

TRACTATENBLAD

VAN HET

KONINKRIJK DER NEDERLANDEN

JAARGANG 1967 Nr. 142

A. TITEL

*Europese Overeenkomst betreffende de uitwisseling van genees-
middelen van menselijke oorsprong, met Bijlagen;
Parijs, 15 december 1958*

B. TEKST

De tekst van Overeenkomst en Bijlagen is geplaatst in *Trb.* 1959, 118.

Bij een door de Secretaris-Generaal van de Raad van Europa op 12 mei 1967 opgesteld Proces-verbaal is aan het bij de Overeenkomst behorende Protocol toegevoegd een lid D in deel I en een Bijlage 7, waarvan de Engelse en de Franse tekst als volgt luiden:

„D. *Freedom from toxicity of plastic blood transfusion equipment*

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

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 equipment, the source of the components of the material or materials and their methods 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

„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.”

ANNEXE 7 AU PROTOCOLE
CONSEIL DE L'EUROPE

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

**Innocuité des appareillages de transfusion sanguine en
matière 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 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

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:

$$L = \frac{A}{3.14 (D_1 + D_2)}$$

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 elution 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 tubes¹). 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.

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.

¹) 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.

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'éluat, 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 verre¹⁾. 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.

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.

1) 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.

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 SO₄²⁻ 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 per cent w/v solution of ascorbic acid. Heat on a water bath at 50° 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.

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.

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 phénolphaléine 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. 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. 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).

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 per cent.

9. Saveur et odeur

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

10. Eléments 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

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.

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 per cent 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 a_0), 30.00 ml buffer stock solution and 20.00 ml water (solution b_0) and 15.00 ml buffer stock solution and 85.00 ml water (solution c_0).

To each of three centrifuge tubes (1, 2 and 3) 1.40 ml eluate are added. To tube 1 is added 0.10 ml a_0 , to tube 2 0.10 ml b_0 , and tube 3 0.10 ml c_0 , 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 ($\pm 1^\circ$) for 40 minutes. Then three solutions containing 3.00 ml a_0 and 12.00 ml water

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 méthodes

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 a_0), 30 ml de la solution-mère et 20 ml d'eau (solution b_0) et 15 ml de la solution-mère et 85 ml d'eau (solution c_0).

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 a_0 ; dans le tube 2, 0,10 ml de solution b_0 et dans le tube 3, 0,10 ml de solution c_0 ; 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 un bain-marie à 30°C

(solution a_1), 4.00 ml b_0 and 11.00 ml water (solution b_1), and 4.75 ml b_0 and 10.25 ml water (solution c_1) are prepared.

To the first tube is added 1.50 ml of a_1 , to the second 1.50 ml of b_1 and to the third 1.50 ml of c_1 . 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 solution 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 1000.0 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.

($\pm 1^\circ$) pendant 40 minutes. Puis on prépare trois solutions contenant 3,00 ml de a_0 et 12,00 ml d'eau (solution a_1); 4,00 ml de b_0 et 11,00 ml d'eau (solution b_1) et 4,75 ml de b_0 et 10,25 ml d'eau (solution c_1).

Dans le tube 1, on met 1,50 ml de a_1 , dans le tube 2, 1,50 ml de b_1 et dans le tube 3, 1,50 ml de c_1 . 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 $4^\circ - 6^\circ$, 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 Cr 51. Blood 10 : 429 - 40, 1955.
 5. Cr⁵¹ - I¹²⁵ 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.
-

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 Cr 51. Blood 10 : 429-40, 1955.
 5. Cr⁵¹ - I¹²⁵ 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.
-

De Overeenkomst is in overeenstemming met artikel 7 nog ondertekend voor:

Zwitserland ¹⁾	15 april 1964
Denemarken ²⁾	30 september 1964
Malta ¹⁾	2 mei 1966

- 1) De ondertekening geschiedde onder voorbehoud van bekrachtiging.
- 2) De ondertekening was vergezeld van de volgende verklaring: "In connexion with the supply of whole blood, Denmark will be unable to certify that the provisions of Part II (1), whole Human Blood, of the Protocol to the Agreement, concerning haemoglobin content and the sealing of the containers, will be observed, or that the provisions of Part II (3), Human Albumin, and Part II (4), Human Gamma Globulin, of the said Protocol, prohibiting the addition of antiseptic or bacteriostatic substances, will be observed if this prohibition applies also to the final sealing of human albumin and human gamma globulin in ampoules."

C. VERTALING

Zie *Trb.* 1959, 118.

De vertaling in het Nederlands van de bij het Proces-verbaal van 12 mei 1967 tot stand gekomen aanvullingen op het Protocol behorend bij de Overeenkomst luidt als volgt:

1. Aan Deel I van het Protocol (Algemene voorschriften) wordt een lid „D” toegevoegd, dat als volgt luidt:

„D. Afwezigheid van toxiciteit bij plastic bloedtransfusie-apparaatuur.

De apparatuur dient in overeenstemming te zijn met de bepalingen van Bijlage 7 bij dit Protocol.”

2. Aan de tekst van de bij dit Protocol behorende Bijlagen worden de volgende bepalingen toegevoegd:

BIJLAGE 7 BIJ HET PROTOCOL RAAD VAN EUROPA

*Europese Overeenkomst betreffende de uitwisseling van
geneesmiddelen van menselijke oorsprong*

Afwezigheid van toxiciteit bij plastic bloedtransfusie-apparaatuur

I. Chemische proeven

Het te beproeven materiaal dient afkomstig te zijn uit gesteriliseerde apparatuur, d.w.z. in de staat waarin deze wordt gebruikt voor transfusie.

De vervaardiger van transfusie-apparaatuur is gehouden de bevoegde gezondheidsautoriteiten tot in bijzonderheden mededeling te doen van

de samenstelling van het plastic materiaal en van iedere andere stof die bij de vervaardiging van de apparatuur wordt gebruikt, alsmede de oorsprong aan te duiden van de bestanddelen van het materiaal en de wijze waarop zij zijn vervaardigd (of de referentienummers van de bestanddelen), tot in bijzonderheden de wijze aan te geven waarop de apparatuur is vervaardigd, de aard van alle toegevoegde stoffen en gebruikte kleefmiddelen en de wijze van sterilisatie te vermelden. In bovenstaande gegevens mogen geen wijzigingen worden aangebracht zonder voorafgaande mededeling aan en goedkeuring door de bevoegde gezondheidsautoriteit.

Elke partij grondstof die wordt gebruikt bij de vervaardiging van de apparatuur wordt aangeduid met een nummer (batch-nummer) dat door de vervaardiger van de apparatuur wordt geregistreerd tezamen met de identificatienummers van alle partijen („batches”) transfusieapparatuur die uit deze grondstof wordt vervaardigd en de resultaten van alle proeven waaraan deze partijen zijn onderworpen.

In ieder stadium van vervaardiging dienen alle mogelijke voorzorgsmaatregelen te worden genomen om het risico van toevallige besmetting te verminderen.

A. Bereiding van eluaat en controlevloeistof

(a) Voor een volledige proef zoals hieronder wordt beschreven is 1250 cm² plastic nodig (totale oppervlakte van de beide zijden van een plastic proefplaat van 625 cm²). Het monster, waarop geen aanduiding of etiket staat, wordt in stukken van maximaal 10 cm² geknipt.

De lengte (L) van de slangen, waarvan de wanddikte niet meer bedraagt dan 1 mm, wordt als volgt berekend:

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

A = totale oppervlakte in cm²

D₁ = inwendige doorsnede in cm

D₂ = uitwendige doorsnede in cm

De slangen dienen over de lengte in stukken van 10 cm te worden geknipt. Voor de elutie wordt 10 ml water per 50 cm² gebruikt.

(b) De stukken plastic folie of slang worden geplaatst in een fles van borosilicaatglas met 250 ml gedestilleerd water uit een goede destillatieapparatuur met glazen condensor en glazen opvangbuizen¹⁾. De hals van de fles wordt afgedekt met een omgekeerd bekerglas en de fles wordt vervolgens 30 minuten lang verhit in verzadigde stoom

¹⁾ Indien de plastic stoffen in aanraking zijn geweest met een antistollingsmiddel, moeten de stukken eerst in eenzelfde fles met koud gedestilleerd water (100 ml) worden geplaatst en enige keren geschud. Dit moet één keer worden herhaald.

van 110° C (in autoclaaf) en daarna snel afgekoeld tot kamertemperatuur. Er behoeft geen rekening te worden gehouden met het eventueel enigszins aan elkaar kleven van de plastic monsters.

Plastic stoffen die geen hoge temperaturen kunnen verdragen, kunnen 72 uur op een temperatuur van 70° worden gehouden, in plaats van in een autoclaaf te worden verhit.

Op overeenkomstige wijze wordt een controlevloeistof bereid zonder de plastic stoffen.

B. Proeven met eluaat

1. Oxydeerbare stoffen

Bij 20 ml eluaat in een Erlenmeyer-kolf van borosilicaatglas voegt men 20 ml 0,01 N kaliumpermanganaatoplossing en 0,1 ml 2 N zwavelzuur en laat het mengsel 3 minuten koken. Men laat de oplossing snel afkoelen en voegt 0,1 g kaliumjodide en 5 druppels stijfseloplossing toe. Vervolgens titreren met 0,01 N natriumthiosulfaatoplossing. Tegelijkertijd voert men een blanco titratie uit. Het verschil in hoeveelheid thiosulfaat dat bij beide titraties wordt gebruikt is niet meer dan 2,00 ml 0,01 N natriumthiosulfaat.

2. Chloride

Het eluaat moet voldoen aan een geëigende grensreactie op chloride, overeenkomend met ten hoogste 400 microgram Cl⁻ per liter.

3. Sulfaat

Het eluaat moet voldoen aan een geëigende grensreactie op sulfaat, overeenkomend met ten hoogste 2,5 mg SO₄²⁻ per liter.

4. Ammoniak

Het eluaat moet voldoen aan een geëigende grensreactie op ammoniak, overeenkomend met ten hoogste 2,0 mg NH₃ per liter.

5. Fosforzuur – Fosfaat

Het eluaat moet voldoen aan een geëigende grensreactie op fosfaat.

Grensreactie op fosfaat

Verdamp 25 ml eluaat in een Kjeldahl-kolf tot bijna droog, laat de rest afkoelen en voeg 2 druppels zwavelzuur en 1 ml salpeterzuur toe; verhit het mengsel totdat een witte damp wordt ontwikkeld en laat vervolgens afkoelen. Voeg een druppel perchloorzuur toe en verwarm het mengsel matig gedurende een half uur. Laat de rest afkoelen en voeg water tot 25 ml toe. Giet vervolgens 10 ml van de oplossing over in een titreerkolfje van 25 ml en voeg toe 8 ml van een ammoniummolybdaatzwavelzuuroplossing, alsmede 2 ml van een versbereide

10% (gew./vol.) ascorbinezuur-oplossing. Houdt de oplossing gedurende 30 minuten met behulp van een waterbad op een temperatuur van 50° C. Koel vervolgens af en verdun het mengsel tot 25 ml. De groene of blauwe kleur van de oplossing is niet donkerder dan die welke wordt verkregen wanneer 25 ml van de controlevloeistof op dezelfde wijze wordt behandeld.

6. Zuurgraad

10 ml eluaat mag niet rood kleuren na toevoegen van 2 druppels phenolphthaleïne-oplossing, terwijl na niet meer dan 0,4 ml 0,01 N natriumhydroxyde een rode kleur moet ontstaan. Na toevoegen van 0,8 ml 0,01 N zoutzuur ontstaat met 5 druppels van een methylrood-oplossing een rode of oranje-rode kleur.

7. Verdampingsrest

Verdamp 100 ml eluaat op een waterbad en droog bij een temperatuur van 105° C tot constant gewicht. De rest mag niet meer dan 5,0 mg bedragen.

8. Helderheid en kleur

Vergeleken met de controlevloeistof is het eluaat bij een doorzichtlengte van 5 cm helder en kleurloos.

9. Smaak en geur

In vergelijking met de controlevloeistof is het eluaat reukloos en smaakloos.

10. Bijzondere elementen

Bij een spectraalanalyse mogen in het eluaat geen sporen aanwezig zijn van arsenicum, cadmium, chroom, koper, lood, silicium, zilver of tin.

C. Proeven op plastic stoffen

11. Asrest

Na verassen van 1,0 g van het plastic materiaal tot constant gewicht mag de rest niet meer bedragen dan 1 mg.

12. Zware metalen

Los de asrest op in de kleinst mogelijke hoeveelheid 2 N zoutzuur, indien nodig onder verwarming. Voer een geëigende grensreactie uit op zware metalen. Het plastic materiaal moet voldoen aan een grens overeenkomend met maximaal 5 microgram, berekend als Pb.

II. Biologische proeven

- (1) Een onderzoek op giftigheid wordt uitgevoerd met de eluaten A en B (zie noot hieronder) volgens de in de nationale farmacopee voorgeschreven procedure of volgens een methode die is goedgekeurd door de nationale toezicht houdende autoriteit.
- (2) Controle op de afwezigheid van pyrogenen wordt verricht met de eluaten A en C (zie noot hieronder) volgens de in de nationale farmacopee voorgeschreven procedure of volgens een methode die is goedgekeurd door de nationale toezicht houdende autoriteit.
- (3) Een test ter bepaling van haemolytische effecten in gebufferde systemen wordt verricht met het eluaat zoals in paragraaf I. A hierboven is aangegeven. (Voor methode en aanvaardbare limieten, zie het aanhangsel van deze bijlage.)
- (4) Een test ter bepaling van de overlevingsduur in vivo van erythrocyten geschiedt bij de eerste toepassing van een kunststof voor de vervaardiging van ampullen voor het bewaren van bloed. Indien een wijziging wordt aangebracht in de overeengekomen samenstelling, wordt de proef herhaald. (Voor voorgestelde methoden en aanvaardbare limieten, zie het aanhangsel van deze bijlage.)

Noot

Eluaat A: Aan het in I. A hierboven beschreven eluaat pyrogeenvrij natriumchloride toevoegen tot men een concentratie van 0,9 procent verkrijgt.

Eluaat B: Vul een transfusieapparaat zo goed mogelijk met een steriele natriumchloride-oplossing, maak de uiteinden zorgvuldig dicht en leg het gevulde apparaat een uur in water waarvan de temperatuur op 85° C wordt gehouden. Verzamel vervolgens de inhoud van het apparaat.

Eluaat C: Voer 40 ml van een steriele pyrogeenvrije natriumchloride-oplossing, op kamertemperatuur, door tenminste tien transfusieapparaten met een snelheid van ± 10 ml per minuut en vang het filtraat op. Onderzoek de aldus verkregen oplossing.

AANHANGSEL

Biologische analyse: limieten en methoden

A. Onderzoek op giftigheid

(Zie II, 1 van bijlage hierboven): limiet als voorgeschreven in de nationale farmacopee.

B. Controle op de afwezigheid van pyrogenen

(Zie II, 2 van bijlage hierboven): limiet als voorgeschreven in de nationale farmacopee.

C. Test ter bepaling van hemolytische effecten in gebufferde systemen

(Zie II, 3 van bijlage hierboven):

(a) Limiet:

Een 0,50 % natriumchloride-oplossing mag geen hemolyse-waarde opleveren die hoger is dan 10 %, en de hemolyse-waarde van een 0,40 % natriumchloride-oplossing mag niet meer dan 10 % verschillen van de waarde, verkregen bij de overeenkomstige controle-vloeistof.

(b) Methode:

Uitgaande van de bufferstamoplossing voor hemolyse bereidt men drie oplossingen: 30 ml bufferstamoplossing en 10 ml water (oplossing a_0), 30 ml bufferstamoplossing en 20 ml water (oplossing b_0) en 15 ml bufferstamoplossing en 85 ml water (oplossing c_0).

In drie centrifugebuisen (1, 2 en 3) doet men 1,40 ml eluaat. Aan buisje 1 voegt men 0,10 ml a_0 toe; aan buisje 2, 0,10 ml b_0 en aan buisje 3, 0,10 ml c_0 ; men verkrijgt zodoende zoutoplossingen overeenkomend met 0,50 % (buisje 1), 0,40 % (buisje 2) en 0,10 % (buisje 3) natriumchloride wat de osmotische electrolytwerking betreft. Aan ieder buisje wordt 0,020 ml vers, goed gemengd menselijk heparine-bloed toegevoegd. De buisjes worden 40 minuten in een waterbad van 30° C ($\pm 1^\circ$) geplaatst. Vervolgens bereidt men drie oplossingen bevattende 3,00 ml a_0 en 12,00 ml water (oplossing a_1), 4,00 ml b_0 en 11,00 ml water (oplossing b_1) en 4,75 ml b_0 en 10,25 ml water (oplossing c_1).

Aan buisje 1 wordt 1,50 ml a_1 toegevoegd, aan buisje 2, 1,50 ml b_1 en aan buisje 3, 1,50 ml c_1 . De buisjes worden vervolgens 5 minuten gecentrifugeerd in een horizontale centrifuge. Daarop worden voor elk van de concentraties controle-oplossingen bereid waarin het eluaat is vervangen door water.

De extinctie bij 540 nm van de vloeistoflaag wordt gemeten. De bufferstamoplossing voor de hemolyse wordt gebruikt als blanco. De hemolyse-waarde in % wordt berekend aan de hand van de volgende formule:

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

waarin $E_{100\%}$ = de extinctie voor een 0,10 % natriumchloride-oplossing, en

E_{exp} = de extinctie voor onderscheidenlijk 0,40 en 0,50 % natriumchloride-oplossingen.

Bufferstamoplossing voor het meten van het hemolyse-gehalte

90,0 g natriumchloride; 13,7 g dinatriumfosfaat en 1,90 g mononatriumfosfaat worden opgelost in 1.000 ml water.

D. Test ter bepaling van de overlevingsduur in vivo van erythrocyten

(Zie II, 4 van bijlage hierboven):

(a) *Limiet:*

70 % van de erythrocyten uit vol menselijk bloed, opgevangen in een citraat-glucose antistollingsmiddel en gedurende 21 dagen bewaard bij 4° tot 6° C, moet 24 uur na transfusie nog in leven zijn. Dit kan worden bepaald aan de hand van een van de hieronder onder (b) voorgestelde methodes.

(b) *Voorgestelde methodes:*

1. Methode van 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 Cr 51.
Blood 10 : 429-40, 1955.
 5. Cr⁵¹ - I¹²⁵ 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.
-

D. GOEDKEURING

Zie *Trb.* 1961, 98.

E. BEKRACHTIGING

Behalve de in *Trb.* 1961, 98 genoemde hebben nog de volgende Staten in overeenstemming met artikel 7 een akte van bekrachtiging bij de Secretaris-Generaal van de Raad van Europa nedergelegd:

de Bondsrepubliek Duitsland ¹⁾	18 februari 1963
het Verenigd Koninkrijk van Groot-Britannië en Noord-Ierland	8 december 1964
Zwitserland	29 november 1965
Turkije	3 juni 1966
Malta	12 december 1966

¹⁾ De Duitse Bondsregering heeft op 31 mei 1963 het volgende verklaard:

„L'Accord du 15 décembre 1958 relatif à l'échange de substances thérapeutiques d'origine humaine s'applique également au Land Berlin avec effet au 1er mars 1963, date à laquelle ledit Accord est entré en vigueur pour la République Fédérale d'Allemagne.”

G. INWERKINGTREDING

Zie *Trb.* 1959, 118 en *Trb.* 1961, 98.

De bepalingen van de Overeenkomst zijn voor de in rubrieken B en E genoemde Staten ingevolge artikel 8 in werking getreden op de eerste dag van de maand volgende op de ondertekening zonder voorbehoud van bekrachtiging of de nederlegging van de akte van bekrachtiging.

De in rubriek B hierboven afgedrukte aanvullingen van het bij de Overeenkomst behorende Protocol gelden van 12 mei 1967 af.

J. GEGEVENS

Zie *Trb.* 1959, 118 en *Trb.* 1961, 98.

In overeenstemming met artikel 102 van het Handvest der Verenigde Naties is de onderhavige Overeenkomst op 29 februari 1960 geregistreerd bij het Secretariaat der Verenigde Naties onder nr. 5022. De tekst van de Overeenkomst is afgedrukt in het „Recueil des Traités” der Verenigde Naties, deel 351, blz. 159 e.v.

Voor het op 5 mei 1949 te Londen ondertekende Statuut van de Raad van Europa zie ook, laatstelijk, *Trb.* 1965, 185.

Op 14 mei 1962 is te Straatsburg tot stand gekomen de Europese Overeenkomst betreffende de uitwisseling van testsera voor bloedgroepenonderzoek. De tekst van deze Overeenkomst is geplaatst in *Trb.* 1965, 4. Zie ook, laatstelijk, *Trb.* 1967, 141.

Uitgegeven de *tweede* oktober 1967.

De Minister van Buitenlandse Zaken a.i.,
WITTEVEEN.