

ROSÂNGELA DE ALBUQUERQUE RIBEIRO

- CRIOPRECIPITADO -

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE CONGELAMENTO DO PLASMA SOBRE A
RECUPERAÇÃO FINAL DO FATOR VIII

TRABALHO APRESENTADO COMO REQUISITO
FINAL AO CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM
HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA.
CONVÊNIO UFC - MEC - BID III

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA - CEARÁ

1986

Este trabalho recebeu, em diversas etapas de sua elaboração, o auxílio de várias pessoas às quais sou profundamente agradecida:

Aos meus queridos mestres, Dr. Murilo Martins e Dra. Helena Pitombeira por suscitarem em mim o espírito científico e pela paciência das muitas correções.

Ao Dr. Luiz Carlos Fontenele e ao Dr. Orlando Rodrigues pelo empenho na aquisição do meu material de trabalho.

Aos colegas do Serviço de Onco-Hematologia do Hospital Infantil Albert Sabin pelo árduo trabalho enquanto eu estava ausente.

Aos que fazem o Projeto de Epidemiologia das Infecções Respiratórias Agudas (Convênio Departamento de Saúde Comunitária da UFC - Departamento de Medicina Geográfica da Universidade de Virgínia) por cederem um "freezer" a -70°C para o congelamento dos plasmas.

Aos funcionários do setor de fracionamento do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará pelo interesse sempre presente em todas as etapas do processamento dos crioprecipitados.

Ao Prof. Roberto Cláudio Frota Bezerra pela assistência durante a análise estatística dos resultados obtidos.

ÍNDICE

	Página
1 - INTRODUÇÃO	2
2 - MATERIAL E MÉTODOS	5
2.1 - Doadores	5
2.2 - Coleta de sangue	5
2.3 - Preparação do crioprecipitado ...	5
2.4 - Medida da atividade do fator VIII	6
2.5 - Testes estatísticos	8
3 - RESULTADOS	9
4 - DISCUSSÃO	12
5 - CONCLUSÃO	15
6 - SUMMARY	16
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17

CRIOPRECIPITADO

Influência da temperatura de congelamento do plasma sobre a recuperação final do fator VIII*

Rosângela de Albuquerque Ribeiro**

RESUMO

Foram dosados os níveis de fator VIII de trinta bolsas de crioprecipitados produzidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE), no período de 16 de dezembro de 1985 a 5 de fevereiro de 1986.

As trinta bolsas foram processadas de maneira semelhante a não ser pela técnica de congelamento dos plasmas.

Os crioprecipitados obtidos dos plasmas congelados a -20°C apresentaram uma média de 58 unidades de fator VIII por bolsa, enquanto que os obtidos dos plasmas congelados a -70°C apresentaram uma melhor recuperação do fator VIII, com uma média de 92 unidades por bolsa.

Sugere-se que a aferição do conteúdo de fator VIII nas bolsas de crioprecipitados produzidos na rotina dos bancos de sangue seja feita, periodicamente, para controle de qualidade e uma terapêutica de reposição dos hemofílicos mais efetiva.

* Trabalho realizado no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará. (HEMOCE).

** Médica hematologista do Hospital Universitário Walter Cantídio - Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará e Hospital Infantil Albert Sabin.

1 - INTRODUÇÃO

O controle dos episódios hemorrágicos na hemofilia A e a prevenção de sangramentos excessivos após procedimentos cirúrgicos depende da restauração do mecanismo hemostático por uma adequada reposição de fator VIII. A terapêutica feita com sangue total ou plasma (23) torna-se impraticável, principalmente nos casos de sangramento grave, dado o risco de sobrecarga circulatória para a manutenção da atividade do fator VIII acima de 10% por mais de dois ou três dias.

Desde a descrição do defeito básico da hemofilia clássica (22) vários métodos de preparação de fator anti-hemofílico humano para uso clínico foram propostos.

A produção de um crioprecipitado de fator VIII sete vezes mais do que o plasma, proposta por Pool et al. (27) revolucionou a conduta clínica da hemofilia A a partir de 1965. O produto final deste procedimento é altamente ativo, específico e pouco dispendioso, passível de ser feito em qualquer banco de sangue com a vantagem de se poder reconstituir o sangue total do qual o crioprecipitado foi preparado. Este concentrado de globulina anti-hemofílica é usado para manter um efetivo controle do sangramento de hemofílicos A sem o risco de hipervolemia (4-13-14-16-28).

O crioprecipitado tem algumas desvantagens. O conteúdo de fator VIII nestes produtos varia consideravelmente, podendo em algumas bolsas ter níveis muito baixos, dificultando assim, uma terapia racional (5-14-16-28-29). Necessita também ser transportado e estocado no estado congelado e

por isso é menos apropriado para o uso a domicílio que os concentrados liofilizados. Outro inconveniente é a possibilidade de ser contaminado por vários antígenos e vírus estando entre estes, o causador da síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), contudo, apesar das inconveniências é o produto de escolha para o tratamento da doença de Von Willebrand, das formas leves de hemofilia A e para a reposição de fibrinogênio (17).

Os concentrados liofilizados apesar de serem de fácil administração e convenientes para o estoque, têm a grande desvantagem do alto custo, a limitada produção, um maior risco de transmissão de hepatite e também a eventual contaminação com o vírus da SIDA.

A inconveniência da variada e frequentemente baixa potência do crioprecipitado deve ser contornada pela produção de concentrados utilizando técnicas que possibilitem uma maior recuperação possível dos níveis plasmáticos iniciais de globulina antihemofílica.

Nos Estados Unidos o Código Federal de Regulamentos (21 CFR 640-36) requer um mínimo de 80 unidades de fator VIII por bolsa de crioprecipitado preparado de um único doador e que uma amostra da produção mensal seja testada para controle de qualidade (1).

Nos países em desenvolvimento, a disponibilidade de concentrados liofilizados, industrializados, de fator VIII, ainda é muito pequena, crescendo assim a necessidade de se produzir crioprecipitados de boa qualidade para um tratamento adequado dos episódios hemorrágicos dos hemofílicos.

O objetivo deste trabalho é fazer uma aferição do conteúdo de fator VIII dos crioprecipitados produzidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE) verificando a influência de diferentes temperaturas de congelamento do plasma sobre a potência final destes componentes sanguíneos.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Doadores

O sangue foi colhido, aleatoriamente, de trinta doadores que compareceram ao Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará, no período de 16 de dezembro de 1985 a 5 de fevereiro de 1986. Todos preencheram os pré-requisitos exigidos pela Legislação Federal do Setor Saúde (8).

2.2 - Coleta de Sangue

Aproximadamente 450ml de sangue foram colhidos, por flebotomia, em bolsas plásticas, simples, da Hemobag Produtos cirúrgicos Ltda contendo 70ml de ACDP (0,327g de ácido cítrico anidro, 2,630g de citrato de sódio desidratado, 0,222g de fosfato de sódio, 2,550g de dextrose monohidratada e água destilada q.s.p. 100ml), usando agulha de calibre 16g. Para assegurar uma adequada homogeneização do sangue com o anticoagulante, as bolsas foram gentilmente agitadas, de maneira intermitente, durante a coleta.

2.3 - Preparação do crioprecipitado

Os crioprecipitados foram preparados por uma modificação parcial do método de Pool e Shannon (27). Vinte e cinco bolsas de sangue total foram centrifugadas imediatamente após a coleta e cinco, por motivos técnicos, permaneceram a 4°C, por 4 horas antes de serem processadas. Os elementos celulares foram separados do plasma em centrífugadora refrigerada DPR-6000 da DAMON/IEC Division, por 15 minutos, a 3 500 r.p.m, a 4°C. O plasma sobrenadante foi passado para uma bolsa plástica de transferência, da Hemobag, com capacidade para 300ml.

O volume plasmático foi determinado pesando-se a bolsa de transferência com seu conteúdo subtraindo-se a seguir, o peso da bolsa vazia. Uma amostra foi colocada em tubo plástico para imediata medida da atividade do fator VIII.

Quinze bolsas foram colocadas em "freezer" a -20°C , como é feito rotineiramente no HEMOCE, congelando dentro de um período de 6 horas. As outras quinze, para efeito de estudo, foram colocadas a -70°C , congelando em uma hora. Esta técnica de congelamento se tornou possível pela concessão de um "freezer" a -70°C do Projeto de Epidemiologia das Infecções Respiratórias Agudas (Convênio Universidade Federal do Ceará-Universidade de Virgínia). Não houve condições técnicas para um congelamento mais rápido.

No mínimo 24 horas após o congelamento, os plasmas foram transferidos para um refrigerador a 4°C onde permaneceram por 18-20 horas até o completo descongelamento sendo logo após, centrifugados a 3.500 r.p.m, por 15 min, a 4°C . O maior volume possível foi passado para outra bolsa de transferência, permanecendo 10 a 15ml de plasma sobrenadante nas bolsas de crioprecipitados. (Fig. 1).

Os crioprecipitados foram imediatamente colocados a -20°C , recongelando dentro de 3 horas. Após 48 horas foi efetuada a medida do conteúdo de fator VIII das bolsas.

2.4 - Medida da atividade do fator VIII

A dosagem de fator VIII, dos plasmas e dos crioprecipitados, foi feita pelo método de Langdell (9) utilizando a determinação de tempo de tromboplastina parcial. O plasma de

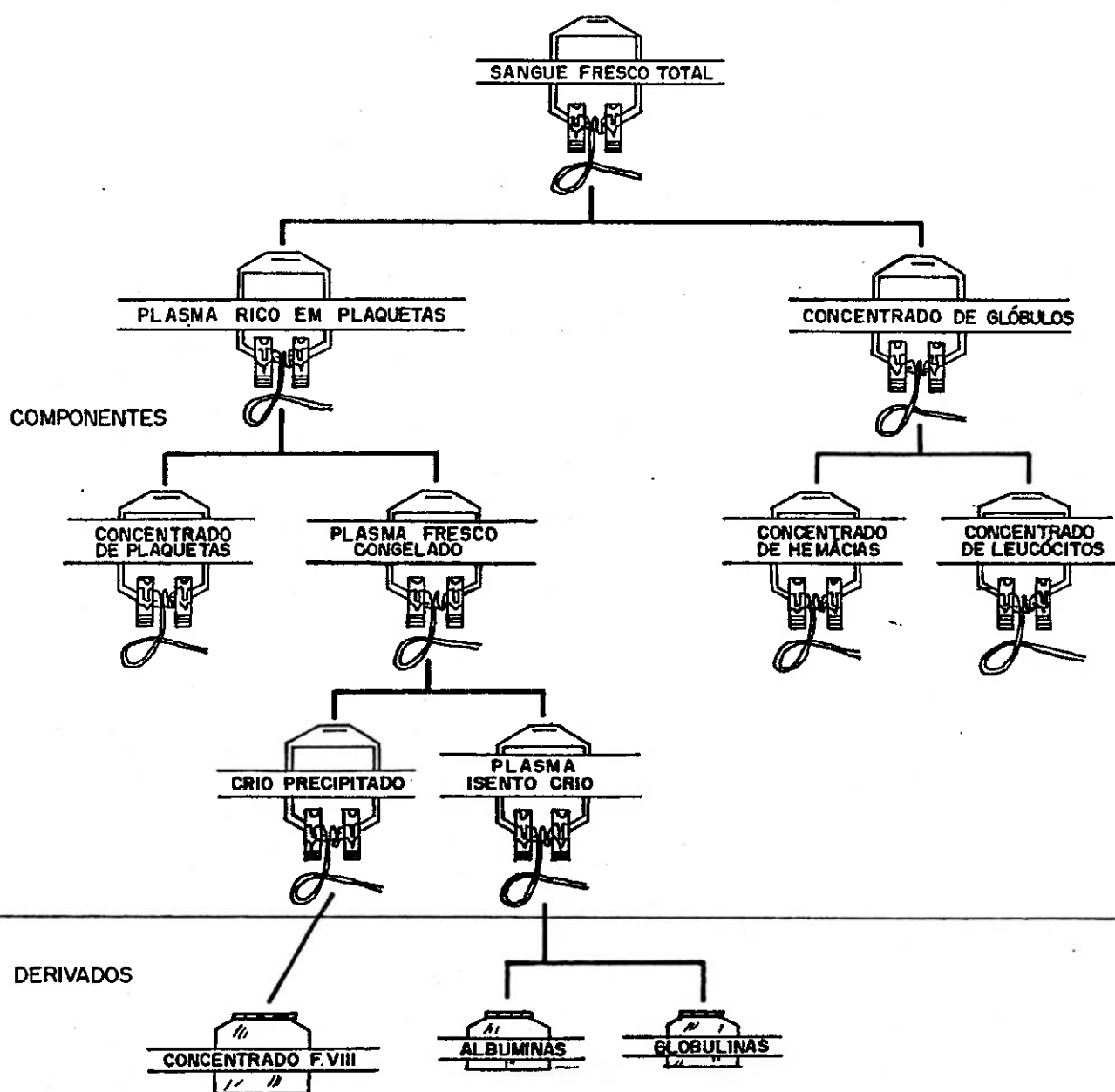


FIGURA I - Obtenção do crioprecipitado a partir de uma unidade de sangue total fresco

hemofílico A severo, usado como substrato, foi preparado no Instituto Santa Catarina Hemoderivados e Reagentes Ltda (lotes 83 e 84) e a cefalina (Cephamat, lote 15061) pelo laboratório da Biolab-Merrieux.

Todas as amostras de plasmas e crioprecipitados foram dosadas em duplicata, em quatro diluições, considerando-se a média dos resultados. Utilizamos como controle uma mistura de plasmas citratados de dez adultos normais cujas alíquotas foram estocadas a -20°C por um período máximo de seis semanas. Consideramos como 100% a atividade do fator VIII do plasma controle. Uma curva-padrão foi construída, diariamente, dosando quatro diluições do plasma-controle. Todas as diluições foram feitas com solução salina a 0,9%. As variações da curva de um dia para outro foram desprezíveis e as linhas de regressão foram calculadas pelo método dos mínimos quadrados.

Antes da dosagem, os crioprecipitados foram rapidamente descongelados em banho-maria a 37°C e diluídos em solução salina a 0,9%, sendo o volume final medido com seringa.

A atividade do fator VIII das amostras de plasmas e crioprecipitados foi determinada graficamente com o auxílio da curva-padrão feita em papel duplo-logarítmico.

O total de globulina anti-hemofílica foi expressa em unidades sendo uma unidade definida como a atividade de fator VIII existente em 1 ml de plasma humano normal (6). O total de unidades e a recuperação de fator VIII no crioprecipitado foram calculadas como se segue (4):

$$\text{Unidades de fator VIII} = \frac{\text{Fator VIII (\%)} \times \text{vol. de plasma (ml)}}{\text{do plasma origem (Up)} \quad 100}$$

$$\text{Unidades de fator VIII} = \frac{\text{Fator VIII (\%)} \times \text{vol. de crioprecipitado (ml)}}{\text{do crioprecipitado (Ve)} \quad 100}$$

$$\text{Recuperação do FVIII no crioprecipitado} = \frac{\text{Ve}}{\text{Up}}$$

2.5 - Testes estatísticos

Os resultados foram comparados pelo teste "t" de Student para duas médias independentes ($n < 30$). Todas as análises foram realizadas ao nível de significância de $\alpha = 0,05$.

3 - RESULTADOS

A análise das trinta bolsas de crioprecipitados mostrou uma diminuição "in vitro", do fator VIII, no grupo cujas plasmas de origem foram congelados a -20°C (Tabela 1). A potência destes crioprecipitados variou de 32 a 87 unidades de fator VIII por bolsa, com uma média de 58 unidades. Apenas 13,3% dos concentrados apresentou mais de 80 unidades desta proteína da coagulação.

O grupo dos crioprecipitados de plasmas congelados a -70°C apresentou uma recuperação média dos níveis plasmáticos iniciais de fator VIII significativamente maior. A variação da potência foi de 52 a 136 unidades, com uma média de 92 unidades de fator VIII por bolsa. A distribuição também foi assimétrica com 60% das bolsas apresentando mais de 80 unidades de globulina anti-hemofílica.

Tabela 1 - Recuperação do FVIII no crioprecipitado*

	Temperatura de Congelamento do Plasma	
	-20°C	-70°C
Recuperação de FVIII (%)	$28,7 \pm 9,3$	$43 \pm 13,4$
Unidades de FVIII por bolsa	$58 \pm 17,4$	$92 \pm 25,7$
	N = 15	N = 15

* Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio padrão (D.P.).

Com o objetivo de verificar se os níveis circulantes de fator VIII nos plasmas dos doadores influenciaram de maneira importante o conteúdo final de fator VIII dos crioprecipitados, calculamos o coeficiente de correlação entre estas duas variáveis e não encontramos uma associação significativamente positiva entre elas ($r = 0,43$ para o grupo cujos plasmas foram congelados a -20°C e $r = 0,3$ para o grupo cuja temperatura de congelamento foi -70°C) (Tabelas 2 e 3).

Não houve diferença significativa entre as médias dos níveis de fator VIII nos plasmas dos doadores de ambos os grupos de crioprecipitados.

Tabela 2 - Níveis de FVIII nos crioprecipitados e nos plasmas-origem congelados a -20°C .

Nº da doação	FVIII no plasma (%)	FVIII no crioprecipitado (%)
692136	103,56	140,60
192917	94,25	114,65
192097	62,50	88,00
199003	121,68	136,80
198871	102,80	126,60
212784	135,60	141,25
212008	91,75	90,25
675829	93,25	117,75
212272	86,60	78,75
688810	106,00	139,25
695039	90,00	178,75
676054	71,75	143,75
689460	144,00	244,00
212307	123,25	199,75
674092	61,75	144,00
média $\pm$ DP	97,05 $\pm$ 21,6	138,94 $\pm$ 43,2

Tabela 3 - Níveis de FVIII nos crioprecipitados e nos plasmas-origem congelados a -70°C .

Nº da doação	FVIII no plasma (%)	FVIII no crioprecipitado (%)
694015	127,50	306,00
192834	95,40	165,00
191581	91,10	154,10
192879	77,50	144,25
191225	131,25	276,25
674488	80,00	263,75
675933	83,00	296,50
676118	107,75	303,75
673792	83,35	348,00
696060	85,00	206,75
673716	80,75	170,37
674508	95,50	242,87
696251	110,87	290,25
676472	110,37	244,00
673117	126,50	209,25
média $\pm$ DP	99,05 $\pm$ 18,7	241,4 $\pm$ 63,6

4 - DISCUSSÃO

Desde as publicações originais de Pool et al. (25-26-27) sobre a produção do crioprecipitado, baseadas em suas próprias observações anteriores (26), vários trabalhos têm surgido propondo modificações na técnica original para garantir um nível mais alto de fator VIII neste concentrado (9-18-20-24 - 31-32).

A potência do crioprecipitado é afetada parcialmente pela técnica de processamento e parcialmente pelos níveis de fator VIII do doador (11-15).

Os níveis plasmáticos normais de fator VIII variam de 50 a 200 por cento e bolsas contendo 250ml de plasma podem ter de 125 a 500 unidades de fator VIII. Se a recuperação da globulina anti-hemofílica plasmática no crioprecipitado fosse consistentemente em torno de 50%, poderíamos esperar uma variação de 62 a 250 unidades de fator VIII neste concentrado, no entanto, este conteúdo sofre também a influência da crioprecipitabilidade do fator antihemofílico A do doador e de falhas técnicas (11). Estes fatos podem reduzir a recuperação do fator VIII no crioprecipitado para menos de 20% o que explicaria a falta de correlação significativa observada neste trabalho, entre os níveis plasmáticos iniciais de fator VIII e o seu conteúdo nos crioprecipitados.

Todas as etapas da produção do crioprecipitado têm influência direta sobre a recuperação final da globulina anti-hemofílica, contudo, fatores como o intervalo entre a coleta do sangue e o seu processamento, as técnicas de congelamento e descongelamento do plasma e os procedimentos de ressuspensão do crioprecipitado são de importância crítica.

Apesar de Weaver et al. terem obtido crioprecipitados relativamente potentes usando plasmas de sangues estocados a 4°C por 21 dias (33), a maioria dos autores concorda que o crioprecipitado deve ser obtido de sangues processados de 4-6 horas após a coleta (2-10-30), tempo máximo que garante perdas desprezíveis dos níveis iniciais do fator VIII (7-12-21).

O plasma após centrifugação deve ser rapidamente congelado a temperaturas iguais ou inferiores a -70°C. Isto é mais convenientemente feito usando-se nitrogênio líquido, uma mistura de etanol e gelo seco ou congeladores a -85°C. Com estas técnicas, o tempo de congelamento do plasma é menor do que 30 minutos. Tempos prolongados de congelamento do plasma favorecem a uma perda importante dos níveis iniciais de fator VIII, como já foi descrito na literatura (30) e como ficou demonstrado neste trabalho.

A técnica original da produção do crioprecipitado recomenda que o plasma seja descongelado a 4°C num período de 18 a 24 horas em refrigerador, no entanto, publicações posteriores mostraram que tempos de descongelamento inferiores a uma hora podem contribuir para um aumento da recuperação do fator VIII para até 100% dos níveis plasmáticos iniciais. Uma menor perda de globulina antihemofílica durante a etapa de descongelamento do plasma pode ser conseguida imergindo a bolsa em banho-de-água a baixas temperaturas, com ou sem agitação contínua (9-10-20-30-32).

Alguns autores têm demonstrado que a ressuspensão do crioprecipitado, imediatamente antes do uso, tanto com o

plasma sobrenadante retido na bolsa, como com solução salina, mantêm uma recuperação satisfatória do fator VIII (18-24). Outras variáveis que também não nos foi possível estudar como o pH da solução anticoagulante entre 6-8 e 8.0, o uso de grandes bolsas de transferência e o rápido recongelamento do crioprecipitado têm influência positiva sobre o conteúdo final de fator anti-hemofílico A do crioprecipitado (18).

No presente trabalho, apenas com a mudança da temperatura de congelamento dos plasmas, conseguimos um significativo aumento na recuperação final de fator VIII nos crioprecipitados, chegando algumas bolsas a ter 74% dos níveis plasmáticos iniciais com mais de 130 unidades de globulina anti-hemofílica.

Sugerimos que todo centro de hemoterapia deva se aparelhar para a produção de crioprecipitados de alta potência e manter um controle de qualidade pela aferição periódica, tanto "in vitro" como "in vivo", da eficiência desses concentrados de fator VIII. Medidas como estas tornarão mais racional uma terapêutica de reposição.

5 - CONCLUSÃO

Verificamos a influência da temperatura de congelamento dos plasmas sobre o conteúdo de fator VIII nos crioprecipitados obtidos a partir destes plasmas e concluimos que:

- 1) - O grupo de crioprecipitados obtidos dos plasmas congelados a -20°C apresentou um nível médio, muito baixo, de 58 unidades de fator VIII por bolsa;
- 2) - o congelamento dos plasmas a -70°C resultou na produção de crioprecipitados com um nível médio, significativamente, mais elevado de 92 unidades de fator VIII por bolsa;
- 3) - constatamos, portanto, que a temperatura de congelamento dos plasmas é um fator crítico no processamento destes concentrados de globulina anti-hemofílica.

6 - SUMMARY

Assays of factor VIII were carried out on 30 bags of cryoprecipitate produced in the Hematology and Hemotherapy Center of Ceará (HEMOCE) during the period from December 16, 1985 to February 5, 1986. Thirty bags of cryoprecipitate were processed in the same manner except for the method of freezing.

The fifteen bags which were frozen at a temperature of -20°C had a mean of 58 units of factor VIII per bag. The fifteen bags which were frozen at a temperature of -70°C showed higher levels of factor VIII with a mean of 92 units per bag.

It is suggested that assays of the factor VIII content of bags of cryoprecipitate routinely produced in blood banks be carried out periodically for quality control and more effective replacement therapy.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS. Technical Manual, 8th ed. Washington DC, 1981.
- 2 - AVOY, D.R.; ELLISOR, S.S.; NOLAN, R.S.; COX, Jr; FRANCO, J.A.; HARBURY, C.B.; SCRIER, S.L.; POOL, J.G. The effect of delayed refrigeration on red blood cells, platelet concentrates and cryoprecipitable AHF. Transfusion 18 (2); 160-8, 1978.
- 3 - BARROWCLIFFE, T.W. & KIRKWOOD, T.B.L. Standardization of factor VIII. I. Calibration of British standards for factor VIII clotting activity. Br. J. Haematol. 46 (3): 471-81, 1980.
- 4 - BENNETT, E.; DORMANDY, K.M.; CHURCHILL, W.G.L.; COWARD, A. R.; SMITH, M.; CLEGHORN, T.E. Cryoprecipitate and the plastic blood bag system: provision of adequate replacement therapy for routine treatment of haemophilia. Br. Med. J. 2: 88-91, 1967.
- 5 - BIGGS, R.; RIZZA, C.R.C.; BLACKBURN, E.K.; CLEGHORN, T. E.; CUMMING, R.; DELAMORE, I.W.; DORMANDY, K.M.; DOUGLAS, A. S.; GRANT, J.; HARDISTY, R.M.; INGRAM, G.I.C.; KERWICK, R.A.; MAYCOCK, W. d'A; WALLACE, J. Factor VIII concentrates made in the United Kingdom and the treatment of hemophilia based on studies made during 1969-72. Report of the medical Research Council's Blood Transfusion Research Committee working party on the cryoprecipitate method of preparing AHF concentrates. Br. J. Haematol. 27 (3): 391-405, 1974.

- 6 - BIGGS, R.; RUSH, B.M.; MACFARLANE, R.G.; MATTHEWS, J.M.; JOHNSTONE, F.C.; HAYTON-WILLIAMS, D.S. Further experience in use of human antihaemophilic extraction globulin (H.A.H.G.) for the control of bleeding after dental extraction in haemophilic patients. A report of the Medical Research Council's working party on human antihaemophilic globulin. Lancet, 1: 969-74, 1965.
- 7 - BOWIE, E.J.W.; THOMPSON, J.H. & OWEN, C.A. The stability of antihemophilic globulin and labile factor in human blood. Mayo Clin. Proc. 39: 144-51, 1964.
- 8 - BRASIL. Ministério da Saúde, Consultoria Jurídica. Legislação Federal do Setor Saúde. 2a. ed. Brasília, 1977, v.3 p. 1068-9.
- 9 - BROWN, D.L.; HARDISTRY, R.M.; KOSOY, M.H.; BRACKEN, C. Antihemophilic globulin: preparation by improved cryoprecipitation method and clinical use. Br. Med. J. 2: 79-85, 1967.
- 10 - BURKA, E.R.; HARKER, L.A.; KASPER, C.K.; KEVY, S.J.; NESS, P.M. A protocol of cryoprecipitate production. Transfusion 15 (4): 307-11, 1975.
- 11 - BURKA, E.R.; PUFFER, T.; MARTINEZ, J. The influence of donor characteristics and preparation methods on the potency of human cryoprecipitate. Transfusion 15 (4): 323-8, 1975.
- 12 - CARLEBJÖRK, C.; BLOMBACK, M.; AKERBLÖM, O. Improvement of plasma quality as raw material for factor VIII: C concentrates. Vox Sang. 45: 233-42, 1983.

- 13 - COOKE, J.V.; HOLLAND, P.V.; SHULMAN, N.R. Cryoprecipitate concentrates of factor VIII for surgery in hemophiliacs. Ann. Inter. Med. 68: 39-47, 1968.
- 14 - DALLMAN, P.R. & POOL, J.G. Treatment with factor VIII concentrates. N. Engl. J. Med. 278: 199-202, 1968.
- 15 - GRAYBEAL, F.Q.; MOORESIDE, Jr. D.E.; LANGDELL, R.D. Clotting factor activity in cryoprecipitates and supernatant plasma prepared from blood collected into ACD, ACD-adenine, CPD and CPD-adenine and from plasma collected by plasmapheresis. Transfusion 9. (3): 135-40, 1969.
- 16 - HATTERSLEY, P.G. The treatment of classical hemophilic with cryoprecipitates. Laboratory control with readily available tests. JAMA 198 (3): 243-7, 1966.
- 17 - KASPER, C.K. & DIETRICH, S.L. Comprehensive management of haemophilia. Clin. Haemathol. 14 (2): 489-512, 1985.
- 18 - KASPER, C.K.; MYHRE, B.A.; MC DONALD, J.D.; NAKASAKO, Y.; FEINSTEIN, D.I. Determinants of factor VIII recovery in cryoprecipitate. Transfusion, 15 (4): 312-22, 1975.
- 19 - LANGDELL, R.D.; WAGNER, R.H.; BRINKHOUS, K.M. Effect of antihemophilic factor on one-stage clotting tests. J. Lab. Clin. Med. 41: 637-47, 1953.
- 20 - MASON, E.C. Thaw-siphon technique for production of cryoprecipitate concentrate of factor VIII. Lancet, 2 (8079): 15-27, 1978.
- 21 - NILSSON, J.; HEDNER, J.; NILSSON, I.M.; ROBERTSON, B. Shelf-life of bank blood and stored plasma with special reference to coagulations factors. Transfusion, 23 (5): 377-81, 1983.

- 22 - PATEK, A. J. Jr. & STETSON, R.P. Hemophilia. I. The abnormal coagulation of the blood and its relation to the blood platelets. J. Clin. Invest. 15: 531-42, 1936
- 23 - PAYNE, W.W. & STEEN, R.E. Haemostatic therapy in haemophilia. Br. Med. J. 1: 1150-2, 1929.
- 24 - POOL, J.G. The effect of several variables on cryoprecipitated factor VIII (AHG) concentrates. Transfusion, 7 (3): 165-7, 1967.
- 25 - POOL, J.G.; HERSHGOLD, E.J.; PAPPENHAGEN, A.R. High-potency anti-haemophilic factor concentrate prepared from cryoglobulin precipitate. Nature, 203: 312, 1964.
- 26 - POOL, J.G. & ROBINSON, J. Observations on plasma and transfusion procedures for haemophilic patients using a quantitative assay for anti-haemophilic globulin (AHG). Br. J. Haematol. 5: 24-30, 1959.
- 27 - POOL, J.G. & SHANNON, E. Production of high-potency concentrates of antihemophilic globulin in a closed-bag system. Assay in vitro and in vivo. N. Engl. J. Med. 273 (27): 1443-7, 1965.
- 28 - PRENTICE, C.R.M.; BRECKENRIDGE, R.T.; FORMAN, W.B.; RATNOFF, O.D. Treatment of haemophilia (factor VIII deficiency) with human anti-haemophilic factor prepared by the cryoprecipitate process. Lancet, 1: 457-64, 1967.
- 29 - SHANBERGE, J.N.; GRUAL, M.C.; IKEMORI, R.; INOSHITA, K.; CHALOS, M.K.; ASTER, R.H. A comparison of factor VIII activity in cryoprecipitate prepared from ACD and CPD plasma. Transfusion, 12 (4): 251-8, 1972.

- 30 - SLICHTER, S.J.; COUNTS, R.B.; HENDERSON, R.; HARKER, L.A.
Preparation of cryoprecipitate factor VIII concentrates. Transfusion, 16(6): 616-26, 1976.
- 31 - STRAND, C.L.; BEENE, J.R.; GEIGER, T.; ECKEL, M.O.; KUNKEL, K.; BULL, G. Production of high-potency cryoprecipitate from exercised blood donors and the treatment of haemophilia A with this material. Am. J. Clin. Pathol. 62 (4): 496-501, 1974.
- 32 - VERMEER, C; SOUTE, B-A-M.; ATEES, G.; BRUMMELAVIS. H.G.J.
Contributions to the optimal use of human blood VIII. Increase of the yield of factor VIII in four-donor cryoprecipitate by an improved processing of blood and plasma. Vox. Sang. 30: 1-22, 1976.
- 33 - WEAVER, R.A.; GABRIEL, DON, A.; LANDELL, R.D. Concentrated antihemophilic factor (AHF) from outdated blood. Transfusion, 7 (3): 169-72, 1967.