

ZKOUŠKA HEMOKOMPATIBILITY IV. - HEMATOLOGIE

Výsledek č. TH03010288 – V4

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

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

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 – nefracionovaná krev odebraná od lidského dárce

ZP – zdravotnický prostředek

PK – pozitivní kontrola

NK – negativní kontrola

KO – krevní obraz

WBC – celkový počet leukocytů

RBC – celkový počet erytrocytů

HGB – hemoglobin

HCT – hematokrit

MCV – střední objem erytrocytů

MCH – střední objemem erytrocytu

MCHC – střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytu

PLT – počet trombocytů

Ly – lymfocyty

Mo – monocyty

Gr – granulocyty

MPV – střední objem trombocytů

PCT – destičkový hematokrit

PDW – šíře distribuce trombocytů

3. 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

3.1. Princip metody

V první fázi testování - fáze expozice, je zdravotnický prostředek vystaven interakci s krví za definovaných podmínek. Jako testovací systém se používá krev od dobrovolných dárců ošetřená antikoagulantem. Expozice krve zdravotnickému prostředku se provádí v Chandlerově smyčce, která simuluje fyziologický krevní tok.

Po fázi expozice následuje změření jednotlivých požadovaných parametrů. Hodnocené parametry – viz Popis metody.

3.2. Popis metody

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

Metody měření

Celkový krevní obraz a počet leukocytů se stanovuje pomocí hematologického analyzátoru.

3.3. Provedení zkoušky

Při zkoušce se provádí měření a hodnocení:

- krve exponované zdravotnickým prostředkem
- samotné krve bez ovlivnění zdravotnickým prostředkem – negativní kontrola
- krve exponované materiálem, který způsobuje známé změny hodnocených parametrů - pozitivní kontrola

Exponovanou krev, pozitivní a negativní kontroly testujeme v duplikátech

Kontroly

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

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

- **3.3.1. 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.

- **3.3.2. Expozice krve testovanému zdravotnickému prostředku**

Expozice probíhá v systému Chandlerovy smyčky, která je složena z vodní lázně a rotoru s držákem na hadičky. Používají se hadičky, které jsou komerčně vyráběné.

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 10 ml 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 2 ml zkumavek.

- **3.3.3. Zpracování krve a měření**

Pro měření základních parametrů krevního obrazu se krev po odebrání z Chandlerovy smyčky již nijak nezpracovává a po fázi expozice je co nejrychleji provedeno měření na hematologickém analyzátoru MEK-6500 Celltac Alpha, Nihon Kohden, Japonsko, obsluha viz SOP č. 126.

Po změření se výsledek zobrazí na monitoru. Výsledky jsou vždy hned po měření vytisknuty. Výtisk s výsledky se vlepi na formulář měření na hematologickém analyzátoru viz příloha č.1

- **3.3.4. Podmínky zkoušky**

Fáze expozice

Teplota: 37 ± 2 °C
 Délka expozice: 30 min

Zpracování krve

Teplota: laboratorní

- **3.3.5. 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
- termostat

T A Č R

- hematologický analyzátor
- obvyklé laboratorní vybavení

3.4. Měřené parametry

Celkový krevní obraz:

- **Erytrocyty** (červené krvinky)

RBC (red blood cells) – počet erytrocytů, obvykle v jednotce $10^{12}/l$

HGB – hemoglobin, obvykle v jednotce g/l

HCT – hematokrit,

MCV (mean corpuscular volume) – střední objem erytrocytu, obvykle v jednotce femtolitr (fl)

MCH (mean corpuscular hemoglobin) – střední množství hemoglobinu v erytrocytu, obvykle v jednotce pikogram (pg), vypočítává se na základě vztahu $MCH = HGB/RBC$

MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration) – střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytu, obvykle v jednotce g/l, vypočítává se na základě vztahu $MCHC = HGB/HCT$

- **Leukocyty** (bílé krvinky)

WBC (white blood cells) – počet leukocytů, obvykle v jednotce $10^9/l$

Ly% – lymfocyty relativně

Ly# – lymfocyty absolutně

Mo% – monocyty relativně

Mo# – monocyty absolutně

Gr% – granulocyty relativně

Gr# – granulocyty absolutně

- **Trombocyty** (krevní destičky)

PLT (platelet) – počet trombocytů, obvykle v jednotce $10^9/l$

MPV (mean platelet volume) – střední objem trombocytů, obvykle v jednotce femtolitr

PCT (platelet hematocrit) – destičkový hematokrit, v jednotce ml/l nebo jako bezrozměrné číslo

PDW (platelet distribution width) – šíře distribuce trombocytů, v jednotce fl nebo v procentech

Kritéria akceptovatelnosti experimentu

- Výsledné hodnoty krevního obrazu u negativní kontroly by se měly pohybovat ve fyziologickém rozmezí
- Výsledky stanoveného množství leukocytů jsou u negativní kontroly $\geq 20\%$ v porovnání s výsledky pozitivní kontroly ($NK \geq 20\%PK$)

Pokud nejsou splněna tato kritéria, musí se experiment zopakovat.

3.5. Hodnocení výsledků měření

Krevní obraz

Výsledné hodnoty krevního obrazu (KO) po expozici jsou u exponované krve porovnány s negativní kontrolou. Pro statistické hodnocení bude použit software Statgraphic[®] Centurion (version XVII, USA).

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. Rozdíly v počtu bílých krvinek mezi exponovanou a kontrolní krví se budou hodnotit statisticky.

3.6. Závěrečná zpráva

Obsahuje minimálně následující informace:

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

4. Literatura

T A
Č R

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