



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Studies

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

**Vyšetření krve na celkovou bílkovinu  
a elektroforézu před a po plazmaferéze.**

Vypracoval: Lenka Hanušová

Vedoucí práce: prof. MUDr. Miloš Velemínský, CSc., dr. h. c.

České Budějovice 2014

## **Abstrakt**

### **Vyšetření krve na celkovou bílkovinu a elektroforézu před a po plazmaferéze.**

V mé bakalářské práci se zabývám tématem vyšetření celkové bílkoviny a elektroforézy v séru dárců před a po výkonu plazmaferézy.

Vzorky krve potřebné k laboratornímu výzkumu ve své práci jsem získala od 25. dárců plazmaferetického centra Plasmafera s.r.o. v Českých Budějovicích, kteří souhlasili s účastí ve výzkumu. Po podepsání prohlášení jim byla odebrána 1 zkumavka srážlivé krve ( 7 ml) před zahájením plazmaferézy. Dále proběhl odběr plazmaferézou. Po deseti minutách od ukončení plazmaferézy byla odebrána druhá zkumavka srážlivé krve ( 7 ml) pro můj výzkum.

Během získávání vzorků jsem se seznámila s procesem plazmaferézy, jejíž funkce sloužila k dárcovským účelům a dalšímu zpracování odebrané plazmy, jakožto výchozí suroviny pro výrobu léčiv. Plazmaferéza je separační metoda, jejíž princip spočívá v odběru, separaci plné krve na krvinky a plazmu téměř zbavenou buněčných složek a následnému vrácení krvinek zpět dárci. Při tomto procesu byl dárci napojen na separátor AUTOPHERESIS-C, kterým plazmaferetické centrum disponuje. Tento postup odběru vyžadoval jednojehlovou venepunkci, kdy se pro odběr a následný návrat krve používá pouze jeden žilní přístup. Tento plazmaferetický systém střídá odběrovou a reinfuzní fázi, dokud sběrný vak neobsahuje stanovený objem plazmy. Při fázi odběru je krev s přísadkou antikoagulačního roztoku čerpána do separačního zařízení, kde je plazma oddělena pomocí rotačního membránového filtru a odvedena do příslušného odběrového vaku. U fáze reinfuze dochází k čerpání koncentrované buněčné složky do rezervoáru a postup se opakuje, dokud se rezervoár nenaplní přibližně do  $\frac{3}{4}$ . V tu chvíli se směr čerpání krevního čerpadla obrátí a krvinky jsou z rezervoáru vráceny dárci stejnou aferézni jehlou.

Další část mé bakalářské práce zahrnovala vyšetření 50. vzorků krve, která probíhala ve spolupráci s Laboratoří klinické chemie Nemocnice v Českých Budějovicích, a.s, kde jsem vzorky nejprve identifikovala, vložila do laboratorního informačního systému a vygenerovaným čárovým kódem jsem opatřila příslušné zkumavky se vzorky. Metoda stanovení celkové bílkoviny patří v biochemických laboratořích mezi rutinní metody a je citlivým ukazatelem celkového zdravotního stavu pacienta nebo poukazuje na možné onemocnění ledvin či trávicího traktu. Při mém výzkumu jsem vyšetření prováděla na plně automatizovaném biochemickém analyzátoru ADVIA 1800 od společnosti Siemens. Tento analyzátor pro stanovení celkové bílkoviny využívá principu Biuretovi reakce, kdy proteiny reagují s měďnatými ionty za vzniku fialovomodrého komplexu, který je vhodný k fotometrickému měření.

Druhou fází mého výzkumu bylo vyšetření vzorků elektroforézou. Elektroforéza je metoda taktéž používaná v rutinním biochemickém provozu jako screeningová metoda, která spočívá v separaci látek v elektrickém poli dle jejich relativní elektroforetické pohyblivosti za vzniku 5 frakcí: albumin,  $\alpha$ -1-globulinu,  $\alpha$ -2-globulinu,  $\beta$ -globulinu a  $\gamma$ -globulinu. Elektroforéza sérových bílkovin se provádí zejména po zjištění patologických výsledků celkové bílkoviny nebo pro získání podrobnějších informací o sérových proteinech a jako průkaz dysproteinemií či paraproteinemií. Stanovení elektroforézy jsem prováděla pomocí systému HYDRASYS a setu SEBIA Hydragel 15/30 protein. Systém HYDRASYS provádí elektroforetické kroky po vložení aplikátoru s nanesenými vzorky, nasazení houbiček s pufrům a vložení gelu v sekvencích, kdy se postupně vystřídají všechny kroky jako je aplikace vzorku, migrace, inkubace, barvení a sušení. Získané výsledky byly přeneseny do PC pomocí skenovacího programu Epson Perfection V700 PHOTO a vyhodnoceny v programu PHORESIS.

Během praktické části byla změřena hodnota celkové bílkoviny a elektroforézy v séru u 25. dárců, kdy každý dárců poskytl vzorek krve před odběrem a po výkonu plazmaferézy. S pomocí Plasmafera s.r.o se sídlem v Českých Budějovicích jsem získala cenné rady o chodu celého centra, od příjmu dárců, přes poučení a vyšetření, o

procesu odběru plazmy na automatickém separátoru, vyšetření odebrané plazmy a kritériích podle kterých je řízena následující manipulace a propuštění plazmy k dalšímu zpracování, či likvidace plazmy nevyhovující.

V Laboratoři klinické chemie Nemocnice v Českých Budějovicích, a.s, mi bylo umožněno projít celým laboratorním procesem a pod dohledem laborantky provést stanovení vzorků, jejichž naměřené hodnoty jsou výsledkem mé bakalářské práce.

## **Abstract**

### **Examination total protein and electrophoresis before and after plasmapheresis.**

I apply my mind to the theme of the examination of overall protein and electrophoresis in the donors serum before and after implementation of plasmapheresis in my bachelor work.

I got blood samples needed for the laboratory research of my work from 25 donors of plasmapheretic center Plasmafera s.r.o. in České Budějovice. These donors gave sanction to attending of this research. It was taken one 7 ml test tube of coagulable blood before the beginning of plasmapheresis. It was also taken sample by plasmapheresis. There was pause of 10 minutes after the ending of plasmapheresis and it was taken second 7 ml test tube of coagulable blood after this for my research.

I got to know the process of plasmapheresis while the sampling. Function of the plasmapheresis was an initial ingredient of medicine production in donor purposes and also in following processing of taken plasma. Plasmapheresis is a separation technique and its principle consists in sampling, separation of complete blood into corpuscles and plasma (almost without cell components) and subsequent returning of corpuscles back to the donor. The donor was connected to the separator AUTOPHERESIS-C during this process. This separator is property of the plasmapheretic center. The procedure of sampling requires an "one-needled vein puncture". It means that there is needed just one vein input for the taking and returning of the blood. This plasmapheretic system changes the phases of taking and re-infusing as long as the collecting bag contains the given plasma volume. There is blood with addition of the anticoagulant solution pumped up to separating appliance during the phase of collection. Plasma is afterwards separated by the rotating membrane filter in this separating appliance and it's taken to relevant collection bag. The concentrated cell component is pumped into the reservoir during the phase of re-infusion. This procedure is repeated until the reservoir is fulfilled

of ca 3/4 of its volume. The direction of the blood pump changes in this moment and corpuscles are returned back from the reservoir to the donor by the use of the same apheresis needle.

Next part of my bachelor work included examination of 50 blood samples and it was in collaboration with "Laboratoř klinické chemie Nemocnice v Českých Budějovicích, a.s.". Firts of all - I was identifying these samples, putting them into the laboratory information system and generating bar code. I putted these bar codes on relevant sample test tubes. Method of determination overall protein belongs to routine techniques and it's sensitive indicator of overall health state of the patient (or it could refers to possible kidney or alimentary system diseases). I worked with fully automated biochemical analyzer ADVIA 1800 of Siemens company. This analyzer uses an principle of Biuret reaction for the determination of overall protein. It means that proteins reacts with copper ions - it causes violet-blue complex which is proper to photometric exploration.

The second phase of my research resides in sample examination by electrophoresis. Electrophoresis is also routine technique used in biochemical operation. This screening method is grounded on substance separation in electrical field according to its relative electrophoretical mobility. There spring up 5 fractions during this: albumin,  $\alpha$ -1-globulin,  $\alpha$ -2-globulin,  $\beta$ -globulin a  $\gamma$ -globulin. Electrophoresis of serial proteins is particularly pursued after pathological results determination of overall protein (or after getting more detailed information about serial proteins). I was pursuing the determination of electrophoresis by use of the system HYDRASYS and set SEBIA Hydragel 15/30 protein. System HYDRASYS gets electrophoretical moves after insertion of applicator with spread samples, placing sponges with puffer and insertion of the gel. This process must be carried out in sequences and there must take all phases in turns (applying of the sample, migration, incubation, coloring and drying). Obtained results have to be entered to PC with the use of scanning program Epson Perfection V700 PHOTO. Results are evaluated in program PHORESIS.

It was considered the total protein value and electrophoresis of 25 donors during the practical part of research. Each donor provided first blood sample before the collection and the second after process of plasmapheresis. I obtained precious advices from Plasmafera s.r.o based in České Budějovice. I found out how whole center works (from donors, statements, examinations up to unsuitable samples disposal).

They enabled me to take a part in whole laboratory process in Laboratoř klinické chemie Nemocnice v Českých Budějovicích, a.s., superintended by laboratory technician. I was able to determinate samples - measured values of these samples are the results of my work.

## Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma Vyšetření elektroforézy a celkové bílkoviny před a po plazmaferéze jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. V platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivované fakultou – elektronickou cestou ve veřejných přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. Zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

-----

Podpis studenta



## Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli a vedoucímu mé bakalářské práce panu prof. MUDr. Miloši Velemínskému, CSc., dr.h.c. za odbornou pomoc a poskytnutí cenných informací. Dále bych chtěla poděkovat paní Ing. Marii Kašparové za ochotu a vstřícnou pomoc při vyhodnocování laboratorních výsledků. Děkuji také celému kolektivu Laboratoře Klinické chemie Nemocnice České Budějovice a.s, za spolupráci a pomoc při praktické části. Díky patří také panu MUDr. Karlu Blažkovi a celému kolektivu plazmaferetického centra Plasmafera s.r.o za vstřícnost při realizaci praktické části bakalářské práce.

## Obsah

<i>Úvod</i> .....	15
<i>1. Současný stav</i> .....	16
<i>1.1. Klinická biochemie</i> .....	16
<i>1.1.1. Biochemické vyšetření</i> .....	16
<i>1.1.1.1. Preanalytická část vyšetření</i> .....	16
<i>1.1.1.1.1. Odběr biologického materiálu</i> .....	17
<i>1.1.1.1.2. Odběrové systémy</i> .....	17
<i>1.1.1.1.3. Odběrové nádoby</i> .....	17
<i>1.1.1.1.4. Odběr krve</i> .....	18
<i>1.1.1.1.5. Možnosti chyb při odběru</i> .....	18
<i>1.1.1.1.6. Transport biologického materiálu</i> .....	18
<i>1.2. Analytická fáze</i> .....	19
<i>1.3. Postanalytická fáze</i> .....	19
<i>1.4. Proteiny</i> .....	19
<i>1.4.1. Aminokyseliny</i> .....	20
<i>1.4.2. Struktura proteinů</i> .....	21
<i>1.4.3. Vlastnosti proteinů</i> .....	22
<i>1.4.4. Rozdělení proteinů</i> .....	22

1.4.5.	<i>Proteiny krevní plazmy</i>	22
1.5.	<i>Celková bílkovina</i>	24
1.5.1.	<i>Možnosti stanovení celkové bílkoviny v séru</i>	25
1.5.1.1.	<i>Biuretová reakce</i>	25
1.6.	<i>Elektroforéza</i>	25
1.6.1.	<i>Historie elektroforézy</i>	26
1.6.2.	<i>Elektroforéza na agarózovém gelu</i>	27
1.6.3.	<i>Izoelektrický bod (pI)</i>	27
1.7.	<i>Plazmaferéza</i>	27
1.7.1.	<i>Plazma</i>	28
1.7.2.	<i>Plazmaferetická centra</i>	28
1.7.3.	<i>Využití plazmaferézy</i>	28
1.7.3.1.	<i>Plazmatické transfuzní přípravky</i>	29
1.7.4.1.	<i>Rizika pro dárce</i>	30
2.	<i>Cíle práce</i>	31
3.	<i>Metodika</i>	32
3.1.	<i>Systém Autopheresis-C</i>	32
3.1.1.	<i>Fáze odběru</i>	34
3.1.2.	<i>Fáze reinfuze</i>	35

3.1.3.	<i>Ukončení plazmaferézy</i> .....	36
3.1.4.	<i>Vyšetření odebrané plazmy</i> .....	37
3.2.	<i>Vlastní analýza vzorků</i> .....	38
3.2.1.	<i>ADVIA 1800</i> .....	38
3.2.2.	<i>Kvantitativní stanovení celkové bílkoviny v séru</i> .....	41
3.2.3.	<i>Kalibrace</i> .....	42
3.2.4.	<i>Kontrola kvality</i> .....	42
3.2.5.	<i>Systém HYDRASYS</i> .....	42
3.2.6.	<i>Příprava vzorků</i> .....	44
3.2.7.	<i>Stanovení elektroforézy sérových bílkovin</i> .....	44
3.2.7.1.	<i>Migrace</i> .....	45
3.2.7.2.	<i>Barvení</i> .....	45
3.2.7.3.	<i>Set Sebia – HYDRAGEL 7, 15 a 30 Proteine</i> .....	45
4.	<i>Výsledky</i> .....	46
4.1.	<i>Celková bílkoviny</i> .....	46
4.2.	<i>Elektroforéza</i> .....	47
4.2.1.	<i>Frakce albuminu</i> .....	47
4.2.2.	<i>Frakce <math>\alpha</math>-1-globulinů</i> .....	49
4.2.3.	<i>Frakce <math>\alpha</math>-2-globulinů</i> .....	50
4.2.4.	<i>Frakce <math>\beta</math>-globulinů</i> .....	52

4.2.5. Frakce $\gamma$ -globulinů.....	53
5. Diskuze.....	58
6. Závěr .....	61
7. Seznam použité literatury .....	62
8. Klíčová slova.....	66

## Seznam použitých zkratek

BIS – N,N'-metylen-bis-akrylamid

EDTA – Kyselina ethylendiamintetraoctová

ELFO - Elektroforéza

FFP – Čerstvě zmražená plazma

Ig – Imunoglobulin

KO – Krevní obraz

NK – Nukleová kyselina

pI – Izoelektrický bod

SDS – Podium dodecyl sulphat ( dodecylsulfát sodný)

## Úvod

V současné době se stále více rozšiřuje odběr plazmy za účelem dalšího zpracování na plazmatické přípravky, vzhledem k přirozenému složení plazmy, kdy složky které obsahuje, jsou nenahraditelnými produkty při léčbě některých onemocnění. Tento proces pravděpodobně ovlivňuje hladinu bílkovin v krvi, která hraje zásadní roli v udržování správné funkce lidského organismu.

Cílem mé práce bylo naučit se teoreticky a prakticky ovládat vyšetření celkové bílkoviny a elektroforézy v séru dárců před a po plazmaferéze a posoudit zjištěné hodnoty ve spolupráci s plazmaferetickým centrem Plasmafera s.r.o a Laboratoří klinické chemie Nemocnice v Českých Budějovicích, a.s.

V teoretické části mé bakalářské práce se zabývám základním principem a využitím plazmaferézy, charakteristikou proteinů, jakožto celku a kvantitativním stanovením celkové bílkoviny a elektroforézy v séru.

V praktické části je uveden způsob odběru vzorků krve před a po výkonu plazmaferézy, zabývám se zde popisem systému Autophoresis – C, biochemického analyzátoru ADVIA 1800 od společnosti Siemens a systému HYDRASYS od společnosti Sebia. Jsou zde uvedeny principy a metodiky vyšetření a následné zpracování výsledků do přehledných grafů a tabulek.

# 1. Současný stav

## 1.1. *Klinická biochemie*

Klinická biochemie je jedním ze základních oborů medicíny. Zkoumá metabolické děje v lidském organizmu, zachycuje charakteristické změny těchto metabolických dějů a nabyté znalosti se snaží prakticky uplatnit a využít jich pro prevenci a diagnostiku nemocí, sledování průběhu terapie a prognózu vývoje nemocí.

### 1.1.1. *Biochemické vyšetření*

Biochemické vyšetření informuje o metabolických funkcích, má široký rozsah, je dostatečně specifické a citlivé, je kvantifikovatelné, je relativně snadno dostupné a příliš nezatěžuje pacienta. Vyšetření mají typická složení, ve kterém jednotlivé části na sebe navazují a vzájemně se ovlivňují.

Každé biochemické vyšetření má preanalytickou ( lze dále rozdělit na mimolaboratorní a laboratorní), analytickou a postanalytickou ( lze dále rozdělit na laboratorní a mimolaboratorní) část. (Nezbeda 2014)

- a) *Preanalytická část*, zahrnuje přípravu pacienta na odběr, vlastní odběr, transport biologického vzorku a jeho příjem.
- b) *Analytická část* zahrnuje vlastní analýzu, případnou reanalýzu.
- c) *Postanalytická část* začíná kontrolou výsledků před jeho vydáním a následnou interpretaci výsledků lékaři.

#### 1.1.1.1. *Preanalytická část vyšetření*

Preanalytická část vyšetření ovlivňuje zásadním způsobem jeho spolehlivost. Nedostatky a chyby v této části jsou nebezpečné, protože často vedou k chybným výsledkům a nedají se dobře odhalit systémem laboratorní kontroly. (Nezbeda 2014)



#### **1.1.1.1.1. Odběr biologického materiálu**

Odběr biologického materiálu může zásadním způsobem ovlivnit konečný výsledek laboratorní analýzy. Zákrok by neměl pacienta zbytečně traumatizovat. Pacient by před odběrem biologického materiálu měl zachovat stejný režim, jako v jiné dny. V některých případech je potřeba upravit stravování, pohybový režim, aj.

#### **1.1.1.1.2. Odběrové systémy**

Moderní odběrové systémy určené k odběru krve jsou uzavřené odběrové systémy, které představují bezpečné odběry pro pacienty i personál. Nedochozí k přímému styku s odebíraným materiálem, mimo jiné umožňují využití jednoho vpichu pro více odběrů pro různá pracoviště a odbornosti.

#### **1.1.1.1.3. Odběrové nádobky**

Odběrové zkumavky jsou vyráběny převážně z materiálu na jedno použití. Jsou odlišeny barevnými uzávěry, které indikují typ odběrové nádobky, např.

*a) Nádobky pro odběr séra – bez aditiva nebo s aktivátorem srážení, mívají červený uzávěr*

*b) Nádobky na KO – obsahují EDTA a mívají fialový uzávěr*

*c) Nádobky pro hemokoagulaci – obsahují citrát sodný a mívají modrý uzávěr*

*d) Nádobky pro speciální odběry – např. obsahují stabilizátory pro odběr hormonů, zkumavky s velmi nízkým obsahem kovů pro stanovení stopových prvků, mikrozkušavky pro odběry kapilární krve. Uzávěr je opět barevně odlišen.*

*e) Nádobky pro sedimentaci - obsahují 3,2% roztok pufrovaného citrátu sodného a mívají černý uzávěr ( Nezbeda 2014)*

#### **1.1.1.1.4. Odběr krve**

Pro odběr krve platí obecné zásady, které je potřeba dodržovat. Je dobré provádět odběry krve v konkrétní hodinu, nejlépe ráno. Před odběrem by měl pacient dodržovat alespoň 5 minutový klid a měl by se vyvarovat jakéhokoliv stresu, odběr by měl probíhat nalačno, vyvarovat se nápojům obsahující kofein a alkohol. Pacient by při odběru měl mít vždy stejnou polohu, nejlépe vsedě nebo vleže.

Nejobvyklejším způsobem odběru je odběr venózní (žilní) krve z loketní jamky. Další způsob je odběr kapilární krve nejlépe z ušního lalůčku a odběr arteriální krve (tepenné). (Nezbeda 2014)

#### **1.1.1.1.5. Možnosti chyb při odběru**

##### *a) Hemolýza*

Hemolýzou se rozumí rozpad erytrocytů a vylití jejich obsahu do krevního řečiště. Hemolýza má dva typy: *In vivo* (tj. v živém organismu) při intravaskulární hemolýze a *In vitro* (v odběrové nádobce), kdy převládající příčina vzniku bývá při chybách v preanalytické části rutinní laboratorní diagnostiky, např. při odběru, transportu a základní zpracování krve (mechanicky, osmoticky, tepelně a chemicky). Hemolýza ovlivňuje konečné výsledky analýz tím, že do plazmy vyplatí obsah erytrocytů, na obtíž je červené pozadí způsobené hemoglobinem, hemoglobin zároveň působí jako pufr a mění pH činidla se kterým reaguje a rozkládá ho. (Nezbeda 2014, Lippi et al 2009)

##### *b) Ikterické sérum tj. zbarveno bilirubinem*

##### *c) Chylózní sérum tj. s obsahem tuku*

#### **1.1.1.1.6. Transport biologického materiálu**

Transport materiálu musí probíhat dle určitých zásad, jako je např. přeprava v uzavřených nádobkách, bez přístupu světla, transport musí být rychlý, šetrný aby se zabránilo hemolýze nebo dalším rizikům nevratného znehodnocení vzorku. (Racek 2006)

## ***1.2. Analytická fáze***

Analytická fáze probíhá manuálním nebo automatizovaným provedením laboratorních metod. Je nezbytné dodržování striktních zásad správné laboratorní práce, jako je manipulace a uchovávání vzorku před analýzou, správný průběh reakcí, systém kontroly kvality, vyhodnocování, kontrolní analýzy či dokonalý technický stav a správné funkce analyzátorů. (Dastych, Breinek 2008)

V klinické biochemii se měří veličiny komponent (analyzovaných složek), které se analyzují v nějakém systému. Hodnoty veličin jsou uspořádány ve stupnicích. Naměřené hodnoty, čili výsledek měření se vydávají v jednotkách. Výsledek v sobě obsahuje nejistotu měření. (Nezbeda 2014)

## ***1.3. Postanalytická fáze***

Postanalytická fáze se vyznačuje získáním a interpretací výsledků laboratorního nálezu. Výsledky se porovnávají s fyziologickými hodnotami, s klinickým obrazem pacienta. (Dastych, Breinek 2008)

## ***1.4. Proteiny***

Jedná se o biopolymery složené z L-aminokyselin spojených peptidovou vazbou do dlouhých polypeptidových řetězců. Obsahují přibližně 100 až několik tisíc AK zbytků, mají vyšší molekulovou hmotnost (více jak 10 000) a jsou charakteristické prostorovým uspořádáním, které je dáno nekovalentními interakcemi mezi úseky řetězce. Označuje se jako nativní konformace bílkovin. (Dostál a kol. 2005, Odstrčil 2005)

Vznik bílkovin je řízen proteosyntézou, která je ovlivněna geneticky. Pořadí a počet AK zbytků je dáno genetickým kódem. Proteiny zastávají téměř všechny biologické funkce, s výjimkou přenosu informací. Mezi hlavní funkce bílkovin patří *strukturní, metabolická a informační*. (Čermáková a kol. 2005, Dostál a kol. 2005)

a) *Strukturní funkce*- Podílí se na tvorbě skeletu buněčných i mimobuněčných struktur.

b) *Metabolická funkce* – Část bílkovin má charakter enzymů jako biokatalyzátorů chemických reakcí ( pepsin), mají také transportní úlohu ( hemoglobin). Také jsou jediným zdrojem dusíku, ze kterých syntetizuje vlastní bílkoviny.

c) *Informační funkce* – Imunoglobuliny, bílkovinné protilátky, rozeznávají antigen a specificky se na něj vážou, čímž dochází k zahájení dějů, které vedou k zneškodnění antigenů. (Dostál a kol. 2005, Odstrčil 2005)

V laboratoři se mohou prokazovat barevnými změnami při určitých chemických reakcích, elektroforézou či speciálními reakcemi antigen – protilátka. (Sedláček 2012)

#### **1.4.1. Aminokyseliny**

Jedná se o substituční deriváty karboxylových kyselin, jejichž molekula obsahuje aminové skupiny,  $-NH_2$  ve většině případů vázanou na uhlíku  $\alpha$  který je chirálním centrem, proto jsou aminokyseliny opticky aktivní.

Při spojení dvou nebo více AK peptidovou vazbou vzniká peptidový řetězec, na jehož jednom konci je nezreagovaná  $\alpha$ -aminoskupina (N- konec) a na konci druhém volná karboxylová skupina (C-konec). ( Dostál a kol. 2005)

V biologické terminologii se pro aminokyseliny používají triviální názvy, od nichž se odvozují třípísmenné zkratky, které se používají celosvětově.

Aminokyseliny jsou bezbarvé krystalické látky, dobře rozpustné ve vodě, nerozpustné v nepolárních sloučeninách. Obsahují dvě funkční skupiny, kyselou skupinu  $-COOH$  a zásaditou skupinu  $-NH_2$ , mají vlastnost reagovat jako kyselina i jako zásada, jsou to amfolyty. ( Odstrčil 2005)

### **1.4.2. Struktura proteinů**

Základní stavební jednotkou všech proteinů jsou aminokyseliny. Pořadí aminokyselin v řetězci proteinu je pro každý druh proteinu a druh organismu charakteristické a je řízeno geneticky. Struktury se rozlišují do čtyř úrovní, které se označují jako *primární, sekundární, terciární a kvartérní*. (Odstrčil 2005)

#### *a) Primární struktura*

Popisuje pořadí AK zbytků v polypeptidovém řetězci. Dle konvence se pořadí uvádí vždy od N-konce k C-konci řetězce podle směru proteosyntézy. (Dostál a kol. 2005, Odstrčil 2005)

#### *b) Sekundární struktura*

Jedná se o prostorové uspořádání hlavního polypeptidového řetězce. Popisuje uspořádání a stabilizaci atomů v hlavním řetězci.

Rozeznáváme dva typy sekundární struktury:  *$\alpha$ -helix* odpovídá pravotočivé šroubovici a  *$\beta$ -strukturu* která je označena za strukturu skládaného listu. (Dostál a kol. 2005)

#### *c) Terciární struktura*

Jedná se o prostorové uspořádání všech atomů bílkovin, charakteristickou nativní konformací a zevním tvarem. Na udržení struktury se podílí vzájemné interakce postraních řetězců, což znamená, že terciární struktura je výsledkem stabilizujících interakcí mezi postraními řetězci úseků s různou sekundární strukturou. (Dostál a kol. 2005)

#### *d) Kvartérní struktura*

Kvartérní strukturu mají jen některé proteiny. Tato struktura popisuje počet a prostorové uspořádání podjednotek v bílkovinné molekule, např. hemoglobin skládající se ze čtyř podjednotek. (Odstrčil 2005)

### ***1.4.3. Vlastnosti proteinů***

Bílkoviny, které jsou kvůli své vysoké molekulové hmotnosti ve vodě rozpustné, vytvářejí molekulárně koloidní roztoky, jejich molekuly neprocházejí membránami, jejichž póry jsou užší než průměr bílkovinných molekul.. ( Dostál a kol. 2005, Odstrčil 2005)

I proteiny mají amfoterní povahu, v izoelektrickém bodu jsou náboje vyrovnané. V oblasti pH menší než pI jsou volné aminové skupiny převedeny na skupiny amoniové, protein se stává kationtem, v oblasti pH větší než pI jsou disociované karboxylové skupiny, protein se stává aniontem. Tohoto jevu se využívá k dělení proteinů elektroforézou. (Odstrčil 2005)

### ***1.4.4. Rozdělení proteinů***

Podle složitosti molekuly proteiny dělíme na jednoduché a složité.

Jednoduché proteiny mají makromolekuly tvořené jen peptidovými řetězci. Hlavní skupiny jednoduchých proteinů jsou:

- a) *histony*
- b) *albuminy*
- c) *globuliny*
- d) *fibrilární proteiny*

Složené proteiny se skládají ze dvou částí. Z bílkovinné složky a složky nebílkovinné, zvané prostetické. Jsou to: fosfoproteiny, glykoproteiny, chromoproteiny, metaloproteiny, lipoproteiny, nukleoproteiny. (Odstrčil 2005)

### ***1.4.5. Proteiny krevní plazmy***

Jedná se o velkou skupinu s různou, často mnohočetnou funkcí. Plazmatické bílkoviny jsou za fyziologického stavu ve vzájemné rovnováze a neustále se obnovují.

Za patologických stavů dochází k poruše rovnováhy mezi tvorbou a rozkladem bílkovin a tím ke změnám v jejich koncentraci i vzájemném poměru. ( Čermáková a kol.2005, Dastych, Breinek 2008)

Plazmatické bílkoviny jsou děleny podle jejich elektroforetické pohyblivosti v agarózovém gelu do pěti frakcí: albumin,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ .

Bílkoviny krevní plazmy plní následující funkce:

- Udržení onkotického tlaku, který uchovává tekutiny v krevním řečišti. Největší význam na udržení koloidně osmotického tlaku má albumin.
- Transport řady minerálů, hormonů, lipidů i katabolitů, zejména jsou-li nerozpustné ve vodě.
- Udržení pH krve. Plazmatické bílkoviny jsou součástí systému pufrů, podílejících se na acidobazické rovnováze.
- Obrana proti infekci. Tuto funkci plní zejména imunoglobuliny.
- Hemokoagulace a fibrinolýza jsou zajištěny koagulačními faktory.
- Enzymy a inhibitory enzymů.
- Speciální funkce, např. ochrana před volnými radikály. (Racek et al. 2006)

Jednotlivé bílkoviny krevní plazmy jsou:

- ***Prealbumin***
- ***Albumin***
- ***Alfa<sub>1</sub>- globuliny*** mezi které patří *Alfa<sub>1</sub>-inhibitor proteáz (API)*, *Alfa<sub>1</sub>-kyselý glykoprotein* (orosomukoid), *Alfa<sub>1</sub>-fetoprotein*, *Alfa<sub>1</sub>-lipoprotein* a *Alfa<sub>1</sub>-mikroglobulin*

- **Alfa<sub>2</sub>-globuliny** mezi které patří *Alfa<sub>2</sub>-makroglobulin, Haptoglobin, Ceruloplazmin, Ferritin* a *Proteiny transportující hormony*
- **Beta-globuliny** mezi které patří *Transferin, Hemopexin, Složky komplementu C3 a C4, Beta-lipoprotein, Beta<sub>2</sub>-mikroglobulin, C-reaktivní protein (CRP) a Fibrinogen*
- **Gama-globuliny** mezi které patří *IgG, IgA, IgM, IgD a IgE*

(Marshall, Bangert 2008, Sedláček 2012)

### **1.5. Celková bílkovina**

Celková bílkovina je pestrá směs mnoha druhů bílkovin, která má různé složení i biologický poločas. Její stanovení poskytuje orientační informaci o tvorbě, metabolismu a vylučování plazmatických bílkovin. Slouží jako citlivý, i když nespecifický test pro celkové posouzení stavu pacienta a patří k nejčastěji požadovaným, rutinním vyšetřením v klinicko-biochemické laboratoři.

Koncentrace celkové bílkoviny se za fyziologických okolností u dospělých osob pohybuje v rozmezí 63 – 84 g/l. Změny v koncentraci i složení se označují jako dysproteinémie.

Snížená koncentrace celkové bílkoviny (hypoproteinémie) vzniká z příčin převodnění pacient, snížení koncentrace jedné nebo několika málo bílkovin, např. při nefrotickém syndromu, těžké hepatopatie, aj. a malnutričních stavů.

Zvýšená koncentrace bílkovin (hyperproteinémie) vzniká při dehydrataci nebo zvýšené koncentraci jedné nebo několika málo bílkovin, např. polyklonální či monoklonální hyperiminoglobulinémie. (Dastyh, Breinek 2008, Okutucu et al 2007)



### ***1.5.1. Možnosti stanovení celkové bílkoviny v séru***

Celková bílkovina se stanovuje v plazmě, séru či moči. Obvyklejší je stanovení v séru. Použijeme-li plazmu, musíme počítat s tím, že koncentrace celkové bílkoviny je asi o 3-5% vyšší vzhledem k přítomnosti fibrinogenu. Jelikož bílkoviny vážou vodu, mohou naměřené změny množství bílkovin záviset také na změněném podílu vody v séru. Nejrozšířenějším vyšetřením v rutinním provozu je Biuretová reakce, která je jednoduchá a lehce automatizovaná, postrádá však dostatečnou citlivost u biologického materiálu s nízkou koncentrací celkové bílkoviny. Detekční limit bývá kolem 2 g/l, takže metoda je vhodná pouze pro stanovení v séru a plasmě. Nelze jí využít pro stanovení v moči a likvoru. ( Dastych, Breinek 2008, Sedláček 2012)

#### ***1.5.1.1. Biuretová reakce***

Bílkoviny a peptidy poskytují v alkalickém prostředí s měďnatými ionty červenofialově zbarvený komplex. Intenzita zbarvení je přímo úměrná počtu peptidových vazeb a měří se fotometricky při 540 - 550 nm. Reakci dávají obecně látky, které mají v molekule alespoň dvě skupiny  $-\text{CO}-\text{NH}_2$  nebo  $-\text{CO}-\text{NH}-$ , tzn. nejméně dvě peptidové vazby.

Biuret ( $-\text{NH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ) je nejjednodušší látka, který vzniká tepelnou úpravou močoviny. Odtud pochází název metody.

Před fotometrováním je nutné chránit obsah zkumavek před přímým světlem. Reakci v séru ruší především lipémie a hemolýza. ( Skoršepa a kol. 2008)

### ***1.6. Elektroforéza***

Elektroforézou se rozumí pohyb (nabitých) koloidních částic nebo iontů v homogenním stejnosměrném elektrickém poli. Jedná se o metodu rutinně používanou v klinických laboratořích, kde slouží jako screeningová metoda, používající se k separaci látek v elektrickém poli podle jejich relativní elektroforetické pohyblivosti, která závisí

na několika faktorech jako je např. velikosti elektrického náboje, velikost molekul, pH prostředí, na vlastnostech nosiče, iontové síle pufru a tvaru dělených částic.

Látky amfoterní povahy nesou různý elektrický náboj podle pH prostředí ve kterém se nacházejí, např. bílkoviny, AK, peptidy. V kyselém prostředí se chovají jako zásady, jejich výsledný náboj je kladný a proto putují v elektrickém poli směrem ke katodě. V alkalickém prostředí se chovají jako kyseliny, mají záporný náboj a pohybují se směrem k anodě.

Při určitém pH se ionizuje stejné množství kyselých a zásaditých skupin, takže se molekula jeví jako elektroneutrální, mluvíme o izoelektrickém bodu látky. (Doležalová a kol. 1995)

V Klinické biochemii se rutinně používá v diagnostice nemocí, jako viditelný vzájemný podíl jednotlivých bílkovin či jako průběžná kontrola při různých onemocnění. Nejčastěji se měří v séru. Pro rutinní analýzu je nejvhodnější ELFO na agarózovém gelu velmi často na semiautomatizovaných analyzátoch. ( Sedláček 2006, Lissou et al 2003)

### ***1.6.1. Historie elektroforézy***

Volná elektroforéza byla nejpoužívanější elektroforetická metoda jejímž zakladatelem byl Tiselius. Prováděl elektroforézu bílkovin v kyvetě v prostředí volného elektrolytu, kdy se bílkovinné frakce dělily v podobě pruhů, které tvořily ostré pohyblivé rozhraní. Pohyb frakcí byl sledován refraktometricky.

Elektroforéza na papíře je označována za nejstarší metodu, která se používala pro dělení sérových bílkovin, kde nosičem byl chromatografický papír. Touto technikou se dělí bílkoviny ve stejnosměrném elektrickém poli na 5 frakcí: albumin, alfa<sub>1</sub> globuliny, alfa<sub>2</sub> globuliny, beta globuliny, gama globuliny. Jednotlivé frakce se dělí podle velikosti elektrického náboje, kdy záporně nabitě makromolekuly bílkovin se v alkalickém prostředí dělí směrem od katody k anodě. ( Doležalová a kol. 1995)

### ***1.6.2. Elektroforéza na agarózovém gelu***

Nejrozšířenější elektroforézou je elektroforéza na agarózovém gelu, kdy nejpoužívanějším komerčním nosičem v českých zemích je Hydragel od firmy Sebia, což jsou agarózové gely pro různé typy dělení, které jsou umístěné na plastové destičce.

Agaróza je neutrální polysacharid, který je připravený z agaru po odstranění agaropektinu. ( Nezbeda 2014)

Při této elektroforéze získáme 6 frakcí, kdy nejrychlejší je frakce albuminu, za ním následují Alfa-1 -globuliny, alfa-2-globuliny, beta-1-globuliny, beta-2-globuliny a gama globuliny.

### ***1.6.3. Izoelektrický bod (pI)***

Izoelektrický bod je charakteristická veličina pro každý amfolyt. Při pH izoelektrického bodu se látka ve stejnosměrném elektrickém poli nepohybuje.

Pokud je pH vyšší ( běžně se provádí při pH kolem 8,6) než pI má látka záporný náboj a pohybuje se k anodě, naopak při nižším pH než pI je náboj kladný a pohybuje se ke katodě.

## ***1.7. Plazmaferéza***

Plazmaferéza je způsob odběru krve, při kterém s z celé krve odebere jen plazma a erytrocyty jsou vráceny dárci. Mimo to se jedná o metodu mimotělního čištění krve zahrnující odstranění zánětlivých mediátorů a protilátek. Plazmaferéza může být manuální, kdy hovoříme o dvojité plazmaferéze, která se provádí pomocí vakových systémů, kdy se po odebrání 500 ml krve provede centrifugace, plazma se odčerpá do odběrového vaku a erytrocyty se vrátí zpět dárci a celý proces se opakuje. Druhým způsobem odběru, je tzv. přístrojová plazmaferéza, která se provádí pomocí speciálních separátorů. ( Sakalová a kol. 1995, Szczeklik et al 2013)

### ***1.7.1. Plazma***

Jedná se o nažloutlý slabě zásaditý vodný roztok bílkovin, které se dělí na albuminy, globuliny a fibrinogen, elektrolytů, jako např. sodíku, chloridů a malých organických sloučenin. Složení plazmy za fyziologických podmínek je velmi stálé. Objem plazmy u dospělého člověka činí okolo 5% tělesné hmotnosti. (Trojan 1999)

### ***1.7.2. Plazmaferetická centra***

Plazmaferetické centrum Plasmafera s.r.o. je centrum odebírající šetrně krevní plazmu pro výrobu léčiv. (SOP-Plasmafera)

Poptávka po produktech plazmaferézy, tj. plazmatických derivátech se zvyšuje, proto udržování členství dárců je velice důležité. Pomocí náborových programů se případným dárcům snaží osvětlit princip plazmaferézy, postup při odběru, rizika a využití plazmaferézy pro další účely. ( Ringwald et al. 2007)

### ***1.7.3. Využití plazmaferézy***

Rozvoj plazmaferéz je spoje s rozvojem průmyslového zpracování čerstvě zmražené plazmy na jednotlivé bílkovinné součásti plazmy jako léky, které nelze doposud nahradit. Jedná se zejména o albumin, který se používá jako krevní náhrada při velkých ztrátách, faktor VII a faktor IX které jsou nenahraditelné jako léky při léčbě vrozené krvácivosti, Antitrombin III, který je důležitý při léčbě získaných poruch krvácivosti a imunoglobuliny, které pomáhají pacientům vyrovnat se s těžkými infekcemi a v poslední době jsou moderním lékem při léčbě systémových onemocnění.

(Howard, Hamilton 1997)

Dalším typem je výměnná plazmaferéza založena na odstranění patogenních antigenů nebo látek ve frakci plazmy a doplnění základních koagulačních faktorů a albuminu. Slouží k léčbě pacientů s imunologickými, nefrologickými, hematologickými či metabolickými poruchami. (Siami 2001, Nakanishi et al 2014)

### **1.7.3.1. Plazmatické transfuzní přípravky**

Cílem je zachování funkce koagulačních faktorů a přirozených inhibitorů koagulace šokovým zmražením během jedné hodiny na teplotu  $-30^{\circ}\text{C}$ . Tyto látky představují léčebnou složku při transfuzi. Získány mohou být z odběru plné krve, plazmaferézou nebo jako vedlejší produkt při trombocytaferéze či erythrocytaferéze. Pro klinickou praxi se využívá plazma se splněným intervalem karantény. Při aplikaci plazmy se s vakem musí zacházet velmi šetrně, neboť je velmi křehký. Rozmrazení musí proběhnout co nejrychleji a plazma by měla být podána do 1 hodiny po rozmrazení.

*a) Plazma čerstvě zmražená ( FFP )* – jedná se o plazmu oddělenou z plné krve, či o plazmu získanou aferézou která je šokově zmražená. Obsahuje koagulační faktory, přirozené inhibitory koagulace, albumin a Ig.

*b) Plazma bez kryoproteinu ( K plazma )* – jedná se o část plazmy, která zůstane z jednotky čerstvě zmrazené plazmy, propuštěné pro klinické použití po splnění intervalu karantény a po odstranění kryoprecipitátu. ( Penka, Tesařová a kol. 2012, Rozsypalová a kol. 2002)

### **1.7.4. Princip plazmaferézy**

Plazmaferéza se provádí zejména pomocí separátorů. Podle použití jednoho nebo dvou žilních přístupů jsou separátory děleny na dva druhy. (Bednařík 2011)

#### *a) Kontinuální separátor*

Tento typ separátoru se využívá zejména k léčebné plazmaferéze, kdy je zapotřebí odstranit škodlivou látku z těla obsaženou v plazmě, kterou jiným způsobem odstranit nelze. Kontinuální separátor se vyznačuje dvěma žilními přístupy, kdy se z jedné paže provádí odběr a do druhé návrat krvinek. Doba odběru trvá 2 – 3 hodiny.

#### *b) Diskontinuální separátor*

Tento typ separátoru je vhodný zejména pro odběry plazmy, kdy se využívá jednoho žilního přístupu, tzn. vpichu pouze jedné jehly do jedné ruky. Celý proces

probíhá v uzavřeném jednorázovém odběrovém setu. Odběr probíhá v několika cyklech, kdy v jednom cyklu je odebráno cca 2dcl krve, která je rozdělena na plazmu a krvinky. Plazma se sbírá do sběrného vaku a krvinky jsou vráceny zpět dárce. Množství odebrané plazmy se nastavuje dle hmotnosti na 600-880 ml a odběr trvá 45-60 minut.

(Plazmaferéza – OHKT ÚCL ÚVN)

#### **1.7.4.1. Rizika pro dárce**

Pro ne zcela zdravého dárce může být odběr krve či krevních složek rizikový, proto se provádí základní vyšetření, která slouží k posouzení zdravotního stavu dárce. U dárce se mohou vyskytnout nežádoucí reakce shodné s reakcemi při běžných postupech odběru krve, jako jsou závratě, mdloba, zvracení, hyperventilace a vznik hematomu v místě vpichu z důvodu nesprávně provedené venepunkce. U osob darujících poprvé se mohou objevit nežádoucí účinky jako důsledek působení psychologických faktorů, např. zvracení, mdloba, hyperventilace. Během odběru je doplněn krevní oběh dárce o fyziologický roztok z důvodu bezpečnosti a spokojenosti dárce. ( SOP-Plasmafera, Buzza et al 2012)

Všechny materiál používaný k vlastnímu odběru plasmy i krve k laboratornímu vyšetření je určen k jednorázovému použití, proto žádné riziko přenosu infekce na dárce nehrozí. ( SOP-Plasmafera)

## **2. Cíle práce**

- 1) Ovládat metodiku plazmaferézy.
- 2) Osvojit si metodiku stanovení celkové bílkoviny a elektroforézy ze vzorku séra v laboratoři Klinické chemie Nemocnice a.s, České Budějovice.
- 3) Zjistit, u kolika dárců došlo ke snížení bílkovin v séru pod referenční mez.

### **3. Metodika**

V této části mé práce bude uvedeno získání vyšetřovaných vzorků krve ve spolupráci s personálem centra Plasmafera s.r.o. a následné zpracování těchto vzorků v Laboratoři Klinické chemie Nemocnice v Českých Budějovicích a.s. Dárci, kteří se účastnili výzkumu, podepsali prohlášení, že souhlasí s odběrem a následným zpracováním vzorků. Jejich jména byla z důvodu zachování mlčenlivosti v laboratorním procesu nahrazena čísly, pod kterými byla analýza provedena.

Vzorky pro můj laboratorní výzkum jsem získala ve spolupráci s plazmaferetickým centrem Plasmafera s.r.o v Českých Budějovicích, kde laborantka odebrala dárci 1 zkumavku srážlivé krve před odběrem a druhou zkumavku srážlivé krve po provedení plazmaferézy. ( Plasmafera s.r.o)

Při příchodu do Plazmaferetického centra byl dárci předán dotazník, který vyplnil a s průkazem totožnosti jej odevzdal na recepci, kde byl zaevidován. Dárce byl následně zvážen, byl mu změřen tlak a teplota. Poté mu bylo přiděleno číslo, pod kterým byl dále evidován v odběrové místnosti. Na základě zvacího systému byl dárce pozván do příslušné vyšetřovny, kde společně s vyšetřujícím lékařem došlo ke konzultaci dotazníku, kladení otázek ohledně zdravotního stavu dárce a provedení fyzické prohlídky. Pokud lékař určí, zda je dárce vhodný k odběru, vrací se zpět na recepci, kde je přes systém pozván na odběrový sál, kde mu je přiděleno lůžko. Před zahájením vlastní separace byl každému dárci vyšetřen krevní obraz, kde se sleduje hladina hemoglobinu. Vyšetření probíhalo na hematologickém analyzátoru COULTER HmX - AL. Pokud hladina odpovídala normě, separace byla zahájena. Pokud neodpovídala, dárce nebyl napojen na separátor a plazmaferetické centrum opustil.

#### ***3.1. Systém Autopheresis-C***

Jedná se o automatizovaný plazmaferetický systém skládající se z přístroje Autopheresis-C a jednorázové odběrové soupravy Plasmacell-C. Cílem systému je provádět rychlou ale zároveň šetrnou separaci plné krve na koncentrované buněčné



složky a plazmu prakticky zbavenou buněčných složek. Pro odběr se vyžaduje jednojehlová venepunkce, kdy tedy odběr probíhal přes jeden cévní přístup. Žilní tlak byl celou dobu monitorován, aby byl průtok optimální a nedošlo k přetížení žíly dárce. Koncentrované buněčné složky se reinfundují zpět dárci a plasma odebíraná pro transfuzi se transfunduje nebo se zpracovává jako čerstvá zmražená plasma. Odebraná plasma může být zpracovaná také na další produkty. Jednorázová souprava Plasmacell-C se skládala z integrálně připojeného separačního zařízení, neinfuzního rezervoáru a soustavy hadiček, kterými se čerpá krev a roztoky v uzavřeném sterilním systému. Objem soupravy byl přibližně 200 ml. (SOP-Plasmafera)

Před samotným odběrem provedla laborantka kontrolu, při které zjistila, zda jsou správně k separátoru připojeny antikoagulační roztoky, fyziologické roztoky a jednorázová souprava Plasmacell-C. Zavěsila odběrový vak na závěs váhy a zkontrolovala, zda je odběrový vak dostatečně velký pro zadaný objem odběru plazmy. Poté linku připojila k odběrovému vaku. (SOP-Plasmafera)



**Obr. 1** Vlastní separátor s jednorázovou odběrovou soustavou Plasmacell-C

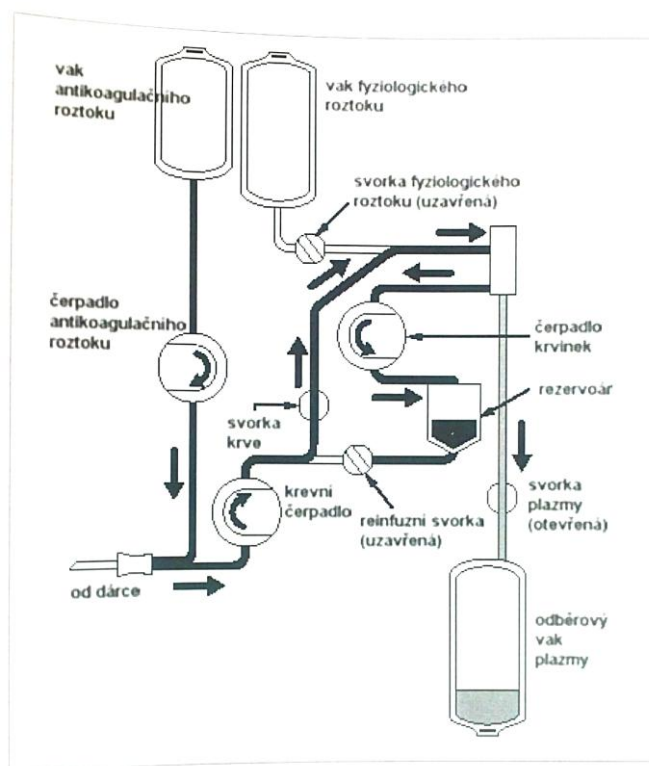
( Zdroj: vlastní foto)

Po uložení dárce na lůžko a přípravě dárce na plazmaferézu laborantka nasadila dárci tlakovou manžetu a nastavila tlak v manžetě. Poté zvolila žílu pro nabodnutí. Poté laborantka manžetu vypustila stisknutím tlačítka na displeji, místo pro vpich opatřila dezinfekčním roztokem a stisknutím tlačítka manžetu opět nafoukla. Hemostatem uzavřela hadičku jehly a provedla venepunkci. Po venepunkci provedla laborantka odběr krve do fialové zkumavky na stanovení krevního obrazu, na biochemické a sérologické vyšetření, na vyšetření PCR a dále provedla odběr do biochemické zkumavky pro mé potřeby na stanovení celkové bílkoviny a elektroforézy. Poté asepticky připojila aferézní jehlu k jednorázové soustavě Plasmacell-C. Po dokončení venepunkci laborantka nastavila tlak v manžetě na vhodnou úroveň pro odběr. Jako poslední krok laborantka sejmula hemostaty z hadičky aferézní jehly a z hadičky linky dárce a zahájila předplnění krví. (SOP-Plasmafera)

### ***3.1.1. Fáze odběru***

Po vstoupení plné krve z žíly dárce do soupravy hadiček byl do krve řízenou rychlostí čerpán antikoagulační roztok (AC). Antikoagulovaná krev byla dále čerpána do separačního zařízení, kde byla plazma oddělena od buněčných složek pomocí rotačního membránového filtru a odváděna do příslušného odběrového vaku.

Tento systém automaticky střídal odběrovou a infuzní fázi, dokud nebyl ve sběrném vaku odebrán stanovený objem plasmy. (SOP – Plasmafera)

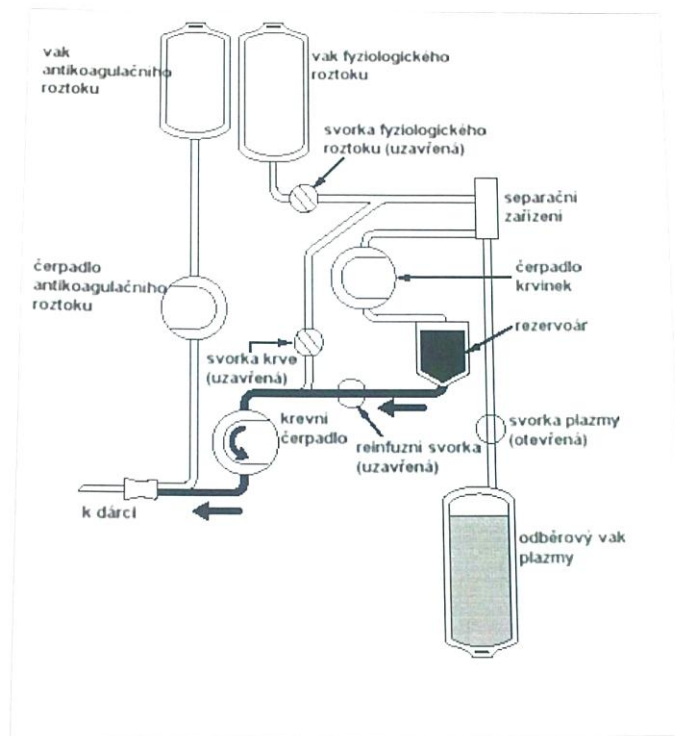


**Obr. 2** Fáze odběru ( Zdroj: SOP – Plasmafera s.r.o.)

### 3.1.2. Fáze reinfuze

Koncentrované buněčné složky byly čerpány ze separačního zařízení vřazeného rezervoáru k následné reinfuzi. Po naplnění rezervoáru koncentrovanými buňkami se systém zastavil a přešel automaticky k fázi reinfuze.

Během reinfuze se obrátil směr čerpání krevního čerpadla a koncentrované buněčné složky byly čerpány z rezervoáru stejnou aferézni jehlou zpět dárci. (SOP-Plasmafera)



**Obr 3. Fáze reinfuze**

( Zdroj: SOP – Plasmafera s.r.o.)

### 3.1.3. Ukončení plazmaferézy

Po docílení požadovaného objemu plazmy byl odběr ukončen. Než došlo k proplachu fyziologickým roztokem a infuzí, odpojila laborantka odběrový vak s plazmou kvůli zabránění zředění plazmy fyziologickým roztokem, které by způsobovalo falešně negativní výsledky. Laborantka před vyjmutím jehly odebrala dárci 200 ml krve do injekční stříkačky, kvůli případnému zkreslení výsledků při biochemickém stanovení. Následně do zkumavky odebrala krev po plazmaferéze, určenou pro mé stanovení celkové bílkoviny a elektroforézy. Po ukončení venepunkce, laborantka místo vpichu ošetřila dezinfekcí. Linka plazmy byla uzavřena na příslušných místech, jako jsou obě linky tlakových čidel pod filtrem, krevní linku a linku antikoagulačního roztoku, linky fyziologického roztoku a linku plazmy pod separačním zařízením. Místa, jako jsou, čerpadla, dvířka detektoru hemoglobin a detektoru vzduchu

zůstala otevřená. Zbytek jednorázové soustavy byl vyjmut z přístroje a zlikvidován podle předpisů. (SOP-Plazmafera)

Vak s plazmou byl vložen do odběrového boxu společně se zkumavkami na sérologii a PCR a byl odeslán do laboratoře k vyšetření a dalšímu zpracování. (SOP-Plazmafera)

Laborantka předala dárci průvodní list, který potvrdila a poslala ho zpět na recepci, kde byl překontrolován ohledně shody a dárcce byl z plazmaferetického centra propuštěn. (SOP-Plazmafera)

#### **3.1.4. *Vyšetření odebrané plazmy***

Po odběru jsou provedeno serologické vyšetření a vyšetření PCR. Pro vyloučení případných rizik infekčních onemocnění, byla každá plazma serologicky vyšetřena na HIV, Syfilis, HBV( žloutenka typu B) a HCV ( žloutenka typu C), kdy přítomnost některého typu infekčních onemocnění bylo důvodem k neprodlenému vyloučení dárcce z dárcovství. (SOP-Plazmafera)

V případě porušení některých z pokynů, kterým by se měl každý dárcce řídit, může docházet k získání nekvalitní plazmy, která nemůže být dále zpracována jako např. výchozí surovina pro výrobu tzv. léčiv derivovaných z plazmy. Během mé přítomnosti při odběrech byl zastaven pouze jeden odběr, kdy laborantka detekovala chylózní plazmu. Pro likvidaci plazmy jsou rozhodující tyto důvody:

- a) Reaktivita virových markerů a syfilis*
- b) Nestandardní vzhled plazmy*
- c) Nestandardní podmínky skladování*
- d) Porušení vaku při zpracování a skladování*

### ***3.2. Vlastní analýza vzorků***

Po zanesení vzorků do biochemického analyzátoru ADVIA 1800, zkumavky automatizovaným linkovým systémem prošly do centrifugy, kde byly pomocí podavačů vkládány do otvorů v rotoru tak, aby byli správně vyvážené. Poté se víko rotoru uzavřelo robotickým ramenem. Po nastavení příslušných parametrů započala centrifugace, která trvala 5 minut při 3500 otáčkách/ min. Po skončení centrifugace byli zkumavky vyjmuty z rotoru. Výsledek centrifugace byl projeven odstředěním krve na čiré sérum, v horní části zkumavky a krevní koláč ve spodní části. Tyto dvě části byli rozdělené separačním gelem. ( ADVIA 1800, Siemens – technický manuál)

Dle čárových kódů označených na zkumavkách program vyhodnotí, zda je nutné vytvořit aliquoty pro příslušné laboratorní metody. Vygenerované čárové kódy se automaticky nalepí na prázdné sekundární zkumavky a odpipetuje se do nich příslušný objem vyšetřovaných sér. (Siemens, ADVIA 1800, uživatelská příručka)

#### ***3.2.1. ADVIA 1800***

Automatický analyzátor ADVIA 1800 od firmy Siemens pracuje v režimu mikroobjemové technologie který umožňuje 1200 fotometrických a 600 ISE stanovení za hodinu. Umožňuje zpracování sér, plazmy, moče a dalších tělních tekutin. Analyzátor provádí turbidimetrii, absorpční spektrofotometrii a potenciometrické měření iontově selektivními elektrodami ( ISE). Analyzátor se skládá z PC, LCD monitoru, klávesnice, myši, tiskárny a software v prostředí Windows XP. Před samotným zahájením vyšetření bylo důležité do analyzátoru naprogramovat metody, kalibrátory a kontroly, jinak by analyzátor nemohl pracovat. ( Siemens, ADVIA 1800, uživatelská příručka)

Měřené vzorky byly po vložení do systému odvíčkovány a automatickým linkovým systémem dopraveny až do analyzátoru ADVIA 1800, kde přes čárový kód proběhla identifikace vzorku, po které byla zahájena vlastní analýza vzorku pomocí několika částí analyzátoru.



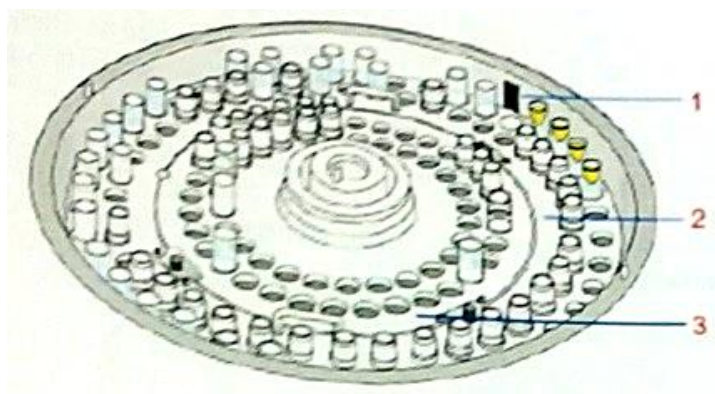
**Obr. 4** Analyzátor ADVIA 1800, Siemens

( Zdroj : <http://www.healthcare.siemens.com/clinical-chemisty/system/advia-1800-chemistry-system>)

Místem pro reagentie, které byly důležité pro analýzu vzorku, byly reagenční disky 1 a 2. Díky reagenčním jehlám byla požadovaná reagentie nasáta a dopravena do kyvet na reakčním disku, za účelem provedení analýzy. (Siemens, ADVIA 1800, uživatelská příručka)

Na vzorkovém disku se nacházely místa pro měřené vzorky, kalibrátory a kontroly, které se díky otáčení disku dostávaly do pipetovací pozice. Vzorkový disk byl složen ze dvou částí :

- Vnější část ( STT), která obsahovala dvě řady se 42 pozicemi v každé z nich. Tato část se používala pro vzorky a standardy u vícebodové kalibrace.
- Vnitřní část (CTT), obsahující rovněž dvě řady, měla na vnější řadě 34 pozic a na řadě vnitřní 27 pozic. Součástí vnitřní části bylo chlazení vodou. Tato část se používala pro kalibrátory, kontroly a speciální diluenty. (Siemens, ADVIA 1800, uživatelská příručka)



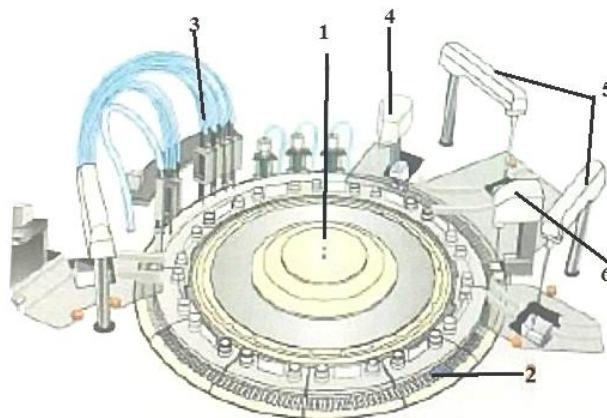
**Obr 5.** Vzorkový disk, č.1 čtečka čárového kódu, č.2 vnější vzorkový disk, č.3 vnitřní vzorkový disk (Zdroj : ADVIA 1800, Siemens – technický manuál)

Analýza pokračovala odebráním vzorku pipetovací jehlou na ředění vzorků (DPP). Tato pipetovací jehla byla opatřena tlakovým spínačem, který monitoruje tlak v systému jehly a zajišťuje tak detekci sraženiny. Případná přítomnost sraženiny zvyšuje riziko nesprávného vyhodnocení výsledků. Pomocí senzoru detekce hladiny kapaliny byl sledován stav hladiny kapaliny, který kontroloval, zda byla jehla během celého procesu ponořena v kapalině. Při zjištění obou závad by byl zdravotnický personál upozorněn varovnou zprávou. Dále byl systém opatřen funkcí detekce nárazu, pomocí kterého zjistíme překážku pipetovací. (Siemens, ADVIA 1800, uživatelská příručka)

V této fázi analýzy nadávkovali reagenční pipetovací jehly reagencií z kyvet na reakčním disku, tzn. že reagenzie R1 byla nepipetována reagenční jehlou č.1 z reagenčního disku 1 a reagenzie R2 byla pomocí reagenční jehly č.2 napipetována do kyvety z reagenčního disku 2. Vzorková pipetovací jehla poté nadávkovala předředený vzorek o objemu 17,5 $\mu$ l do kyvety, kde reakční míchadla směs promíchala a tím byla vyvolána reakce. Zároveň probíhalo natočení kyvety před spektrofotometr, který změřil absorbanci kyvety. Během reakce byly kyvety ponořeny v reakční vaně, obsahující tepelnou olejovou lázeň, která kyvety na reakčním disku udržovala při konstantní teplotě 37°C. Po ukončení analýzy byl reakční disk a kyvety promyty reakční mycí stanicí, což umožňuje opětovné použití



kyvet bez rizika kontaminace dalšího vzorku. (Siemens, ADVIA 1800, uživatelská příručka)



**Obr. 6** *Reakční disk, č.1 reakční disk, č.2 kyvety na reakčním disku, č.3 promývání reakčního disku, č.4 reakční míchadlo, č.5 reagenční pipetory, č.6 reagenční míchadlo ( Zdroj: ADVIA 1800, Siemens – technický manuál)*

Reakční disk posunul kyvetu každých 6 vteřin ve směru spektrofotometru před halogenovou žárovkou, která emituje světlo, které projde kyvetami. Spektrofotometr se skládá z fotometru, který změřil absorbanci na základě energie halogenové žárovky a optické hustoty kyvet a chladicí nádržky, která udržovala teplotu žárovky pomocí chladicí kapaliny. (Siemens, ADVIA 1800, uživatelská příručka)

### **3.2.2. Kvantitativní stanovení celkové bílkoviny v séru**

Metoda kvantitativního stanovení celkové bílkoviny je založena na Biuretové reakci, kterou systém ADVIA 1800 disponuje. Při Biuretové reakci reagují proteiny s měďnatými ionty v alkalickém prostředí za vzniku fialového komplexu, kdy množství celkové bílkoviny je přímo úměrné intenzitě vzniklého barevného komplexu.

Rovnice reakce:



### **3.2.3. Kalibrace**

Kalibrace jsem se účastnila pod dohledem odpovědné osoby, která mi celý systém kalibrace objasnila a následně mě jím provedla. Kalibrace se provádí před zahájením vyšetření v případě analyzátoru ADVIA 1800 každý den, minimálně jednou z důvodu nepřetržitého provozu.

### **3.2.4. Kontrola kvality**

Frekvence kontroly kvality je založena na mnoha faktorech. Při provádění metody by měly kontroly kvality probíhat minimálně 2x denně, vždy při použití nové šarže reagensů, po údržbě systému, čištění či odstraňování závad na zařízení a po provedení nové kalibrace. Pro kontrolu kvality pro stanovení celkové bílkoviny se používají komerční kontrolní vzorky, fyziologická a patologická hodnota kontroly. ( Siemens, ADVIA 1800, uživatelská příručka)

### **3.2.5. Systém HYDRASYS**

Jedná se o kompletně nový, multiparametrický, poloautomatizované zařízení, které umožňuje zpracovávání jakýchkoliv agarózových gelů elektroforézy ze série Hydragelů. Elektroforetické kroky jsou dány v sekvencích, jako je aplikace vzorku, migrace, inkubace, barvení, odbarvování a sušení. Pro zajištění správné funkce přístroje mohou být používány pouze speciální HYDRAGEL kity, gely a reagensie vyráběné a testované firmou SEBIA. ( Hydrasys, Sebia – technický manuál)

Zařízení je složeno z kontrolního panelu s LCD obrazovkou, která ukazuje průběh migračního a barvicího programu, v různých krocích, 2 LED diod, z dotekové klávesnice, migrační a barvicí komory. ( Hydrasys, Sebia – technický manuál)



**Obr. 7** *Systém HYDRASYS, Sebia*

*( Zdroj: Systém HYDRASYS, Sebia – technický manuál )*

Migrační komora sloužila k migraci a sušení gelů. Skládala se z teplotně regulované desky, která sloužila pro vložení gelu a udržovala konstantní teplotu po dobu migrace, probíhalo zde i chlazení a inkubace gelů. Druhou částí migrační komory byl migrační rámeček, který je místem pro vložení aplikátoru a jejich pomocí aplikuje vzorky na gel. Druhou jeho nezávislou funkcí byla aplikace elektrického pole od platinových elektrod v gelu prostřednictvím pufrů nasycených houbiček. Migrační komora byla vybavena dvojitým ochranným systémem, prvním z nich byl vnitřní mikrospínač, který chránil obsluhu v průběhu práce před kontaktem s elektrickým napětím, nebo horkými částmi komory. Napětí neprochází, pokud není víko komory uzavřeno. Druhým ochranným systémem byl termospínač, který přerušil napájení, pokud došlo k překročení teploty sušení před 110°C.

Barvicí komora zajišťovala barvení, odbarvování a sušení gelů. Tato část byla složena z nosiče gelů, těsné hliníkové komory opatřené teflonovým povrchem, pumpy, která zajišťovala cirkulaci reagentie v komoře, deseticestného ventilu a sušícího elementu, rozvádějícího teplý vzduch po celém povrchu gelu. Ochranný systém barvicí komory byl složen z detektoru přítomnosti nosiče gelu, zámku nosiče gelu, tří senzorů úrovně hladiny v barvicí komoře, řízeného ventilu, který zabraňoval kontaminaci reagentií a termospínače, který odpojí napájení, pokud teplota sušení přesáhne 110°C. ( Hydrasys, Sebia – technický manuál)

### **3.2.6. Příprava vzorků**

Vzorky označené čárovým kódem jsem rozmístila do stojanu, zkontrolovala jsem pořadí dle vytištěného průvodního listu a připravila jsem si všechny náležitosti pro pipetování. Po zvolení příslušného migračního programu Protein 15/30 jsem vyndala vlhkou komoru z ledničky a vybalila jsem aplikátory. Pomocí automatické pipety nastavené na 10 ml jsem aplikovala příslušný vyšetřovaných sér do každé jamky podle čísel označených na zkumavkách. Takto připravený aplikátor jsem poté zasunula do drážky k tomu určené ve vnitřním plastovém nosiči vlhké komory zuby směrem nahoru a víko komory jsem uzavřela. Poté jsem čekala 5 minut. Poté jsem aplikátor vyjmula z vlhké komory. Připravený aplikátor jsem umístila do příslušné pozice do aplikační části migračního rámečku, dle příbalového letáku v soupravě, čili do pozice 3 a 9. ( Hydrasys, Sebia – technický manuál)

Poté jsem otevřela víko migrační komory, vybalila jsem houbičky nasycené pufrem a umístila jsem je za plastové konce na spodní stranu migračního rámečku, tak, aby byly ve správném kontaktu s elektrodami. Gel jsem vybalila, krátce jsem filtračním papírem odsála přebytek roztoku z povrchu gelu. Do rámečku na migrační desce jsem aplikovala přibližně 200 ml destilované vody. Gel jsem prohnutím umístila na migrační desku. ( Hydrasys, Sebia – technický manuál)

### **3.2.7. Stanovení elektroforézy sérových bílkovin**

Systém HYDRASYS je kompletně nový systém originální koncepce, který otevírá cestu automatizaci elektroforetických technik na Hydragelech. Systém může provést až 90 elektroforéz sérových bílkovin za 1 hodinu. Pod dohledem laborantky jsem si zvolila migrační program vhodný pro mé vyšetření, který indikovaly dvě zelené LED diody. HYDRASYS má kapacitu 40 migračních programů. ( Hydrasys, Sebia – technický manuál)

### **3.2.7.1. Migrace**

Volbu programu jsem provedla pod dohledem laborantky zmáčknutím klávesy 1 : SELECT MIGRATION. Migrační program sestával ze tří po sobě jdoucích fází: aplikace, migrace a inkubace / sušení. Po ochlazení migrační desky na 50°C. (Hydrasys, Sebia – technický manuál)

### **3.2.7.2. Barvení**

HYDRASYS má kapacitu 40 barvicích programů. Volbu barvicího programu jsem provedla zmáčknutím klávesy 3 : SELECT STAINING, z nabídky dostupných programů jsem zvolila program 1 PROTEIN. Barvicí program sestával z několika po sobě jdoucích fází jako je barvení, odbarvování a sušící krok, po jehož dokončení následovalo krátké chlazení ventilátorem. Po schladnutí zařízení akustickým pípnutím oznámilo ukončení barvicího programu a nosič gelů byl odemčen. ( Hydrasys, Sebia – technický manuál)

Po ukončení barvicího programu byl gel připraven pro vizuální odečtení, po němž následovalo skenování pomocí skenovacího přístroje Epson Perfection V700 PHOTO a pomocí vyhodnocovacího programu PHORESIS.

### **3.2.7.3. Set Sebia – HYDRAGEL 7, 15 a 30 Proteine**

Pro stanovení elektroforézy sérových bílkovin jsem použila soupravu Hydragel 15 Protein, což znamená, že série vyšetření probíhala po 15 vzorcích na jedné gelové destičce. Souprava obsahovala 10 gelů pro přímé použití , 10 jednorázových aplikátorů, 20 jednorázových houbiček nasycených pufrem, 1 lahvička koncentrovaného barvicího roztoku amidočerně, filtrační papíry. Reagencie, které jsou potřebné pro vyšetření, ale nejsou součástí setu, se dokupují zvlášť, jako např. HYDRASYS odbarvovací roztok, HYDRASYS promývací roztok či Fluidil. ( Hydrasys, Sebia – technický manuál)

## 4. Výsledky

Vyšetření na celkovou bílkovinu a elektroforézu v séru dárců jsem prováděla v Laboratoři klinické chemie, Nemocnice České Budějovice a.s. pod dohledem laborantky. Výsledky měření jsem zpracovala do barevných grafů a přehledných tabulek v programu Microsoft Excel 2007. Součástí výsledků jsou i doplňující informace o dárcích v tabulce č. 14. ( věk, pohlaví dárců, hmotnost a množství odebrané plazmy). Všechny naměřené výsledky se nachází v Příloze č.1. Ze zjištěných výsledků byly zpracovány základní parametry, jako je aritmetický průměr, směrodatná odchylka, minimum, maximum a medián. Součástí je i procentuální výskyt snížené hladiny proteinů v séru u vyšetřovaných dárců.

### 4.1. Celková bílkovina

**Tab. 1** Naměřené parametry u celkové bílkoviny před odběrem plazmaferézy [ g/l ]

<b>Průměr</b>	73
<b>Směrodatná odchylka</b>	4,1
<b>Minimum</b>	64
<b>Maximum</b>	81
<b>Medián</b>	73

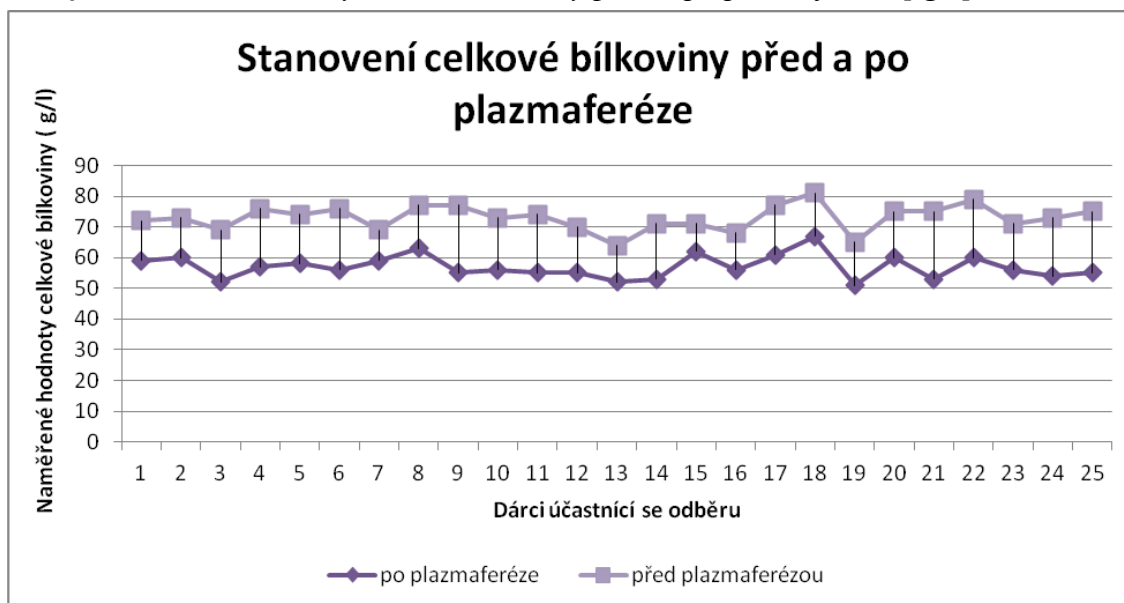
Zdroj: Vlastní výzkum

**Tab. 2** Naměřené parametry u celkové bílkoviny po odběru plazmaferézou [ g/l ]

<b>Průměr</b>	57
<b>Směrodatná odchylka</b>	3,8
<b>Minimum</b>	51
<b>Maximum</b>	67
<b>Medián</b>	56

Zdroj: Vlastní výzkum

**Graf 1** Naměřené hodnoty celkové bílkoviny před a po plazmaferéze [ g/l ]



Zdroj: Vlastní výzkum

Tabulka č. 1, zobrazuje základní parametry naměřených hodnot celkové bílkoviny v séru před a po plazmaferéze. Tabulka č. 2, znázorňuje základní parametry naměřených hodnot po plazmaferéze. Z grafu č. 1, je patrné, že odběr plazmaferézou ovlivňuje výsledky celkové bílkoviny.

## 4.2. Elektroforéza

### 4.2.1. Frakce albuminu

**Tab. 3** Naměřené parametry u albuminové frakce před odběrem plazmaferézou [ g/l ]

<b>Průměr</b>	47,3
<b>Směrodatná odchylka</b>	3,5
<b>Minimum</b>	39,0
<b>Maximum</b>	55,0
<b>Medián</b>	48,1

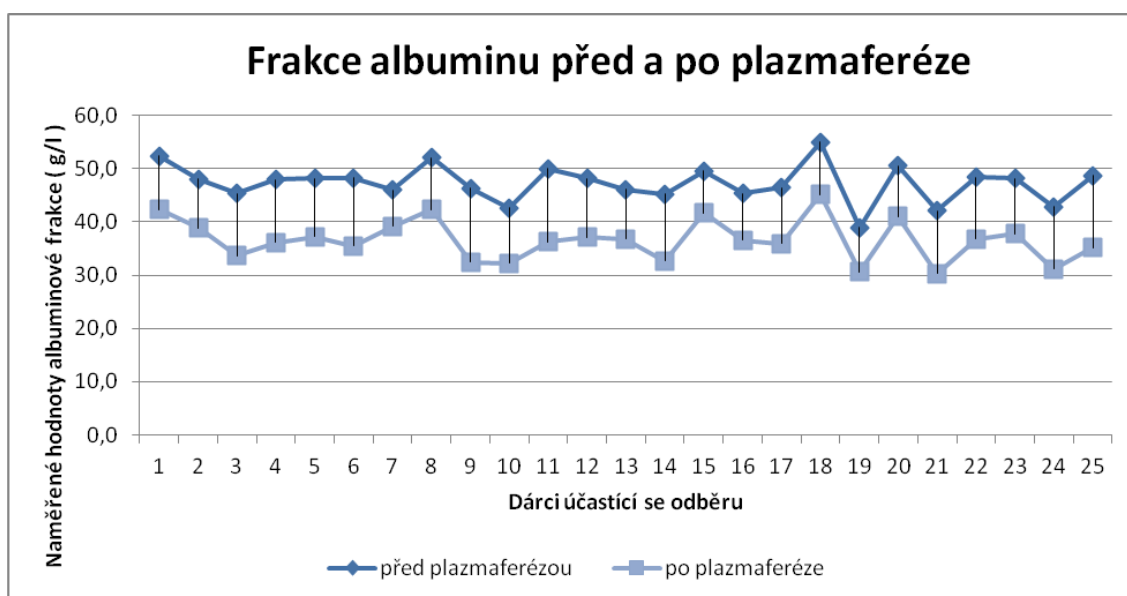
Zdroj: Vlastní výzkum

**Tab. 4** Naměřené parametry u albuminové frakce po odběru plazmaferézou [ g/l ]

<b>Průměr</b>	36,6
<b>Směrodatná odchylka</b>	3,9
<b>Minimum</b>	30,3
<b>Maximum</b>	45,1
<b>Medián</b>	36,6

Zdroj: Vlastní výzkum

**Graf 2** Naměřené hodnoty albuminové frakce před a po plazmaferéze [ g/l ]



Zdroj: Vlastní výzkum

Tabulka č.3 zobrazuje základní parametry naměřených hodnot albuminové frakce před plazmaferézou. Tabulka č.4 znázorňuje základní parametry naměřených hodnot po odběru plazmaferézou. Na Grafu č. 2 je možné vidět výraznější rozdíly v naměřených hodnotách.



#### 4.2.2. Frakce $\alpha$ -1-globulinů

**Tab. 5** Naměřené parametry u  $\alpha$ -1-globulinové frakce před plazmaferézou [ g/l ]

<b>Průměr</b>	2,17
<b>Směrodatná odchylka</b>	0,41
<b>Minimum</b>	1,50
<b>Maximum</b>	3,30
<b>Medián</b>	2,20

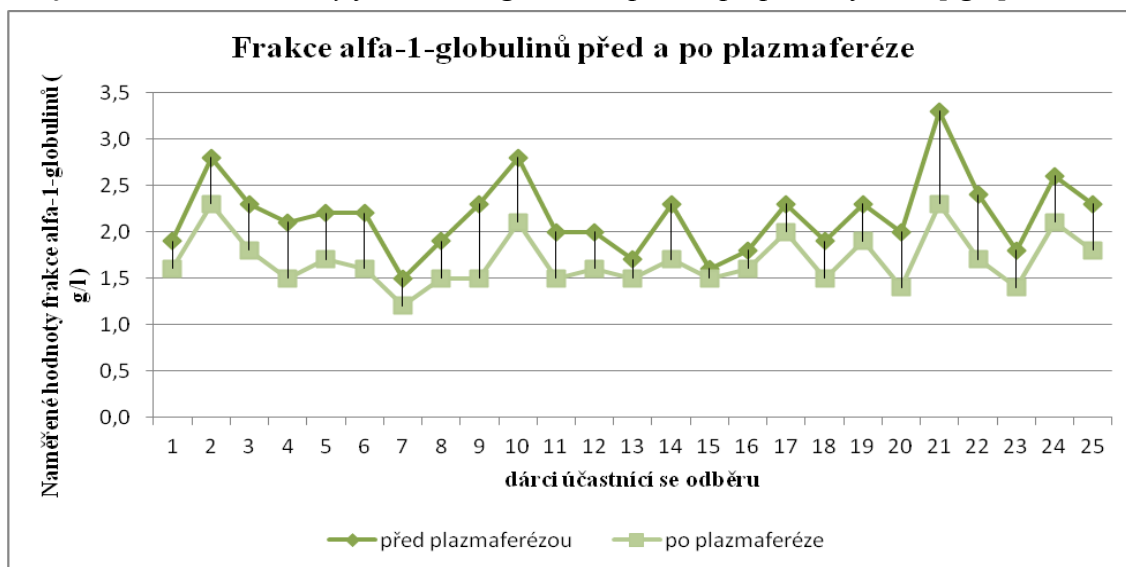
Zdroj: Vlastní výzkum

**Tab. 6** Naměřené parametry u  $\alpha$ -1-globulinové frakce po plazmaferéze [ g/l ]

<b>Průměr</b>	1,69
<b>Směrodatná odchylka</b>	0,28
<b>Minimum</b>	1,20
<b>Maximum</b>	2,30
<b>Medián</b>	1,60

Zdroj: Vlastní výzkum

**Graf 3** Naměřené hodnoty frakce  $\alpha$ -1-globulinů před a po plazmaferéze [ g/l ]



Zdroj: Vlastní výzkum

Tabulka č.5 znázorňuje základní parametry naměřených hodnot frakce  $\alpha$  1 globulinů před plazmaferézou. Tabulka č.6 obsahuje základní parametry naměřených hodnot po plazmaferéze. Na grafu č.3 jsou vidět snížené hodnoty.

#### 4.2.3. Frakce $\alpha$ -2-globulinů

**Tab. 7** Naměřené parametry u frakce  $\alpha$ -2-globulinů před plazmaferézou [ g/l ]

<b>Průměr</b>	7,33
<b>Směrodatná odchylka</b>	0,93
<b>Minimum</b>	5,80
<b>Maximum</b>	9,80
<b>Medián</b>	7,50

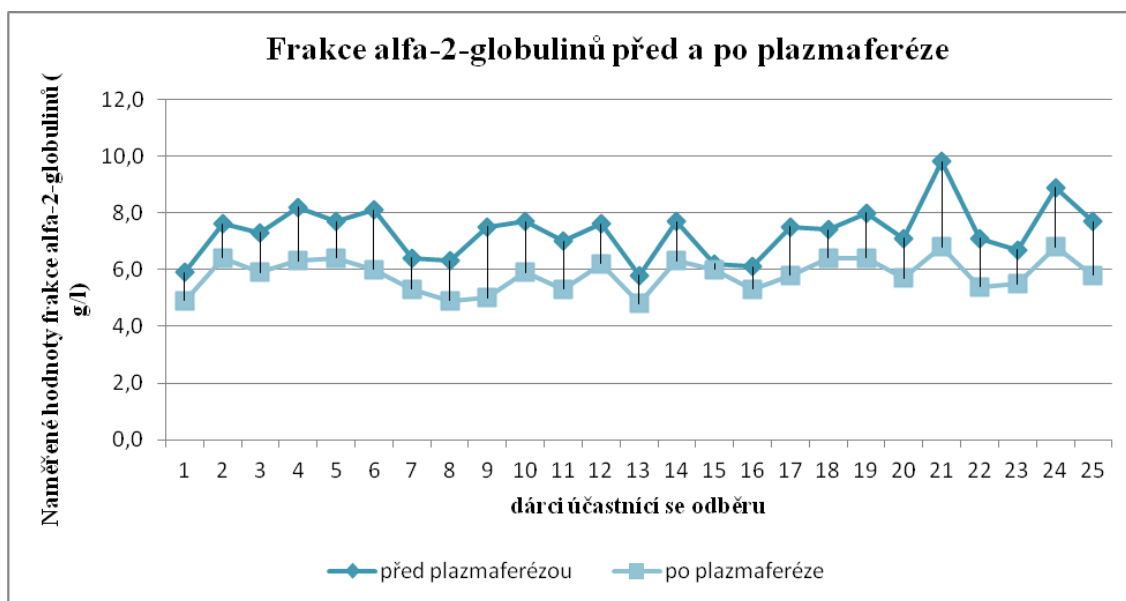
Zdroj: Vlastní výzkum

**Tab. 8** Naměřené parametry u frakce  $\alpha$ -2-globulinů po plazmaferéze [ g/l ]

<b>Průměr</b>	5,82
<b>Směrodatná odchylka</b>	0,59
<b>Minimum</b>	4,80
<b>Maximum</b>	6,80
<b>Medián</b>	5,90

Zdroj: Vlastní výzkum

**Graf 4** Naměřené hodnoty frakce  $\alpha$ -2-globulinů před a po plazmaferéze [ g/l ]



Zdroj: Vlastní výzkum

Tabulka č.7 obsahuje základní parametry naměřených hodnot u frakce  $\alpha$ -2-globulinů před plazmaferézou. Tabulka č. 8 dokumentuje základní parametry naměřených hodnot po plazmaferéze. Z grafu č. 4 je patrné, že k většímu snížení před a po plazmaferéze nedocházelo.

#### 4.2.4. Frakce $\beta$ -globulinů

**Tab. 9** Naměřené parametry u frakce  $\beta$ -globulinů před plazmaferézou [g/l ]

<b>Průměr</b>	6,80
<b>Směrodatná odchylka</b>	1,12
<b>Minimum</b>	4,70
<b>Maximum</b>	9,40
<b>Medián</b>	6,70

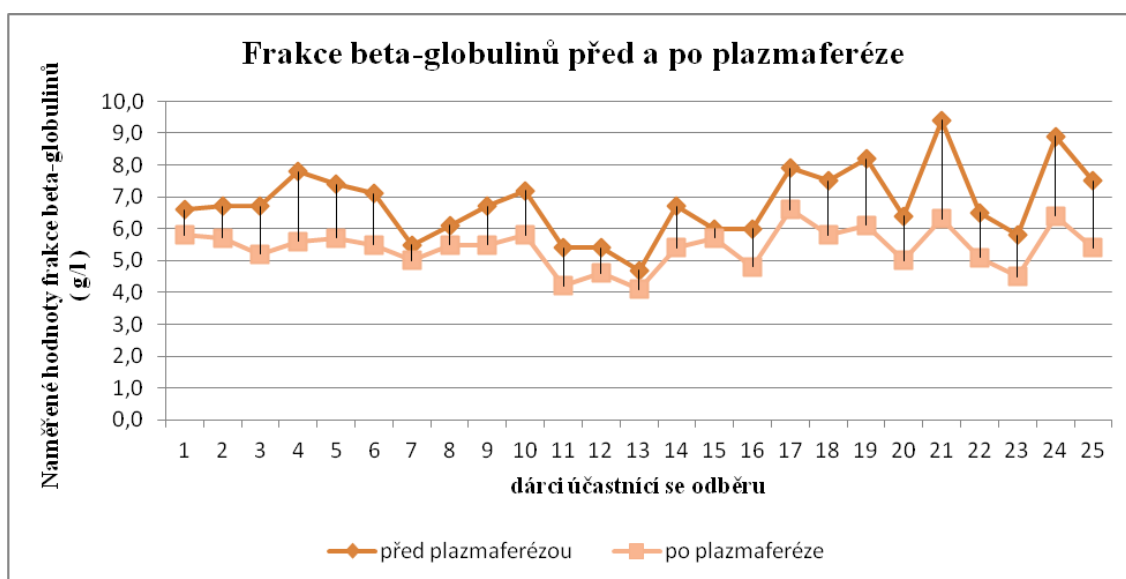
Zdroj: Vlastní výzkum

**Tab. 10** Naměřené parametry u frakce  $\beta$ -globulinů po plazmaferéze [ g/l ]

<b>Průměr</b>	5,41
<b>Směrodatná odchylka</b>	0,64
<b>Minimum</b>	4,10
<b>Maximum</b>	6,60
<b>Medián</b>	5,50

Zdroj: Vlastní výzkum

**Graf 5** Naměřené hodnoty frakce  $\beta$ -globulinů před a po plazmaferéze [ g/l ]



Zdroj : Vlastní výzkum

Tabulka č.9 obsahuje základní parametry naměřených hodnot frakce  $\beta$ -globulinů před plazmaferézou. Tabulka č.10 vyjadřuje základní parametry hodnot po plazmaferéze. Na grafu č.5 jsou vidět snížené hodnoty.

#### 4.2.5. Frakce $\gamma$ -globulinů

**Tab. 11** Naměřené parametry u frakce  $\gamma$ -globulinů před plazmaferézou [ g/l ]

<b>Průměr</b>	9,32
<b>Směrodatná odchylka</b>	2,35
<b>Minimum</b>	5,20
<b>Maximum</b>	14,50
<b>Medián</b>	9,10

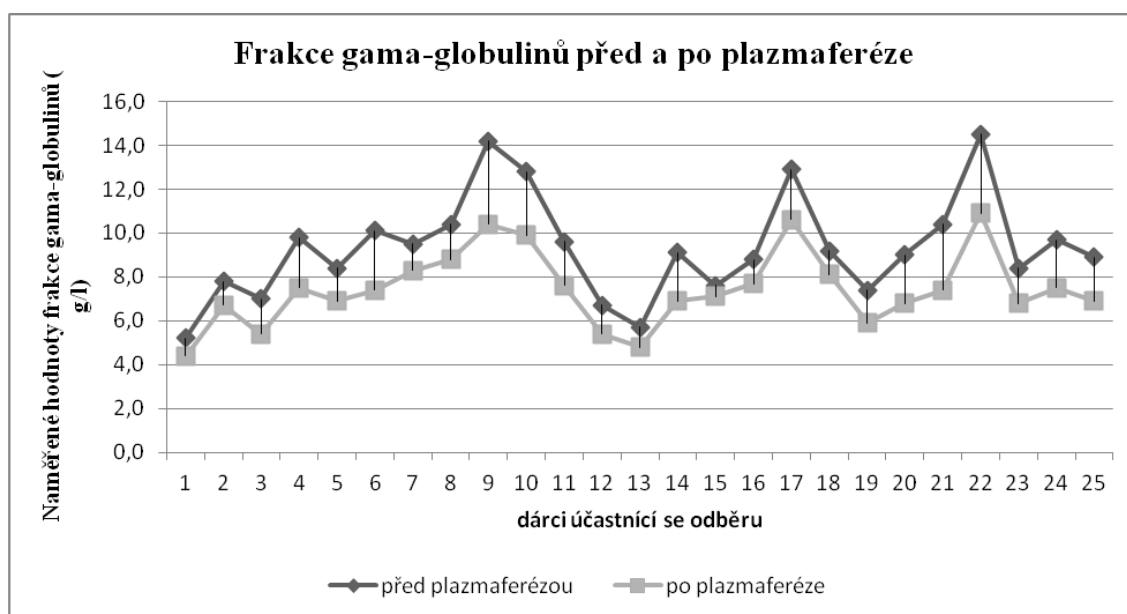
Zdroj: Vlastní výzkum

**Tab. 12** Naměřené parametry u frakce  $\gamma$ -globulinů po plazmaferéze [ g/l ]

<b>Průměr</b>	7,44
<b>Směrodatná odchylka</b>	1,70
<b>Minimum</b>	4,40
<b>Maximum</b>	10,90
<b>Medián</b>	7,40

Zdroj: Vlastní výzkum

**Graf 6** Naměřené hodnoty frakce  $\gamma$ -globulinů před a po plazmaferéze [ g/l ]



Zdroj: Vlastní výzkum

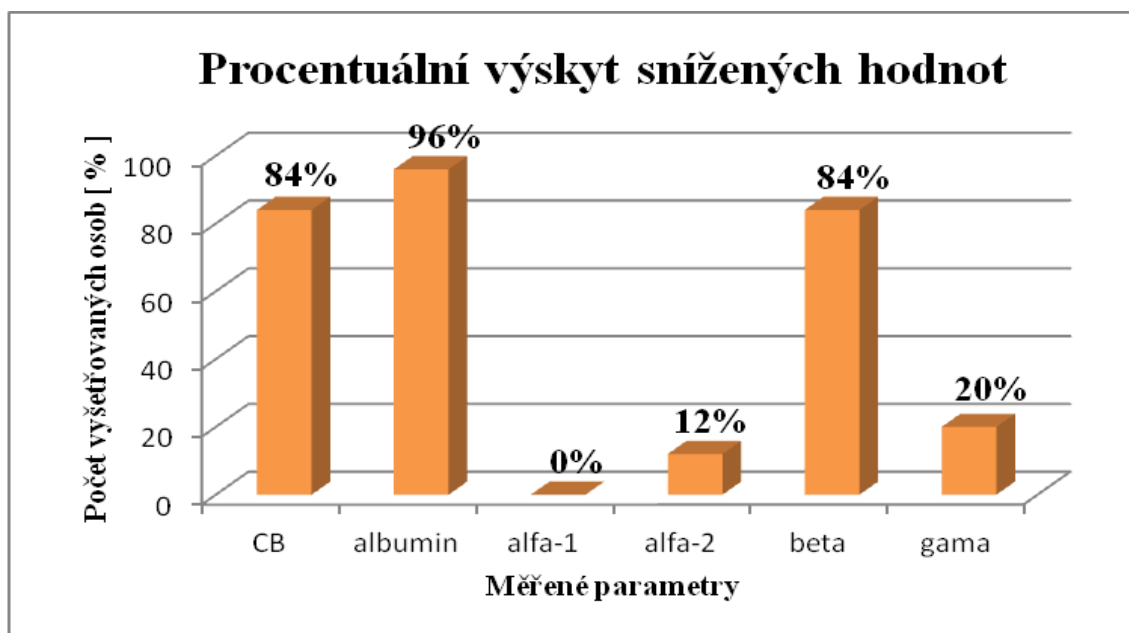
Tabulka č.11 obsahuje základní parametry o naměřených hodnotách frakce  $\gamma$  globulinů před plazmaferézou. Tabulka č.12 dokumentuje základní parametry hodnot naměřených po plazmaferéze. Na Grafu 6. jsou vidět snížené hodnoty.

**Tab. 13** Počet dárců se sníženou hladinou bílkovin v séru po odběru plazmaferézou [ počet osob ]

	Referenční hodnoty [ počet osob ]	Snížené hodnoty [počet osob ]
<b>Celková bílkovina</b>	4	21
<b>Albumin</b>	1	24
<b>Alfa - 1 - globuliny</b>	25	0
<b>Alfa- 2 -globuliny</b>	22	3
<b>Beta - globuliny</b>	4	21
<b>Gama - globuliny</b>	20	5

Zdroj : Vlastní výzkum

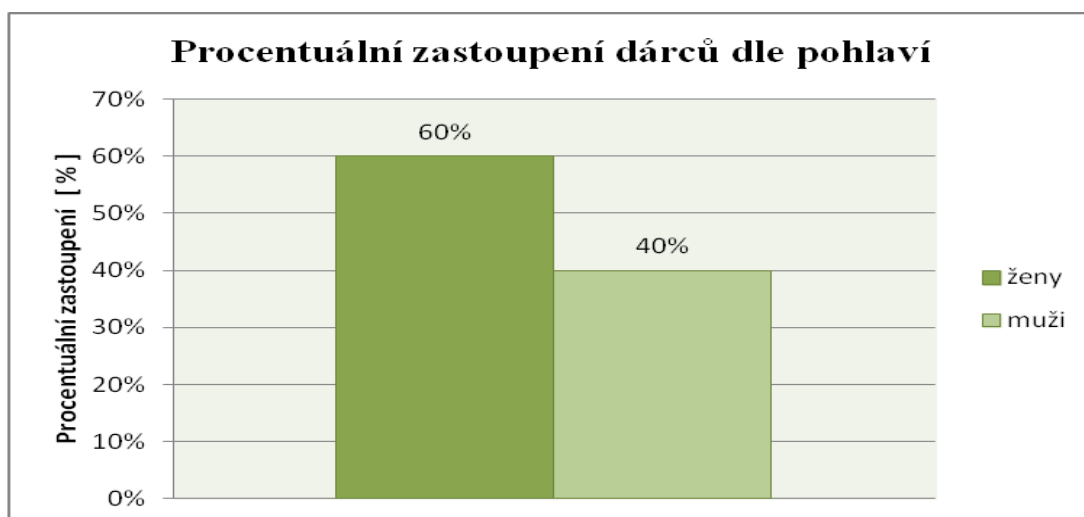
**Graf 7** Procentuální výskyt snížení CB a elektroforetických frakcí u dárců po odběru plazmaferézou [ %]



Zdroj: Vlastní výzkum

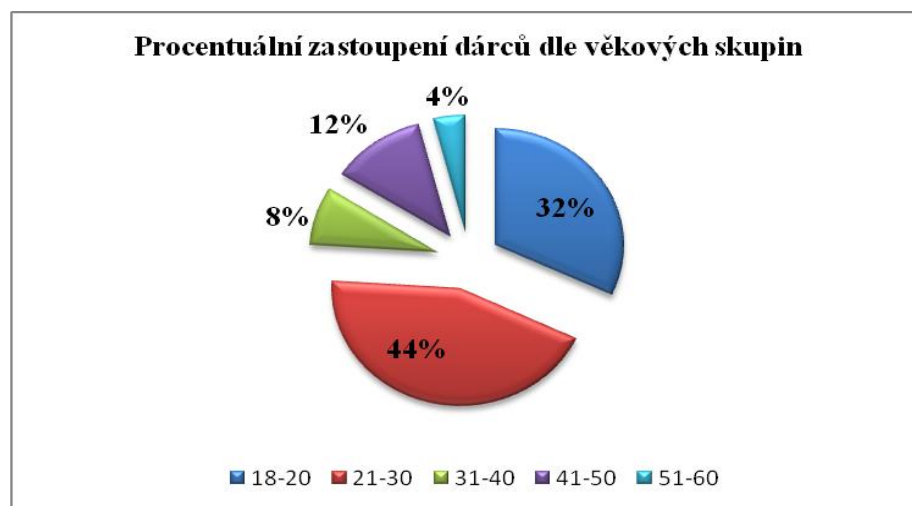
Tabulka č.13 dokumentuje počty dárců, u kterých byla zjištěna snížená hladina vyšetřovaných proteinů v séru po odběru plazmaferézou. Graf č.7 znázorňuje počet těchto osob v procentech.

**Graf 8** *Procentuální zastoupení dárců účastnících se odběru dle pohlaví [ % ]*



Zdroj: Vlastní výzkum

**Graf 9** *Procentuální zastoupení dárců účastnících se odběru dle věkových skupin [ % ]*



Zdroj: Vlastní výzkum



Graf č.8 obsahuje procentuální zastoupení dárců dle pohlaví, graf č.9 vykazuje procentuální zastoupení dárců dle věkových skupin. Tabulka č.14 dokumentuje doplňující informace o dárcích. Všechny naměřené výsledky jsou obsaženy v Příloze č.1.

**Tab. 14** *Doplňující informace o dárcích účastnících se odběru*

č.	pohlaví	věk	hmotnost [ kg ]	odebraná plazma [ ml ]
1	muž	47	98	880
2	žena	21	55	650
3	žena	22	72	800
4	muž	43	99	880
5	žena	25	114	880
6	žena	32	61	700
7	muž	58	84	880
8	muž	32	87	880
9	žena	24	66	751
10	žena	19	79	852
11	žena	19	58	651
12	žena	50	57	650
13	muž	22	67	750
14	žena	20	65	751
15	muž	27	119	880
16	muž	19	85	880
17	žena	27	66	751
18	muž	20	105	880
19	žena	20	58	650
20	muž	22	88	880
21	žena	22	60	700
22	žena	23	65	751
23	muž	20	73	800
24	žena	19	79	851
25	žena	22	58	650

Zdroj: Vlastní výzkum

## 5. Diskuze

Výzkum k mé bakalářské práci probíhal v Laboratoři klinické chemie Nemocnice v Českých Budějovicích, kdy jsem pod dohledem laborantky provedla měření 50. vzorků séra od 25. dárců odebraných před a po plazmaferéze, získaných z plazmaferetického centra Plasmafera s.r.o, která se zabývá odběry plazmy pro další zpracování. Tyto vzorky sér jsem vyšetřila na celkovou bílkovinu a elektroforézu. Stanovení celkové bílkoviny patří mezi rutinní biochemická vyšetření, které jsem prováděla pomocí analyzátoru ADVIA 1800 od společnosti Siemens. Vyšetření celkové bílkoviny je citlivý test pro posouzení celkového stavu pacienta, kdy výsledky mohou poukázat na postižení ledvin nebo trávicího ústrojí. (Dastyh, Breinek 2008)

V případě stanovení celkové bílkoviny byla použita Biuretová reakce, která se používá v běžné rutinní biochemické praxi. Naměřené hodnoty jsou patrné v grafu č.1, kde je zaznamenáno výraznější snížení po provedení plazmaferézy. Medián je v tomto případě 73 před odběrem a 56 po odběru. V tomto měření jsem zjistila 21 snížených hodnot. Pouze 4 dárce měli hodnoty celkové bílkoviny v normální hladině. Byl zjištěn jeden dárce se sníženou hodnotou celkové bílkoviny již před samotným odběrem.

Elektroforéza sérových bílkovin byla prováděna pomocí systému HYDRASYS a setu SEBIA 15/30 protein, kdy princip metody byla elektroforéza na agarózovém gelu.

U albuminové frakce, jejíž hodnoty jsou zobrazeny na grafu č. 2, jsou patrné snížené hodnoty. Medián byl v tomto případě 48,1 před odběrem a 36,6 po odběru. V tomto měření jsem zaznamenala 24 snížených hodnot albuminu po provedení plazmaferézy. Pouze jeden dárce měl hladinu albuminu v normálních hodnotách. U tří dárců byli hodnoty albuminu snížené již před odběrem.

Graf č.3, znázorňuje naměřené hodnoty  $\alpha$ -1-globulinové frakce, kde k výrazným poklesům nedošlo. Medián byl v tomto případě 2,20 před odběrem a 1,60 po odběru.

Ze vzorků odebraných po plazmaferéze nebyly zjištěny žádné snížené hodnoty v této frakci.

V případě frakce  $\alpha$ -2-globulinů, jejíž naměřené hodnoty jsou vyneseny v grafu č.4, bylo zjištěno snížení hodnot pouze u 3 vzorků. Medián byl 7,5 před odběrem a 5,9 po odběru.

Frakce  $\beta$ -globulinu je hodnocena na grafu č.5. U této frakce bylo zjištěno 21 vzorků se sníženou hladinou  $\beta$ -globulinů po odběru plazmaferézou.

U hodnocení frakce  $\gamma$ - globulinů jsou v tabulce č. 11 a 12 lehké rozdíly mezi naměřenými hodnotami před a po plazmaferéze. Na grafu č.6 jsou vidět lehká snížení hodnot. Bylo zjištěno 5 vzorků se sníženou hladinou po provedení plazmaferézy.

Důležitým hlediskem celého procesu je i preanalytická příprava dárce před vlastním odběrem plazmaferézou, kdy je zapotřebí, aby dárce dodržovali opatření, nutná před odběrem. Jejich součástí je dodržování stravovacích omezení, dieta 14-16 h před odběrem, dostatečný pitný režim, vyvarovat se fyzické námahy a nehladovět. Dárce musí dodržovat i intervaly mezi odběry, které nesmí být kratší než dva týdny, neboť poklesy a následná kompenzace hodnot může být pro organismu zatěžující. Otázkou je, jak může ovlivnit odběr plazmaferézou a snížení hladiny bílkovin v séru, byť přechodné, samotného dárce a jak se toto snížení může projevovat? Mohlo by to ovlivnit samotný odběr a vést k přerušení nebo dokonce ukončení odběru ještě před dosažením stanoveného objemu plazmy z důvodů, jako jsou např. mdloby, dehydratace, pocit nevolnosti, nechutenství či dokonce až ke kolapsu dárce? Zároveň by bylo vhodné provést dále vyšetření bílkovin např. 14 dní po odběru, aby bylo zjištěno, za jaký čas se hladiny proteinů dostanou zpět na normální hladinu.

Graf č.7 zaznamenává procentuální snížení celkové bílkoviny a elektroforetických frakcí v séru po odběru plazmaferézou. Zbývající dva grafy zaznamenávají procentuální zastoupení dárců dle jejich pohlaví, viz graf č.8 a dle věkových skupin, viz graf č.9. V neposlední řadě nechybí ani celý přehled naměřených výsledků

zpracovaných v příloze č.1 a doplňující informace o dárcích účastnících se odběru v tabulce č.14.

Z výsledků vyšetření je pravděpodobné, že snížení parametrů bílkoviny v séru nastalo samotným odběrem plazmaferézou a naředěním organismu dárců fyziologickým roztokem v rámci kompenzace odebrané plazmy. U dárců, kteří odběry absolvují pravidelně, se dá usuzovat, že jejich zdravotní stav je v pořádku. Ovšem v případech některých dárců, byla hladina bílkoviny v krevním séru snížena již před samotným odběrem plazmaferézou a po ní byly tyto hodnoty ve stavu hypoproteinemie. Vzhledem k vyšetření, která dárci podstupují před odběrem, by bylo možná vhodné, obohatit je o jistá biochemická vyšetření, která by odhalila případná rizika již před samotným odběrem plazmaferézou. Zároveň by bylo zajímavé pokračovat ve výzkumu a dárcům odebrat 1 zkumavku srážlivé krve např. za 14 dní po odebrání předchozích dvou zkumavek krve ( před a po výkonu plazmaferézy), krev vyšetřit a posoudit, za jaký časový odstup nastane opětovné vyrovnání hladiny bílkovin v séru na normální ( referenční) hladinu.

## 6. Závěr

Cílem mé bakalářské práce bylo teoreticky a prakticky ovládnout metodiku plazmaferézy, stanovení celkové bílkoviny a elektroforézy v séru dárců ze získaných vzorků před a po výkonu plazmaferézy a z naměřených výsledků zjistit, u kolika dárců došlo ke snížení hladiny bílkovin v séru pod referenční mez.

V Laboratoři klinické chemie Nemocnice v Českých Budějovicích a.s, jsem provedla měření 50. vzorků krve od 25. dárců. Z vyšetřených vzorků odebraných po plazmaferéze bylo zjištěno snížení hladiny celkové bílkoviny u 84% dárců ( 21 dárců), frakce albuminu byla snížena u 96% dárců ( 24 dárců), u alfa<sub>1</sub>-globulinové frakce bylo procento snížení 0% ( žádný dárců neměl po odběru plazmaferézou snížené hodnoty v této frakci), alfa<sub>2</sub>-globulinové frakce byla snížena u 12% dárců ( 3 dárci), beta - globulinová frakce byla snížena u 84% dárců( 21 dárců) a frakce gama-globulinů byla snížena u 20% dárců ( 5 dárců).

## 7. Seznam použité literatury

ANALYZÁTOR ADVIA 1800, SIEMENS , dostupné z <http://www.healthcare.siemens.com/clinical-chemistry/system/advia-1800>

ANALYZÁTOR HYDRASYS, SEBIA, dostupné z [http://alstruments.sk/sebia\\_p\\_01.html](http://alstruments.sk/sebia_p_01.html)

BEDNAŘÍK, J. *Léčebná výměnná plazmaferéza v léčbě autoimunitních nervosvalových onemocnění*. Neurologie pro praxi. 12 (6). 2011

BUZZA, M., MARKS, DC., CAPPER, E., BADCOCK, CA., REID, S., KWOK, M., YANG, H., LEE, J., CORRIGAN, C., HARTKOPF-THEIS, T., KELLER, A. *A prospective trial assessing the safety and efficacy of collecting up to 840 mL of plasma in conjunction with saline infusion dutiny plasmapheresis*. Transfusion, 52 (8) : 1806-13, 2012.

ČERMÁKOVÝ, M. A KOLEKTIV AUTORŮ. *Klinická biochemie 2.díl*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2005. ISBN 80-7013-424-0

DASTYCH, M., BREINEK, P. A KOLEKTIV AUTORŮ. *Klinická biochemie*. Brno: Masarykova univerzita, 2008. ISBN 978-80-210-4572-9

DOLEŽALOVÁ, V. A KOLEKTIV AUTORŮ. *Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii*. Brno, 1995. ISBN 80-7013-198-5

DOSTÁL, J., PAULOVÁ, H., SLANINA, J., TÁBORSKÁ, E. *Biochemie pro bakaláře*. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3232-4

GUDER, WG. *History of the preanalytical phase: a personal view*. Biochimica Medica 24 (1) : 25-30, 2014.

HOWARD, MR., HAMILTON, PJ. *Haematology an illustrated colour text*. Churchill Livingstone, 1997. ISBN 0-443-05276-X

LIPPI, G., LUCA SALVAGNO, G., BLANKAERT, N., GIAVARINA, D., GREEN, S., KITCHEN, S., PALICKA, V., VASSAULT, AJ., PLEBÁNI, M. *Multicenter evaluation of the hemolysis index in automated clinical chemistry systéme*. Clinical chemismy and laboratoř medicine, 47 ( 8) : 934-9, 2009.

LISSOIR, B., WALLEMACQ, P., MAISIN, D. *Serum protein electrophoresis: comparison of capillary zone electrophoresis Capillarys (Sebia) and agarose gel electrophoresis Hydrasys ( Sebia)*. Annales de biologie clinique. 61 (5) : 557-62, 2003.

MARSHAL, WJ., BANGERT, SK.. *Clinical Chemmistry*. Mosby Elsevier, 2008. ISBN 97-80-7234-34-559

NAKANISHI, T., SUZUKI, N., KURAGANO, T., NAGASAWA, Y., HASUIKE, Y. *Current topics in therapeutic plasmapheresis*. Clinical and experimental nephrology. 18 (1) : 41-9, 2014.

NEZBEDA, P. *Analytická část laboratorního vyšetřeni 2013*. CEVA [online] 9.duben 2014, [ 2014-01-04]. Dostupné z <http://www.ceva-edu.cz/course/view.php?id=82> ISSN 1803-8999

NEZBEDA, P. *Bilkoviny 2013*. CEVA [online] 9.duben 2014, [ 2014-01-04]. Dostupné z <http://www.ceva-edu.cz/course/view.php?id=78> ISSN 1803-8999

NEZBEDA, P. *Klinická biochemie a laboratorní medicína 2013*. CEVA [online] 9.duben 2014, [ 2014-01-04]. Dostupné z <http://www.ceva eu.cz/course/view.php?id=83> ISSN 1803-8999

NEZBEDA, P. *Laboratorní diagnostický proces 2013*. CEVA [online] 9. duben 2014 , [2014-01-04 ]. Dostupné z <http://www.ceva-edu.cz/course/view.php?id=84> ISSN 1803-8999.

ODSTRČIL, J. *Biochemie*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2005. ISBN 80-7013-425-9

OKUTUCU, B., DINER, A., HABIB, O., ZIHNIUGLU, F. *Comparison of five methods for determination of total plasma protein concentration*. Journal of biochemical and biopsychical methods. 70 (5) : 709-11, 2007.

PENKA, M., TESAŘOVÁ, E., A KOLEKTIV. *Hematologie a transfuzní lékařství II*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3466-6

PLASMAFERA s.r.o, dostupné z <http://plasmafera.eu>

PLAZMAFERÉZA. Ústřední vojenská nemocnice, oddělení hematologie a krevní transfúze, Praha, dostupné z: <http://www.transfuze-uvn.cz/plazmaferenza.html>

RACEK, J., A KOLEKTIV AUTORŮ. *Klinická biochemie 2.vydání*. Praha: Galén, 2006. ISBN 80-7262-324-9

RINGWALD, J., LANGE, N., RABE, C., ZIMMERMANN, R., STRASSER, E., HENDELMEIER, M., STROBEL, J., ECKSTEIN, R. *Why do some apheresis donor donate blood just once?* Vox sanguinis 93 (4) : 354-62, 2007

ROZSYPALOVÁ, M., HALADOVÁ, E., ŠAFRÁNKOVÁ, A. *Ošetrovatelství II*. Praha : Informatorium, 2002. ISBN 80-86073-97-1

SAKALOVÁ, A., A KOLEKTIV AUTORŮ. *Hematológia a transfuziológia*. Žilina, 1995. ISBN 80-217-0444-6

SEDLÁČEK, P. *Jak se vyznat v laboratorních hodnotách*. Eminent, 2006. ISBN 80 7281-256-4

SIAMI, GA, SIAMI, FS. *Membrane plasmapheresis in the United States: a review over the last 20 years*. Therapeutic apheresis 5 (4) : 315-20, 2001

SKORŠEPA, M., VACULČÍKOVÁ, D., CEJPEK, K. *Biochemické experimentálne metódy*. Banská Bystrica, 2008. ISBN 978-80-8083-570-5

STANDARTNÍ OPERAČNÍ POSTUP. Plasmafera s.r.o, České Budějovice



SZCZEKLIK, W., WAWRZYCKA, K., WLUDARCZYK, A., SEGA, A., NOSÁK, I.,  
SECZYNSKA, B., FAJFEK, I., ZAJAC, K., KRÓLIKOWSKI, W., KÓZKA, M.

*Complications in patients treated with plasmapheresis in the intensive care unit.*

*Anesthesiology intensive therapy.* 45 (1) : 7-13, 2013.

TECHNICKÝ MANUÁL. ADVIA 1800, Siemes

TECHNICKÝ MANUÁL. Hydragel 7, 15 a 30 Proteine, Sebia, 2009

TECHNICKÝ MANUÁL. HYDRASYS, Sebia

TROJAN, S., A KOLEKTIV. *Lékařská fyziologie.* Praha: Grada, 1999. ISBN 80-7169 -  
788-5

## **8. Klíčová slova**

Plazmaferéza

Kvantitativní stanovení celkové bílkoviny

Elektroforéza

### **Key words**

Plasmapheresis

Quantitative determination of total protein


Electrophoresis

## Přílohy

**Příloha č. 1** Naměřené hodnoty celkové bílkoviny a elektroforézy v séru dárců před a po plazmaferéze – výsledky

č.	CB ( g/l)		Elektroforéza bílkovin ( %)									
			albumin		alfa 1		alfa 2		beta		gama	
	před	po	před	po	před	po	před	po	před	po	před	po
1	72,0	59,0	72,9	71,7	2,6	2,7	8,2	8,3	9,1	9,8	7,2	7,5
2	73,0	60,0	65,9	64,8	3,8	3,9	10,4	10,6	9,2	9,6	10,7	11,1
3	69,0	52,0	65,8	64,9	3,4	3,4	10,7	11,4	9,7	10,0	10,4	10,3
4	76,0	57,0	63,2	63,3	2,8	2,6	10,8	11,0	10,3	9,9	12,9	13,2
5	74,0	58,0	65,2	64,1	3,0	3,0	10,4	11,1	10,0	9,9	11,4	11,9
6	76,0	56,0	63,6	63,4	2,9	2,8	10,7	10,7	9,4	9,8	13,4	13,3
7	69,0	59,0	66,7	66,5	2,2	2,0	9,3	8,9	8,0	8,5	13,8	14,1
8	77,0	63,0	67,7	67,2	2,5	2,4	8,3	7,8	8,0	8,7	13,5	13,9
9	77,0	55,0	60,2	59,1	3,0	2,8	9,7	9,2	8,7	10,0	18,4	18,9
10	73,0	56,0	58,3	57,7	3,9	3,7	10,5	10,6	9,8	10,4	17,5	17,6
11	74,0	55,0	67,5	66,0	2,7	2,7	9,5	9,7	7,3	7,7	13,0	13,9
12	70,0	55,0	68,8	67,5	2,8	3,0	10,9	11,3	7,7	8,3	9,8	9,9
13	64,0	52,0	72,1	70,7	2,7	2,9	9,0	9,2	7,3	7,9	8,9	9,3
14	71,0	53,0	63,6	61,7	3,2	3,3	10,9	11,8	9,5	10,2	12,8	13,0
15	71,0	62,0	69,8	67,2	2,2	2,4	8,8	9,7	8,5	9,2	10,7	11,5
16	68,0	56,0	66,6	65,4	2,6	2,8	9,0	9,4	8,8	8,6	13,0	13,8
17	77,0	61,0	60,3	58,9	3,0	3,3	9,8	9,5	10,2	10,9	16,7	17,4
18	81,0	67,0	67,9	67,3	2,4	2,3	9,1	9,6	9,2	8,7	11,4	12,1
19	65,0	51,0	60,0	60,0	3,6	3,8	12,4	12,6	12,6	12,0	11,4	11,6
20	75,0	60,0	67,3	68,3	2,7	2,4	9,5	9,6	8,5	8,4	12,0	11,3
21	75,0	53,0	56,2	57,1	4,4	4,4	13,0	12,8	12,5	11,8	13,9	13,9
22	79,0	60,0	61,3	61,4	3,0	2,9	9,1	9,0	8,3	8,5	18,3	18,2
23	71,0	56,0	67,9	67,5	2,6	2,5	9,5	9,8	8,1	8,1	11,9	12,1
24	73,0	54,0	58,7	57,8	3,6	3,8	12,2	12,6	12,2	11,9	13,3	13,9
25	75,0	55,0	64,9	64,0	3,0	3,2	10,3	10,5	10,0	9,8	11,8	12,5

**Příloha č. 2 Dotazník dárce plasmy, část 1**



**Plasmafera s.r.o.**

**DOTAZNÍK DÁRCE PLASMY**  
Označení dokumentu : F1

<b>PŘÍJMENÍ:</b>	<b>JMÉNO</b>		<b>NEVYPLŇUJTE</b> (ZVACÍ ČÍSLO VYPLŇÍ RECEPCE)
<b>RODNÉ ČÍSLO:</b>	titul	pojišťovna	

Vyplňte, prosím, zodpovědně a úplně všechny údaje a otázky  
Správnou odpověď zakroužkujte!  
Před vyplněním dotazníku se seznamte, prosím, s „Poučením dárce krve“


1.	Seznámil(a) jste se s poučením o rizikovém chování z hlediska darování krve a rozumíte mu?	ANO	NE
2.	Patříte do některé skupiny s rizikovým chováním? (viz „ <u>POUČENÍ DÁRCE KRVE</u> “)	ANO	NE

**SOUČASNÝ ZDRAVOTNÍ STAV**

3.	Cítíte se zdrav(a)?	ANO	NE
4.	Užíváte pravidelně léky? (uved'te všechny, včetně např. acylpyrinu, antikoncepce) Pokud Vaše odpověď zní ano, uveďte jaké:	ANO	NE
5.	Užil(a) jste v posledních 4 týdnech nějaké jiné léky? (pravidelně užívané léky již neuvádějte) Pokud Vaše odpověď zní ano, uveďte jaké:	ANO	NE
6.	Léčíte se nebo jste sledován(a) pro nějaké onemocnění (včetně infekčního)?	ANO	NE
7.	Potíte se v noci v nadměrné míře, pozorujete zvýšené teploty, zduřelé uzliny?	ANO	NE
8.	Hubnete v poslední době bez zjevné příčiny?	ANO	NE
9.	Prodělal(a) jste v posledních 4 týdnech nějaké onemocnění (nachlazení, průjem apod.)?	ANO	NE
10.	Podstoupil(a) jste v posledních 7 dnech trhání zubů nebo malý chirurgický výkon?	ANO	NE
11.	Měl(a) jste v posledních 4 týdnech přisáté klišťe?	ANO	NE

Verze formuláře: 4 Strana č.: 1 ze 4  
Datum platnosti od: 1. 4. 2012 Součást SOP: registrace dárců plasmy

Příloha č. 3 Dotazník dárce plasmy, část 2



**Plasmafera s.r.o.**

**DOTAZNÍK DÁRCE PLASMY**

**Označení dokumentu : F1**

**ZMĚNY ZDRAVOTNÍHO STAVU Prodělal(a) jste v uplynulých 6 měsících**

12.	Transplantace, operace, ošetření v nemocnici, nitrožilní podání léků, endoskopické vyšetření, poranění injekční jehlou, kontakt s krví (poraněním nebo sliznicí)?	ANO	NE
	Jaké: _____ Kdy: _____		
13.	Dostal(a) jste transfuzi krve?	ANO	NE
14.	Bylo Vám provedeno tetování, akupunktura, propíchování uší, piercing?	ANO	NE
15.	Byl(a) jste očkován(a)?	ANO	NE
	Pokud ano, proti čemu: _____		
16.	Pracujete v rizikovém (infekčním, zdraví škodlivém) prostředí?	ANO	NE
	Pokud ano, tak v jakém (infekce, záření, chemická rizika atd.): _____		
17.	Byl(a) jste léčen(a) pro pohlavní chorobu?	ANO	NE
18.	Pobýval(a) jste v nápravném zařízení (vězení)?	ANO	NE
19.	Byl(a) jste v úzkém kontaktu (rodina, pohlavní styk) s nemocným s infekční žloutenkou AIDS, jiným infekčním onemocněním nebo s nitrožilním uživatelem drog?	ANO	NE
	Pokud ano, tak jakým: _____		
20.	Pobýval(a) jste mimo Evropu (zejména v exotických oblastech tropů nebo subtropů)?	ANO	NE
	Pokud ano, tak kde (i krátkodobě, turistický pobyt): _____		
21.	Pro ženy: Byla jste v posledním roce nebo jste těhotná?	ANO	NE

**ODBĚRY KRVE V MINULOSTI**

22.	Darujete krev nebo její složky dnes poprvé? (pokud ano, otázky 23 a 24 nevyplňujete)	ANO	NE
	Pokud NE ,kdy naposledy: _____		
23.	Měl(a) jste po minulém odběru zdravotní komplikaci (např. mdloby, kolaps, větší modřinu, aj.)?	ANO	NE
24.	Chodíte darovat i do jiného zdravotnického zařízení?	ANO	NE
25.	Byl(a) jste někdy odmítnut(a) jako dárce-dárkyně krve?	ANO	NE
	Důvod odmítnutí: _____		

**PRODĚLANÉ CHOROBY – ANAMNÉZA (od narození do dnešního dne)**

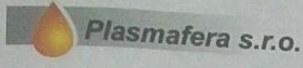
26.	Infekční žloutenka, HIV infekce (AIDS), infekce virem HTLV I/II, pohlavní nemoc (syfilis, kapavka), tuberkulóza, jiné přenosné nemoci (inf. mononukleóza, klišťová encefalitida, brucelóza, tularemie, toxoplazmóza, listerióza, borelióza, malárie, babesióza, leishmaniáza (Kala-Azar), Chagasova choroba, Q horečka, tyfus, paratyfus, aj.) označte podtržením	ANO	NE
27.	Nemoci srdce, nemoci cév, vysoký nebo nízký krevní tlak	ANO	NE
28.	Nemoci krve (chudokrevnost, krvácivost, polycytemie, talasemie, aj.)	ANO	NE
29.	Nemoci zažívacího traktu (vředová choroba, záněty slinivky, střeva, aj.)	ANO	NE
30.	Nemoci žláz s vnitřní sekrecí (cukrovka, poruchy metabolismu, štítná žláza, aj.)	ANO	NE
31.	Nemoci ledvín (záněty, kameny, kolika, aj.)	ANO	NE

Verze formuláře: 4 Strana č.: 2 ze 4

Datum platnosti od: 1. 4. 2012 Součást SOP: registrace dárců plasmy



Příloha č. 4 Dotazník dárce plasmy, část 3



**DOTAZNÍK DÁRCE PLASMY**  
Označení dokumentu : F1

32.	Nemoci dýchacích orgánů (astma, rozedma plic, chronický zánět průdušek, aj.)	ANO	NE
33.	Nemoci kostí a kloubů (záněty kloubů, revmatická horečka, osteomyelitis, aj.)	ANO	NE
34.	Nádorové onemocnění	ANO	NE
35.	Nemoci nervové soustavy, nemoci oka, psychická onemocnění (křečové stavy, epilepsie, roztroušená skleróza, deprese, psychóza, aj.)	ANO	NE
36.	Operace a všechny větší úrazy; transplantace; transfuze krve (včetně transfuze ve V. Británii)	ANO	NE
Pokud ano, tak jaké a kdy:			
37.	Byla Vám implantována tvrdá plena mozková, rohovka nebo ušní bubínek?	ANO	NE
38.	Alergie, poruchy imunity, kožní onemocnění.	ANO	NE
Pokud ano, tak jaké:			
39.	Bylo u Vás nebo v rodině zjištěno onemocnění Creutzfeldt-Jakobovou chorobou nebo její variantou (vCJD)?	ANO	NE
40.	Užíval(a) jste někdy následující léky: isotretinoin (např. Accutane), etretinát (např. Tegison), acitretin (např. Neotigason), finasterid (např. Proscar, Propecia), dutasterid (např. Avodart), aj.?	ANO	NE
41.	Byl(a) jste někdy léčen(a) růstovým hormonem nebo extraktem hypofýzy?	ANO	NE
42.	Byl(a) jste někdy léčen(a) pro alkoholismus nebo lékovou závislost?	ANO	NE
43.	Užíval(a) jste někdy drogy (zejména nitrožilní aplikace)?	ANO	NE
44.	Narodil(a) jste se nebo žil(a) jste v zahraničí?	ANO	NE
Pokud ano, tak kde:			
45.	Pobýval(a) jste v období 1980-1996 celkem déle než 6 měsíců ve Velké Británii nebo Francii	ANO	NE
46.	Máte zaměstnání nebo koničku se zvýšenou tělesnou zátěží nebo nároky na pozornost (řidič z povolání, pilot, práce ve výškách, horolezectví, potápění)?	ANO	NE

Stvrzuji, že jsem nezamlčel(a) žádné závažné skutečnosti a všechny informace, které jsem poskytl(a), jsou dle mého nejlepšího vědomí a svědomí pravdivé (zamlčení skutečností, které mohou ohrozit zdraví nebo život příjemce transfuze, je zákonem postižitelné).

Seznámil(a) jsem se s „Poučením dárce krve“ a jeho obsahu rozumím. Ve smyslu znění „Poučení dárce krve“ se považuji za vhodného dárce, jehož krev neohroží zdraví příjemce.


Byl(a) jsem poučen(a) o průběhu odběru a rizicích s ním spojených a s odběrem souhlasím. Byl(a) jsem poučen(a) o tom, že mám právo klást otázky týkající se odběru a právo kdykoliv od odběru ustoupit. Potvrzuji, že na každou položenou otázku jsem dostal(a) uspokojivou odpověď.

Byl(a) jsem poučen(a) o možnosti diskrétního samovyhloučení.

Souhlasím s vyšetřením mé krve všemi potřebnými testy, včetně testu na AIDS a s uchováváním vzorků krve pro případné dodatečné vyšetření krvi přenosných infekcí a krevních skupin. Souhlasím s tím, aby v případě nevyhovujících výsledků byla odebrána krev použita v rámci zdravotní péče k jiným než transfuzním účelům.

Verze formuláře: 4 Strana č.: 3 ze 4  
Datum platnosti od: 1. 4. 2012 Součást SOP: registrace dárců plasmy

**Příloha č. 5 Dotazník dárce plasmy, část 4**

 <b>Plasmafera s.r.o.</b>									
<b>DOTAZNÍK DÁRCE PLASMY</b> Označení dokumentu : F1									
<p>Byl(a) jsem poučen(a), že v případě nevyhovujících laboratorních vyšetření budu informován(a). Prohlašuji, že nepřicházím darovat krev za účelem vyšetření na AIDS. Beru na vědomí, že nejméně 30 minut po odběru bych měl(a) odpočívat a teprve poté se aktivně účastnit silničního provozu.</p> <p>Souhlasím s tím, že mé osobní údaje a údaje o mém zdravotním stavu budou evidovány při dodržování povinné mlčenlivosti dle platného zákona a při dodržování zásad lékařského tajemství budou využívány v rámci transfuzní služby (např. referenční laboratoře pro infekční choroby, registr vyřazených dárců krve, registr dárců krve se vzácnou krevní skupinou, aj.) a v rámci výuky studentů ve zdravotnictví.</p> <p>Souhlasím s tím, že mé osobní údaje budou sděleny subjektům ČČK pro potřeby oceňování dárců.</p> <p>Souhlasím s tím, aby léčivé přípravky, vyrobené z mé krve (nebo plazmy), byly použity v souladu s medicínskými, etickými a humanitárními principy k léčbě nemocných v rámci platné legislativy pouze v případě, že budou vyhovovat požadavkům na jejich bezpečnost a jakost. V případě vzniku přebytku vyrobených léčivých přípravků v ČR souhlasím s jejich vývozem za účelem léčby nemocných v jiných zemích.</p> <p>Žádám tímto plasmferetické centrum o úhradu účelně, hospodárně a prokazatelně vynaložených výdajů spojených s odběrem krve a jejich složek v souladu s ustanovením § 32 odst. 2 zákona č. 373/2011 Sb., o specifických zdravotních službách a stvrzuji, že poskytnutá finanční náhrada, kterou požaduji nepřesáhne částku ve výši 5% minimální mzdy, tedy 400,- Kč. Zároveň tímto prohlašuji, že výše finanční náhrady, o kterou jsem požádal(a), odpovídá skutečné výši mnou účelně, hospodárně a prokazatelně vynaložených výdajů spojených s odběrem krve a jejich složek.</p>									
Datum ..... Podpis dárce .....									
<b>VYHODNOCENÍ DOTAZNÍKU OSOBOU ODPOVĚDNOU ZA PROPUSTĚNÍ DÁRCE K ODBĚRU</b>									
<table border="1"><tr><td>Dárce vyhovuje?</td><td>ANO</td><td>NE</td></tr><tr><td>Nevyhovuje pro: .....</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Datum:.....podpis odpovědné osoby:.....</td><td></td><td></td></tr></table>	Dárce vyhovuje?	ANO	NE	Nevyhovuje pro: .....			Datum:.....podpis odpovědné osoby:.....		
Dárce vyhovuje?	ANO	NE							
Nevyhovuje pro: .....									
Datum:.....podpis odpovědné osoby:.....									
<table border="1"><tr><td>Verze formuláře: 4</td><td>Strana č.: 4 ze 4</td></tr><tr><td>Datum platnosti od: 1. 4. 2012</td><td>Součást SOP: registrace dárců plasmy</td></tr></table>	Verze formuláře: 4	Strana č.: 4 ze 4	Datum platnosti od: 1. 4. 2012	Součást SOP: registrace dárců plasmy					
Verze formuláře: 4	Strana č.: 4 ze 4								
Datum platnosti od: 1. 4. 2012	Součást SOP: registrace dárců plasmy								