

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin  
(Direktor Univ. - Prof. Dr. Andreas Greinacher)  
der Universitätsmedizin Greifswald

## **Qualitätsuntersuchungen zu Rekonvaleszenten- und Universalplasma**

**Inaugural - Dissertation**  
zur  
**Erlangung des akademischen**  
**Grades**  
**Doktor der Wissenschaften in der Medizin**  
**(Dr. rer. med.)**  
der  
**Universitätsmedizin Greifswald**

**2022**

vorgelegt von: Raster, Johannes  
Friedrich  
geb. am: 11.05.1995  
in: Hamburg

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Greinacher

2. Gutachter: PD Dr. med. Kristina Hölig

Ort, Raum: Greifswald, Seminarraum der Klinischen Chemie, Raum 10.0.16

Tag der Disputation: 05.06.2023

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	4
1 Einleitung.....	5
2 Ergebnisse und Diskussion.....	8
2.1 Einfluss der Pathogeninaktivierung mittels Methylenblau auf die Integrität der Immunglobuline M und G .....	8
2.2 Isoagglutinindepletion von humanem Frischplasma zur AB0-Blutgruppen unabhängigen Transfusion .....	12
3 Zusammenfassung .....	24
4 Literaturverzeichnis.....	25
5 Anhang .....	30
5.1 Publikationsliste .....	30
5.2 Danksagung.....	31
5.3 Publikationen .....	32

## Abkürzungsverzeichnis

EK	Erythrozytenkonzentrat
EBV	Eppstein-Barr-Virus
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
MB	Methylenblau
ns	nicht signifikant
OD	Optische Dichte
PEI	Paul-Ehrlich-Institut

# 1 Einleitung

Humanes Frischplasma wird zur Behandlung von Koagulopathien, thrombotischer Mikroangiopathien, beim Plasmaaustausch und zum Ersatz von Gerinnungsfaktoren im Rahmen von Massivtransfusionen oder Lebererkrankungen eingesetzt. [1, 2] Im Rahmen von en- oder pandemischen Verbreitungen neuartiger Pathogene wird auch immer wieder der Einsatz von Rekonvaleszentenplasma, Plasma von genesenen Spendern, diskutiert und untersucht. Bereits im 19. Jahrhundert wurde die Therapie mit Rekonvaleszenten Serum und -plasma, später auch mit daraus isolierten Antikörpern, erfolgreich für verschiedene Krankheiten wie Diphtherie, Tetanus, Milzbrand, Hepatitis B und Tollwut durchgeführt. [3] Sie basiert auf dem Prinzip der passiven Immunisierung mit xeno- oder allogenen Antikörpern. Seit der Entdeckung antibiotischer Wirkstoffe ist die Verbreitung dieser Therapieform jedoch stark zurückgegangen. [4] In den vergangenen Jahren wurde jedoch vermehrt der Einsatz von Rekonvaleszentenplasma im Zusammenhang mit SARS, MERS und Ebola, aber auch COVID-19, diskutiert. [5–7] In einem Positionspapier aus 2017 empfiehlt die WHO die Etablierung einer Infrastruktur zur schnellen und sicheren Sammlung und Verteilung von Rekonvaleszentenplasma im Falle einer Verbreitung neuartiger Pathogene. Die Ergebnisse bezüglich Wirksamkeit und Sicherheit dieser Therapieoption sollen im Rahmen zentral angelegter klinischer Studien dokumentiert und ausgewertet werden. [4]

Die Anwendungssicherheit von therapeutischem Plasma wird maßgeblich durch die intensive infektionsserologische Untersuchung jeder Vollblut- und Plasmaspende, der darauffolgenden Lagerung unter Quarantäne für mindestens vier Monate und die Ausgabe von AB0-kompatiblen Plasma gewährleistet. [8]

Wenn zu Beginn einer endemischen oder pandemischen Notlage ein hoher Bedarf bei gleichzeitig niedrigem Lagerbestand an Rekonvaleszentenplasma besteht, kann die Quarantänelagerung jedoch nicht immer eingehalten werden. Als Alternative schlägt die Richtlinie Hämotherapie der Bundesärztekammer eine Behandlung des Plasmas mit pathogeninaktivierenden Methoden vor. [8] Derzeitig für humanes Frischplasma verwendete Pathogeninaktivierungsverfahren basieren auf verschiedenen Technologien [9]:

- Zugabe von Methyleneblau und Bestrahlung mit sichtbarem Licht (Theraflex®-MB),
- Zugabe von Amotosalen und Bestrahlung mit UV-Licht (Intercept®),
- Zugabe von Riboflavin und Bestrahlung mit UV-Licht (Mirasol®),
- Bestrahlung mit UVC-Licht (Theraflex®-UV).

Das Ziel dieser Verfahren ist die Inaktivierung, also die Zerstörung der Fähigkeit zur Vervielfältigung, von Pathogenen. Bei der Theraflex®-MB Behandlung erfolgt die Inaktivierung durch die Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies, welche zu Brüchen in RNA- und DNA-Strängen führen. [10] Das Intercept®-System inaktiviert Pathogene durch die Interkalation von Amotosalen in RNA- und DNA-Stränge und der Bildung von Quervernetzungen bei der Bestrahlung. [11] Das bei dem Mirasol®-Verfahren verwendete Riboflavin kann bei Anwesenheit von UV-Licht direkt mit den in RNA und DNA enthaltenen Nukleinsäuren reagieren und diese durch einen Elektronentransfer verändern. [12] Theraflex®-UV nutzt die Eigenschaft von UVC-Licht direkt Quervernetzungen in RNA- und DNA-Strängen zu erzeugen. [13] Jedoch wurde bis zum Beginn dieser Promotionsarbeit der Einfluss dieser Verfahren auf die Funktionalität von im Plasma enthaltenen Antikörpern noch nicht untersucht. Eine weitere Schwierigkeit bei der frühen Versorgung besonders gefährdeter Patientenpopulationen mit Rekonvaleszentenplasma ist die Notwendigkeit der AB0-Kompatibilität des Plasmas. Plasma enthält Antikörper gegen die Antigene des AB0-Blutgruppensystems (Isoagglutinine). Plasma der Blutgruppe A enthält anti-B-Isoagglutinine, Plasma der Blutgruppe B enthält anti-A-Isoagglutinine, Plasma der Blutgruppe 0 enthält anti-A- und anti-B-Isoagglutinine und Plasma der Blutgruppe AB enthält keine Isoagglutinine.

Lediglich 6% der deutschen Bevölkerung und damit der möglichen Spenderpopulation zeigt den AB-Phenotyp und gilt somit als „Universal“-Spender für Plasma. [14] Im herkömmlichen klinischen Umfeld werden daher nur 27 % aller AB-Plasmaeinheiten auch an AB-Patienten transfundiert, der restliche Anteil kommt bei Empfängern aller Blutgruppen zum Einsatz. [15] Zu Beginn einer en- oder pandemischen Situation wird der begrenzte Vorrat dieser „Universal“-Plasmen jedoch für die Patienten mit Blutgruppe AB benötigt, da diese nicht mit dem Plasma der Blutgruppe A, B und 0 kompatibel sind. Daher wurde in der Vergangenheit besonderes Augenmerk auf die Herstellung von Universal-Plasma durch Entfernung

der im Plasma der Blutgruppen A, B und 0 befindlichen Antikörper gegen A- und B-Blutgruppenantigene gelegt. Die bisherigen Verfahren basierten auf der Adsorption der Isoagglutinine an Blutgruppenantigenen auf dem Füllmaterial einer Säule (Glycorex®) oder auf Plasmaproteinen (Uniplas®). [12, 13, 16, 17] Bis jetzt konnte jedoch keine dieser Methoden dezentral in transfusionsmedizinischen Einrichtungen etabliert werden.

Für diese Arbeit ergaben sich daher zwei Fragestellungen:

1. Welchen Einfluss haben Pathogeninaktivierungsmethoden für humanes Frischplasma auf die Funktionalität von im Plasma enthaltenen Antikörpern?
2. Kann eine Methode zur Depletion von Isoagglutininen entwickelt werden, die in jeder transfusionsmedizinischen Einrichtung mit den dort vorhandenen Mitteln realisiert werden kann?

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sollten mögliche Lösungsansätze für diese beiden Probleme untersucht werden.

#### Zielstellungen

1. Beurteilung des Einflusses der Pathogeninaktivierung mittels Methylenblau auf Immunglobuline in gefrorenem Frischplasma
2. Entwicklung einer Methode zur Herstellung von isoagglutinindepletiertem Plasma mit den Mitteln einer transfusionsmedizinischen Einrichtung
  - a. Anmeldung der Methode zum Patent
  - b. Beantragung einer Erweiterung der Herstellungserlaubnis
  - c. Beantragung einer Zulassung

## 2 Ergebnisse und Diskussion

### 2.1 Einfluss der Pathogeninaktivierung mittels Methylenblau auf die Integrität der Immunglobuline M und G

**Raster J**, Zimmermann K, Wesche J, Aurich K, Greinacher A, Selleng K. Effect of Methylene Blue Pathogen Inactivation on the Integrity of Immunoglobulin M and G. *Transfus Med Hemother.* 2021;48:148-153

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proben vor und nach Pathogeninaktivierung mit dem Theraflex®-MB-Verfahren untersucht. Um den Einfluss der Behandlung auf die Integrität der Immunglobuline M (IgM) und G (IgG) zu untersuchen wurde der IgM und IgG Isoagglutinin-Titer mittels der Gelkarten-Technik, die Bindung von Antikörpern an Epstein-Barr-Virus- (EBV) und Tetanus-Toxin-Antigene mittels ELISA und die Bindung von Fc $\gamma$  an Fc $\gamma$ -Rezeptoren auf THP-1 Zellen an einem Durchflusszytometer untersucht. EBV- und Tetanus-Toxin-Antikörper dienen hier als im Menschen ubiquitär vorkommende Modellantikörper.

Es konnte gezeigt werden, dass die Pathogeninaktivierung mit Methylenblau keinen signifikanten Einfluss auf den IgM und IgG Isoagglutintiter hat (Abbildung 1). Die Bindung von IgG an EBV- und Tetanus-Toxin-Antigene (Abbildung 2) Fc $\gamma$  an Fc $\gamma$ -Rezeptoren (Abbildung 3) wurde nicht signifikant reduziert.

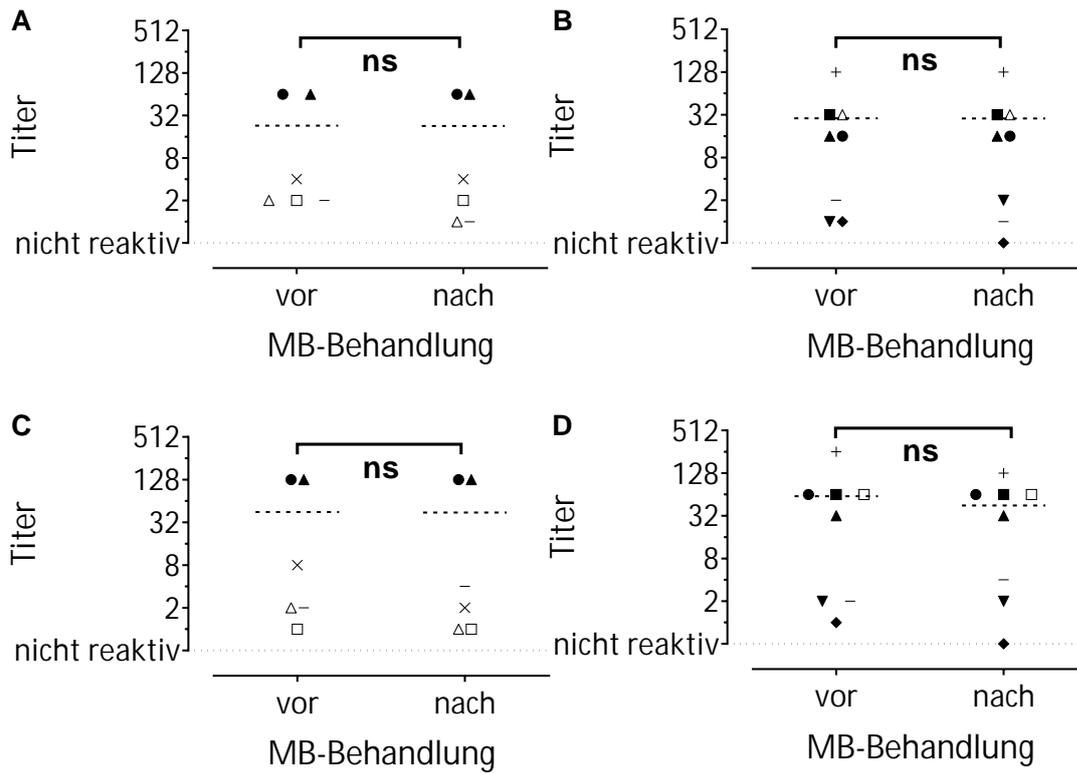


Abbildung 1: Anti-A und anti-B Isoagglutinititer vor und nach der Pathogenreduktion mit MB. Die Titer wurden mit Gelkarten ohne (A, B) und mit (C, D) anti-human-globulin bestimmt. A und C zeigen den anti-A Titer der Proben mit Blutgruppe 0 und B. B und D zeigen den anti-B Titer der Proben mit Blutgruppe 0 und A. (Blutgruppe A, n = 4; Blutgruppe B, n = 2; Blutgruppe 0, n = 4; Median)

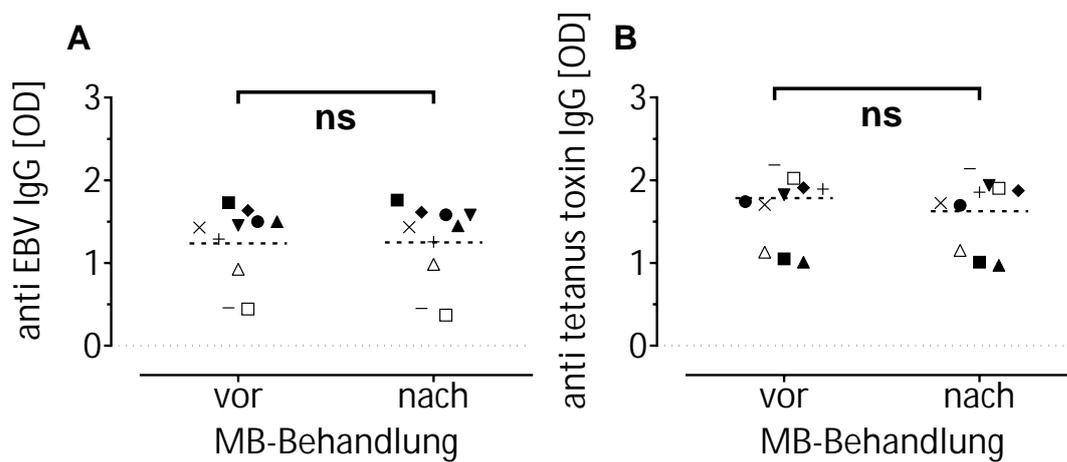


Abbildung 2: Gemessene OD für EBV- (A) und Tetanus-Toxin-spezifische (B) Bindung von IgG (n = 10; Median).

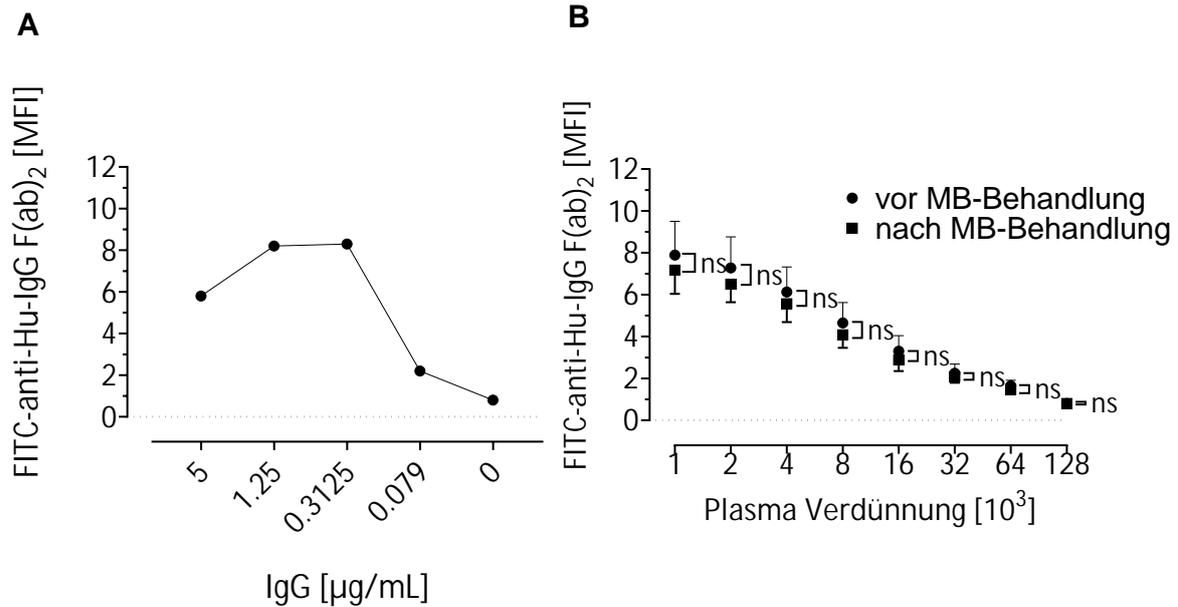


Abbildung 3: Bindung von Fc $\gamma$  an Fc $\gamma$ -Rezeptoren auf der Oberfläche von THP-1 Zellen. **(A)** IVIG wurde als Positiv-Kontrolle verwendet. Eine Bindung konnte ab einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{g/ml}$  beobachtet werden ( $n = 1$ ; Referenz für humanes Frischplasma:  $7\text{-}16 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$ ). **(B)** Die Bindung von IgG an Fc $\gamma$ -Rezeptoren war vor und nach MB-Behandlung nicht signifikant unterschiedlich ( $n = 10$ , Mittelwert  $\pm$  SD), ns=nicht signifikant

Die Pathogenreduktion mittels MB-Behandlung ist ein gut untersuchtes Verfahren, welches in Deutschland zur Bearbeitung von humanem Frischplasma zugelassen ist. [18] Der Einfluss der Behandlung auf qualitätsrelevante Parameter für die konventionelle Nutzung von humanem Frischplasma für die Behandlung von Koagulopathien ist gering und gut untersucht. Die Methode hat nur einen geringen Einfluss auf die Funktionalität der im Plasma enthaltenen Gerinnungsfaktoren, den von-Willebrandt-Faktor und die Proteine C und S. [19–21]

Für die Verwendung von humanem Plasma als Rekonvaleszentenplasma ist jedoch die Integrität der enthaltenen Immunglobuline essenziell. Diese Fragestellung wurde zuerst im Rahmen dieses Promotionsprojektes bearbeitet. [22] In nachfolgenden Studien wurde gezeigt, dass bei der Pathogenreduktion von COVID-19-Rekonvaleszentenplasma die neutralisierenden Antikörper nicht unter wirksame Titer reduziert werden. [23, 24] Eine Studie von Kostin et al. vergleicht den Abfall des Titers neutralisierender Antikörper gegen das SARS-CoV-2 Virus nach der Behandlung mit drei verschiedenen Methoden zur Pathogeninaktivierung. [25] Werden nur die für die Therapie geeigneten Plasmaeinheiten mit einem Titer von über 80 betrachtet, kommt es nach MB-Behandlung bei lediglich 19 % der Einheiten zu einem Abfall des Titers um eine Stufe ( $n=53$ ). Nach Behandlung mit Amotosalen

und UV-A-Strahlung (Intercept®-Verfahren) kommt es bei 40 % der Einheiten zu einem Abfall um eine Stufe (n=55), während nach der Behandlung mit Riboflavin und UVB-Bestrahlung (Mirasol®-Verfahren) 50 % der behandelten Einheiten einen Abfall um eine, 7 % sogar einen Abfall um zwei Titerstufen zeigen (n=33). [20]

Nach aktuellem wissenschaftlichem Stand ist von den drei zugelassenen Methoden die Pathogenreduktion mittels MB-Behandlung am besten zur Bearbeitung von SARS-CoV-2 Rekonvaleszentenplasma geeignet.

Das PEI hat am 17.02.2021 ein Stufenplanverfahren eröffnet, um den Nutzen der Quarantänelagerung für gefrorenes Frischplasma, lyophilisiertes Plasma und kryokonservierte Erythrozytenkonzentrate zu überprüfen. Am 15.06.2022 wurde die Stufe 2 des Verfahrens eingeleitet. [26] Es wurden zwei mögliche Maßnahmen definiert, welche im Rahmen der Anhörung diskutiert werden sollen:

1. Die Aufhebung der Quarantänelagerung von gefrorenem Frischplasma, lyophilisiertem Plasma und kryokonserviertem Erythrozytenkonzentrat und die Etablierung eines neuen Sicherheitsstandards für das Spender-Screening. Für die Festlegung des Sicherheitsstandards wurden LoD-Werte gewählt, die im Bereich der geringsten Nachweisgrenzen (aufgerundete Werte) liegen, die von den an der Umfrage beteiligten Spendeinrichtungen angegeben wurden.
  - a. HIV-Nachweis: serologische Einzelspender-Testung auf Anti-HIV-1/2-Antikörper plus ein Minipool-HIV-NAT-Screening mit einer nachgewiesenen LOD  $\leq 3.300$  IU/ml bezogen auf die Einzelspende.
  - b. HCV-Nachweis: serologische Einzelspender-Testung auf Anti-HCV-Antikörper plus ein Minipool-HCV-NAT-Screening mit einer nachgewiesenen LOD  $\leq 1.900$  IU/ml bezogen auf die Einzelspende.
  - c. HBV-Nachweis: serologische Einzelspender-Testung auf HBs-Antigen und Anti-HBcAntikörper plus ein zusätzliches Minipool-HBV-NAT-Screening mit einer nachgewiesenen LOD  $\leq 900$  IU/ml bezogen auf die Einzelspende.
2. Beibehaltung der bisherigen Quarantänelagerung von gefrorenem Frischplasma, lyophilisiertem Plasma und kryokonserviertem Erythrozytenkonzentrat von 4 Monaten bei einer Beibehaltung der bisher geltenden Nachweisgrenzen für das NAT-Screening.

Sollte das PEI zu dem Schluss kommen, die Quarantänelagerung bei Absenkung der geforderten Nachweisgrenze abzuschaffen, wird die Pathogenreduktion zur zügigen Versorgung von Risiko-Patienten mit Rekonvaleszentenplasma nicht mehr benötigt. Zu Beginn der massenhaften Verbreitung eines neuartigen Pathogens mit unbekanntem Infektionsweg, insbesondere aber von pathogenen die hämatogen übertragen werden, bleibt die Pathogenreduktion jedoch weiterhin relevant. Die während der SARS-CoV-2 Pandemie gewonnenen wissenschaftlichen Erkenntnisse bilden eine solide Basis für die Verwendung von pathogenreduziertem Rekonvaleszentenplasma für kommende pan- und endemische Ereignisse.

## **2.2 Isoagglutinindepletion von humanem Frischplasma zur AB0-Blutgruppen unabhängigen Transfusion**

**Raster J**, Jacob M, Greinacher A, Aurich K. Plasma Isoagglutinin Depletion for Blood Group Independent Plasma Transfusion. *Transfus Med Hemother*. Published online: February 4, 2022

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode zur Depletion der Isoagglutinine aus Plasma im geschlossenen System entwickelt. Das Prinzip der Depletion ist eine Adsorption der Antikörper an Antigenen auf der Oberfläche von Erythrozyten. Für Durchführung der Methode werden drei Einheiten humanes Frischplasma mit einem Aliquot eines Erythrozytenkonzentrates (EK) gepoolt und inkubiert. Der gebildete Antikörper-Erythrozyten-Immunkomplex wird später durch Zentrifugation vom Plasma getrennt. Um die Qualität des behandelten humanen Frischplasmas zu kontrollieren, wurden die IgM und IgG Isoagglutinin-Titer, die Aktivität der Gerinnungsfaktoren V, VIII und XI, die Resterythrozytenzahl und die mikrobiologische Qualität bestimmt. Um das Ausmaß der während der Verarbeitung aufgetretenen Hämolyse von Erythrozyten beurteilen zu können, wurde auch das freie Hämoglobin bestimmt.

In einem ersten Schritt wurden die Isoagglutinititer verschiedener Plasmen bestimmt. Dabei zeigte sich, dass diese in Plasma der Blutgruppe A niedriger sind als in Plasma der Blutgruppe B. Plasma der Blutgruppe 0 zeigt die höchsten Isoagglutinititer und beinhaltet als einziges der drei Blutgruppen höhere Titer an IgG, als IgM Antikörper (Abbildung 4). Diese Ergebnisse stimmen mit der Angabe in der Literatur überein. [27]

Im nächsten Schritt wurde das Volumen an EK ermittelt, welches zu Depletion der Isoagglutinine benötigt wird. Vor der Behandlung ganzer Plasmaeinheiten wurde das benötigte Volumen an EK an kleinen Pools von 4 ml Plasma bestimmt. Die anti-B Isoagglutinine aus einem Pool von 4 ml Plasma der Blutgruppe A konnten mit 200  $\mu$ L EK der Blutgruppe B ausreichend auf  $\leq 1:2$  depletiert werden (Abbildung 4A). Für einen Pool der Blutgruppe B wurden 300  $\mu$ L EK der Blutgruppe A benötigt (Abbildung 4B), um den anti-A Titer auf  $\leq 1:16$  zu senken, während für einen Pool der Blutgruppe 0 400  $\mu$ L EK der Blutgruppe AB ausreichten, um den anti-A Titer auf  $\leq 1:16$  zu senken, während der anti-B Titer in einem Fall nur auf 1:32 gesenkt werden konnte (Abbildung 4C). Das für die Behandlung ganzer Plasma-Einheiten (300 ml) benötigte Volumen wurde später von diesen Daten aus extrapoliert. Somit werden für die Depletion der Isoagglutinine pro Plasmaeinheit 15 ml EK der Blutgruppe B für Plasma der Blutgruppe A, 23 ml EK der Blutgruppe A für Plasma der Blutgruppe B oder 30 ml EK der Blutgruppe AB für Plasma der Blutgruppe 0 benötigt.

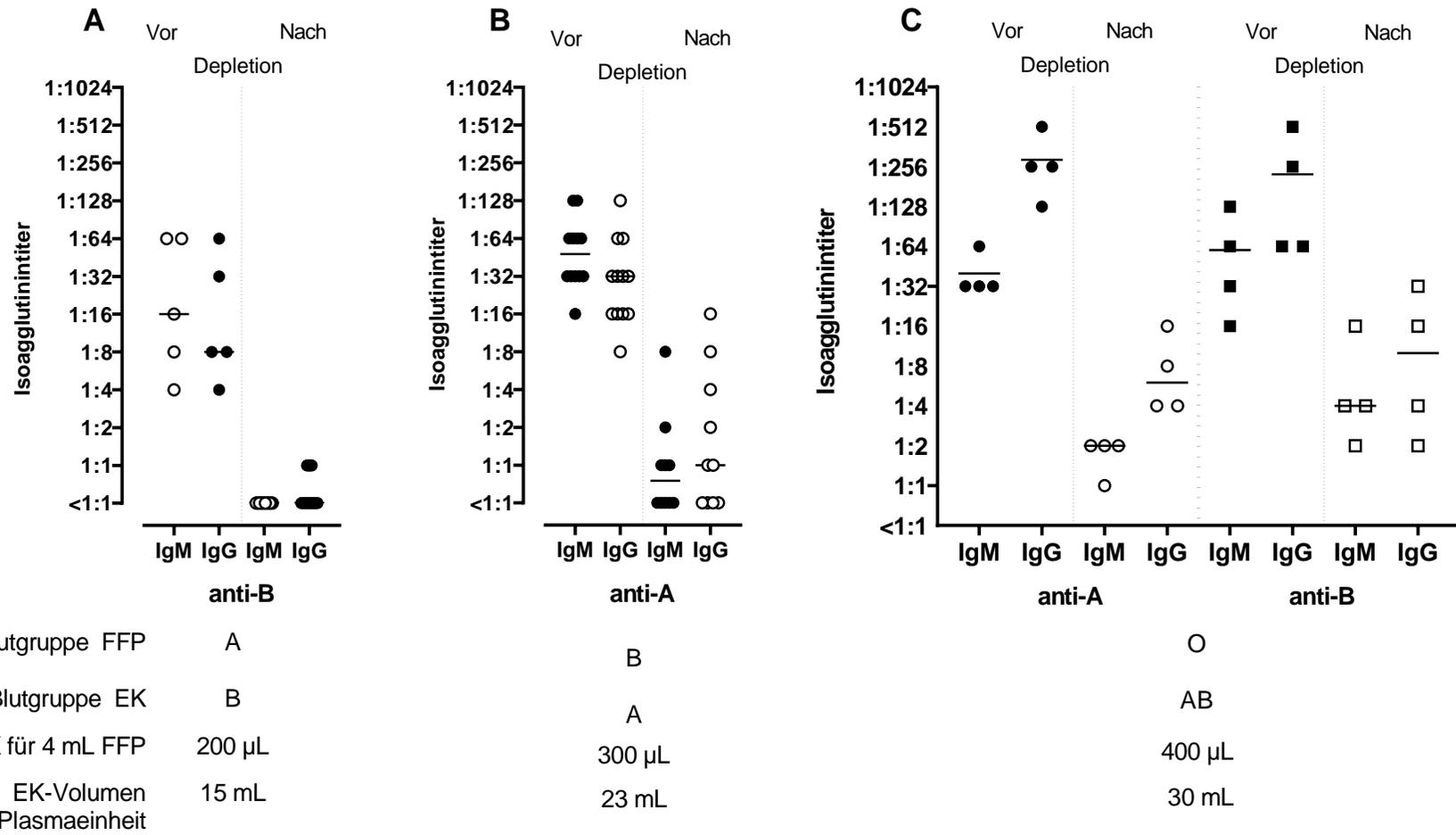
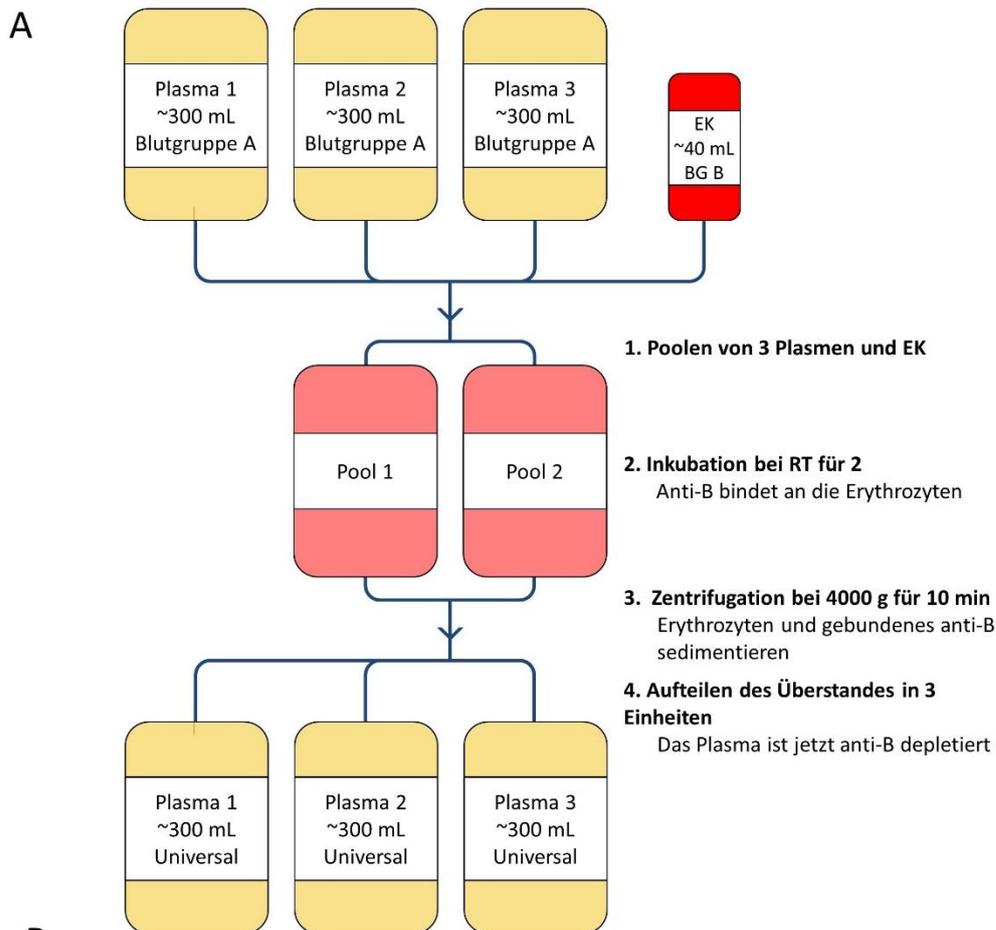


Abbildung 4: IgM und IgG Isoagglutininintiter vor und nach Behandlung kleiner Pools (4 ml) von (A) Plasma der Blutgruppe A mit Erythrozytenkonzentrat der Blutgruppe B, (B) Plasma der Blutgruppe B mit Erythrozytenkonzentrat der Blutgruppe A und (C) Plasma der Blutgruppe 0 mit Erythrozytenkonzentrat der Blutgruppe AB. Das für eine ganze Einheit benötigte Erythrozytenkonzentratvolumen wurde aus den Ergebnissen der kleinen Pools extrapoliert. (Median)

Nach Ermittlung des benötigten EK-Volumens wurde eine Herstellungsmethode entwickelt, in der gleichzeitig drei isoagglutinindepletierte Plasmaeinheiten in einem geschlossenen Beutelsystem hergestellt werden können (Abbildung 5A).

Für die Durchführung wurde ein Beutelsystem zum Poolen von drei Plasmen und einem Aliquot EK entwickelt (Abbildung 5B), die zusammen in zwei 500-ml-Beutel gepoolt. Anschließend ruht das Plasma-EK-Gemisch für zwei Stunden bei Raumtemperatur, um die Adsorption der Isoagglutinine an die Blutgruppenantigene zu ermöglichen. Nach der Inkubation wird das Plasma-Erythrozyten-Gemisch für 10 Minuten bei 4000 g zentrifugiert. Dabei sedimentieren die Erythrozyten mit den daran gebundenen Isoagglutininen und können durch Abpressen des Plasmas von diesem getrennt werden. Das erhaltene Plasma wird nun gleichmäßig zwischen den Beuteln der Ausgangs-Plasmen aufgeteilt und wieder eingefroren.



**B**

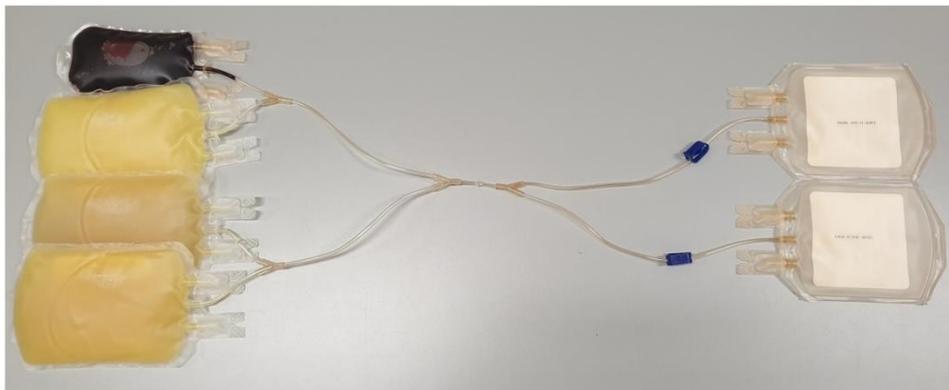


Abbildung 5: (A) Schematische Darstellung des Prozesses der Herstellung von Universalplasma. (B) Entwickeltes geschlossenes Beutelsystem.

Im Rahmen der Isoagglutinindepletion von zwölf Plasmaeinheiten der Blutgruppe A in vier Pools wurde der anti-B-Titer erfolgreich auf  $\leq 1:1$  gesenkt (Tabelle 1). Bei der Qualitätskontrolle wurde eine Erhöhung des freien Hämoglobins von  $26,0 \pm 15,0 \mu\text{mol/l}$  auf  $53,7 \pm 4,7 \mu\text{mol/l}$  beobachtet (Tabelle 2).

Tabelle 1: Qualitätskontrolldaten der hergestellten anti-B depletierten Plasmen der Blutgruppe A

\*Für die Isoagglutinindepletion wurden gefrorene Plasmaeinheiten aufgetaut, behandelt und wieder eingefroren. Die Untersuchung der Gerinnungsfaktoren erfolgte an wieder aufgetautem behandeltem Plasma um den Anwendungsfall zu simulieren.

Pool [#]	Plasmaeinheit [#]	Gewicht der einzelnen Plasmaeinheit [g]	Rest- Erythrozyten [x 10 <sup>9</sup> /l]	Freies Hämoglobin [µmol/l]	Faktor V* [%]	Faktor VIII* [%]	Faktor XI* [%]	Mikrobiologische		
								Kontrolle	Anti-B titer IgM IgG	
1	1	302	0	55.8	84	93.7	81	Sterile	< 1:1	< 1:1
	2	282								
	3	290								
2	4	298	0	47.2	84	119.8	88	Sterile	< 1:1	< 1:1
	5	306								
	6	301								
3	7	296	0	52.2	99	112.2	92	Sterile	< 1:1	< 1:1
	8	299								
	9	289								
4	10	320	0	59.5	85	102	75	Sterile	1:1	1:1
	11	337								
	12	234								

Tabelle 2: Qualitätskontrolldaten der hergestellten anti-B depletierten Plasmen der Blutgruppe A im Vergleich zu unbehandelten Plasmaeinheiten

	<b>Plasma Blutgruppe A vor der Isoagglutinin- depletion (nach dem ersten Auftauvorgang, n=12, Mittelwert±SD)</b>	<b>Plasma Blutgruppe A nach der Isoagglutinin- depletion (nach dem zweiten Auftauvorgang, n=12, Mittelwert±SD)</b>	<b>Statistische Differenz</b>
<b>Resterythrozyten [x10<sup>9</sup>/l]</b>	0.5±0.08	0	p>0.05
<b>Freies Hämoglobin [µmol/l]</b>	26.0±15.0	53.7±4.7	p<0.001
<b>Gerinnungsfaktor V [%]</b>	97.8±7.3	96.3±7.8	p>0.05
<b>Gerinnungsfaktor VIII [%]</b>	107.3±15.3	102.8±16.6	p>0.05
<b>Gerinnungsfaktor XI [%]</b>	95.7±20.1	94.8±19.6	p>0.05

Auf der Basis mehrerer Studien, welche bei AB0-inkompatiblen Transfusionen von Plasma mit einem Isoagglutinititer von ≤1:16 kein erhöhtes Risiko für transfusionsbedingte unerwünschte Ereignisse fanden, wurden Richtlinien für die Plasmatherapie im Notfall geschaffen. [28–31] Eine Reduktion des Isoagglutinititers auf Werte unter 1:16 wurde daher als ausreichend angesehen.

Der einzige signifikant veränderte Qualitätsparameter ist das erhöhte freie Hämoglobin. Dieser Wert ist ein Hinweis auf eine geringgradige Hämolyse während des Prozesses. Die Richtlinie Hämotherapie empfiehlt keinen Grenzwert für freies Hämoglobin in Plasma. [8] Für EK wird eine Hämolyserate von bis zu 0,8 %, das entspricht im Mittel 220 µmol/l freies Hämoglobin, als sicher angesehen. Der in dieser Studie bestimmte Wert beträgt mit 53,7±4,7 µmol/l ca. ein Viertel dieses Grenzwertes.

Das Paul-Ehrlich-Institut (PEI) fordert in Modul 3 der Zulassungsunterlagen für Blutprodukte die Analyse der Gerinnungsfaktoren V, VIII, XI bei Neuzulassung von Plasmen. Die Aktivität der Gerinnungsfaktoren V, VIII und XI ist in den mit der entwickelten Methode hergestellten Plasmen nicht signifikant vermindert.

Andere Studien zur Stabilität der Plasmaqualität während der Lagerung bei - 24 °C oder - 74 °C oder bei der Lagerung bei 4 °C in einer Flüssigplasmabank nach dem Auftauen bestimmten außerdem Fibrinogen, Protein S, Protein C, das von-Willebrandt-Antigen, Antithrombin und die Gerinnungsfaktoren II, VII, IX, X, XII und XIII. [19, 32] In diesen Studien wurden die Faktoren V, VIII und XI als die instabilsten

Gerinnungsfaktoren identifiziert. Das deckt sich auch mit der Angabe in der Literatur. [33–35]

Das Poolen von Blutbestandteilen zur Herstellung von Thrombozytenkonzentraten ist in der Transfusionsmedizin weit verbreitet. [36] Aus der Kombination von Material mehrerer Spender ergibt sich ein theoretisch erhöhtes Risiko der Übertragung von Pathogenen. [37] Um das Risiko so gering wie möglich zu halten, werden für die Herstellung von Isoagglutinin-depletiertem humanem Frischplasma nur Quarantäne-gelagerte Plasmaeinheiten verwendet. Diese Plasmen werden erst zur Verwendung am Patienten freigegeben, wenn der Spender eine für Infektionskrankheiten negativ getestete Folgespende geleistet hat. Werden dann im Nachgang die drei aus einem Pool gewonnenen Plasmaeinheiten an den gleichen Patienten ausgegeben, erhöht sich die Spenderexposition nur geringgradig. Für eine Erhöhung der Infektionssicherheit können die Plasmaeinheiten nach der Isoagglutinindepletion zusätzlich Pathogen-inaktiviert werden.

Die Herstellung von „Universal-Plasma“ kann mit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode je nach Bedarf und Kapazität in kurzer Zeit vor Ort in einer transfusionsmedizinischen Einrichtung durchgeführt werden. Diese Eigenschaft stellt den größten Vorteil gegenüber dem kommerziell nicht mehr erhältlichen Uniplas® dar. [38] Zur Herstellung von Uniplas® werden große Mengen Plasma im Verhältnis 70 % A-Plasma, 20 % B-Plasma und 10 % AB-Plasma gepoolt. Die enthaltenen Isoagglutinine bilden stabile Immunkomplexe mit den A- und B-Antigenen auf den enthaltenen Proteinen. Anschließend wird der Pool mittels Solvent/Detergent-Verfahren pathogeninaktiviert. [39] Für die Durchführung dieser Methode werden spezialisierte industrielle Anlagen benötigt. Das verhindert die dezentrale Etablierung der Herstellung von Uniplas® in transfusionsmedizinischen Einrichtungen.

Die Firma Glycorex entwickelt das Glycosorb® UBP-System zur Depletion von Isoagglutininen aus Plasma. Das System besteht aus einer kleinen Säule mit einem Packungsvolumen von 4 ml. Die feste Phase ist mit A- und B-Antigenen beschichtet, welche die Isoagglutinine binden und in der Säule zurückhalten. [16, 17] Mit einer Säule können bis zu 700 ml Plasma behandelt werden, eine mehrfache Benutzung wird aufgrund einer Reduktion der Bindungsspezifität und beeinflusster Sterilität nicht empfohlen. Um das prozessierbare Plasmavolumen auszureizen, müssten auch für die Depletion mit einer Glycosorb® UBP-Säule drei Plasmaeinheiten gepoolt werden.

Die Donorexposition ist bei dieser Methode geringer als bei der Depletion mit Erythrozyten. Jedoch liegen die Kosten für drei behandelte Plasmaeinheiten mit der Glycosorb® UBP-Methode bei 372,00 €, während die Behandlung mit Erythrozyten nur 272,70 € bis 345,30 € kostet (siehe Tabelle 3). Die Kosten für die Behandlung mit Erythrozyten variieren je nachdem, wie viele Aliquots aus einem EK gewonnen werden. Die Gewinnung nur eines einzelnen Aliquots würde die Gesamtkosten des EK auf nur einen Herstellungsschritt konzentrieren. In der Praxis wäre eine Gewinnung eines einzelnen Aliquots wirtschaftlich und praktisch nicht sinnvoll.

Tabelle 3: Vergleich der Materialkosten der Behandlung von drei Plasmaeinheiten mit der Erythrozyten-Methode und der Glycosorb® UBP-Methode

Erythrozyten Methode		Glycosorb® UBP	
Material	Kosten (€)	Material	Kosten (€)
Plasma 1	71,60	Plasma 1	71,60
Plasma 2	71,60	Plasma 2	71,60
Plasma 3	71,60	Plasma 3	71,60
Erythrozytenkonzentrat	17,7 – 88,5	Glycosorb® UBP-Säule	150,00
Schlauchspinne	18	4x Schweißnaht	7,20
Zweifach-500ml-Beutelsystem	15		
4 x Schweißnaht	7,20		
Summe	272,70 - 345,30	Summe	372,00

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode zur Depletion von Isoagglutininen aus Plasma ist somit in jeder transfusionsmedizinischen Einrichtung mit Standardequipment kostengünstig durchzuführen.

Die für die entwickelte Methode relevanten A- und B-Antigene befinden sich auf der Oberfläche der Zellmembran. Während der Lagerung der EK kommt es zu biochemischen und morphologischen Veränderungen der Erythrozyten, sogenannte „storage lesions“. [40] Ein Teil dieser storage lesions sind die Abschnürung von Mikrovesikeln von den Erythrozyten. [41] Somit kann es zu einer Reduktion der Membranoberfläche und damit zu einer Reduktion der A- und B-Antigene auf den Erythrozyten kommen. Weiter kann die von Beginn an vorhandene Menge an A- und B-Antigenen von Spender zu Spender variieren. Der Einfluss des Alters des EK und

die Donorvariabilität auf die Antigenmenge und somit die Effektivität der Isoagglutinindepletion muss weiter untersucht werden. Erste Ergebnisse zeigen weitestgehend eine konstante B-Antigen-Expression über die gesamte Lagerdauer (Abbildung 6).

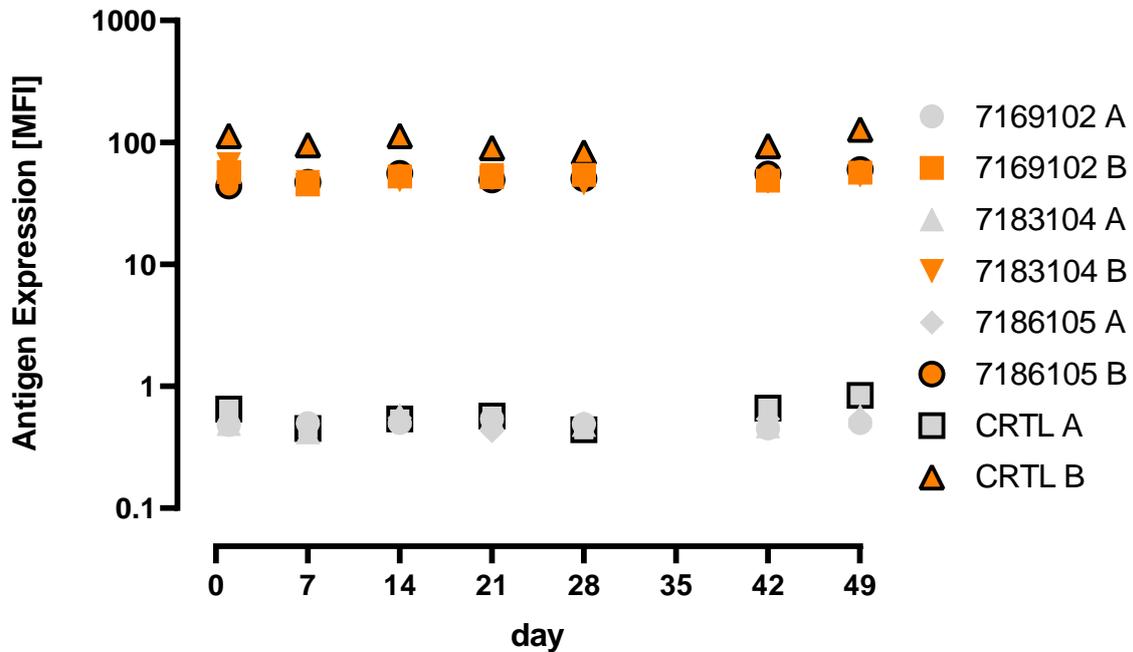


Abbildung 6: Expression der A- und B-Antigene auf Erythrozyten der Blutgruppe B über den Verlauf der Laufzeit von 49 Tagen. (n=3)

Die donorspezifische Variabilität der B-Antigen-Expression zeigt keine starke Abhängigkeit zur Effektivität der Depletion von anti-B-Isoagglutininen aus einem hochtitrigen Plasma (Abbildung 7).

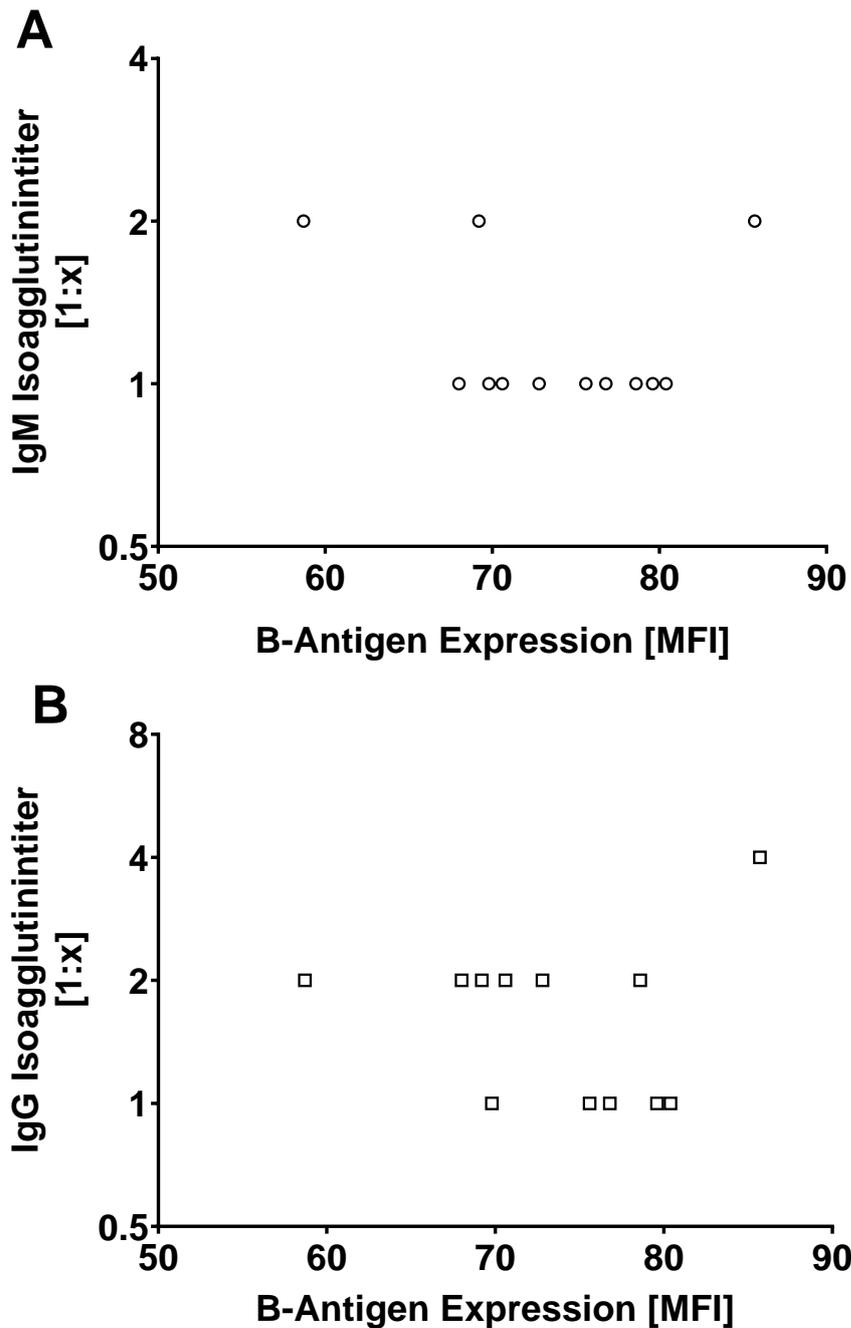


Abbildung 7: Darstellung der verbleibenden anti-B-Isoagglutinititer nach der Behandlung eines anti-B-Hochtiter Plasmas (Ursprünglich: IgM 1:64; IgG 1:128). (A) zeigt den verbleibenden IgM-Titer. (B) zeigt den verbleibenden IgG-Titer. (n=12)

Nach abgeschlossener Entwicklung der Methode wurde ein Antrag auf Erweiterung der Herstellungserlaubnis gem. §13 AMG bei der Landesarzneimittelbehörde gestellt. Ein Antrag auf Zulassung von Isoagglutinin-depletiertem humanem Frischplasma gem. §21 AMG zur Einreichung bei der Bundesoberbehörde, dem PEI, befindet sich in Vorbereitung.

Für die Methode wurde am 07.04.22 durch das Deutsche Patent- und Markenamt ein Patent erteilt (Patent-Nr. 10 2020 212 609).

## **Limitationen**

Es gibt noch Limitationen der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode zur Depletion von Isoagglutininen aus humanem Frischplasma.

Die aufgetretene Hämolyse (Tabelle 2) kann mit der Bildung potentiell immunogener Mikrovesikel und somit dem Risiko einer Allo-Immunsierung einhergehen. [42–44]

Eine stattgefundene Allo-Immunsierung kann bei zukünftig notwendigen Transfusionen die Versorgung des behandelten Patienten erschweren. Ob tatsächlich immunogene Mikrovesikel gebildet werden muss in weiteren Untersuchungen gezeigt werden.

Weiter folgt die Untersuchung der Gerinnungsfaktoren V, VIII und XI in den behandelten Plasmen zwar der Empfehlung des PEI, jedoch ist diese Untersuchung nicht ausreichend um den Einfluss des Verfahrens auf die Qualität des Plasmas vollumfänglich beurteilen zu können. Im Rahmen der Validierung des Prozesses für die Erweiterung der Herstellungserlaubnis und die Erteilung der Zulassung sollten weitere Parameter untersucht und eine Anwendungsbeobachtung für die Beurteilung der Wirksamkeit und Sicherheit durchgeführt werden.

### 3 Zusammenfassung

Im Falle einer neuen, sich rasch ausbreitenden viralen Erkrankung empfiehlt die WHO die Verwendung von Blutplasma von bereits Genesenen (Rekonvaleszentenplasma) zur ersten Therapie bevor Impfstoffe entwickelt werden können, da dieses Plasma bereits Immunglobuline gegen den Erreger enthält. In dieser zeitkritischen Situation kann die von der deutschen Richtlinie für Hämotherapie geforderte Quarantänelagerung für Plasmen für mindestens vier Monate nicht immer eingehalten werden. Eine Alternative zur Quarantänelagerung stellen Verfahren zur Pathogeninaktivierung des Plasmas dar. Es muss jedoch sichergestellt werden, dass die enthaltenen Immunglobuline durch die Pathogeninaktivierung nicht beeinträchtigt werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Pathogeninaktivierung von Plasma mittels Methylenblau-Behandlung keinen signifikanten Einfluss auf Immunglobuline M und G hat. Die Ergebnisse können die Sicherheit der Verwendung von Rekonvaleszentenplasma zu Beginn einer Ausbreitung einer viralen Erkrankung deutlich erhöhen.

Blutplasma muss generell blutgruppenkompatibel transfundiert werden, um Blutgruppeninkompatibilitäten durch enthaltene gegen die Blutgruppenantigene A und B gerichtete Antikörper (Isoagglutinine) zu vermeiden. Plasma von Spendern der Blutgruppe AB enthält keine Isoagglutinine und kann somit Patienten aller Blutgruppen transfundiert werden. Der Anteil der Spender in der mitteleuropäischen Bevölkerung mit Blutgruppe AB ist mit 4 % jedoch sehr gering. Daher besteht der Bedarf Isoagglutinine aus Plasma der Blutgruppe A, B und 0 zu entfernen, um dieses „universell“ transfundierbar zu machen. Das so hergestellte Isoagglutinin-depletierte Plasma kann auch für Notfalltransfusionen bei Patienten mit unbekannter Blutgruppe angewendet werden. Kleinere Krankenhäuser können ihre Logistik effizienter gestalten und lediglich diese Art von Plasma bevorraten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ein geschlossenes Beutelsystem und ein Prozess entwickelt, welcher die Depletion von Isoagglutininen aus Plasma mit Mitteln ermöglicht, die in jeder transfusionsmedizinischen Einrichtung vorhanden sind. Es konnte gezeigt werden, dass die Qualität des Plasmas der des bereits zugelassenen humanen gefrorenen Frischplasmas entspricht. Durch Pools im Herstellungsprozess können mehrere Plasmen gleichzeitig bereitgestellt werden. Das Verfahren hat das Potenzial, die klinische Praxis der Plasmatherapie zu beeinflussen.

## 4 Literaturverzeichnis

- 1 Roback JD, Caldwell S, Carson J, Davenport R, Drew MJ, Eder A, Fung M, Hamilton M, Hess JR, Luban N, Perkins JG, Sachais BS, Shander A, Silverman T, Snyder E, Tormey C, Waters J, Djulbegovic B: Evidence-based practice guidelines for plasma transfusion. *Transfusion* 2010;50:1227–1239.
- 2 Garraud O, Aubron C, Ozier Y, Coppo P, Tissot J-D: Plasma for direct therapeutic use, for today and tomorrow: A short critical overview. *Transfus Clin Biol* 2018;25:281–286.
- 3 Ehrlich P, Kossel H, Wassermann A: Ueber Gewinnung und Verwendung des Diphtherieheilserums. *Deutsche Medicinische Wochenschrift*;1894:353–355.  
[https://www.pei.de/SharedDocs/Downloads/DE/institut/veroeffentlichungen-von-paul-ehrlich/1886-1896/1894-gewinnung-verwendung-diphtherieheilserums.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=2](https://www.pei.de/SharedDocs/Downloads/DE/institut/veroeffentlichungen-von-paul-ehrlich/1886-1896/1894-gewinnung-verwendung-diphtherieheilserums.pdf?__blob=publicationFile&v=2).
- 4 WHO Blood Regulators Network: Position Paper on Use of Convalescent Plasma, Serum or Immune Globulin Concentrates as an Element in Response to an Emerging Virus 2017.
- 5 Chen L, Xiong J, Bao L, Shi Y: Convalescent plasma as a potential therapy for COVID-19. *The Lancet Infectious Diseases* 2020;20:398–400.
- 6 Bloch EM, Shoham S, Casadevall A, Sachais BS, Shaz B, Winters JL, van Buskirk C, Grossman BJ, Joyner M, Henderson JP, Pekosz A, Lau B, Wesolowski A, Katz L, Shan H, Auwaerter PG, Thomas D, Sullivan DJ, Paneth N, Gehrie E, Spitalnik S, Hod EA, Pollack L, Nicholson WT, Pirofski L, Bailey JA, Tobian AA: Deployment of convalescent plasma for the prevention and treatment of COVID-19. *J Clin Invest* 2020;130:2757–2765.
- 7 Duan K, Liu B, Li C, Zhang H, Yu T, Qu J, Zhou M, Chen L, Meng S, Hu Y, Peng C, Yuan M, Huang J, Wang Z, Yu J, Gao X, Wang D, Yu X, Li L, Zhang J, Wu X, Li B, Xu Y, Chen W, Peng Y, Hu Y, Lin L, Liu X, Huang S, Zhou Z, Zhang L, Wang Y, Zhang Z, Deng K, Xia Z, Gong Q, Zhang W, Zheng X, Liu Y, Yang H, Zhou D, Yu D, Hou J, Shi Z, Chen S, Chen Z, Zhang X, Yang X: Effectiveness of convalescent plasma therapy in severe COVID-19 patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2020;117:9490–9496.

- 8 Bundesärztekammer: Richtlinie zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten: Richtlinie Hämotherapie 2021.
- 9 Jeffrey McCullough: Pathogen Reduced Blood Products; in *Transfusion Medicine*, John Wiley & Sons, Ltd, 2021, pp 359–375.
- 10 Seghatchian J, Walker WH, Reichenberg S: Updates on pathogen inactivation of plasma using Theraflex methylene blue system. *Transfusion and Apheresis Science* 2008;38:271–280.
- 11 Wollowitz S: Fundamentals of the psoralen-based Helinx™ technology for inactivation of infectious pathogens and leukocytes in platelets and plasma. *Seminars in Hematology* 2001;38:4–11.
- 12 Goodrich RP, Edrich RA, Li J, Seghatchian J: The Mirasol PRT system for pathogen reduction of platelets and plasma: an overview of current status and future trends. *Transfusion and Apheresis Science* 2006;35:5–17.
- 13 Seltsam A, Müller TH: UVC Irradiation for Pathogen Reduction of Platelet Concentrates and Plasma. *Transfus Med Hemother* 2011;38:43–54.
- 14 Gitas G, Proppe L, Alkatout I, Tsolakidis D, Rody A, Kotanidis C, Baum S: Is ABO blood group a risk or prognostic factor for patients with endometrioid endometrial cancer? A retrospective analysis in Germany. *Blood Transfus* 2020;18:465–470.
- 15 Zeller MP, Barty R, Dunbar NM, Elahie A, Flanagan P, Garritsen H, Kutner JM, Pagano MB, Pogłód R, Rogers TS, Staves J, van Wordragen-Vlaswinkel M, Zwaginga JJ, Murphy MF, Heddle NM, Yazer MH: An international investigation into AB plasma administration in hospitals: how many AB plasma units were infused? The HABSWIN study. *Transfusion* 2018;58:151–157.
- 16 Rydberg L, Bengtsson A, Samuelsson O, Nilsson K, Breimer ME: In vitro assessment of a new ABO immunosorbent with synthetic carbohydrates attached to sepharose. *Transplant international official journal of the European Society for Organ Transplantation* 2005;17:666–672.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15551052/>.
- 17 Pavenski K, Bucholz M, Cheatley PL, Krok E, Anderson M, Prasad GR, Qureshi MA, Meliton G, Zaltzman J: The First North American Experience Using Glycosorb Immunoabsorption Columns for Blood Group-Incompatible Kidney Transplantation. *Can J Kidney Health Dis* 2020;7:2054358120962586.

- 18 Seghatchian J, Struff WG, Reichenberg S: Main Properties of the THERAFLEX MB-Plasma System for Pathogen Reduction. *Transfus Med Hemother* 2011;38:55–64.
- 19 Thiele T, Kellner S, Hron G, Wasner C, Nauck M, Zimmermann K, Wessel A, Warkentin TE, Greinacher A, Selleng K: Storage of thawed plasma for a liquid plasma bank: impact of temperature and methylene blue pathogen inactivation. *Transfusion* 2012;52:529–536.
- 20 Rock G: A comparison of methods of pathogen inactivation of FFP. *Vox Sanguinis* 2011;100:169–178.
- 21 Prowse C: Properties of pathogen-inactivated plasma components. *Transfusion Medicine Reviews* 2009;23:124–133.
- 22 Raster J, Zimmermann K, Wesche J, Aurich K, Greinacher A, Selleng K: Effect of Methylene Blue Pathogen Inactivation on the Integrity of Immunoglobulin M and G. *Transfus Med Hemother* 2021;48:148–153.
- 23 Focosi D, Franchini M: Impact of pathogen-reduction technologies on COVID-19 convalescent plasma potency. *Transfus Clin Biol* 2021;28:132–134.
- 24 Larrea L, Castro E, Navarro L, Vera B, Francés-Gómez C, Sánchez-Sendra B, Giménez Á, Castelló E, Collado M, Vayá M-J, Mirabet V, Callao V, Ortiz-de-Salazar M-I, Roig R, Geller R, Arbona C: Preservation of anti-SARS-CoV-2 neutralising antibodies in convalescent plasma after pathogen reduction with methylene blue and visible light. *Blood Transfus* 2021.
- 25 Kostin AI, Lundgren MN, Bulanov AY, Ladygina EA, Chirkova KS, Gintsburg AL, Logunov DY, Dolzhikova IV, Shcheblyakov DV, Borovkova NV, Godkov MA, Bazhenov AI, Shustov VV, Bogdanova AS, Kamalova AR, Ganchin VV, Dombrovskiy EA, Volkov SE, Drozdova NE, Petrikov SS: Impact of pathogen reduction methods on immunological properties of the COVID-19 convalescent plasma. *Vox Sanguinis* 2021;116:665–672.
- 26 Anhörung zur Bewertung des Nutzens der Quarantänelagerung für Langzeitkonservierbare Blutkomponenten (gefrorenes Frischplasma; lyophilisiertes Plasma; kryokonservierte Erythrozytenkonzentrate): Stufenplan: Stufenplan zur Abwehr von Arzneimittelrisiken (Stufe 2).  
<https://www.pei.de/SharedDocs/Downloads/DE/arzneimittelsicherheit/haemovigila>

nz/anhoerungen/2022-06-15-anhoerung-bewertung-nutzen-quarantaenelagerung-blut.pdf?\_\_blob=publicationFile&v=2.

- 27 Shim H, Hwang J-H, Kang S-J, Seo H-S, Park EY, Park KU, Kong S-Y: Comparison of ABO isoagglutinin titres by three different methods: tube haemagglutination, micro-column agglutination and automated immunohematology analyzer based on erythrocyte-magnetized technology. *Vox Sanguinis* 2020;115:233–240.
- 28 Isaak EJ, Tchorz KM, Lang N, Kalal L, Slapak C, Khalife G, Smith D, McCarthy MC: Challenging dogma: group A donors as "universal plasma" donors in massive transfusion protocols. *Immunohematology* 2011;27:61–65.
- 29 Zielinski MD, Johnson PM, Jenkins D, Goussous N, Stubbs JR: Emergency use of prethawed Group A plasma in trauma patients. *The journal of trauma and acute care surgery* 2013;74:69-74; discussion 74-5.
- 30 Solheim BG, Chetty R, Flesland O: Indications for use and cost-effectiveness of pathogen-reduced ABO-universal plasma. *Current opinion in hematology* 2008;15:612–617.
- 31 Chen G, Zhu L, Wang S, Zhuang Y, Yu Y, Wang D: Study on the immunological safety of universal plasma in the Chinese population in vitro. *Transfusion and apheresis science official journal of the World Apheresis Association official journal of the European Society for Haemapheresis* 2017;56:171–174. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27913225/>.
- 32 Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, Gourmelin Y: Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood coagulation & fibrinolysis an international journal in haemostasis and thrombosis* 2001;12:229–236.
- 33 Carlebjörk G, Blombäck M, Pihlstedt P: Freezing of plasma and recovery of factor VIII. *Transfusion* 1986;26:159–162.
- 34 Milam JD, Buzzurro CJ, Austin SF, Stansberry SW: Stability of factors V and VIII in thawed fresh frozen plasma units. *Transfusion* 1980;20:546–548.
- 35 Kakaiya RM, Morse EE, Panek S: Labile coagulation factors in thawed fresh frozen plasma prepared by two methods. *Vox Sanguinis* 1984;46:44–46.
- 36 Sicherheitsinformationen - Stellung-nahme des Paul-Ehrlich-Instituts (PEI) zur Sicher-heit von Pool-Thrombo-zyten-konzentraten (PTK) und Apherese-Thrombo-zyten-konzentraten (ATK), 2022.

<https://www.pei.de/DE/newsroom/veroeffentlichungen-arzneimittel/sicherheitsinformationen-human/2011/ablage2011/2011-11-29-haemovigilanz-stellungnahme-sicherheit-ptk-atk.html> (accessed May 25, 2022).

- 37 Schrezenmeier H, Seifried E: Buffy-coat-derived pooled platelet concentrates and apheresis platelet concentrates: which product type should be preferred? *Vox Sanguinis* 2010;99:1–15.
- 38 Noddeland H, Tølløfsrud S, Svennevig JL, Bentsen G, Brosstad F, Solheim BG: Universal solvent/detergent-treated fresh frozen plasma (Uniplas®)—rationale and clinical properties. *Thrombosis Research* 2002;107:S33-S37.
- 39 Tølløfsrud S, Noddeland H, Svennevig JL, Bentsen G, Mollnes TE, Solheim BG: Universal fresh frozen plasma (Uniplas): a safe product in open-heart surgery. *Intensive Care Med* 2003;29:1736–1743.
- 40 Daryl J. Kor, Camille M Van Buskirk, Ognjen Gajic: RED BLOOD CELL STORAGE LESION. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences* 2009;9:S21.
- 41 Chin-Yee I, Arya N, d’Almeida MS: The Red Cell Storage Lesion and its Implication for Transfusion. *Transfusion Science* 1997;18:447–458.
- 42 Rubin O, Canellini G, Delobel J, Lion N, Tissot J-D: Red blood cell microparticles: clinical relevance. *Transfus Med Hemother* 2012;39:342–347.
- 43 Karpman D, Ståhl A, Arvidsson I, Johansson K, Loos S, Tati R, Békássy Z, Kristoffersson A-C, Mossberg M, Kahn R: Complement Interactions with Blood Cells, Endothelial Cells and Microvesicles in Thrombotic and Inflammatory Conditions; in *Immune Responses to Biosurfaces*, Springer, Cham, 2015, pp 19–42.
- 44 Shkair L, Garanina EE, Stott RJ, Foster TL, Rizvanov AA, Khaiboullina SF: Membrane Microvesicles as Potential Vaccine Candidates. *International Journal of Molecular Sciences* 2021;22:1142.

## 5 Anhang

### 5.1 Publikationsliste

#### Zeitschriftenartikel:

- Raster J, Zimmermann K, Wesche J, Aurich K, Greinacher A, Selleng K: Effect of Methylene Blue Pathogen Inactivation on the Integrity of Immunoglobulin M and G. *Transfus Med Hemother* 2021;48:148-153.
- Raster J, Jacob M, Greinacher A, Aurich K: Plasma Isoagglutinin Depletion for Blood Group Independent Plasma Transfusion. *Transfus Med Hemother* 2022. doi: 10.1159/000521217
- Raster J, Greinacher A, Schönborn L: Risk of Blood Bag Lesions Induced by Standard Transfusion Devices. *Transfus Med Hemother* 2022. doi: 10.1159/000524376

#### Kongressbeiträge:

- DGTI-Kongress 2021, Abstract und Poster: **J. Raster**, K. Zimmermann, J. Wesche, K. Aurich, A. Greinacher, K. Selleng: Effect of methylene blue pathogen inactivation on integrity of immunoglobulin M and G. Abstract *Transfus Med Hemother* 2021
- DGTI-Kongress 2021, Abstract und Kurzvortrag: **J. Raster**, M. Jacob, A. Greinacher, K. Aurich: Facilitating blood group independent plasma transfusion. Abstract *Transfus Med Hemother* 2021
- DGTI-Kongress 2022, Abstract und Poster: **J. Raster**, A. Greinacher, K. Aurich: GMP conform production of isoagglutinin depleted human plasma for blood group independent transfusion. Abstract eingereicht
- DGTI-Kongress 2022, Abstract und Kurzvortrag: **J. Raster**, A. Greinacher, L. Schönborn: Risk of blood bag lesions induced by standard transfusion devices. Abstract eingereicht

## 5.2 Danksagung

Mein Dank gilt vor allem meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med Andreas Greinacher, für die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für Transfusionsmedizin durchzuführen. Die konstruktiven Diskussionen über Pläne, Ergebnisse und Manuskripte haben maßgeblich dazu beigetragen, dass diese Arbeit in dieser Form existiert. Dieses Forschungsprojekt zur Herstellung und Qualität von Arzneimitteln war eine hervorragende Erweiterung meiner Kenntnisse als Apotheker und hat mir das Handwerkszeug für eine systematische Herangehensweise an Projekte geliefert.

Auch bei Frau Dr. rer. nat. Konstanze Aurich möchte ich mich für die vielen Stunden des Brütens und der Diskussion über Arzneimittelrecht und -qualität, Daten, Manuskripten und dieser Dissertation bedanken. Danke, dass du immer ein offenes Ohr und praxisorientierte Lösungsansätze für mich hattest.

Frau PD Dr. med. Kathleen Selleng hat mir mit ihrer sorgfältigen Arbeitsweise und ihrem Auge für das Wesentliche immer wieder auf methodisch sichere Füße geholfen. Danke, dass du dich mit mir in Methoden, Ergebnisse und Manuskripte vertieft hast, um daraus etwas Gutes zu machen.

Ich möchte mich auch bei allen Mitarbeitern des Instituts für Transfusionsmedizin bedanken. Besonderer Dank gilt dabei Jan Wesche, der mir mit seiner Expertise stets zur Seite stand und ohne den diese Arbeit so wohl nicht zustande gekommen wäre. Weiter möchte ich mich bei allen Gastwissenschaftlern, Diplomstudenten, Famulanten und studentischen Hilfskräften bedanken, die mich auf meinem Weg begleitet haben. Danke an Federica Fumoso, Michelle Jacob, Anna Krawutschke, Pascal Rosendahl, Sofia Zharinova und Maximilian Reinhardt.

Besonderer Dank gilt auch meinen Eltern und meiner Partnerin Regine. Ihr unterstützt mich in allen Lebenslagen und bei allen Entscheidungen, motiviert mich, wenn ich nachlasse, und bremst mich, wenn ich unüberlegt voran presche. Danke!

## 5.3 Publikationen

# Effect of Methylene Blue Pathogen Inactivation on the Integrity of Immunoglobulin M and G

Johannes Raster<sup>a</sup> Kathrin Zimmermann<sup>b</sup> Jan Wesche<sup>a</sup> Konstanze Aurich<sup>a</sup>  
Andreas Greinacher<sup>a</sup> Kathleen Selleng<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Abteilung Transfusionsmedizin, Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin, Universitätsmedizin Greifswald, Greifswald, Germany; <sup>b</sup>Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsmedizin Greifswald, Greifswald, Germany

## Keywords

Pathogen inactivation · Methylene blue · Immunoglobulin G · Immunoglobulin M

## Abstract

**Introduction:** In the light of the ongoing SARS-CoV-2 pandemic, convalescent plasma is a treatment option for COVID-19. In contrast to usual therapeutic plasma, the therapeutic agents of convalescent plasma do not represent clotting factor activities, but immunoglobulins. Quarantine storage of convalescent plasma as a measure to reduce the risk of pathogen transmission is not feasible. Therefore, pathogen inactivation (e.g., Theraflex<sup>®</sup>-MB, Macopharma, Mouvoux, France) is an attractive option. Data on the impact of pathogen inactivation by methylene blue (MB) treatment on antibody integrity are sparse. **Methods:** Antigen-specific binding capacity was tested before and after MB treatment of plasma ( $n = 10$ ). IgG and IgM isoagglutinin titers were tested by agglutination in increasing dilutions. Furthermore, the binding of anti-EBV and anti-tetanus toxin IgG to their specific antigens was assessed by ELISA, and IgG binding to Fc receptors was assessed by flow cytometry using THP-1 cells expressing FcRI and FcRII. **Results:** There was no significant difference in the isoagglutinin titers, the antigen binding capacity of anti-EBV and anti-tetanus toxin IgG, as well as the Fc receptor binding capacity before and after MB treatment of plasma. **Conclusion:** MB treatment of plasma does not in-

hibit the binding capacity of IgM and IgG to their epitopes, or the Fc receptor interaction of IgG. Based on these results, MB treatment of convalescent plasma is appropriate to reduce the risk of pathogen transmission if quarantine storage is omitted.

© 2021 The Author(s)  
Published by S. Karger AG, Basel

## Introduction

Convalescent plasma is discussed as an option to treat patients with SARS, MERS, Ebola, and COVID-19 diseases [1–3]. Plasma of donors who have recovered from a viral infection contains pathogen-specific antibodies, which are used for passive immunization of acutely ill patients.

According to the national German guidelines, plasma donations have to be stored under quarantine for at least 4 months and can only be issued after consecutive negative testing for transfusion-transmitted pathogens [4]. Alternatively, plasma has to be pathogen inactivated. In a pandemic situation like the SARS-CoV-2 outbreak, convalescent plasma is used as supportive treatment [5–7]. Especially at the beginning of a pandemic, quarantine storage is not feasible as the plasma is required before the end of the quarantine period. Therefore, exceptions have been granted in regard to mandatory quarantine storage of non-pathogen-inactivated convalescent plasma.

Possible means of pathogen inactivation for plasma are a combination of amotosalen/UVA (e.g., Intercept<sup>®</sup> Blood System, Cerus, Concord, CA USA), riboflavin/UV (e.g., Mirasol<sup>®</sup> PRT, Terumo BCT Europe N.V., Leuven, Belgium), and methylene blue (MB)/visible light (e.g., Theraflex<sup>®</sup>-MB; Macopharma, Mouvoux, France) [8–10]. Phenothiazine-like dyes such as MB can induce the formation of singlet oxygen [11], which can alter protein structures. This is most likely the reason for the reduction in activity of some clotting factors (especially factor V and factor VIII) and fibrinogen caused by MB treatment [8, 12].

## Materials and Methods

### Study Design and Sample Preparation

Plasmapheresis was performed in healthy donors of different blood types. All plasma units were frozen within 6 h after collection and stored at  $-30^{\circ}\text{C}$ . After storage, plasma was thawed at  $37^{\circ}\text{C}$  for 1 h and split into 3 bioequivalent subunits of approximately 220 mL each. One was treated with MB/light according to the manufacturer's instructions (Macotronic B2, Macopharma; peak wavelength  $627 \pm 10$  nm,  $120$  J/cm<sup>2</sup>). Plasma samples were drawn from MB-treated and untreated plasma and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis.

### THP-1 Cells

The human monocytic cell line THP-1, expressing Fc $\gamma$ RI (CD64) and Fc $\gamma$ RII (CD32) but not Fc $\gamma$ RIII (CD16) [13], was obtained from the DSMZ (Braunschweig, Germany) and cultured in RPMI-1640 (PAN Biotech, Aidenbach, Germany) supplemented with 10% FBS Gold plus (Bio&Sell, Feucht/Nürnberg, Germany). Cells were washed once (140 g, 5 min), and resuspended in PBS/BSA (PBS buffer w/o Ca, Mg; pH 7.5; 0.22% BSA; Ortho Clinical), at  $10 \times 10^6$  cells/mL. Cell viability was monitored by 7AAD (flow cytometry, Beckmann Coulter Inc., Miami Lakes, FL, USA).

### Antigen-Specific Binding of IgM

IgM binding was assessed by isoagglutinin testing with red blood cells (RBCs). MB-treated and non-MB-treated plasma in 1:2 dilution series were incubated (RT, 15 min) with RBCs of blood type A and B using a microcolumn gel card system (ID-Card for NaCl, enzyme test and cold agglutinins, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. RBCs of blood type O were used as a negative control. Agglutination strengths were evaluated by 2 independent researchers. Antibody titer was defined as the last plasma dilution inducing agglutination. Relevant differences between MB treated and non-treated plasma were defined as antibody titers differing by 2 or more dilution steps.

### Antigen-Specific Binding of IgG

IgG binding was assessed by incubating MB-treated and non-MB-treated plasma, as follows. (1) In a 1:2 dilution series ( $37^{\circ}\text{C}$ , 15 min) with RBCs of blood type A and B using a microcolumn gel card system with human antiglobulin phase (ID-Card LISS/Coombs, Bio-Rad Laboratories Inc.) according to the manufacturer's instructions. RBCs of blood type O were used as negative controls. Agglutination strengths were evaluated by 2 independent researchers. Antibody titer was defined as the last plasma dilution inducing agglutination. Relevant differences between MB-treated and non-treated plasma were defined as antibody titers differing

by 2 or more dilution steps. (2) By reactivity of the plasma units (OD measurements) in an anti-EBV (Epstein-Barr virus)-IgG ELISA and an anti-tetanus toxin IgG ELISA (EBV VCA IgG/Tetanus IgG, Serion ELISA Classic, Virion, Würzburg, Germany) according to the manufacturer's instructions.

### Fc Part of IgG Binding to Fc Receptors

The influence of MB treatment on IgG-Fc binding to Fc receptors on THP-1 cells was assessed by flow cytometry (Cytomics FC 500, Beckmann Coulter Inc., Miami Lakes, USA). IVIG (Privigen<sup>®</sup>, CSL Behring GmbH, Hattersheim am Main, Germany) was used as positive control and buffer as negative control, as previously described [14]. In brief,  $100 \mu\text{L}$  ( $1 \times 10^5$ ) of THP-1 cells were incubated (30 min;  $4^{\circ}\text{C}$ ) with diluted (1:1,000 to 1:64,000) plasma samples or controls, washed and stained with  $100 \mu\text{L}$  of FITC-rabbit anti-Human IgG-F(ab')<sub>2</sub> fragment (Agilent, Santa Clara, USA, 1:75 in PBS/BSA; 30 min), washed twice and resuspended in  $500 \mu\text{L}$  of PBS/BSA and assessed by forward-sideward scatter gating.

### Statistics

The Mann-Whitney test (GraphPad Prism 8.0.1) was used for statistical analysis of the isoagglutinin titer test results. The Wilcoxon test (GraphPad Prism 8.0.1) was used for statistical analysis of the EBV and tetanus toxin-specific IgG binding test results. The Friedman test (GraphPad Prism 8.0.1) was used for statistical analysis of the Fc part of IgG binding test results.  $p < 0.05$  was defined as statistically significant.

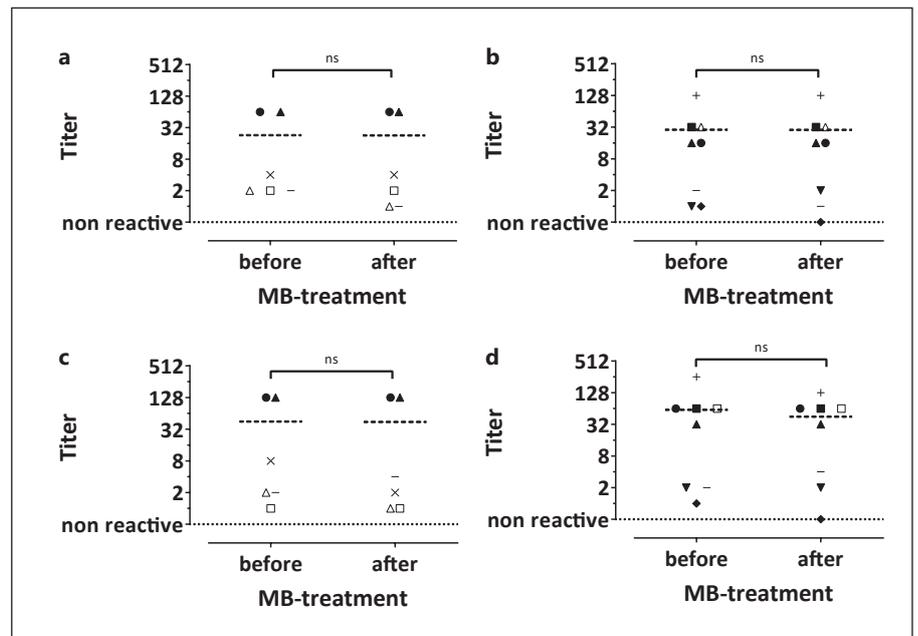
## Results

Isoagglutinin titers of plasma (blood type A,  $n = 4$ ; B,  $n = 2$ ; O,  $n = 4$ ) before and after MB treatment did not differ (Fig. 1a, b for IgM, and c, d for IgG). Reactivity of the plasma units for anti-EBV and anti-tetanus toxin IgG before and after MB treatment did not differ (Fig. 2). IgG binding to Fc receptors did not differ between MB-treated and untreated plasma (Fig. 3).

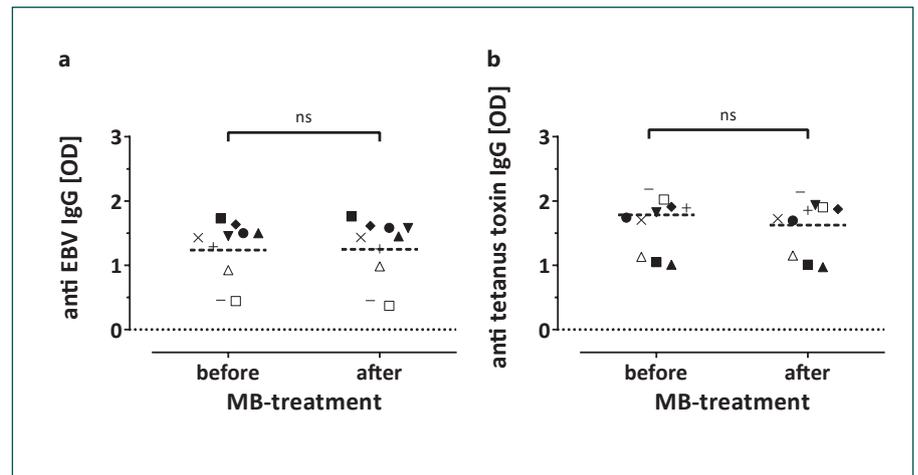
## Discussion

In this study we have shown that pathogen inactivation of plasma by MB treatment does not affect IgM and IgG binding to their cognitive epitopes, or IgG binding to Fc receptors. This was expected as MB shows high affinities to negatively charged macromolecules like DNA and only low affinities to neutral macromolecules like immunoglobulins [15]. Preservation of immunoglobulin function is important for the use of MB-treated convalescent plasma for the treatment of infections, such as COVID-19. To allow generalizable assessment of the integrity of IgM and IgG antibodies after MB treatment, we assessed antibodies with specificities widely present in the normal population. We used the anti-A and anti-B isoagglutinins and additionally IgG specific for EBV and tetanus toxin. Both antibody specificities are ubiquitous in the blood donor population of Western Pomerania (data

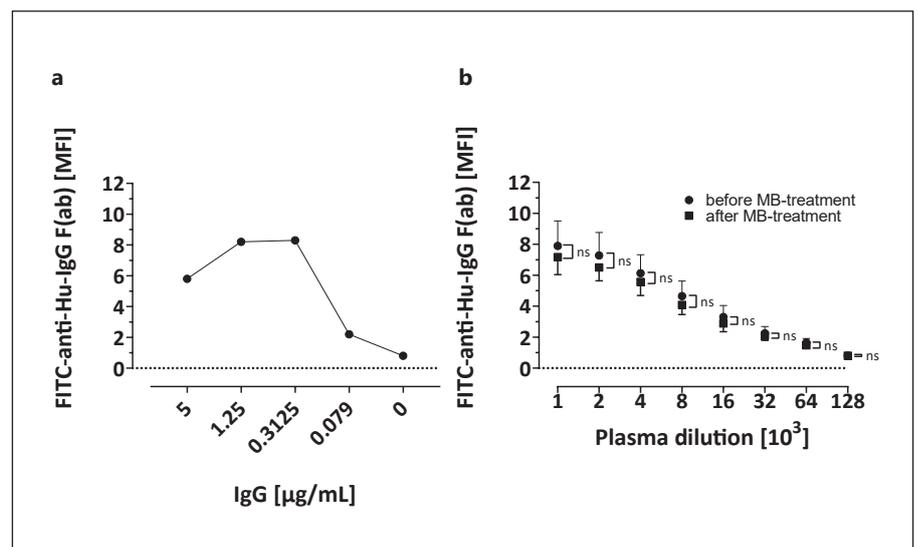
**Fig. 1.** Anti-A and anti-B isoagglutinin titers before and after treatment with MB pathogen inactivation using microcolumn gel cards with (c, d) and without (a, b) human antiglobulin serum in 10 individual donor plasma units each (blood type A,  $n = 4$ ; B,  $n = 2$ ; O,  $n = 4$ , medians are given). a, c Anti-A isoagglutinin titers of samples with blood type B and O. b, d Anti-B isoagglutinin titers of samples with blood type A and O. ns, not significant.



**Fig. 2.** ODs measured for EBV-specific (a) and tetanus toxin-specific (b) IgG before and after MB treatment ( $n = 10$ ; medians are given). ns, not significant.



**Fig. 3.** IgG Fc binding to THP-1 cell Fc receptors. a IVIG was used as positive control, binding analysis was feasible with concentrations above  $0.1 \mu\text{g/mL}$  (reference for plasma concentrations  $7\text{--}16 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$ ;  $n = 1$ ). b IgG binding to Fc receptors on THP-1 cells did not differ before and after MB pathogen inactivation ( $n = 10$  individual donor plasma units, means  $\pm$  SD are given). ns, not significant.



not shown). These tests allow assessment of the integrity of the F(ab) part of the antibodies. Beside antigen binding, the integrity of the Fc part of IgG is important for its biological efficacy, especially when antibodies are needed for defense against pathogens. To test the integrity of the Fc part of IgG we used binding of IgG to THP-1 cells expressing Fc receptors [14]. This method has been shown to be equivalent to the European Pharmacopoeia method 2.7.9 (test for Fc binding of immunoglobulin) [16], and has been used for quality control of IVIG preparations.

Our study has some limitations. We neither tested preservation of the binding and neutralizing capacity of anti-SARS-CoV-2 IgG, nor the integrity of the Fc part of anti-SARS-CoV-2 IgG. Taking this into account, we cannot make definite assumptions on an eventual change in effectiveness of pathogen-inactivated convalescent plasma in the way shown by Tonn et al. [17] using the Intercept® system. However, there is no reason to assume that MB treatment would affect anti-SARS-CoV-2 IgG in a different way than EBV or tetanus toxin antibodies as they share the basic structure which presumably leads to the same low affinity for the intercalation of MB. In conclusion, our results indicate that MB treatment of plasma does not change the binding capacity of IgM and IgG to their cognitive antigens, or of IgG Fc receptor binding.

## Acknowledgements

We acknowledge support for the Article Processing Charge from the DFG (German Research Foundation, 393148499) and the Open Access Publication Fund of the University of Greifswald.

## References

- 1 Chen L, Xiong J, Bao L, Shi Y. Convalescent plasma as a potential therapy for COVID-19. *Lancet Infect Dis*. 2020 Apr;20(4):398–400.
- 2 Bloch EM, Shoham S, Casadevall A, Sachais BS, Shaz B, Winters JL, et al. Deployment of convalescent plasma for the prevention and treatment of COVID-19. *J Clin Invest*. 2020 Jun;130(6):2757–65.
- 3 Duan K, Liu B, Li C, Zhang H, Yu T, Qu J, et al. Effectiveness of convalescent plasma therapy in severe COVID-19 patients. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2020 Apr;117(17):9490–6.
- 4 Bundesärztekammer. Richtlinie zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten. Richtlinie Hämotherapie; 2019. Available from: [https://www.bundesaeztekammer.de/fileadmin/user\\_upload/downloads/pdf-Ordner/MuE/Richtlinie\\_Haemotherapie\\_E\\_A\\_2019.pdf](https://www.bundesaeztekammer.de/fileadmin/user_upload/downloads/pdf-Ordner/MuE/Richtlinie_Haemotherapie_E_A_2019.pdf).
- 5 Mair-Jenkins J, Saavedra-Campos M, Baillie JK, Cleary P, Khaw FM, Lim WS, et al.; Convalescent Plasma Study Group. The effectiveness of convalescent plasma and hyperimmune immunoglobulin for the treatment of severe acute respiratory infections of viral etiology: a systematic review and exploratory meta-analysis. *J Infect Dis*. 2015 Jan;211(1):80–90.
- 6 Shen C, Wang Z, Zhao F, Yang Y, Li J, Yuan J, et al. Treatment of 5 critically ill patients with COVID-19 with convalescent plasma. *JAMA*. 2020 Apr;323(16):1582–9.
- 7 Hung IF, To KK, Lee CK, Lee KL, Chan K, Yan WW, et al. Convalescent plasma treatment reduced mortality in patients with severe pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus infection. *Clin Infect Dis*. 2011 Feb;52(4):447–56.
- 8 Rock G. A comparison of methods of pathogen inactivation of FFP. *Vox Sang*. 2011 Feb;100(2):169–78.
- 9 Smith J, Rock G. Protein quality in Mirasol pathogen reduction technology-treated, apheresis-derived fresh-frozen plasma. *Transfusion*. 2010;50:926–931.
- 10 Irsch J, Pinkoski L, Corash L, Lin L. INTERCEPT plasma: comparability with conventional fresh-frozen plasma based on coagulation function – an in vitro analysis. *Vox Sang*. 2010;98:47–55.
- 11 Seghatchian J, Walker WH, Reichenberg S. Updates on pathogen inactivation of plasma using Theraflex methylene blue system. *Transfus Apheresis Sci*. 2008 Jun;38(3):271–80.

## Statement of Ethics

Our research complies with the guidelines for human studies and the research was conducted ethically in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki. The institutional ethics review board of Universitätsmedizin Greifswald approved the study (BB 014/14). As we used residuals of samples routinely collected during plasmapheresis, a separate written consent was not collected.

## Conflict of Interest Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

## Funding Sources

This work was funded by the research budget of Universitätsmedizin Greifswald.

## Author Contributions

J.R. contributed to the conception of the work and the acquisition, analysis, and interpretation of the data for the work, and drafted the manuscript. K.Z. contributed to the conception of the work and the acquisition and analysis of the data for the work. Specifically, she contributed the ELISA test results showing the binding affinity of IgG to their specific antigens. J.W. contributed to the conception of the work and the acquisition, analysis and interpretation of the data for the work. Specifically, he contributed the flow cytometry results showing the binding affinity of IgG to their receptors on THP-1 cells. K.A. and A.G. contributed to the conception of the work and the interpretation of the data for the work. K.S. contributed to the conception of the work and the acquisition, analysis, and interpretation of the data for the work. Specifically, she contributed the agglutination results showing the isoagglutinin titers. All authors approved the final version of the manuscript to be published. All authors agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

- 12 Thiele T, Kellner S, Hron G, Wasner C, Nauck M, Zimmermann K, et al. Storage of thawed plasma for a liquid plasma bank: impact of temperature and methylene blue pathogen inactivation. *Transfusion*. 2012 Mar;52(3):529–36.
- 13 Handke W, Gravemann U, Sumian C, Reichenberg S, Seltsam A. Theraflex MB-plasma treatment does not interfere with the antibody integrity in human plasma. 25th Regional Congress of the ISBT, London 2015.
- 14 Ramasamy I, Tran E, Charnock A, Farrugia A. Flow-cytometric method for the quantitation of the Fc function of intravenous immunoglobulin preparations. *Vox Sang*. 2000;78(3):185–193.
- 15 Dardare N, Platz MS. Binding affinities of commonly employed sensitizers of viral inactivation. *Photochem Photobiol*. 2002 Jun;75(6):561–4.
- 16 Reipert BM, Ilas J, Carnewal C, Füreder SF, Bözlbauer U, Teschner W, et al. Fc function of a new intravenous immunoglobulin product: IGIV 10% triple virally inactivated solution. *Vox Sang*. 2006 Oct;91(3):256–63.
- 17 Tonn T, Corman VM, Johnsen M, Richter A, Rodionov RN, Drosten C, et al. Stability and neutralising capacity of SARS-CoV-2-specific antibodies in convalescent plasma. *Lancet Microbe*. 2020 Jun;1(2):e63.

# Plasma Isoagglutinin Depletion for Blood Group Independent Plasma Transfusion

Johannes Raster Michelle Jacob Andreas Greinacher Konstanze Aurich

Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin, Abteilung Transfusionsmedizin, Universitätsmedizin Greifswald, Greifswald, Germany

## Keywords

Universal plasma · Transfusion · Isoagglutinin depletion

## Abstract

**Background:** Plasma transfusion is one of the basic treatments in patients with major blood loss. The anti-A and anti-B antibodies contained in the plasma demand ABO blood group compatibility. This is limiting the use of plasma in emergency situations and can cause a shortage in the supply of plasma of certain blood groups. We developed a method for anti-A and anti-B depletion by adsorbing plasma isoagglutinins using red blood cells. **Materials and Methods:** Three units of fresh frozen plasma were thawed after quarantine storage, pooled, and an aliquot of red cell concentrate was added. After 2 h of incubation at room temperature antibody-red-cell complexes were removed by centrifugation, the isoagglutinin-depleted plasma was split into three units and deep frozen. Isoagglutinin titers, free hemoglobin, residual red cells, clotting factor activity, and sterility of plasma units were determined after isoagglutinin depletion and a double freeze-thawing procedure. **Results:** Anti-B titers in group A plasma were reduced from values of 1:64 to 1:1 or lower, anti-A titers in group B plasma decreased from values of 1:128 to at least 1:16. Postprocedure clotting factor activities were preserved with  $88.0 \pm 7.3\%$  (factor V),  $106.9 \pm 11.4\%$  (factor VIII), and  $84.0 \pm 7.5\%$  (factor XI) fulfilling the quality control requirements. No residual red cells were found, but free hemoglobin slightly increased to  $53.7 \pm 5.2 \mu\text{mol/L}$ . All units were sterile. **Discussion:** We described a method for the production of anti-A- and anti-B-depleted

plasma in a closed system that uses standard equipment. The resulting isoagglutinin-depleted plasma may allow for blood group independent plasma transfusion.

© 2022 The Author(s).  
Published by S. Karger AG, Basel

## Introduction

Plasma is transfused to patients to treat and prevent coagulopathies, to replace labile coagulation factors during massive transfusion, liver diseases, or is a treatment for patients with thrombotic microangiopathies often as plasma exchange therapy [1, 2]. Transfused plasma needs to be ABO blood group compatible because anti-A and anti-B IgM and IgG antibodies (isoagglutinins) can cause adverse effects in recipients expressing the cognate antigens on endothelium and red cells [3]. The requirement of blood group compatibility is a limitation to treat bleeding emergencies in patients with an unknown ABO blood group (e.g., prehospital transfusions) [4]. Only group AB plasma, which does not contain isoagglutinins, can be transfused universally. However, as the prevalence for blood group AB in Germany is only about 6%, the access to AB plasma is limited despite targeted recruitment of AB plasma donors [5]. The need for AB plasma is consistently high as AB plasma is used as universal plasma and only 27% of AB plasma units transfused in 2014 in hospitals around the world were transfused to group AB recipients [6]. Three clinical situations are attractive for blood group independent transfusion of plasma. First are emergency situations transfusing the unknown patient,

second is the use of convalescent plasma for newly emerging pathogens, and third is the much easier logistics for smaller hospitals, which would need to store only one type of plasma for all patients. Current emergency release protocols usually allow the use of group A plasma for patients of unknown blood group to overcome the shortage in AB plasma stocks [7]. Several emergency release protocols categorize the group A plasma units in anti-B high titer ( $\geq 1:128$ ), low titer ( $\leq 1:64$  but  $\geq 1:16$ ), and very low titer ( $< 1:16$ ) with decreasing risk of transfusion-related adverse effects [8]. However, these protocols compromise between accepting potential adverse effects of incompatible plasma transfusions and the benefit of being able to supply sufficient amounts of plasma to the patient [9]. Using group A plasma instead of AB requires extensive testing of multiple plasma units to identify the very low titer units eligible for emergency release. As most methods for anti-A and anti-B determination come with inter- and intra-laboratory variations of up to 4 titration steps, extensive titer testing might lead to a false sense of security [10–12]. Another, presumably more reliable, approach to reduce the risk of incompatible transfusions associated with the emergency release of therapeutic plasma is the depletion of isoagglutinins from therapeutic plasma. Current approaches to produce “universal plasma” by antibody depletion require either larger pools of plasma with different ABO blood groups or industrial scale processes producing batches of hundreds of liters [13, 14]. Both mentioned procedures utilize A- and B-antigens on soluble plasma proteins to form immune complexes effectively blocking the antigen binding site of the isoagglutinins. Such anti-A- and anti-B-depleted plasma has been used in military settings and during cardiac surgery [15, 16]. It is difficult to establish these procedures in small individual blood banks as they require either specialized or large-scale equipment. The principle of adsorbing the isoagglutinins onto structures expressing the cognate antigens can also be applied by adding red cells from red cell concentrates [17]. This also allows for the removal of the formed immune complexes. In the present study we developed a procedure for the production of small batches of anti-A- and anti-B-depleted plasma by isoagglutinin red blood cell adsorption using resources available in every blood bank facility.

## Materials and Methods

### *Blood Collection and Processing*

Plasma and red cell concentrate (RCC) were collected by fractionation of whole blood donations from voluntary healthy donors (centrifugation at 4,000 g for 10 min at 21 °C; Roto Silenta 630 S, Hettich GmbH, Germany; separation by MacoPress Smart, Maco Pharma, France) after letting the whole blood rest for 1–8 h at room temperature in compliance with the German guideline for hemotherapy [18]. Whole blood was collected into a quadruple

blood bag system T/B 500 mL, citrate phosphatedextrose solution systems with phosphate-adenine-glucose-guanosin-saline-mannitol solution (PAGGS-M) as additive solution (Maco Pharma).

The plasma units were not leukocyte depleted. All plasma units were shock frozen (HOF GmbH, Germany) within 6 h after fractionation at  $-60$  °C for 1 h and stored below  $-30$  °C. After quarantine storage for 4 months, the plasma units were thawed at 37 °C (Plasmatherm, Barkey GmbH, Germany).

The RCC was leukocyte depleted by in-line filtration (LCRD2 Leukoflex, Maco Pharma, France), split into 45-mL aliquots using pediatric blood bags (Maco Pharma, France) and stored at  $2-6$  °C. The red cell count of RCC was determined by a Sysmex cell counter (Sysmex XP-300, Sysmex Deutschland GmbH, Germany). All process steps are performed under GMP conditions.

### *Determination of the Required Red Blood Cell Amount for Anti-A and/or Anti-B Depletion in Plasma*

Initially, we used small volume plasma pools of 4 mL containing equal amounts of plasma from three donors to determine the amount of RCC required for sufficient anti-A and/or anti-B depletion of plasma ( $n = 15$  group A plasma,  $n = 8$  group B plasma,  $n = 10$  group O plasma). Group B red cells were added to group A plasma pools, group A<sub>1</sub> red cells to group B plasma, and group AB red cells to group O plasma pools. After incubation in polystyrol tubes (2 h; room temperature; standing upright; no agitation) the red cells were removed by centrifugation (10 min, 2,500 g) and the supernatant was used for further analysis. The RCC volumes required for small volume plasma samples were extrapolated to one full plasma unit (300 mL). Samples were analyzed for isoagglutinin titer directly after treatment.

### *Anti-A and Anti-B Titer Determination*

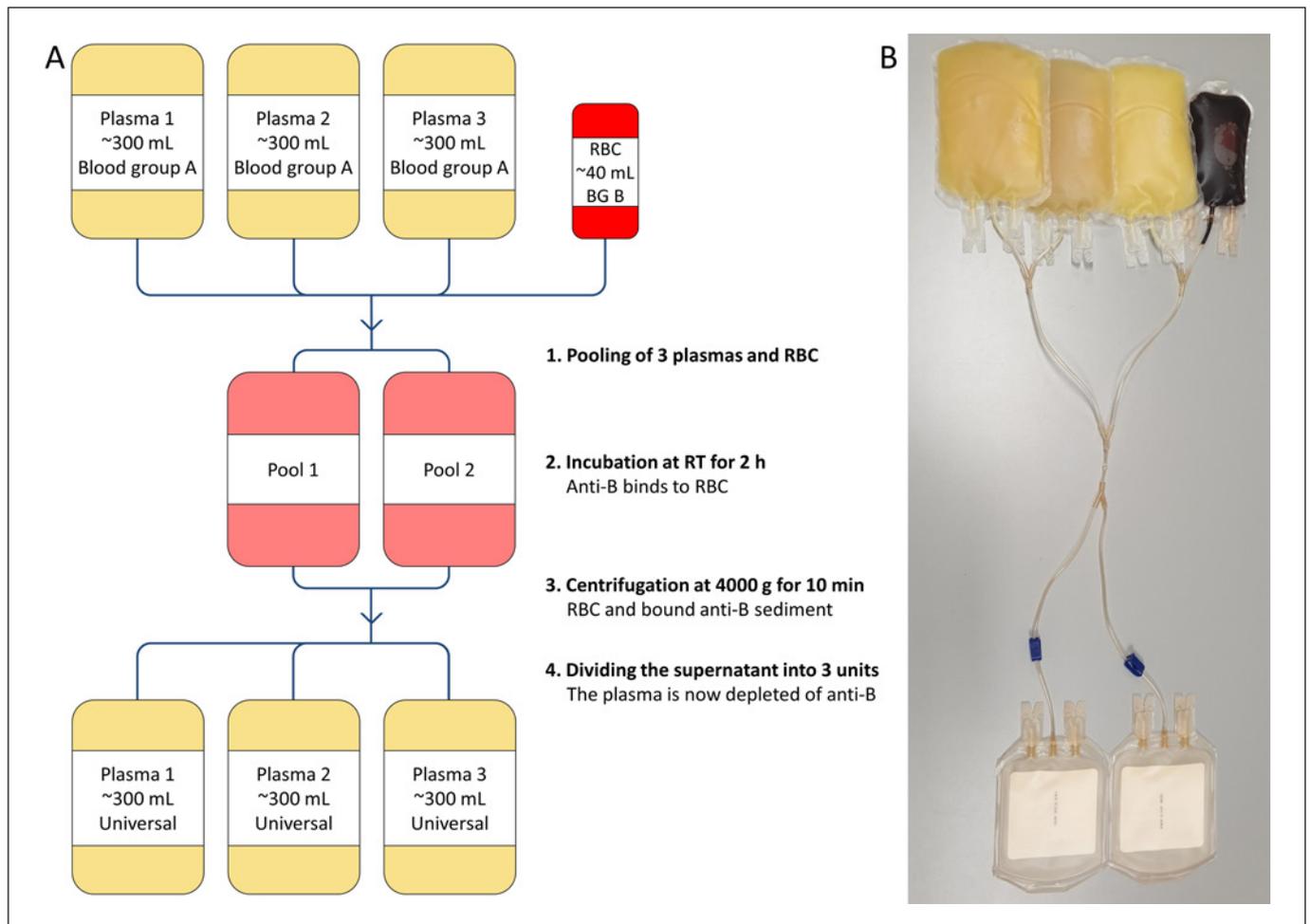
Titers of anti-A and anti-B were determined by a microcolumn gel card system. For anti-A and anti-B IgM, saline cards (ID-Card for sodium chloride, enzyme test and cold agglutinins; Bio-Rad Laboratories Inc., USA) were used; for anti-A and anti-B IgG cards with anti-human globulin phase (ID-Card LISS/Coombs, Bio-Rad Laboratories Inc.) were used according to the manufacturer's instructions. In brief, plasma samples in 1:2 dilution series (dilution media: 0.9% NaCl solution) were incubated (room temperature [IgM] or 37 °C [IgG], 15 min) with group B red cells for anti-A and group A red cells for anti-B. Group O red cells were used as a negative control. Agglutination strengths were evaluated by two independent individuals. Discrepant assessment results were solved by discussion. Antibody titer was defined as the last plasma dilution inducing agglutination.

### *Other Quality Parameters*

Residual red cells in anti-A- and anti-B-depleted plasma units were counted using a Nageotte chamber (Assistant, Sonderheim vor der Rhön, Germany) under a microscope. Clotting factor V, VIII, and XI activities were analyzed using 500  $\mu$ L of supernatant from centrifuged plasma on a CS5100 device (Siemens Healthcare, Germany) by standard methods based on factor-deficient plasma.

Free hemoglobin, as a marker for hemolysis of red cells used for isoagglutinin adsorption, was measured as cyanmethemoglobin spectroscopically using potassium hexacyanoferrate III and potassium cyanide (= transformation reagent) in cell free supernatant. A multi-wavelength absorption analysis was performed at 540 nm (A1) and 680 nm (A2) in a spectrophotometer (UV-1700, Shimadzu, Japan).

Free hemoglobin content of untreated plasma units prepared for routine quality control served as the reference ( $n = 10$ ). Microbiological control of the treated plasma units was assessed according to method 2.6.27 of the European Pharmacopoeia [19].



**Fig. 1. A** Schematic of the process of the production of universal plasma. BG, blood group. **B** Device configuration used to produce anti-A- and anti-B-depleted plasma.

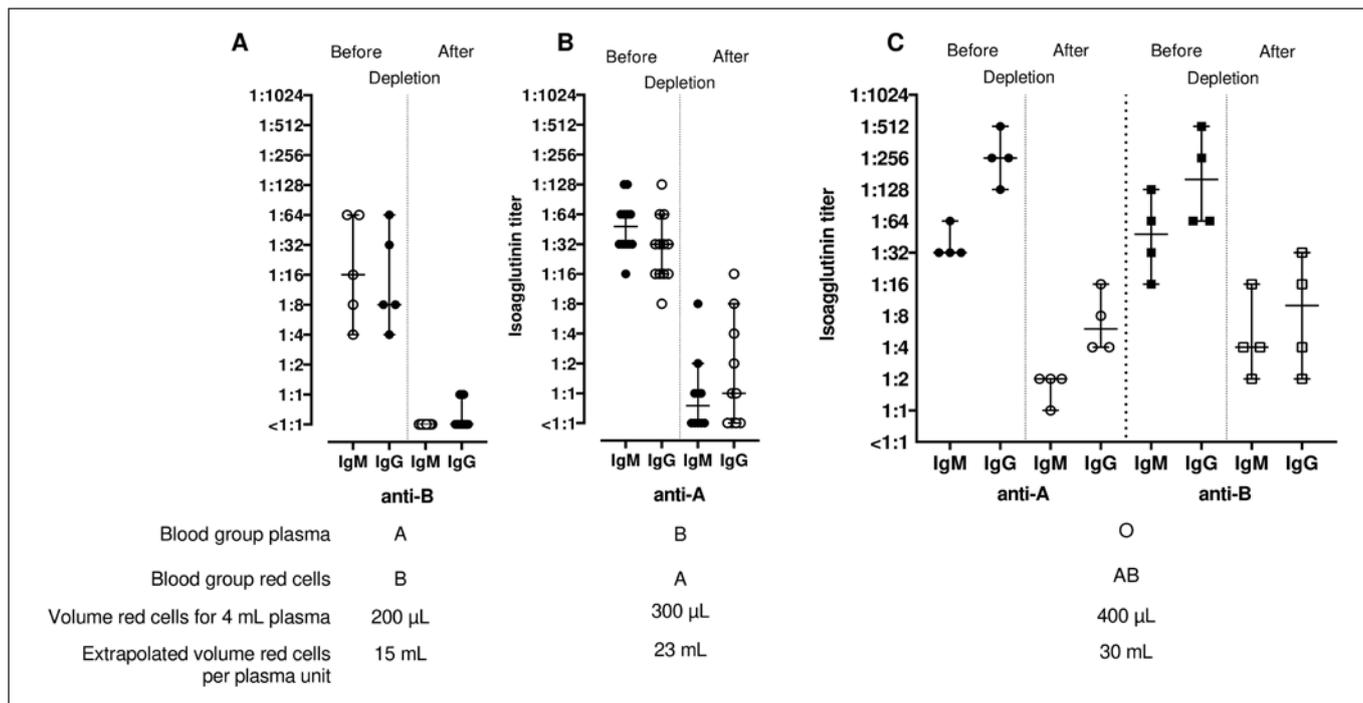
#### *Development of a Bag System for Anti-A/Anti-B Depletion in a Closed System*

The bag system for the production of anti-B-depleted plasma from group A plasma units consisted of two 500-mL bags (Maco Pharma, France) connected to four blunt ends via several standard Y-connectors (Maco Pharma) which were connected using sterile docking (TSCDII, Terumo BCT, Belgium). All processing steps required were carried out in a closed system.

Three plasma units (280–330 mL each) were thawed (Plasmatherm, Barkey, Germany) and pooled in two 500-mL bags with simultaneous addition of the 45-mL RCC aliquot using sterile docking (TSCDII, Terumo, Brussels, Belgium). The plasma/RCC pool was incubated for 2 h at room temperature, centrifuged (4,000 g, 10 min, Hettich Roto Silentia 630 RS, Hettich GmbH, Germany) and separated by a manual press (Fenwal® Plasma Extractor, Baxter Healthcare Corporation, USA). The supernatant was transferred into the original plasma bags. Plasma units were frozen in a shock freezer (60 min, –60 °C, 2 bar, HOF GmbH, Germany) and stored at –30 (+3) °C until use. A schematic of the process and the bag system are given in Figure 1. Samples were analyzed for isoagglutinin titer directly after treatment. Residual cell count, free hemoglobin, and clotting factor V, VIII, and XI activity were determined after storage at –30 °C.

#### **Results**

Before the production of isoagglutinin-depleted plasma units from quarantine stored fresh frozen plasma, we determined the required RCC volume by measuring the titers in a small volume approach of 4 mL of plasma and extrapolated the results for plasma units of 300 mL. A volume of 200 µL of group B RCC was found to be sufficient to reduce the IgG and IgM anti-B titers in 4 mL of the group A plasma pool to <1:2 (Fig. 2A). For plasma pools of group B, 300 µL of group A RCC was required to decrease the IgG and IgM anti-A titers to values of 1:16 or lower (Fig. 2B). A volume of 400 µL of group AB RCC was required to reduce the anti-A and anti-B titers to values of 1:16 or lower for group O plasma units with the exception of one pool, where anti-B IgG titer was not decreased below 1:32 (Fig. 2C). Extrapolating the RCC volumes to one whole plasma unit (300 mL), we required 15 mL of group B RCC to treat a unit of group A plasma, 23 mL of group A RCC to treat a unit of group B plasma, and



**Fig. 2.** Isoagglutinin IgM and IgG titers before and after treating small batches (4 mL) of group A plasma with group B red cells (A), group B plasma with group A red cells (B), and group O plasma with group AB red cells (C). The volume of red cells per plasma unit is extrapolated from isoagglutinin depletion in 4 mL of plasma. Medians and 95% confidence intervals are given.

at least 30 mL of group AB RCC to treat a unit of group O plasma.

The process was scaled up to a closed bag system and used to produce 4 pools (12 units) of anti-B-depleted plasma from group A plasma by pooling three plasma units and adsorbing anti-B onto red cells of group B RCC. We used the extrapolated RCC volume determined in the small volume batch and added this to the plasma pool. Anti-B IgM and IgG in all four group A plasma pools were reduced to titers of 1:1 or lower. No bacterial contamination was detected (Table 1). Most of the quality parameters were not affected by the isoagglutinin depletion and the double freeze-thawing process compared to non-treated plasma units (Table 2). The isoagglutinin-red cell aggregates were completely removed by centrifugation. Coagulation factor V, VIII, and XI activity levels were also maintained. Cell-free hemoglobin increased by twice the baseline value (Table 2) but remained within the accepted quality range [20].

## Discussion

We present a method to produce isoagglutinin-depleted plasma in a closed bag system. The method is highly efficient and even outliers did not exceed isoagglutinin

titers of 1:16, which are below the risk of severe transfusion-related adverse effects as observed for non-processed plasma [21, 22] and former commercially available Bioplasma FDP and Uniplas<sup>®</sup>, where IgM and IgG titers of <math><1:32</math> did not result in hemolysis [23, 24]. Due to the large RCC volume required for the isoagglutinin depletion of group O plasma (30 mL for one plasma unit), we concentrated on group A plasma.

When comparing and interpreting data regarding safe titers of isoagglutinins obtained from different studies and guidelines [8, 9, 23, 24], variations regarding the methods have to be considered. We used the gel microcolumn hemagglutination technique, which is more sensitive and less variable than the commonly used tube technique [11]. Even taking the possible inaccuracies of the method into account, the remaining isoagglutinin titers were so low that the risk for isoagglutinin-mediated transfusion-related adverse effects seems to be negligible.

The quality of the isoagglutinin-depleted plasma remains high. Despite the double freezing and thawing process during manufacturing, clotting factor V, VIII, and XI activity was preserved and within the specification range of conventional fresh frozen plasma [25]. Although we depleted all red cells used for adsorption, as assessed by the highly sensitive nageotte chamber method, formation of red cell microvesicles and thus the risk of allo-sensitiza-

**Table 1.** Quality control parameters of the produced anti-B-depleted group A plasma

Pool No.	Plasma unit No.	Weight of single plasma units, g	Residual red cell count, $\times 10^9/L$	Free hemoglobin, $\mu\text{mol/L}$	Factor V <sup>a</sup> , %	Factor VIII <sup>a</sup> , %	Factor XI <sup>a</sup> , %	Microbiological control	Anti-B titer	
									IgM	IgG
1	1	302	0	55.8	84	93.7	81	Sterile	<1:1	<1:1
	2	282								
	3	290								
2	4	298	0	47.2	84	119.8	88	Sterile	<1:1	<1:1
	5	306								
	6	301								
3	7	296	0	52.2	99	112.2	92	Sterile	<1:1	<1:1
	8	299								
	9	289								
4	10	320	0	59.5	85	102	75	Sterile	1:1	1:1
	11	337								
	12	234								

<sup>a</sup> Plasma units were frozen and thawed once before pooling and then frozen and thawed again before testing to reflect the coagulation factor activities when anti-A-/anti-B-depleted plasma is produced from quarantine stored plasma units and then stored at  $-30^{\circ}\text{C}$  until use.

**Table 2.** Quality parameters of plasma units before and after the isoagglutinin depletion treatment

	Group A plasma units before isoagglutinin depletion treatment (after freezing and thawing, $n = 12$ , mean $\pm$ SD)	Group A plasma units after final isoagglutinin depletion treatment (double freezing and thawing, $n = 12$ , mean $\pm$ SD)	Statistical difference, $p$
Residual red cell count, $\times 10^9/L$	0.5 $\pm$ 0.08	0	>0.05
Cell-free hemoglobin, $\mu\text{mol/L}$	26.0 $\pm$ 15.0	53.7 $\pm$ 4.7	<0.001
Clotting factor V, %	97.8 $\pm$ 7.3	96.3 $\pm$ 7.8	>0.05
Clotting factor VIII, %	107.3 $\pm$ 15.3	102.8 $\pm$ 16.6	>0.05
Clotting factor XI, %	95.7 $\pm$ 20.1	94.8 $\pm$ 19.6	>0.05

tion against erythrocyte antigens cannot be excluded. This is highlighted by the observed red cell lysis indicated by the increase in free hemoglobin concentration. The red cell lysis may be induced by complement activation. However, a free hemoglobin concentration of  $53.7 \pm 5.2 \mu\text{mol/L}$  found in the isoagglutinin-depleted plasma is far below the concentration of  $125 \mu\text{mol/L}$ , which showed an effect of free hemoglobin on nitric oxide (NO) bioavailability in an in vivo rat model [20]. Free hemoglobin in transfused blood products like RCC or plasma will be bound on the recipients' haptoglobin [26]. After binding to haptoglobin, the hemoglobin-haptoglobin protein complex is scavenged by CD163+ macrophages and monocytes in order to clear the organism of toxic cell-free hemoglobin [27]. During storage of RCC, free hemoglobin increases as a result of hemolysis due to aging. However, a hemolysis rate of up to 0.8%, which corresponds to  $220 \mu\text{mol/L}$  of free hemoglobin, greatly exceeds the levels of free hemoglobin found in the isoagglutinin-depleted plasma. The transfusion of RCC is considered to be

safe due to dilution effects in patients' circulation and the binding capacity of haptoglobin. Even in massive transfusion settings, while haptoglobin levels decreased after transfusion of 1,000 mL of transfused blood, detectable levels of free hemoglobin were only found after transfusion of 2,000 mL ( $2 \mu\text{mol/L}$ , corresponding to 3.2 mg/dL). Even after the transfusion of 5,000 mL stored whole blood free hemoglobin levels only increased to  $4 \mu\text{mol/L}$  (6.4 mg/dL) [28]. Hemolysis is defined as a free hemoglobin concentration above 30 mg/dL, while levels above 100 mg/dL are defined as severe hemolysis [29].

Although we removed the anti-B isoagglutinins from group A plasma, A-antigens are still present on several plasma proteins. Those proteins are not removed using the method proposed in this work. The presence of A-antigens on soluble proteins may lead to the formation of circulating immune complexes if the plasma is transfused to patients with anti-A. Patients who received compatible but non-identical plasma showed increased mortality compared to recipients of ABO identical plasma transfu-

sion (relative risk, 1.15; 95% confidence interval, 1.02–1.29) [30]. This also applies to group AB plasma, which has been safely used as universal plasma for decades. Decreasing mortality may be an argument to use group O plasma for isoagglutinin depletion as it does not contain soluble A and B antigens. However, the amount of red cells needed to deplete the anti-A and anti-B titers, which are usually higher in group O plasma [31, 32], might impose RCC stocks of blood group AB RCCs. High titers of anti-A and anti-B are also found in group A and B plasma. These high titers can be induced by pregnancy, vaccination, or certain food components [33, 34]. Following the German hemotherapy guidelines, plasma of females with a history of pregnancy must not be used to directly treat patients unless it is tested negative for anti-human neutrophil antigen and anti-human leukocyte antigen antibodies. Untested plasma from females with pregnancy history will not be used for the presented method. In addition, pooling of three plasma units reduces the overall titer in a plasma pool containing one high titer unit ensuring the stability of isoagglutinin depletion.

It is controversially discussed that pooling blood components of several donors increases the risk of transfusion transmitted infections (TTI) or transfusion-associated adverse effects in comparison to single donations. The risk of TTI is, at least theoretically, enhanced for pooled platelet concentrates (PCs); however, no epidemiological study or clinical trial has demonstrated different risks of viral infections transmitted by pooled PCs compared to apheresis PCs [35]. To keep the risk as low as possible we used quarantine stored plasma units of donors, who tested negative in the standard infection assays for TTI at least 4 months later during a follow-up donation. Further risk reduction can be achieved by assigning the three plasma units from one pool to the same patient. At least 15 mL of plasma per kilogram bodyweight should be transfused to treat coagulopathy (equals 900 mL or 3 units if the patient weighs 60 kg).

To lower the risk of transfusing emerging pathogens, pathogen reduction methods (e.g., amotosalen/UVA, Intercept<sup>®</sup> Blood System; riboflavin/UV, Mirasol<sup>®</sup> PRT, or methylene blue/visible light, Theraflex<sup>®</sup>-MB) can be applied to the isoagglutinin-depleted plasma before refreezing. Pathogen-reduced isoagglutinin-depleted plasma can be manufactured directly after plasma donation and does not require quarantine storage. This is of particular interest for the use of convalescent plasma from recovered donors for the treatment of new emerging pathogens.

Commercially produced units of universal plasma are currently not available in Europe and North America since regulatory authorization of Uniplas<sup>®</sup> was waived in 2009 [36] and Bioplasma FDP is only produced and used in South Africa [23]. Using the method described here,

blood banks are able to cost-effectively provide isoagglutinin-depleted plasma. When summarizing the additional costs for the RCC (proportionally 40 mL for the treatment of three plasma units), tubes, bags, and tube welding for connecting the system, the price of one unit of isoagglutinin-depleted plasma increases by approximately 20% compared to fresh frozen plasma.

## Conclusion

We have described a method for the production of anti-A- and anti-B-depleted plasma in a closed system that uses standard blood processing equipment. The method was shown to be scalable using group A plasma and group B red cells. The resulting anti-A- and/or anti-B-depleted plasma may allow for blood group-independent plasma transfusion.

## Acknowledgements

We thank Jan Wesche, Kathrin Denker, Nicole Lembke, Pascal Rosendahl, Anna Krawutschke, and Maximilian Reinhardt for technical support. This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG [German Research Foundation] grant No. 374031971-TRR 240).

## Statement of Ethics

Our research complies with the guidelines for human studies and the research was conducted ethically in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki. The institutional ethics review board of Universitätsmedizin Greifswald approved the study (BB 014/14). As we used plasma units found not eligible for treating patients or use for fractionation, a separate written consent was not collected.

## Conflict of Interest Statement

The Universitätsmedizin Greifswald has filed a patent for the described method of universal plasma production. A.G. is an advisor for Maco Pharma. A.G. and K.A. received funding from Maco Pharma for another project. J.R. declares no conflict of interest. M.J. declares no conflict of interest. In the study exclusively anonymized data were used. The institutional ethics review board of the University Medicine Greifswald approved the study.

## Funding Sources

This work was funded by the research budget of Universitätsmedizin Greifswald and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG [German Research Foundation] grant No. 374031971-TRR 240).

## Author Contributions

J.R. performed the experiments and analyzed the data. A.G. developed the concept and designed the study. M.J. performed the experiments and analyzed the data. K.A. designed the concept, performed the experiments, and analyzed the data. All authors contributed to writing the manuscript. All authors had full access to all data, including all statistical reports and tables used in the manuscript.

## Data Availability Statement

All data generated or analyzed during this study are included in this article. Further enquiries can be directed to the corresponding author.

## References

- 1 Roback JD, Caldwell S, Carson J, Davenport R, Drew MJ, Eder A, et al. Evidence-based practice guidelines for plasma transfusion. *Transfusion*. 2010;50:1227–39.
- 2 Garraud O, Aubron C, Ozier Y, Coppo P, Tissot JD. Plasma for direct therapeutic use, for today and tomorrow: a short critical overview. *Transfus Clin Biol*. 2018;25:281–6.
- 3 Balbuena-Merle R, West FB, Tormey CA, Hendrickson JE. Fatal acute hemolytic transfusion reaction due to anti-B from a platelet apheresis unit stored in platelet additive solution. *Transfusion*. 2019;59:1911–5.
- 4 Hervig T, Doughty H, Ness P, Badloe JF, Berseus O, Glassberg E, et al. Prehospital use of plasma: the blood bankers' perspective. *Shock*. 2014;41(Suppl 1):39–43.
- 5 Gitas G, Proppe L, Alkatout I, Tsolakidis D, Rody A, Kotanidis C, et al. Is ABO blood group a risk or prognostic factor for patients with endometrioid endometrial cancer? A retrospective analysis in Germany. *Blood Transfus*. 2020;18:465–70.
- 6 Zeller MP, Barty R, Dunbar NM, Elahie A, Flanagan P, Garritsen H, et al. An international investigation into AB plasma administration in hospitals: how many AB plasma units were infused? The HABSWIN study. *Transfusion*. 2018;58:151–7.
- 7 Chhibber V, Greene M, Vauthrin M, Bailey J, Weinstein R. Is group A thawed plasma suitable as the first option for emergency release transfusion? (CME). *Transfusion*. 2014;54:1751–5.
- 8 Isaak EJ, Tchorz KM, Lang N, Kalal L, Slapak C, Khalife G, et al. Challenging dogma: group A donors as "universal plasma" donors in massive transfusion protocols. *Immunohe-matology*. 2011;27:61–5.
- 9 Zielinski MD, Johnson PM, Jenkins D, Gous-sous N, Stubbs JR. Emergency use of prethawed Group A plasma in trauma patients. *J Trauma Acute Care Surg*. 2013;74:69–5.
- 10 Kang SJ, Lim YA, Baik SY. Comparison of ABO antibody titers on the basis of the antibody detection method used. *Ann Lab Med*. 2014;34:300–6.
- 11 Kumlien G, Wilpert J, Säfwenber J, Tydén G. Comparing the tube and gel techniques for ABO antibody titration, as performed in three European centers. *Transplantation*. 2007;84:S17–9.
- 12 Lim YA, Kang SJ. Standardization of ABO antibody titer measurement at laboratories in Korea. *Ann Lab Med*. 2014;34:456–62.
- 13 Pusateri AE, Given MB, Schreiber MA, Spinella PC, Pati S, Kozar RA, et al. Dried plasma: state of the science and recent developments. *Transfusion*. 2016;56(Suppl 2):S128–39.
- 14 Noddeland H, Töllöfsrud S, Svennevig JL, Bentsen G, Borsstad F, Solheim B. Universal solvent/detergent-treated fresh frozen plasma (Uniplas®) – rationale and clinical properties. *Thromb Res*. 2002;107:S33–S37.
- 15 Nguyen C, Bordes J, Cungi P-J, Esnault P, Cardinale M, Mathais Q, et al. Use of French lyophilized plasma transfusion in severe trauma patients is associated with an early plasma transfusion and early transfusion ratio improvement. *J Trauma Acute Care Surg*. 2018;84:780–5.
- 16 Töllöfsrud S, Noddeland H, Svennevig JL, Bentsen G, Mollnes TE, Solheim BG. Universal fresh frozen plasma (Uniplas): a safe product in open-heart surgery. *Intensive Care Med*. 2003;29:1736–43.
- 17 Sattarzadeh Bardsiri M, Kouhbananinejad SM, Vahidi R, Soleimany S, Moghadari M, Derakhshani A, et al. Ubiquitous convalescent plasma: an artificial universal plasma for COVID-19 patients. *Transfusion and Apher-esis Science*. 2021;60(5):103188.
- 18 Bundesärztekammer. Richtlinie Hämotherapie 2017 mit E/A 2019. [https://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user\\_upload/downloads/pdf-Ordner/MuE/Richtlinie\\_Haemotherapie\\_E\\_A\\_2019.pdf](https://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user_upload/downloads/pdf-Ordner/MuE/Richtlinie_Haemotherapie_E_A_2019.pdf).
- 19 European Pharmacopoeia 10.6, 2021. <https://ph.eur.edqm.eu/app/10-6/content/default/20627E.htm> (accessed July 26, 2021).
- 20 Donadee C, Raat NJH, Kania T, Tejero J, Lee JS, Kelley EE, et al. Nitric oxide scavenging by red blood cell microparticles and cell-free hemoglobin as a mechanism for the red cell storage lesion. *Circulation*. 2011;124:465–76.
- 21 Green L, Bolton-Maggs P, Beattie C, Cardigan R, Kallis Y, Stanworth SJ, et al. British Society of Haematology Guidelines on the spectrum of fresh frozen plasma and cryoprecipitate products: their handling and use in various patient groups in the absence of major bleeding. *Br J Haematol*. 2018;181:54–67.
- 22 Pietersz RNI, Engelfriet CP, Reesink HW, Davis KG, Lown J, Thomson A, et al. Transfusion of apheresis platelets and ABO groups. *Vox Sanguinis*. 2005;88:207–21.
- 23 Solheim BG, Chetty R, Flesland O. Indications for use and cost-effectiveness of pathogen-reduced ABO-universal plasma. *Curr Opin Hematol*. 2008;15:612–7.
- 24 Chen G, Zhu L, Wang S, Zhuang Y, Yu Y, Wang D. Study on the immunological safety of universal plasma in the Chinese population in vitro. *Transfus Apher Sci*. 2017;56:171–4.
- 25 Feng G, Zhao Y, Zhang J, Feng L. Effects of freeze-thaw times on screening coagulation tests and factors VIII and IX activities in citrate-anticoagulated plasma at –20°C and –80°C. *Clin Lab*. 2018;64:1439–44.
- 26 Buehler PW, Humar R, Schaer DJ. Haptoglobin therapeutics and compartmentalization of cell-free hemoglobin toxicity. *Trends Mol Med*. 2020;26:683–97.
- 27 Pires IS, Palmer AF. Tangential flow filtration of haptoglobin. *Biotechnol Prog*. 2020;36:e3010.
- 28 Nishiyama T, Hanaoka K. Free hemoglobin concentrations in patients receiving massive blood transfusion during emergency surgery for trauma. *Can J Anaesth*. 2000;47:881–5.
- 29 Houston S, Patel S, Badheka A, Lee-Son K. Clearance of severely elevated plasma free hemoglobin with total plasma exchange in a pediatric ECMO patient. *Perfusion*. 2021;2676591211021946.
- 30 Shanwell A, Andersson TM-L, Rostgaard K, Edgren G, Hjalgrim H, Norda R, et al. Post-transfusion mortality among recipients of ABO-compatible but non-identical plasma. *Vox Sanguinis*. 2009;96:316–23.
- 31 Harm SK, Yazer MH, Bub CB, Cohn CS, Jacob EK, Kutner JM, et al. Seasonal variability is not observed in the rates of high anti-A and anti-B titers in plasma, apheresis platelet, and whole blood units tested by different methods. *Transfusion*. 2019;59:762–7.
- 32 Dunbar NM. Does ABO and RhD matching matter for platelet transfusion? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2020;2020:512–7.
- 33 Berséus O, Boman K, Nessen SC, Westerberg LA. Risks of hemolysis due to anti-A and anti-B caused by the transfusion of blood or blood components containing ABO-incompatible plasma. *Transfusion*. 2013;53(Suppl 1):114S–23S.
- 34 Daniel-Johnson J, Leitman S, Klein H, Alter H, Lee-Stroka A, Scheinberg P, et al. Probiotic-associated high-titer anti-B in a group A platelet donor as a cause of severe hemolytic transfusion reactions. *Transfusion*. 2009;49:1845–9.
- 35 Schrezenmeier H, Seifried E. Buffy-coat-derived pooled platelet concentrates and apheresis platelet concentrates: which product type should be preferred? *Vox Sang*. 2010;99:1–15.
- 36 EMEA: Decision on the granting of a product specific waiver for human plasma proteins (EMA-000507-PIP01-08) 2009. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/pipe-decision/p/116/2009-european-medicines-agency-decision-16-june-2009-granting-product-specific-waiver-human-plasma/2006-europe\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/pipe-decision/p/116/2009-european-medicines-agency-decision-16-june-2009-granting-product-specific-waiver-human-plasma/2006-europe_en.pdf).