

THERAPEUTIC
SUBSTANCES OF
HUMAN ORIGIN



Treaty Series No. 70 (1967)

Additions to the Protocol
to the European Agreement on the
Exchange of Therapeutic Substances of
Human Origin signed at Paris on
15 December 1958

Strasbourg, 12 May 1967

*Presented to Parliament by the Secretary of State for Foreign Affairs
by Command of Her Majesty
September 1967*

LONDON

HER MAJESTY'S STATIONERY OFFICE

PRICE 1s. 9d. NET

Cmnd. 3388

**ADDITIONS TO THE PROTOCOL
TO THE EUROPEAN AGREEMENT ON THE EXCHANGE
OF THERAPEUTIC SUBSTANCES OF HUMAN ORIGIN
SIGNED AT PARIS ON 15 DECEMBER, 1958**

CERTIFICATE OF THE SECRETARY GENERAL

Whereas it is stated in the fourth paragraph of Article 4 of the European Agreement on the Exchange of Therapeutic Substances of Human Origin⁽¹⁾ that the Protocol and its Annexes may be amended or supplemented by the Governments of the Parties to the said Agreement,

Whereas, at the 153rd and 159th meetings of the Ministers' Deputies held in Strasbourg from 19th to 26th September 1966 and from 3rd to 7th April 1967 the representatives of the Governments of the Contracting Parties to the said Agreement (Belgium, Denmark, France, Federal Republic of Germany, Greece, Ireland, Italy, Luxembourg, Netherlands, Norway, Sweden, Switzerland, Turkey and United Kingdom), approved the insertion of provisions relating to the freedom from toxicity of plastic blood transfusion equipment in the Protocol to the European Agreement on the Exchange of Therapeutic Substances of Human Origin,

The Secretary General hereby certifies as follows :

1. Part I (General Provisions) of the Protocol is supplemented by a new paragraph "D", which reads as follows :

"D. Freedom from toxicity of plastic blood transfusion equipment

Equipment shall comply with the provisions set out in Annex 7 to this Protocol."

2. To the text of the Annexes to the said Protocol is added the following :

ANNEX 7 TO THE PROTOCOL

COUNCIL OF EUROPE

*European Agreement on the Exchange
of Therapeutic Substances of Human Origin*

**FREEDOM FROM TOXICITY OF PLASTIC BLOOD
TRANSFUSION EQUIPMENT**

I. Chemical tests

The material to be tested shall be taken from sterilised equipment, e.g. in the state in which it would be used for transfusion.

The manufacturer of the transfusion equipment is required to disclose to the appropriate health authority the detailed formulations of the plastics material or materials and other materials used in the manufacture of the

(1) "Treaty Series No. 27 (1965)", Cmnd. 2591.

**ADDITIONS AU PROTOCOLE
À L'ACCORD EUROPÉEN RELATIF A L'ECHANGE
DE SUBSTANCES THÉRAPEUTIQUES D'ORIGINE HUMAINE,
SIGNÉE À PARIS LE 15 DECEMBRE 1958**

PROCES-VERBAL DU SECRETAIRE GENERAL

Considérant que le quatrième alinéa de l'article 4 de l'Accord européen relatif à l'échange de substances thérapeutiques d'origine humaine énonce que le Protocole et ses annexes pourront être modifiés ou complétés par les Gouvernements des Parties audit Accord,

Considérant que les représentants des Gouvernements des Parties Contractantes audit Accord (Belgique, Danemark, France, République Fédérale d'Allemagne, Grèce, Irlande, Italie, Luxembourg, Pays-Bas, Norvège, Suède, Suisse, Turquie et Royaume-Uni), au cours des 153^e et 159^e réunions des Délégués des Ministres, tenues à Strasbourg du 19 au 26 septembre 1966 et du 3 au 7 avril 1967, ont approuvé l'insertion de dispositions relatives à l'innocuité des appareillages de transfusion en matière plastique dans le Protocole à l'Accord européen relatif à l'échange de substances thérapeutiques d'origine humaine,

Le Secrétaire-Général certifie, par les présentes, ce qui suit :

1. La première partie relative aux conditions générales du Protocole est à compléter par un paragraphe "D" ainsi libellé:

"D. Innocuité des appareillages de transfusion sanguine en matière plastique

Les appareillages doivent être conformes aux dispositions prévues à l'annexe 7 au présent Protocole."

2. Le texte des annexes audit Protocole est complété par les dispositions ci-après:

ANNEXE 7 AU PROTOCOLE

CONSEIL DE L'EUROPE

*Accord européen relatif à l'échange
de substances thérapeutiques d'origine humaine*

**INNOCUITE DES APPAREILLAGES DE TRANSFUSION
SANGUINE EN MATIERE PLASTIQUE**

I. Essais chimiques

Le matériel à essayer doit être prélevé sur un appareil stérilisé, c'est-à-dire dans l'état dans lequel il serait employé pour la transfusion.

Le fabricant d'appareillage de transfusion est tenu de dévoiler aux autorités sanitaires compétentes la formulation détaillée de la ou des matières plastiques et de tout autre substance utilisée pour la fabrication de

equipment, the source of the components of the material or materials and their method of manufacture (or, alternatively, the compound reference numbers), details of manufacture of the equipment, the nature of any processing additives and adhesives and the method of sterilisation. No change shall be permitted in any of the foregoing without prior submission to and approval of the appropriate health authority.

Each batch of raw material used in the manufacture of the equipment shall be identified by a batch number, which shall be recorded by the manufacturer of the equipment together with the identification numbers of all batches of transfusion equipment made from it and the results of all tests relevant to these batches.

Every practicable precaution must be taken to reduce the risk of adventitious contamination at each stage of the manufacturing process.

A. PREPARATION OF ELUATE AND BLANK

(a) A total test as described below requires 1,250 cm² plastics (total surface area, both sides, of a plastic sample in sheet form with surface area of 625 cm²). The sample—without any printing or label on it—should be cut into pieces of not more than 10 cm².

For tubing with a wall thickness of 1 mm and under, the length (L) in cm is calculated as follows:

$$L = \frac{A}{3 \cdot 14 (D_1 + D_2)}$$

A = total surface area cm²

D₁ = inner diameter cm

D₂ = outer diameter cm

The tubing should be cut lengthwise into sections measuring 10 cm. For the eluation 10 ml of water is used per surface area of 50 cm².

(b) The pieces of the plastic film or tubing should be placed in a bottle of borosilicate glass with 250 ml distilled water obtained from an efficient still having glass condensation surfaces and collecting tubes.* The neck of the bottle is covered with an inverted beaker and the bottle is then heated in saturated steam at 110°C for 30 minutes (autoclaving) and then quickly cooled to room temperature. It is of no significance if the plastic specimens tend to stick together slightly.

Heat-sensitive plastic material, instead of being heated in an autoclave, may be heated at 70°C for 72 hours.

* If the plastics have been in contact with an anti-coagulant solution, the pieces should first be placed in a similar bottle with cold distilled water (100 ml) and shaken several times. This should be repeated once.

l'appareillage, ainsi que d'indiquer l'origine des composés entrant dans la fabrication de la ou des matières, leur méthode de fabrication (ou, à défaut, les numéros de référence du composé), les méthodes détaillées de fabrication de l'appareillage, la nature de tout additif et adhésif employés en cours de production, ainsi que le mode de stérilisation. Aucune modification ne peut être apportée aux données ci-dessus si elle n'a pas été communiquée au préalable à l'autorité sanitaire compétente et approuvée par elle.

Chaque lot de matière première utilisée pour la fabrication de l'appareillage est identifié par un numéro qui est consigné par le fabricant, en même temps que les numéros d'identification de tous les lots d'appareillages de transfusion fabriqués à partir de cette matière première et les résultats de toutes les analyses auxquelles ils ont été soumis.

Toutes les précautions possibles doivent être prises pour diminuer les risques de contamination accidentelle à chaque stade de fabrication.

A. PRÉPARATION DE L'ÉLUAT ET DE LA SUBSTANCE TÉMOIN

(a) Pour effectuer un essai complet tel qu'il est décrit ci-dessous, on utilise 1.250 cm² de matière plastique (surface totale des deux faces d'un échantillon constitué par une feuille de matière plastique dont chaque face mesure 625 cm²). L'échantillon qui ne porte aucune indication écrite ou étiquette doit être découpé en morceaux de 10 cm² au maximum.

La longueur (L) des tuyaux, dont l'épaisseur de paroi ne dépasse pas 1 mm, est calculée comme suit :

$$L = \frac{A}{3,14 (D_1 + D_2)}$$

A = surface totale en cm²

D₁ = diamètre intérieur en cm

D₂ = diamètre extérieur en cm

Les tuyaux doivent être découpés dans le sens de la longueur, en tronçons de 10 cm. Pour l'éluion, on utilise 10 ml d'eau par 50 cm².

(b) Les morceaux de pellicule ou de tuyau en matière plastique doivent être introduits dans un flacon de verre borosilicate avec 250 ml d'eau distillée provenant d'un alambic efficace muni de surfaces de condensation et de tubes de captage en verre.* Le col de la bouteille est recouvert d'un becher renversé et la bouteille est ensuite réchauffée dans la vapeur saturée à 110° pendant 30 minutes (dans l'autoclave) et rapidement refroidie à la température de la pièce. Il n'est pas nécessaire de tenir compte d'une éventuelle légère adhérence entre les échantillons de matière plastique.

Au lieu d'être chauffées dans un autoclave, les matières plastiques sensibles à la chaleur peuvent être chauffées à 70° pendant 72 heures.

* Dans le cas de matières plastiques qui ont été en contact avec une solution anti-coagulante, les morceaux devraient être introduits d'abord dans un flacon semblable contenant de l'eau distillée froide (100 ml), qui est agité plusieurs fois. Cette opération doit être répétée une fois encore.

A blank preparation is made in a corresponding manner omitting the plastic.

B. TESTS ON THE ELUATE

1. OXIDISABLE MATTER

To 20 ml of the eluate in an Erlenmeyer flask of borosilicate glass add 20 ml of 0.01 N potassium permanganate solution and 1.0 ml of 2 N sulphuric acid and boil the mixture for 3 minutes. Cool the solution rapidly and add 0.1 g of potassium iodide and 5 drops of starch solution. Titrate with 0.01 N sodium thiosulphate solution. At the same time carry out a blank titration. The difference in the volume of thiosulphate used in the two titrations does not exceed 2.00 ml of 0.01 N sodium thiosulphate.

2. CHLORIDE

The eluate complies with a suitable limit test for chloride equivalent to not more than 400 microgrammes Cl' per litre.

3. SULPHATE

The eluate complies with a suitable limit test for sulphate equivalent to not more than 2.5 mg SO₄" per litre.

4. AMMONIA

The eluate complies with a suitable limit test for ammonia equivalent to not more than 2.0 mg NH₃ per litre.

5. PHOSPHORIC ACID-PHOSPHATE

The eluate complies with the limit test for phosphate.

Limit test for phosphate

Evaporate 25 ml of the eluate almost to dryness in a Kjeldahl flask, cool the residue, add 2 drops sulphuric acid and 1 ml nitric acid, heat the mixture until white fumes appear, then cool. Add 1 drop of perchloric acid and heat gently for half an hour. Cool the residue and add water to 25 ml. Transfer 10 ml of the solution to a 25 ml titration flask, add 8 ml ammonium molybdate sulphuric acid solution and 2 ml of freshly prepared 10% w/v solution of ascorbic acid. Heat on a water bath at 50°C for thirty minutes, cool and dilute the mixture to 25 ml. The green or blue colour of the solution is not more intense than that obtained by treating 25 ml of the blank solution in the same manner.

6. ACIDITY OR ALKALINITY

10 ml of the eluate is not coloured red on the addition of 2 drops of phenolphthalein solution and requires not more than 0.4 ml of 0.01 N sodium hydroxide to produce a red colour. After removal of the colour by the addition of 0.8 ml 0.01 N hydrochloric acid, the addition of 5 drops of methyl red solution produces a red or orange-red colour.

Une solution témoin correspondante est préparée sans les matières plastiques.

B. ESSAIS SUR L'ÉLUAT

1. MATIÈRES OXYDABLES

A 20 ml de l'éluat contenus dans une fiole Erlenmeyer de verre borosilicate, ajoutez 20 ml de solution de permanganate de potassium 0,01 N et 1,0 ml d'acide sulfurique 2 N, et faites bouillir le mélange pendant 3 minutes. Refroidissez la solution rapidement et ajoutez 0,1 g d'iodure de potassium et 5 gouttes de solution d'amidon. Titrez par une solution de thiosulfate de sodium 0,01 N en effectuant un titrage parallèle avec la solution témoin. La différence entre la quantité de thiosulfate utilisée dans les deux titrages ne dépasse pas 2,00 ml de thiosulfate de sodium 0,01 N.

2. CHLORURE

L'éluat satisfait à un essai-limite approprié pour les chlorures correspondant à un maximum de 400 microgrammes de Cl' par litre.

3. SULFATE

L'éluat satisfait à un essai-limite approprié pour les sulfates correspondant à un maximum de 2,5 mg de SO₄" par litre.

4. AMMONIAQUE

L'éluat satisfait à un essai-limite approprié pour l'ammoniaque correspondant à un maximum de 2,0 mg de NH₃ par litre.

5. ACIDE PHOSPHORIQUE-PHOSPHATE

L'éluat satisfait à l'essai-limite des phosphates.

Essai-limite des phosphates

Faites évaporer 25 ml de l'éluat presque à sec dans une fiole Kjeldahl, refroidissez le résidu, ajoutez 2 gouttes d'acide sulfurique et 1 ml d'acide nitrique, chauffez le mélange jusqu'à dégagement de vapeurs blanches et refroidissez. Ajoutez une goutte d'acide perchlorique et chauffez doucement pendant une demi-heure. Refroidissez le résidu et ajoutez de l'eau pour obtenir 25 ml. Transvasez 10 ml de la solution dans une fiole de titrage de 25 ml, ajoutez 8 ml de solution de molybdate d'ammonium-acide sulfurique et 2 ml d'une solution d'acide ascorbique à 10% p/v récemment préparée. Chauffez au bain-marie à 50° pendant 30 minutes, refroidissez et étendez le mélange à 25 ml. La coloration verte ou bleue de la solution n'est pas plus intense que celle obtenue en traitant 25 ml de la solution témoin de la même façon.

6. RÉACTION

10 ml de l'éluat ne prennent pas une coloration rouge par addition de 2 gouttes de solution de phénolphtaléine et n'exigent pas plus de 0,4 ml d'hydroxyde de sodium 0,01 N pour donner une coloration rouge. Après élimination de cette coloration par addition de 0,8 ml d'acide chlorhydrique 0,01 N, l'addition de 5 gouttes de solution de rouge de méthyle donne une coloration rouge ou rouge-orangée.

7. RESIDUE ON EVAPORATION

Evaporate 100 ml of the eluate to dryness on a water bath and dry at 105°C to constant weight. The residue weighs not more than 5.0 mg.

8. CLARITY AND COLOUR

The eluate, when viewed through a thickness of 5 cm, is clear and colourless when compared with the blank.

9. TASTE AND SMELL

The eluate compared with the blank is odourless and tasteless.

10. SPECIAL ELEMENTS

When examined by spectral analysis the eluate does not reveal: arsenic, cadmium, chromium, copper, lead, silicon, silver or tin.

C. TESTS ON THE PLASTIC MATERIAL

11. RESIDUE ON IGNITION

1.0 g of the plastic material when ignited to constant weight leaves not more than 1 mg of residue.

12. HEAVY METALS

Dissolve the residue on ignition in the minimum quantity of 2 N hydrochloric acid, heating if necessary. Carry out a suitable limit test for heavy metals. The plastic material complies with a limit not exceeding 5 microgrammes per gramme calculated as Pb.

II. Biological tests

(1) A test for undue toxicity shall be carried out, using eluates A and B (as defined in Note below), by the procedure specified in the national pharmacopoeia or some other method approved by the national control authority.

(2) A test for freedom from pyrogens shall be carried out, using eluates A and C (as defined in Note below), by the procedure specified in the national pharmacopoeia or some other method approved by the national control authority.

(3) A test for haemolytic effects in buffered systems shall be performed using the eluate described in paragraph I.A above. (For method and acceptable limit see Appendix to the present Annex.)

(4) A test for the *in vivo* survival of red cells shall be carried out in the initial evaluation of plastics formulations intended for the fabrication of containers for blood. If any change is made in the agreed formulation, the test shall be repeated. (For suggested methods and acceptable limit see Appendix to the present Annex.)

7. RÉSIDU À L'ÉVAPORATION

Faites évaporer 100 ml de l'éluat à sec au bain-marie et séchez à 105° jusqu'à poids constant. Le résidu ne pèse pas plus de 5,0 mg.

8. LIMPIDITÉ ET COULEUR

L'éluat, observé à travers une épaisseur de 5 cm, est limpide et incolore lorsqu'il est comparé à la solution témoin.

9. SAVEUR ET ODEUR

Comparé à la solution témoin, l'éluat est inodore et sans saveur.

10. ÉLÉMENTS SPÉCIAUX

L'analyse spectrale ne fournit aucune trace d'arsenic, de cadmium, chrome, cuivre, plomb, silicium, argent ou étain.

C. ESSAIS SUR LES MATIÈRES PLASTIQUES

11. RÉSIDU À L'INCINÉRATION

1,0 g des matières plastiques, incinéré à poids constant, ne doit pas laisser de résidu dépassant 1 mg.

12. MÉTAUX LOURDS

Dissolvez le résidu à l'incinération dans une quantité minimum d'acide chlorhydrique 2 N en chauffant, le cas échéant. Effectuez un essai-limite approprié pour les métaux lourds. La matière plastique satisfait à une limite ne dépassant pas 5 microgrammes par gramme, calculée comme Pb.

II. Analyses biologiques

(1) La recherche d'un excès de toxicité sera effectuée à l'aide des éluats A et B (voir note ci-dessous), selon la procédure prescrite dans la pharmacopée nationale ou toute autre méthode approuvée par l'autorité nationale chargée du contrôle.

(2) Le contrôle d'apyrogénéité sera effectué à l'aide des éluats A et C (voir note ci-dessous) selon la procédure prescrite dans la pharmacopée nationale ou toute autre méthode approuvée par l'autorité nationale chargée du contrôle.

(3) L'analyse des effets hémolytiques dans un système tamponné sera effectuée à l'aide de l'éluat exposé sous I. A ci-dessus. (Pour la méthode et les limites acceptables, voir appendice à la présente annexe.)

(4) Un test de survie *in vivo* des globules rouges sera effectué lors de l'analyse initiale des formulations des matières plastiques destinées à la fabrication des flacons de sang. Si quelque modification est apportée à la formulation convenue, le test est répété. (Voir les méthodes proposées et les limites acceptables figurant à l'appendice de la présente annexe.)

Note

Eluate A is prepared by adding to the eluate described in I. A above pyrogen-free sodium chloride to a final concentration of 0.9%.

Eluate B: Fill a transfusion set as completely as possible with sterile saline solution, clamp the ends securely and immerse the filled set completely for 1 hour in water maintained at 85°C. Collect the contents of the set.

Eluate C: Pass 40 ml portions of sterile pyrogen-free isotonic saline solution at room temperature through not less than ten transfusion sets at a flow rate of approximately 10 ml per minute and pool the effluents. Test the solution obtained.

APPENDIX

BIOLOGICAL TEST : LIMITS AND METHODS

A. TEST FOR UNDUE TOXICITY

(See item II, 1 of Annex above): limit as specified in national pharmacopoeias.

B. TEST FOR FREEDOM FROM PYROGENS

(See item II, 2 of Annex above): limit as specified in national pharmacopoeias.

C. TEST FOR HAEMOLYTIC EFFECTS IN BUFFERED SYSTEMS

(See item II, 3 of Annex above.)

(a) Limit :

0.50% salt solution shall not cause a haemolysis value higher than 10% and 0.40% salt solution shall not differ by more than 10% in haemolysis value from that caused by the corresponding blank.

(b) Method :

From the primary buffer stock solution for haemolysis three solutions are prepared: 30.00 ml buffer stock solution and 10.00 ml water (solution a₀), 30.00 ml buffer stock solution and 20.00 ml water (solution b₀) and 15.00 ml buffer stock solution and 85.00 ml water (solution c₀).

To each of three centrifuge tubes (1, 2 and 3) 1.40 ml eluate are added. To tube 1 is added 0.10 ml a₀, to tube 2 0.10 ml b₀, and tube 3 0.10 ml c₀, thus obtaining salt solutions corresponding to 0.50% (tube 1), 0.40% (tube 2) and 0.10% (tube 3) of sodium chloride in so far as electrolyte osmotic action is concerned. To each tube is added 0.020 ml fresh, well mixed heparinised human blood. The tubes are put into water bath at 30°C (± 1°) for 40 minutes. Then three solutions containing 3.00 ml a₀

Note

Eluat A : Ajouter à l'éluat décrit sous I A ci-dessus du chlorure de sodium apyrogène jusqu'à obtention finale d'une concentration de 0,9 pour cent.

Eluat B : Remplir un appareil de transfusion, aussi complètement que possible, d'une solution saline stérile, en fixer les extrémités et immerger complètement l'appareil ainsi rempli pendant une heure dans de l'eau maintenue à 85°. Recueillir le contenu de l'appareil.

Eluat C : Passer 40 ml de solution saline isotonique apyrogène stérile, à température ambiante, à travers dix appareils de transfusion au moins, à raison de 10 ml environ par mn et recueillir le filtrat. Analyser la solution ainsi obtenue.

APPENDICE

ANALYSE BIOLOGIQUE: LIMITES ET METHODES

A. ANALYSE CONCERNANT LA RECHERCHE D'UN EXCÈS DE TOXICITÉ

(Voir II, 1 de l'annexe ci-dessus): limite prescrite dans la pharmacopée nationale.

B. ANALYSE CONCERNANT LE CONTRÔLE D'APYROGÉNÉITÉ

(Voir II, 2 de l'annexe ci-dessus): limite prescrite dans la pharmacopée nationale.

C. ANALYSE DES EFFETS HÉMOLYTIQUES DANS UN SYSTÈME TAMPONNÉ

(Voir II, 3 de l'annexe ci-dessus):

(a) *Limite* :

Une solution de chlorure de sodium à 0,50% ne doit pas donner de valeur d'hémolyse supérieure à 10%, et la valeur d'hémolyse d'une solution salée à 0,40% ne doit pas différer de plus de 10% de la valeur obtenue avec la solution-témoin correspondante.

(b) *Méthode* :

A partir de la solution tampon-mère pour hémolyse, on prépare trois solutions: 30 ml de la solution-mère et 10 ml d'eau (solution a₀), 30 ml de la solution-mère et 20 ml d'eau (solution b₀) et 15 ml de la solution-mère et 85 ml d'eau (solution c₀).

Dans trois tubes à centrifugation (1, 2 et 3), on ajoute 1,40 ml d'éluat. Dans le tube 1, on ajoute 0,10 ml de solution a₀; dans le tube 2, 0,10 ml de solution b₀ et dans le tube 3, 0,10 ml de solution c₀; on obtient donc des solutions salées correspondant à 0,50% (tube 1), à 0,40% (tube 2) et à 0,10% (tube 3) en chlorure de sodium, en ce qui concerne l'action osmotique de l'électrolyte. On ajoute dans chaque tube 0,020 ml de sang humain hépariné, frais et bien homogénéisé. Les tubes sont placés dans

and 12.00 ml water (solution a₁), 4.00 ml b₀ and 11.00 ml water (solution b₁), and 4.75 ml b₀ and 10.25 ml water (solution c₁) are prepared.

To the first tube is added 1.50 ml of a₁, to the second 1.50 ml of b₁ and to the third 1.50 ml of c₁. The tubes are centrifuged for 5 minutes in a horizontal centrifuge. Subsequently, control solutions, in which the eluate is replaced with water, are prepared for each of the concentrations.

The extinction at 540 nm of the liquid layer is measured. Buffer stock solution for haemolysis is used as blank. The haemolysis value in per cent is calculated according to the following formula:

$$\frac{E_{\text{exp}}}{E_{100\%}} \times 100$$

where E_{100%} = extinction for 0.10% salt solution

and E_{exp} = extinction for 0.40 and 0.50% salt respectively.

Buffer stock solution for haemolysis

90.0 g sodium chloride, 13.7 g disodium phosphate and 1.90 g monosodium phosphate are dissolved in 1,000.0 ml water.

D. TEST FOR THE *in vivo* SURVIVAL OF RED CELLS

(See item II, 4 of Annex above.)

(a) *Limit* :

Whole human blood in ACD anticoagulant which has been stored for 21 days at 4–6°C shall have a 24-hour post-transfusion survival value of at least 70%. This can be determined according to one of the methods proposed in (b) below.

(b) *Suggested methods* :

1. Method of ISO/TC/76/WGD/3, App. E.
2. Ashby Technique—Ashby, W. The determination of the length of life of transfused blood corpuscles in man.
J. Exp. Med. 29: 267–82, 1919.
Young, L. E., Platzer, R. F., and Rafferty, J. A. Differential agglutination of human erythrocytes.
J. Lab. Clin. Med. 32: 489–501, 1947.
3. The Gibson-Scheitlin method—Gibson, J. G., and Scheitlin, W. A. A method employing radio-active chromium for assaying the viability of human erythrocytes returned to the circulation after refrigerated storage.
J. Lab. Clin. Med. 46: 679–88, 1955.
4. The Strumia method—Strumia, M. M., Taylor, L., Sample, A. B., Colwell, L. S., and Dugan, A. Uses and limitations of survival studies of erythrocytes tagged with Cr51.
Blood 10: 429–40, 1955.

un bain-marie à 30°C (± 1°) pendant 40 minutes. Puis on prépare trois solutions contenant 3,00 ml de a₀ et 12,00 ml d'eau (solution a₁); 4,00 ml de b₀ et 11,00 ml d'eau (solution b₁) et 4,75 ml de b₀ et 10,25 ml d'eau (solution c₁).

Dans le tube 1, on met 1,50 ml de a₁, dans le tube 2, 1,50 ml de b₁ et dans le tube 3, 1,50 ml de c₁. Les tubes sont alors centrifugés 5 minutes dans une centrifugeuse horizontale. Ultérieurement, des solutions-témoins dans lesquelles l'éluat est remplacée par de l'eau sont préparées pour chaque concentration.

L'extinction à 540 nm, due à la couche liquide est mesurée. Comme référence, on utilise la solution tampon-mère pure. La valeur de l'hémolyse en % est calculée par la formule suivante:

$$\frac{E_{\text{exp}}}{E_{100\%}} \times 100$$

où E_{100%} = extinction pour une solution saline à 0,10%.

E_{exp} = extinction pour respectivement des solutions salines à 0,40 et 0,50%.

Solution tampon-mère pour mesurer le taux d'hémolyse

90,0 g de chlorure de sodium; 13,7 g de phosphate disodique et 1,90 g de phosphate monosodique, dissous dans 1.000 ml d'eau.

D. TEST DE SURVIE *in vivo* DES GLOBULES ROUGES

(Voir II, 4 de l'annexe ci-dessus):

(a) Limite :

Le sang humain complet en présence d'une solution anticoagulante ACD, après une conservation de 21 jours à 4°-6°, doit avoir une survie, 24 heures après la transfusion, d'au moins 70%. Ceci peut être déterminé selon une des méthodes proposées sous (b) ci-après.

(b) Méthodes proposées :

1. Méthode de ISO/TC/76/WGD/3, App. E.

2. Ashby Technique—Ashby, W. The determination of the length of life of transfused blood corpuscles in man.

J. Exp. Med. 29: 267-82, 1919.

Young, L. E., Platzer, R. F., and Rafferty, J. A. Differential agglutination of human erythrocytes.

J. Lab. Clin. Med. 32: 489-501, 1947.

3. The Gibson-Scheitlin method—Gibson, J. G., and Scheitlin, W. A. A method employing radio-active chromium for assaying the viability of human erythrocytes returned to the circulation after refrigerated storage.

J. Lab. Clin. Med. 46: 679-88, 1955.

4. The Strumia method—Strumia, M. M., Taylor, L., Sample, A. B., Colwell, L. S., and Dugan, A. Uses and limitations of survival studies of erythrocytes tagged with Cr51.

Blood 10: 429-40, 1955.

5. Cr^{51} - I^{125} technique—Button, L. N., Gibson, J. G., and Walter, C. W. Simultaneous determination of the volume of red cells and plasma for survival studies of stored blood.

Transfusion 5: 143-148, 1965.