

## **ZKOUŠKA HEMOKOMPATIBILITY I. - TROMBÓZA**

Výsledek č. TH03010288 – V1

Číslo projektu: **TH03010288**

Název projektu: **Využití zkoušek hemokompatibility pro zdravotnické prostředky na bázi pokročilých materiálů**

## 1. Účel

Účelem SOP je stanovení postupu při hodnocení trombózy *in vitro* u biologického hodnocení zdravotnických prostředků zahrnujících zkoušky na interakce s krví v souladu s normou ČSN EN ISO 10993-4.

## 2. Definice, zkratky

**Trombóza** – tvorba trombu *in vivo*, *ex vivo* nebo za simulovaných podmínek *in vitro*, způsobená aktivací koagulačního systému a destiček v tekoucí plné krvi

**Trombus** – koagulovaná směs červených krvinek, agregovaných destiček, fibrinu a buněčných elementů

**Koagulace** – jev, který je důsledkem aktivace kaskády srážecích (koagulačních) faktorů

**Hematologie** – studium krve, jehož součástí je kvantitativní stanovení buněčných a plazmatických složek krve

**Destičky** – bezjaderná buněčná tělíska přítomná v krvi a přispívající k procesu trombózy krve tím, že adherují k povrchům, uvolňují faktory a/nebo agregují za vzniku hemostatické uzávěry

**Destičky adherující** – materiál nebo zdravotnický prostředek, který má tendenci umožňovat nebo podporovat uchycení destiček na svém povrchu

**Antikoagulans** – činidlo, které brání nebo oddaluje koagulaci krve (heparin, EDTA, citrát sodný)

**Hemokompatibilní** – snášenlivý s krví: zdravotnický prostředek nebo materiál zdravotnického prostředku, který je schopen přicházet do styku s krví aniž by způsobil jakékoli znatelné klinicky významné nepříznivé reakce, jako je trombóza, hemolýza, aktivace destiček, leukocytů a komplementu a nebo jinou s krví související nepříznivou událost

**Plná krev** – nefrakcionovaná krev odebraná od lidského dárce

**ELISA** – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay – heterogenní enzymová imunoanalýza

**FPA** – fibrinopeptid

**PLT** – počet krevních destiček

**PF-4** – destičkový faktor

**KO** – krevní obraz

**WBC** – celkový počet leukocytů

**RBC** – erytrocyty

**HGB** – hemoglobin

**HCT** – hematokrit

**MCV** – střední objem erytrocytů

#### **4. Textová část**

Text tohoto SOP byl vypracován v souladu s normou:

- ČSN EN ISO 10993-4 Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 4: Výběr zkoušek na interakce s krví, Prosinec 2017

##### **4.1. Princip metody**

V první fázi testování - fáze expozice, bude vybraný zdravotnický prostředek vystaven interakci s krví za definovaných podmínek. Jako testovací systém bude použita krev od dobrovolných dárců ošetřená antikoagulantem. Expozice bude provedena v Chandlerově smyčce, která simuluje fyziologický krevní tok.

Po fázi expozice bude následovat zpracování krve a změření jednotlivých požadovaných parametrů.

##### **4.2. Měřené parametry**

###### **a) zkoušky *in vitro***

###### **Koagulace**

- ELISA FPA (fibrinopeptid)

###### **Aktivace destiček**

- Počet trombocytů (PLT)
- Destičkový hematokrit (PCT)
- ELISA PF-4

###### **Hematologie**

- Celkový krevní obraz:
  - Celkový počet leukocytů (WBC)
  - Počet červených krvinek (RBC)

- Koncentrace hemoglobinu (HGB)
- Střední objem erytrocytu (MCV)
- Hematokrit (HCT)
- Aktivace leukocytů - počet bílých krvinek (WBC)

#### b) zkoušky *ex-vivo*

### Makroskopická analýza zdravotnického prostředku

- mikroskopické hodnocení povrchu

### 4.3. Kritéria kvality

- Výsledky koncentrací koagulačních markerů jsou u pozitivní kontroly  $\geq 20\%$  v porovnání s výsledky negativní kontroly (FPA vzorku:  $PK \geq 20\%NK$ )
- Výsledky stanoveného množství destiček jsou u negativní kontroly  $\geq 20\%$  v porovnání s výsledky pozitivní kontroly (PLT vzorku:  $NK \geq 20\%PK$ )
- Výsledky koncentrací markerů aktivace destiček jsou u pozitivní kontroly  $\geq 20\%$  v porovnání s výsledky negativní kontroly (PF-4 vzorku:  $PK \geq 20\%NK$ )
- Výsledné hodnoty krevního obrazu (KO) po expozici jsou u hemokompatibilního materiálu co nejblíže hodnotám negativní kontroly, pro přijetí materiálu odchýleny maximálně o  $20\%$ .
- Výsledky stanoveného množství leukocytů jsou u negativní kontroly  $\geq 20\%$  v porovnání s výsledky pozitivní kontroly (WBC vzorku:  $NK \geq 20\%PK$ )

### 4.4. Kontroly

**Negativní kontrola** – jako negativní kontrola slouží BPT hadičky o délce 30 cm a průměru 4,80 mm bez přidaného zdravotnického prostředku.

**Pozitivní kontrola** – jako pozitivní kontrola slouží hadičky z černé gumy o průměru 4,80 mm a délce 30 cm, nebo BPT hadičky naplněné borosilikátovými skleněnými kuličkami.

### 4.5. Popis metody

Metoda slouží k hodnocení trombózy pomocí *in vitro* a *ex vivo*. Hodnotí se koagulační aktivita tj. stupeň změny krevních hladin proteinu vedoucích k trombinu a tvorbě fibrinu. Dále pak počet krevních destiček a jejich aktivace a celkový krevní obraz.

KO poskytuje informace o vlivu interakcí zdravotnického prostředku s tvořenými krevními elementy. Počty destiček a leukocytů před a po působení zdravotnického prostředku jsou důležité pro odhad ztráty aktivovaných destiček a leukocytů zachycených při tvorbě trombu.

Aktivační proteiny FPA a PF-4 se stanovují pomocí komerčních ELISA souprav, KO a počet destiček pomocí hematologického analyzátoru.

## 4.6. Provedení zkoušky

### • 4.6.1. Odběr krve

Pro *in vitro* testování hemokompatibility se využívá lidská krev dobrovolných zdravých dárců. Dárci jsou před odběrem seznámeni s účelem využití darované krve a podepíší informovaný souhlas dobrovolného dárce s odběrem periferní krve pro vědecké (výzkumné) účely. Odběr probíhá vždy ráno na lačno v prostorách laboratoře VUOS odběrovou zdravotní sestrou. Odběr žilní krve probíhá při poloze v sedě z paže dárce. Místo vpichu je těsně před odběrem dezinfikováno. Zatažení paže by nemělo trvat déle než jednu minutu. Po nabodnutí žíly je nutné turniket z paže sundat a vyhnout se pumpování paže.

Krev je odebírána vakuovým systémem do zkumavek VACUETTE bez přísad. Objem jedné zkumavky je 4 ml a jednomu dárci je odebráno celkem šest zkumavek. Při použití vakuových systémů se vloží vhodná jehla do držáku, palcem pod místem odběru se stabilizuje poloha žíly, provede se venepunkce a poté se postupně nasazují zkumavky. Vakuová zkumavka se nesmí nasadit na vnitřní jehlu držáku před venepunkcí, protože by se vakuum ve zkumavce narušilo. Jakmile krev začne pomocí vakua vtékat do zkumavky, lze odstranit turniket. Vakuum ve zkumavce zajistí přiměřené naplnění zkumavky na požadovaný objem.

Ihned po odběru je do každé zkumavky aplikován heparin v celkovém poměru 1,7 IU/ml. Tedy 1,36 µl zásobního injekčního roztoku 5000 IU/ml do 4 ml krve. Krev je s antikoagulantem promíchána pomocí jemného opakovaného převrácení zkumavek.

### • 4.6.2. Expozice krve testovanému zdravotnickému prostředku

Expozice probíhá v systému Chandlerovy smyčky, která je složena z vodní lázně a rotoru s držákem na hadičky naplněné krví. Vodní lázeň se naplní vodou tak, aby hladina dosahovala prostředního šroubu držáku hadiček. Termostat se nastaví na 37 °C a zapne se ohřev. K zahájení ohřevu je nutná dostatečná hladina vody a připojený rotor k vodní lázni. Přidání 5 gramů kyseliny citrónové (přibližně jedna odměrná lžička) zvýší životnost kovových částí přístroje. Při ohřevu se doporučuje zapnout rotor, aby se usnadnilo promíchání ohřáté vody. Pokud se voda ohřeje nad požadovaných 37 °C, odebereme dva litry vody pomocí odměrné nádoby a doplníme studenou vodou. Necháme ustálit teplotu a vložíme vzorky k testování.

Testovaný sterilní zdravotnický materiál vytvoří smyčku o délce 30 cm, která je naplněna krví. Hadičku předtím propláchneme fyziologickým roztokem (0,9% NaCl). Jako negativní kontrola slouží BPT hadičky o stejné délce. Pozitivní kontrolu tvoří hadičky z černé gumy o průměru 4,80 mm a délce 30 cm, případně BPT hadičky naplněné borosilikátovými skleněnými kuličkami. Kontrolní hadičky také propláchneme fyziologickým roztokem před naplněním krví. Všechny vzorky testujeme v duplikátech, tedy 2 x ZP, 2x NK, 2x PK na jednoho dárce krve.

Takto připravené hadičky naplníme krví. Krev před aplikací promícháme převrácením zkumavek. Do každé hadičky nasajeme pomocí podtlaku obsah jedné odběrové zkumavky. Podtlak vytvoříme tak, že jeden konec hadičky vložíme do zkumavky s krví a na druhý konec umístíme 10ml injekční

stříkačku a pomalu táhneme píst do takové pozice, dokud se hadička nenaplní krví. Naplněné hadičky spojíme do kruhu pomocí 2 cm dlouhých spojovacích hadiček a větším průměru (MPH 9 x 11,4 mm).

Naplněné hadičky uzavřené do kruhu připevníme pomocí klipů do držáku Chandlerovy smyčky a zapneme rotaci na 15 RPM. Necháme rotovat 30 minut při teplotě vody 37 °C. Po skončení expozice sundáme hadičky z přístroje a vypustíme krev do uzavíratelných 2ml zkumavek.

- **4.6.3. Zpracování krve – plazma pro FPA a PF-4**

Exponovanou krev v 2ml zkumavkách necháme centrifugovat při 4 °C a 1500 x g (přibližně 4000 RPM) po dobu 15 minut. Poté odebereme oddělenou plazmu do nových zkumavek. Plazmu použijeme pro další testování a nebo pokud potřebujeme nashromáždit větší počet vzorků, vzorky necháme zamrazit v hluboko mrazicím boxu při – 80 °C pro pozdější testování.

- **4.6.4. Podmínky zkoušky**

*Fáze expozice*

Teplota: 37 ± 2 °C

Délka expozice: 30 min

*Zpracování krve*

Teplota: 4 ± 1 °C

- **4.6.5. Přístroje a zařízení**

- Chandlerova smyčka (vodní lázeň s teplotou 37°C)
- odběrové zkumavky VACUETTE bez přísad
- BPT hadičky
- hadičky z černé gumy
- 2 ml zkumavky
- hlubokomrazicí box
- termostat
- hematologický analyzátor
- chlazená centrifuga
- spektrofotometr
- obvyklé laboratorní vybavení

- **4.6.6. Měření**

## Koagulace

### Měření koncentrace fibrinopeptidu A (FPA)

Před začátkem ELISA testu necháme pozvolna rozmrazit vzorky a vytemperovat na pokojovou teplotu stejně jako jednotlivé reagentie ELISA kitu. Analýzu provedeme podle návodu výrobce. Do 96jamkové destičky aplikujeme vzorky a standardy o známých koncentracích minimálně

v duplikátech po 100 µl v každé jamce. Destičku inkubujeme při 37 °C po dobu dvou hodin a následně po jejím vyprázdnění přidáme biotinovou protilátku. Inkubujeme při 37 °C další hodinu. Poté destičku třikrát promyjeme a aplikujeme do každé jamky 100 µl HRP avidinu. Inkubujeme po dobu jedné hodiny a znovu promyjeme. Promytí opakujeme pětkrát. Do každé jamky napipetujeme 90 µl TMB substrátu a inkubujeme 15 – 30 minut při 37 °C chráněné před světlem. Nakonec přidáme 50 µl stopovacího roztoku a změříme optickou denzitu pomocí spektrofotometru Epoch (BioTek). V softwaru Gen 5 vytvoříme kalibrační křivku a získáme hodnoty koncentrací jednotlivých vzorků.

## **Aktivace destiček**

### Počet trombocytů a destičkový hematokrit

Pro měření počtu trombocytů a destičkového hematokritu se krev již nijak nezpracovává a po fázi expozice je co nejrychleji je provedeno měření na analyzátoru Nihon Kohden MEK-6500 Celltac Alpha (Nihon Kohden, Japonsko). Analyzátor Celltac α je plně automatizovaný analyzátor pro diagnostiku krevních vzorků. Obsluha přístroje je popsána ve Standardním operačním postupu č. 126.

### Měření koncentrace destičkového faktoru 4 (PF-4)

Před začátkem ELISA testu necháme pozvolna rozmrazit vzorky a vytemperovat na pokojovou teplotu stejně jako jednotlivé reagenty ELISA kitu. Analýzu provedeme podle návodu výrobce. Do 96jamkové destičky aplikujeme vzorky a standardy o známých koncentracích minimálně v duplikátech po 100 µl v každé jamce. Destičku inkubujeme při 37 °C po dobu dvou hodin a následně po jejím vyprázdnění přidáme biotinovou protilátku. Inkubujeme při 37 °C další hodinu. Poté destičku třikrát promyjeme a aplikujeme do každé jamky 100 µl HRP avidinu. Inkubujeme po dobu jedné hodiny a znovu promyjeme. Promytí opakujeme pětkrát. Do každé jamky napipetujeme 90 µl TMB substrátu a inkubujeme 15 – 30 minut při 37 °C chráněné před světlem. Nakonec přidáme 50 µl stopovacího roztoku a změříme optickou denzitu pomocí spektrofotometru Epoch (BioTek). V softwaru Gen 5 vytvoříme kalibrační křivku a získáme hodnoty koncentrací jednotlivých vzorků.

## **Hematologie**

Pro měření základních parametrů krevního obrazu (KO) se krev již nijak nezpracovává a po fázi expozice je co nejrychleji provedeno měření na analyzátoru Nihon Kohden MEK-6500 Celltac Alpha (Nihon Kohden, Japonsko). Analyzátor Celltac α je plně automatizovaný analyzátor pro diagnostiku krevních vzorků. Obsluha přístroje je popsána ve Standardním operačním postupu č. 126.

## **Makroskopická analýza zdravotnického prostředku**

Základní součástí hodnocení zdravotnického prostředku je makroskopická analýza. Po odstranění krve zdravotnický prostředek jemně opláchneme fyziologickým roztokem (0,9% NaCl), abychom odstranily neadherované krevní buňky. K analýze povrchu se využije stereomikroskop a dle stupnice se zhodnotí adheze krevních buněk na povrchu materiálu.

Tabulka č.1 Pro kvantifikaci adheze je navržen skórovací systém:

Adheze trombocytů	Pokrytí povrchu [%]	Hodnocení
Nevýznamná	0 – 10	0
Nízká	10 - 25	+
Střední	25 – 50	++
Vysoká	nad 50	+++

#### 4.6.7. Hodnocení výsledků měření

##### Koagulace

##### FPA – fibrinopeptid A

Porovnáme získané koncentrace FPA vzorků vystavených expozici testovaného zdravotnického materiálu s hodnotami kontrol. Výsledkem je kvantitativní odhad množství vytvořeného fibrinu, který odráží úroveň koagulační aktivity. Čím vyšší je obsah FPA v plazmě oproti negativní kontrole, tím více daný zdravotnický prostředek aktivoval koagulační kaskádu krve a je tedy z hlediska hemokompatibility méně vhodný k *in vivo* aplikaci.

##### Aktivace destiček

##### Počet trombocytů a destičkový hematokrit

Počet destiček je porovnán před expozicí a po expozici zdravotnického prostředku. Významný pokles destiček je způsoben adhezí, agregací, odloučením destiček nebo vznikem trombu na zdravotnických prostředcích.

##### Měření koncentrace PF-4

PF-4 je protein nacházející se v alfa granulách destiček, který se ve velkém množství uvolňuje po aktivaci destiček. Porovnáme získané koncentrace PF-4 vzorků vystavených expozici testovaného zdravotnického materiálu s hodnotami kontrol. Výsledkem je koncentrace PF-4 v daných vzorcích, která odráží úroveň aktivace destiček. Čím vyšší je obsah PF-4 v plazmě oproti negativní kontrole,



**T A**

**Č R**

tím více daný zdravotnický prostředek aktivoval krevní destičky a je tedy z hlediska hemokompatibility méně vhodný k *in vivo* aplikaci.

## **Hematologie**

### Krevní obraz

Výsledné hodnoty krevního obrazu (KO) po expozici jsou u hemokompatibilního materiálu co nejbližší hodnotám negativní kontroly, pro přijetí materiálu odchýleny maximálně o 20 %.

### Aktivace leukocytů

Aktivace leukocytů je hodnocena na základě analýzy počtu bílých krvinek, tedy na základě hodnoty WBC získané pomocí hematologického analyzátoru. Snížení hodnoty WBC signalizuje aktivaci leukocytů, případně jejich adhezi na povrchu testovaného ZP. V obou případech se jedná o negativní vliv materiálu na krev.

## **4.7. Závěrečná zpráva**

*Obsahuje minimálně následující informace:*

- popis zdravotnického prostředku
- poměr velikosti zdravotnického prostředku k objemu krve (expoziční poměr)
- popis odběru krve
- použitý antikoagulant
- použitý kit ELISA soupravy
- použité přístroje
- naměřené výsledky
- hodnocení výsledků

## **7. Literatura**

ČSN EN ISO 10993-4 Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 4: Výběr zkoušek na interakce s krví, Prosinec 2017