réalisée suivant un protocole standardisé basé sur l'utilisation d'un dispositif à usage unique. Le plasma est tout d'abord filtré pour éliminer les cellules résiduelles puis est additionné de BM. Le plasma est ensuite soumis à une source lumineuse. La dernière étape consiste à éliminer le BM résiduel et ses produits de dégradation à l'aide d'un filtre permettant leur absorption.

Le BM est une phénothiazine et présente une affinité pour les acides nucléiques. Après absorption d'énergie lumineuse, il y a production de formes actives d'oxygène qui dénaturent de manière irréversible les acides nucléiques et certaines protéines ce qui inhibe la réplication virale. Ce procédé est particulièrement efficace contre les virus enveloppés.

C'est un colorant dont il n'a pas été rapporté de toxicité en usage clinique à des concentrations plasmatiques incomparablement supérieures à celle qui est utilisée pour la viro-inactivation du plasma. La sécurité du produit est néanmoins renforcée par l'adsorption du BM en fin de traitement.

La méthode présentée a les avantages d'un traitement efficace appliqué sur du plasma unitaire, permettant d'obtenir un plasma viro-inactivé à usage thérapeutique, ce qui réduit considérablement la diffusion potentielle de pathogènes à de nombreux receveurs, et à titre individuel, le nombre de donneurs pour un receveur donné.

3. Efficacité du traitement par le BM sur les virus

L'enveloppe lipidique des virus enveloppés possède une haute affinité pour le BM qui est, dès lors, localement concentré et rend ces virus très sensibles à l'inactivation. Il s'agit principalement des virus HIV, HBV, HCV. Néanmoins certains virus non enveloppés montrent également une bonne sensibilité, principalement le parvovirus B19 qui peut provoquer des complications graves chez la femme enceinte et le nouveau né.

Des essais employant la technique de PCR montrent après traitement au BM, l'élimination directe de HIV, HBV, HCV et parvovirus B19 d'unités infectées [D'Antonio 1999, Iudicone 1999].

Tableau 1 : Résultats de la réduction virale [Williamson et al., 2003].

Enveloppe lipidique		Enveloppe non-lipidique	
Virus	Log réduction	Virus	Log réduction
HIV	> 5,5	HAV	0
BVDV (modèle HCV)	> 6,2	Encephalomyocarditis	0
DHBV (modèle HBV)	3,9	Porcine parvovirus	0
Influenza	5,1	Polio	0
Pseudorabies	5,4	SV40	4,3
Herpes Simplex	> 6,5	Adenovirus	4
Vesicular Stomatitis	> 4,9	Human parvovirus B19	> 4
West Nile virus	> 6,5	Calicivirus (modèle HEV)	> 3,9

*La réduction virale s'exprime en logarithme de réduction

Il semblerait également que le BM activé par la lumière, pourrait prévenir la transmission de la maladie de Chagas provoquée par le Trypanosome Cruzi [Gironés et al., 2006].

4. Technique d'inactivation par le BM utilisée au Service du Sang

a) Préliminaires

La technique de traitement du plasma par le BM pour l'inactivation virale a été développée en Allemagne au début des années 90 par l'Institut Springe. Cette technique utilisait la congélation et la décongélation du plasma pour en lyser les cellules résiduelles et permettre ainsi l'accès du BM aux pathogènes intracellulaires.

Le développement de filtres spécifiques pour le plasma a permis de remplacer l'étape de congélation – décongélation par une étape de déplétion cellulaire par filtration du plasma avant traitement par le BM. De plus l'absorption finale du BM par filtration a été une évolution décisive dans le regain d'intérêt pour cette technique. Le Service du Sang utilise depuis 2004 la technique « Theraflex® – Plasma Bleu de Méthylène » (Marquage CE de Classe III) de la société MacoPharma.

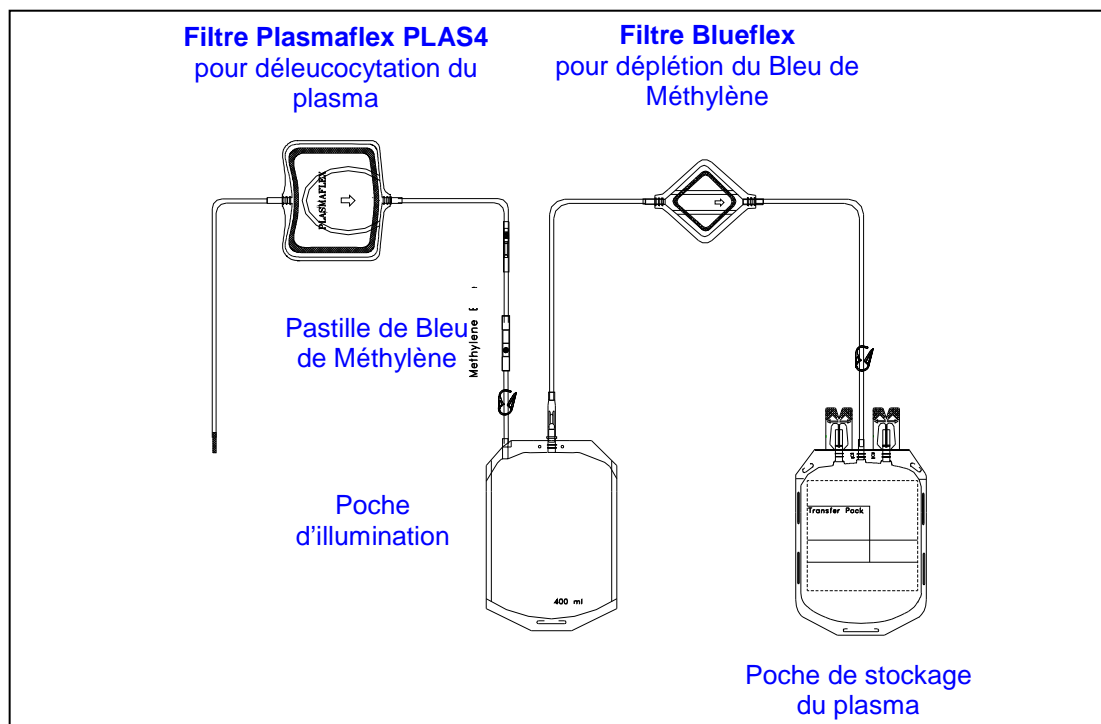


Figure 1 : Schéma du dispositif utilisé pour le procédé de viro-inactivation par photo-oxydation BM.

b) Etapes de production

1. Sélection des plasmas : plasmas de sang total ou d'aphérèse de donneurs prélevés en Belgique.

Le plasma provient de donneurs n'ayant aucun antécédent de transfusion, ni de grossesses chez les femmes. La majorité des plasmas provient de donneurs masculins. Cette sélection est importante pour réduire le risque de TRALI (Transfusion Related Acute Lung Injury) [Beckman et al.,2004].

2. Connexion stérile du plasma au dispositif de traitement
3. Filtration du plasma avec le filtre PLAS4 (pores de $0,65\mu\text{m}$) intégré dans le dispositif pour une déplétion cellulaire.
4. Dissolution de la pastille de BM ($85\mu\text{g}$) pour obtenir une concentration moyenne finale de $1\mu\text{M}$ ($0,84 - 1,13\mu\text{M}$).
5. Illumination par des lampes à sodium de 590 nm pendant 20 à 25 minutes qui délivrent une dose de 180 J/cm^2 .
6. Filtration du plasma traité pour une déplétion de plus de 90% du BM et de ses résidus photochimiques.
7. Congélation rapide des plasmas à -30°C en moins d'une heure.

Le volume final des plasmas viro-inactivés par cette méthode, est compris entre 200 et 300 mL avec une moyenne de 239 ± 16 mL.

La couleur du plasma peut varier suivant les unités de jaune à verdâtre, de même son aspect peut être limpide à plus ou moins trouble.

c) Transport

La température de conservation doit être maintenue durant le transport. L'hôpital de réception doit vérifier que les poches sont restées congelées pendant le transport. Excepté s'il est prévu de les utiliser immédiatement, les poches doivent être transférées sans délai dans un lieu de conservation où règne la température recommandée.

d) Conservation et stabilité (Arrêté Royal du 4 avril 1996)

La température optimale de conservation est égale ou inférieure à -25°C . La stabilité dépend de la température de stockage :

- 1 an à -30°C ,
- 6 mois à -25°C ,
- 3 mois à une température comprise entre -18°C et -25°C .

5. Effet du traitement BM sur les protéines plasmatiques - Comparaison des données de la littérature avec les résultats de l'étude du Service du Sang

Les résultats obtenus sont comparables à ceux décrits dans la littérature à ce sujet bien que, dans la majorité des publications, les techniques de viro-inactivation utilisées soient parfois un peu différentes (voir Tableau 2).

Toutes les valeurs observées restent dans les normes physiologiques et respectent celles fixées par la législation belge. Les paramètres biochimiques et chimiques étudiés ne sont pas affectés par le traitement.

La protéase ADAMTS-13 du facteur von Willebrand a été recherchée et est toujours active après viro-inactivation par le BM. Ceci a également été confirmé dans la littérature [del Rio-Garma et al., 2008].

Tableau 2 : Comparaison des résultats de l'étude du Service du Sang avec les données de la littérature

Paramètres	Résultats* PFC - BM	Valeurs normales	Résultats PFC - BM dans les études publiées
Fibrinogène (FI) (Clauss) (g/L)	1.91 ± 0.31	1.50 - 4.50	2.01 ⁷ , 1.65 ⁵¹ , 1.57 ⁵⁸ , 1.80 ¹⁰⁶ , 2.05 ⁵ , 1.85 ⁸⁷ , 2.07 ¹⁹ , 2.11 ¹⁷ , 1.97 ⁴⁰ , 2.00 ⁹⁶
Prothrombine (FII) (U/mL)	0.96 ± 0.07	0.7 - 1.3	1.00 ⁷ , 1.15 ⁵¹ , 1.37 ⁵⁸ , 1.05 ¹⁰⁶ , 0.95 ⁸⁹
Facteur V (U/mL)	0.86 ± 0.15	0.7 - 1.3	0.79 ⁷ , 0.84 ⁵¹ , 0.79 ⁵⁸ , 0.73 ¹⁰⁶ , 0.75 ⁸⁹ , 0.84 ¹⁸ , 0.76 ⁴⁰
Facteur VII (U/mL)	0.98 ± 0.12	0.7 - 1.3	0.90 ⁷ , 1.10 ⁵¹ , 1.04 ⁵⁸ , 0.90 ¹⁰⁶ , 0.81 ⁸³ , 1.02 ⁹⁶
Facteur VIII (U/mL)	0.74 ± 0.19	0.5 - 1.5	0.58 ⁷ , 0.78 ⁵¹ , 0.58 ⁵⁸ , 0.58 ¹⁰⁶ , 0.60 ⁵ , 0.85 ⁸⁷ , 0.55 ⁸⁹ , 0.70 ¹⁹ , 0.88 ¹⁸ , 0.83 ⁴⁰ , 0.66 ⁹⁶
Facteur IX (U/mL)	1.15 ± 0.14	0.5 - 1.5	0.72 ⁷ , 1.00 ⁵¹ , 0.55 ⁵⁸ , 0.62 ⁸⁹ , 0.88 ⁴⁰
Facteur X (U/mL)	1.02 ± 0.16	0.7 - 1.3	0.90 ⁷ , 1.05 ⁵¹ , 1.03 ⁵⁸ , 0.88 ⁸⁹
Facteur XI (U/mL)	0.76 ± 0.15	0.7 - 1.3	0.73 ⁷ , 1.00 ⁵¹ , 1.30 ⁵⁸ , 0.84 ⁴⁰ , 0.52 ⁹⁶
Antithrombine (U/mL)	0.94 ± 0.08	0.7 - 1.3	1.00 ⁷ , 0.78 ⁵¹ , 1.05 ⁵⁸ , 0.95 ¹⁰⁶ , 0.82 ⁸⁹ , 0.96 ⁴⁰
Protéine C (U/mL)	0.96 ± 0.11	0.7 - 1.3	1.03 ¹⁰⁶ , 0.93 ⁸⁹ , 0.89 ⁴⁰
Protéine S (U/mL)	1.12 ± 0.19	0.7 - 1.3	1.11 ¹⁰⁶ , 1.02 ⁸⁹ , 0.99 ¹⁰⁴
Temps de prothrombine (sec)	13.1 ± 0.6	11 - 15	12.3 ¹⁰⁶ , 18.6 ⁸⁷
INR	1.08 ± 0.05	0.9 - 1.3	
Temps de céphaline activée ou APTT (sec)	34.1 ± 2.3	23 - 35	39.8 ¹⁰⁶ , 44 ⁸⁷ , 40 ⁹⁶
Fragments 1+2 de la prothrombine (nM/L)	1.220 ± 0.231	0.4 - 1.4	
Protéines Totales (g/L)	59 ± 3		56 ¹⁰⁶
Albumine (g/L)	36 ± 2		37 ¹⁰⁶
K+ (mMol/L)	3.2 ± 0.2		

* Résultats exprimés en moyenne ± écart-type

Méthodes utilisées dans les études (numéro des articles dans la bibliographie) :

Springe	Baxter	MacoPharma	?
7, 51, 58, 106	5, 87, 89	17, 18, 40, 96, 104	19

6. Déplétion cellulaire

La double filtration que subit le plasma élimine les cellules résiduelles (globules blancs, globules rouges et plaquettes sanguines). Les études montrent que les limites des méthodes de détection des cellules sont atteintes avec ce traitement [Cardigan et al., 2001 ; Vassort et al., 1998]. Plus de 99% des fragments membranaires sont également retenus par la filtration [Herault et al., 2000]. Nous obtenons ainsi un plasma qui peut être qualifié d'acellulaire.

7. Contrôle Qualité

Des contrôles de qualité sont régulièrement organisés suivant les normes de la législation belge (Arrêté Royal du 1^{er} février 2005). Un dosage du Facteur VIII (FVIII) est réalisé pour s'assurer que son activité dans les plasmas viro-inactivés est supérieur à 50% de celle mesurée dans le plasma avant le traitement. De plus, le contrôle qualité vérifie si le taux de protéines est d'au moins 50 g/L et que le taux de cellules résiduelles (avant la congélation) est inférieur à 6×10^9 /L de globules rouges, à $0,1 \times 10^9$ /L de leucocytes et à 50×10^9 /L de plaquettes.

La récupération du FVIIIc vis-à-vis du plasma fraîchement prélevé est en moyenne de 86% avec un écart type de 6%. Nous avons contrôlé 523 plasmas ce qui représente 2% de notre production (données 2008).

La quantité de FVIIIc présente dans les plasmas viro-inactivés BM est en moyenne de 0,86 U/mL avec un écart type de 0,24 U/mL. La répartition des résultats de FVIIIc en fonction des groupes sanguins ABO est décrite dans le tableau ci-dessous :

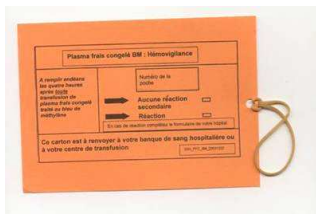
	A	B	AB	O
FVIIIc (U/mL)				
Moyenne	0,90	0,97	0,91	0,75
Ecart type	0,24	0,23	0,23	0,20

Nous avons également contrôlé 368 plasmas viro-inactivé BM en 2008 pour la contamination cellulaire et la quantité en protéines. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

	Moyenne	Écart type
Protéine (g/L)	60,6	3,4
Globules rouges (10^9 /L)	0,0003	0,0001
Leucocytes (10^9 /L)	0,0001	0,0000
Plaquettes (10^9 /L)	0,2263	1,1770

8. Hémovigilance

Lors de l'introduction des plasmas viro-inactivés par le BM, le Service du Sang a mis en place un système de carton d'hémovigilance pour chaque plasma distribué. Ceci a permis de constater que le nombre de réactions transfusionnelles était inférieur à 0,1%.



PFC - BM distribués	Réactions Transfusionnelles*	%*
88107	75	< 0,1 %

*Retours non-systématiques des cartons

Les Cliniques Universitaires Saint-Luc [Deneys et al., 2006] ont comparé les réactions transfusionnelles entre les plasmas traités par Solvant/Détergent et par le BM. Ils n'ont pas mis en évidence d'augmentation significative de réactions transfusionnelles avec les plasmas traités au BM.

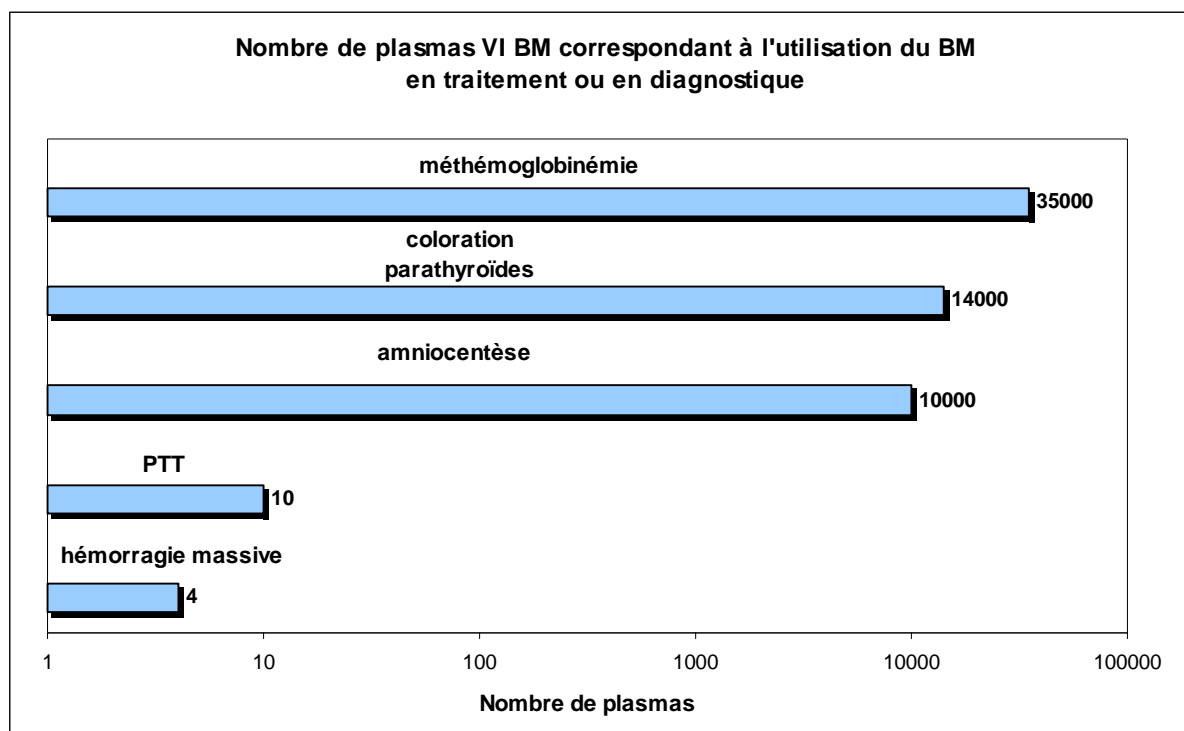
	PFC - Solvant/Détergent	PFC - BM
Période	2003 - 2004	milieu 2004 - 2005
PFC transfusés	5101	5660
Réactions Transfusionnelles	6 (0,12%)	8 (0,14%)

9. Etude toxicologique du BM

Le BM, non activé par la lumière, est utilisé en médecine depuis plus d'un siècle. La principale application clinique du BM était son utilisation comme agent d'oxydoréduction dans les cas de méthémoglobinémie et d'empoisonnement au cyanure en injection intraveineuse de 1 à 5 mg par Kg. Des doses intraveineuses de 2 à 5 mg par Kg ont également été employées pour la neutralisation de l'héparine et pour la coloration pré-opératoire des glandes parathyroïdes [Chapman 1994-1995, Mohr 1995, Lambrecht 1991, Weiding 1999]. Aucun effet secondaire important n'a été rapporté suite à ces traitements.

Par comparaison, le plasma viro-inactivé a une concentration moyenne en BM 10.000 fois moindre. La quantité de BM résiduelle est de l'ordre de 10 µg dans une unité de plasma. Pour un patient de 70 Kg recevant 4 unités de plasma, la dose totale de BM transfusé est d'environ 40 µg, soit 0.6 µg par Kg. Le BM et ses métabolites sont rapidement excrétés par le système urinaire endéans les 2 à 3 jours [Chapman 1994].

Quelques effets secondaires sont rapportés pour des fortes concentrations de BM (de 10 à 200 mg) dans le cadre de l'utilisation du BM comme indicateur d'une rupture de la membrane pendant une amniocentèse [Porat 1996, Cragan 1999].



Le traitement BM ne provoque pas de formation de néo-antigènes [Mohr 1992, Tissot 1994].

Entre 1992 et 1998, plus d'un million d'unités de plasmas BM (sans absorption du BM) ont été transfusées en Allemagne, en Suisse et en Autriche sans qu'il ne fût jamais décrit d'effets secondaires spécifiques [Weiding 1992]. Cette technique de viro-inactivation est utilisée depuis plusieurs années en Espagne, en Grande Bretagne et en Italie, et aucun effet toxique n'a été rapporté.

10. Indications

Le plasma ne peut être utilisé pour restaurer la volémie. Ses principales indications sont les troubles de la coagulation.

Le plasma humain frais congelé viro-inactivé n'est remboursé que dans les indications suivantes (A.R. du 23 novembre 2006) :

- Déficits isolés en facteurs de coagulation V ou XI
- Accident hémorragique massif dû au surdosage en anti-vitamines K quand le traitement par vitamine K est insuffisant
- Hémorragies massives avec déficit combiné de facteurs de coagulation ou après thrombolyse
- Purpura thrombotique thrombocytopénique (Moschowitz)
- Exsanguino-transfusion néonatale pour incompatibilité ABO

Contre-indication formelle : Malade porteur d'anticorps anti-IgA.

11. Données cliniques

En Europe, plusieurs millions d'unités ont été transfusées avec succès dans différentes pathologies (déficit en Facteur V, déficit en Facteur XI, purpura thrombotique thrombocytopenique, transfusions de nouveau-nés).

La fréquence des réactions transfusionnelles ne diffère pas de celle connue pour les PFC. De plus, aucune plainte de diminution d'efficacité transfusionnelle du plasma viro-inactivé par le BM n'a été enregistrée [Pohl 1994, 1996 et 1998]. Köhler et Wieding (1996 et 1999) ont mené une étude comparative entre le plasma traité par le BM et le plasma traité par Solvant/Détergent sur 70 patients de chirurgie cardiaque. Ils n'ont pas observé de différence clinique entre les 2 types de plasmas. En outre, dans les plasmas BM, la protéine S et l'alpha 2-antiplasmine sont mieux conservés [Cardigan et al., 2002 ; Zeiler et al., 1994].

Ramila (2001) décrit une réponse similaire avec des plasmas viro-inactivés par le BM par rapport aux PFC dans le traitement du purpura thrombotique thrombocytopenique.

Cependant, des résultats contradictoires ont été observés avec le plasma viro-inactivé par le BM dans cette affection [Alvarez-Larran et al., 2004 ; de la Rubia et al., 2001]. A l'heure actuelle, il n'y a toujours pas d'explication à ces résultats. En effet, l'activité in vitro de l'ADAMTS-13 ne semble pas significativement différente de celle mesurée dans les PFC [del Rio-Garma et al., 2008].

Castrillo (2000) et Politis (2007), utilisant des plasmas traités avec la technique BM de MacoPharma, n'observent pas d'augmentation de la consommation de plasmas sur 15 mois et 5 ans d'utilisation (respectivement 8000 et 8500 unités transfusées), ni d'augmentation du nombre de réactions transfusionnelles.

Conclusions

La technique de viro-inactivation par déplétion cellulaire et photo-oxydation par le Bleu de Méthylène, permet de fournir du plasma de très grande qualité en termes de facteurs de coagulation. Les études d'hémovigilance ne montrent pas d'effet secondaire spécifique.

Les avantages sont essentiellement liés

- **à la qualification « unitaire » du produit : ce qui permet de réduire considérablement la diffusion potentielle de pathogènes (agent du nvCJD) à de nombreux receveurs, et à titre individuel, le nombre de donneurs pour un receveur donné.**
- **à la sélection des donneurs : le plasma provient de donneurs volontaires et non rémunérés, prélevés en Belgique. Ces donneurs n'ont pas d'antécédent de transfusion, ou de grossesse chez les femmes. Cette sélection est importante pour réduire le risque de TRALI.**
- **à la filtration du produit qui prévient les réactions transfusionnelles attribuées à la présence de leucocytes et retient les éventuels pathogènes intracellulaires.**
- **et aux tests réalisés in vitro : les résultats des contrôles de qualité réalisés sont bien au-dessus des normes exigées par les recommandations internationales.**

Bibliographie

1. Abe H, Yamada-Ohnishi Y, Hirayama J, Owada T, Ikeda H, Ikebuchi K. Elimination of both cell-free and cell-associated HIV infectivity in plasma by a filtration/methylene blue photoinactivation system. *Transfusion*, 2000; 40: 1081-1087.
2. Alvarez-Larran A, Del Rio J, Ramirez C, Albo C, Pena F, Campos A, Cid J, Muncunill J, Sastre J-L, Sanz C, Pereira A. Methylene blue-photoinactivated plasma vs fresh-frozen plasma as replacement fluid for plasma exchange in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Vox Sang*, 2004; 86: 246-251.
3. Atance R, Pereira A, Ramirez B. Transfusing methylene blue-photoinactivation plasma instead of FFP is associated with an increased demand for plasma and cryoprecipitate. *Transfusion*, 2001; 41: 1548-1552.
4. AuBuchon JP, Pickard C, Herschel L, O'Connor JL, Lee E. Removal of methylene blue from plasma via an adsorbent filter. *Vox Sang*, 1998; 74: 1-6.
5. Aznar JA, Molina R, Montoro JM. Factor VIII / von Willebrand factor complex in methylene blue-treated fresh plasma. *Transfusion*, 1999; 39: 748-750.
6. Aznar JA, Montoro JM, Cid AR, Bonanad S, Hurtado C, Soler MA, De Miguel A. Clotting factors in cryoprecipitate and cryosupernatant from MB-treated fresh plasma. *Transfusion*, 2000; 40: 493.
7. Aznar JA, Bonanad S, Montoro JM, Hurtado C, Cid AR, Soler M A, De Miguel A. Influence of methylene blue photoinactivation treatment on coagulation factors from Fresh Frozen Plasma, cryoprecipitates and cryosupernatants. *Vox Sang*, 2000; 79: 156-160.
8. Bachmann B, Redecker-Klein A, Mohr H. Influence of methylene blue/light treatment on RNA of HGV and other flaviviruses in human plasma. *Vox Sang*, 1998; 74 (Suppl 1):1294.
9. Baech J, Joergensen J, Salaod J, Soerensen H. Production and use of FFP-viral inactivated with methylene blue. *Vox Sang*, 1998; 74 (Suppl 1):1291.
10. Baeten M, Rapaille A, Donnay D, Van der Beek M, Sondag D, Vanderkerckove P. The effect of methylene blue inactivation of whole blood plasma on Fc VIII related to storage time. *Vox Sang*, 2004; 87 (Suppl 3), 72.
11. Barz D, Budde U, Hellstern P. Therapeutic plasma exchange and plasma infusion in thrombotic microvascular syndromes. *Thromb Res*, 2002; 107: S23-S27.
12. Beckman N, MacLennan S, Ashford M, Edmondson D. Male only fresh frozen plasma to reduce risk of transfusion-related acute lung injury. *Vox Sang*, 2004; 87 (Suppl 3): 143.
13. Cardigan R, Lawrie AS, Garwood M, Beard M, Purdy G, Mackie IJ, Williamson LM. The effect of methylene blue treatment on fibrinogen assays. *Transf Clinique Biologique*, 2001; 8 (Suppl 1): P142.
14. Cardigan R, Sutherland J, Garwood M, Krailadsiri P, Seghatchian J, Berad M, Beckman N, Williamson L. The effect of leucocyte depletion on the quality of fresh-frozen plasma. *Br J Haematol*, 2001; 114: 233-240.
15. Cardigan R, Allford S, Williamson L. Levels of von Willebrand factor-cleaving protease are normal in methylene blue treated fresh frozen plasma. *Br J Haematol*, 2002; 117: 253-254.
16. Cardigan R, Garwood MI, Hornsey V, Williamson LM, Prowse CV. Effect of freeze-thawing, leukocyte depletion, methylene blue(MB) treatment and removal on the quality of FFP. *Vox Sang*, 2002; 83 (Suppl 2): 190.

17. Castrillo A, Eiras A, Casro A, Areal C, Adelantado M, Cid J, Flores J, Solla E, Garcia-Villaescusa R. Evaluation of methylene blue treated plasma. *Vox Sang*, 2000; 78 (Suppl 1): P545.
18. Castrillo A, Eiras A, Castro A, Adelantado M, Areal C, Cid J, Flores J, Solla E, Garcia-Villaescu R. A new evaluation of methylene blue treated plasma. *Transf Clinique Biologique*, 2001; 8 (Suppl 1): 103S.
19. Castro E, Barea L, Gonzalez R, Bueno JI. Impact of quarantine and methylene blue/light treatment on plasma quality, *Transfusion*. 1998; 38 (Suppl): S86.
20. Castro E, Barea L, Gonzalez R, Bueno JI. Quality parameters of cryoprecipitate (Cryo) from quarantine or methylene blue/light treated plasma. *Transfusion*, 1998; 38 (Suppl): S87.
21. Chapman J. Virus inactivation of plasma by methylene blue photoinactivation: approaches and toxicology. *Transfusion Today*, 1994; 20: 2-4.
22. Chapman J. Viral inactivation of plasma by methylene blue photoinactivation: virology and plasma protein overview. *Transfusion Today*, 1995; 22: 2-5.
23. Chapman J, Sun C, D'Silva E. Viral inactivation of single donor units of fresh and frozen plasma using methylene blue (MB) and a high intensity light source. *Transfusion*, 1995; 35 (Suppl 1): S49.
24. Chapman J, Leuschner J. Photodynamic viral inactivation of plasma with methylene blue: in vivo efficacy and safety assessment. *Vox Sang*, 1996; 70 (Suppl 1): 25.
25. Chapman J, Swallow M, Sun C, Carpenter W, Hanley K, Stark P, Larsen D, Buchholz DH. Viral inactivation of single donor units of FFP using a second generation methylene blue photoinactivation system. *Vox Sang*, 1998; 74 (Suppl 1): 1287.
26. Cragan JD. Teratogen update : Methylene Blue. *Teratology*, 1999; 60: 42-48.
27. D'Antonio D, Di Gianfilippo R, Iacone A, Bonfini T. Methylene blue and high intensity light source inducing HCV RNA PCR negativity in plasma of two HCV positive patients. *Transfusion*, 1999; 39 (Suppl): 24S.
28. de la Rubia J, Arragia F, Linares D, et al. Role of methylene blue-treated or fresh frozen plasma in the response to plasma exchange in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*, 2001; 114: 721-723.
29. de la Rubia J, Arriaga F, Camps A, Linares D, Lorente P, Carpio N, Marty ML. Comparative study of the use of fresh frozen plasma with or without methylene blue photoinactivation treatment for the management of patients with Thrombotic Thrombocytopenic Purpura . *Transf Clinique Biologique*, 2001 ; 8 (Suppl 1): P229.
30. del Rio-Garma J, Pereira A, Arroyo JL, Mateo J, Alvarez-Larrán A, Martinez C, Barbolla L. ADAMTS-13 activity and von Willebrand factor levels in methylene blue photo-inactivated plasma processed by either the Springle method or an 'in house' system. *Vox Sang*, 2008; 95: 101-105.
31. Deneys V, Latinne D, Guerrieri C, Baele P. Three years haemovigilance of methylene blue-treated fresh frozen plasma : no increase in transfusion reaction incidence. *Vox Sang*, 2006; 91 (Suppl 3): P502.
32. Depasse F, Seghatchian J, Sensebe L, Andreu G, Samama MM. The influence of methylene blue-light treatment on fibrinogen activity and fibrin polymerization. *Vox Sang*, 2004; 87 (Suppl 3): 119.
33. Equitani F, Mistretta G, Hortencio de Medeiros M, Mele I, Paladini U, Filoni V, Pezone F, Moroni S, Ciarli M, Menichella G. MB-photoinactivated FFP is effective and safe for treatment of coagulopathies and bleeding disorders. *Vox Sang*, 2004; 87 (Suppl 3): 72.

34. Furlan M, Robles R, Galbusera M, Remuzzi G, Kyrle PA, Brenner B, Krause M, Scharrer I, Aumann V, Mittler U, Solenthaler M, Lämmli B. Von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med*, 1998; 339: 1578-1584.
35. Garwood M, Cardigan RA, Drummond O, Hornsey VS, Turner CP, Young D, Williamson LM, Prowse CV. The effect of methylene blue photoinactivation and methylene blue removal on the quality of fresh-frozen plasma. *Transfusion*, 2003; 43: 1238-1247.
36. Gironés N, Bueno JL, Carrión J, Fresno M, Castro E. The efficacy of photochemical treatment with methylene blue and light for the reduction of *Trypanosoma cruzi* in infected plasma. *Vox Sang*, 2006; 91: 285-291.
37. Hellstern P, Haubelt H. Manufacture and composition of fresh frozen plasma and virus-inactivated therapeutic plasma preparation: correlation between composition and therapeutic efficacy. *Thromb Res*, 2002; 107: S2-S8.
38. Herauld O, Binet C. Membrane fragments depletion: a study of two plasma filters efficiency. *Transfusion*, 2000; 40 (Suppl 1):70.
39. Hornsey V, Krailadsiri P, MacDonald S, Seghatchian J, Williamson LM, Prowse V. Coagulation factor content of cryoprecipitate prepared from methylene blue light virus-inactivated plasma. *Br J Haematol*, 2000; 109: 665-670.
40. Hornsey V, Drummond O, Young D, Docherty A, Prowse C. A potential improved approach to methylene blue virus inactivation of plasma: the Maco Pharma Maco-tronic system. *Vox Sang*, 2000; 78 (Suppl 1): P538.
41. Hornsey VS, Drummond O, Young D, Docherty A, Prowse CV. A potentially improved approach to methylene blue virus inactivation of plasma: the MacoPharma Maco-Tronic system. *Transfusion Medecine*, 2001; 11: 31-36.
42. Hornsey V, Young D, Prowse CV. Cryoprecipitate prepared from plasma treated with methylene blue using the MacoPharma Maco-tronic system. *Transf Clinique Biologique*, 2001; 8 (Suppl 1): P140.
43. Hornsey V, Young D, Prowse C. Cryoprecipitate prepared from methylene blue-treated fresh plasma. *Transfusion*, 2001; 41: 151-152.
44. Horowitz B. Pathogen inactivated transfusion plasma: existing and emerging methods. *Vox Sang*, 2002; 83 (Suppl 1): 429-436.
45. Inada Y, Hessel B, Blomback B. Photooxidation of fibrinogen in the presence of methylene blue and its effect on polymerisation. *Biochim Biophys Acta*, 1978; 532: 161-170.
46. Iudicone P, Andreoni M, Lavorino C, Martorana MC, Nicastrì E, Azzi A, Qunitiliani L. Photodynamic treatment of Fresh Frozen Plasma by methylene blue: effect on HIV, HCV and Parvovirus B19. *Infusion Therapy and Transfusion Medicine*, 1999; 26: 252-256.
47. Kavallierlou L, Hantziaras S, Politis C, Richardson CL. Comparison of cytokines IL6, IL8 and GM-CSF serum concentrations and coagulation factor I, V, VII activities before and after viral inactivation of leukodepleted Fresh Frozen Plasma using methylene blue and illumination. *Transf Clinique Biologique*, 2001; 8 (Suppl 1): P158.
48. Knüver-Hopf J, Redecker-Klein A, Mohr H. No evidence of protein alteration in thionine treated platelet concentration revealed by gel electrophoretic investigation. *Vox Sang*, 1998; 74 (Suppl 1): 1303.
49. Knüver-Hopf J, Vogt I, Mohr H. The influence of photodynamic treatment on the genome and the infectivity of Parvovirus B19. *Transf Clinique Biologique*, 2001; 8 (Suppl 1): P141.

50. Köhler M, Wieding JU, Niehues A, Zenker D, Rathgeber J, Sonntag H, Kettler D, Dalichau H. Efficacy and tolerance of methylene blue/light (MB-VIP) versus solvent/detergent virus-inactivated plasma (SD-VIP) in cardiac surgery: clinical results of a prospective, randomized study. *Vox Sang*, 1996; 70 (Suppl 1): 121.
51. Lambrecht B, Mohr H, Knüver-Hopf J, Schmitt H. Photoinactivation of viruses in human Fresh Frozen Plasma by phenothiazine dyes in combination with visible light. *Vox Sang*, 1991; 60: 207-213.
52. Lambrecht B, Norley SG, Kurth R, Mohr H. Rapid inactivation of HIV-1 in single donor preparations of human Fresh Frozen Plasma by methylene blue/light treatment. *Biologicals*, 1994; 22: 227-231.
53. Lambrecht B, Selz A, Herms O, Marks F, Mohr H. Stability testing of Fresh Frozen Plasma after photodynamic virus inactivation (MB-/light treatment) during a 27-month storage period. *Infusionsther Transfusionsmed*, 1997; 24: 290.
54. Lambrecht B, Mohr H, Dalle V, Goudaliez F, Walker WH. Virus inactivation of fresh frozen plasma using a blood bag system with integrated methylene blue and plasma filter. *Vox Sang*, 1998; 74 (Suppl 1): 1286.
55. Lambrecht B, Mohr H. Influence of haemoglobin on photodynamic virus inactivation during methylene blue/light treatment of FFP. *Vox Sang*, 1998; 74 (Suppl 1): 1293.
56. Lambrecht B, Mohr H, Goudaliez F, Walker WH. Validation of virus inactivation in human plasma using blood bag system MB959D and Maco-tronic illumination device. *Vox Sang*, 2000; 78 (Suppl 1): P544.
57. Lorenz M, Müller M, Jablonka B, Vigh T, Kirchmaier CM. High doses of methylene blue/light treatment crosslink the α -subunit of fibrinogen: influence of this photooxidation on fibrinogen binding to platelets. *Haemostasis*, 1998; 28: 17-24.
58. Mohr H, Knüver-Hopf J, Lambrecht B, Scheidecker H, Schmitt H. No evidence for neoantigens in human plasma after photochemical virus inactivation. *Ann Hematology*, 1992; 65: 224-228.
59. Mohr H, Lambrecht B, Selz A. Photodynamic virus inactivation of blood components. *Immuno Invest*, 1995; 24: 73-85.
60. Mohr H, Bachmann B, Lambrecht B. Methylene blue light treatment of fresh plasma: influence on blood-borne viruses. *Vox Sang* 1996; 70 (Suppl 1): 25.
61. Mohr H, Bachmann B, Klein-Struckmeier A, Lambrecht B. Virus inactivation of blood products by phenothiazine dyes and light. *Photochem Photobiol*, 1997; 65: 441-445.
62. Mohr H, Knüver-Hopf J. Influence of photodynamic treatment on Parvovirus B19. *Infusionstherapie Transfusionsmedizin*, 1999; 26 (Suppl 1): 18.
63. Mohr H. Inactivation of viruses in human plasma. *M Enzymol*, 2000; 319: 207-216.
64. Mohr H. Methylene blue and thionine in pathogen inactivation of plasma and platelet concentrates. *Trans Apheresis Sci*, 2001; 25: 183-184.
65. Mohr H, Oller K, Lambrecht B. Sterilization of platelet concentrates derived from *S. epidermidis* infected buffy coats by treatment with thionine/light and UV-B. *Transf Clinique Biologique*, 2001; 8 (Suppl 1): S13-005.
66. Mohr H, Knüver-Hopf J, Redecker-Klein A. West Nile, Hepatitis C and other Flavivirus are highly sensitive to treatment by phenothiazine dyes and light. *Trans Med and Hemotherapy*, 2003; 30 (Suppl): 16-17.
67. Mohr H, Knüver-Hopf J, Gravemann U, Redecker-Klein A, Müller TH. West Nile virus in plasma is highly sensitive to methylene blue-light treatment. *Transfusion*, 2004; 44: 886-890.

68. Müller T H, Schmidt S, Klein-Struckmeier A, Schunter F. Plasma only after an excessive methylene blue phototreatment inhibits platelet aggregation in vitro. *Transfusion*, 1996; 36 (Suppl): S255.
69. Müller-Breitkreutz K, Mohr H. Hepatitis C and Human Immunodeficiency Virus RNA degradation by methylene blue/light treatment of human plasma. *J Medical Virology*, 1998; 56: 239-245.
70. Pamphilon D. Viral inactivation of Fresh Frozen Plasma. *British J Haematol*, 2000; 109: 680-693.
71. Perrotta PL, Baril L, Tead C, Chapman J, Dindecco D, Buchholz DH, Snyder E L. Effects of methylene blue-treated plasma on red cells and stored platelet concentrates. *Transfusion*, 1999; 39: 63-69.
72. Pereira A. Cost-effectiveness of transfusing virus-inactivated plasma instead of standard plasma. *Transfusion*, 1999; 39: 479-487.
73. Pereira A. Methylene-blue-photoactivated plasma and its contribution to blood safety. *Transfusion*, 2004; 44:948-949. Reply by Williamson L. *Transfusion*, 2004; 44: 950.
74. Pohl U, Mohr H. Virus inactivation of plasma by methylene blue/light exposure: clinical experiences. *Transfusion Today*, 1994; 24: 2-3.
75. Pohl U, Mohr H. Experience in the clinical use of plasma photodynamically virus inactivated by the methylene blue/light procedure. *Vox Sang*, 1996; 70 (Suppl 1): 121.
76. Pohl U, Mohr H, Diekamp U. No unusual adverse reactions after infusion of fresh frozen plasma virus inactivated by methylene blue/light procedure (MB-VIP). *Vox Sang*, 1998; 74 (Suppl 1): 1540.
77. Pohler P, Walker WH, Reichenberg S, Mohr H, Gravemann U, Müller TH. Methylene blue treated plasma: pharmacokinetic and toxicological profile of MB and photoproducts. *Vox Sang*, 2004; 87 (Suppl 3): 119.
78. Politis C, Kavallierou L, Hantziara S, Katsea P, Triantaphylou V, Richardson C, Tsoutsos D, Anagnostopoulos N, Gorgolidis G, Ziroyannis P. Quality and safety of fresh-frozen plasma inactivated and leucoreduced with the Theraflex methylene blue system including the Blueflex filter: 5 years' experience. *Vox Sang*, 2007; 92: 319-326.
79. Porat R, Gilbert S, Magilner D. Methylene blue-induced phototoxicity: an unrecognized complication. *Pediatrics*, 1996; 97: 717-721.
80. Prowse C, Hornsey V, MacDonald S, Walker B, Bethel H, Seghatchian J, Krailaadsiri P, Williamson L. Cryoprecipitate from methylene blue plasma. *Vox Sang*, 1998; 74 (Suppl 1): 1308.
81. Prowse C, Robinson AE. Pathogen inactivation of labile blood components. *Transfusion Medicine*, 2001; 11: 147.
82. Publication du conseil supérieur de la santé n°8094. La sécurisation maximale de la collecte et de la transfusion sanguine.
83. Publication du conseil supérieur de la santé n°8339. La viro-inactivation du plasma frais congelé.
84. Ramila E, Muniz-Diaz E, Martinez C, Montero A, Pastoret C, Madoz P. Use of methylene blue virus-inactivated plasma in the treatment of Trombotic Thrombocytopenic Purpura (TTP). *Transf Clinique Biologique*, 2001; 8 (Suppl 1): S03-004.
85. Rider JR, Winter MA, Payrat JM, Mathias JM, Pamphilon DH. Leucocytes can be eliminated from plasma by filtration prior to viral inactivation with methylene blue. *Vox Sang*, 1998; 74: 209-210.

86. Riggert J, Humpe A, Simson G, Gutensohn K, Köhler M. Reduktion des Gehaltes an Methylenblau (MB) in MB-photooxidiertem Plasma durch Filtration. *Infusion Therapy and Transfusion Medicine*, 1996; 23: 252-255.
87. Riggert J, Humpe A, Legler TJ, Wolf C, Simson G, Köhler M. Filtration of methylene blue-photooxidized plasma: influence on coagulation and cellular contamination. *Transfusion*, 2001; 41: 82-86.
88. Schneider JE, Tabatabaie T, Maitt L, Horning Smith R, Nguyen X, Pye Q, Floyd RA. Potential mechanisms of photodynamic inactivation of virus by methylene blue I. RNA-protein crosslinks and other oxidative lesions in Q beta bacteriophage. *Photochem and Photobiol*, 1998; 67: 350-357.
89. Seghatchian J, Krailadsiri P. What's happening ? The quality of methylene blue treated FFP and cryo. *Transf Apheresis Sci*, 2001; 25: 227-231.
90. Sherman IS, Lee EK, Williams SC, Vernuccio PJ, Caret GK. Removal of methylene blue and leukocytes by filtration following viral inactivation of fresh frozen plasma. *Transfusion*, 1995; 35 (Suppl 1): S51.
91. Simonsen AC, Sørensen H. Clinical tolerance of methylene blue virus-inactivated plasma. *Vox Sang*, 1999; 77: 210-217.
92. Suontaka AM, Blombläck M, Chapman J. Changes in functional activities of plasma fibrinogen after treatment with methylene blue and red light. *Transfusion*, 2003; 43: 568-575.
93. Taborski U, Oprean N, Tessmann R, Bassler S, Heidinger K, Wieding JU. Methylene blue/light –treated plasma and the disturbance of fibrin polymerization in vitro and in vivo: a randomized, double-blind clinical trial. *Vox Sang*, 2000; 78 (Suppl 1): P546.
94. Tissot JD, Hochstrasser DF, Schneider B, Morgenthaler JJ, Schneider P. No evidence for protein modifications in Fresh Frozen Plasma after photochemical treatment: an analysis by high-resolution two-dimensional electrophoresis. *Br J Haematol*, 1994; 86: 143-145.
95. Vassort-Bruneau C, Luspot E, Dalle V, Verpoort T, Mouchet C, Sensebe L, Chassaigne M, Bergeat P. Reduction of white blood cells in plasma by filtration: efficiency and final product quality. *Vox Sang*, 1998; 74 (Suppl 1): 1300.
96. Verpoort T, Chollet S, Lebrun F, Goudalier F, Mohr H, Walker WH. Elimination of methylene blue from photo-dynamically treated virus inactivated fresh-frozen plasma: the Blueflex filter. *Transf Clinique Biologique*, 2001; 8 (Suppl 1): P157.
97. Verpoort T, Chollet S, Héron C, Lebrun F, Goudalier F, Walker WH, Reichenberg S. Filtration of methylene blue and photoproducts after photodynamic treatment of plasma using Blueflex. *ISBT Congress Istanbul*, July 2003.
98. Wagner SJ, Cifone MA, Murli D, Dodd RY, Myhr B. Mammalian genotoxicity assessment of methylene blue in plasma: implications for virus inactivation. *Transfusion*, 1995; 35: 407-413.
99. Wagner SJ, Skripchenko A, Robinette D, Foley JW, Cincotta L. Factors affecting virus photoinactivation by a series of phenothiazine dyes. *Photochemistry and photobiology*, 1998; 67: 343-349.
100. Wagner SJ. Virus inactivation in blood components by photoactive phenothiazine dyes. *Transfus Med Rev*, 2002; 16: 61-66.
101. Wieding JU, Neumeyer H. Erste Erfahrungen mit Methylenblau-Virus-inaktiviertem Fresh-Frozen-Plasma: Ergebnisse einer klinischen und einer In-vitro Studie. *Infusionstherapie*, 1992; 19: 84-90.

102. Wieding JU, Rathgeber J, Zenker D, Pohl U, Koehler M. Prospective, randomized and controlled study on solvent/detergent virus methylene blue/light virus inactivation. *Transfusion*, 1999; 39 (Suppl): 23S.
103. Williamson LM, Cardigan R, Prowse CV. Methylene blue-treated fresh-frozen plasma: what is its contribution to blood safety?. *Transfusion*, 2003; 43: 1322-1329.
104. Yarranton H, Lawrie AS, Purdy G, Mackie IJ, Machin SJ. Comparison of von Willebrand factor antigen, von Willebrand factor-cleaving protease and protein S in blood components used for treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfusion Medecine*, 2004; 14: 39-44.
105. Yamada-Ohnishi Y, Owada T, Abe H, Hirayama J, Ikeda H, Ikebuchi K. Cell-associated virus infectivity of primary HIV-1 isolate can be eliminated by a filtration/methylene blue photoinactivation system. *Transfusion*, 2000; 40: 1542-1543.
106. Zeiler T, Riess H, Wittmann G, Hintz G, Zimmermann R, Müller C, Heuft HG, Huhn D. The effect of methylene blue phototreatment on plasma proteins and in vitro coagulation capability of single-donor Fresh Frozen Plasma. *Transfusion*, 1994; 34: 685-689.
107. Zeiler T, Wittmann G, Zimmermann R, Hintz G, Huhn D, Riess H. The effect of virus inactivation on coagulation factors in therapeutic plasma. *British J Haematol*, 2000; 111: 986-987.