

ZKOUŠKA HEMOKOMPATIBILITY II. - KOAGULACE

Výsledek č. TH03010288 – V2

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

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

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

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

- Fibrinopeptid A
- D-dimer
- fibrinogen

4.3. Kritéria kvality

- Výsledky koncentrací koagulačních markerů jsou u pozitivní kontroly $\geq 20\%$ v porovnání s výsledky negativní kontroly.
- U stanovení fibrinogenu se výsledek považuje za negativní, pokud jsou hodnoty v fyziologickém rozmezí pro dospělého zdravého člověka tj. 1,8 – 4,2 g/l.
- U stanovení D-dimeru je výsledek považován za negativní, pokud je hodnota nižší než 255 ng/ml.

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 koagulace tj. stupně změny krevních hladin proteinu vedoucích k trombinu a tvorbě fibrinu. Testuje se, zda zdravotnický prostředek nevyvolá nadměrnou koagulační aktivitu, která by mohla představovat riziko pro pacienta. Aktivační proteiny se stanovují pomocí komerčních ELISA souprav, fibrinogen a D-dimer pomocí hemokoagulačního 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 μ l 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. Při ohřevu se doporučuje zapnout rotor, aby se usnadnilo promíchání ohřáté vody. Necháme ustálit teplotu a vložíme vzorky k testování.

Testovaný sterilní zdravotnický materiál umístíme do BPT hadiček o vnitřním průměru 4,80 mm a délce 30 cm. Hadičku předtím propláchneme fyziologickým roztokem (0,9% NaCl). Velikost zdravotnického prostředku by měla odpovídat 3 – 6 cm² na 1 ml krve. Jako negativní kontrola slouží tytéž BPT hadičky o stejné délce a průměru bez přidaného zdravotnického prostředku. Pozitivní kontrolu tvoří hadičky z černé gumy o průměru 4,80 mm a délce 30 cm, nebo BPT hadičky naplněné borosilikátovými skleněnými kuličkami. Kontrolní hadičky také propláchneme fyziologickým roztokem před naplněním krví. Všechny vzorky testujeme v duplikátech, tedy 2 x BPT hadička se vzorkem, 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 o 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**

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 mrazícím 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
- hemokoagulační analyzátor

- chlazená centrifuga
- spektrofotometr
- obvyklé laboratorní vybavení

- **4.6.6. Měření**

Měření koncentrace fibrinopeptidu A (FPA)

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 densitu pomocí spektrofotometru Epoch (BioTek). V softwaru Gen 5 vytvoříme kalibrační křivku a získáme hodnoty koncentrací jednotlivých vzorků.

Doplňkové měření koncentrace fibrinogenu a D-dimeru

Z exponované krve odebereme do samostatných zkumavek 360 µl krve a přidáme 40 µl 3,8% citrátu sodného (poměr 1:9). Dáme na 10 minut do centrifugy na 3000 RPM. Poté odebereme oddělenou plazmu do nových zkumavek a změříme hodnoty D-dimeru a fibrinogenu na analyzátoru ACL ELITE Pro (Instrumentation Laboratory, USA).

- **4.6.7 Hodnocení výsledků měření**

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.

Fibrinogen a D-dimeru

Porovnáme získané výsledky hodnot pro testovaný zdravotnický materiál s kontrolami. Výsledek testu se považuje za negativní, pokud je koncentrace D-dimerů nižší než 255 ng/ml. Fyziologické rozmezí fibrinogenu je u dospělého zdravého člověka 1,8 – 4,2 g/l. Důležité pro hodnocení koagulace je především porovnání hodnot získaných ze vzorků exponovaných testovanému prostředku s hodnotami kontrol. Zvýšené množství D-dimeru, případně fibrinogenu, oproti negativní kontrole, poukazuje na hyperkoagulaci.

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

5. Literatura

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