

VOORSCHRIFTEN:

Laboratorium voor

CRYO-BIOLOGIE

I N H O U D
=====

700

1 = Het invriezen, bewaren, ontdooien en wassen van
erythrocyten

4 pag.

HET INVRIEZEN, BEWAREN, ONTDOOIEN EN WASSEN VAN ERYTHROCYTENDoel:

Het bewaren van erythrocyten gedurende onbeperkte tijd.

Toepassingsgebied:

In het CLB worden erythrocyten ingevroren bij -196°C ten behoeve van:

1. zeldzaam voorkomende bloedgroepcombinaties;
2. autologe donores voor wie geen andere passende donor gevonden kan worden;
3. een groep patienten, die gefiltreerd bloed behoeven teneinde vorming van leucocyten antistoffen te voorkomen.

Principe:

Na toevoeging van een vriesbeschermende stof (glycerol) worden eenheden erythrocyten ingevroren met een bepaalde koelsnelheid tot de temperatuur van vloeibare stikstof is bereikt (-196°C). Bij deze temperatuur kunnen de erythrocyten onbeperkt bewaard blijven in een biostaat. Er wordt ontdooid totdat kamertemperatuur is bereikt. Glycerol en vrijgekomen haemoglobine moeten worden uitgewassen in drie stappen. De uitvoering gebeurt steriel.

Methodiek:

- A. voor eenheden van ongeveer 500 ml bloed
- B. voor kleine volumina

Benodigde materialen:

- Oplossingen:
1. Invriesmengsel:

Glycerol	38 % (w/v)
Sorbitol	2,9% (w/v)
NaCl	0,63% (w/v)
H ₂ O	tot 1000 ml
 2. Sorbitol oplossing:

Sorbitol	17,5% (w/v)
NaCl	0,8% (w/v)
H ₂ O	tot 1000 ml
 3. Natriumchloride 0,9%

- Containers:
4. Aluminium bloedbussen (schoon en steriel)
 - Rietjes 1 ml, één zijde afgesloten met stopje (niet steriel)
 - Glazen flesjes 8 ml, 15 ml en 25 ml

- Diversen:
5. 2-naald koppelsysteem
Ontluchtingslangen (korte en lange naald)
 6. Lege plastic zak met 5 flessenaalden, speciaal voor het wassen
 7. 5 vacuümflessen, watergespeeld, steriel en pyrogeenvrij
 8. Dewarvat met vloeibare stikstof
 9. Biostaat (opslagruimte bij -196°C)
 10. Waterbad ($+40^{\circ}\text{C}$) met schudinrichting (60 slagen per min).

Uitvoering A. Er wordt steriel gewerkt bij het uitvoeren van onderstaande punten.

1. Er wordt uitgegaan van ongeveer 500 ml onstolbaar gemaakt bloed.
 2. Verwijdering van het plasma door centrifugeren. Het plasma kan eventueel gevriesdroogd worden en als eiwitpoeder bewaard worden.
 3. Toevoeging van 300 ml invriesmengsel aan de packed cells. Is het packed cell volume kleiner dan 200 ml, dan wordt 1:1 toegevoegd. Het toevoegen gebeurt snel op een roterend plateau.
 4. Overbrengen van deze geglyceroliseerde celsuspensie in de bloedbus. De bus wordt voorzien van een volgnummer, donornaam en invriesdatum; zie punt 17. Van de geglyceroliseerde celsuspensie worden kruisproefmonsters genomen; deze worden apart behandeld volgens uitvoering B, punt 4a.
 5. Na zorgvuldig sluiten van de bus wordt deze afgekoeld, in verticale positie, in een dewarvat met vloeibare stikstof. De eindtemperatuur na dit proces, dat 10 min. duurt, is -196°C .
- N.B.: Wees voorzichtig met vloeibare stikstof; vriesletsel en/of explosiegevaar is niet uitgesloten.
6. Transport van de bloedbus naar de biostaat, waarin deze bewaard kan blijven in de dampfase van vloeibare stikstof.
 7. Ontdooien gebeurt in een waterbad (temp. $+40^{\circ}\text{C}$) met schudinrichting (60 slagen/min.). Het bad is geschikt voor het tegelijkertijd ontdooien van 4 bloedbussen. Ontdooitijd is 10 min.
 8. Een extra lange naald met ontluchtings slang wordt ingebracht. Vervolgens wordt de inhoud van de bus overgebracht in een plastic zak, die voorzien is van 5 naalden. Hiervoor wordt de eerste van de 5 naalden gebruikt. Wanneer de zak gevuld is met de ontdooide celsuspensie wordt deze slang dicht gelast.
 9. Centrifugeren van de celsuspensie.

10. Verwijdering van de bovenstaande vloeistof, die glycerol en haemoglobine bevat, via de tweede slang naar een vacuümfles. Toevoegen van 250 ml Sorbitoloplossing door dezelfde slang onder voortdurend mengen.
11. Centrifugeer stap.
12. Zie punt 10; echter nu wordt in plaats van sorbitol een NaCl 0,9% oplossing (ca 300 ml) toegevoegd.
13. Centrifugeer stap.
14. Zie punt 12; nogmaals een NaCl 0,9% wassing.
15. Centrifugeer stap; verwijderen van de bovenstaande vloeistof.
16. Reconstitutie: a) met 75 ml NaCl 0,9%; of
b) met plasma (eventueel autoloog, op speciaal verzoek).

Gevriesdroogd plasma (zie punt 2.) wordt in aqua dest (steriel en pyrogeenvrij) opgelost tot het oorspronkelijke volume, waarna het toegevoegd wordt aan de ontdooide en gewassen erythrocyten.

De houdbaarheid van het eindprodukt is 24 uur bij +4°C.

17. Administratie.

Alle gegevens, die nodig zijn om verwisseling van bussen te voorkomen en het snel terugvinden van bussen mogelijk te maken, worden vermeld op een protocol/ponskoncept. Hiervan wordt een computerlijst gemaakt zodat er een compact overzicht is van alle in voorraad zijnde ingevroren eenheden bloed.

Een uitgebreid voorschrift is aanwezig op de afdeling Cryobiologie.

Uitvoering B. In de routine-uitvoering wordt niet steriel gewerkt.

Bij gebruik van afsluitbare flesjes is het echter wel mogelijk om steriel te werken. Uitvoering A wordt gevolgd, met wijzigingen bij de volgende punten:

1. Er wordt uitgegaan van volumina van 1 - 50 ml onstolbaar gemaakt bloed.
 2. Plasma wordt niet bewaard door de afdeling Cryobiologie.
 3. De verhouding erythrocyten: invriesmengsel moet nauwkeurig 1:1 zijn.
- 4-6 De suspensie wordt verdeeld over:
- a) rietjes met een inhoud van 1 ml (= $\frac{1}{2}$ ml packed cells). Deze zijn niet afsluitbaar. De rietjes zijn verkrijgbaar in 8 kleuren. De kleur heeft een coderingsfunctie. Voorzien van een 6-cijferig kodenummer worden de rietjes ingevroren m.b.v. geprogrammeerde invriesapparatuur, waarna ze in een biostaat worden opgeslagen.

- b) flesjes waarin 1 ml, 3 ml, 6 ml, 10 ml of 20 ml packed cells worden uitgevuld. De flesjes worden afgesloten met een penicilline dopje en een aluminium kapje. Voorzien van een 6-cijferig kodenummer worden deze flesjes ingevroren in vloeibare stikstof.
7. Ontdooien: in waterbad $+40^{\circ}\text{C}$.
- a) rietjes gedurende 20 sec. in stilstaande verticale positie.
N.B.: Vermijd elk contact van water met de inhoud van het rietje.
- b) flesjes gedurende 2-4 minuten m.b.v. de schudinrichting (60 slagen/min.).
8. Openen en ledigen:
- a) rietje met open zijde in een reageerbuis; het stopje met een schaar afknippen.
- b) flesjes: een ontluchtingsnaald door de rubberstop prikken.
Verwijderen van de stop. Inhoud overbrengen in reageerbuis of fles.
- 9-15 Wasprocedure: analoog aan uitvoering A, echter met aangepaste volumina (1:1).
- 16 De erythrocyten worden in een 10% suspensie in bewaarvloeistof bewaard.
Houdbaarheid 3 weken bij $+4^{\circ}\text{C}$.