Cours TP: plasma

Niels Lion
niels.lion@mavietonsang.ch
Septembre 2012

Sommaire

- Le fractionnement du plasma
- Le plasma thérapeutique
  - sécurisation par quarantaine
  - sécurisation par procédé solvent/détergent
  - sécurisation par traitement Intercept

Fractionnement du plasma

Produits issus du plasma

Produit	Indication
Facteur VIII	Hémophilie A
	Hémophilie B
complexe facteur IX	Déficiences en Facteur II et X Maladies du foie
immunoglobulines	Immune thrombocytopenic purpura Prophylaxie
antithrombin III	déficience congénitale coagulation intravasculaire disséminée
alpha-I-antitrypsin	déficiences héréditaires emphysème et COPD cirrhose

Procédé de fractionnement

- Développé par Edwin J Cohn pendant la deuxième guerre mondiale.
- But initial: extraire de l'albumine purifiée du plasma de pools de plasmas

Fraction	I	II	III	IV	IV
Ethanol (%)	8	25	18	40	40
pH	7.2	6.9	5.2	5.8	4.8
Temperature	-3	-5	-5	-5	-5
Protein	5.1	3	3	3	1

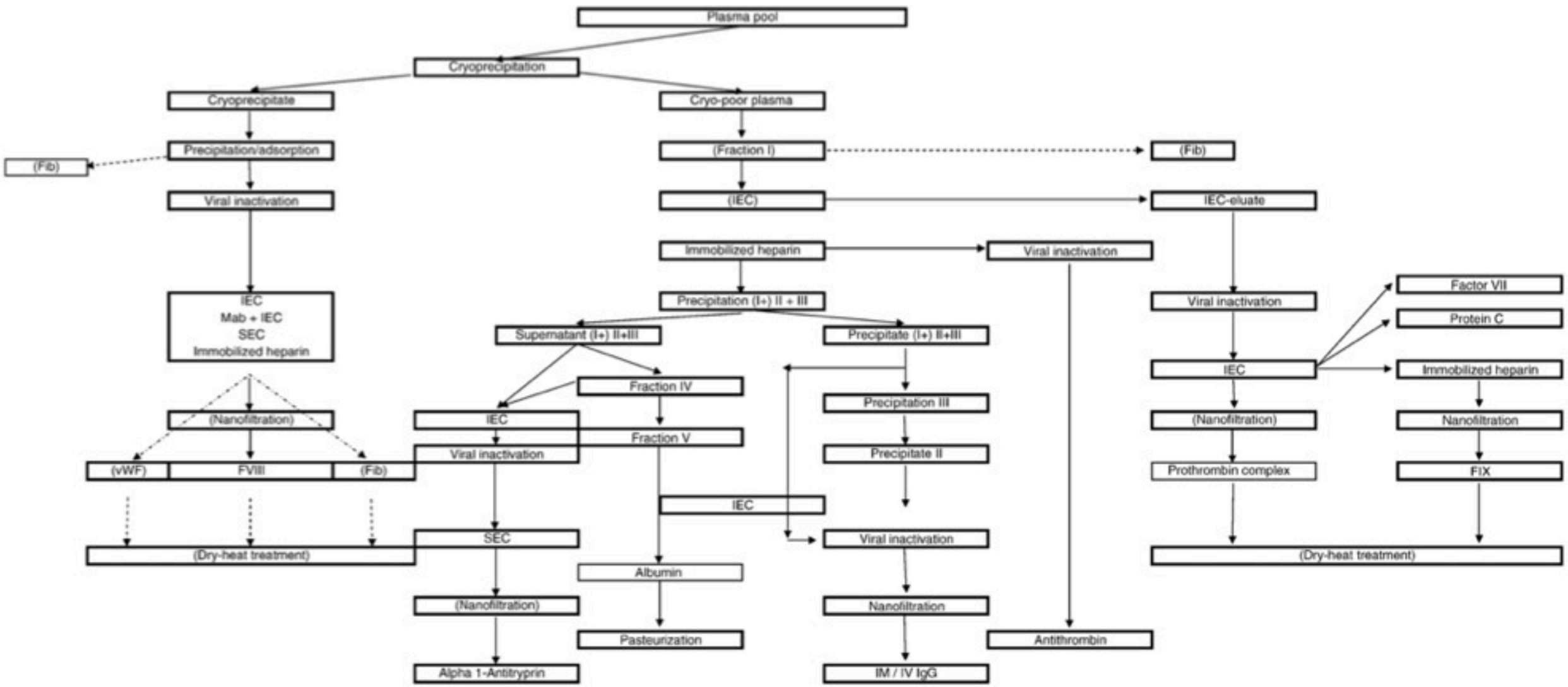
Albumine

Procédé moderne

Procédé	Conditions	Principe	Extraits
Cryoprécipitation	+1 à +4°C	solubilité différentielle	Facteur VIII, VWF, fibrinogène
Précipitation à l'éthanol	10-40% éthanol, -3 à -6°C, pH 7.4-4.5	solubilité différentielle	Fibrinogène, albumine, IgG, alpha-1-antitrypsine
Chromatographie par échange d'ions	Adhésion à des matériaux de chromatographie	charge des protéines	facteurs de coagulation
Chromatographie d'affinité	Liaison spécifique à des ligands chimiques (héparine, métaux, gélatine)	affinité	VWF, Facteur IX
Immunoaffinité	Liaison spécifique à des anticorps immobilisés	affinité	Facteur VIII, Facteur IX, protéine C
Chromatographie d'exclusion de taille		séparation par taille	AAT, Facteur VIII
Ultrafiltration	concentration de protéines, élimination de protéines de petite taille	séparation par taille	Finalisation de tous les extraits

MA VIE TON SANG.ch

Flowchart du procédé



Fib	Fibrinogen
IEC	Ion exchange chromatography
Mab	Monoclonal antibody chromatography
SEC	Size exclusion chromatography
()	indicates optional treatment

Procédés de sécurisation du plasma

- Quarantaine (en attente d'alerte depuis un centre de transfusion)
- Screening virologique
- Filtration des particules virales
- Procédé Solvent/détergent (voir plus loin)
- Pasteurisation
- Traitement acide
- Elimination des prions lors du procédé (précipitation? chromatographie d'affinité?)

CSL Behring: usine de Melbourne

In the CSL Biotherapies' plasma products facility in Melbourne, Production Supervisor, Tom Koukouvaos (top) works with Shift Leader Graeme Webster in our Next Generation intravenous immunoglobulin (IVIg) pasteurisation and nanofiltration facility.

Installation pour une étape: pasteurisation et nanofiltration des IVIGs

Le plasma thérapeutique en Suisse

Qu’est-ce que le plasma?

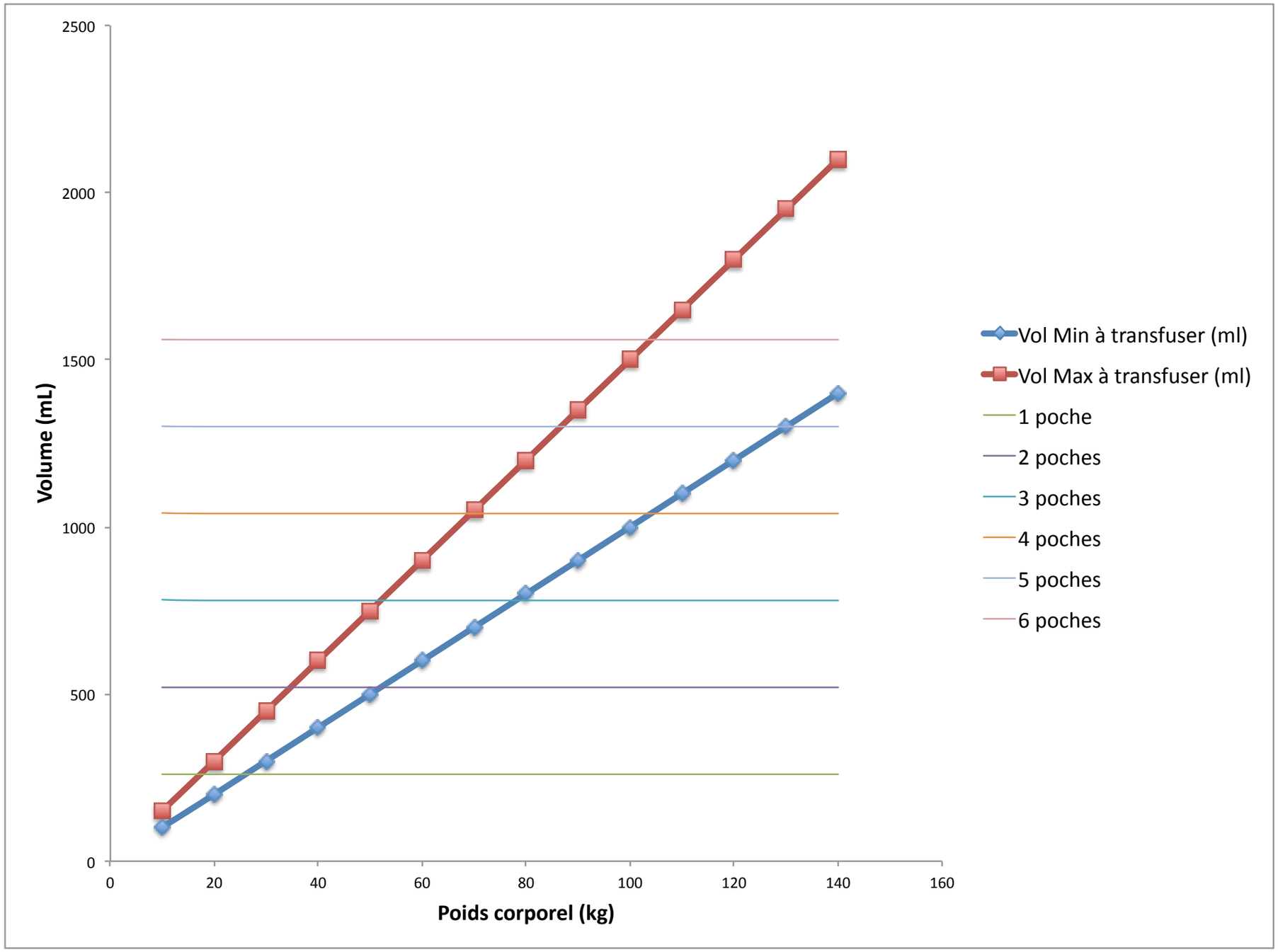
- Le plasma est le composant liquide du sang
- Il représente 55% du volume sanguin
- Il est responsable du transport des cellules (globules rouges, globules blancs, plaquettes), des nutriments et sels

Indications (Compendium Suisse)

- Carence majeure en facteurs de coagulation.
- Coagulopathie de dilution dans le cadre d'une transfusion massive avec hémorragie clinique ou activité hémostatique inférieure au seuil jugé critique selon les résultats du bilan.
- Coagulation intravasculaire disséminée aiguë dans le cadre d'un grand nombre de pathologies (tendance anormale au saignement et/ou microthromboses dans des organes vitaux).
- Carence en vitamine K accompagnée d'un risque hémorragique potentiellement létal c.-à-d. intervention urgente ne permettant pas d'attendre l'effet correcteur d'une injection intraveineuse de vitamine K (ex.: surdosage d'anticoagulants oraux, nouveau-nés).
- Carence en plusieurs facteurs de coagulation dans le cadre de maladies hépatiques.
- Carence isolée en facteurs de coagulation, en l'absence d'autre produit de substitution spécifique (ex.: déficit en facteur V ou XI).
- Carence en inhibiteur de la C1-estérase: traitement de l'oedème angioneurotique (aucun autre traitement disponible).
- Echange plasmatique dans le cadre d'un syndrome hémolytique et urémique ou d'un purpura thrombotique thrombocytopénique.
- Infections incontrôlables potentiellement létales chez des patients présentant un déficit en facteurs du complément.

Posologie

10-15 mL par kilo



La technique de quarantaine

- Principe: s’assurer que le donneur n’est pas porteur d’une maladie avant de libérer le plasma pour transfusion

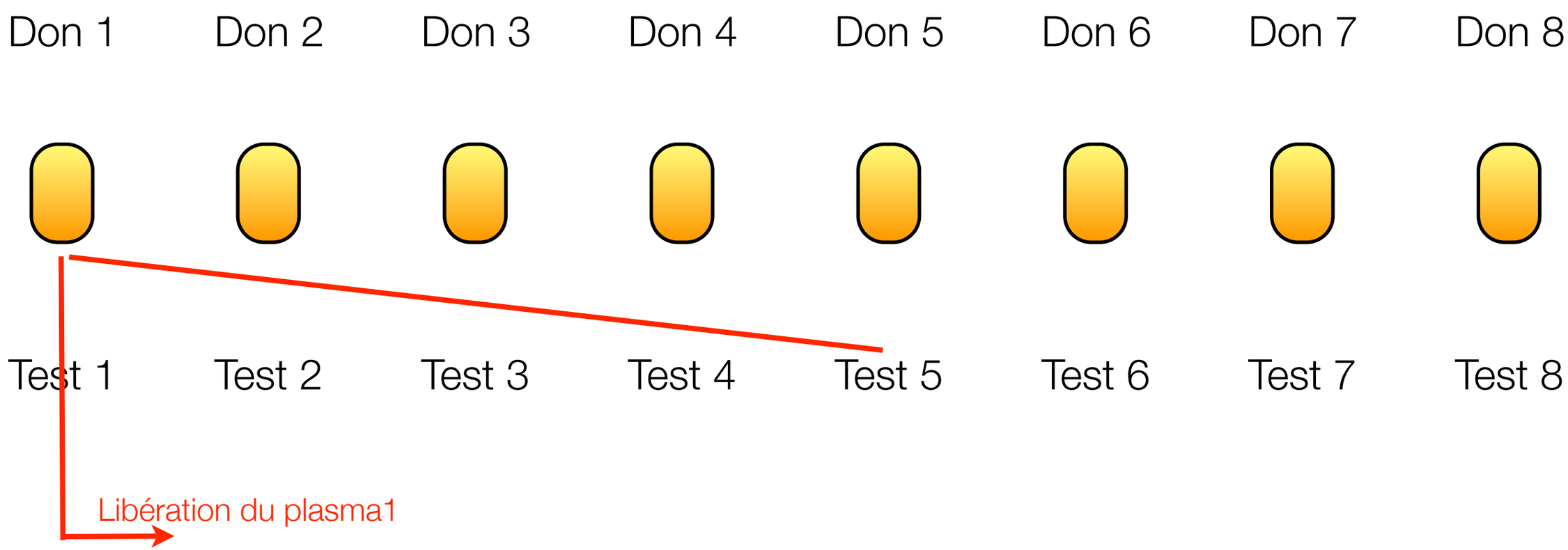
Cas pour un don par mois, quatre mois de quarantaine

Don 1	Don 2	Don 3	Don 4	Don 5	Don 6	Don 7	Don 8
Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	Test 6	Test 7	Test 8

La technique de quarantaine

- Principe: s’assurer que le donneur n’est pas porteur d’une maladie avant de libérer le plasma pour transfusion

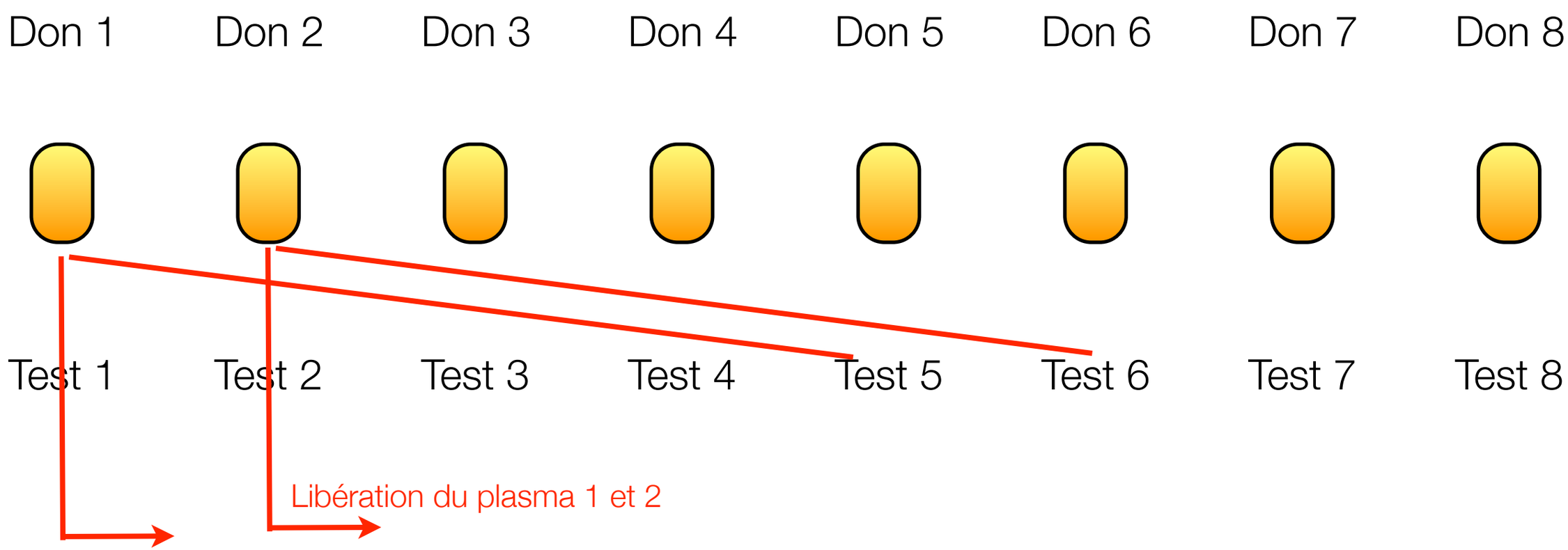
Cas pour un don par mois, quatre mois de quarantaine



La technique de quarantaine

- Principe: s’assurer que le donneur n’est pas porteur d’une maladie avant de libérer le plasma pour transfusion

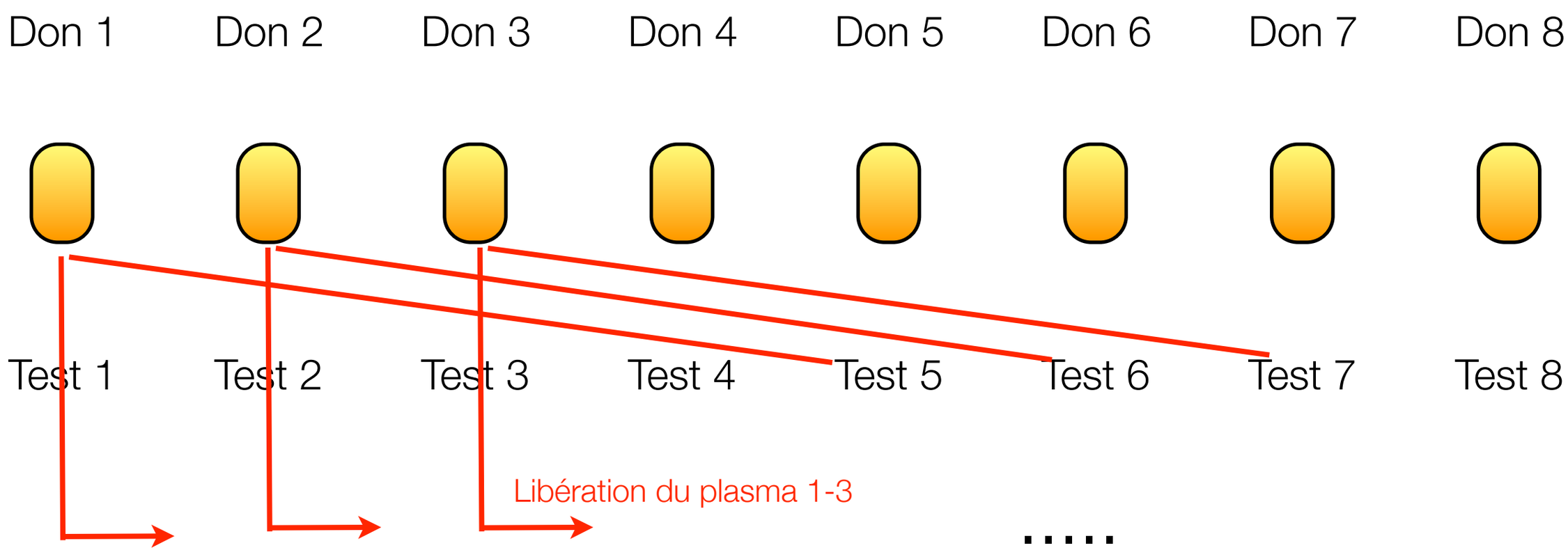
Cas pour un don par mois, trois mois de quarantaine



La technique de quarantaine

- Principe: s’assurer que le donneur n’est pas porteur d’une maladie avant de libérer le plasma pour transfusion

Cas pour un don par mois, trois mois de quarantaine



Sécurité du plasma de quarantaine

- Aucune infection transmise par du plasma sécurisé par le système de quarantaine en Suisse.

- Inconvénient 1: on doit conserver en stock de grandes quantités de plasma en attente d'analyse.

- Inconvénient 2: on ne protège les receveurs que contre ce qu'on teste (HIV, HBV, HCV), ou contre les maladies dont la clinique apparaît en 120 jours.

Sécurisation par procédé solvent-détergent

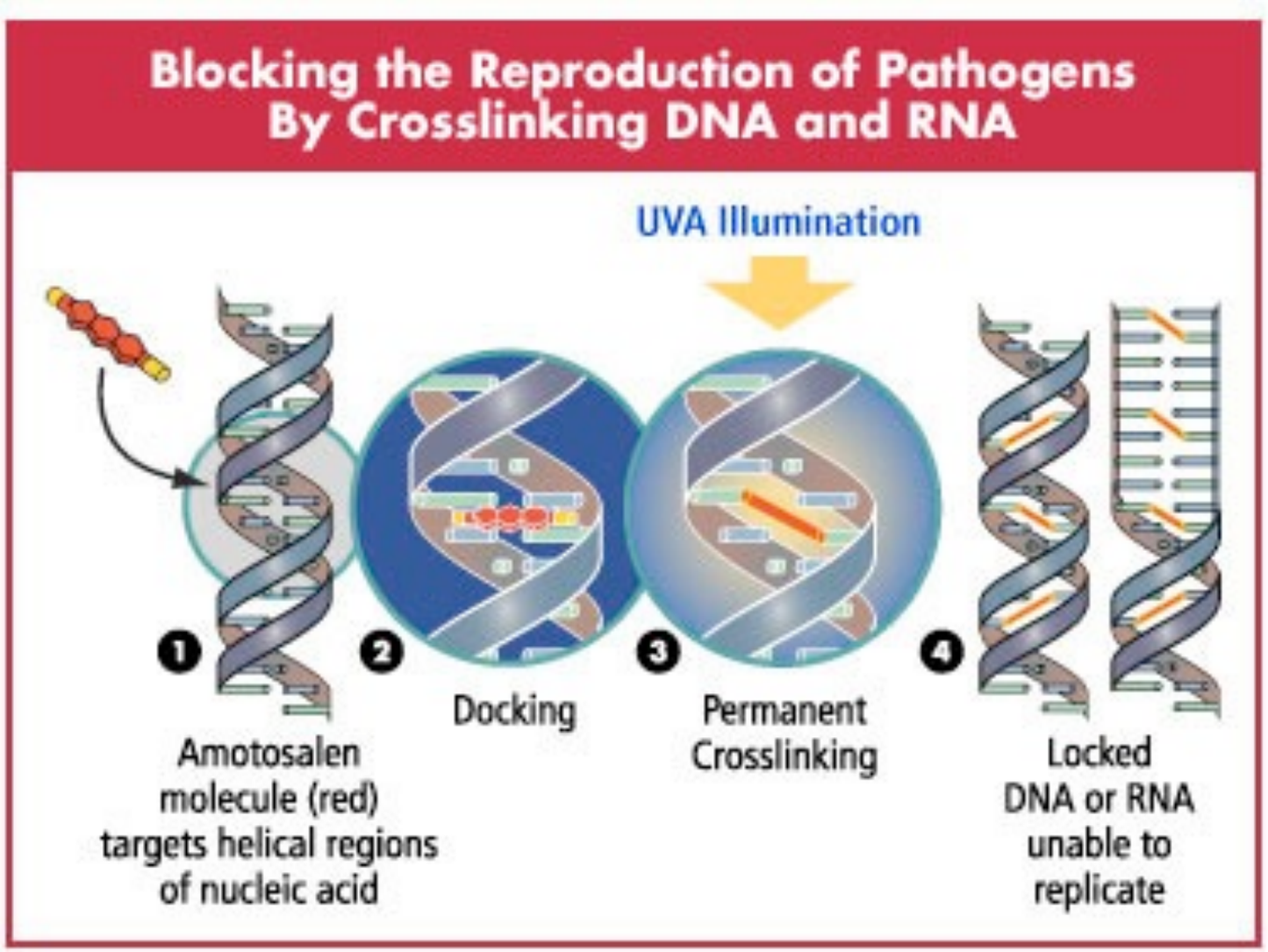
- Principe: traitement chimique qui dissoud les membranes des agents pathogènes

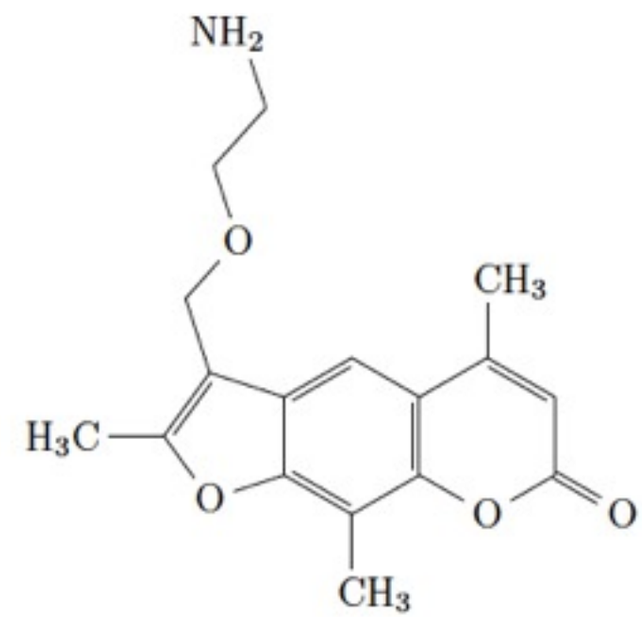
Type de plasma	Source et qualité	Taille du pool	Température et durée	Elimination des prions	Produit final
Octaplas (CH+AU)	Aphérèse ou sang complet	380 L (630 aphérèses ou 1520 plasmas SC)	4 h à 30°C (1%TNBP +1% Triton X-100)	2.5 log (du au procédé)	200 mL
Octaplas LG CH+AU)	Aphérèse ou sang complet	380 L (630 aphérèses ou 1520 plasmas SC)	1-1.5 h à 30°C (1%TNBP +1% Triton X-100)	>5 log (chromatographie d'affinité)	200 mL

Le procédé lui-même n'est efficace que contre les virus à enveloppe, mais à la fois les étapes de dilution, de filtration et de chromatographie, éliminent également les virus nus.

Sécurisation par procédé Intercept

- Même principe et réactif que pour les plaquettes





Efficacité du procédé Intercept - virus

Viruses Tested Using the INTERCEPT Blood System	Extent of Inactivation* (log_{10} reduction)	
	Platelets in plasma/Additive solution	Platelets in plasma
Enveloped Viruses		
HIV-1 (cell-associated)***	>6.1	>6.7
HIV-1 (cell-free)	>6.2	≥4.7
Clinical isolate of HIV-1	>3.4	-
Clinical isolate of HIV-2	>2.5	-
Latent proviral HIV-1	Inactivated to the limit of detection	-
HBV (strain MS-2)	>5.5	>4.5
HCV (strain Hutchison)	>4.5	>4.5
HTLV-I (Human T-cell Lymphotropic Virus)***	4.7**	≥4.5
HTLV-II (Human T-cell Lymphotropic Virus)***	5.1**	>5.7
Cell-associated Cytomegalovirus (CMV)***	>5.9	-
Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV, model virus for human HCV)	>6.0	≥5.4
Duck Hepatitis B Virus (DHBV, model virus for human HBV)	>6.2	4.4 to 4.5
PRV (Pseudorabies virus, model for CMV)	-	≥4.7
West Nile virus	>6.0	≥6.8
SARS-CoV (Human Corona virus)	-	≥5.5
Chikungunya virus	>6.4	≥7.6
Influenza A H5N1 virus (Avian Influenza)	>5.9	>5.7
Non-Enveloped Viruses		
Bluetongue Virus, type 11	>5.0	5.1
Calicivirus	1.7 to 2.4	-
Human Adenovirus-5	>5.9	≥6.9
Parvo (Parvovirus B19)	-	1.8

Viruses Tested Using the INTERCEPT Blood System for Plasma	Extent of Inactivation* (log_{10} reduction)
Enveloped Viruses	
HIV-1 (cell-associated)**	>6.7
HIV-1 (cell-free)	>6.8
HBV (strain MS-2)	>4.5
HCV (strain Hutchison)	>4.5
HTLV-I (Human T-cell Lymphotropic Virus)**	≥4.5
HTLV-II (Human T-cell Lymphotropic Virus)**	>5.7
WNV (West Nile Virus)	≥6.8
SARS-CoV (Human Corona Virus)	≥5.5
BVDV (Bovine Viral Diarrhea Virus, model virus for human HCV)	≥6.0
DHBV (Duck Hepatitis B Virus, model virus for human HBV)	4.4 - 4.5
Chikunguyna virus	≥7.6
Influenza A H5N1 virus (Avian Influenza)	>5.7
Non-Enveloped Viruses	
BTV (Bluetongue Virus)	5.1
Human Adenovirus-5	≥6.9
Parvo (Parvovirus B19)	1.8

Efficacité du procédé Intercept - bactéries

Bacterial Species Tested Using the INTERCEPT Blood System	Extent of Inactivation* (log_{10} reduction)	
	Platelets in plasma/Additive Solution	Platelets in plasma
Gram-Negative Bacteria		
Escherichia coli	>6.4	≥7.3
Serratia marcescens	>6.7	-
Klebsiella pneumoniae	>5.6	≥6.7
Pseudomonas aeruginosa	4.5	-
Salmonella choleraesuis	>6.2	-
Yersinia enterocolitica	>5.9	>7.3
Enterobacter cloacae	5.9	-
Anaplasma phagocytophilum (HGE agent)**	-	>4.2
Gram-Positive Bacteria		
Staphylococcus epidermidis	>6.6	>7.4
Staphylococcus aureus	6.6	>7.6
Streptococcus pyogenes	>6.8	-
Listeria monocytogenes	>6.3	-
Corynebacterium minutissimum	>6.3	-
Bacillus cereus (includes spores)	3.6	-
Bacillus cereus (vegetative)	>6.0	-
Bifidobacterium adolescentis	>6.5	-
Propionibacterium acnes	>6.7	-
Lactobacillus species	>6.9	-
Clostridium perfringens (vegetative form)	>7.0	-
Spirochete Bacteria		
Treponema pallidum (syphilis)	≥6.8 to ≤7.0	>5.9
Borrelia burgdorferi (Lyme disease)	>6.8	>10.6

Bacterial Species Tested Using the INTERCEPT Blood System for Plasma	Extent of Inactivation* (log_{10} reduction)
Gram-Negative Bacteria	
Klebsiella pneumoniae	≥7.4
Yersinia enterocolitica	>7.3
Anaplasma phagocytophilum (HGE agent)	>4.2
Gram-Positive Bacteria	
Staphylococcus epidermidis	>7.3
Spirochete Bacteria	
Treponema pallidum (syphilis) **	>5.9
Borrelia burgdorferi (Lyme disease)	>10.6

Efficacité du procédé Intercept - parasites

Parasites Tested Using the INTERCEPT Blood System	Extent of Inactivation* (log10 reduction)	
	Platelets in plasma/Additive Solution	Platelets in plasma
*Plasmodium falciparum*** (malaria)	≥6.0	≥6.9
Trypanosoma cruzi (Chagas' disease)	>5.3	>5.0
Leishmania mexicana (metacyclic promastigote stage)	>5.0	-
Leishmania major Jish (amastigote stage)	>4.3	-
Babesia microti (babesiosis)	>5.3	>5.3

Parasites Tested Using the INTERCEPT Blood System for Plasma	Extent of Inactivation* (log_{10} reduction)
*Plasmodium falciparum*** (malaria)	≥6.9
Trypanosoma cruzi (Chagas' disease)	>5.0
Babesia microti (babesiosis)	>5.3

Les guardbands Intercept

	Min	Max
Volume (y.c. anticoagulant)	385 mL	650 mL
Globules rouges		4.10^9 /L

Les sources de plasma autorisés

- Plasma source: plasma de plasmaphérèse
- Plasma concurrent: collecté lors d’aphérèse multi-composant
- Recovery plasma: plasma de sang complet
- Plasma décongelé: plasma de n’importe laquelle des 3 sources, qui est traité par Intercept et distribué rapidement ou recongelé (à discuter plus loin)

Procédé Intercept

- Produit final: 200 ± 20 mL
- Perte pendant le traitement: 30 mL
- 385 mL < Vol < 430 mL: 1 poche finale
- 430 mL < Vol < 630 mL: 2 poches finales
- 630 mL < Vol < 650 mL: 3 poches finales

Congélation dans les 20 heures post-don!

Besoins en plasma transfusionnel

Plasmas distribués

Groupe	O	A	B	AB	Total
Nombre d'unités plasma distribuées	3300	2600	850	700	7450 poches
Volume approximatif (Vol = 260 mL)	860 L	680 L	220 L	180 L	1940 L
Nombre d'unités 200 mL	4300	3400	1100	900	9700 poches
Volume de plasma SC collecté	3120 L	3900 L	550 L	230 L	7800 L
Volume de plasma hommes collecté	1404 L	1755 L	248 L	104 L	3510 L
Plasmas distribués / plasmas de sang complet disponibles	61%	39%	89%	173%	55%

Hypothèses: 1/ les groupes sanguins des donneurs sont ceux de la population générale

2/ le volume moyen d'un plasma passe de 260 mL à 200 mL (volume distribué conservé)

Exemple du groupe AB

- En 2010, 435 donneurs actifs de SC de groupe AB -> 700 SC de groupe AB (182 L)

- 30 donneurs actifs en aphérèse plaquettaire de groupe AB. Si transfert en plasmaphérèse avec un don par mois (3 doses): 1080 plasmas de 200 mL.

- Conclusion: pour les plasmas de groupe AB (et B), l'approvisionnement ne peut venir du sang complet, et nous ne disposons pas de suffisamment de donneurs d'aphérèse pour mettre en place rapidement l'approvisionnement en plasma de plasmaphérèse.

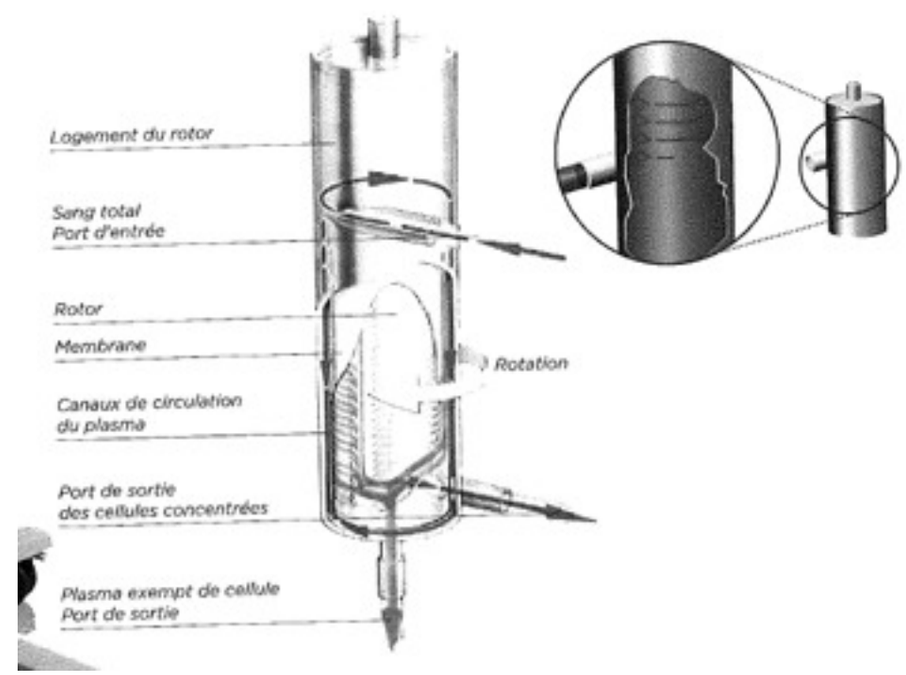
Plasmaphérèse

Objectifs

- On veut collecter des doses de plasma de:
    - 385 mL < Vol < 430 mL: une poche finale
    - 430 mL (min 390 mL) < Vol < 630 mL: deux poches finales
    - 630 mL (min 570 mL) < Vol < 650 mL: trois poches finales
- Le plasma doit être essentiellement acellulaire (<4.10^9 GR/L; < 1, 2 ou 3.10^6 GB/poche; PLT < 50.10^9/L).
- Le volume prélevé (hors AC) ne doit pas dépasser 600 mL (pas de compensation saline).

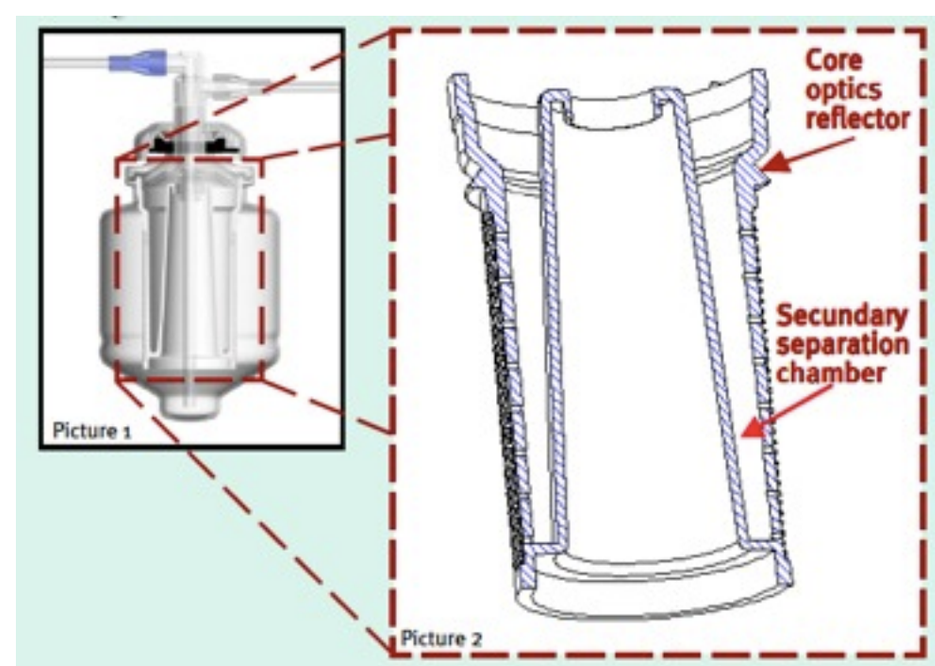
Autopheresis-C, Fenwal

- Technologie continue de filtration rotative
- Plasma essentiellement exempt de cellules
- Le plasma collecté est pesé en continu
- durée de procédure: 45-50 minutes



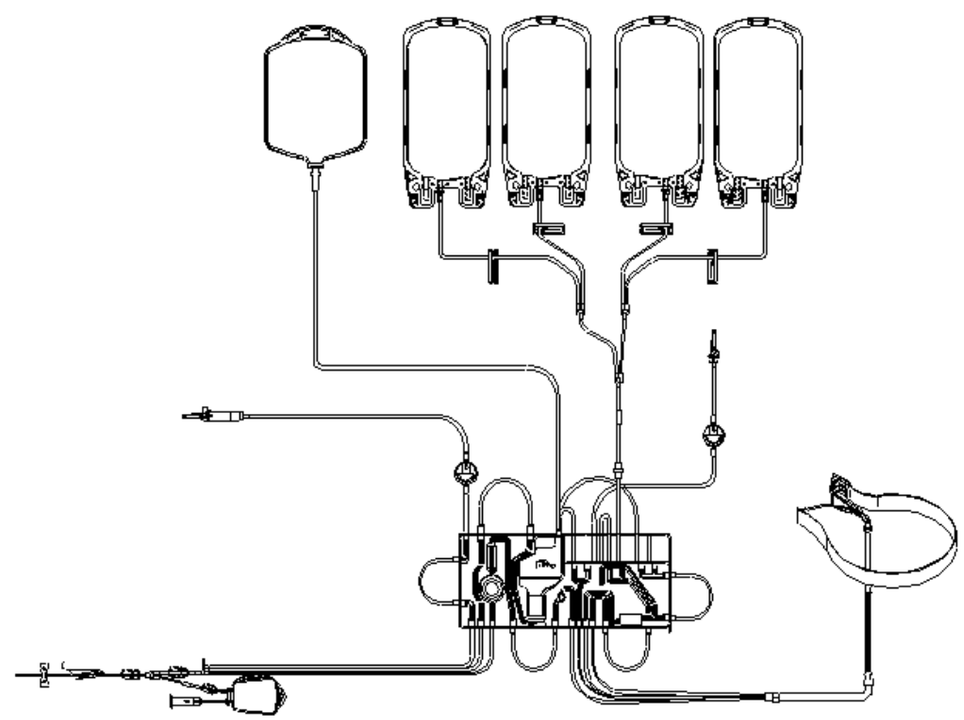
PCS2, Haemonetics

- Technologie de remplissage/centrifugation/ extraction d'un bol (275 mL).
- Plasma essentiellement exempt de cellules
- Le plasma collecté est pesé en continu
- durée de procédure: 45-50 minutes



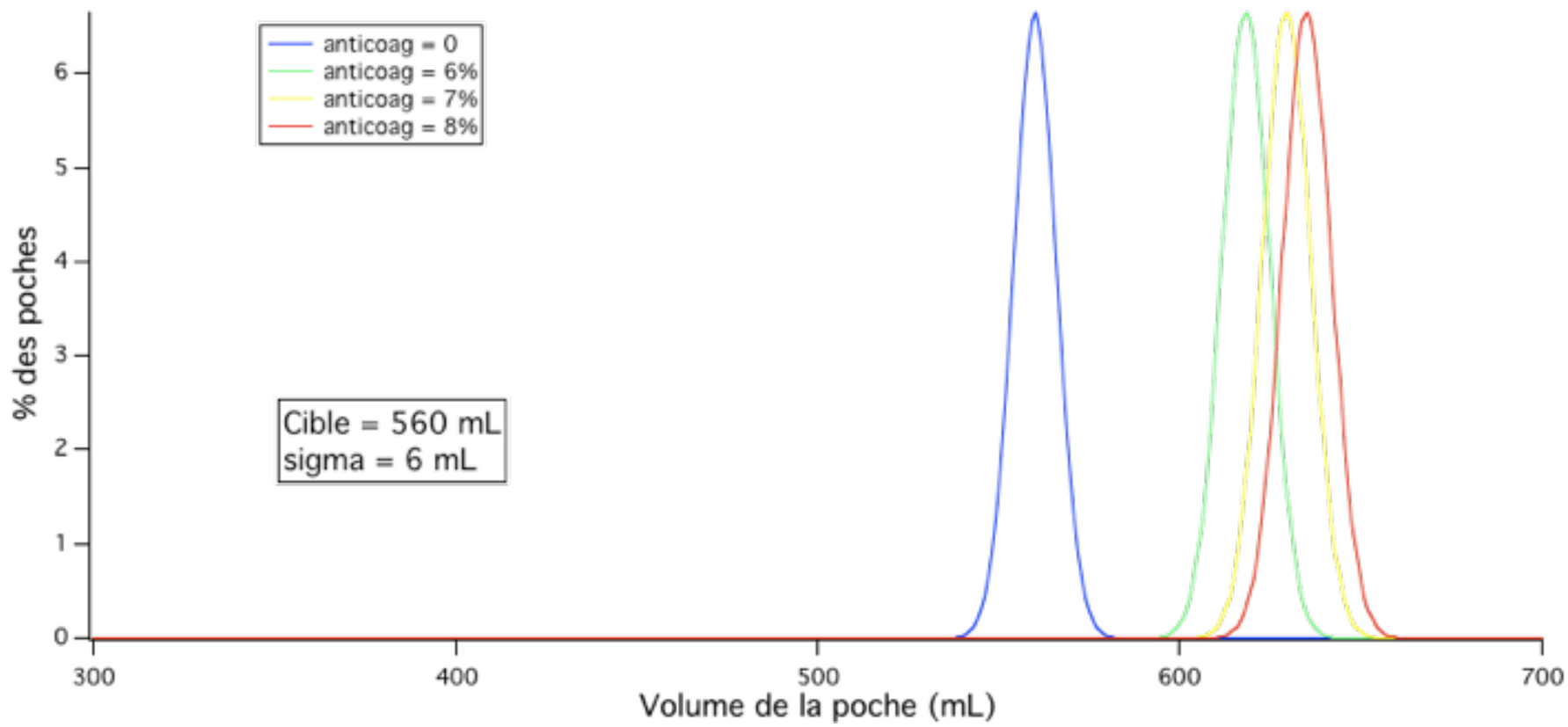
Trima, Terumo BCT

- Technologie de centrifugation continue (anneau)
- Plasma essentiellement exempt de cellules
- C’est le nombre de tours de pompe de collecte qui détermine le volume collecté
- durée de procédure (600mL): 30 min



Anticoagulation

- Solution classique en plasmaphérèse: 6-8% (concentration finale, ou 10-13% v:v) de solution anticoagulante (sodium citrate à 4%)



Recommandation Caridian: ratio 6.0 à 13.7, défaut 11 (7.3-16.6%, défaut 9%)

Anticoagulation - volume final avec AC

cible = 560 mL sigma = 6 mL	< 385 mL	385-430 mL	430-630 ml	630-650 ml	> 650 mL
AC=0	0	0	100%	0	0
AC=6%	0	0	96.2%	3.8%	0
AC=7%	0	0	53.3%	46.6%	0.1%
AC=8%	0	0	23.0%	75.6%	1.4%

	Sodium citrate concentrations (%)		
Measure	6	7	8
Citrate (mmol/L)	14.2 (13.3-15.4)	16.9† (15.1-18.3)	18.3† (14.6-20.6)
Sodium citrate (% of total plasma volume)	10.4 (9.6-12.4)	12.4† (11.0-13.9)	13.4† (10.8-15.7)

Nombre de donneurs nécessaires

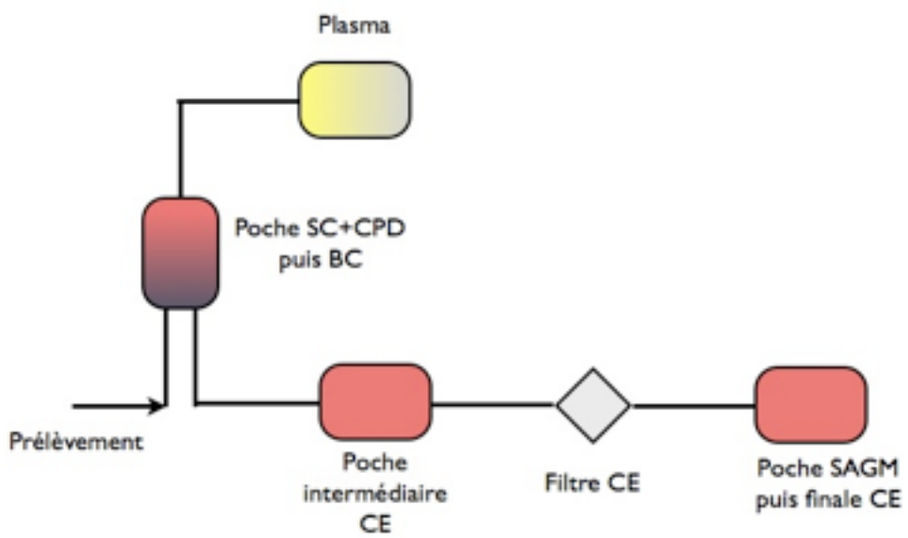
Groupe	O	A	B	AB	Total
Nombre d'unités distribuées	3300	2600	850	700	7450 poches
Volume approximatif (Vol = 260 mL)	860 L	680 L	220 L	180 L	1940 L
Nombre d'unités 200 mL	4300	3400	1100	900	9700 poches
Nombre de procédures de plasmaphérèse (triple dose)	?	?	280-370	230-300	510-670
Nombre de donneurs (un don par mois)	?	?	23-30	20-25	43-55
Nombre de donneurs (4 dons par an)	?	?	70-90	55-75	125-165
Nombre de procédures de plasmaphérèse (double dose)			425-550	350-450	775-1000
Nombre de donneurs (un don par mois)			35-45	30-37	65-82
Nombre de donneurs (4 dons par an)			100-140	90-115	190-255

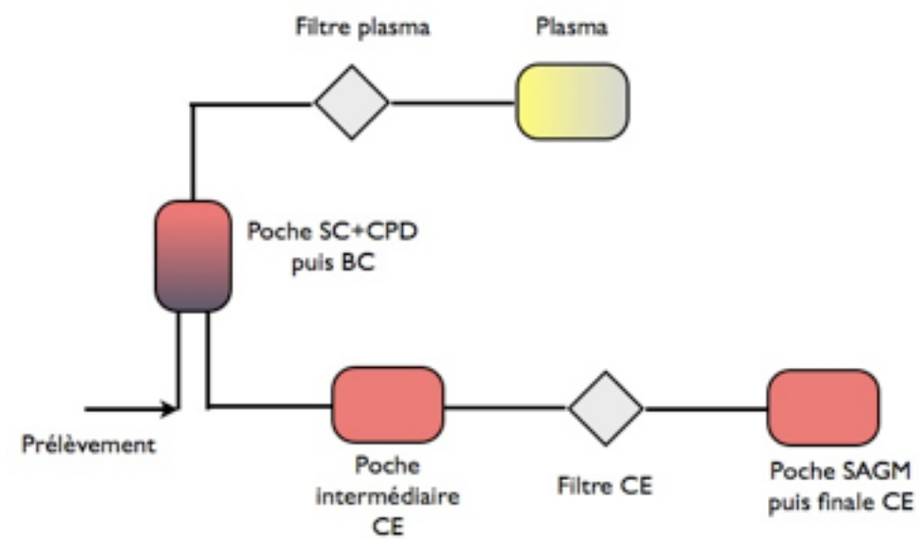
Plasma de sang complet

Respect des guardbands

- Les guardbands de volume Intercept (385-650 mL) imposent de pooler plusieurs plasmas de sang complet (260 mL) pour pouvoir inactiver du plasma
- Swissmedic et T-CH ont autorisé le pooling de 2 à 6 plasmas de sang complet
- Le plasma doit être déleucocyté avant Intercept
- Une unité finale inactivée = 200 ± 20 mL
- La moyenne de la production doit être de 200 mL

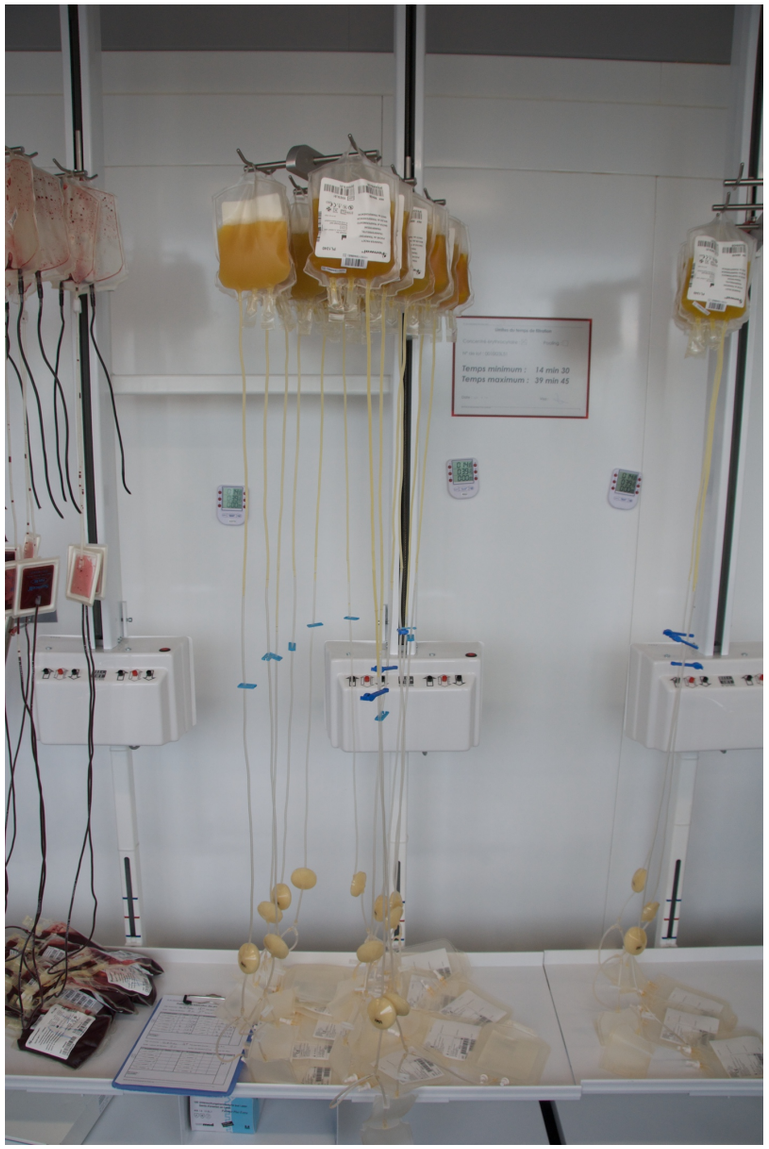
Filtration du plasma: kit intégré





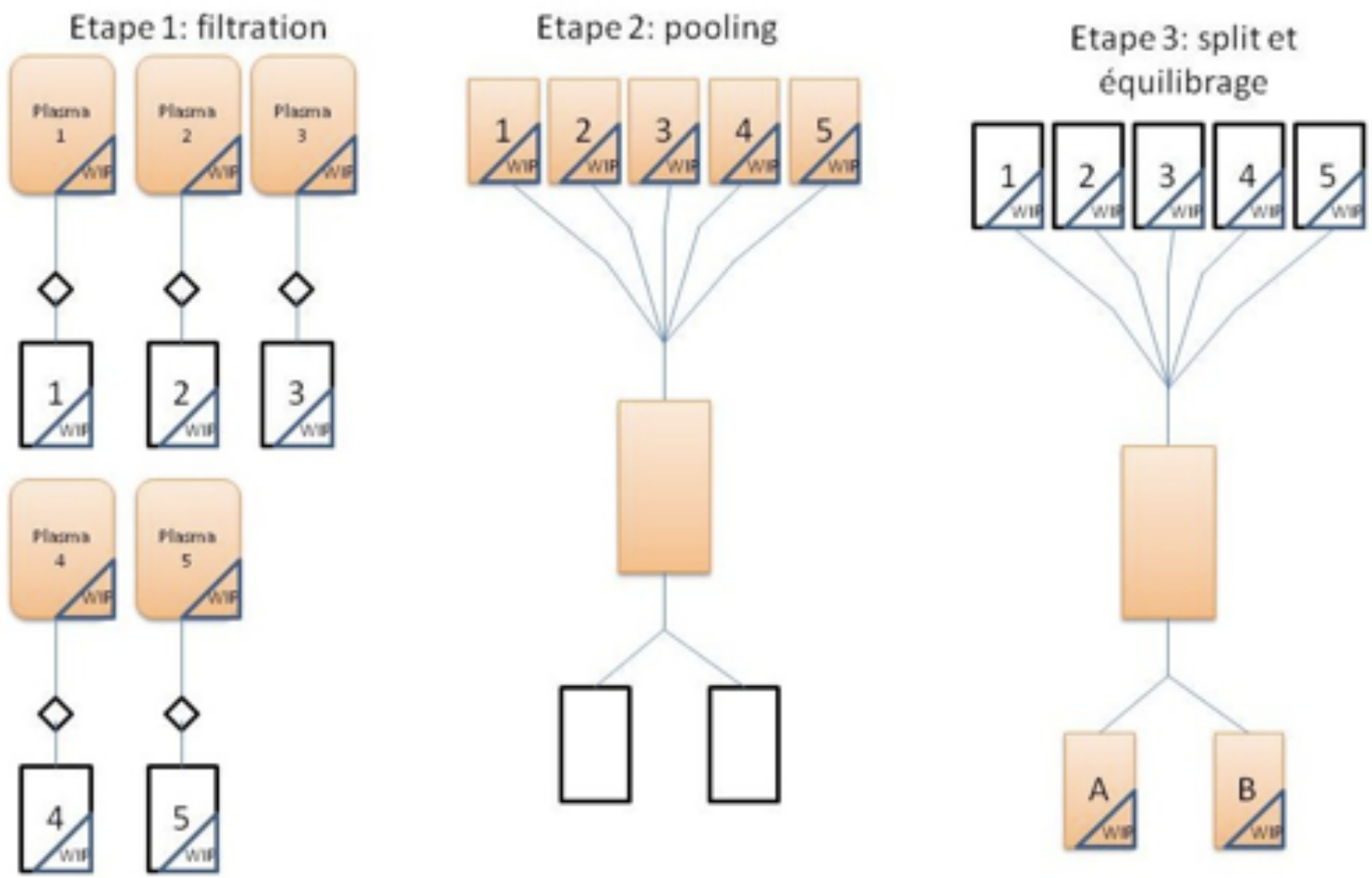
- Contraintes logistiques en collecte: 2 kits à disposition:
- 1 kit pour le plasma transfusionnel
- 1 kit pour le plasma de fractionnement

Filtration unitaire du plasma



Filtre LPSB1U
Coût: 15 CHF/plasma
Filtration en 15-20 min
Volume mort 7 mL

Procédé de filtration / pooling



Filtration unitaire du plasma

- On filtre chaque plasma avant pooling, on poole 2-6 plasmas
- Chaque procédure Intercept entraîne une perte de 30 mL

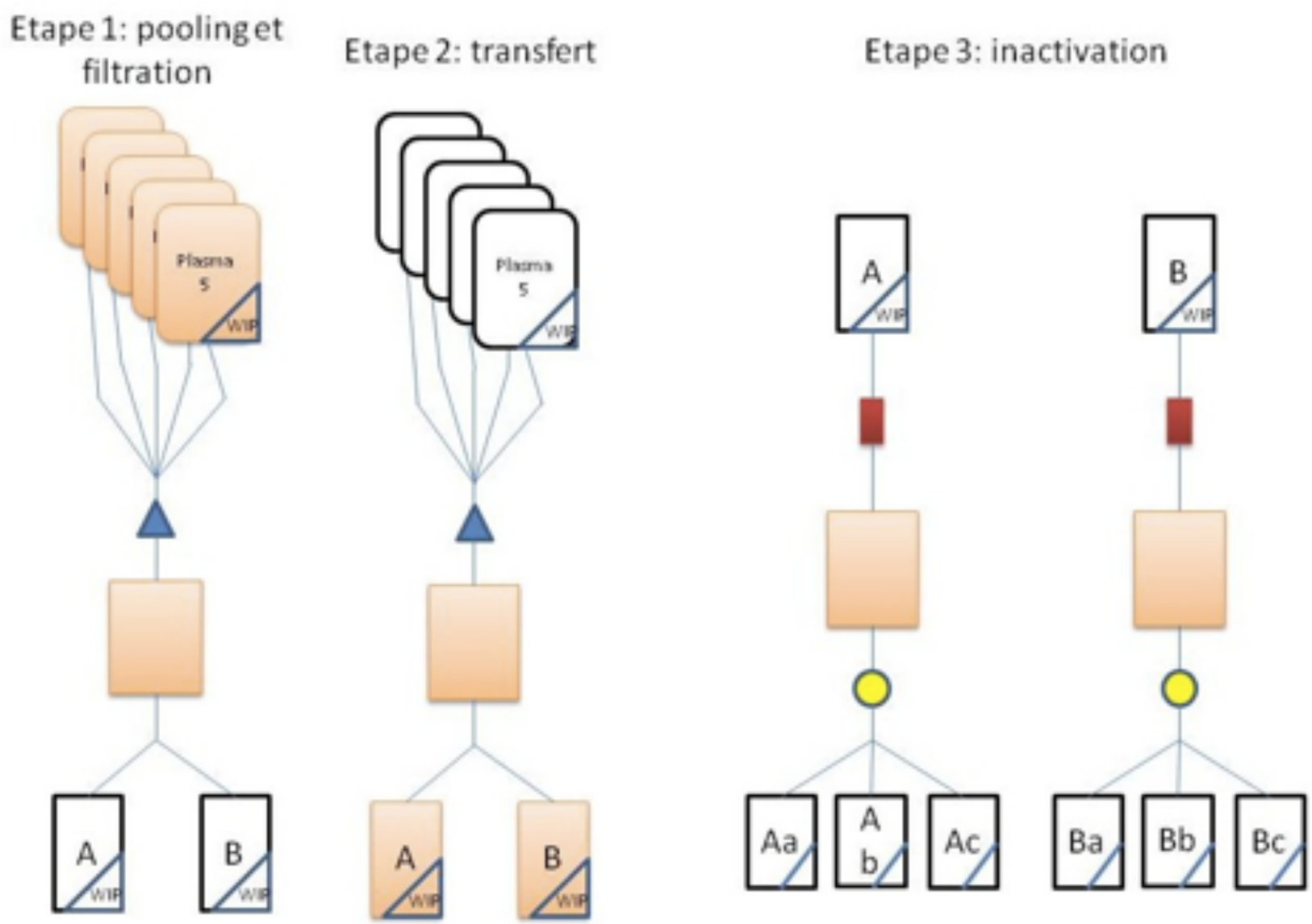
Nombre de plasma de 260 mL	Volume poolé après filtration (-7 mL par plasma)	Nombre de kits Intercept | pertes (mL)	Volume final | nombre de plasmas
2	506	1 | 0	476 mL | 2 | 76 mL
3	759	1 | 109 mL	620 mL | 3 | 20 mL
4	1012	2 | 0 mL	952 mL | 4 | 152 mL
5	1265	2 | 0 mL	1205 mL | 6 | 5 mL
6	1518	2 | 218 mL	1240 mL | 6 | 40 mL

Filtration unitaire du plasma

- On filtre chaque plasma avant pooling, on poole 2-6 plasmas
- Chaque procédure Intercept entraîne une perte de 30 mL

Nombre de plasma de 260 mL	Volume poolé après filtration (-7 mL par plasma)	Nombre de kits Intercept | pertes (mL)	Volume final (perte de 30 mL) | nombre de plasmas | Vol à éliminer
2	506	1 | 0	476 mL | 2 | 76 mL
3	759	1 | 109 mL	620 mL | 3 | 20 mL
4	1012	2 | 0 mL	952 mL | 4 | 152 mL
5	1265	2 | 0 mL	1205 mL | 6 | 5 mL
6	1518	2 | 218 mL	1240 mL | 6 | 40 mL

Filtration / pooling en une étape



Filtration du pool

- On peut envisager de pooler et filtrer le plasma en une étape (pas de kits commercialement disponibles)

- Trois prototypes sont en cours de développement:

    - Pall + Meise (filtration OK, temps = 5 min)???

    - Macopharma (filtration OK, temps = 25 min)

    - Griffols + Pall?

- Avantages: on limite le nombre de connexions stériles et les étapes intermédiaires (étiquetage?), on limite les pertes de filtration.

Filtration du pool de plasma

- On filtre le pool de plasmas (pertes = 17 mL par pool)
- Chaque procédure Intercept entraîne une perte de 30 mL

Nombre de plasma de 260 mL	Volume poolé après filtration (-17 mL par pool)	Nombre de kits Intercept | pertes (mL)	Volume final | nombre de plasmas | pertes
2	503	1 | 0 mL	473 mL | 2 | 73 mL
3	763	1 | 113 mL	620 mL | 3 | 20 mL
4	1023	2 | 0 mL	962 mL | 4 | 162 mL
5	1283	2 | 0 mL	1223 mL | 6 | 23 mL
6	1543	2 | 243 mL	1240 mL | 6 | 40 mL

Filtration du pool de plasma

- On filtre le pool de plasmas (pertes = 17 mL par pool)
- Chaque procédure Intercept entraîne une perte de 30 mL

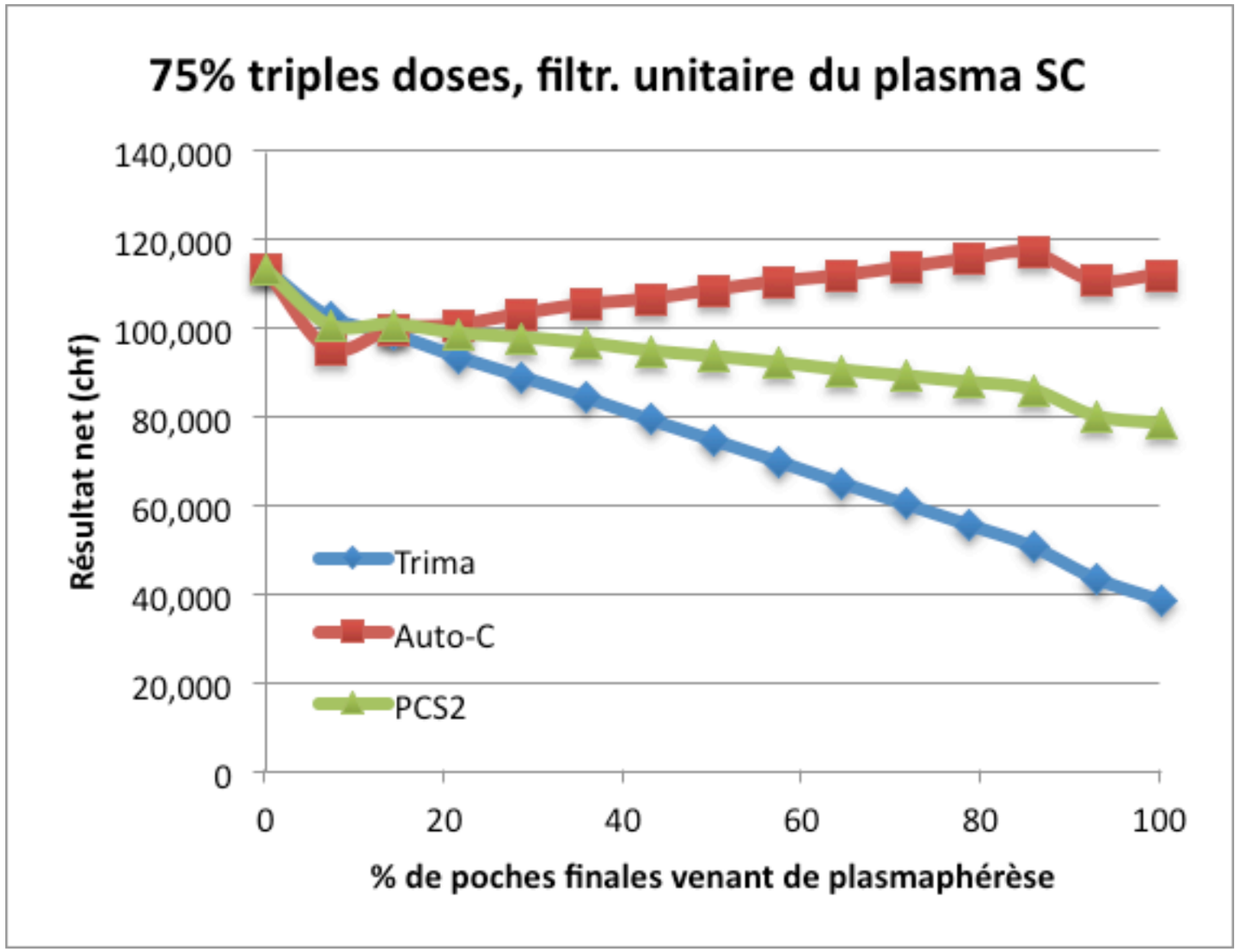
Nombre de plasma de 260 mL	Volume poolé après filtration (-17 mL par pool)	Nombre de kits Intercept | pertes (mL)	Volume final | nombre de plasmas | pertes
2	503	1 | 0 mL	473 mL | 2 | 73 mL
3	763	1 | 113 mL	620 mL | 3 | 20 mL
4	1023	2 | 0 mL	962 mL | 4 | 162 mL
5	1283	2 | 0 mL	1223 mL | 6 | 23 mL
6	1543	2 | 243 mL	1240 mL | 6 | 40 mL

Coût du plasma de sang complet

Hypothèses:

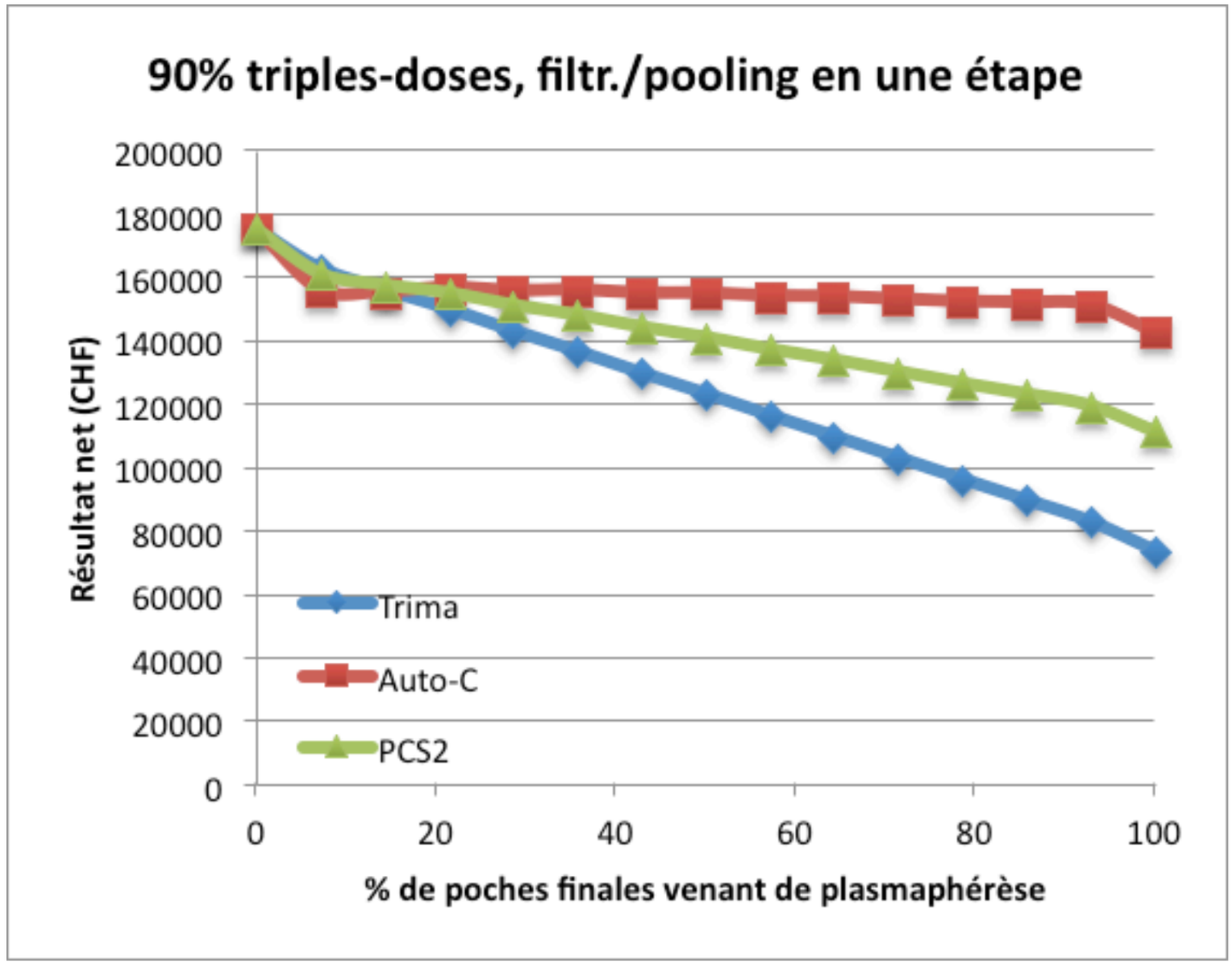
- Pooling de 5 plasmas de SC pour produire 6 iFFP
- Chaque procédure Intercept donne 3 plasmas
- La perte en vente de plasma de fractionnement est prise en compte
- SCD=2.80 CHF; Intercept= 122.20 CHF; pas de coût d'analyse.
- **Coût final d'un iFFP=78 (filtration du pool) ou 87 CHF (filtration unitaire) pour le SC (plasma source = 85-100 CHF; plasma concurrent = 84 CHF).**

Coûts globaux, cas défavorable



Production de 7000 poches de plasma 200 mL

Coûts globaux, cas optimiste



Etat du projet

- Le modèle de plan de validation national est en cours d'approbation par Swissmedic
- La validation pourrait avoir lieu fin septembre-octobre
- La mise en place en routine ne pourra avoir lieu que lorsque:
  - la plasmaphérèse est en place
  - une solution idoine de filtration/pooling des plasmas de SC est en place
  - les développements informatiques ont été effectués

Merci de votre attention