

"УТВЕРЖДАЮ"
Первый заместитель Министра
здравоохранения РФ
А.Д.ЦАРЕГОРОДЦЕВ
29.05.1995 г.

"СОГЛАСОВАНО"
Начальник Управления организации
медицинской помощи населению
А.Н.ДЕМЕНКОВ
29.05.1995 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЮ КЛЕТОК КРОВИ

ВВЕДЕНИЕ

Для долгосрочного консервирования клеток крови (эритроцитов, тромбоцитов) разработаны методы их замораживания и хранения при ультранизких (жидкий азот и его пары) и умереннонизких (электрические холодильники на -30 град. - -80 град.) температурах. Эти методы позволяют длительно (годами) сохранять клетки в жизнеспособном и функционально полноценном состоянии и после размораживания и специальной обработки применять их для трансфузий больным.

Для криоконсервирования эритроцитов используют два метода замораживания:

1. Очень быстрое охлаждение до -196 град. С. Метод не требует применения больших концентраций криопротекторных веществ, так как при этих условиях приобретает значение скорость теплоотвода от замораживаемой смеси эритроцитов с ограждающим раствором и хранение при постоянной ультранизкой температуре. Для этого применяют алюминиевые, стальные или полимерные контейнеры соответствующей конструкции и специальное жидкоазотное холодильное оборудование. Контейнеры с замороженными эритроцитами хранят в бункерах - камерах с жидким азотом (-196 град. С) или в его парах - над жидким азотом (-135 - 150 град. С).

2. Сравнительно медленное охлаждение с применением больших концентраций (до 40%) криопротекторных веществ, в основном, глицерина.

Медленное замораживание эритроцитной взвеси и хранение ее при умереннонизких температурах осуществляется в воздушной камере электрорефрижераторов, обеспечивающих соответствующие температуры (-30-80 град. С).

Для криоконсервирования тромбоцитов в настоящее время разрешен для клинического применения метод их контролируемого замораживания с криоконсервантом "Тромбокриодмац" с последующим хранением в жидком азоте при -196 град. С.

I. МЕТОДЫ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ УЛЬТРАНИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ (В ЖИДКОМ АЗОТЕ ПРИ -196 ГРАД. С ИЛИ ЕГО ПАРАХ ПРИ -150 ГРАД. С)

1. Метод быстрого замораживания эритроцитов с раствором
ЦНИИГПК 11

4

Замораживанию для длительного хранения подвергается эритроцитная масса в смеси с ограждающим раствором. Эритроциты получают из крови, заготовленной на одном из общепринятых глюкозо - нитратных растворов. Отделенная плазма хранится в замороженном состоянии до момента трансфузии или передается для приготовления из нее препаратов.

Замораживанию подвергают эритроцитную массу, хранившуюся не более 5 дней после заготовки крови от донора, предпочтительно в течение первых двух суток, так как в процессе хранения при положительных температурах снижаются показатели функциональной полноценности эритроцитов, в первую очередь, кислородтранспортной функции.

Для быстрого замораживания эритроцитов, предназначенных к применению в клинике, в настоящее время рекомендуется криоконсервант ЦНИИГПК 11, содержащий в качестве криопротектора

глицерин, защищающий клетки от разрушения при замораживании.

1.1.1. В условиях асептики к эритроцитной массе (путем прокола пробки бутылки или дистального конца трубки пластикового мешка иглой системы, соединенной с сосудом, содержащим ограждающий раствор) медленно (в течение 5-8 мин) при помешивании эритроцитов добавляют раствор ЦНИИГПК 11 в соотношении 1:1.

4

1.1.2. После перемешивания смесь эритроцитов с ограждающим раствором переливают через ту же систему в алюминиевый гофрированный контейнер с двумя штуцерами, для чего на один штуцер надевают резиновую трубку длиной 4-5 см, соединяемую с системой, второй штуцер служит для выхода воздуха из контейнера.

Примечание: для ускорения заполнения контейнера можно применить повышенное давление стерильного воздуха через воздухоотводящую иглу во флаконе, из которого переливается в контейнер смесь эритроцитов с раствором.

1.1.3. После заполнения контейнера взвесью эритроцитов штуцеры контейнера герметизируют путем прочного навинчивания тефлоновых колпачков. На стенку контейнера у основания штуцеров наносят номер, под которым в специальном регистрационном журнале указаны все паспортные данные крови, находящейся в этом контейнере. Взвесь эритроцитов в контейнере следует оставить на 15-20 минут при комнатной температуре для полной глицеринизации эритроцитов. Более длительная экспозиция приводит к частичному гемолизу эритроцитов.

1.1.4. Замораживание производят путем погружения контейнера с эритроцитной взвесью в предназначенную для этого ванну с жидким азотом (температура -196 град. С). Замораживание дозы в 250 мл продолжается около двух минут. Об окончании замораживания судят по прекращению выделения паров азота из трубки в крышке "ванны для замораживания".

1.1.5. После замораживания контейнер с кровью переносят в специальный жидкоазотный бункер или камеру для длительного хранения замороженных биоматериалов.

1.1.6. При необходимости оттаять эритроциты нужный контейнер вынимают из хранилища и помещают в специальную емкость с жидким азотом, которую подносят к ванне для оттаивания. Оттаивание эритроцитов производят в ванне с подогретой водой (температура +45 град. С) при автоматическом покачивании (200 качаний в минуту) контейнера с кровью в течение 25 секунд. Допускается производить оттаивание при тех же температурных условиях в водяной бане путем покачивания вручную в течение 50-60 секунд.

1.1.7. Для подготовки размороженных эритроцитов к переливанию производят их отмывание от глицерина, проникшего из ограждающего раствора внутрь клеток. Введение неотмытых эритроцитов в кровяной поток реципиента вызвало бы их гемолиз из-за большого осмотического градиента. Для отмывания применяют растворы с последовательно снижающейся концентрацией ингредиентов (см. Приложение 1). Отмывание эритроцитов производят с помощью серийного центрифугирования.

После оттаивания размороженную взвесь эритроцитов (250 мл) из алюминиевого контейнера переводят в полимерный контейнер <*>, добавляют в соотношении 1:1 один из гипертонических растворов (250 мл), предназначенных для первого этапа отмывания, контейнер со смесью клеток герметизируют и центрифугируют при 1100 г в течение 7 минут при 4 град. С.

<*> Для этого используют контейнеры типа Гемакон 500 или специальные контейнеры для отмывания эритроцитов (ТУ 64-2-419-90).

1.1.8. После остановки центрифуги контейнер передают в бокс. После снятия надосадочной жидкости к эритроцитам постепенно, при постоянном их помешивании, добавляют другой отмывающий раствор, предназначенный для второго этапа отмывания, в количестве до 400 мл. Взвесь осторожно перемешивают, контейнер герметизируют.

1.1.9. Контейнер со взвесью эритроцитов центрифугируют при том же режиме в течение 5 минут. После второго центрифугирования процедуру отмывания повторяют с добавлением раствора, предназначенного для третьего этапа отмывания. Взвесь центрифугируют третий раз и супернатант удаляют. К оставшимся в полимерном контейнере отмытым эритроцитам добавляют, в соотношении 1:1 ресуспенсирующий раствор ЦНИИГПК 8в (Приложение 1) и контейнер герметизируют. При необходимости получения для переливания размороженной

отмытой эритроцитной массы с более высоким гематокритом количество добавляемого ресуспендирующего раствора ЦНИИГПК 8в допустимо уменьшить до соотношения 1:0,5, особенно если не предполагается длительное, в течение суток, хранение конечного продукта.

1.1.10. Отмытые ресуспендированные эритроциты хранят при 4 +/- 2 град. С и используют для переливания в течение 24 часов с момента заготовки.

1.2. Метод быстрого замораживания эритроконцентрата
с оградяющим раствором ЦНИИГПК 11

5

Замораживание концентрированной массы эритроцитов позволяет помещать в стандартные алюминиевые контейнеры (емкостью 250 мл) удвоенные объемы эритроцитов и, следовательно, хранить в жидкоазотных хранилищах большие их запасы по сравнению с методом замораживания разведенной взвеси эритроцитов. Это достигается удалением перед замораживанием (по окончании глицеринизации эритроцитов) избытка оградяющего раствора. Кроме того, метод позволяет при отмывании сократить число процедур отмывания размороженных эритроцитов и уменьшить объем отмывающих растворов.

1.2.1. Для криоконсервирования эритроцитов в виде эритроконцентрата применяют оградяющий раствор ЦНИИГПК 11 - М или

5

ЦНИИГПК 11 - С (см. Приложение 1). В бутылку или полимерный

5

контейнер, содержащий эритроцитную массу, медленно (в течение 5-8 минут) при постоянном помешивании добавляют в соотношении 1:1 криоконсервант ЦНИИГПК 11 .

5

1.2.2. После перемешивания эритроцитов с криоконсервантом бутылку или полимерный контейнер герметизируют и передают на центрифугирование при 1100 g в течение 20 минут при +4 град. С. Затем надсадок отделяют от эритроцитов, оставшийся эритроконцентрат в количестве 250 мл (из двух бутылок или из одного полимерного контейнера) переливают в стандартный металлический контейнер, герметизируют, паспортизируют.

1.2.3. Контейнер с эритроконцентратом замораживают путем погружения в ванну с жидким азотом. Полное замерзание завершается за 2-2,5 минуты. Контейнеры с замороженным эритроконцентратом быстро переносят в жидкоазотное хранилище и хранят в жидком азоте (-196 град. С) или в его парах (-150 град. С).

1.2.4. При подготовке к трансфузии оттаивание эритроконцентрата производят в ванне с водой (температура + 45 град. С) при автоматическом (200 качаний в минуту) или ручном покачивании контейнера. Оттаивание завершается при ручном покачивании за 2 минуты, при автоматическом качании - за 25-30 секунд.

1.2.5. Для деглицеринизации оттаянную эритроцитную массу переливают в полимерный контейнер <*>, в котором производят все этапы отмывания.

<*> типа Гемакон 500 или контейнер для отмывания эритроцитов (ТУ 64-2-219-90)

Для отмывания применяют как магнитные, так и солевые растворы (п.1.1.7., Приложение 1).

К 250 мл размороженного эритроконцентрата добавляют постепенно при помешивании 250-300 мл отмывающего маннитного или солевого раствора N 1, контейнер герметизируют и центрифугируют 10 минут при 1100 g в рефрижераторной центрифуге при 4 град. С.

1.2.6. Надсадочную жидкость отделяют, к оставшимся эритроцитам добавляют 300-400 мл раствора N 2 для второго этапа отмывания, центрифугируют в вышеуказанном режиме в течение 5 минут и снова отделяют надсадочную жидкость.

1.2.7. К оставшимся эритроцитам добавляют раствор N 3 для третьего этапа отмывания (300-400 мл), снова центрифугируют и снимают надсадок. При наличии в надсадке значительного гемолита (определяемого визуально) третий этап отмывания повторяется. Всего для отмывания 250 мл размороженного эритроконцентрата, полученного из 500 мл консервированной крови, используют максимально 1000 мл отмывающих растворов при трехкратном отмывании и 1350 мл отмывающих растворов - при четырехкратном отмывании.

1.2.8. К отмытому эритроконцентрату (150-200 мл) через систему - магистраль добавляют плазмозамещающий раствор ЦНИИГПК 8в (см. 1.1.9), смесь осторожно и тщательно перемешивают. При необходимости ресуспендированную эритроцитную взвесь через систему

для переливания крови фильтруют в бутылку емкостью 500 мл из-под ресуспендирующего раствора с целью удаления возможных сгустков. Бутылку со взвесью герметизируют, наклеивают этикетку и направляют на хранение или непосредственно в лечебное учреждение для трансфузии.

2. Метод медленного замораживания и хранения эритроцитов при -30 град. С

Метод предназначен для криоконсервирования эритроцитов при температуре -30 град. С и предусматривает использование электрических холодильников. Замораживание осуществляют в стеклянных бутылках или полимерных контейнерах, в которых заготавливается кровь.

Для криоконсервирования эритроцитов, их длительного хранения в электрохолодильниках при -30 град. С и последующего отмывания методом серийного центрифугирования применяют один из двух ограждающих растворов (ЦНИИГПК 11 55, ЦНИИГПК 11).

5 5

2.1. Смешивание эритроцитной массы с ограждающими растворами проводят в первичных емкостях, в которых была заготовлена консервированная кровь: бутылки вместимостью 250 мл, полимерные контейнеры на 500 мл. С раствором 11 55 эритромассу смешивают в

5

соотношении 1:1.

При замораживании с криоконсервантом 11 эритроцитную массу 5 смешивают с раствором в соотношении 1:1,6. К каждому 125 мл эритромассы добавляют 200 мл раствора.

2.2. Глицеринизацию эритроцитов осуществляют в течение 10 минут при легком покачивании сосуда с кровью. После герметизации, маркировки и экспозиции при комнатной температуре в течение 15-20 минут бутылки или полимерные контейнеры помещают в специальные сетки (кассеты, бязевые мешки, коробки) и переносят для замораживания и хранения в электрохолодильники.

Полимерные контейнеры с глицеринизированной эритро массой, помещенные в кассеты или картонные коробки, в камере электрохолодильника размещают в горизонтальном положении. Через сутки после замораживания при необходимости они могут быть переведены в вертикальное положение.

2.3. При замораживании эритроцитов в виде эритроконцентрата эритроциты медленно (в течение 10 мин) при постоянном помешивании соединяют с раствором 11 55 в соотношения 1:1. Взвесь

5

центрифугируют в течение 20 минут - 1100 г при +4 град. С. После удаления надосадочной жидкости и герметизации сосуда его помещают на хранение в электрохолодильник.

2.4. Оттаивание проводят в водяной бане с температурой 38-40 град. С в течение 6-10 минут до полного исчезновения льда.

2.5. Деглицеринизацию размороженных эритроцитов проводят в полимерных контейнерах вместимостью 500 мл с применением солевых или маннитно - солевых растворов.

Этапы отмывания эритроцитов,
замороженных с раствором 11 55

5

I этап

К размороженной эритроцитной взвеси (250 мл), переведенной из емкости для замораживания в полимерный контейнер, постепенно добавляют, помешивая, вначале 100 мл 6% раствора NaCl (или 16% раствора маннита) через 2-3 минуты - 150-200 мл 2% раствора NaCl (или 5% раствора маннита). Разведенную эритроцитную взвесь центрифугируют при 1100 г в течение 10 минут.

II этап

После удаления надосадочной жидкости к оставшимся эритроцитам, после их осторожного перемешивания, добавляют 400-450 мл 1% раствора NaCl (или 2,5% раствора маннита). Взвесь эритроцитов центрифугируют при том же режиме, но в течение 5 минут и снова отделяют надосадочную жидкость.

III этап

Повторить этап II.

После удаления надосадочной жидкости отмытые эритроциты ресуспендируют в растворе ЦНИИГПК 8в (см. 1.1.9).

Этапы отмывания эритроцитов, замороженных с раствором 11
5

I этап

К размороженной эритроцитной взвеси (325 мл), хранившейся в полимерном контейнере, добавить, постепенно помешивая, 200 мл 4% раствора NaCl (или 16% раствора маннита). Через 2-3 минуты разведенную взвесь эритроцитов центрифугируют при 1100 g в течение 10 минут.

II этап

После удаления надосадочной жидкости к оставшимся эритроцитам, после их перемешивания, добавляют 400-450 мл 2% раствора NaCl (или 5% раствора маннита). Взвесь центрифугируют при том же режиме в течение 5 минут и снова удаляют надосадочную жидкость.

III этап

Оставшиеся эритроциты разводят 400-450 мл 1% раствора NaCl, центрифугируют при том же режиме в течение 5 минут, удаляют надосадочную жидкость и ресуспендируют в растворе 8в (см. 1.1.9).

2.6. Для деглицеринизации эритроконцентрата необходимо дозу (250 мл) эритроконцентрата разделить приблизительно по 125 мл в два контейнера вместимостью 500 мл и отмывать так же, как и размороженную эритроконцентрат. Если после 3-го центрифугирования удаляемый супернатант будет иметь интенсивное окрашивание, следует ввести 1-2 дополнительных этапа центрифугирования с использованием последнего отмывающего раствора (1% NaCl) в объемах 400-500 мл. Отмытые клетки ресуспендируют в растворе ЦНИИГПК 8в (см. 1.1.9).

3. Метод криоконсервирования эритроцитов при умеренно низких температурах (-25-38 град. С) со сниженной концентрацией глицерина

Введение

В Российском НИИ гематологии и трансфузиологии разработан метод криоконсервирования эритроцитов при -25-38 град. С со сниженной в 2 раза (с 40% общепринятой до 20%) концентрацией глицерина и упрощенной методикой деглицеринизации, предусматривающей использование двух циклов центрифугирования (вместо трех) и дешевых отмывающих растворов на основе хлорида натрия. По своей эффективности он не уступает методу замораживания эритроцитов в жидком азоте, характеризуется низким уровнем трудовых затрат, экономичностью и доступностью для службы крови.

3.1. Глицеринизация. К эритроцитной массе (125 мл в стеклянном флаконе или 250 мл в полимерном контейнере "Гемакон-500"), полученной отстаиванием или центрифугированием донорской крови 1-3 суток хранения при +4 град. С, струйно, но медленно (применительно к 125 мл эритроцитов - в течение 5 минут, к 250 мл - 10 минут) при

постоянном помешивании добавляют равный объем криозащитного раствора ЦНИИГПК-11 М.

5

Полученную взвесь выдерживают при комнатной температуре в течение 15 минут.

3.2. Подготовленную к замораживанию взвесь эритроцитов, находящуюся в стеклянном флаконе емкостью 500 мл, в объеме 250 мл или полимерном контейнере "Гемакон-500" в объеме 500 мл, помещают в электрохолодильник при -25-38 град. С, где осуществляется их нерегулируемое медленное замораживание и последующее хранение. Низкотемпературное хранение при -25 град. С ограничено 5 месяцами, при -38 град. С - одним годом.

3.3. Оттаивание эритроцитов производят в водяной бане при температуре +42 град. С - +44 град. С при постоянном ручном покачивании (60 циклов в одну минуту).

Длительность оттаивания различна в зависимости от вида тары и объема взвеси - 9,5 минут (стеклянный флакон емкостью 500 мл, объем взвеси 250 мл), 15 минут (полимерный контейнер "Гемакон-500", объем взвеси 500 мл).

3.4. Отмывание размороженных эритроцитов (250 мл) проводят в стеклянных флаконах емкостью 500 мл или полимерных контейнерах "Гемакон-500" (предварительно половина взвеси из полимерного контейнера - 250 мл - переводится в стеклянный флакон, где и отмывается) с использованием двух циклов центрифугирования и трех отмывающих растворов хлорида натрия в понижающейся концентрации. Техника деглицеринизации заключается в следующем:

- к оттаянным эритроцитам (250 мл) добавляют отмывающий раствор N 1 в соотношении 1:1, после тщательного перемешивания взвесь центрифугируют при 1500 об/мин в течение 15 минут; супернатант удаляют;

- к оставшимся эритроцитам (100-125 мл) добавляют отмывающий раствор N 2 в соотношении 1:1; после тщательного перемешивания и пятиминутной экспозиции к полученной взвеси добавляют отмывающий раствор N 3 в соотношении 1:1; после перемешивания взвесь эритроцитов (500 мл) центрифугируют в том же режиме, что и при первом разделении; супернатант удаляют.

Таким образом, на отмывание 250 мл взвеси размороженных эритроцитов требуется всего 750 мл отмывающих растворов.

3.5. К размороженным отмытым эритроцитам (75-100 мл) добавляют равный объем ресуспендирующего раствора ЦНИИГПК-8в и тщательно перемешивают.

Эритроцитную взвесь переводят обратно во флакон емкостью 250 мл из-под ресуспендирующего раствора.

Флакон парафинируют, закрывают бумажно - полупергаментной повязкой и маркируют.

Примечание. Образцы этикетки для размороженных отмытых эритроцитов и журнала для регистрации замороженной крови и ее компонентов прилагаются (приложение 1).

4. Оценка качества и хранение размороженной и отмытой эритроцитной взвеси

4.1. Бактериологический контроль осуществляется согласно "Инструкции по контролю стерильности консервированной крови, ее компонентов, препаратов, консервированного костного мозга, кровезаменителей и консервирующих растворов" (N 04-14/21-14 от 12.09.89).

4.2. При определении годности трансфузионной среды обращают внимание на герметичность укупорки и целостность сосуда, в котором она заготавливалась, правильность паспортизации, срок годности. Критерием годности взвеси размороженных эритроцитов служит прозрачность надстоя с незначительным розовым окрашиванием, равномерность эритроцитного слоя, отсутствие видимых сгустков.

Выборочную оценку качества отмытой взвеси эритроцитов производят на основании содержания свободного гемоглобина (бензидиновый метод) и показателя гематокрита на микроцентрифуге. Отмывание эритроцитов должно производиться до тех пор, пока отделяемая по сливной трубке промывная жидкость не будет почти бесцветной или с незначительным розовым окрашиванием. Содержание свободного гемоглобина перед трансфузией не должно превышать 2,0 г/л (200 мг%), показатель гематокрита не ниже 0,27 л/л.

4.3. Бутылки или полимерные контейнеры с размороженной отмытой эритроцитной взвесью хранят до переливания не более 24 часов в электрохолодильнике при температуре 4+/-2 град. С. Транспортируют эритроцитную взвесь в термоизоляционной таре, поддерживающей вышеуказанную температуру.

4.4. При хранении в условиях жидкого азота для трансфузий допускается использование эритроцитов, сохраняемых в замороженном состоянии до 5 лет, в электрохолодильниках - 3 года при условии постоянного поддержания температуры ниже - 65 град. С; при температуре хранения -40-30 град. С - один год.

5. Приготовление растворов

5.1. Ограждающие, отмывающие и ресуспендирующие растворы готовят по правилам, предусмотренным для приготовления растворов для внутривенного введения.

Для приготовления растворов следует использовать следующие реактивы:

1) Глицерин - дистиллированный, высшего сорта, удельный вес 1,248; ГОСТ-6824-76, ФС 42-698-73.

2) Маннит - чда, ТУ 6-09-5484-90.

3) Сахароза - чда, ГОСТ-5833-75.

4) Глюкоза - кристаллическая, медицинская, ГФ X, ст. 311, стр. 334.

5) Натрия хлорид - ГФ X, ст. 426, стр. 442.

6) Натрия фосфат двузамещенный ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$, м.в. 358,17) - ГФ X, стр. 896.

7) Натрия фосфат однозамещенный ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, м.в. 156,01) - ГФ X, стр. 896.

5.2. Для приготовления ограждающих растворов ингредиенты (кроме глицерина) взвешивают и растворяют в горячей (70-80 град. С) воде для инъекции, после чего добавляют глицерин. Смесь тщательно перемешивают и доводят водой для инъекций до нужного объема. Растворы фильтруют через фильтры, разрешенные для использования при приготовлении инфузионных растворов. Разливают по 125 и 250 мл в стеклянные бутылки вместимостью 250 и 500 мл соответственно, укупоривают пробками из резиновой смеси марки 25-П по ТУ 38-006-269-80, завальцовывают металлическими колпачками по ОСТ 64-7-85-79, этикетировывают, помещают в двойные мешки и стерилизуют в автоклаве при следующих условиях: ограждающие, отмывающие и ресуспендирующие растворы в объемах до 150 мл автоклавируют в течение 30 минут при 1,2 атм; растворы в объемах от 200 мл до 400 мл в бутылках вместимостью 500 мл стерилизуют в течение 45 минут при 1,2 атм.

5.3. Испытание на стерильность растворов, размороженной и отмытой эритроцитной взвеси проводят согласно "Инструкции по контролю стерильности консервированной крови, ее компонентов, препаратов, консервированного костного мозга, кровезаменителей и консервирующих растворов" (М., 1989 год).

Бутылки с растворами сохраняют в защищенном от света месте в двойных матерчатых мешках, в течение двух месяцев. <*> Транспортируют в соответствии с ГОСТ 17768-80.

<*> В течение этого срока сохраняется стерильность наружной поверхности флаконов.

5.4. Растворы, применяемые для замораживания, отмывания и ресуспендирования эритроцитов, должны быть бесцветными, прозрачными жидкостями.

6. Клиническое применение размороженных отмытых эритроцитов

6.1. Преимущества.

Размороженная эритроцитная взвесь применяется в лечебной практике в тех же дозах и по тем же показаниям, что и эритроцитная масса или взвесь, консервированные при положительной температуре.

Трансфузии размороженных эритроцитов имеют следующие преимущества перед переливаниями эритроцитов, консервированных обычными методами:

1) Эритроциты, консервированные методом замораживания, при длительном хранении почти не отличаются по физиологическим свойствам (жизнеспособности и кислороднотранспортной функции) от свежезаготовленных эритроцитов 1-3 дней хранения, т.к. в условиях холода (ультранизкие температуры -196 град. С, умереннонизкие температуры -30-40-80 град. С) эритроциты сохраняют свои биологические и физиологические свойства.

2) Во взвеси размороженных отмытых эритроцитов не содержится лимоннокислого натрия, большого количества калия, элементов метаболизма, накапливающихся в крови, консервированной и сохраняемой при положительной температуре, групповых агглютининов (альфа и бета), которые могут быть причиной посттрансфузионных реакций при переливании

массивных доз крови O(I) группы реципиентам других групп, особенно при выраженной анемии или сенсibilизации больных.

3) Возможность длительного хранения эритроцитов позволяет постоянно иметь их в наличии заблаговременно заготовленными и физиологически полноценными, в том числе редкой групповой принадлежности (и эритроциты с редко встречаемыми антигенными факторами или их сочетаниями).

4) Консервирование эритроцитов методом замораживания разрешает проблему заблаговременного накопления и сохранения собственных эритроцитов больных для проведения им аутоотрансфузий при предстоящем оперативном лечении или для аутоотрансфузий больным с редкими группами крови.

5) Трансфузии размороженной отмытой эритроцитной массы (взвеси), как правило, не сопровождаются посттрансфузионными реакциями благодаря тому, что при отмывании удаляются лейкоциты, тромбоциты и белковые компоненты плазмы, к которым реципиенты часто бывают сенсibilизированы после многократного переливания крови.

6) Повторные трансфузии размороженной отмытой эритроцитной массы (взвеси), лишенной указанных выше сенсibilизирующих компонентов, протекают без реакции и не иммунизируют реципиентов.

7) При трансфузиях размороженных отмытых эритроцитов значительно снижен риск заражения реципиентов вирусом гепатита.

6.2. Показания к применению.

Размороженная отмытая эритроцитная масса может применяться для переливания в виде: 1) концентрированной эритроцитной массы, 2) взвеси в собственной плазме, 3) взвеси в плазмозамещающем растворе ЦНИИГПК 8в.

Трансфузии размороженных отмытых эритроцитов показаны:

1) при лечении острой кровопотери, травматического, ожогового или операционного шока, при обширных травмах и оперативных вмешательствах;

2) при хронических анемических состояниях различного происхождения, в том числе при гнойно - септических заболеваниях, а также при заболеваниях почек (нефрозоз - нефрит);

3) при тяжелых реакциях на повторные переливания крови, аллергопатии, наличии антилейкоцитарных, антитромбоцитарных антител и антител к белкам плазмы;

4) при редкой группе крови (в случаях отсутствия консервированной крови или донора данной группы);

5) при склонностях к тромбозам и эмболиям (при наличии жизненных показаний к трансфузиям);

6) при подготовке к трансплантации органов, в частности почек и тканей (например, костного мозга) в операционном, пред- и послеоперационном периодах;

7) для заполнения аппарата искусственного кровообращения;

8) для заполнения аппарата "искусственная почка";

9) при массивных и обменных трансфузиях.

6.3. Противопоказания.

Противопоказания к переливанию размороженных эритроцитов аналогичны противопоказаниям к переливанию нативной (незамороженной) эритроцитной массы и взвеси или консервированной крови. Исключение представляют больные, сенсibilизированные к компонентам крови, которым из-за посттрансфузионных реакций невозможна гемотерапия и поэтому показаны трансфузии только размороженных отмытых эритроцитов.

6.4. Техника переливания взвеси размороженных эритроцитов.

Пластикатный мешок или флакон со взвесью оттаянных отмытых эритроцитов монтируется с системой для переливания таким же образом, как и при переливании обычной консервированной крови. Целесообразно применять пластикатные системы для переливания крови с фильтрами.

Перед переливанием обязательно производится проверка групповой принадлежности крови донора и реципиента, проба на групповую и резус - совместимость, а также биологическая проба в соответствии с "Инструкцией по переливанию крови и ее компонентов" (М., 1988 г.).

Следует также обратить внимание на величину гемолиза взвеси отмытых размороженных эритроцитов. Обычно свободный гемоглобин имеется в надстое в небольших концентрациях (от 40 до 120 мг%), что не оказывает неблагоприятного влияния на больного. При увеличении гемолиза (надосадок приобретает интенсивную розовую окраску при превышении 200 мг% свободного гемоглобина) рекомендуется снять надстой после центрифугирования взвеси эритроцитов и применить эритроцитную массу для переливания. Переливания необходимо

начинать медленно. При условии отсутствия реакции организма на биологическую пробу дальнейшая трансфузия производится в зависимости, от показаний - замедленно- струйным или капельным способом. Количество переливаемой эритроцитной взвеси определяется лечащими врачами в зависимости от состояния больного и характера патологического процесса.

После переливания размороженных отмытых эритроцитов, как и после переливания обычной консервированной крови, необходимо врачебное наблюдение за состоянием больного (термометрия тела через каждый час в течение трех часов, измерение артериального давления, наблюдение за диурезом, анализ мочи и т.д.).

7. Метод криоконсервирования тромбоцитов с оградяющим раствором "Тромбокриодмац"

Раствор "Тромбокриодмац" предназначен для замораживания и длительного хранения концентрата тромбоцитов с целью клинического применения. Раствор содержит диметилацетамид (ДМАЦ) и глюкозу, представляет собой бесцветную или слегка желтоватую прозрачную жидкость со слабым специфическим запахом, хорошо смешивается с тромбоцитами.

Раствор "Тромбокриодмац" оказывает криозащитное действие на тромбоциты при их медленном замораживании, последующем хранении в жидком азоте (-196 град. С) и оттаивании.

При длительном (до двух лет) хранении замороженных концентратов тромбоцитов после размораживания сохраняется более 80% клеток, из которых 50% сохраняют жизнеспособность и функциональную активность по тестам *in vitro*.

Размороженные тромбоциты применяются в лечебной практике с учетом тех же показаний, что и свежеприготовленные. Лечебная доза

11

трансфузий тромбоцитов составляет 2 x 10¹¹ или более клеток. Раствор "Тромбокриодмац" нетоксичен, апирогенен, нереактогенен. Раствор "Тромбокриодмац" готовят лабораторным способом по правилам, предусмотренным для приготовления растворов для внутривенного введения. После фильтрации раствор разливают по 50-100 мл в бутылки для крови и кровезаменителей (ГОСТ 10782-77) вместимостью 250 мл, укупоривают пробками, закрывают металлическими колпачками (ОСТ 64-7-85-79), автоклавируют при 1,2 атм в течение 30 минут, хранят при комнатной температуре в защищенном от света месте. Срок хранения раствора "Тромбокриодмац" - до двух лет.

7.1. Заготовка концентратов тромбоцитов для криоконсервирования.

Для криоконсервирования могут быть использованы концентраты тромбоцитов, полученные любым методом - на сепараторах, тромбоцитаферезом или в соответствии с "Инструкцией по фракционированию консервированной крови на клеточные компоненты и плазму" - и сохраняемые не более 2-4 часов после заготовки крови от донора или тромбоцитафереза.

Тромбоциты, выделенные из 500 мл консервированной крови, считают единицей концентрата, который в последующем замораживают в одном контейнере. Одна единица тромбоконцентрата в объеме 25-30 мл

9

плазмы содержит в среднем 50x10⁹ тромбоцитов. Возможно объединение 2 единиц концентрата тромбоцитов, совместимых по группам крови АВО Rh-фактору, в одном контейнере для замораживания.

7.2. Подготовку концентрата тромбоцитов к замораживанию производят в асептических условиях бокса. Взвесь тромбоцитов тщательно перемешивают. Затем в пластиковый контейнер с концентратом тромбоцитов медленно, в течение нескольких минут, добавляют через систему при постоянном помешивании равный объем раствора "Тромбокриодмац".

Смесь тромбоцитов с оградяющим раствором сразу же переводят в металлический (алюминиевый) контейнер вместимостью 50, 100 или 160 мл, герметически закрывают, маркируют простым карандашом, указывая фамилию, инициалы донора, группу крови, резус - принадлежность, число и номер контейнера по журналу, в который одновременно вносят эти данные, и направляют на замораживание.

7.3. Замораживание взвеси концентрированных тромбоцитов осуществляют в аппарате программного замораживания с медленной скоростью (3 град. С в мин до -60 град. С) охлаждения окружающей среды. Продолжительность процесса замораживания около 30 минут. По окончании замораживания контейнеры с замороженной взвесью тромбоцитов помещают в бункер с жидким азотом, специально предназначенный для их хранения. Размещение, график - сетку и регистрацию контейнеров выполняют в соответствии с инструкциями по эксплуатации криогенного оборудования.

Тромбоциты, замороженные с раствором "Тромбокриодмац" в жидком азоте, сохраняют биологическую полноценность в течение двух лет.

7.4. Размораживание концентратов тромбоцитов. Контейнеры с замороженными тромбоцитами вынимают из жидкого азота и быстро помещают в 20-литровую ванну, наполненную водой с температурой +37 - +38 град. С. Оттаивают при автоматическом покачивании контейнера (200 качаний в минуту) в течение 15-20 секунд. После размораживания контейнеры сразу переносят в бокс для обработки.

7.5. Подготовка концентратов тромбоцитов для трансфузии.

Размороженную тромбовзвесь закрытым способом переводят из алюминиевого контейнера в стерильный пластиковый контейнер "Компопласт" вместимостью 300 мл. При одновременной обработке нескольких контейнеров с тромбоцитами одной групповой и резус - принадлежности, предназначенных для одного больного, содержимое нескольких контейнеров (до 5-6) сливают в один пластиковый контейнер, который затем герметизируют. В тех случаях, когда в один контейнер сливают 7 и более единиц концентратов тромбоцитов, взвесь клеток центрифугируют в течение 20 минут при 2350 g. Около 50% надстоя, содержащего плазму и раствор "Тромбокриодмац" вместе с продуктами распада клеток, удаляют. Оставшиеся на дне мешка клетки через 15 минут тщательно и равномерно размешивают в оставшемся количестве надосадочной жидкости и мешок герметизируют.

7.6. На мешок с тромбоцитами, предназначенными для переливания, наклеивают этикетку с указанием названия препарата, фамилии и инициалов доноров, группы крови, резус - принадлежности, даты замораживания и оттаивания, объема взвеси тромбоцитов, количества единиц концентратов тромбоцитов, срока годности препаратов, фамилии врача, производившего обработку размороженных тромбоцитов.

Пластиковый контейнер с размороженными тромбоцитами передают в клинику для трансфузии, которая должна производиться в течение первых двух часов после их заготовки.

7.7. Контроль качества концентратов тромбоцитов. Готовые к переливанию концентраты размороженных тромбоцитов должны иметь вид гомогенной суспензии светло - желтого цвета, без глыбок и агрегатов. При оттаивании в верхней части объема жидкости имеется прозрачный слой плазмы. Для контроля стерильности концентратов тромбоцитов используют концентрат клеток, находящийся в пластиковой трубке, в количестве 2 мл. Для посева берут пробу от одного из 10 заготовленных мешков с концентратом тромбоцитов.

8. Организация отделения долгосрочного хранения замороженных клеток крови

8.1. Общие положения.

Для организации отделения длительного хранения клеток крови требуется:

- 1) Необходимая аппаратура и криогенное оборудование.
- 2) Соответствующее помещение для рационального размещения в нем оборудования.
- 3) Специально подготовленный технический и медицинский персонал, способный обеспечить бесперебойную работу отделения.
- 4) Организация регулярного бесперебойного получения жидкого азота в требуемых количествах.

5) Обеспечение обслуживания и ухода за оборудованием.

6) Система документации: учет поступления, хранения и выдачи компонентов крови.

Помещение указанного отделения организуется в отдельном блоке, выделенном на первом этаже или в цоколе здания для удобства подачи извне жидкого азота в аппараты. Отделение, как минимум, должно состоять из трех комнат. Помещение должно быть сухим, с достаточным количеством света, иметь достаточную двухкратную приточно - вытяжную вентиляцию, водопровод и подвод электроэнергии (220-380 Вольт). В одной комнате (50 кв. м) размещают все необходимо аппараты и оборудование для замораживания и хранения крови и ее компонентов в жидком азоте. Вторая комната (15-20 кв. м) используется как помещение для хранения запасных частей к аппаратам, контейнеров для крови и др. Третья комната (15 кв. м)

предназначена для персонала, обслуживающего криогенное оборудование. Желательно, чтобы она располагалась рядом с первой. Все помещения, в которых производится замораживание и хранение крови и ее компонентов, содержатся в безупречной чистоте.

Для работы в отделении по замораживанию и длительному хранению донорской крови и ее компонентов необходим специально подготовленный для этого персонал: врачи и медицинские сестры, а также инженер (техник).

Асептическая часть работы банка по криоконсервированию клеток крови производится в помещении СПК или ОПК в отделении заготовки крови.

8.2. Документация.

Документация ведется в операционном отделении, где производят все работы по криоконсервированию клеток крови (подготовка к замораживанию, обработка после оттаивания перед трансфузией). Основные сведения о групповой принадлежности клеток крови и все другие данные о замороженном образце заносятся врачом или медрегистратором в "Журнал регистрации замороженных компонентов крови" (форма N 414/у, утверждена Минздравом СССР от 07.08.85 г. N 1055). Если замораживаемые эритроциты относятся к редкой группе, в графах 5 или 6 этого журнала следует сделать соответствующую запись. Журнал хранится у ответственного врача отделения замораживания крови.

В этом журнале находится информация, необходимая для быстрого нахождения по зарегистрированному номеру нужного контейнера. Затем номер контейнера отыскивается в специальном графике - сетке, который находится у сотрудника (инженера), ответственного за техническую часть работы отделения. В графике - сетке обозначены номера контейнеров с замороженными компонентами крови и их место расположения в хранилище: номер корзины (кассеты) в хранилище и номер ячейки в ней, в которой находится контейнер.

При необходимости размораживания эритроцитов редкой группы крови определенной характеристики пользуются дополнительно данными перфокарты, заведенной в отделении донорских кадров на доноров редкой группы. В перфокарте отделения донорских кадров должен быть поставлен журнальный номер контейнера, в котором сохраняется нужная кровь. По мере надобности контейнер извлекают из хранилища, при этом пользуются заявкой и данными графика - сетки. После оттаивания и обработки эритроцитов последние паспортизируют путем наклеивания на стандартную бутылку или полимерный контейнер этикетки с паспортными данными, переписанными из регистрационного журнала и сверенными с перфокартой (в случае редкой группы крови) и номером на контейнере. Лишь после этого перфокарта оттаянного образца переносится в архив, а в графике - сетке делается соответствующее исправление. Такая паспортизация и учет предупреждают возможность ошибок в использовании размороженных клеток, гарантируют необходимый контроль за работой отделения по заготовке, хранению и выдаче замороженных эритроцитов.

8.3. Криогенное и вспомогательное оборудование.

Размещение аппаратуры и криогенного оборудования должно быть рациональным и обеспечивать легкий подход к аппаратам со всех сторон. Для функционирования отделения длительного хранения замороженных клеток крови используются два типа холодильного оборудования: комплект специального криогенного оборудования, работающего на жидком азоте (- 196 град. С) и электрорефрижераторы на -30, -40, -70, -80 град. С. Кроме этого, необходимо иметь центрифуги с охлаждением со стаканами на 1000 или 500 мл для обработки размороженных клеток.

В настоящее время разработано и выпускается серийно криогенное оборудование нового поколения - "Биокомплекс-II". Полуавтоматический режим работы биокомплекса, новый принцип хранения крови в двух фазах (жидком азоте и его парах) требуют квалифицированного обслуживания, знания конструктивных особенностей оборудования, особенностей его эксплуатации, осуществления профилактических мероприятий и соблюдения техники безопасности.

Перечень аппаратов "Биокомплекса-II".

1. Камера криогенная К-1000	- 2 шт.
2. Цистерна транспортная для жидких кислорода, азота и аргона ЦТК 2,5/0,25	- 1 шт.
3. Цистерна подпиточная ЦТК 0,5/0,25	- 1 шт.
4. Аппарат для замораживания биопродуктов	- 1 шт.
5. Аппарат для размораживания биопродуктов	- 1 шт.
6. Хранилище для биопродуктов ХВ-0,2	- 2 шт.
7. Сосуд Дьюара КВ 6303 (5 литров)	- 3 шт.
8. Сосуд Дьюара промышленный СПД-16	- 2 шт.
9. Комплект ЗИП	- 1 шт.

Потребляемая мощность электричества для "Биокомплекса-II" - 4,5 кВт.

8.4. Технический и медицинский специально подготовленный персонал.

За техническим состоянием всей аппаратуры следит и отвечает инженер или техник. Он проводит замораживание и оттаивание. Он же следит за уровнем жидкого азота в хранилищах, доликает их периодически азотом, обеспечивает (контролирует) своевременную доставку жидкого азота, следит за работой криогенных камер, электрохолодильников и другого оборудования. Инженер ведет учет движения контейнеров с замороженными компонентами крови в хранилищах (их поступление, хранение, выдача) по журналу и по специальному графику - сетке и выдает их после оттаивания, производимого по заявке врача, который сверяет по журналу достоверность отобранного контейнера.

Для функционирования отделений долгосрочного хранения клеток крови, оснащенных "Биокомплексом-II", в котором будет храниться до 2,0-2,5 тыс. доз компонентов крови, необходимо иметь не менее 5 единиц обслуживающего персонала. Врач (1) и медсестры (2) производят подготовку компонентов крови для замораживания, специальную их обработку после размораживания перед переливанием. Инженер (1) и техник (1) обслуживают оборудование и выполняют все функции, изложенные выше. Младшая медицинская сестра обеспечивает чистоту помещений.

8.5. Порядок работы - эксплуатация "Биокомплекса-II".

Контейнеры с биоматериалом (клетками крови) в отделении долгосрочного хранения крови обрабатываются по технологической системе: замораживание - хранение - размораживание.

8.5.1. Замораживание.

Перед замораживанием контейнеры, заполненные биопродуктом - клетками крови - дополнительно герметизируют путем прочного навинчивания тефлоновых колпачков на штуцера во избежание попадания азота в контейнер (в случае попадания жидкого азота при оттаивании может произойти разрыв контейнера). Затем на верхнюю пластину контейнера наносят номер, под которым в специальном регистрационном журнале (см. Приложение 1) фиксируют паспортные данные на кровь, находящуюся в этом контейнере.

Замораживание крови в контейнере производят в специальном аппарате (ванне) с жидким азотом, куда наливают 45 кг азота. Контейнеры по 2 шт. (объем - 290 мл) помещают в корзину аппарата, который закрывают крышкой и включают электродвигатель. Процесс замораживания биоматериала происходит при автоматическом покачивании контейнеров (200 циклов в минуту) в среде жидкого азота до двух минут. Об окончании замораживания можно судить по прекращению выделения паров азота из трубки в крышке аппарата для замораживания.

8.5.2. После замораживания контейнеры с кровью переносят в специальный жидкоазотный бункер (ХБ-0,2, камеру К-1000) для длительного хранения замороженного биоматериала в среде жидкого азота или его парах. Для переноса контейнеров используют специальные щипцы и цилиндрический сосуд Дьюара на 5 литров, который наполняют жидким азотом перед помещением в него переносимых контейнеров.

Хранилище К-1000 представляет собой криогенную прямоугольную камеру с устройством для автоматической подпитки ее жидким азотом. Криогенная камера предназначена для хранения 1000-1200 контейнеров с эритроцитарной массой, из которых часть (до 700 штук) хранится в нижнем ярусе камеры погруженными в жидкий азот (-196 град. С), часть (до 500 штук) - хранится в верхнем ярусе камеры в парах азота, где температура поддерживается в пределах -150 +/- 10 град. С.

Для загрузки камеры контейнерами с кровью необходимо открыть одну из двух крышек и установить контейнеры в тележки; при закладке контейнеров в нижний ярус криогенной камеры опускать их следует медленно во избежание сильного испарения (вскипания) жидкого азота.

В специальном графике - сетке фиксируют номер и местоположение каждого заложенного на хранение контейнера. После загрузки контейнерами крышки запирают на замки.

Подпитка камер К-1000 жидким азотом осуществляется автоматически; в случае неисправности автоматики можно заливать хранилища жидким азотом вручную.

В автоматическом режиме работы камер нормальный уровень жидкого азота поддерживается дискретным регулятором уровня, расположенным в верхнем правом углу лицевой панели криогенной камеры.

Для заправки камер жидким азотом необходимо иметь специальные металлорукава (8ДО.449.013ТО). Металлорукава к цистернам ЦТК 2,5/0,25 и ЦТК 0,5/0,25 соединяются с помощью накидных гаек. Смонтированная таким образом гибкая магистраль предназначена для наполнения хладагентом жидкоазотных бункеров и камер.

Камера К-1000 эксплуатируется при температуре окружающей среды от +10 град. С до +35 град. С, при влажности воздуха до 80% и отсутствии в воздухе примесей, вызывающих коррозию. В процессе эксплуатации криогенных камер в местах выхода паров азота конденсируется влага из окружающего воздуха; образующиеся снег и иней необходимо своевременно удалять скребком, хранящимся в ящике ЗИП.

В комплект биокомплекса, помимо криогенных камер, включены два биохранилища ХБ-0,2. Это жидкоазотные бункера круглой формы, предназначенные для хранения замороженных биоматериалов только в среде жидкого азота. Гидравлическая емкость одного хранилища ХБ-0,2 - 200 литров, количество корзин - 16, вмещающих 100 контейнеров с эритро массой.

Перед началом эксплуатации каждое хранилище необходимо обезжирить 3% раствором питьевой соды и гидролизным спиртом (1 литр на 200 литров гидравлической емкости хранилища).

Для охлаждения внутреннего сосуда хранилища залить 20-30 литров жидкого азота, через 24 часа азот заливается до верхней кромки стеллажа, на который и устанавливаются корзины с контейнерами (их местоположение фиксировать в графике - сетке), сразу же после установки корзин емкость долить жидким азотом до уровня на 1 см ниже кромки горловины. Хранилище должно быть постоянно закрыто крышкой, открывать ее можно только для закладки или извлечения контейнеров. Подпитка жидким азотом хранилища ХБ-0,2 производится с помощью металлоулавки через горловину хранилища из цистерны ЦТК 2,5/0,25. В процессе эксплуатации биохранилища необходимо удалять влагу, конденсирующуюся на крышке.

8.5.2.2. Удаление водяного конденсата.

Во время работы с жидкоазотными бункерами и криогенными камерами при повышенной влажности воздуха видимость внутри емкостей затруднена, т.к. при соприкосновении воздуха с парами азота конденсируется влага и образуется водяной конденсат (туман), который можно удалять с помощью бытового пылесоса.

В процессе хранения контейнеров с биопродуктом в среде жидкого азота из-за неплотности прилегания тефлоновых колпачков к штуцерам или некачественной сварки боковых швов возможно натекание азота внутрь контейнера. При извлечении такого контейнера появляется характерное потрескивание его оболочки. Это результат испарения жидкого азота, что создает избыточное давление во внутренней полости контейнера и вызывает деформацию или разрыв контейнера. Чтобы предотвратить деформацию или разрыв контейнера, следует сразу же поместить контейнер обратно в биохранилище, погрузив его частично в жидкий азот, и ослабить тефлоновый колпачок на штуцере. При повторном извлечении контейнера газообразный азот выйдет в атмосферу. Плотнo завернув колпачок, можно размораживать контейнер. При уверенности сохранения стерильности биопродукт можно использовать для клинических целей.

8.5.3. Размораживание.

При необходимости оттаивания биоматериала по графику - сетке нужный контейнер извлекают из хранилища. Вынимают контейнеры специальным ключом и щипцами, помещают в пятилитровый сосуд Дьюара с жидким азотом и переносят к аппарату для размораживания. Затем контейнеры помещают по 2 штуки в корзину аппарата для размораживания, который закрывают крышкой, и включают электродвигатель размораживателя.

Масса воды, заливаемая в аппарат для размораживания - 70 кг, температура воды в аппарате регулируется автоматически от +30 град. С до + 80 град. С.

Оттаивание производится в аппарате, заполненном водой, подогретой до температуры +45 град. С, при автоматическом покачивании контейнера (200 циклов в минуту) в течение 25 секунд. По истечении необходимого времени отогрева автоматически отключается электродвигатель и включается звонок, сигнализирующий об окончании процесса. Допускается производить оттаивание при тех же температурных условиях вручную покачиванием контейнера с кровью в течение 50-60 секунд.

9. Описание и правила эксплуатации цистерн - транспортной

ЦТК 2,5/0,25 (накопительная) и подпиточной

ЦТК 0,5/0,25 (промежуточная емкость)

Цистерна транспортная - ЦТК 2,5/0,25 предназначена для транспортировки, хранения жидкого азота и заправки им подпиточной цистерны в процессе эксплуатации биокомплекса. Количество азота, заливаемое в ЦТК 2,5/0,25 (2100 кг) обеспечивает нормальную работу биокомплекса в течение 12-14 дней. Для более экономичного режима работы транспортную цистерну ЦТК 2,5/0,25 следует размещать как можно ближе к промежуточной емкости ЦТК

0,5/0,25 с внешней стороны здания. При таком расположении сокращается длина трубопроводов, чем снижают потери жидкого азота при его перекачивании. Цистерна ЦТК 2,5/0,25 должна быть защищена от солнца, для чего делается навесная крыша. Необходимая площадь для размещения указанного оборудования вне помещения - 15 кв. м, высота оборудования - 2,2 м. При эксплуатации данной емкости следует внимательно обращаться с вентилями, регулирующими работу цистерны. Для их открытия и закрытия не прикладывать усилий, в противном случае золотники клапанов быстро изнашиваются.

Подпиточная цистерна ЦТК 0,5/0,25 вмещает 380 кг жидкого азота. Этого количества хладоносителя достаточно для работы двух камер К-1000 в автоматическом режиме подпитки в течение трех суток. Потери жидкого азота от самоиспарения из цистерны не должны превышать 1,1% в сутки. Для заполнения жидким азотом промежуточной емкости открывают вентили "наполнение - опорожнение" и "газосброс", закрывают вентили через 20-30 минут после заправки (отепленными) без усилий. Отсоединять металлический рукав от штуцера ЦТК 0,5/0,25 можно только при отсутствии избыточного давления внутри емкости. Цистерны ЦТК 2,5/0,25 и ЦТК 0,5/0,25 функционируют при избыточном давлении, что требует строгого соблюдения порядка работы в соответствии с указаниями инструкции по их эксплуатации, а также выполнения мер безопасности при работе с жидким азотом.

9.1. Профилактические мероприятия.

В целях обеспечения безаварийной работы "БиокомплексII" следует проводить регламентные и профилактические работы камер, аппаратов и коммуникаций в строгом соответствии с инструкцией. Гарантийный срок непрерывной работы криогенных емкостей и камер - 12 месяцев. Для рационального использования комплектующего оборудования биокомплекса составляется график проведения регламентных и профилактических мероприятий в течение года. Сроки всех регламентных работ, а также перечень выполняемых мероприятий указаны в инструкциях завода - изготовителя по эксплуатации биокомплекса. Кроме того:

а) цистерны ЦТК 2,5/0,25 и ЦТК 0,5/0,25 один раз в три года должны подвергаться испытаниям на прочность внештатными инспекторами технадзора по месту эксплуатации;

б) гидравлические испытания на прочность указанных цистерн в связи со сложностью и трудоемкостью их проведения разрешено заменять пневматическими испытаниями, т.е. воздухом под давлением 3,5 кг/кв. см в течение 15 минут. Затем при отсутствии падения давления резервуар выдерживается под пневматическим давлением 2 кг/кв. см в течение 8 часов. При этом падение давления не должно превышать 0,1 кг/кв. см. При подготовке цистерн к испытаниям следует снять мембраны и установить вместо них заглушки, а также нагрузить предохранительный клапан во избежание его срабатывания. Во время проведения испытаний для предотвращения травм в случае разрыва цистерн сотрудники должны находиться в укрытии;

в) контроль вакуума в изолированном пространстве кожуха транспортной и подпиточной цистерн и биохранилища ХБ-0,2 следует проводить один раз в 6 месяцев. При необходимости вакуум восстанавливается до остаточного давления 0,5 мм рт.ст.;

г) манометры на цистернах проверяются и клеймятся метрологической службой один раз в год.

Если для выполнения регламентных работ или обезжиривания (см. приложение 3) требуется утеплить биохранилище или камеру, необходимо заранее разгрузить данную емкость в запасное хранилище или выдать кровь для применения. При подозрении на утерю вакуума криогенными емкостями (повышенная испаряемость, обмерзание крышки и верхней части обечаек) необходимо немедленно данные емкости разгрузить от биоматериала в запасной резервуар (биохранилище) и установить причину развакуумирования. Чтобы обеспечить сохранность биоматериала в подобных ситуациях, необходимо иметь в отделении запасное (аварийное) биохранилище. Для восстановления вакуума в комплекте биокомплекса поставляется (по согласованию с заказчиком) вакуумный насос 2НВР-5Д, вакуумный агрегат ВА-01-1ПР и вакууметр ВНТ-2А4Ш.

10. Обеспечение жидким азотом

При ежедневной работе по замораживанию эритроцитов и других клеток крови, а также для покрытия расхода жидкого азота на самоиспаряемость при хранении клеток крови, месячное потребление его для комплекта оборудования "Биокомплекс-II" составит 4-5 тонн.

Доставка жидкого азота для хранилища производится централизованно или самовывозом на автомашине с ТРЖК, выделенной в распоряжение СПК. Для этого:

а) машина должна быть зарегистрирована в органах ГАИ, как "Спецавтотранспорт";
б) она должна быть оснащена специальными знаками: предупреждающая окраска в соответствии с ГОСТом, маркировка "Опасный груз", номер перевозимого вещества по списку ООН (для жидкого азота - 1977 КЭМ 234);

в) водитель, кроме общих документов, перечисленных в "Правилах дорожного движения", должен иметь ряд документов, определенных разделом "Правила транспортировки опасных грузов", а именно:

1. Свидетельство о прохождении водителем спецподготовки (приложение 16/15), которое выдается инженером по технике безопасности обслуживаемого учреждения.

2. Аварийную карточку системы информации об опасности (приложение 1 (2-5)) которая выдается органами ГАИ.

3. Свидетельство о допуске транспортного средства (приложение 3 (II)), которое выдается органами ГАИ.

4. В путевом листе водителя должны быть:

- в левом верхнем углу - пометка "Опасный груз", выполненная красным цветом;

- в графе 22 - номер перевозимого вещества по списку ООН.

Техника безопасности при работе с жидким азотом.

1. К эксплуатации криогенной аппаратуры допускаются лица, изучившие техническое описание, инструкцию по эксплуатации и прошедшие инструктаж по технике безопасности. Обслуживающий персонал должен сдать зачет по правилам безопасности и получить допуск медицинской комиссии. Персонал должен знать следующее:

а) жидкий азот - низкипящая жидкость, поэтому попадание жидкого азота на кожу человека может вызвать тяжелые ожоги;

б) следует помнить, что после открытия крышки, а также при погружении в камеру предметов, имеющих комнатную температуру, может произойти вскипание азота с разбрызгиванием жидкости;

в) во избежание ожогов не допускать попадания жидкого азота на тело. Для этого обслуживающий персонал должен работать в защитной одежде (халат, комбинезон), а на руках иметь рукавицы. Для защиты глаз рекомендуется применять защитные очки;

г) газообразный азот не имеет запаха и цвета;

д) газообразный азот при нормальных условиях легче воздуха;

е) нужно помнить, что повышение концентрации азота в помещении (содержание кислорода менее 18%) приводит к головной боли, сонливости, общей слабости и потере сознания;

ж) в помещении, где размещается криогенная камера и другое жидкоазотное оборудование, должна быть исправно работающая, постоянно включенная приточно - вытяжная вентиляция с местным отсосом с воздухообменом не менее двукратного. Инструкция местного отсоса не должна мешать открыванию крышки камеры;

з) запрещается обслуживание жидкоазотного оборудования одним человеком. В помещении должны находиться не менее двух человек;

и) при передвижении тележек внутри камеры, при погружении предметов в жидкий азот или извлечении их оттуда необходимо пользоваться щипцами или деревянной палкой, при этом низко наклоняться над камерой не рекомендуется;

к) загрузку и выгрузку контейнеров необходимо производить с задержанным дыханием. Отдышаться следует в стороне от камеры;

л) предохранительный клапан должен быть отрегулирован на нужное давление, опломбирован. Он должен быть чистым от снега;

м) нарушение обслуживания и инструкции по технике безопасности приводит к несчастным случаям с людьми и авариям;

н) при потере сознания от повышенной концентрации азота необходимо:

- немедленно вынести пострадавшего на свежий воздух;

- освободить от одежды, стесняющей дыхание, а в случае остановки дыхания произвести искусственное дыхание;

- вызвать врачебную помощь.

Во избежание поломки крышек помещать груз на них воспрещается - крышки сделаны из стеклопластика.

При эксплуатации электрооборудования биокомплекса необходимо руководствоваться "Правилами технической эксплуатации электроустановок потребителей" (ПТЭ) и "Правилами техники безопасности при эксплуатации электроустановок потребителей" (ПТБ), издание третье, 1971 г." Личный состав, обслуживающий электрооборудование биокомплекса, должен иметь

квалификационную группу по технике безопасности не ниже III и сдать зачет на право допуска к самостоятельной работе.

2. Все работы на электрооборудовании должны производиться инструментом с диэлектрическими ручками.

3. Все виды работ по наладке и ремонту электрооборудования должны производиться при снятом напряжении.

4. В помещении, где размещено криогенное оборудование биокомплекса, при первичном заполнении жидком азотом подпиточной цистерны ЦТК 0,5/0,25, камер К-1000 и аппарата для замораживания необходимо производить анализ воздуха не реже двух раз в смену при помощи газоанализатора ГК I (ТУ 25-111223-76). Особенно тщательно следить за концентрацией кислорода в воздухе, его должно быть не менее 19%.

5. Один раз в 6 месяцев необходимо проверять процентное содержание кислорода в азоте, находящемся в камерах и в аппарате для замораживания также газоанализатором ГК I, при этом кислорода должно быть не более 30%.

6. В целях безопасности работы необходимо следить за исправностью контура заземления и заземляющих устройств.

7. Заправка криогенных емкостей жидким азотом, их техническое состояние регистрируется в специальном журнале ежедневно ответственным лицом (см. приложение 2).

II. МЕТАЛЛИЧЕСКИЕ КОНТЕЙНЕРЫ ДЛЯ КЛЕТОК КРОВИ И ИХ ОБРАБОТКА

Металлический сосуд предназначен для помещения в него крови и ее компонентов, которые подвергаются быстрому замораживанию в жидком азоте (при температуре -196 град. С) или программному охлаждению и дальнейшему хранению при температурах от -150 град. С до -196 град. С (жидкий азот, его пары).

Полная емкость сосудов, используемых для помещения в них эритроцитарной взвеси, равна 250-290 мл, для тромбоцитов емкость сосуда составляет 50, 75 и 160 мл.

Контейнеры для замораживания и хранения клеток крови сделаны из алюминия, инертного при контакте с кровью и ее компонентами. Они имеют форму, сечение и развитую поверхность, обеспечивающие при замораживании до -196 град. С максимальный теплоотвод, необходимый для наименьшего повреждения клеток крови. Контейнер снабжен двумя штуцерами, что необходимо для удобства заполнения кровью и для их мытья. Контейнер выдерживает быстрое охлаждение от +20 град. С до -196 град. С и обратный быстрый нагрев, а также длительное (в течение ряда лет) пребывание с кровью или ее компонентами в жидком азоте без нарушения герметичности.

Обработка и подготовка металлических контейнеров.

1. Новые контейнеры перед применением подвергаются специальной обработке.

Обработка внутренней поверхности контейнера состоит из двух этапов; 1) обезжиривание, 2) создание окисной пленки.

Для обезжиривания и растворения других различных загрязнений внутренняя поверхность контейнера обрабатывается ацетоном (примерно 1/3 объема контейнера) (одна порция ацетона используется повторно для других контейнеров) и далее щелочным раствором нижеуказанной прописи.

NaOH	-	8,0
Na ₃ PO ₄	-	50,0
Na ₂ SiO ₃	-	30,0

Воды до 1000 мл

Примечание. Раствор готовят следующим образом: готовится 70% водный раствор NaOH. Затем берется 11 мл этого раствора, выливается в заранее взвешенные Na₃PO₄ - 50,0, Na₂SiO₃ - 30,0, растворенные в части воды, и доводится до 1000 мл дистиллированной водой.

Обработка контейнеров щелочным раствором производится следующим образом:

1) нагретый до 60 град. С раствор наливают в контейнеры (в том же количестве, что и ацетон) и промывают им в течение 10 минут, поочередно обволакивая стенки внутренней поверхности контейнера, затем раствор выливают;

2) многократно (до 10 раз) контейнер тщательно промывают проточной водой, последнюю промывную жидкость проверяют лакмусовой бумажкой на нейтральность среды;

3) для создания окисной пленки (Al₂O₃), которая препятствует коррозии металла, в контейнер наливают на 15 секунд раствор крепкой азотной кислоты в разведении с водой 1:1, покачивая контейнер для обработки всей внутренней поверхности;

4) после освобождения от раствора азотной кислоты контейнер промывают водопроводной водой (10-12 раз) и три раза дистиллированной водой. Нейтральность внутренней поверхности контейнера снова проверяется пробой последней промывной воды на лакмус;

5) контейнеры высушиваются путем нагревания в сушильном шкафу или продувания газообразным азотом или сжатым воздухом. В таком высушенном виде контейнеры хранятся до момента их стерилизации и использования;

6) стерилизуются контейнеры в автоклаве при +120 град. С (давление 1,2 атм) в течение одного часа и там же высушиваются. При этом фторопластовые колпачки не завинчиваются на штуцерах контейнеров, чтобы не мешать прохождению пара внутрь контейнера. Оба колпачка, завернутые в бумагу, располагают между штуцерами, и в таком виде контейнеры, обернутые в бумагу, складываются в матерчатые мешки для стерилизации.

2. Использованные контейнеры моются следующим образом:

а) тщательное отмывание проточной водопроводной водой от крови при встряхивании (10-12 раз);

б) обработка щелочным раствором вышеописанным образом;

в) многократное промывание проточной теплой водой и трижды дистиллированной с проверкой последней промывной воды на лакмус;

г) высушивание и стерилизация, как описано выше.

Приложение N 1

РАСТВОРЫ ДЛЯ БЫСТРОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ ЭРИТРОВЗВЕСИ (раздел 1.1)

Криоконсервант ЦНИИГПК 11

4

Глицерина дистиллированного высшего сорта	- 300 мл
Маннита	- 40,0 г
Натрия хлорида	- 7,0 г
Натрия фосфата двузамещенного кристаллогидрата	- 0,3 г
Воды для инъекций	до 1000 мл

Пропись растворов для отмывания размороженных эритроцитов, хранившихся в жидком азоте - с криоконсервантами П и П

4 5

Этапы отмывания	Маннитные	Солевые
I	N 1	N 1
	Маннига - 160,0 Натрия хлорида - 7,0	Натрия хлорида - 40,0 Натрия фосфата двузамещенного - 0,3
	Воды для инъекций до	1000 мл
II	N 2	N 2
	Маннита - 50,0 Натрия хлорида - 7,0	Натрия хлорида - 20,0 Натрия фосфата двузамещенного 0,3

	Воды для инъекций до	1000 мл						
III	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; text-align: center;">N 3</td> <td style="width: 50%; text-align: center;">N 3</td> </tr> <tr> <td>Маннита - 25,0</td> <td>Натрия хлорида - 10,0</td> </tr> <tr> <td>Натрия хлорида - 7,0</td> <td>Натрия фосфата двузамещенного - 0,3</td> </tr> </table>	N 3	N 3	Маннита - 25,0	Натрия хлорида - 10,0	Натрия хлорида - 7,0	Натрия фосфата двузамещенного - 0,3	
N 3	N 3							
Маннита - 25,0	Натрия хлорида - 10,0							
Натрия хлорида - 7,0	Натрия фосфата двузамещенного - 0,3							
	Воды для инъекций до	1000 мл						

ПРОПИСЬ РЕСУСПЕНДИРУЮЩЕГО РАСТВОРА
ЦНИИГПК 8в

Сахарозы - 70,0
Натрия хлорида - 3,0
Натрия фосфата двузамещенного - 2,0
Натрия фосфата однозамещенного - 1,0
Воды для инъекций до 1000 мл
Соотношение эритроциты: раствор = 1:1

РАСТВОРЫ ДЛЯ БЫСТРОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ ЭРИТРОКОНЦЕНТРАТА
(раздел 1.2)

ЦНИИГПК 11 - М
5

ЦНИИГПК 11 - С
5

Глицерина - 400 мл	Глицерина - 400 мл
Маннита - 40,0 г	Сахарозы - 50,0 г
Натрия хлорида - 7,0 г	Натрия хлорида - 7,0 г
Натрия фосфата	Натрия фосфата
двузамещенного - 0,3 г	двузамещенного - 0,3 г
Воды для инъекций до 1000 мл	Воды для инъекций до 1000 мл

РАСТВОРЫ ДЛЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ
ПРИ -30 ГРАД. С
(Раздел 2)

ЦНИИГПК 11 55
5

ЦНИИГПК 11
5

Глицерина - 550 мл	Глицерина - 400 мл
Маннита - 40 г	Маннита - 40 г
или	или
Сахарозы - 50 г	Сахарозы - 50 г
Хлорида натрия - 7 г	Хлорида натрия - 7 г
Натрия фосфата	Натрия фосфата
двузамещенного	двузамещенного
кристаллогидрата - 0,3 г	кристаллогидрата - 0,3 г

Воды для инъекций до 1000 мл

Соотношение
эритроциты: раствор = 1:1

Соотношение
эритроциты: раствор = 1:1,6

РЕЦЕПТУРА РАСТВОРОВ ДЛЯ ДЕГЛИЦЕРИНИЗАЦИИ
ЭРИТРОЦИТОВ, ЗАМОРОЖЕННЫХ ПРИ -30 ГРАД. С

Наименование растворов	Состав раствора	
	Солевые	Маннитно - солевые

6% раствор NaCl	Натрия хлорида - 60,0	Маннита	- 160,0
16% раствор маннита		Натрия хлорида -	7,0
	Воды для инъекций до 1000 мл		
4% раствор NaCl	Натрия хлорида - 40,0		
	Воды для инъекций до 1000 мл		
2% раствор NaCl	Натрия хлорида - 20,0	Маннита	- 50,0
5% раствор маннита	Натрия фосфата	Натрия хлорида -	7,0
	двузамещенного - 0,2		
	Воды для инъекций до 1000 мл		
1% раствор NaCl	Натрия хлорида - 10,0	Маннита	- 25,0
2,5% раствор маннита	Натрия фосфата	Натрия хлорида -	7,0
	двузамещенного - 0,2		
	Воды для инъекций до 1000 мл		

РЕЦЕПТУРА СОЛЕВЫХ РАСТВОРОВ ДЛЯ ДЕГЛИЦЕРИНИЗАЦИИ
РАЗМОРОЖЕННЫХ ЭРИТРОЦИТОВ ПО МЕТОДУ,
РАЗРАБОТАННОМУ В РОСНИИГТ
(раздел 3)

Раствор N 1

Натрия хлорида - 32,0
Воды для инъекций - до 1000 мл

Раствор N 2

Натрия хлорида - 20,0
Воды для инъекций - до 1000 мл

Раствор N 3

Натрия хлорида - 9,0
Воды для инъекций - до 1000 мл

Рецептура раствора "Тромбокриодмац"

NN-Диметилацетамида (ДМАЦ) х.ч.
(ТУ 6-09-537-73, ГОСТ 388573) - 50,0 мл
Глюкозы (ГФ X, Ст. 311) - 50,0 мл
Воды для инъекций (ГФ X, Ст. 74) до 1000 мл

Образец этикетки для размороженных отмытых
эритроцитов

Институт (станция) переливания крови.....
Размороженные отмытые эритроциты
Заморожены..... Донор.....
Разморожены..... N бутылки.....
Контейнер Дата заготовки крови.....
Криоконсервант..... Консервант.....
Эритроцетовзвеси..... мл Группа крови.....
Ресуспендирующего раствора... мл Резус - принадлежность.....
Срок годности..... Врач.....

ВНИМАНИЕ! Врач, переливающий кровь, обязан непосредственно перед переливанием эритроцитов проверить:

- 1) группу крови больного;
- 2) группу переливаемой взвеси эритроцитов;
- 3) совместимость эритроцитов донора с сывороткой крови больного;
- 4) произвести биологическую пробу;
- 5) удостовериться в совместимости крови донора и реципиента по резус - фактору.

Приложение N 2

ОБРАЗЕЦ ЖУРНАЛА ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ
ЗАМОРОЖЕННОЙ КРОВИ И ЕЕ КОМПОНЕНТОВ

N п/п	N контейнера с кровью, место в хранилище	Дата замораживания	Донор			
			Дата взятия крови	Фамилия, имя, N флакона или контейнера	Группа крови, резус - фактор, редкая группа	Консервант, его количество
1	2	3	4	5	6	7

Замораживание				Дата оттаивания и время	Время хранения в замороженном состоянии
Объем замороженной взвеси, число клеток (для лейкоцитов и тромбоцитов)	Ограждающий раствор	Тип контейнера	Режим		
8	9	10	11	12	13

Отмывание		Куда выдано, дата выдачи	Фамилия, имя, отчество и подпись ответственного лица
Метод и растворы	Взвешивающий раствор, его объем, объем восстановленных клеток		
14	15	16	17

ЖУРНАЛ РЕГИСТРАЦИИ ЗАПРАВКИ
КРИОГЕННЫХ ЕМКОСТЕЙ ЖИДКИМ АЗОТОМ

Дата	N машины	Фамилия, имя, отчество шофера, N фактуры	Количество полученного азота	Количество разлитого азота

--	--	--	--	--

Дата заправки криогенных емкостей	Фамилия, имя, отчество, производившего заправку	Проверяющий

Приложение N 3

**НОРМЫ РАСХОДОВАНИЯ ГИДРОЛИЗНОГО СПИРТА ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ
ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ОБЕЗЖИРИВАНИЯ И ДЕЗИНФЕКЦИИ
КРИОГЕННОГО ОБОРУДОВАНИЯ И КОММУНИКАЦИЙ**

- 1) на 200 литров гидравлической емкости биохранилищ - 1 литр растворителя (спирт гидролизный),
- 2) на 1 погонный метр коммуникаций - 0,1 литра растворителя (спирт гидролизный).

Инструкция предназначена для врачей Службы крови и лечебно - профилактических учреждений.

Для размещения на сайте текст инструкции любезно предоставлен уважаемым доктором А.В. Мельниковым (Ессентуки)