



---

**Adviesomtrent dediepgevoren rode bloedlichaampjes:  
praktische modaliteiten, bereiding en gebruik**

-  
**HGR: 7847**

---

**Tijdens de vergadering van 20.11.2003, waarvan de notulen – voor wat dit punt betreft -tijdens de zitting goedgekeurd werden, heeft de Hoge Gezondheidsraad (afdeling 2.1) het volgende advies uitgebracht omtrent de diepgevoren rode bloedlichaampjes: praktische modaliteiten, bereiding en gebruik:**

I.

Dit advies werd op vraag van de heer Minister J. TAVERNIER opgesteld (ref. AD270303 ; 28.03.03) ; deze vraag is zelf het gevolg van een schrijven aan minister Tavernier vanwege de heer Minister van Defensie A. FLAHAUT, betreffende de bewaringstermijn van ingevoren rode bloedcellen na ontdooiing.

De bewaringstermijn werd bij koninklijk besluit van 04.04.1996 vastgelegd op maximaal 24 uren. Op basis van een aantal elementen zoals het gebruik van een gesloten systeem en resuspensie van de ontdooide rode bloedcellen in een additieve oplossing en de ervaring van de militaire bloedtransfusiedienst wordt een herziening van de bewaringstermijn gevraagd

II. Algemene beschouwingen :

Met betrekking tot de vraag van de heer Minister, lijkt het voor de werkgroep « Bloed en Beenmerg » van de Hoge Gezondheidsraad duidelijk dat er, in een eerste benadering, aan dient herinnerd te worden dat het probleem van de bewaringstermijn eerst en vooral het leger betreft en weinig de burgermaatschappij. Men mag niet uit het oog verliezen dat er op zich en op inherente wijze duidelijke verschillen bestaan tussen de burgerlijke en de militaire wereld qua opvatting van de problemen en hun behandeling.

Het zou ten andere wenselijk zijn om bij het Raadgevend Comité Bio-Ethiek te vragen of het opslaan van een grote hoeveelheid O RhD neg-bloed, waarvan het gebruik een (onopgeloste) vraag blijft, opportuun is; te meer daar er aan bloedeenheden geschonken door ORh D negatieve donors steeds een grote nood bestaat.

Bovendien lijkt het aangewezen om de toediening van ontdooide ingevoren rode bloedcellen aan patiënten, zonder duidelijke indicatie voor de toediening van dit type cellen, voorafgaandelijk voor te leggen aan het ethisch comité van het ziekenhuis. Dit omwille van de bijzondere zorg waarmee de bewerkelijke en ingewikkelde, en bijgevolg kostelijke, procedure van bereiding en bewaring dient omringd te worden. Bovendien dient er rekening gehouden te worden met de aanbevelingen van de Raad van Europa die de indicaties voor toediening van dit type cellen voorbehoudt voor specifieke

toepassingen. De ervaring die er in de wereld bestaat met betrekking tot debevoorrading met bloedeenheden van de (burger)ziekenhuizen ter gelegenheid van grote rampen of ongelukken leert ten andere dat er geen enkele noodzaak bestaat om een grote voorraad ingevroren rode bloedcellen aan te leggen. Het vergt bovendien veel tijd om een grote hoeveelheid ingevroren rode bloedcellen te ontdooien. Ook dient er bijzondere aandacht besteed te worden of de criteria waaraan de donors en dedonaties op het ogenblik van de bloedafname dienden te voldoen nadien, tijdens de jarenlange bewaring, niet gewijzigd of verstrengd werden waardoor (een deel van) het bewaarde bloed niet langer voor toediening in aanmerking zou komen.

De gegevens die met betrekking tot het onderwerp bezorgd werden zijn interessant maar het is belangrijk meer resultaten bijeen te brengen en de bevindingen te staven. In deze optiek kan de afdeling « Bloed en Beenmerg » de auteurs van de uitgevoerde studies slechts aanmoedigen om hun resultaten te publiceren en ze aan de wetenschappelijke en kritische beoordeling te onderwerpen.

Naast deze overwegingen, om het standpunt van de HGR wetenschappelijk te staven, wordt besloten een omstandig verslag als bijlage aan dit advies toe te voegen.

### III. Besluit en advies :

De werkgroep “bloed en beenmerg” van de Hoge Gezondheidsraad meent dat er geen noodzaak bestaat om de bewaringstermijn van ingevroren rode bloedcellen na ontdooiing in België te wijzigen. Ook is de werkgroep van mening dat de indicaties voor toediening van deze rode bloedcellen zeer beperkt zijn en dat de toediening ervan buiten deze indicaties niet aangewezen is.

### IV. Bijlage :

Verslag over “Bewaringstermijn van rode bloedcellen, gesuspenseerd in een additieve oplossing, na een invries – ontdooi cyclus.

### V. Verspreiding van deze aanbevelingen:

De werkgroep is van mening dat het huidige advies integraal naar de Minister van Volksgezondheid mag worden overgemaakt en op de website mag gepubliceerd worden.

### VI. Samenstelling van de expertengroep die aan het advies hebben meegewerkt:

- BAELE P.
- CRAS P.
- DESMYTER J.
- DOBBELAER R.
- FERRANT A.
- GOUBAU P.
- LAMBERMONT M.
- LATINNE D.
- MUYLLE L.

- PLUM J.
- SONDAG D.
- STEENSSENS L.
- THOMAS I.
- VAN RANST M.
- VOETS E.D.

**Namens Professor Sondag – Thull,**

**De Voorzitter van de afdeling “Bloed en Beenmerg” van de Hoge Gezondheidsraad**

**De Secretaris van de Hoge Gezondheidsraad**

**G. Devleeschouwer**

Bijlage:

**Bewaringstermijn van rode bloedcellen, gesuspenderd in een additieve oplossing, na een invries –ontdooi cyclus**

## **A. Inleiding**

Rode bloedcellen (RBC) kunnen ingevroren worden om een langdurige bewaring van eenheden met zeldzame bloedgroepfenotypes toe te laten. Ingevroren RBC kunnen 10 jaar bewaard worden op een temperatuur lager dan  $-65^{\circ}\text{C}$ . Het invriesproces dient nauwkeurig uitgevoerd te worden om een goede viabiliteit van de ontdooide RBC te bekomen. Het gebruik van een cryoprotectans zoals glycerol (in geval van bewaring bij  $-80^{\circ}\text{C}$  wordt een 40 % glycerol oplossing gebruikt) is belangrijk om de viabiliteit van de cellen te behouden. Ingevroren eenheden dienen ontdooid en gewassen te worden (om het glycerol vóórtoediening te verwijderen). Het cryoprotectans wordt verwijderd door een reeks van wasstappen waarbij oplossingen met dalende osmolariteit gebruikt worden. Het gradueel verwijderen van het cryoprotectans is zeer belangrijk om afbraak van de rode bloedcellen te vermijden en om de (RBC) oplossing tot een normale osmolariteit te brengen. Het eindproduct wordt normaal in een fysiologische zoutoplossing opgelost; het bevat meer dan 80 % van de originele RBC, minder dan  $10^8$  witte bloedcellen (dus niet leukocyten gedepleteerd), de oplossing bevat weinig plasma en heeft een osmolariteit lager dan 340 mOsm/l.

De bewaring van rode bloedcellen na een invries - ontdooi cyclus is beperkt tot maximum 24 uur op  $4^{\circ}\text{C}$ . Deze korte bewaringstermijn is het gevolg van het feit dat het gesloten systeem geopend dient te worden omwille van vele handelingen, en er aldus een risico op bacteriële besmetting van de RBC ontstaat.

Een toestel werd ontwikkeld (ACP 215, Haemonetics) dat toelaat om gebruik makend van een set voor eenmalig gebruik, aan het rode bloedcellenconcentraat glycerol toe te voegen of weg te wassen, en dit op een automatische en functioneel gesloten wijze. Koppeling tussen het erytrocytenconcentraat en de set voor eenmalig gebruik gebeurt door middel van een steriel connectie hulpmiddel (SCD). Bijgevolg stelt zich de vraag of, hoelang, en onder welke voorwaarden,

ontdooide rode bloedcellen bewaard kunnen worden. Om (langere) bewaring toe te laten worden de ontdooide RBC opgelost in een additieve oplossing zoals SAGM of AS-3, die naast NaCl ondermeer dextrose en adenine bevatten (zie tabel 1).

## B. Bereiding, indicatie en kwaliteitsverzekering

De Gids van de Raad van Europa beveelt aan om ingevroren RBC enkel in bijzondere situaties te gebruiken, namelijk voor :

- transfusie van RBC aan patiënten met zeldzame bloedgroepen of met multiple alloantistoffen;
- immunisatiedoelstellingen waarbij de RBC ten minste zes maanden bewaard worden om het hertesten van de donor mogelijk te maken;
- kan in overweging genomen worden in sommige gevallen van auto-logtransfusie.

Voor bereiding en kwaliteitsverzekering wordt verwezen naar de aanbevelingen van de Raad van Europa <sup>1</sup>.

## C. Gebruik van het ACP 215 toestel

In 4 artikelen wordt het gebruik van het toestel en het gesloten systeem gerapporteerd <sup>1234 = 2345</sup>. In één artikel worden de ontdooide RBC tijdens de finale stap gewassen met een SAGM oplossing waarin ze ook verder bewaard worden op 4 ° C <sup>2</sup>. In drie andere artikelen werd een AS-3 oplossing gebruikt <sup>345</sup>.

### Hemolysetijdens de ontdooi - wascyclus

Na de invries - ontdooi - was cyclus werd respectievelijk 90 % ± 2 %, 87 % ± 5 %, 89 % ± 3 % van de RBC teruggevonden (geen vermelding in studie 4).

Lelkens en medewerkers <sup>(2)</sup> stelden vast dat de glycerolisatie, zonder invries - ontdooi stappen, en gevolgd door de wasstap een belangrijke hemolyse (11% ± 3 %) van de RBC veroorzaakte. De hemolyse was niet groter in de studiearm waar de RBC de hele invries - ontdooiprocedure doorliepen.

Valeri en medewerkers <sup>(3,4)</sup> melden ook dat een aantal eenheden niet kon gebruikt worden: 3 eenheden die een lek vertoonden als gevolg van een niet correcte las van de tubing, en 2 eenheden die niet volledig gerecupereerd konden worden tijdens de behandeling (op 163 eenheden).

Dit wijst op de bijzondere zorg waarmee de procedure omringd dient te worden. Op het einde van de bewaring werd van alle eenheden die in de studie opgenomen waren (n = 142), een monster genomen voor aerobe en anaerobe kweek. In één eenheid werd een *Propionibacterium acnes* aangetoond. Verondersteld werd dat de besmetting gebeurde tijdens de bloedafname.

### Hemolysetijdens de bewaring op 4 ° C van ontdooide RBC

RBC in AS - 3 toonden 0,3 % ± 0,1 % hemolyse na 1 dag bewaring, 0,5 % ± 0,1 % hemolyse na 7

dagen,  $0,5 \% \pm 0,2 \%$  na 14 dagen en  $0,9 \% \pm 0,2 \%$  na 21 dagen

De concentraties vrij plasma hemoglobine en plasma  $K^+$  namen ook toe, en dit in verhouding tot het % gehemolyseerde RBC. De gevonden concentraties voor RBC in AS – 3 na 14 dagen bewaring voldeden aan de criteria van de Raad van Europa <sup>1</sup>.

### **pH en ATP gehalten van de RBC**

De pH van RBC in AS – 3 is laag bij de start van de bewaring (pH :  $6,4 \pm 0,1$ ) en daalt verder tijdens de bewaring. Dit is te wijten aan de zure pH van de AS – 3 oplossing. Als gevolg van deze lage pH wordt de glycolyse tijdens de bewaring zeer sterk gereduceerd en is er geen significante ATP vorming meer, zodat de ATP waarden van de RBC in AS – 3 na 2 weken zo sterk dalen dat deze niet meer compatibel zijn met een succesvolle posttransfusie overleving van de RBC (een oplossing met een hogere pH kan hier naar de toekomst toe een oplossing bieden).

In de studie met de RBC in SAGM werd aangetoond dat het ATP gehalte van RBC bij de start van de bewaring normaal was, maar reeds vanaf dag 2 snel daalde <sup>2</sup>. Bovendien werd vastgesteld dat het totale adenylaatgehalte van de RBC (ATP, ADP, AMP) duidelijk verlaagd was in vergelijking met de waarde vóór invriezen.

Högman en medewerkers stelden vast dat het totale adenylaatgehalte een betere correlatie vertoont met de overleving van de RBC, dan het ATP gehalte (<sup>5</sup>). Bijgevolg zou dit een effect kunnen hebben op de posttransfusie overleving van de RBC (SAGM). De auteurs voerden geen in vivo studie uit om dit na te gaan.

Tijdens de bewaring van RBC in SAGM werd ook een snelle toename van de hemolyse vastgesteld : meer dan 1 % na 7 dagen bewaring op  $4^{\circ} C$  <sup>2</sup>. Volgens de aanbevelingen van de Raad van Europa dient de hemolyse op het einde van de bewaring minder dan 0,8 % te bedragen <sup>1</sup>.

Verder dient vermeld te worden dat RBC in AS – 3 tijdens de hele duur van de bewaring een hoog mean corpuscular volume (MCV) vertonen ( $110 \text{ fl}$ ; normale waarden :  $88 \text{ fl} \pm 8 \text{ fl}$ ) <sup>5</sup>. Betekenis ?

### **24 uur posttransfusie overleving en RBC halfleven**

De 24 uur posttransfusie overleving van RBC in AS-3 was  $81 \% \pm 3 \%$  na 7 dagen bewaring,

$77 \% \pm 9 \%$  na 15 dagen bewaring en  $65 \% \pm 7 \%$  na 21 dagen bewaring <sup>3,4</sup>. Het halfleven van de RBC was  $28 \pm 4$  dagen na 15 dagen bewaring terwijl het halfleven van controle RBC, bewaard in AS-1 gedurende 42 dagen,  $27 \pm 3$  dagen bedroeg <sup>3</sup>.

## **D. Samenvatting**

Het ACP 215 systeem biedt de mogelijkheid om RBC in een gesloten systeem te behandelen, zodat de bewaring van ontdooide RBC gesuspenderd in een additieve oplossing langer dan 24 uur mogelijk wordt.

De keuze van additieve oplossing is belangrijk. Wegens de snelle toename van de hemolyse van RBC in SAGM is deze oplossing niet geschikt. Bewaring van RBC in AS-3 gedurende 7 dagen lijkt aanvaardbaar. Nochtans dient er bijtoediening aan patiënten (en vooral in geval van kinderen) rekening gehouden te worden met de lage pH van de oplossing en het hoog MCV van de RBC. Ook dient erop gewezen dat de procedure vele handelingen (kans op fouten) inhoudt, bewerkelijk is en

zeer duur. Om die redenen dienen de indicaties beperkte zijn en bij voorkeur overeen te stemmen met deze die vastgelegd zijn in de aanbevelingen van de Raad van Europa.

## E. Referenties

- (1) Council of Europe. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 9<sup>th</sup> edition 2003, p 115-118.
- (2) Lelkens CC, Noorman F, Koning JG, et al. Stability after thawing of RBCs frozen with the high- and low-glycerol method. *Transfusion* 2003; 43 :157-64.
- (3) Valeri C, Ragno G, Pinacek LE et al. A multicenter study of in vitro and in vivo values in human BCs frozen with 40-percent (wt/vol) glycerol and stored after deglycerolization for 15 days at 4 degrees C in AS-3: assessment of RBC processing in the ACP 215. *Transfusion*. 2001; 41:933-9. Erratum in: *Transfusion* 2002 ;42:1618.
- (4) Valeri C, Ragno G, Pinacek LE et al. In vivo survival of apheresis RBCs, frozen with 40-percent (wt/vol) glycerol, deglycerolized in the ACP 215, and stored at 4 degrees C in AS-3 for up to 21 days. *Transfusion* 2001;41:928-32.
- (5) Hess JR, Hill HR, Oliver CK et al : The effect of two additive solutions on the postthaw storage of RBCs. *Transfusion* 2001; 41: 923-927.
- (6) Högman CF, de Verdier CH, Ericson A, et al. Studies on the mechanism of human red cells loss of viability during storage at + 4 degrees C in vitro. I. Cell shape and total adenylate concentration as determinant factors for post transfusion survival. *Vox Sang* 1985; 48:257-68.

Tabel 1 : Samenstelling van de RBC additieve oplossingen

	<b>SAG-M</b>	<b>AS-3</b>
NaCl	8,77 g	4,1 g
Dextrose	8,2 g	10,0 g
Adenine	0,169 g	0,3 g
Mannitol	5,25 g	
Natrium dihydrofosfaat		2,76 g
Trinatrium citraat		5,88 g
Citroenzuur		0,456 g
Water tot	1 liter	1 liter

100 ml van deze oplossing ( SAGM : pH 5.7; AS-3 : pH 5,8) wordt aan ongeveer 200 ml RBC (uit 450 ml volledig bloed ) toegevoegd.

### Adres:

Hoge Gezondheidsraad  
Zelfbestuursstraat 4  
1070 Brussel

Telefoon: 02 – 525.09.66

Fax: 02 – 525.09.77

Email: [Guy.Devleeschouwer@health.fgov.be](mailto:Guy.Devleeschouwer@health.fgov.be)

