

***In vitro* kwaliteit van LyoPlas (gevriesdroogd plasma) vergeleken met Quarantaine Plasma (Fresh Frozen Plasma)**

**Stéphanie Groot, Pieter van der Meer,
Johan Lagerberg, Dirk de Korte**

Sanquin Bloedbank, Afdeling Product- en Procesontwikkeling
s.groot@sanquin.nl

Disclosure

- Geen “disclosures”

Beoogd gebruik

- Ziekenhuizen zoeken naar alternatieven voor bevroren plasma
 - Ontdooitijd
 - Korte bewaartijd na ontdooien
 - Logistiek buiten ziekenhuis
- Met name trauma afdelingen willen ready-for-use product, dat ook zonder al teveel voorzorgen in ambulance/trauma helikopter mee kan

Op verzoek van trauma afdelingen van ziekenhuizen onderzoekt Sanquin of in Nederland gevriesdroogd plasma beschikbaar kan worden gesteld.

LyoPlas, Duitsland



Inleiding

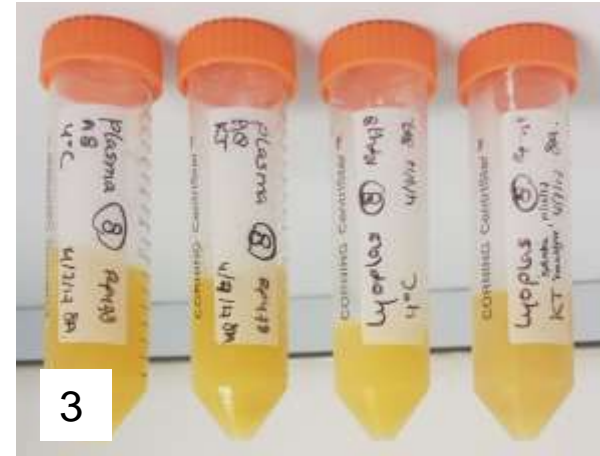
- LyoPlas is een product dat door het Duitse Rode Kruis (DRK) wordt gemaakt en verkregen uit 1 donatie (single-donor Q-plasma).
- Het voordeel van LyoPlas is dat het gevriesdroogd plasma 15 maanden bij +2°C - +25°C kan worden bewaard en snel (2-5 min volgens bijsluiter) op te lossen is met 200 ml water.
- Ontdooien van Fresh Frozen Plasma (FFP) duurt langer en tevens moet het bevroren opgeslagen en vervoerd worden.

Het doel was om ervaring op te doen met LyoPlas en om de stabiliteit van de stollingsfactoren onder verschillende condities na resuspensie te bepalen.

Materiaal en Methode

- Er werden 10 LyoPlas flessen opgelost/geresuspendeerd en gesplitst over 50 ml buizen en bewaard bij 2-6°C of kamertemperatuur.
- Als controle werden 10 FFPs ontdooid, (in een waterbad bij 37°C gedurende 14 minuten) en op dezelfde wijze bewaard.
- Stollingsfactoren en stollingstesten werden uitgevoerd op verschillende momenten:
 - na oplossen/ontdooien,
 - na 24 uur kamertemperatuur (KT: 18-25°C)
 - na 6 dagen (144 uur) bij 2-6°C.
- Tevens werd er een deeltjestelling uitgevoerd vanwege eerder, met microscopie, waargenomen naaldachtige structuren in LyoPlas. (kom ik later op terug)

LyoPlas



Figuur 1 t/m 3 : LyoPlas fles voor toevoeging van water (1), na resuspensie in zak (2) en uitgevuld over 50 ml buizen (3).

Resultaten: celtelling (deeltjes)

- De resuspensie van LyoPlas was compleet in 5-8 min, iets langer dan vermeld.
- In LyoPlas werden deeltjes in het trombocyten- en leukocytenkanaal gedetecteerd. Het FFP was vrij van deeltjes.

	LyoPlas n= 10 gem ± sd	Plasma (FFP) n= 10 gem ± sd	Richtlijn voor plasma
PLT, x10⁹/L			< 50 x 10 ⁹ /L
KT t=0	57 ± 23*	3 ± 3	
WBC, x10⁶/L			< 5,0 x 10 ⁶ /eenheid# # < 1,0 x 10 ⁶ /eenheid bij 90%
KT t=0	2,0 ± 0,6*	0,0 ± 0,0	
RBC, x10¹²/L			< 3,0 x 10 ⁸ /L
KT t=0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	

* p<0,05

Resultaten: Stollingstesten

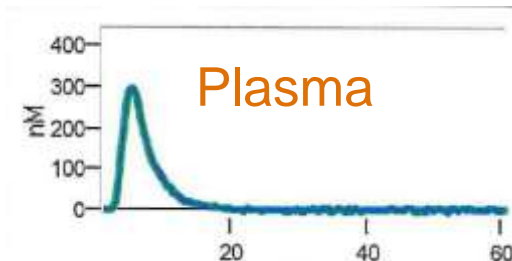
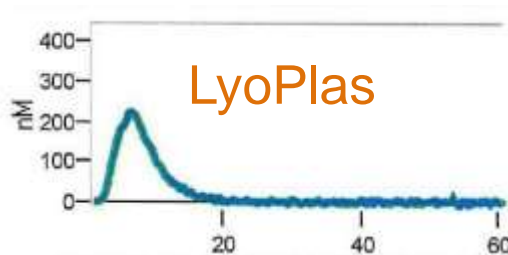
Test n=10	LyoPlas			FFP		
	t=0 uur vers	t=24 uur KT toe- of afname %	t=144 uur 4°C toe- of afname %	t=0 uur vers	t=24 uur KT toe- of afname %	t=144 uur 4°C toe- of afname %
PT (sec)	11,7*	+ 4%	+ 10%	10,9	+ 1%	+ 8%
APTT (sec)	30,9*	+ 3%	+ 8%	28,1	+ 1%	+ 6%
FV (IE/ml)	0,78	- 7%	- 21%	0,78	- 4%	- 14%
FVII (IE/ml)	0,83	- 3%	- 27%	1,07	- 4%	- 26%
FVIII (IE/ml)	0,75	- 17%	- 33%	0,87	- 14%	- 31%

- De PT (sec) en de APTT (sec) van LyoPlas waren iets langer dan van FFP. Door de geringe variatie waren de verschillen wel significant ($p < 0,05$). Tijdens bewaren namen PT en APTT waarden iets toe, maar bleven binnen de normaalwaarden voor beide producten. Kleine vergelijkbare stijging.
- De FV, FVII en FVIII (IE/ml) waarden waren vergelijkbaar voor LyoPlas en FFP en namen gedurende bewaren in beide producten vergelijkbaar af, vooral bij bewaren bij 4°C.

Resultaten: Stollingstesten

Test n=10	LyoPlas			FFP		
	t=0 uur vers	t=24 uur KT toe- of afname %	t=144 uur 4°C toe- of afname %	t=0 uur vers	t=24 uur KT toe- of afname %	t=144 uur 4°C toe- of afname %
vWF (IE/ml)	0,84*	- 1%	- 5%	1,21	- 1%	- 8%
TGA (min)	2,7	+ 9%	+ 19%	2,5	+ 10%	+ 22%
AUC (nM*min)	1630	- 6%	+ 2%	1661	- 5%	+ 8%

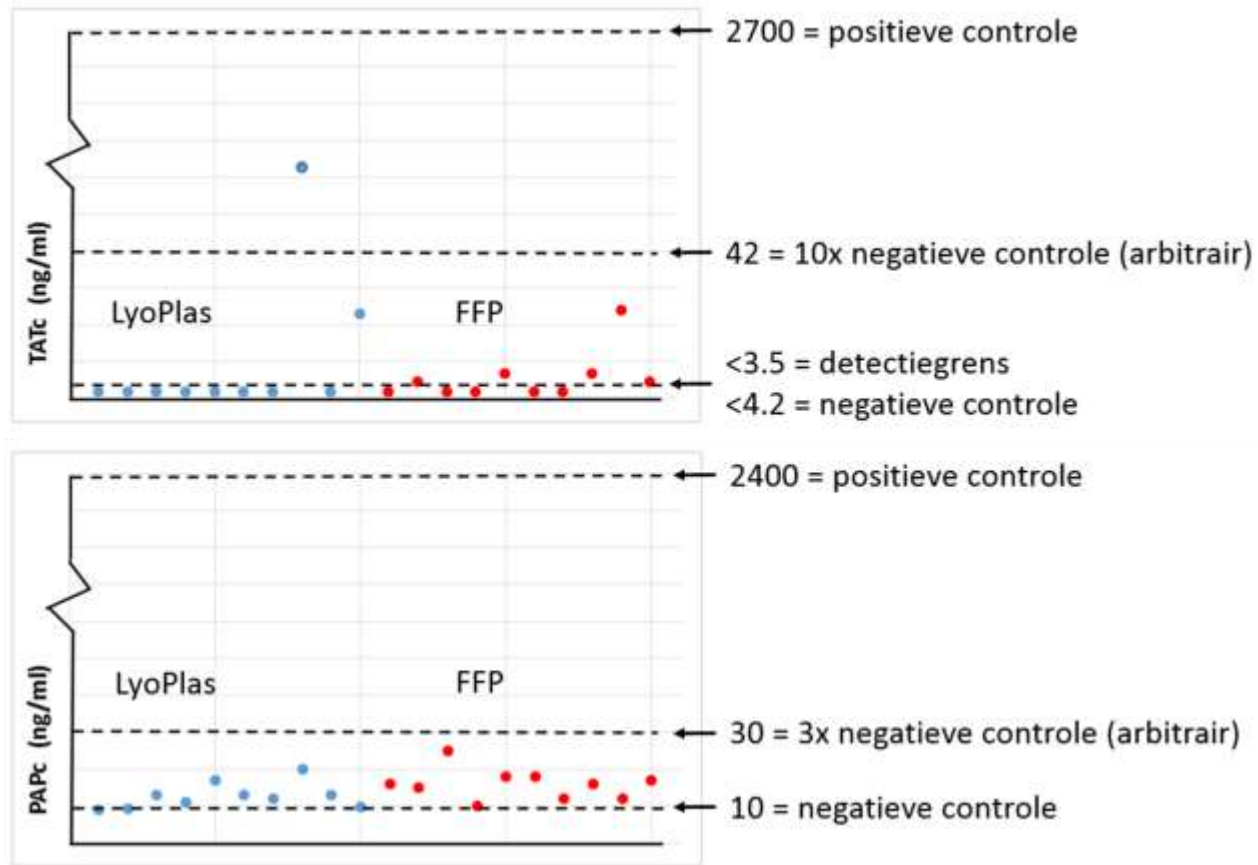
- De vWF (IE/ml) waarden waren significant ($p < 0,05$) lager in LyoPlas. Gedurende bewaren bij 4°C was een kleine daling te zien bij zowel LyoPlas als FFP monsters.
- De capaciteit van trombinevorming (TGA) met plaatjes-arm-plasma, was ook vergelijkbaar. Tijdens bewaren nam de tijd tot trombinevorming iets toe.
- Ook de Area Under the Curve (TGA test) was voor beide producten vergelijkbaar.



Resultaten: Stollingstesten

De proteïne C, proteïne S (IE/ml), fibrinogeen (g/l) en totaal eiwit (TE) waarden waren vergelijkbaar en gedurende de bewaartijd stabiel (waarden niet getoond).

Resultaten: TATc en PAPc test



- De trombine-anti-trombine complex (TATc, <math><42</math> ng/ml) en plasminogeen-anti-plasminogeen complex (PAPc, <math><30</math> ng/ml) waren in LyoPlas en FFP negatief.

Naaldjes in LyoPlas

Door de Militaire Bloedbank (MBB) is geconstateerd dat de “swirling” die waargenomen wordt in elke LyoPlas, veroorzaakt wordt door naaldachtige structuren. Hierover is met het DRK gecommuniceerd.



Met behulp van fase-contrast microscopie zijn de naaldjes duidelijk zichtbaar; grootte van de naaldjes varieert tussen de 1 en 9 μm , met een scherp puntje aan 1 kant van het kristal.

Conclusie

- LyoPlas is snel te resuspenderen, maar het neemt toch wel wat tijd in beslag voor het visueel vrij is van deeltjes/fliebers
 - 5-8 minuten.
- Voorzichtig resuspenderen, anders schuimvorming.
- In tegenstelling tot FFP, geeft LyoPlas bij de celtelling aan dat er deeltjes aanwezig zijn, dit zijn mogelijk de naaldachtige structuren die gezien worden onder de microscoop. Omdat plasma voor droogvriezen gefiltreerd is over een 0,2 µm filter kunnen dit geen cellen zijn.
- Stollingsfactoren en andere stollingstesten waren over het algemeen voor zowel FFP als LyoPlas redelijk stabiel en vergelijkbaar, alleen vWF was significant lager in LyoPlas. Er is geen activatie van de stolling in LyoPlas.
- Ziekenhuizen bespreken: klinische studie met LyoPlas

Met dank aan:

- PPO
 - Davina Sijbrands
 - Ido Bontekoe
 - Dirk de Korte
- Plasma eiwitten:
 - Marleen Zuurveld
 - Herm-Jan Brinkman
 - Mariëtte Boon-Spijker
- Immunopathologie
 - Gerard van Mierlo
- Stolling
 - Jeannette Rentenaar
- Immunochemie
 - Shirley Janssen