

PROTOKOL K EVROPSKÉ DOHODĚ
o výměně léčebných látek lidského původu

ČÁST I

OBEČNÁ USTANOVENÍ

A. ZNAČENÍ

Každá nádoba nebo transfúzní souprava musí být před expedicí opatřena etiketou v angličtině a francouzštině podle příslušného vzoru uvedeného v přílohách 2 až 10 protokolu.

B. BALENÍ A EXPEDICE

Plná lidská krev se vždy expeduje v nádobách, v nichž se během celé přepravy udržuje teplota mezi 4-6°C.

Splnění této podmínky se nevyžaduje u derivátů uvedených v protokolu.

C. PRODUKTY A PŘÍSTROJE

Produkty a přístroje uvedené v části II tohoto protokolu musí být sterilní, nepyrogenní a netoxické.

Ke každé zásilce se doporučuje přiložit transfúzní soupravy, jakož i rozpouštědla pro sušené výrobky.

D. NETOXICITA PLASTOVÝCH SOUPRAV PRO KREVNÍ TRANSFÚZI

Soupravy musí splňovat podmínky stanovené v příloze II tohoto protokolu.

ČÁST II

ZVLÁŠTNÍ USTANOVENÍ

1. PLNÁ LIDSKÁ KREV

Plná lidská krev je krev, která byla po odběru od zdravého lidského jedince smíšena s vhodným antikoagulačním činidlem.

Krev nelze odebírat od jedince:

Revidovaný překlad právního předpisu Evropských společenství

- a) o němž je známo, že má nebo měl syfilis nebo hepatitidu, nebo
- b) u něžž krevní testy na syfilitickou infekci nebyly negativní, nebo
- c) který není imunní proti chorobám přenosným krevní transfúzí, pokud to lze zjistit pouhým lékařským vyšetřením a studiem jeho anamnézy.

Krev se odebírá asepticky pomocí uzavřeného systému sterilních hadiček do sterilní nádoby, do které byl před sterilizací nalit antikoagulační roztok. Použité zařízení musí být nepyrogenní. Po dokončení odběru se nádoba okamžitě uzavře a ochladí na teplotu 4-6°C. Znovu se otevře až těsně před použitím krve.

Krev se odebírá do kyselého roztoku citrátu obsahujícího glukosu. Nesmí se přidávat žádné antiseptické ani bakteriostatické látky. Objem antikoagulačního roztoku nesmí překročit 220 ml na 1 litr plné lidské krve a koncentrace hemoglobinu nesmí být menší než 97 gramů na litr.

Krevní skupina

Krevní skupina v systému AB0 se stanoví vyšetřením krvinek a séra a krevní skupina v systému Rh vyšetřením krvinek samostatného vzorku odděleného od dárcovy krve. Pokud existuje nějaká vnitrostátní metoda, která je normalizovaná nebo doporučena pro stanovení krevní skupiny, použije se tato metoda.

Pojem Rh negativní se použije pouze tehdy, pokud zvláštní testy prokázaly nepřítomnost antigenů C, D, D^u a E. Ostatní krev musí být označena jako Rh pozitivní.

Krev vyměněnou podle podmínek stanovených v této dohodě lze pro transfúzi použít pouze u jedinců, kteří mají odpovídající skupinu AB0.

Skladování

Plná lidská krev se uchovává ve sterilní uzavřené nádobě, aby byla chráněna před mikroorganismy, a skladuje se při teplotě 4-6°C až do okamžiku použití. Výjimku tvoří doba nutná pro provádění testů a přepravu při vyšších teplotách, přičemž žádná tato doba nesmí překročit 30 minut a po jejím uplynutí musí být krev okamžitě zchlazena na teplotu 4-6°C.

Značení

Etiketa na nádobě musí obsahovat všechny požadované údaje, které jsou uvedeny na vzorové etiketě (příloha 2). Rh faktor se vyjádří jako „pozitivní“ nebo „negativní“, nebo pomocí zkratky „POS“ nebo „NEG“.

1a. KONCENTRÁTY LIDSKÝCH ČERVENÝCH KRVINEK

Koncentrát lidských červených krvinek je jednotka plné lidské krve, z níž byla odebrána většina plazmy.

Obsahuje všechny červené krvinky jednotky, z níž byl připraven; ostatní složky krvinek mohou být v koncentrátu přítomny nebo z něho mohou být částečně odstraněny.

Kapalný obsah koncentrátu tvoří zbytky plazmy nebo vhodný izotonický umělý vodní roztok, který se do koncentrátu přidává po odstranění plazmy. Objem červených krvinek by měl činit 65-75 % celkového objemu koncentrátu. V případě větší koncentrace červených krvinek je však nutné, aby na etiketě byl uveden přibližný procentuální objem erytrocytů (hematokrit).

Všechny úkony potřebné pro přípravu koncentrátu se provádějí v aseptických podmínkách. Dekantace se provádí ve sterilním uzavřeném systému, a to vždy stlačením. Nepřidávají se žádné antiseptické ani bakteriostatické látky.

Krevní skupina a skladování

Stejně jako v případě plné lidské krvi.

Značení

Etiketa na nádobě musí obsahovat všechny požadované údaje, které jsou uvedeny na vzorové etiketě (příloha 2a). Rh faktor se vyjádří jako „pozitivní“ nebo „negativní“, nebo pomocí zkratky „POS“ nebo „NEG“. Pokud se do koncentrátu přidá umělý vodní roztok, na etiketě musí být rovněž uveden jeho objem a složení.

2. SUŠENÁ LIDSKÁ PLAZMA

Sušená lidská plazma se připravuje sušením supernatantu, kapaliny, která vznikne odstředováním nebo sedimentací plné lidské krve.

Při přípravě plazmy se nepřidávají žádné antiseptické, bakteriostatické nebo jiné látky. Sušená lidská plazma se získává lyofilizací nebo kteroukoli jinou metodou, při níž nedochází k denaturaci proteinů. Sušený výrobek musí být snadno rozpustný ve vodě, jejíž objem se rovná objemu kapaliny, ze které byl připraven. Takto získaný roztok nesmí obsahovat méně než 45 gramů proteinů na litr a nesmí vykazovat viditelné známky přítomnosti produktů hemolýzy. Titr hemaglutininu nesmí být vyšší než 1:32.

Sušená lidská plazma připravená z jednoho nebo dvou odběrů krve

Je nutné vyřadit odebranou krev, o níž se ví, že obsahuje nebezpečné množství isohemolysinů (stanovené ze vzorku čerstvého séra) nebo jiné imunní hemoglutininy. Pokud se plazma nesmíchá a nezmrází během 48 hodin po odběru krve, sterilita každé jednotky se ověří kultivací nejméně 10 ml.

Sušená lidská plazma připravená smícháním více než dvou odběrů krve

Je nutné vyřadit smíchanou krev, která obsahuje nebezpečné množství imunních hemoglutininů nebo isohemolysinů. Mají-li se vyloučit negativní

Revidovaný překlad právního předpisu Evropských společenství

účinky způsobené produkty bakteriálního růstu v plazmě, nepoužije se žádná odebraná krev, která by vykazovala známky bakteriální kontaminace; sterilita všech směsí se zkontroluje kultivací nejméně 10 ml krve. Aby se snížilo riziko přenosu sérové hepatitidy, musí být plazma připravena ze směsí pocházejících nejvýše z 12 odběrů krve nebo kteroukoli jinou známou metodou, která je schopna podobným způsobem uvedené riziko snížit.

Rozpustnost ve vodě

Přidá se takové množství vody, které se rovná objemu kapaliny, z níž byl připraven vzorek; látka se zcela rozpustí během 10 minut při teplotě 15 – 20°C.

Identifikace

Dané množství produktu se rozpustí v takovém množství vody, jehož objem se rovná objemu kapaliny, z níž byl připraven; u roztoku musí být provedeny tyto testy:

- i) testy srážení se specifickými antiséry, které musí prokázat, že roztok obsahuje pouze lidské plazmatické proteiny;
- ii) do 1 ml se přidá vhodné množství trombinu nebo chloridu vápenatého; dojde ke koagulaci, kterou lze urychlit inkubací při 37°C.

Ztráta hmotnosti sušením

Během sušení za přítomnosti oxidu fosforečného a při tlaku nejvýše 0,02 mm sloupce rtuti po dobu 24 hodin nesmí sušená lidská plazma ztratit více než 0,5% své hmotnosti.

Sterilita

Konečný produkt musí být po rekonstituci sterilní, pokud je vyšetřen za použití vhodné bakteriologické metody.

Skladování

Sušená krevní plazma se uchovává v dusíkové atmosféře nebo ve vakuu ve sterilní uzavřené nádobě, aby byla chráněna před mikroorganismy a v nejvyšší možné míře před vlhkostí a světlem, a skladuje se při teplotě nižší než 20°C.

Značení

Etiketa na nádobě musí obsahovat všechny požadované údaje, které jsou uvedeny na vzorové etiketě (příloha 3).

3. LIDSKÝ ALBUMIN A STÁLÉ ROZTOKY PROTEINŮ LIDSKÉ PLAZMY

Lidský albumin a stálé roztoky proteinů lidské plazmy jsou proteinové preparáty; proteiny v nich obsažené představují asi 60 % masy všech proteinů obsažených v plazmě plně lidské krve.

K jejich přípravě se použije taková metoda, při které vznikne konečný produkt splňující požadavky uvedené v tomto protokolu. Bez ohledu na to, zda konečný produkt má být kapalný nebo sušený, po přidání vhodného stabilizačního činidla se musí přípravek ohřívat v kapalném stavu v nádobě konečného uložení při teplotě $60^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 hodin, aby se deaktivovala látka způsobující sérovou hepatitidu. Během přípravy se nepřidávají žádné antiseptické ani bakteriostatické látky.

V přípravných lidského albuminu tvoří albumin nejméně 95 % celkové masy proteinů. Ve stálých roztocích proteinů lidské plazmy tvoří albumin nejméně 85 % celkové masy proteinů. Žádný z těchto dvou druhů přípravků nesmí obsahovat více než 10 mg imunoglobulinu G v 1 gramu produktu.

Je-li konečný produkt vyráběn lyofilizací, v 1 gramu produktu musí být obsaženo nejméně 950 mg proteinů.

Stálé roztoky proteinů lidské plazmy musí v jednom litru obsahovat 45 až 50 gramů celkových proteinů. Je-li lidský albumin připravován ve formě roztoku, musí mít koncentraci nejméně 45 g proteinů v jednom litru.

Rozpustnost sušeného produktu

Po přidání daného množství vody musí být zcela rozpustný.

Stabilita

Srovnávací metody pro zjištění viskozity a zakalení, jakož i ultracentrifugace a elektroforéza, které byly provedeny u roztoků před jejich zahřátím a po něm, nesmí vykazat žádné známky denaturace rozpuštěných proteinů. Po ohřevu na 57°C a míchání v mechanické třepačce po dobu šesti hodin při této teplotě se v roztoku nesmí vyskytovat žádné viditelné částice.

Identifikace

- i) Testy srážení prostřednictvím specifických antisér musí prokázat, že oba přípravky obsahují pouze proteiny lidské plazmy.
- ii) Elektroforéza prováděná metodou volné migrace za přijatelných a vhodných podmínek musí prokázat, že podíl proteinů, které vykazují mobilitu albuminové složky normální lidské plazmy, činí nejméně 95 % hmotnosti u přípravků lidského albuminu nebo nejméně 85 % hmotnosti u stálých roztoků proteinů lidské plazmy.

Obsah a koncentrace sodíku

Obsah sodíku v lidském albuminu s malým obsahem soli nesmí být vyšší než 0,61 milimolu sodíku v jednom gramu albuminu. V ostatních přípravcích lidského albuminu a ve stálých roztocích proteinů lidské plazmy nesmí koncentrace sodíku překročit 0,15 mol na jeden litr roztoku nebo rekonstituovaného sušeného produktu.

Obsah draslíku

V lidském albuminu a ve stálých roztocích proteinů lidské plazmy nesmí být koncentrace draslíku vyšší než 2 milimoly na litr roztoku nebo rekonstituovaného sušeného produktu.

Kyselost

pH obou přípravků měřené při teplotě 15 – 25°C ve zředěném roztoku o koncentraci 10 gramů proteinů a 0,15 molů chloridu sodného na jeden litr činí $6,8 \pm 0,2$.

Ztráta hmotnosti při sušení

Pokud jde o sušený přípravek, sušení za přítomnosti oxidu fosforečného a při tlaku nejvýše 0,02 mm sloupce rtuti po dobu 24 hodin nesmí vést ke ztrátě hmotnosti o více než 0,5 %.

Sterilita

Při vyšetření vhodnou bakteriologickou metodou musí být konečný produkt sterilní.

Skladování

Sušený lidský albumin musí být uchováván v dusíkové atmosféře nebo ve vakuu ve sterilní uzavřené nádobě, aby byl chráněn před mikroorganismy a v nejvyšší možné míře před vlhkostí a světlem, a skladován při teplotě nižší než 20°C.

Roztoky lidského albuminu a stálé roztoky proteinů lidské plazmy musí být uchovávány ve sterilních uzavřených nádobách, aby byly chráněny před mikroorganismy a světlem, a skladovány při teplotě 4 – 6°C.

Značení

Etiketa na nádobě musí obsahovat všechny požadované údaje, které jsou uvedeny na vzorové etiketě (příloha 4). U roztoků datum přípravy znamená datum tepelného zpracování v nádobě, ve které jsou uchovávány.

4. NORMÁLNÍ LIDSKÝ IMUNOGLOBULIN

Normální lidský imunoglobulin je přípravek plazmatických proteinů připravený z plně lidské krve a obsahující protilátky normálních dospělých osob. Získává se ze směsi tekuté plazmy od nejméně 1000 dárců.

Postup přípravy musí být takový, aby přípravek splňoval požadavky uvedené v tomto protokolu a aby konečný produkt nepřenášel sérovou hepatitidu. Metoda přípravy by kromě toho měla být taková, aby protilátky obsažené ve výchozím materiálu byly v přiměřeném množství obsaženy v konečném produktu. Použitou metodu je nutné v tomto ohledu považovat u jednotlivých přípravků za uspokojivou, pokud se ve výchozím materiálu i v konečném produktu získají titrací protilátky odpovídající alespoň jednomu viru a jednomu bakteriálnímu toxinu. Zvolí se takové protilátky, pro které existují vyzkoušené metody titrace.

Při přípravě se nepřidávají žádné antiseptické ani bakteriostatické látky; do konečného produktu lze přidat vhodné konzervační a stabilizační činidlo, aby se zachovala bakteriální sterilita a stabilita konečného produktu.

Konečný produkt se dodává ve formě roztoku, který obsahuje imunoglobulin o koncentraci mezi 100 a 170 gramů na litr.

Identifikace

- i) Testy srážení prostřednictvím specifických antisér musí prokázat, že přípravek obsahuje pouze proteiny lidské plazmy.
- ii) Elektroforéza prováděná metodou volné migrace za přijatelných a vhodných podmínek musí prokázat, že nejméně 90 % celkové hmoty proteinů má mobilitu gama složky globulinů v normální lidské plazmě.

Stabilita

Před zahříváním, jakož i po zahřívání při teplotě 37°C po dobu sedmi dnů nesmí konečný roztok vykazovat žádné viditelné známky srážení ani zakalení. Rovněž se doporučuje provést kontrolu pomocí ultracentrifugace, aby mohla být stanovena míra rozložení produktu na složky s menší molekulovou hmotností.

Kyselost

pH konečného roztoku, měřené při teplotě 15–25°C po zředění při koncentraci 10 gramů proteinů na litr v roztoku obsahujícím 0,15 molů chloridu sodného v 1 litru, musí činit $6,8 \pm 0,4$.

Sterilita

Při vyšetření vhodnou bakteriologickou metodou musí být konečný produkt sterilní.

Skladování

Roztoky lidského imunoglobulinu musí být uchovávány ve sterilních uzavřených nádobách, aby byly chráněny před mikroorganismy a světlem, a skladovány při teplotě 4 – 6°C.

Značení

Etiketa na nádobě musí obsahovat všechny požadované údaje, které jsou uvedeny na vzorové etiketě (příloha 5). Datum přípravy znamená datum plnění do nádoby, ve které jsou uchovávány.

5. SPECIFICKÉ LIDSKÉ IMUNOGLOBULINY

Specifické lidské imunoglobuliny obsahují protilátky proti některým virům a bakteriím. Z tohoto důvodu se tyto produkty připravují ze směsi krve omezeného počtu dárců.

Požadavky zde stanovené se vztahují na tyto specifické lidské imunoglobuliny:

- lidský imunoglobulin proti tetanu
- lidský imunoglobulin proti vakcínii.

Lze připravit další specifické lidské imunoglobuliny; pokud existuje příslušná mezinárodní norma, musí být kontrolovány podle této normy a jejich účinnost vyjádřena v mezinárodních jednotkách.

Lidský imunoglobulin proti vakcínii musí obsahovat nejméně 500 IU (mezinárodních jednotek) na 1 ml protilátek proti vakcínii. Obsah protilátek se stanovuje neutralizačním testem na chorio-alantoidních membránách nebo v tkáňové kultuře. Protitetanový lidský imunoglobulin musí obsahovat nejméně 50 IU v 1 ml antitoxinu tetanu, který se stanovuje neutralizačním testem u zvířat.

Specifické lidské imunoglobuliny musí dále splňovat požadavky uvedené v části 4 – Normální lidský imunoglobulin.

Koncentrace imunoglobulinu v konečném roztoku může kolísat mezi 100 a 170 gramy na litr v závislosti na obsahu protilátek.

Značení

Etiketa na nádobě musí obsahovat všechny požadované údaje, které jsou uvedeny na vzorové etiketě (příloha 5). Na etiketě je navíc uvedena účinnost v mezinárodních jednotkách (IU) podle příslušné mezinárodní normy nebo mezinárodního referenčního přípravku.

6. SUŠENÝ LIDSKÝ FIBRINOGEN

Sušený lidský fibrinogen je sušený přípravek obsahující rozpustnou složku kapalně lidské plazmy, která se po přidání trombinu přemění na fibrin. K jeho přípravě se použije taková metoda, při které vznikne konečný produkt

Revidovaný překlad právního předpisu Evropských společenství

splňující požadavky uvedené v tomto protokolu a který snižuje riziko přenosu sérové hepatitidy. Směsi plazmy použité při přípravě fibrinogenu musí pocházet z co nejmenšího počtu odběrů.

Při přípravě se nepřidávají žádné antiseptické ani bakteriostatické látky. Konečný produkt musí být lyofilizován.

Rozpustnost

Sušený produkt musí být zcela rozpustný po přidání stanoveného množství vody. Během 60 minut následujících po rekonstituci se nesmí objevit žádné sraženiny.

Identifikace

- i) Testy srážení pomocí specifických antisér musí prokázat, že přípravek obsahuje pouze proteiny lidské plazmy.
- ii) Po přidání trombinu vytváří čerstvě rekonstituovaný produkt sraženiny. Po přidání trombinu do roztoku lidského fibrinogenu o stejné koncentraci jako má čerstvá normální plazma musí ke srážení dojít během doby, která nepřesáhne dvojnásobek doby srážení normální čerstvé plazmy po přidání trombinu.
- iii) Srážlivý protein. Možnost srážení trombinen musí existovat nejméně u 50 % z celkové hmotnosti proteinů.

Ztráta hmotnosti při sušení

Při sušení přípravků za přítomnosti oxidu fosforečného a při tlaku nejvýše 0,02 mm sloupce rtuti po dobu 24 hodin nesmí žádný z nich ztratit více než 0,3 % své hmotnosti.

Sterilita

Při vyšetření vhodnou bakteriologickou metodou musí být konečný produkt po rekonstituci sterilní.

Skladování

Lidský fibrinogen se uchovává v dusíkové atmosféře nebo ve vakuu ve sterilní uzavřené nádobě, aby byl chráněn před mikroorganismy a v nejvyšší možné míře před vlhkostí a světlem, a skladuje se při doporučené teplotě.

Značení

Etiketa na nádobě musí obsahovat všechny požadované údaje, které jsou uvedeny na vzorové etiketě (příloha 6). Datum přípravy znamená datum konečného rozpuštění před lyofilizací.

7. SUŠENÝ NEBO ZMRAZENÝ LIDSKÝ KOAGULAČNÍ FAKTOR VIII

I. Požadavky na dárce

Dárce musí být zdravý a zejména nesmí trpět žádnou nakažlivou chorobou podle kritérií přijatých pro sušenou lidskou plazmu.

II. Požadavky na přípravky

Sterilita a netoxicity

Konečný produkt musí být sterilní a nepyrogenní. V případě kryoprecipitace v plastovém sáčku nesmí výrobek obsahovat organická rozpouštědla ani jiné cizí látky, které jsou přítomny v mrazicí směsi. Pronikání těchto produktů stěnami plastového sáčku lze zabránit tím, že se tento sáček vloží do dalšího nepropustného obalu a ponechá se v něm po celou dobu ponoření. Riziko roztržení plastového sáčku během skladování ve zmrazeném stavu lze snížit tak, že každý sáček se vloží do ochranné schránky.

Erytrocyty, leukocyty a krevní destičky

Podmínky odstředování musí být takové, aby po odběru vzorků byly vytvořené složky krve co nejdříve a co nejúplněji odstraněny.

Rozpustnost

Po přidání stanoveného množství vhodného rozpouštědla musí dojít k úplnému rozpuštění vysušeného produktu za méně než 30 minut při teplotě 37°C. Malé a snadno oddělitelné agregáty fibrinogenu mohou zůstat nerozpuštěny.

Stabilita

V přípravku skladovaném při teplotě 20°C se během tří hodin po rozpuštění nesmí objevit žádné známky srážení.

Účinnost

Rekonstituovaný přípravek musí obsahovat uvedené minimální množství faktoru VIII, přičemž jedna jednotka odpovídá účinnosti 1 ml průměrné normální čerstvé plazmy. Účinnost se stanoví metodou schválenou příslušným vnitrostátním orgánem.

Nepřítomnost nepravidelných protilátek; je-li přípravek určen pacientům některé skupiny AB0, titr protilátek anti-A a anti-B nesmí být vyšší než 32.

Identifikace

Testy srážení se specifickými antiséry musí prokázat, že přípravek obsahuje pouze proteiny lidské plazmy.

Ztráta hmotnosti sušením

Je-li konečný produkt lyofilizován, sušení za přítomnosti oxidu fosforečného a při tlaku nejvýše 0,02 mm rtuťového sloupce po dobu 24 hodin nesmí vést ke ztrátě hmotnosti o více než 1,5 %.

Skladování

Lidský faktor VIII musí být v případě zmrazeného přípravku uchovávan při teplotě nižší než -30°C a v případě lyofilizovaného přípravku při teplotě nižší než 5°C a musí být chráněn před světlem. Sušený přípravek se uchovává v dusíkové atmosféře nebo ve vakuu, ve sterilní lahvičce uzavřené tak, aby se do ní nedostaly žádné mikroorganismy a pokud možno ani žádná vlhkost. Doba skladování ve zmrazeném stavu nesmí být delší než šest měsíců a ve vysušeném stavu delší než jeden rok, pokud nebyla znovu provedena zkouška ke zjištění minimální požadované účinnosti.

III. **Značení**

Etiketa na přípravku musí obsahovat všechny požadované údaje, které jsou uvedeny na vzorové etiketě (příloha 7).

8. SUŠENÝ LIDSKÝ KOAGULAČNÍ FAKTOR IX

I. **Požadavky na dárce**

Dárce musí být zdravý a zejména nesmí trpět žádnou nakažlivou chorobou podle kritérií přijatých pro sušenou lidskou plazmu.

II. **Požadavky na přípravky**

Sterilita a netoxičita

Konečný produkt testovaný vhodnými metodami musí být sterilní a nepyrogenní a nesmí mít žádné nežádoucí vasodepresivní ani respirační účinky. Test na vasodepresivní účinky se provádí na psech nebo kočkách.

Rozpustnost

Za 10 minut po přidání stanoveného množství rozpouštědla musí dojít při teplotě 37°C k úplnému rozpuštění.

Aktivita tromboplastinu a nepřítomnost volného trombinu

Doba rekalcifikace normální plazmy měřená při teplotě 37°C za přítomnosti stejného objemu různých zředění rekonstituovaného produktu nesmí být kratší než 40 sekund. Rekonstituovaný produkt s přidavkem stejného objemu fibrinogenu (3g/litr) se nesmí během šesti hodin srážet při teplotě 37°C .

Účinnost

Rekonstituovaný přípravek musí obsahovat stanovené minimální množství faktoru IX, přičemž jedna jednotka odpovídá účinnosti 1 ml průměrné normální čerstvé plazmy. Účinnost se stanoví metodou schválenou příslušným vnitrostátním orgánem.

Výtěžek a stabilita in vivo

Metoda přípravy musí být taková, aby rychlá intravenózní aplikace jedné dávky o 50 jednotkách na 1 kg tělesné hmotnosti, pocházející z několika šarží produktu a podané několika pacientům, způsobila za 15 minut za nepřítomnosti speciálního inhibitoru a za bazálních podmínek průměrný růst nejméně 300 jednotek na litr plazmy a po 24 hodinách setrvání průměrného růstu nejméně 60 jednotek na jeden litr plazmy.

Identifikace

Testy srážení se specifickými antiséry musí prokázat, že přípravek obsahuje pouze proteiny lidské plazmy.

Ztráta hmotnosti při sušení

Sušení za přítomnosti oxidu fosforečného a při tlaku nejvýše 0,02 mm rtuťového sloupce po dobu 24 hodin nesmí vést ke ztrátě hmotnosti o více než 1,5 %.

Skladování

Přípravky musí být uchovány v suchu při teplotě pod 5°C. Doba skladování nesmí překročit dva roky, pokud nebyl proveden opakovaný test účinnosti přípravku.

III. Značení

Etiketa na přípravku musí obsahovat všechny požadované údaje, které jsou uvedeny na vzorové etiketě (příloha 8).

PŘÍLOHA I PROTOKOLU

RADA EVROPY

EVROPSKÁ DOHODA O VÝMĚNĚ LÉČEBNÝCH LÁTEK LIDSKÉHO PŮVODU

OSVĚDČENÍ

(Článek 4)

NEODDĚLOVAT OD ZÁSILKY

..... 19....
(místo) (datum)

Počet balení

Níže podepsaný potvrzuje, že zásilka,

.....
.....

Značka

za jejíž přípravu zodpovídá.....

.....
.....

Č. šarže

jeden ze subjektů uvedený v článku 6 dohody, splňuje ustanovení protokolu k dohodě a lze ji okamžitě doručit adresátovi

.....
(jméno a místo)

.....
.....

(razítko)

(podpis)

(titul)

PŘÍLOHA 2 PROTOKOLU

RADA EVROPY

EVROPSKÁ DOHODA O VÝMĚNĚ LÉČEBNÝCH LÁTEK LIDSKÉHO PŮVODU

1. Jméno a adresa výrobce:
2. Plná lidská krev
3. Referenční číslo:
4. Krevní skupina:
5. Rh faktor:
6. ml antikoagulačního roztoku
..... g (glukosy/litr)
..... mol citronanu sodného/litr
..... ml krve
7. Titr isohemolysinu (stanoven)
(nestanoven)
8. Datum odběru:
Použitelné do:
9. Skladujte při 4 – 6°C.
10. Nepoužívejte při jakýchkoli viditelných známkách znehodnocení.

PŘÍLOHA 2a PROTOKOLU

RADA EVROPY

**EVROPSKÁ DOHODA O VÝMĚNĚ LÉČEBNÝCH LÁTEK LIDSKÉHO
PŮVODU**

1. Jméno a adresa výrobce:
2. Koncentrát lidských červených krvinek
3. Referenční číslo:
4. Krevní skupina:
5. Rh faktor:
6. ml připravených z ml krve.
7. Objem a složení použitého antikoagulantu:
8. Datum odběru:
Datum přípravy:
Použitelné do:
9. Skladujte při teplotě 2 – 6°C.
10. Přidaný umělý vodný roztok složení:

PŘÍLOHA 3 PROTOKOLU

RADA EVROPY

EVROPSKÁ DOHODA O VÝMĚNĚ LÉČEBNÝCH LÁTEK LIDSKÉHO PŮVODU

1. Jméno a adresa výrobce:
 2. Sušená lidská plazma:
 3. Referenční číslo:
 4. Rekonstituovaná ml sterilní, nepyrogenní destilované vody.
 5. Rekonstituovaná plazma obsahuje:
..... g glukosy/litr
..... mol citronanu sodného/litr
..... g/l koncentrace proteinů (minimálně)
 6. Počet jednotlivých dárců, z jejichž krve je směs připravena:
 7. Datum přípravy:
 - Použitelné do:
- | |
|---|
| 8. Skladujte při teplotě do 20°C, chraňte před světlem. |
| 9. Použijte okamžitě po rekonstituci. |

PŘÍLOHA 4 PROTOKOLU

RADA EVROPY

EVROPSKÁ DOHODA O VÝMĚNĚ LÉČEBNÝCH LÁTEK LIDSKÉHO PŮVODU

1. Jméno a adresa výrobce:
2. Sušený lidský albumin
3. Číslo šarže:
4. Albumin: g
Stabilizátor: povaha,g/litr (v rekonstituovaném roztoku)
Sodík: mmol/g (albuminu)
5. Datum přípravy:
Použitelné do:
6. Rekonstituováno ml sterilní, nepyrogenní, destilované vody.
7. Skladujte při teplotě do 20°C, chraňte před světlem.
8. Použijte okamžitě po rekonstituci.

PŘÍLOHA 4 (1. pokračování)

RADA EVROPY

EVROPSKÁ DOHODA O VÝMĚNĚ LÉČEBNÝCH LÁTEK LIDSKÉHO PŮVODU

1. Jméno a adresa výrobce:
 2. Roztok lidského albuminu ml
 3. Číslo šarže:
 4. Albumin: g/l
Stabilizátor: povaha, g/litr
Sodík: mmol/g (albuminu)
 5. Datum přípravy:
 - Použitelné do:
- | |
|--|
| 6. Skladujte při teplotě 4 – 6°C, chráňte před světlem. |
| 7. Aplikujte pouze tehdy, pokud je roztok čirý a bez usazenin. |

PŘÍLOHA 4 (2. pokračování)

RADA EVROPY

EVROPSKÁ DOHODA O VÝMĚNĚ LÉČEBNÝCH LÁTEK LIDSKÉHO PŮVODU

1. Jméno a adresa výrobce:
 2. Stálý roztok proteinů lidské plazmy: ml
 3. Číslo šarže:
 4. Albumin: g/l
Stabilizátor: povaha, g/litr
Sodík: mmol/g
 5. Datum přípravy:
 - Použitelné do:
- | |
|--|
| 6. Skladujte při teplotě 4 – 6°C, chraňte před světlem. |
| 7. Aplikujte pouze tehdy, pokud je roztok čirý a bez usazenin. |

PŘÍLOHA 5 PROTOKOLU

RADA EVROPY

EVROPSKÁ DOHODA O VÝMĚNĚ LÉČEBNÝCH LÁTEK LIDSKÉHO PŮVODU

1. Jméno a adresa výrobce:
2. Normální lidský imunoglobulin
3. Číslo šarže:
4. Celkový obsah proteinů: g/l
Další přidané látky: povaha,g/litr
Celkový objem: ml
5. Datum přípravy:
- Použitelné do:

- | |
|--|
| <ol style="list-style-type: none">6. Skladujte při teplotě 4 – 6°C, chráňte před světlem.7. Není určen pro intravenózní aplikaci. |
|--|

PŘÍLOHA 6 PROTOKOLU

RADA EVROPY

EVROPSKÁ DOHODA O VÝMĚNĚ LÉČEBNÝCH LÁTEK LIDSKÉHO PŮVODU

1. Jméno a adresa výrobce:
2. Sušený lidský fibrinogen
3. Číslo šarže:
4. Srážlivý protein: g
Další přidané látky: povaha,g/litr
rekonstituovaného roztoku
5. Datum přípravy:
- Použitelné do:
6. Rekonstituováno ml sterilní, nepyrogenní, destilované vody.
7. Počet jednotlivých dárců, z jejichž krve je směs připravena:
8. Skladujte při teplotě do 20°C, chraňte před světlem.
9. Použijte okamžitě po rekonstituci.

PŘÍLOHA 7 PROTOKOLU

RADA EVROPY

EVROPSKÁ DOHODA O VÝMĚNĚ LÉČEBNÝCH LÁTEK LIDSKÉHO PŮVODU

1. Jméno a adresa výrobce:
2. Zmrazený lidský koagulační faktor VIII nebo
Sušený lidský koagulační faktor VIII
Způsob přípravy:
3. Číslo šarže:
4. Minimální množství faktoru VIII, celkové množství proteinů, povaha a množství všech přidaných látek:
5. Povaha a objem rozpouštědla:
6. Počet dárců v šarži:
7. Titr hemaglutininů nejvýše 1:32 nebo krevní skupina AB0
8. Datum přípravy:
9. Použitelné do:
10. Chraňte před světlem a skladujte zmrazené při teplotě nižší než -30°C nebo sušené při teplotě nižší než 5°C .
11. Po rekonstituci produktu aplikujte intravenózně okamžitě nebo nejpozději po třech hodinách skladování při teplotě 20°C .

PŘÍLOHA 8 PROTOKOLU

RADA EVROPY

EVROPSKÁ DOHODA O VÝMĚNĚ LÉČEBNÝCH LÁTEK LIDSKÉHO PŮVODU

1. Jméno a adresa výrobce:
2. Sušený lidský koagulační faktor IX:
- Ostatní přítomné koagulační faktory:
- Způsob přípravy:
3. Číslo šarže:
4. Minimální množství faktoru IX, celkové množství proteinů, povaha a množství všech přidaných látek:
5. Povaha a objem rozpouštědla:
6. Počet dárců v šarži:
7. Datum přípravy:
8. Použitelné do:
9. **Chraňte před světlem a skladujte při teplotě nižší než 5°C.**
10. **Po rekonstituci produktu okamžitě aplikujte intravenózně.**

PŘÍLOHA 9 PROTOKOLU

RADA EVROPY

EVROPSKÁ DOHODA O VÝMĚNĚ LÉČEBNÝCH LÁTEK LIDSKÉHO PŮVODU

1. Jméno a adresa výrobce:
2. Sterilní, nepyrogenní, destilovaná voda
Pro rekonstituci sušené lidské plazmy
sušeného lidského albuminu
sušeného lidského fibrinogenu
nebo sušených lidských koagulačních faktorů VIII a IX
3. Množství: ml

PŘÍLOHA 10 PROTOKOLU

RADA EVROPY

**EVROPSKÁ DOHODA O VÝMĚNĚ LÉČEBNÝCH LÁTEK LIDSKÉHO
PŮVODU**

1. Jméno a adresa výrobce:
2. Transfúzní set pro podávání plné lidské krve, rekonstituované sušené lidské plazmy, lidského albuminu, stálých roztoků proteinů lidské plazmy, lidského fibrinogenu nebo sušeného nebo zmrazeného lidského koagulačního faktoru VIII nebo sušeného lidského koagulačního faktoru IX.

PŘÍLOHA II PROTOKOLU

RADA EVROPY

EVROPSKÁ DOHODA O VÝMĚNĚ LÉČEBNÝCH LÁTEK LIDSKÉHO PŮVODU

NETOXCITA PLASTOVÝCH SOUPRAV PRO KREVŇÍ TRANSFÚZI

I. CHEMICKÉ ZKOUŠKY

Zkoušky se provádějí v plastových zařízeních pro krevní transfúzi. Tato plastová zařízení tvoří dvě hlavní kategorie pomůcek:

1. plastové nádoby pro sběr, oddělování a skladování krve a krevních produktů;
2. plastové soupravy pro odběr a podávání krve.

Zkoušky plastového materiálu se provádějí po jeho sterilizaci způsobem, který se použije pro závěrečnou sterilizaci soupravy. Jde o tento materiál:

1. plastový materiál, z něž jsou vyrobeny nádoby;
2. hadičky umístěné v nádobách;
3. soupravy na odběr a podávání krve.

Zkoušky nádob se provádějí před tím, než se naplní antikoagulačním roztokem. Pokud se však zkoušky provádějí u nádob, které již byly naplněny antikoagulačním roztokem, pak při vyhodnocování jejich výsledků je třeba vzít v úvahu limitní zkoušky provedené v samotném antikoagulačním roztoku, které jsou popsány v části III protokolu.

Výrobce transfúzního zařízení je povinen sdělit příslušným zdravotním orgánům podrobné údaje o složení plastového materiálu nebo materiálů i dalších materiálů použitých při výrobě tohoto zařízení, jakož i údaje o původu složek materiálu nebo materiálů, způsobu jejich výroby (nebo referenční čísla látek), podrobnosti o výrobě zařízení, povahu všech přísad a pojidel použitých při výrobě a způsob sterilizace. Jakoukoliv změnu těchto materiálů a postupů lze uskutečnit až poté, kdy byl o ní informován příslušný zdravotní orgán a kdy ji tento orgán schválil.

Všechny šarže surovin použitých při výrobě zařízení se označí číslem šarže, které výrobce uvede na zařízení společně s identifikačními čísly všech šarží transfúzních

souprav vyrobených z uvedených surovin a výsledky všech analýz, které u nich byly provedeny.

V každé fázi výroby je třeba učinit všechna možná preventivní opatření s cílem snížit riziko náhodné kontaminace.

A. Příprava extraktu a slepého vzorku

- a) Pro uskutečnění níže popsané zkoušky v plném rozsahu se použije 1250 cm² plastového materiálu (celková plocha obou povrchů vzorku, který tvoří plastová fólie o ploše 625 cm² na každé straně). Vzorek, na němž není žádné písemné značení nebo etiketa, se nařeže na kousky o maximální velikosti 10 cm².

Délka (L) hadiček v cm se vypočte podle tohoto vzorce:

$$L = \frac{1250}{3,14 (D_1 + D_2)},$$

kde:

D₁ = vnitřní průměr v cm,

D₂ = vnější průměr v cm.

Hadičky je třeba podélně rozřezat na kusy asi 10 cm dlouhé. Pro extrakci se použije 10 ml vody na 50 cm² povrchu.

- b) Nařezané kousky plastové fólie nebo hadiček se vloží do nádoby z borosilikátového skla s 250 ml nepyrogenní destilované vody získané z účinného destilačního přístroje, který je vybaven skleněnými kondenzačními plochami a sběracími trubičkami¹. Otvor nádoby se uzavře kádinkou dnem vzhůru a nádoba se po dobu 30 minut zahřívá v nasycené páře při teplotě 110°C (v autoklávu), rychle se ochladí na teplotu okolí a potom se dolije nepyrogenní destilovaná voda tak, aby celkový objem byl 250 ml. Případnému mírnému slepení jednotlivých plastových vzorků není nutné věnovat pozornost.

Tepelně citlivý plastový materiál lze zahřívát po dobu 72 hodin při teplotě 70°C místo ohřevu v autoklávu.

Odpovídající slepý roztok se připraví bez použití plastových materiálů.

¹ Pokud jde o plastový materiál, který byl ve styku s antikoagulačním roztokem, nařezané kousky je nejprve třeba vložit do podobné nádoby se studenou destilovanou vodou (100 ml) a několikrát protřepat. Tento postup je nutné ještě jednou zopakovat.

B. Zkoušky extraktu

1. *Oxidovatelné látky*

Ke 20 ml extraktu v Erlenmeyerově baňce z borosilikátového skla se přidá 20 ml dvoumilimolového roztoku manganistanu draselného na litr a 1,0 ml jednomolového roztoku kyseliny sírové na litr a směs se nechá 3 minuty povařit. Roztok se rychle ochladí a přidá se 100 mg jodidu draselného a 5 kapek roztoku škrobu. Titruje se roztokem obsahujícím 10 milimolů thiosíranu sodného na litr a současně se provádí titrace slepým roztokem. Rozdíl mezi množstvím thiosíranu použitým v obou titracích nesmí být větší než 2,00 ml roztoku obsahujícího 10 milimolů thiosíranu sodného na litr.

2. *Chlorid*

Extrakt splňuje příslušnou limitní zkoušku na chloridy odpovídající nejvýše 11,2 μmol chloridu na litr.

3. *Amoniak*

Extrakt splňuje příslušnou limitní zkoušku na amoniak odpovídající nejvýše 120 μmol NH_3 na litr.

4. *Kyselina fosforečná - fosforečnan*

Extrakt splňuje limitní zkoušku na fosforečnany.

Limitní zkouška na fosforečnany

V Kjeldahlově baňce se nechá odpařit 25 ml extraktu téměř do sucha, zbytek se ochladí, přidají se dvě kapky kyseliny sírové a 1 ml kyseliny dusičné; směs se zahřívá, dokud se neobjeví bílé páry, a potom se zchladí. Přidá se jedna kapka kyseliny chloristé a půl hodiny se pomalu zahřívá. Zbytek se ochladí a doplní se vodou do 25 ml. 10 ml roztoku se přeneso do titrační baňky na 25 ml, přidá se 8 ml roztoku molybdenu amonného a kyseliny sírové a 2 ml čerstvě připraveného roztoku kyseliny askorbové o koncentraci 100 g/l. Po dobu 30 minut se zahřívá ve vodní lázni při teplotě 50°C, ochladí se a směs se zředí na 25 ml. Zelená nebo modrá barva roztoku není intenzivnější než barva 25 ml slepého roztoku, u nějž byla provedena stejná zkouška.

5. *Kyselost nebo zásaditost*

10 ml extraktu se po přidání dvou kapek roztoku fenolftaleinu nezbarví červeně; k dosažení červeného zbarvení stačí přidat 0,4 ml roztoku 10 milimolového hydroxidu sodného v litru. Po odstranění tohoto zbarvení tím, že se přidá 0,8 ml roztoku 10 milimolů kyseliny chlorovodíkové v jednom litru, se přidá 5 kapek červeného roztoku metylu a extrakt se zbarví červeně nebo oranžovo-červeně.

6. *Zbytek po odpařování*

Nechá se odpařit 100 ml extraktu do sucha ve vodní lázni a suší se při teplotě 105°C na konstantní hmotnost. Zbytky neváží více než 5,0 mg.

7. *Čiřost a barva*

Při pohledu přes tloušťku 5 cm se extrakt jeví čirý a bezbarvý v porovnání se slepým roztokem.

8. *Chuť a zápach*

Extrakt je v porovnání se slepým roztokem bez chuti a zápachu.

9. *Speciální prvky*

Extrakt splňuje příslušné limitní zkoušky na

- i) kterýkoliv z následujících prvků: arzén, chróm, měď, olovo, křemík, stříbro a cín, odpovídající 1 µg/g;
- ii) kadmium odpovídající 0,1 µg/g.

10. *Nespalitelný zbytek*

Zbytek z 1,0 g plastového materiálu spalovaného na konstantní hmotnost nesmí být vyšší než 1 mg.

11. *Těžké kovy*

Nespalitelný zbytek se rozpustí v minimálním množství roztoku dvoumolární kyseliny chlorovodíkové na litr, v případě potřeby se zahřeje. Provede se příslušná limitní zkouška na těžké kovy. Plastový materiál musí splňovat limit nepřekračující 5 µg/g, vypočítaný jako olovo.

II. BIOLOGICKÉ ZKOUŠKY

1. Zkouška na zjištění nadměrné toxicity se provádí při počáteční analýze složení plastového materiálu určeného k výrobě nádob a souprav pro odběr a transfúzi, a to pomocí extraktu A a u každé nové šarže materiálu se schváleným složením pomocí extraktu B s použitím postupu stanoveného vnitrostátním lékopisem nebo jinou metodou schválenou vnitrostátním kontrolním orgánem (složení extraktů A a B je uvedeno v poznámce níže).
2. Zkouška na nepřítomnost pyrogenů se provádí při počáteční analýze složení plastového materiálu určeného k výrobě nádob a souprav pro odběr a transfúzi, a to pomocí extraktu A a u každé nové šarže materiálu se schváleným složením pomocí extraktu C, jakož při běžné kontrole nádob a souprav pro odběr a transfúzi pomocí extraktu C s použitím postupu

Revidovaný překlad právního předpisu Evropských společenství

stanoveného vnitrostátním lékopisem nebo jinou metodou schválenou vnitrostátním kontrolním orgánem.

O rozsahu zkoušek na nepřítomnost pyrogenů rozhoduje vnitrostátní kontrolní orgán. (Složení extraktů A a C je uvedeno v poznámce níže).

3. Analýza hemolytických účinků v pufrčním systému se provádí při počáteční analýze složení plastového materiálu určeného k výrobě nádob a souprav pro odběr a podávání krve a u každé nové šarže materiálu se schváleným složením, a to pomocí extraktu popsaného v části I oddílu A výše. (Metoda a přijatelné limity jsou uvedeny v dodatku k této příloze).
4. Zkouška přežití červených krvinek *in vivo* se provádí při počáteční analýze složení plastových materiálů určených k výrobě krevních konzerv. Pokud dojde k jakékoliv změně schváleného složení materiálu, zkouška se opakuje. (Navrhované metody a přijatelné limity jsou uvedeny v dodatku k této příloze).

Poznámka:

Extrakt A:

K extraktu popsanému v části I oddílu A výše se přidává nepyrogenní chlorid sodný, dokud není dosaženo konečné koncentrace 9 gramů chloridu sodného na litr.

Extrakt B:

Transfúzní souprava: transfúzní souprava se co možná nejvíce naplní sterilním nepyrogenním roztokem obsahujícím 9 g chloridu sodného na litr, oba konce se pevně sepnou svorkami a takto naplněná souprava se ponoří na 1 hodinu do vody udržované při teplotě 85°C.

Plastová nádoba: je-li v nádobě antikoagulační roztok, je třeba jej vylít a nádobu dvakrát propláchnout 250 ml sterilní, nepyrogenní destilované vody o teplotě 20°C. Do nádoby se nalije 100 ml sterilního nepyrogenního roztoku obsahujícího 9 gramů chloridu sodného na litr, nádoba se bezpečně uzavře a ponoří na 1 hodinu v horizontální poloze do vody udržované při teplotě 85°C. Obsah nádoby se odebere.

Extrakt C:

Transfúzní souprava: 40 ml sterilního nepyrogenního roztoku chloridu sodného o koncentraci 9 gramů na litr při teplotě prostředí se použije k propláchnutí nejméně 10 transfúzních souprav, průtokem asi 10 ml/min. a odtékající kapalina se zachytí. Takto získaný roztok se analyzuje.

Plastová nádoba: nádoba se vyprázdní; 100 ml sterilního nepyrogenního roztoku chloridu sodného o koncentraci 9 gramů na litr při teplotě prostředí se použije k propláchnutí sběrných hadiček nejméně čtyř plastových nádob, nechá se v nádobách 10 minut a odtékající kapalina se zachytí při odtoku z přechodných hadiček.

Plastová nádoba obsahující antikoagulant (viz oddíl III).

III. POŽADAVKY NA ANTIKOAGULAČNÍ ROZTOK V PLASTOVÝCH NÁDOBÁCH

Každá nádoba musí obsahovat množství antikoagulačního roztoku uvedené na etiketě pro objem krve, která má být odebrána; složení tohoto roztoku musí odpovídat složení uvedenému na etiketě pro daný objem krve.

Antikoagulační roztok a/nebo složky použité při jeho přípravě musí splňovat požadavky vnitrostátního lékopisu příslušného státu.

Antikoagulační roztok musí splňovat požadavky vnitrostátního lékopisu příslušného státu týkající se limitů pro těžké kovy, nepřítomnosti pevných částic a pyrogenů a netoxicity.

Dodatek

BIOLOGICKÁ ANALÝZA: LIMITY A METODY

A. Analýza ke zjištění nadměrné toxicity

(Viz oddíl II odst. 1 výše uvedené přílohy): limity uvedené ve vnitrostátním lékopisu.

B. Analýza ke zjištění nepřítomnosti pyrogenů

(Viz oddíl II odst. 2 přílohy): limity uvedené ve vnitrostátním lékopisu.

C. Analýza hemolytických účinků v pufracním systému

(Viz oddíl II odst. 3 přílohy):

a) *Limity:*

Roztok 5,0 gramů chloridu sodného na litr nesmí vytvořit hodnotu hemolýzy vyšší než 10 % a hodnota hemolýzy slaného roztoku 4,0 gramů chloridu sodného na litr nesmí vykazat více než desetiprocentní rozdíl v porovnání s hodnotou, jíž bylo dosaženo u příslušného slepého roztoku.

b) *Metoda:*

Z tlumivého roztoku pro hemolýzu se připraví tři roztoky: 30 ml matečného roztoku a 10 ml vody (roztok a_0), 30 ml matečného roztoku a 20 ml vody (roztok b_0) a 15 ml matečného roztoku a 85 ml vody (roztok c_0).

Do každé ze tří odstředivkových zkumavek (1, 2, 3) se přidá 1,40 ml extraktu. Do zkumavky 1 se přidá 0,10 ml roztoku a_0 , do zkumavky 2 se přidá 0,10 ml roztoku b_0 a do zkumavky 3 0,10 ml roztoku c_0 . Vzniknou tak slané roztoky o koncentraci 5,0 g NaCl/litr (zkumavka 1), 4,0 g NaCl/litr (zkumavka 2) a 1,0 g NaCl/litr (zkumavka 3), pokud jde o osmotický účinek elektrolytu. Do každé zkumavky se přidá 20 μ l čerstvé, dobře promíchané heparinizované lidské krve. Zkumavky se vloží do vodní lázně o teplotě 30°C (\pm 1°C) na dobu 40 minut. Potom se připraví tři roztoky obsahující 3,0 ml roztoku a_0 s 12,0 ml vody (roztok a_1), 4,0 ml roztoku b_0 s 11,0 ml vody (roztok b_1) a 4,75 ml roztoku b_0 s 10,25 ml vody (roztok c_1).

Do první zkumavky se přidá 1,50 ml roztoku a_1 , do druhé 1,50 ml roztoku b_1 a do třetí 1,50 ml roztoku c_1 . Zkumavky se odstředí po dobu 5 minut rychlostí 2000 – 2500 otáček za minutu ve výkyvné odstředivce. Současně se pro každou koncentraci připraví slepé roztoky, v nichž se extrakt nahradí vodou.

Měří se extinkce kapalné vrstvy při 540 nm. Jako referenční roztok se používá čistý matečný tlumivý roztok. Hodnota hemolýzy v procentech se vypočte podle tohoto vzorce:

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

kde

$E_{100\%}$ = extinkce u roztoku o koncentraci 1,0 gram chloridu sodného na litr

a

E_{exp} = extinkce u roztoků o koncentraci 4,0 a 5,0 gramů chloridu sodného na litr.

Matečný tlumivý roztok pro měření hodnoty hemolýzy

90,0 g chloridu sodného, 13,7 g bezvodého fosforečnanu sodného a 1,90 g bezvodého dihydrofosforečnanu sodného se rozpustí v destilované vodě a doplní se na 1000,0 ml.

D. **Zkouška přežití červených krvinek *in vivo***

(Viz oddíl II odst. 4 přílohy):

a) *Limit:*

24 hodin po transfúzi musí přežít nejméně 70 % červených krvinek v plné lidské krvi za přítomnosti antikoagulačního roztoku ACD, která byla uložena po dobu 21 dní při teplotě 4 – 6°C. Toto lze stanovit pomocí jedné z metod uvedených níže v písmenu b).

b) *Navrhované metody:*

1. Metoda ISO/TC/76/WGD/3, dodatek E.
2. Ashbyho metoda – 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. a Rafferty, J.A.: Differential agglutination of human erythrocytes.
J. Lab. Clin. Med. 32: 489-501, 1947.
3. Gibson-Scheitlinova metoda – Gibson, J.G. a Sheitlin, 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.

Revidovaný překlad právního předpisu Evropských společenství

4. Strumiova metoda – Strumia, M.M, Taylor, L., Sample, A.B., Colwell, L.S. a Dugan A.: Uses and limitations of survival studies of erythrocytes tagged with Cr 51. Blood 10: 429-40, 1955.
5. Metoda Cr⁵¹-I¹²⁵ – Button, L.N., Gibson, J.G a Walter, C.W: Simultaneous determination of the volume of red cells and plasma for survival studies of stored blood. Transfusion 5: 143-148, 1965.
6. Recommended Method for Radioisotope Red Cell Survival Studies. Brit. J. Haemat. 21: 241, 1971,

Ve Štrasburku dne 19. dubna 1982

Franz ARASEK
Generální tajemník

Kopie ověřená podle jediného původního vyhotovení v jazyce anglickém a francouzském uloženého v archivu Rady Evropy.

Erik HARREMOES
Ředitel pro právní záležitosti Rady Evropy