บทความฟื้นวิชา

วิธีการผลิตผลิตภัณฑ์พลาสมา (Methods of Plasma Fractionation)

อรุณรัตน์ จันทนขจรฟุ้ง

ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

Plasma Fractionation คือการแยกส่วนของโปรตีนแต่ละชนิดในพลาสมาออกมาใช้สำหรับการรักษาโรคต่างๆ

วิธีการแยกส่วนของพลาสมาโปรตีน มี 2 วิธี ได้แก่

1. การตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์เย็น (cold ethanol protein precipitate)
2. วิธีแลกเปลี่ยนไอออนของสาร (Ion exchange column chromatography)

การตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์เย็น (cold ethanol protein precipitate)

ใช้วิธีของ Cohn โดย Edwin J. Cohn ตั้งแต่ปี 1946 เป็นการสกัด (extract) และเตรียม albumin จาก blood plasma สมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 ซึ่งนำมาใช้กับการรักษาทหารที่บาดเจ็บในสงครามและคนที่เสียเลือดไปจำนวนมาก และเป็นวิธีพื้นฐานที่ส่วนใหญ่ใช้ในการทำ plasma fractionation มาจนถึงปัจจุบัน

ปี 1995 The Gerlough method ได้มีความพยายาม modify วิธีของ Cohn ให้มีต้นทุนลดลง โดยลดปริมาณของ ethanol ในการตกตะกอนลง จากร้อยละ 40 มาใช้ร้อยละ 20 ซึ่งจะได้ตะกอนของ fraction II fraction III fraction IV และ fraction V รวมกัน แต่ไม่นิยมใช้ในทางอุตสาหกรรมเพราะมีความบริสุทธิ์ต่ำ

ปี 1957 The Hink method เป็นวิธีที่ให้ได้ fraction IV รวมกับ fraction V ซึ่งได้ yield มากขึ้น แต่มีความบริสุทธิ์เพียง 85% เท่านั้น

The Halford method เป็นวิธีที่คล้ายกับ The Hink method ซึ่งรวม fraction IV และ fraction V ไว้ด้วยกัน แต่ถึงแม้ว่าจะได้ yield ของ albumin มากกว่า แต่ก็มีความบริสุทธิ์ต่ำ

Kistler and Nitschmann เป็นวิธีที่ได้ความบริสุทธิ์มากขึ้น แต่ yield จะลดลง ซึ่งคล้ายกับวิธีของ Cohn แต่การตกตะกอน fraction II และ fraction III ใช้ 19% ethanol ที่ pH 5.85 และคล้ายคลึงกับวิธีของ Gerlough and Halford โดยการตกตะกอน fraction IV ใช้ 40% ethanol ที่ pH 5.85 อุณหภูมิ -8°C และใช้ 40% ethanol pH 4.8 อุณหภูมิ -8°C ในการตกตะกอน fraction V

ปี 1979 Hao ใช้ ethanol ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นในการตกตะกอน fraction ต่างๆ ซึ่งทำให้ได้ความบริสุทธิ์สูงถึง 98% แต่ทำให้ได้ yield น้อย เนื่องจากจะขึ้นอยู่กับความซับซ้อนของกระบวนการตกตะกอน

กระบวนการผลิตด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์เย็นเกี่ยวข้องกับหลายปัจจัย ได้แก่ pH ethanol concentration

ตารางที่ 1 สภาวะของการตกตะกอนด้วยวิธี Cohn's method

Fraction	Fraction I	Fraction II	Fraction III	Fraction IV	Fraction V
%Ethanol	8	25	18	40	40
PH	7.2	6.9	5.2	5.8	4.8
Temperature (^{O}C)	- 3	- 5	- 5	- 5	- 5
%Protein fraction	5.1	3	3	3	1

ตารางที่ 2 สภาวะของการตกตะกอนด้วยวิธี Kistler and Nitschmann method

Fraction	Fraction II + III	Fraction IV	Fraction V
%Ethanol	19%	40%	40%
pH	5.85	5.85	4.8
Temperature (^{O}C)	- 3	- 8	- 8

ตารางที่ 3 สภาวะของการตกตะกอนด้วยวิธี Hao method

Fraction	Fraction II + III	Fraction I + II + III + IV	Fraction V
%Ethanol	42%	40%	40%
pH	5.8	5.4 to 7.0	4.8
Temperature (^{O}C)	- 5	- 3 to - 7	- 10

อุณหภูมิ ionic strength และ protein concentration

การตกตะกอนด้วยวิธีพื้นฐานของ Cohn และดัดแปลงโดยใช้วิธีของ Kistler and Nitschmann จะเริ่มด้วยการนำพลาสมาที่ผ่านการตรวจทางห้องปฏิบัติการต่างๆ ตามมาตรฐานการตรวจที่กำหนดมารวมกันให้ได้ตามปริมาณที่ต้องการผลิต แล้วนำไปตกตะกอนโปรตีน fraction I ซึ่งเป็น fibrinogen และ cryoglobulin อื่นๆ ด้วย 8% ethanol pH 7.2±0.2 ที่อุณหภูมิ -3°C แล้วนำมาปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นรอบสูง (17,000 รอบ/นาที) เพื่อแยกเอาตะกอนของ fraction I ออก จากนั้นนำ supernatant I มาตกตะกอนเอา fraction II + III ออกด้วย 19% ethanol pH 5.85±0.05 ที่อุณหภูมิ – 5 ^{O}C แล้วปั่นแยกเอา fraction II + III ออกด้วยเครื่องปั่นรอบสูง ซึ่งตะกอน fraction II + III จะใช้สำหรับการเตรียม Immunoglobulin จากนั้นก็นำเอา supernatant II + III มาตกตะกอน fraction IV ด้วย 40% ethanol ที่ pH 5.85 ±0.05 อุณหภูมิ -6°C นำมาปั่นด้วยเครื่องปั่นรอบสูง แยกเอาตะกอน fraction IV ออกเพื่อนำไปทำ plasma protein solution ต่อไป จากนั้นนำ supernatant IV มาตกตะกอน fraction V ด้วย 40% ethanol อีกครั้ง ที่ pH 4.8±0.05 อุณหภูมิ -8°C ก่อนนำมาปั่นแยกเอาตะกอน fraction V ออกด้วยเครื่องปั่นรอบสูง ซึ่งตะกอน fraction V จะนำไปผลิตเป็น albumin

นำตะกอนของ fraction V มาละลายน้ำทำเป็น suspension แล้วนำมากรองให้ใสด้วยเครื่องกรอง depth filter จากนั้น adjust pH ของ solution ที่กรองแล้วให้ได้ pH 7.0±0.1 นำมาทำ diafiltration เพื่อล้างเอา alcohol โปรตีนที่ไม่ต้องการ และแร่ธาตุต่างๆ เช่น โซเดียม เป็นต้น ด้วยเครื่อง molecular filtration หรือ ultrafiltration จากนั้น concentrate protein ให้ได้ตามต้องการ คือ 20% หรือ 25% เติม Sodium caprylate* เป็น stabilizer แล้วนำมา adjust pH อีกครั้ง ให้ได้ pH 7.0±0.1 แล้วนำมากรองด้วย sterile filter 0.22 um บรรจุลงในขวด ขวดละ 50 mL จากนั้นปิดจุกยางและฝาครอบอะลูมิเนียม นำไป pasteurization** ใน water bath 60°C เป็นเวลา 10 ชั่วโมง เพื่อฆ่าเชื้อไวรัสต่างๆ (viral inactivation) จากนั้น incubate ที่ 37°C ใน incubator นาน 2 สัปดาห์ เพื่อดูว่าเชื้อโรคเกิดขึ้นหรือไม่ และนำมาติดฉลากบรรจุลงกล่อง พร้อมส่งตัวอย่างไปทำการวิเคราะห์ตามมาตรฐานของตำรับยาหรือองค์การอนามัยโลก

* Sodium Caprylate ที่เติมลงไปเป็น stabilizer จะป้องกัน albumin ระหว่างที่ได้รับความร้อนที่ 70 ^{O}C ปัจจุบันการทำ plasma fractionation มักจะใช้ Sodium Caprylate เป็น stabilizer เพียงตัวเดียวเท่านั้น ซึ่งเดิมเคยเติมทั้ง Sodium Caprylate และ Tryptophan

** การ pasteurization จะทำหลังจากบรรจุลงในขวดแล้ว ทั้งนี้เพื่อความสะดวกและเพื่อป้องกันการ contamination หรือจะ pasteurize ก่อนนำไปบรรจุลงในขวดก็ได้ ในบางครั้งพบว่ามีตะกอนเล็กๆ หลัง pasteurize ขึ้นอยู่กับปัจจัยระหว่างการผลิต 5 ข้อ ดังที่กล่าวมาแล้ว

ข้อดีและข้อเสียของการตกตะกอนโปรตีนด้วยวิธีของ Cohn

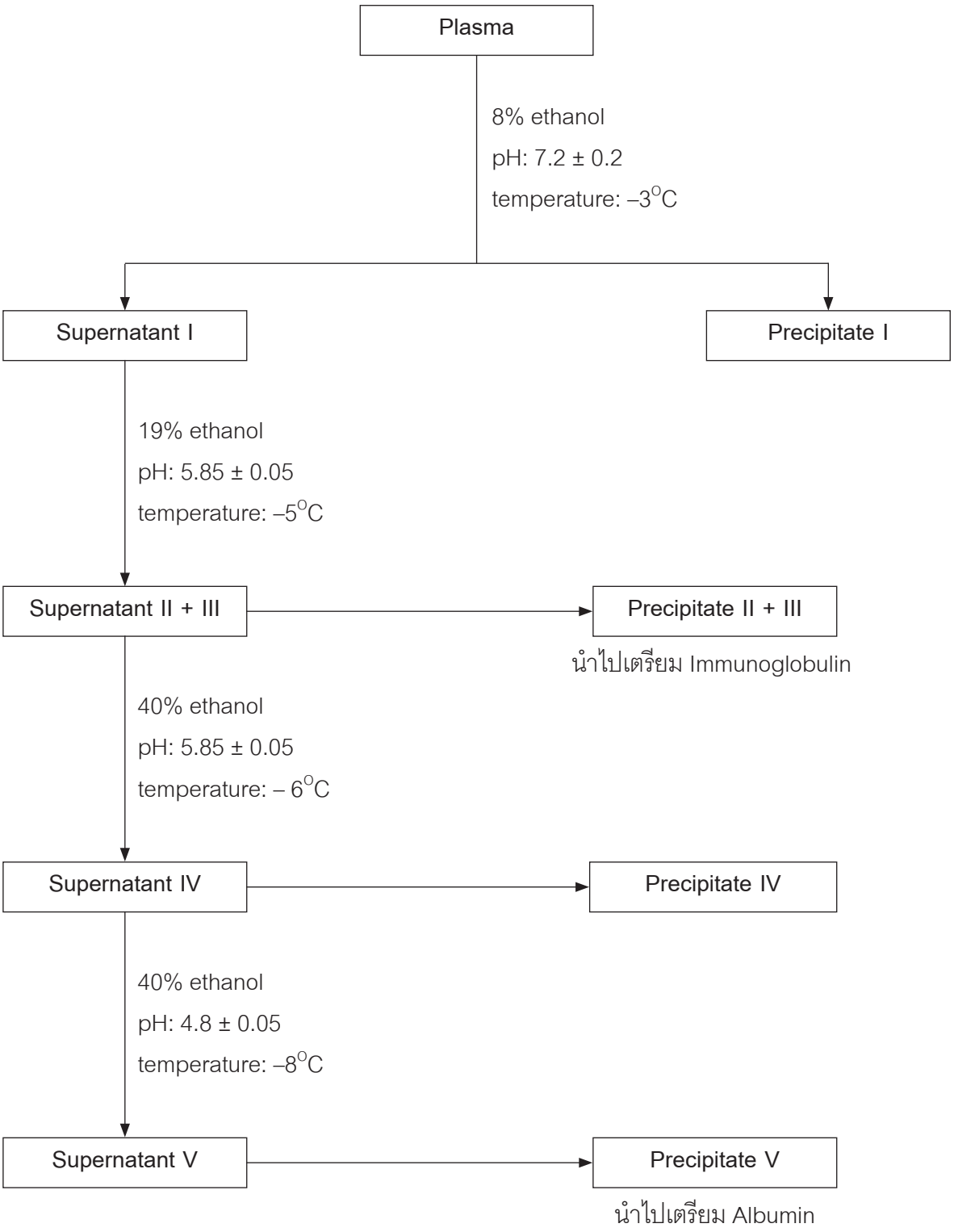
ข้อดี
1. ทำง่าย ประหยัด และเป็นพื้นฐานส่วนใหญ่ในการทำ plasma fractionation
2. toxicity ต่ำ
3. ไม่ค่อยมี bacteria contamination

ข้อเสีย
1. การใช้ alcohol ที่มี concentration สูง จะทำให้เกิดการ เสื่อมสลายของโปรตีนได้ง่าย แต่จะลดลงได้ถ้ามีอุณหภูมิต่ำ -3°C หรือ -7°C ในระหว่างการทำ fractionation
2. process ทั้งหมดจะต้องทำในห้องเย็นหรือการใช้เครื่องทำความเย็นช่วย เพื่อป้องกันการเสื่อมสลาย ของโปรตีน จึงไม่สะดวกในการปฏิบัติงาน
3. fraction V ซึ่งเป็น albumin ต้องขจัดเอา alcohol ออก
4. ethanol เป็นสารที่สามารถติดไฟได้

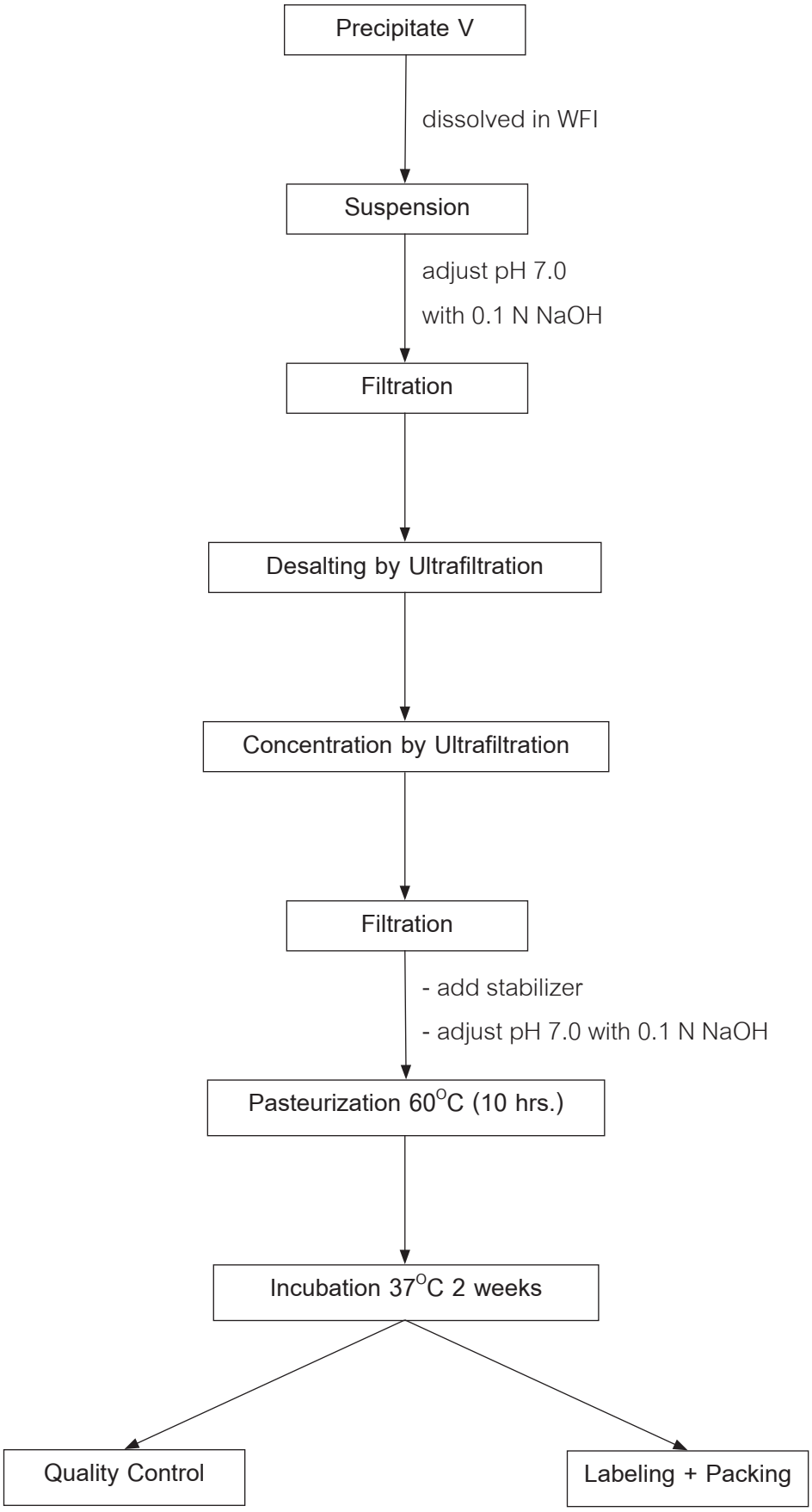
ขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนด้วย Kistler and Nitschmann method มีลำดับตามแผนภูมิที่ 1

ขั้นตอนพื้นฐานในการเตรียม albumin เป็นไปตามแผนภูมิที่ 2

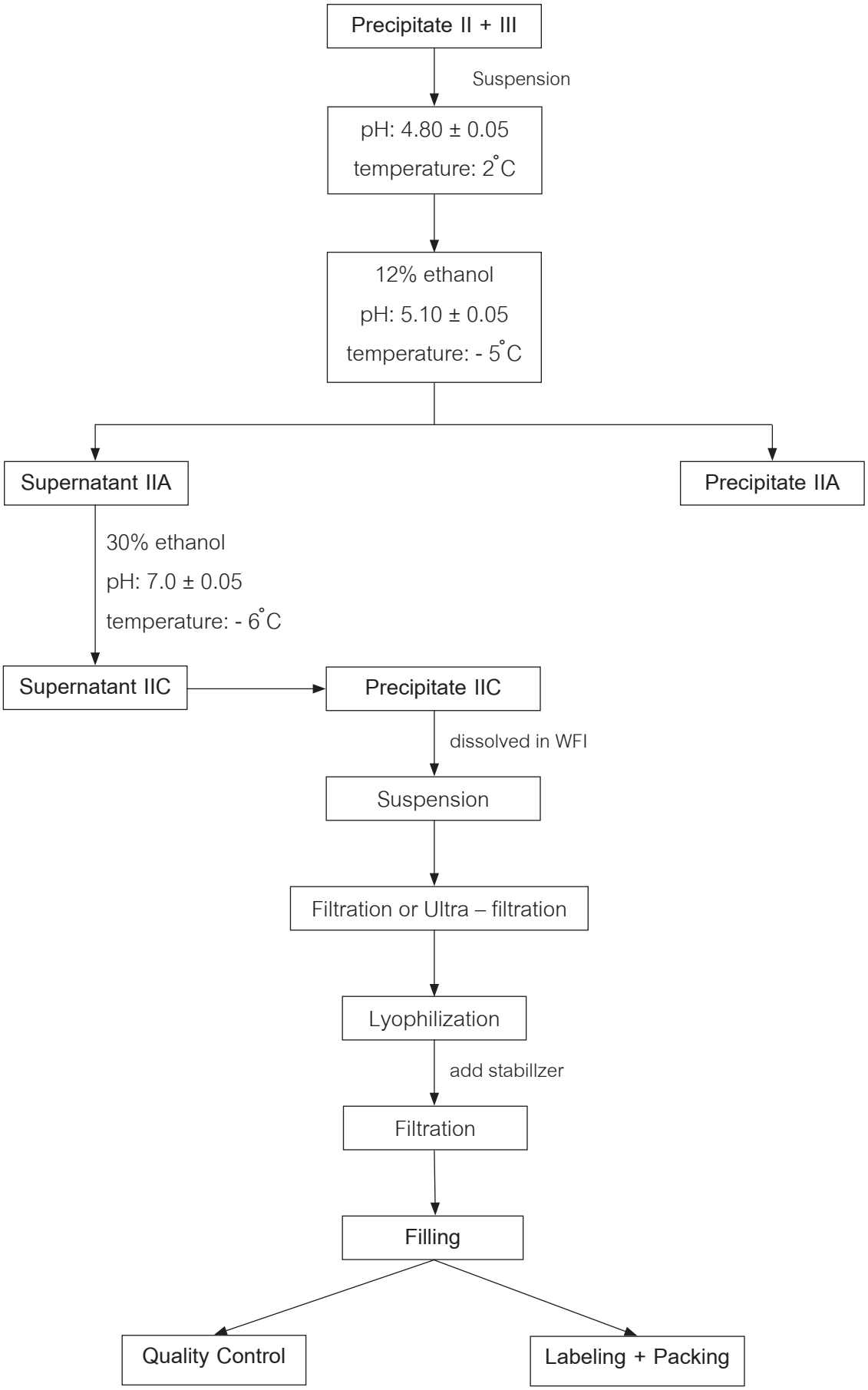
ขั้นตอนพื้นฐานในการเตรียม immunoglobulin เป็นไปตามแผนภูมิที่ 3



แผนภูมิที่ 1 ขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนด้วย Kistler and Nitschmann method



แผนภูมิที่ 2 ขั้นตอนพื้นฐานในการเตรียม albumin



แผนภูมิที่ 3 ขั้นตอนพื้นฐานในการเตรียม immunoglobulin

วิธีแลกเปลี่ยนไอออน (Ion exchange column chromatography) (แผนภูมิที่ 4)

การใช้วิธี chromatography ถือเป็นทางเลือกที่ใช้แทน Cohn method เนื่องจากจะได้ albumin ที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น ซึ่งวิธีนี้เริ่มใช้กันตั้งแต่ต้นทศวรรษที่ 1980 แต่ไม่เป็นที่แพร่หลาย เนื่องจากขาดเครื่องมือสำหรับการผลิตแบบ large scale แม้ว่าจะทำให้ albumin ที่ได้มีความบริสุทธิ์กว่าก็ตาม

วิธีนี้เป็นวิธีผสมระหว่าง ethanol กับ chromatography เพื่อแยก albumin และ immunoglobulin ให้ บริสุทธิ์ถึง 100% และจำนวนที่แยกได้ก็มีปริมาณมาก โดยแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

ขั้นตอนที่ 1 แยกเอาส่วนที่ไม่ต้องการออก และตกตะกอนด้วย alcohol

ขั้นตอนที่ 2 แยกด้วยวิธี chromatography

นำพลาสมาสดแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิ 4°C แล้วนำมาปั่นแยกเอา cryo ออก จากนั้นนำพลาสมาที่แยก cryoprecipitate ออกแล้วมาแยกเอา Factor IX complex ออกด้วยสาร Sephadex A - 50 จากนั้นก็นำพลาสมาที่เหลือมาปรับ pH ให้ได้ 5.2 และปั่นผสมค้างคืนที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อตกตะกอน euglobulin ออก รุ่งขึ้นนำมาปั่นแยก euglobulin ออกด้วยเครื่องปั่นรอบสูง แล้วนำ supernatant มากรองให้ใส ปรับ pH ให้ได้ 5.85±0.05 เติม ethanol ลงไปให้ได้ 20% ที่อุณหภูมิ -6°C เพื่อตกตะกอน fraction II + III ซึ่งจะนำไปแยกเอา albumin และ immunoglobulin โดยวิธี chromatography ต่อไป

วิธี chromatography นี้มีผู้นำไปใช้มากเนื่องจากได้ protein ชนิดอื่นๆ ซึ่งสามารถใช้รักษาโรคทางพันธุกรรม โรคที่โลหิตไหลไม่หยุด โรคขาดโปรตีนพลาสมา เช่น Factor IX deficiency เป็นต้น นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่สามารถทำลายไวรัส หรือ inactivate virus ได้ 100% โดยในปี 1980 เริ่มมีการพัฒนาการผลิตให้เป็น large scale ขึ้นด้วย

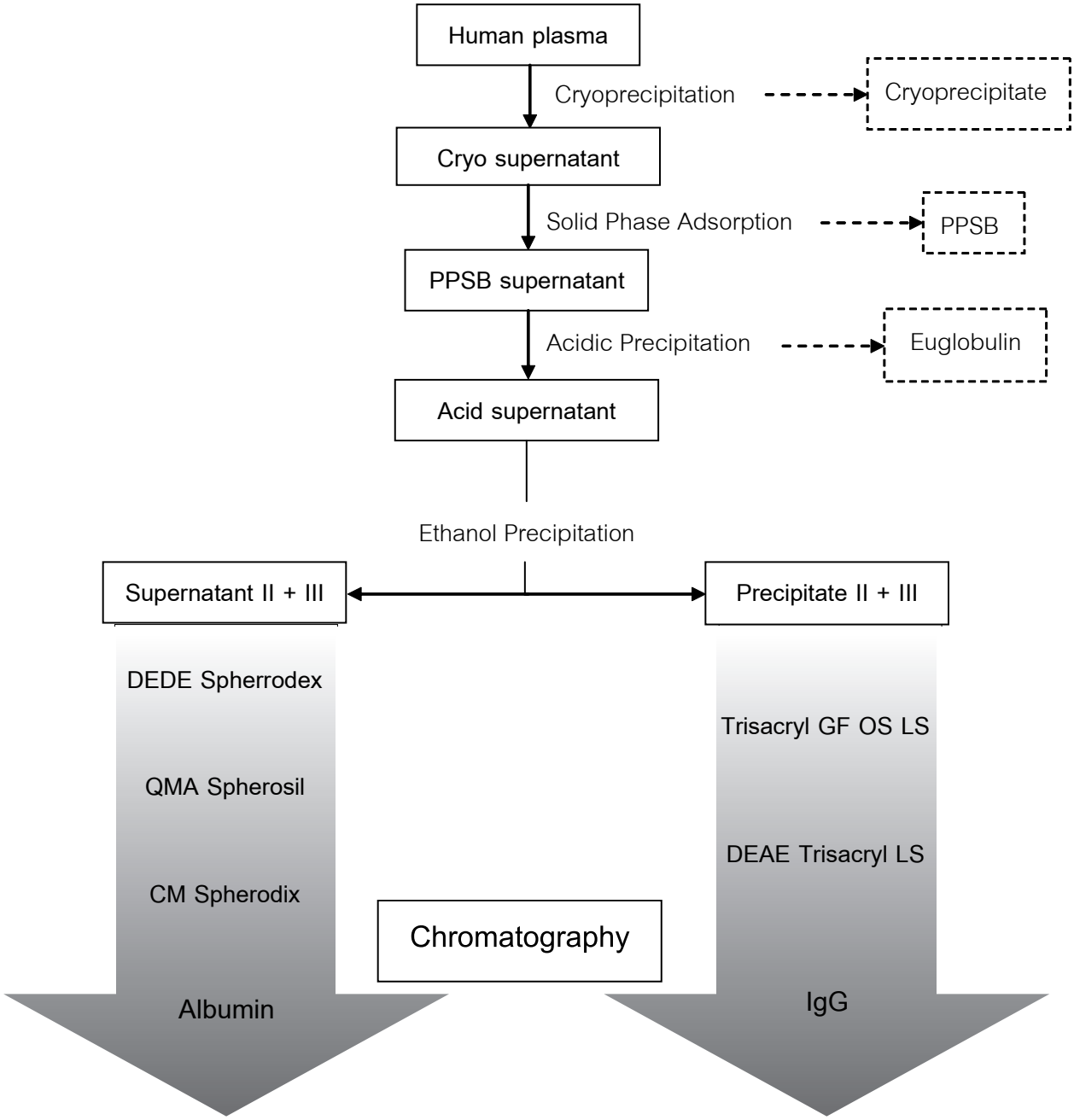
ข้อดี 1. protein ไม่เสื่อมสลาย
2. มีความบริสุทธิ์สูง

ข้อเสีย 1. มีโอกาสเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของไพโรเจน เนื่องจากกระบวนการผลิตอยู่ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลาหลายวัน
2. ราคาแพง
3. ทำ large scale ค่อนข้างลำบาก

อย่างไรก็ตามมีบางวิธีที่สามารถแยกได้ทั้ง albumin immunoglobulin และ coagulation factors ต่างๆ โดยใช้วิธี chromatography เดี่ยวๆ

การทำ plasma fractionation ด้วยวิธีของ Cohn และวิธี chromatography ต่างก็ต้องผ่านขั้นตอนการทำ viral inactivation ซึ่งต้องขึ้นกับชนิดของผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด เช่น การผลิต albumin และ IMIG ด้วย Cohn method ได้รับการยอมรับมานานกว่า 40 ปี ว่ามีความปลอดภัยจากเชื้อไวรัส โดยการทำ viral inactivation ใน albumin จะต้อง pasteurize ด้วยความร้อนที่ 60°C เป็นเวลา 10 ชั่วโมง ส่วนการ inactivation ไวรัสใน IMIG นั้นยังไม่ทราบกลไกแน่ชัด ในขณะที่การตกตะกอนโปรตีนด้วย Cohn method เดี่ยวๆ นั้นก็อาจไม่สามารถ inactivate virus ได้ จำเป็นต้องอาศัยการเพิ่มขั้นตอนพิเศษร่วมด้วย ดังเช่นการเตรียม IVIG เป็นต้น

กล่าวโดยสรุป การทำ plasma fractionation ด้วยวิธี Cohn method ซึ่งมีข้อดีคือ ทำง่ายและสะดวก ส่วนวิธี chromatography ก็มีข้อดีคือ สามารถแยกส่วนประกอบที่มีความบริสุทธิ์สูงและเตรียม plasma protein ได้หลายชนิด แต่ผลิตเป็น large scale ได้ยาก อย่างไรก็ตามทั้งสองวิธีก็ยังต้องผ่านขั้นตอนการทำ viral inactivation ด้วย



แผนภูมิที่ 4 วิธี Chromatography

ตารางที่ 4 Methods Used for Improving the Safety of Plasma Derivatives with Respect to Transmission of Viruses

Established partition methods	Cohn fractionation
	Chromatographic fractionation methods
	Ion exchange
	Hydrophobic chromatography
	Immunoaffinity chromatography
	Adding neutralizing antibodies
	Ultrafiltration
Established Inactivation methods	Heat treatments
	Heating in solution
	Heating of dry products
	Heating of dry products in steam
	Heating of dry products in organic solvent
	S/D
	Beta-propiolactone/UV
Methods under development	Photochemical inactivation
	Several photosensitizers
	Sodium chloride
	Caprylate
	Radiation (gamma, UV)

ข้อควรพิจารณา

I. การทำ plasma fractionation ที่มีคุณภาพและให้ได้ GMP

1. Source of raw material plasma

พลาสมาที่จะนำมาผลิตเป็นผลิต plasma fractionation (PF) จะต้องเตรียมจาก blood components ที่ได้มาตรฐานตามข้อกำหนดและผ่านการตรวจสอบ infectious markers ของ WHO, AABB หรือ European council

2. Water supply

น้ำที่ใช้ในการทำ PF จะต้องเป็น pyrogen free distilled water (PFW) เท่านั้น

น้ำเป็นปัจจัยสำคัญที่สุดในกระบวนการทำ plasma fractionation (ตารางที่ 1, 2, 3) จะเห็นว่าจะต้องใช้ PFW เป็นจำนวนมากในแต่ละขั้นตอน จึงจำเป็นจะต้องคำนวณปริมาณ PFW ให้เพียงพอกับกระบวนการทำ plasma fractionation เสมอทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณพลาสมาที่เริ่มต้นการผลิต PFW ใช้มากในการ dilute alcohol จาก 95% เป็น 8%, 19%, 25% และ 40% ตามลำดับ ที่ใช้ต้องเป็นน้ำแบบ freshly prepared หรือเก็บที่อุณหภูมิ 80°C ตลอดเวลา แต่ในการทำ plasma fractionation จะต้องใช้น้ำที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 10°C เสมอ การ circulate น้ำจาก tank 80°C ไปตามขั้นตอนแต่ละ process ที่ใช้น้ำต่ำกว่า 10°C ต้องอาศัย heat changer เพื่อความเหมาะสมและสะดวกในการปฏิบัติงานได้ตลอดเวลา ระบบของ PFW จะต้องเป็นแบบ closed system ตลอด process เพื่อป้องกันการเกิด bacterial contamination

ในการเตรียมน้ำ PFW ต้องคำนึงถึง

- Tank capacity ที่กลั่นได้ต่อชั่วโมงและในการจัดเก็บน้ำที่ 80°C ตลอดเวลาเพื่อป้องการ bacterial contamination
- การ circulate PFW จาก tank 80°C ผ่าน heat changer ไปยัง tank ที่เก็บน้ำ <10°C ในการ dilute alcohol และในการทำ ultrafiltration (UF)
- ปริมาณน้ำที่ต้องใช้ล้าง tanks ที่ทำ PF แต่ละขั้นตอนแบบ clean in place (CIP)

3. Ethanol supply

Ethanol เป็นสารที่ไวไฟและใช้ปริมาณค่อนข้างมาก จะต้องจัดเก็บในที่ปลอดภัย

4. Centrifuge capacity

การทำ plasma fractionation จะต้องใช้เครื่องปั่นแรงสูง (CEPA) 17,000 รอบ/นาที เป็นเครื่องมือที่มีราคาแพง จำเป็นต้องวิเคราะห์ให้ดีว่าควรใช้เครื่องปั่นแรงสูงจำนวนกี่เครื่อง เพื่อให้พอ

เหมาะกับพลาสมาที่จะนำมา process แต่ละครั้งต่ออาทิตย์

5. Tank Capacity

Tank ที่ใส่พลาสมากับ ethanol ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันในแต่ละขั้นตอน แต่ละ tank ควรจะใช้ fixed tanks พร้อมทั้ง stirrers และมีระบบล้าง tanks แบบ clean in place (CIP) ขนาดของ tank ขึ้นอยู่กับปริมาณพลาสมาที่จะเริ่มต้นการผลิตต่อครั้ง/อาทิตย์

ในการผลิต plasma fractionation ความเข้มข้นของ ethanol ในพลาสมา แต่ละขั้นตอนจะต้องนำไป centrifuge ในเครื่องปั่นแรงสูง แต่ละ fraction จะผ่านจาก tank หนึ่งไปยังอีก tank หนึ่งได้ โดยใช้เครื่อง peristaltic pump

สำหรับความเย็นของ tank อาจจะใช้ tank แบบ double jacket หรือจะใช้แบบ cooling internal coil ก็ได้

6. Cooling capacity

การทำ plasma fractionation จะต้องทำในห้องเย็นหรือถังที่มีความเย็นหล่อเลี้ยงตลอดเวลา เพื่อลด bacterial contamination อุณหภูมิที่ใช้ 4°C, -5°C, -30°C

Tank cooling อุณหภูมิ -20°C

Water cooling มีระบบ cooling / heat changer เพื่อให้น้ำที่เก็บได้มีอุณหภูมิต่ำกว่า 10°C เพื่อเตรียม buffer ต่างๆ และการทำ ultra filtration

น้ำที่ใช้ในการล้าง tank แบบ clean in place

7. Ultra filtration capacity

เพื่อล้างสารเคมีและแอลกอฮอลที่ปนเปื้อนอยู่ในกระบวนการผลิตให้อยู่ในระดับที่ปลอดภัยแก่คนไข้ และป้องกันการเกิด aggregation ใน albumin

8. Freeze dryer

การทำ plasma fractionation บางผลิตภัณฑ์จะต้องเตรียมเป็นชนิดผง ซึ่งเครื่อง freeze dryer จะมีราคาแพงมาก จำเป็นต้องอาศัยผู้มีความรู้ ความชำนาญ ในการดูแลและติดตามเครื่องเป็นอย่างดีตลอดเวลา และจะต้องอยู่ในห้อง clean room ตาม GMP ที่กำหนดไว้

9. Dispensing / Pasteurization / Incubation / Inspection / Packing and Labelling

- ขวดและฝาครอบจะต้องเตรียมแบบ sterile ตามมาตรฐานที่กำหนดในเภสัชตำรับก่อนนำมาบรรจุผลิตภัณฑ์
- Water Bath ที่ใช้ในการ Pasteurization albumin ที่ 60°C 10 ชั่วโมง
- การ Incubation ที่ 37°C 2 สัปดาห์
- Inspection ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ให้ได้มาตรฐานก่อนการบรรจุ
- Packing & Labeling การบรรจุหีบห่อ ติดฉลาก วันที่ผลิต วันที่หมดอายุ รุ่นการผลิตและส่วนประกอบที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์

10. ห้อง clean rooms แต่ละห้อง จะต้องให้ได้ GMP และมาตรฐานตามที่กำหนดแต่ละขั้นตอนในการปฏิบัติงาน

11. ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากพลาสมานั้น จะต้องผ่านการ validation และผ่านการตรวจสอบคุณภาพก่อนนำไปใช้กับคนไข้

II. Quality Control

กระบวนการผลิต plasma fractionation ทุกขั้นตอนจะต้องให้ได้ GMP และผ่านการตรวจสอบคุณภาพให้ได้มาตรฐานตามเภสัชตำรับ

พื้นที่ในการทำ plasma fractionation

Size of plasma fractionation plant 10,000 ลิตร ใช้พื้นที่ 1,200 m^2

Local running cost = 14-28 ล้าน/ปี

Personnel requirement = 17 คน shift workers

Products from plasma 10,000 ลิตร จะได้ผลิตภัณฑ์ดังนี้

Purified coagulation FVIII	6,000 ขวด , 250 IU/ขวด
FIX complex	12,500 ขวด 200 IU/ขวด
Normal Immunoglobulin	16,000 ขวด 2.5 g/ขวด
Albumin	25,000 ขวด 10g/ขวด

Size of plasma fractionation plant 100,000 ลิตร ใช้พื้นที่ 7,000 m^2

- 3,000 m^2 for manufacturing
- 500 m^2 for quality control
- 1,500 m^2 for maintenance and utilities
- 1,700 m^2 for ware housing
- 300 m^2 for production administration

Staff จะต้องได้รับการฝึกอบรมอย่างดี และปฏิบัติอย่างเข้มงวด

- production	=	20 คน
- engineering	=	5 คน
- administration	=	6 คน
- controls	=	8 คน

เอกสารอ้างอิง

1. *Burnouf T. Chromatography in plasma fractionation: benefits and future trends. J Chromatogr B 1995;664:3-15.*
2. *Suamela H. Inactivation of viruses in blood and plasma products. Transfus Med Rev 1993;7(1):42-57.*
3. *Burnouf T. Chromatographic removal of viruses from plasma derivatives.* Dev Biol Stand *1993;81:199-209.*
4. *Morgenthaler JJ. Effect of ethanol on viruses. Curr Stud Hematol Blood Transfus 1989;56:109-21.*
5. *Burnouf T. Modern plasma fractionation. Transfus Med Rev 2007;21(2):101-17.*
6. *Hilfenhaus J, Gröner A, Nowak T, Weimer T. Analysis of human plasma products: polymerase chain reaction does not discriminate between live and inactivated viruses. Transfusion 1997;37:935-40.*
7. *Schneider W, Lefèvre H, Fiedler H, McCarty LJ. An alternative method of large scale plasma fractionation for the isolation of serum albumin. Ann Hematol 1975;30(2):121-34.*
8. *Roboack JD, Combs MR, Grossman BJ, Hillyer CD,ed. Bethesda, Maryland; AAB 2008;189-225.*
9. *Council of Europe. Guide to the praparation, use and quality assurance of blood components. 14th ed. Strasbourg Cedex: Council of Europe, 2008;113-6, 161-73.*
10. *PIC/S Secretariat. Guide to good manufacturing practice for medicinal products (January 2009). Available from http://www.picscheme.org.*