INSO
21665
1st.Edition
2017

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران
Iranian National Standardization Organization

استاندارد ملی ایران
۲۱۶۶۵
چاپ اول
۱۳۹۵

ارزیابی خصوصیات همولیزکنندگی مواد به‌کار رفته در وسایل پزشکی- روش آزمون

Assessment of hemolytic properties of materials used in medical devices – Test method

ICS: 11.100

سازمان ملی استاندارد ایران

تهران، ضلع جنوب غربی میدان ونک، خیابان ولیعصر، پلاک ۲۵۹۲

صندوق‌پستی: ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵ تهران- ایران

تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و ۸۸۸۸۷۱۰۳

کرج ، شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۱۶۳-۳۱۵۸۵ کرج - ایران

تلفن: ۸- ۳۲۸۰۶۰۳۱ (۰۲۶)

دورنگار: ۳۲۸۰۸۱۱۴ (۰۲۶)

رایانامه: standard@isiri.org.ir

وبگاه: http://www.isiri.gov.ir

Iranian National Standardization Organization (INSO)

No.1294 Valiasr Ave., South western corner of Vanak Sq., Tehran, Iran

P. O. Box: 14155-6139, Tehran, Iran

Tel: + 98 (21) 88879461-5

Fax: + 98 (21) 88887080, 88887103

Standard Square, Karaj, Iran

P.O. Box: 31585-163, Karaj, Iran

Tel: + 98 (26) 32806031-8

Fax: + 98 (26) 32808114

Email: standard@isiri.org.ir

Website: http://www.isiri .gov.ir

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران به موجب بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفهٔ تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه‌های مختلف در کمیسیون‌های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، صاحب‌نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می‌شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانهٔ صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و واردکنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان‌های دولتی و غیردولتی حاصل می‌شود. پیش‌نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی‌نفع و اعضای کمیسیون‌های مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیتهٔ ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می‌شود.

پیش‌نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی‌صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کنند درکمیته ملی طرح، بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔملی استاندارد مربوط که در سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌شود به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد (ISO)[1]،کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی (OIML)[3] است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی (CAC)[5] در کشور فعالیت می‌کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی‌های خاص کشور، از آخرین پیشرفت‌های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود.

سازمان ملی استاندارد ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف‌کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست‌محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری کند. سازمان می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه‌ها و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این‌گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن‌ها اعطا و بر عملکرد آن‌ها نظارت می‌کند. ترویج دستگاه بین‌المللی یکاها، واسنجی وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

1- International Organization for Standardization
2- International Electrotechnical Commission
3- International Organization for Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legals)
4- Contact point
5- Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

«ارزیابی خصوصیات همولیزکنندگی مواد به‌کار رفته در وسایل پزشکی- روش آزمون»

رئیس:	**سمت و/یا محل اشتغال:**
حسینخانی، سامان (دکترای تخصصی بیوشیمی)	عضو هیئت علمی دانشگاه تربیت مدرس- دانشکده علوم زیستی
دبیر:	
عطار، فرنوش (دکترای تخصصی بیوشیمی)	عضو هیئت علمی گروه پژوهشی بیولوژی پژوهشگاه استاندارد
اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
باقری، حامد (دکترای تخصصی مهندسی پلیمر)	عضو هیئت علمی دانشکده فن‌آوری‌های برتر دانشگاه تربیت مدرس
حیدرزاده، مرجان (کارشناسی ارشد میکروبیولوژی)	عضو هیئت علمی گروه پژوهشی بیولوژی پژوهشگاه استاندارد
رزق‌دوست، غلامحسین (کارشناسی ارشد بیولوژی و مدیریت اجرایی)	سرپرست گروه پژوهشی مهندسی پزشکی پژوهشگاه استاندارد
رضایی، وحید (کارشناسی ارشد مهندسی پلیمر)	سرپرست کنترل کیفیت شرکت تجهیزات پزشکی سوپا
زارع‌دار، پرویز (دیپلم اقتصاد)	تکنسین بیولوژی شرکت تجهیزات پزشکی سوپا
زایرزاده، احسان (دکترای تخصصی سم شناسی)	عضو هیئت علمی گروه پژوهشی بیولوژی پژوهشگاه استاندارد
ظهوررحمتی، لاله (کارشناسی ارشد مهندسی پزشکی)	کارشناس مسئول مهندسی پزشکی دفتر نظارت بر اجرای استاندارد صنایع فلزی- سازمان ملی استاندارد ایران
عرفانی‌فر، مرجان (کارشناسی مهندسی فناوری اطلاعات)	کاردان امور استاندارد دفتر نظارت بر اجرای استاندارد صنایع فلزی- سازمان ملی استاندارد ایران

اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	**سمت و/یا محل اشتغال:**
علیپور، محسن (دکترای تخصصی نانوبیوتکنولوژی)	دانشجوی دکترای تخصصی دانشگاه تربیت مدرس
کربلایی، حمید (کارشناسی مکانیک)	کارشناس امور استاندارد دفتر نظارت بر اجرای استاندارد صنایع فلزی- سازمان ملی استاندارد ایران
کریمی سوره، کیومرث (کارشناسی ارشد نظارت بر دارو)	مدیر کنترل کیفیت و آزمایشگاه شرکت تجهیزات پزشکی هلال ایران سها
مظاهری، منصوره (دکترای تخصصی بیوفیزیک)	سرپرست گروه پژوهشی بیولوژی پژوهشگاه استاندارد
معبودی، کورش (کارشناسی ارشد بیوشیمی)	کارشناس ارشد کنترل کیفیت انستیتو پاستور ایران
ویراستار:	
طیب زاده، سید مجتبی (کارشناسی ارشد مهندسی پزشکی)	کارشناس مسئول گروه پژوهشی مهندسی پزشکی پژوهشگاه استاندارد

فهرست مندرجات

عنوان	صفحه
آشنایی با سازمان ملی استاندارد	ب
کمیسیون فنی تدوین استاندارد	ج
پیش‌گفتار	و
مقدمه	ز
۱ هدف و دامنه کاربرد	۱
۲ مراجع الزامی	۱
۳ اصطلاحات و تعاریف	۲
۴ مواد و آماده‌سازی	۶
۴-۱ مواد و/ یا واکنشگرها	۶
۴-۲ آماده‌سازی نمونه‌های مورد آزمون و کنترل	۸
۴-۳ تهیه منحنی استاندارد هموگلوبین	۹
۴-۴ جمع‌آوری و آماده‌سازی خون	۹
۵ روش اجرای آزمون	۱۱
۵-۱ کلیات	۱۱
۵-۲ تعیین هموگلوبین مایع رویی و محاسبه درصد همولیز	۱۲
۶ گزارش آزمون	۱۴
۶-۱ گزارش نهایی	۱۴
۶-۲ تبدیل درصد همولیز در گزارش	۱۵
۶-۳ دقت و گرایش	۱۵
پیوست الف (آگاهی دهنده)- اصول کلی	۱۶
پیوست ب (آگاهی دهنده)- طرز تهیه بافر فسفات نمکی (فاقد کلسیم و منیزیم)	۱۷

پیش‌گفتار

استاندارد «ارزیابی خصوصیات همولیزکنندگی مواد به‌کار رفته در وسایل پزشکی- روش آزمون» که پیش‌نویس آن درکمیسیون‌های مربوط تهیه و تدوین شده است، در ششصد و سی و سومین اجلاسیه کمیتهٔ ملی استاندارد مهندسی پزشکی مورخ ۱۳۹۵/۱۲/۰۲ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

استانداردهای ملی ایران بر اساس استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ (استانداردهای ملی ایران- ساختار و شیوهٔ نگارش) تدوین می‌شوند. برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینهٔ صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در صورت لزوم تجدیدنظر خواهند شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدیدنظر در کمیسیون‌های مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی ایران استفاده کرد.

منبع و مأخذی که برای تهیه و تدوین این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیر است:

ASTM F756:2013, Standard practice for assessment of hemolytic properties of materials.

ارزیابی خصوصیات همولیزکنندگی مواد به‌کار رفته در وسایل پزشکی- روش آزمون

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، ارائه اصول کلی برای ارزیابی خصوصیات همولیزکنندگی مواد به‌کار رفته در ساخت وسایل پزشکی که با خون در تماس هستند، است.

این استاندارد برای موارد زیر کاربرد دارد:

الف- ارزیابی خصوصیات همولیزکنندگی مواد به‌کار رفته در وسایل پزشکی در تماس با خون در شرایط برون‌تنی[1]؛

ب- انجام آزمون همولیز تحت شرایط ایستا[2] با مایع استخراجی[3] از مواد به‌کار رفته در وسایل پزشکی؛

پ- انجام آزمون همولیز تحت شرایط ایستا، بلافاصله پس از تماس مستقیم مواد به‌کار رفته در وسایل پزشکی با خون.

یادآوری- برای ارزیابی همولیز مواد به‌کار رفته در وسایل پزشکی، انجام هر دو آزمون (مایع استخراجی و تماس مستقیم) توصیه می‌شود. در صورتیکه کاربرد یا زمان تماس وسایل پزشکی با خون، حذف یکی از آزمون‌ها را توجیه کند می‌توان فقط یک آزمون را انجام داد.

این استاندارد برای پیش بینی وقایعی که در حین انجام آزمون برای تمامی انواع وسایل کاشتنی اتفاق می‌افتد، کاربرد ندارد. لذا به کاربر هشدار داده می‌شود که به مناسب بودن روش برای نمونه مورد آزمون، کاربرد بالقوه نمونه و توصیه‌های استاندارد ملی شماره ۴-۷۲۱۶ توجه کافی نماید.

۲ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد ملی ایران به آنها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب آن مقررات جزئی از این استاندارد ملی ایران محسوب می‌شود.

در صورتی که به مدرکی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی آن مورد نظر این استاندارد ملی ایران نیست. در مورد مدارکی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه‌های بعدی آنها مورد نظر است.

استفاده از مراجع زیر برای این استاندارد الزامی است:

1- In vitro
2- Static conditions
3- Extract

۲-۱ استاندارد ملی ایران شماره ۱۲۹۶۳، فناوری نانو- تعیین ویژگی‌های همولیتیک نانو ذرات- روش آزمون.

۲-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۴-۷۲۱۶، ارزیابی زیست شناختی وسایل پزشکی- قسمت چهارم- گزینش آزمون‌های بررسی برهم کنش با خون.

۲-۳ استاندارد ملی ایران شماره ۱۲-۷۲۱۶، ارزیابی بیولوژیکی وسایل پزشکی- قسمت ۱۲- آماده‌سازی نمونه و مواد مرجع.

2-4 ASTM E691: 2015, Practice for conducting an interlaboratory study to determine the precision of a test method

۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد اصطلاحات و تعاریف زیر به‌کار می‌رود:

۳-۱

هموگلوبین پلاسما

plasma hemoglobin

مقدار هموگلوبین در پلاسما است.

۳-۲

درصد همولیز

% hemolysis

نسبت غلظت هموگلوبین آزاد در پلاسما (mg/ml) بر غلظت هموگلوبین کل (mg/ml) ضرب در ۱۰۰ است که به صورت درصد بیان می‌شود. درصد همولیز همچنین با شاخص همولیزکنندگی[1] مترادف است.

۳-۳

همولیز مقایسه‌ای

comparative hemolysis

مقدار شاخص همولیزکنندگی که تحت شرایط آزمون یکسان توسط یک نمونه مورد آزمون در مقایسه با همولیز تولید شده توسط یک ماده مرجع استاندارد (مانند: پلی اتیلن) ایجاد می‌شود.

1- Hemolytic index

۴-۳

آزمون تماس مستقیم

direct contact test

انجام آزمون همولیز بر روی نمونه مورد آزمونی است که بلافاصله پس از آماده‌سازی در تماس مستقیم با خون قرار گرفته است.

۵-۳

آزمون مایع استخراجی

extract test

انجام آزمون همولیز بر روی مایع استخراجی ایزوتونیک حاصل از نمونه مورد آزمونی است که در تماس با خون قرار گرفته است.

یادآوری- برای تهیه مایع استخراجی از نمونه مورد آزمون، به استاندارد ملی شماره ۱۲-۷۲۱۶ مراجعه شود.

۶-۳

همولیز

hemolysis

تخریب گلبول‌های قرمز و در نتیجه رهایی هموگلوبین به داخل پلاسما یا بافر فسفات نمکی است.

۷-۳

کنترل منفی

negative control

موادی مانند پلی اتیلن که در طی آزمون، همولیز به میزان کم یا هیچ همولیزی (کمتر از ٪۲ پس از تفریق از شاهد) ایجاد نمی‌کنند.

یادآوری- بهتر است که شکل و ابعاد نمونه کنترل مشابه نمونه مورد آزمون باشد.

۸-۳

کنترل مثبت

positive control

موادی هستند که توانایی تولید شاخص همولیز کنندگی بطور یکنواخت (بیشتر از کنترل منفی) به میزان حداقل ٪ ۵ را دارند.[۱]

۱- مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۱۲۹۶۳، فناوری نانو- تعیین ویژگی‌های همولیتیک نانو ذرات- روش آزمون، به عنوان کنترل مثبت می‌توانید از محلول ۱۰٪ تریتون (Triton-X 100) در آب استفاده کنید.

یادآوری ۱- اگر چه مواد کنترل مثبت برای این استاندارد صحه‌گذاری نشده‌اند، ارزیابی‌های بین آزمایشگاهی[1] نشان داده که لاستیک بونا N[2] و وینیل پلاستیزول[3] قادر به ایجاد همولیز به میزان بیش از ٪ ۹۰ هستند. بطوریکه این مقدار همولیز از مایع استخراجی از این مواد در هنگام قرارگیری در دمای ۱۲۱ °C به مدت ۱ h، حاصل شد. در آزمون تماس مستقیم نیز، لاستیک بونا N، همولیزی برابر با ٪ (۵/۳ ± ۱۴/۵) تولید کرد.

یادآوری ۲- مواد مشخص آزمون شده در طی تدوین این استاندارد از شرکت‌های تولید کننده لاستیک بونا N یا وینیل پلاستیزول در دسترس هست. با این حال، این مواد به عنوان کنترل مثبت تایید نشده‌اند، چراکه نیمه عمر نگهداری آنها به عنوان کنترل مثبت و دقت آنها در استاندارد ASTM E691 مشخص نشده است. از این رو، تمامی مواد در دسترس ممکن است به عنوان کنترل مثبت برای این کاربرد مناسب نباشند. بطورکلی موادی که به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته می‌شوند باید از لحاظ مطابقت مناسب بودن آنها با الزامات کنترل مثبت بررسی شوند.

۹-۳

معرف سیان‌مت هموگلوبین

cyanmethemoglobin reagent

معرفی است که به خون کامل، پلاسما یا سوپرناتانت (محلول رویی) نمونه مورد آزمون اضافه شده و به سرعت بیشتر فرم‌های هموگلوبین را به فرم سیان‌مت هموگلوبین تک[4] تبدیل می‌کند. بدین ترتیب سیان‌مت هموگلوبین با داشتن پیک جذبی در ۵۴۰ nm تعیین مقدار می‌شود. زمان تبدیل هموگلوبین به سیان‌مت هموگلوبین بین ۳ min تا ۵ min می‌باشد.

یادآوری- برای تهیه معرف سیان‌مت هموگلوبین به زیربند ۴-۱-۱ مراجعه شود.

۱۰-۳

بافر فسفات نمکی (فاقد کلسیم و منیزیم)

phosphate buffered saline
PBS

محلولی است که به منظور ثابت نگه داشتن pH استفاده می‌شود. این بافر باید فاقد منیزیم و کلسیم باشد چراکه این مساله برای حفظ خواص ضدانعقادی ترکیبات شلاته کننده[5] مورد استفاده در وسایل جمع‌آوری خون ضروری است. همچنین از بافر فسفات نمکی به‌عنوان پس زمینه[6] و یا "شاهد" در آزمون همولیز نیز استفاده می‌شود.

۱۱-۳

جذب

A^x

1- Round robin evaluations
2- Buna N rubber (Aero Rubber Company; ARC-45010, 0.031 in. thick sheet)
3- Vinyl plastisol (Plasti-Coat; 0.025 to 0.075 in. thick sheet, color: DB1541-medium blue 300)
4- Single cyanmethemoglobin form
5- Chelating agents
6- Background

مقدار جذب محصول واکنش سیان‌مت هموگلوبین در nm ۵۴۰ که در آن منظور از "x" جذب نمونه زیربندهای ۳-۱۳ تا ۳-۱۷ است.

۱۲-۳

شیب

F

شیب منحنی استاندارد هموگلوبین، بر حسب واحد [(mg/ml)/ A] است بطوریکه وقتی در مقدار جذب ضرب شود، غلظت هموگلوبین حاصل می‌گردد.

فرض ضمنی: عرض از مبدا منحنی کالیبراسیون هموگلوبین تقریباً صفر است و اثر آن بر تبدیل مقادیر جذب به مقادیر غلظت ناچیز است.

۱۳-۳

غلظت هموگلوبین آزاد پلاسما

plasma free hemoglobin concentration

PFH

مقدار وزنی هموگلوبین آزاد پلاسما در واحد حجم (ml) است.

۱۴-۳

غلظت

concentration

C

مقدار وزنی غلظت کل هموگلوبین خون در واحد حجم (ml) است.

۱۵-۳

T

غلظت هموگلوبین خون رقیق شده است.

۱۶-۳

شاهد

blank

B

لوله شاهد، لوله آزمایشی است که فقط حاوی محیط ایزوتونیک است و هیچ ماده دیگری به این لوله اضافه نمی‌شود.

۱۷-۳

نمونه

sample

S

منظور از نمونه، نمونه مورد آزمون یا نمونه کنترل مثبت و کنترل منفی می‌باشد.

۴ مواد و آماده‌سازی

۴-۱ مواد و/ یا واکنشگرها

از مواد شیمیایی با درجه خلوص آزمایشگاهی استفاده کنید.

۴-۱-۱ معرف سیان‌مت هموگلوبین

۴-۱-۱-۱ مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
فسفات پتاسیم[a]	۰٫۱۴ g
سیانید پتاسیم[b]	۰٫۰۵ g
فری‌سیانید پتاسیم[c]	۰٫۲ g
تریتون (دترجنت غیر یونی)[d]	۰٫۵ ml تا ۱ ml
آب مقطر[e]	به حجم ۱۰۰۰ ml

[a] Potassium phosphate
[b] Potassium cyanide
[c] Potassium ferricyanide
[d] Triton X-100 (nonionic detergent)
[e] Distilled water

۴-۱-۱-۲ روش تهیه

مقدار ۰٫۱۴ g فسفات پتاسیم، ۰٫۰۵ g سیانید پتاسیم، ۰٫۲ g فری‌سیانید پتاسیم و ۰٫۵ ml تا ۱٫۰ ml دترجنت غیر یونی (تریتون؛ Triton-X 100) را با یکدیگر مخلوط و با آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ ml برسانید. مقدار pH این محلول ۷٫۰ تا ۷٫۴ می‌باشد.

یادآوری ۱- این معرف توسط کمیسیون ملی مطالعات آزمایشگاهی بالینی[1] توصیه شده است و می‌توان آن را از مواد شیمیایی تهیه کرد یا از شرکت‌های عرضه کننده خریداری نمود.

یادآوری ۲- اولین معرف سیان‌مت هموگلوبین برای اندازه‌گیری غلظت هموگلوبین خون، معرف درابکین[2] بود (مخلوط ۱ g بیکربنات سدیم، ۰٫۰۵ g سیانید پتاسیم، ۰٫۲ g پتاسیم فری‌سیانید در حجم ۱٫۰ l آب مقطر). معایب استفاده از معرف

1- National Commission for Clinical Laboratory Studies (NCCLS)
2- Drabkin’s reagent

درابکین در مقایسه با معرف سیان‌مت هموگلوبین شامل زمان تبدیل طولانی‌ترِ ۱۵ دقیقه‌ای و pH برابر با ۸٫۶ است که ممکن است باعث ایجاد کدورت شود. با این حال، معرف درابکین هنوز هم از طریق تامین کننده‌های تجاری در دسترس می‌باشد.

یادآوری ۳- هر دو معرف درابکین و سیان‌مت هموگلوبین برای تعیین غلظت زیاد هموگلوبین که بطور طبیعی در خون کامل دیده می‌شود، بکار می‌روند (به عنوان مثال، ۱۵۰۰۰ mg/dl). همچنین، با تغییر حجم رقیق سازی نمونه و محاسبه تداخل پس زمینه، این معرف‌ها می‌توانند غلظت‌های بسیار کم هموگلوبین پلاسما یا سوپرناتانت را نیز اندازه‌گیری کنند.

۴-۱-۲ بافر فسفات نمکی (فاقد کلسیم و منیزیم)

برای تهیه بافر فسفات نمکی به پیوست ب مراجعه شود.

۴-۱-۳ محلول هموگلوبین استاندارد

برای بدست آوردن منحنی کالیبراسیون غلظت هموگلوبین، با استفاده از روش سیان‌مت هموگلوبین، از ماده استاندارد مرجع کارخانه‌ای قابل دسترس و مواد معرف معتبر استفاده کنید. این مواد از شرکت‌های تشخیصی کلینیکی که مطابق با الزامات کمیته بین المللی استانداردسازی در خون شناسی[1] هستند، قابل تهیه می‌باشد. از دستگاه اسپکتروفتومتر که توانایی خوانش جذب تا حداقل سه رقم اعشار را دارد، نیز باید استفاده شود.

منحنی استاندارد هموگلوبین را از ماده استاندارد مناسب با ۶ سری رقیق سازی در محدوده ۰٫۰۳ mg/ml تا ۰٫۷ mg/ml آماده کنید. معرف رقیق کننده سیان‌مت هموگلوبین به عنوان لوله شاهد (جذب صفر) در اسپکتروفتومتر می‌باشد. جذب را در ۵۴۰ nm اندازه‌گیری کنید. منحنی کالیبراسیون را با استفاده از مقادیر جذب بدست آمده، رسم کنید به صورتی‌که در این منحنی غلظت‌های متفاوت هموگلوبین استاندارد در محور افقی (محور x) و مقادیر جذب بدست آمده در ۵۴۰ nm (A_{540}) در محور عمودی (محور y) می‌باشند. ضریب کالیبراسیون، شیب منحنی (F) است. عرض از مبدا منحنی کالیبراسیون هموگلوبین نیز باید تقریباً صفر باشد.

یادآوری- درصورت وجود محدودیت‌های خاص و یا مشکلاتی که مانع استفاده از معرف سیان‌مت هموگلوبین شوند، روش‌های دیگری ممکن است برای اندازه‌گیری غلظت هموگلوبین کل خون، غلظت هموگلوبین آزاد پلاسما و غلظت هموگلوبین مایع رویی جایگزین روش سیان‌مت هموگلوبین شوند. استفاده از روش جایگزین در صورتی امکان پذیر است که روش، صحه‌گذاری و نشان داده شود که بطور قابل ملاحظه‌ای، معادل روش سیان‌مت هموگلوبین می‌باشد. روش‌هایی که فقط اکسی‌هموگلوبین را تعیین مقدار می‌کنند، ممکن است مناسب نباشند چراکه برخی مواد می‌توانند اکسی هموگلوبین را به فرم‌های دیگر تبدیل کنند یا طیف جذب را تغییر دهند. محققان باید آگاه باشند که نتایج تعیین غلظت هموگلوبین مایع رویی ممکن است بدلیل جذب هموگلوبین توسط مواد مورد آزمون، رسوب هموگلوبین در محلول یا تغییر طیف جذب اسپکتروفتومتری توسط مواد قابل نشت به خطر بیافتد.

1- International Committee for Standardization in Hematology (ICSH)

۴-۲ آماده‌سازی نمونه‌های مورد آزمون و کنترل

نمونه‌ها باید مطابق با استاندارد ملی شماره ۱۲-۷۲۱۶ آماده شوند. آماده‌سازی باید در مجموع بر روی حداقل ۶ نمونه کنترل مثبت، ۶ نمونه کنترل منفی و ۶ نمونه مورد آزمون (۳ نمونه برای آزمون تماس مستقیم و ۳ نمونه برای آزمون مایع استخراجی) انجام شود.

یادآوری ۱- آماده‌سازی نمونه نهایی باید طوری انجام شود که سطح نهایی نمونه با کاربرد پایانی وسیله مطابقت داشته باشد.

یادآوری ۲- نمونه باید با همان روشی که برای سترون‌سازی محصول نهایی بکار می‌رود، سترون شود.

یادآوری ۳- در طول آماده‌سازی نمونه‌ها، باید مراقب بود که نمونه‌ها آلوده نشوند، اما روش آسپتیک[1] ضروری نیست.

۴-۲-۱ آماده‌سازی نمونه در آزمون مایع استخراجی

۴-۲-۱-۱ از هر نمونه مورد آزمون (۳ تکرار)، نمونه کنترل مثبت، نمونه کنترل منفی و نمونه شاهد (بافر فسفات نمکی) مطابق با استاندارد ملی شماره ۱۲-۷۲۱۶ و با رعایت نسبت نمونه به ماده استخراج کننده، مایع استخراجی تهیه کنید (ماده استخراج کننده، بافر فسفات نمکی فاقد منیزیم و کلسیم است). نمونه‌ها باید مطابق با استاندارد ملی شماره ۱۲-۷۲۱۶ آماده شوند.

۴-۲-۱-۲ از بالاترین شرایط دمایی استاندارد ملی شماره ۱۲-۷۲۱۶ که ماده مقاوم به حرارت است، استفاده کنید.

یادآوری- درصورتیکه تهیه مایع استخراجی در دمای ^{o}C ۱۲۱ انجام می‌شود، از لوله‌های بوروسیلیکات باید استفاده شود و به هرگونه تغییر حجمی باید توجه شود. در دماهای کمتر می‌توان از لوله‌های شیشه‌ای یا پلی‌استایرن استفاده کرد.

۴-۲-۱-۳ مقدار ml ۷/۰ از مایع استخراجی حاصل از هر یک از نمونه‌ها را به لوله‌های آزمایش درب‌دار از جنس شیشه بوروسیلیکات یا پلی‌استایرن (یا معادل آنها) با ابعاد mm ۱۲۵ × mm ۱۶ یا mm ۱۵۰ × mm ۱۶ منتقل کنید.

۴-۲-۱-۴ پس از صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر، جذب مایع‌های استخراجی را برای در نظر گرفتن تداخل پس زمینه کنترل کنید چراکه تداخل پس زمینه می‌تواند بر روی محاسبه غلظت هموگلوبین سوپرناتانت تاثیر بگذارد. هرگونه جذب پس زمینه باید ثبت شود و برای تصحیح جذب نمونه آزمون (زیربند ۵-۲) در نظر گرفته شود.

1- Aseptic

۴-۲-۲ آماده‌سازی نمونه در آزمون تماس مستقیم

۴-۲-۲-۱ مهم است توجه داشته باشید در روش آزمون تماس مستقیم، آماده‌سازی نمونه‌های آزمون مطابق با استاندارد ملی شماره ۱۲-۷۲۱۶ است، اما در استاندارد فعلی حجم مایع ۷٫۰ ml در نظر گرفته شده است. بنابراین سه تکرار از هر نمونه مورد آزمون، کنترل منفی و کنترل مثبت مطابق با استاندارد ملی شماره ۱۲-۷۲۱۶ تهیه کنید. از جدول ۱ به عنوان راهنما استفاده کنید.

جدول ۱- جدول راهنمای آماده‌سازی نمونه در آزمون تماس مستقیم

ردیف	ضخامت نمونه مورد آزمون	نسبت مساحت سطح به حجم (مطابق با استاندارد ملی شماره ۱۲-۷۲۱۶)	مساحت سطح در PBS ۷٫۰ ml (مطابق با استاندارد فعلی)
۱	ضخامت حداکثر ۰٫۵۰ mm	۱۲۰ cm^2 : ۲۰٫۰ ml	۴۲ cm^2 : ۷٫۰ ml
۲	ضخامت بیشتر از ۰٫۵۰ mm	۶۰ cm^2 : ۲۰٫۰ ml	۲۱ cm^2 : ۷٫۰ ml
۳	ضخامت بیشتر از ۰٫۱۰ mm یا دارای ابعاد هندسی پیچیده	۴٫۰ g : ۲۰٫۰ ml	۱٫۴ g : ۷٫۰ ml

۴-۲-۲-۲ نمونه‌ها را به قطعات کوچک قسمت کنید. هر یک از قطعات نمونه (نمونه مورد آزمون و نمونه‌های کنترل) را در لوله‌های جداگانه (مشابه با زیربند ۴-۲-۱-۳) قرار دهید.

توصیه می‌شود که از لوله‌هایی به ابعاد ۱۲۵ mm × ۱۶ mm استفاده کنید. با این حال اندازه لوله می‌تواند طوری باشد که نمونه توسط ۷٫۰ ml مایع PBS پوشیده شود. مقدار ۷٫۰ ml PBS به هر یک از لوله‌های حاوی قطعات نمونه‌هایی که از آنها مایعی استخراج نشده، اضافه کنید. در لوله‌های شاهد فقط ۷٫۰ ml از PBS اضافه کنید.

۴-۳ تهیه منحنی استاندارد هموگلوبین

منحنی استاندارد هموگلوبین را مطابق با زیربند ۴-۱-۳ تهیه کنید.

۴-۴ جمع‌آوری و آماده‌سازی خون

۴-۴-۱ تهیه خون خرگوش

در هر روز آزمون، خون منعقد نشده را حداقل از سه خرگوش تهیه کنید. ماده ضدانعقاد ترجیحاً سیترات سدیم (۰٫۱۳ M) باشد. از هر خرگوش بطور تقریبی ۵ ml خون بگیرید.

خون را در دمای °C (۲ ± ۴) نگهداری کنید و ترجیحاً در مدت ۴۸ h آن را استفاده کنید. درصورتیکه مقدار هموگلوبین آزاد پلاسما بیش از حد بالا نباشد، می‌توان خون را تا ۹۶ h پس از جمع‌آوری نیز استفاده کرد. توصیه می‌شود مقادیر مساوی از خون هر خرگوش مخلوط شود.

یادآوری- سلول‌ها نباید شسته شوند بلکه آنها را همانطور که در پلاسما معلق هستند، استفاده کنید.

۴-۴-۲ تعیین غلظت هموگلوبین آزاد پلاسما

۴-۴-۲-۱ مقدار ۳٫۰ ml از نمونه خون مخلوط (طبق زیربند ۴-۴-۱) را با دور ۷۰۰ G تا ۸۰۰ G به مدت ۱۵ min با استفاده از یک سانتریفیوژ کلینیکی استاندارد، سانتریفیوژ کنید.

۴-۴-۲-۲ رقیق سازی ۱:۱ از پلاسما (حاصل از زیربند ۴-۴-۲-۱) و معرف سیان‌مت هموگلوبین تهیه کنید (به‌عنوان مثال: ۰/۵ ml پلاسما را به ۰٫۵ ml معرف سیان‌مت هموگلوبین اضافه کنید).

۴-۴-۲-۳ جذب محلول زیربند ۴-۴-۲-۲ را پس از ۱۵ min توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ nm بخوانید. غلظت را با استفاده از منحنی استاندارد بدست آورید. عدد بدست آمده را در ۲ ضرب کنید تا غلظت هموگلوبین آزاد کل پلاسما[1] بدست بیاید (اگرچه تداخل پس زمینه پلاسما در نظر گرفته نشده است). غلظت هموگلوبین آزاد پلاسما را طبق فرمول زیر محاسبه کنید.

$$PFH = A^{PFH} \times F \times 2 \qquad (۱)$$

که در آن:

PFH غلظت هموگلوبین آزاد پلاسما؛

A^{PFH} مقدار جذب هموگلوبین آزاد پلاسما؛

F شیب منحنی استاندارد هموگلوبین (مطابق زیربند ۴-۱-۳).

۴-۴-۲-۴ اگر مقدار هموگلوبین آزاد پلاسما کمتر از ۲ mg/ml بود، آزمون را ادامه دهید. اگر مقدار هموگلوبین آزاد پلاسما برابر با ۲ mg/ml یا بیشتر از ۲ mg/ml بود، خون مورد استفاده باید دور ریخته شود و نمونه خون دیگر تهیه شود.

۴-۴-۳ تعیین غلظت هموگلوبین کل خون

توجه داشته باشید که غلظت هموگلوبین کل خون را می‌توانید از طریق روش سیان‌مت هموگلوبین (زیربندهای ۴-۴-۳-۱ تا ۴-۴-۳-۴) یا از طریق دستگاه سنجش هموگلوبین[2] معتبر تعیین کنید. در صورت استفاده از دستگاه سنجش هموگلوبین معتبر، زیربندهای ۴-۴-۳-۱ تا ۴-۴-۳-۳ را انجام ندهید. با این حال پس از رقیق سازی در مرحله ۴-۴-۳-۴، غلظت هموگلوبین کل خون ممکن است خارج از محدوده معتبر یک دستگاه سنجش هموگلوبین کلینیکی باشد.

1- Plasma free hemoglobin (*PFH*)
2- Hemoglobinometer

۴-۴-۳-۱ مقدار µl ۲۰ از نمونه خونی که به خوبی مخلوط شده را به ml ۵/۰ معرف سیان‌مت هموگلوبین یا رقیق کننده معتبر دیگر اضافه کنید.

۴-۴-۳-۲ جذب محلول زیربند ۴-۴-۳-۱ را پس از مدت min ۱۵ درصورت استفاده از معرف درابکین و پس از مدت min ۵ درصورت استفاده از معرف سیان‌مت هموگلوبین، در طول موج nm ۵۴۰ با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر بخوانید.

۴-۴-۳-۳ غلظت هموگلوبین خون را با استفاده از منحنی استاندارد و ضرب عدد حاصل در ۲۵۱ (محاسبه رقیق سازی) تعیین کنید. این عمل را باید دوبار انجام دهید. غلظت هموگلوبین کل خون را طبق فرمول زیر محاسبه کنید.

$$C = A^C \times F \times 251 \qquad (۲)$$

که در آن:

C غلظت هموگلوبین کل خون؛

A^C مقدار جذب هموگلوبین کل خون؛

F شیب منحنی استاندارد هموگلوبین (مطابق زیربند ۴-۱-۳).

۴-۴-۳-۴ غلظت هموگلوبین کل خون نمونه را با رقیق کردن توسط افزودن مقدار مناسبی از بافر فسفات نمکی (فاقد کلسیم و منیزیم) به غلظتی برابر با mg/ml (۱ ± ۱۰/۰) برسانید. غلظت هموگلوبین را با سه مرتبه تکرار زیربندهای ۴-۴-۳-۱ تا ۴-۴-۳-۴ بازبینی کنید. بدین ترتیب که مقدار µl ۳۰۰ از خون رقیق شده را به ml ۴/۵ معرف اضافه کنید تا همچنان غلظت در محدوده منحنی استاندارد باشد. فاکتور رقیق سازی در این حالت ۱۶ می‌باشد. غلظت هموگلوبین خون رقیق شده را طبق فرمول زیر بدست آورید.

$$T = A^T \times F \times 16 \qquad (۳)$$

که در آن:

T غلظت هموگلوبین خون رقیق شده؛

A^T مقدار جذب هموگلوبین خون رقیق شده؛

F شیب منحنی استاندارد هموگلوبین (مطابق زیربند ۴-۱-۳).

۵ روش اجرای آزمون

۵-۱ کلیات

در آزمون همولیز، نمونه مورد آزمون و کنترل یا مایع استخراجی از آنها در معرض تماس با خون خرگوش، تحت شرایط تعریف شده ایستا، قرار می‌گیرد و افزایش مقدار هموگلوبین آزاد شده، اندازه‌گیری می‌شود. نتایج بدست آمده از نمونه کنترل و آزمون شده که تحت شرایط یکسان آزمون شده‌اند، مقایسه می‌شود. برای

ارزیابی همولیز مواد بکار رفته در وسایل پزشکی، انجام هر دو آزمون (مایع استخراجی و تماس مستقیم) توصیه می‌شود. به جز در مواردی که کاربرد یا زمان تماس وسایل پزشکی با خون، حذف یکی از آزمون‌ها را توجیه کند، می‌توان فقط یک آزمون را انجام داد.

۵-۱-۱ مقدار ml ۱٫۰ از خون آماده شده طبق زیربند ۴-۴-۳-۴ را به هر کدام از لوله‌های آزمایش حاوی مایع استخراجی، لوله‌های حاوی نمونه و لوله‌های شاهد اضافه کنید. درب همه لوله‌ها را ببندید.

یادآوری- در این روش آزمون ترتیب مراحل عبارت است از: آماده‌سازی نمونه، افزودن رقیق کننده به نمونه و سپس افزودن خون به صورتی‌که در این روش تفاوت زمانی برای تماس نمونه با خون به حداقل می‌رسد. در روش دیگر، ممکن است خون به رقیق کننده افزوده شود و سپس نمونه به محلول آماده شده، اضافه شود. هرکدام از روش‌های انتخاب شده باید برای نمونه‌های کنترل و همچنین نمونه‌های مورد آزمون به‌کار رود.

۵-۱-۲ تمامی لوله‌های آزمایش را در جا لوله‌ای مناسب برای مدت حداقل h ۳ در دمای °C (۲ ± ۳۷) حمام آبگرم قرار دهید. به منظور حفظ تماس خون با ماده، تقریباً هر min ۳۰ لوله‌ها را سر و ته کنید. در برخی موارد که نمونه‌ها اشکال پیچیده‌ای دارند، لازم است که دفعات سر و ته کردن لوله‌ها افزایش یابد تا نمونه به میزان کافی با محتویات لوله مخلوط شود.

۵-۱-۳ پس از پایان زمان گرمخانه گذاری (انکوباسیون)، مایع لوله‌های آزمایش را به لوله‌های مناسب منتقل کنید و با دور G ۷۰۰ تا G ۸۰۰ به مدت min ۱۵ با استفاده از یک سانتریفیوژ کلینیکی استاندارد، سانتریفیوژ کنید.

۵-۱-۴ مایع رویی را به دقت طوری جدا کنید که اریتروسیت‌های موجود در ته لوله‌ها با مایع رویی مخلوط نشوند. مایع رویی را در لوله‌های دیگر درب‌دار منتقل کنید. هرگونه رنگ در مایع رویی و هرگونه رسوبی را یادداشت کنید.

۵-۱-۵ غلظت هموگلوبین مایع رویی را مطابق با زیربند ۵-۲ بدست آورید.

۵-۲ تعیین هموگلوبین مایع رویی و محاسبه درصد همولیز

۵-۲-۱ مقدار ml ۱٫۰ سوپرناتانت را به ml ۱٫۰ معرف سیان‌مت هموگلوبین یا رقیق کننده معتبر اضافه کنید.

۵-۲-۲ جذب محلول زیربند ۵-۲-۱ را پس از مدت min ۱۵ درصورت استفاده از معرف درابکین و پس از مدت min ۵ درصورت استفاده از معرف سیان‌مت هموگلوبین، در طول موج nm ۵۴۰ با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر بخوانید.

۵-۲-۳ در موارد غیر معمول، درصورتیکه جذب nm ۵۴۰ (A_{540}) بیش از ۲ باشد که این مساله ممکن است در اثر اشتباه در روند آزمایش و یا اشکال در جذب پس زمینه رخ دهد، مشکل باید مشخص شده و آزمایش مجدداً تکرار شود.

۵-۲-۴ غلظت هموگلوبین مایع رویی در لوله‌های حاوی نمونه مورد آزمون یا نمونه‌های کنترل را طبق فرمول زیر بدست آورید (با استفاده از مقادیر جذب بدست آمده از زیربند ۵-۲-۲ و تصحیح فاکتور رقیق سازی ۲.

$$S = A^S \times F \times 2 \qquad (۴)$$

که در آن:

S غلظت هموگلوبین سوپرناتانت؛

A^S مقدار جذب هموگلوبین سوپرناتانت؛

F شیب منحنی استاندارد هموگلوبین (مطابق زیربند ۴-۱-۳).

غلظت هموگلوبین لوله شاهد را نیز طبق فرمول زیر محاسبه کنید:

$$B = A^B \times F \times 2 \qquad (۵)$$

که در آن:

B غلظت هموگلوبین لوله شاهد؛

A^B مقدار جذب هموگلوبین لوله شاهد؛

F شیب منحنی استاندارد هموگلوبین (مطابق زیربند ۴-۱-۳).

۵-۲-۵ درصد همولیز یا شاخص همولیزکنندگی را طبق فرمول زیر محاسبه کنید:

$$\text{درصد همولیز} = \frac{\text{غلظت هموگلوبین مایع رویی} \times ٪\ ۱۰۰}{\text{غلظت هموگلوبین کل در لوله}} \qquad (۶)$$

در فرمول بالا (۶)، "غلظت هموگلوبین کل در لوله" با تقسیم غلظت هموگلوبین کل خون (حاصل از زیربند ۴-۴-۳-۴) بر عدد ۸ محاسبه می‌شود (به‌دلیل رقیق شدن خون در PBS در لوله‌های آزمایش). در این معادله، تداخل پس زمینه ناشی از پلاسما، هموگلوبین آزاد و عصاره، بسیار ناچیز فرض شده است. این فرض را می‌توان با اندازه‌گیری جذب مایع رویی محلول‌های استخراجی و همچنین خون رقیق شده در لوله‌های حاوی ۷٫۰ ml PBS و ۱٫۰ ml خون رقیق شده (۱۰٫۰ mg/ml) که همراه با لوله‌های نمونه مورد آزمون انکوبه شدند، تایید کرد.

۵-۲-۶ درصد همولیز را با توجه به اصلاح جذب پس زمینه برای نمونه شاهد طبق فرمول زیر محاسبه کنید:

$$\text{درصد همولیز با تصحیح جذب شاهد} = \frac{S - B}{(T/8) - B} \times ٪\ ۱۰۰ \qquad (۷)$$

معادله بالا را با توجه به فاکتورهای رقیق سازی حاصل از زیربندهای ۴-۴-۳-۴ و ۵-۲-۱ می‌توان به صورت فرمول زیر ساده کرد:

$$\text{درصد همولیز با تصحیح جذب شاهد} = \frac{A^S - A^B}{A^T - A^B} \times ۱۰۰\ ٪ \qquad (۸)$$

لازم به ذکر است که معادله ۸ تنها در صورتی قابل کاربرد و محاسبه است که رقیق سازی‌ها در زیربندهای ۴-۴-۳-۴ و ۵-۲-۱ دقیقاً در نظر گرفته شده باشند. در غیر این صورت، لازم است که فاکتورهای اصلاح رقیق سازی در معادله (۷) در نظر گرفته شوند.

۶ گزارش آزمون

نتایج را به صورت درصد شاخص همولیز کنندگی (طبق زیربند ۵-۲-۶) اظهار کنید.

۶-۱ گزارش نهایی

گزارش نهایی، حداقل باید شامل اطلاعات زیر باشد:

۶-۱-۱ اطلاعات جزیی در مورد آماده‌سازی نمونه مورد آزمون و کنترل شامل نام عمومی یا شیمیایی، شماره کاتالوگ، شماره بهر و سایر شناسه‌های موجود یا شرح‌های قابل دسترس.

۶-۱-۲ اطلاعات جزیی در مورد آماده‌سازی نمونه مورد آزمون و نمونه کنترل شامل اندازه نمونه، ضخامت، شکل نمونه مورد آزمون و روش استریلیزاسیون.

۶-۱-۳ سن خون و نوع و غلظت ماده ضدانعقاد بکار رفته.

یادآوری- منظور از سن خون، مدت زمان از لحظه خونگیری تا زمان انجام آزمون می‌باشد.

۶-۱-۴ روش اندازه‌گیری هموگلوبین.

۶-۱-۵ جدول بندی مقدار هموگلوبین کل سوپرناتانت.

۶-۱-۶ درصد همولیز نمونه مورد آزمون، نمونه کنترل منفی، نمونه کنترل مثبت و نمونه شاهد. میانگین و انحراف استاندارد برای هر تکرار نمونه مورد آزمون، نمونه کنترل منفی، نمونه کنترل مثبت و نمونه شاهد.

۶-۱-۷ سایر مشاهدات مربوط به آزمایش.

۶-۲ تبدیل درصد همولیز در گزارش

این استاندارد روشی را برای تعیین گرایش یک ماده به ایجاد همولیز، شرح می‌دهد. برای معیار قبولی/ رد مواد، مواردی همچون ماهیت بافت تماسی، مدت تماس، نسبت مساحت سطح به بدن و ماهیت دستگاه در نظر گرفته می‌شود. از گذشته تاکنون یک میزان خاصی برای همولیز اختصاص داده شده است. با این حال، به‌طور کلی میزان همولیز کنندگی مقیاس واحدی نداشته، صحه گذاری نشده و بر اساس نتایج حاصل از مطالعات قبلی که از روش آزمون کمی متفاوت استفاده کرده‌اند، تعریف شده است. درصورتی‌که نیاز باشد میزان همولیز مشخص شود، میانگین شاخص همولیزکنندگی لوله شاهد باید از شاخص همولیزکنندگی نمونه مورد آزمون و نمونه‌های کنترل کم شود. نتایج حاصل از نمونه مورد آزمون، باید با نتایج حاصل از نمونه کنترل منفی مقایسه شود.

جدول ۲- گزارش میزان همولیزکنندگی نمونه (وسیله پزشکی) مورد آزمون.

ردیف	شاخص همولیزکنندگی بیشتر از نمونه کنترل منفی (بر حسب ٪)	میزان همولیزکنندگی نمونه مورد آزمون
۱	۰ - ۲	غیر همولیز کننده
۲	۲ - ۵	همولیز کننده کم
۳	بیشتر از ۵	همولیز کننده

علاوه بر این، اگر نتیجه میانگین شاخص همولیزکنندگی تکرارهای نمونه‌های مورد آزمون از ٪ ۵ کمتر باشد اما یک یا چند نمونه، شاخص همولیزکنندگی بیشتر از ٪ ۵ داشته باشند، توصیه می‌شود آزمون با تعداد نمونه‌های هم اندازه تکرار، اما گزارش آزمون بر اساس کل نمونه‌های مورد آزمون گزارش شود.

۶-۳ دقت و گرایش[1]

دقت- دقت این روش آزمون تعیین شده است. اگرچه نشان داده شده که این روش آزمون، تکرار پذیری داخل آزمایشگاهی دارد، خصوصاً با توجه به طبقه‌بندی پاسخ همولیزکنندگی، اما تغییرات بین آزمایشگاهی هم همچنان قابل توجه است.

گرایش- گرایش در این روش آزمون شامل برآورد کمی از عدم قطعیت کالیبراسیون تجهیزات آزمون و مهارت کاربر است. در این حالت، توصیه می‌شود عبارت‌های مربوط به گرایش به مستندات عملکرد آزمایشگاه‌های ویژه محدود شود.

1- Bias

پیوست الف

(آگاهی دهنده)

اصول کلی

الف-۱ تماس مواد همولیز کننده با خون ممکن است باعث از بین رفتن یا صدمه زدن به سلول‌های قرمز خون شود و درنتیجه می‌تواند منجر به افزایش مقدار هموگلوبین آزاد پلاسما گردد که این نیز به نوبه خود می‌تواند اثرات سمی یا عوارض دیگر مانند تنش در کلیه یا اندام‌های دیگر را القا کند.

الف-۲ این استاندارد به عنوان یک روش غربالگری برای مقایسه توانایی بالقوه همولیزکنندگی یک نمونه مورد آزمون با مواد کنترل منفی است که این مواد کنترل منفی به طور کل مشخص شده برای موارد کاربردی تماس با خون مناسب است. موادی که توانایی بالقوه همولیزکنندگی آنها بالاتر از مواد کنترل منفی خاص باشد، باید در کاربردشان دقت کافی به‌عمل آورد چراکه این مواد ممکن است در شرایط درون‌تنی توانایی بالقوه همولیزکنندگی داشته یا نداشته باشند.

الف-۳ روش آزمون همولیز که در این استاندارد ارائه شده، به عنوان یک روش معمول غربالگری، قابل تکرار می‌باشد. از طرفی این روش آزمون، حساسیت و ویژگی بالایی برای ارزیابی توانایی بالقوه همولیزکنندگی تمام مواد در همه کاربردها را ندارد. نتایج به دست آمده با این روش آزمون در کنار نتایج بدست آمده از سایر آزمون‌های ارزیابی سازگاری خونی نمونه مورد آزمون باید در نظر گرفته شود.

پیوست ب

(آگاهی دهنده)

طرز تهیه بافر فسفات نمکی (فاقد کلسیم و منیزیم)

ب-۱ مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
کلرید سدیم[a]	۸ g
کلرید پتاسیم[b]	۰٫۲ g
دی‌سدیم فسفات[c]	۱٫۴۴ g
مونو پتاسیم فسفات[d]	۰٫۲۴ g
آب مقطر[e]	به حجم ۱۰۰۰ ml

[a] Sodium chloride (NaCl)
[b] Potassium chloride (KCl)
[c] Disodium phosphate (Na_2HPO_4)
[d] Potassium Dihydrogen Phosphate (KH_2PO_4)
[e] Distilled water

ب-۲ روش تهیه

مقادیر ۸ g کلرید سدیم، ۰٫۲ g کلرید پتاسیم، ۱٫۴۴ g دی‌سدیم فسفات و ۰٫۲۴ g مونو پتاسیم فسفات را در حدود ۸۰۰ ml آب مقطر حل کنید. سپس pH محلول را با اسید کلریدریک ۲ M به ۷٫۴ رسانده و آب مقطر تا حجم نهایی ۱۰۰۰ ml بیافزایید. محلول را پس از صاف کردن با استفاده از کاغذ صافی در یخچال نگهداری کنید. غلظت این بافر برابر با ۱۰ mM می‌باشد.