



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

Vyšetření dárců rekonvalescentní plazmy anti-SARS-CoV-2

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Bc. Lenka Šrámková

Vedoucí práce: PharmDr. Hana Staňková

České Budějovice 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem **Vyšetření dárců rekonvalescentní plazmy anti-SARS-CoV-2** jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské/diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích 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 bakalářské/diplomové práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské/diplomové práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 2.5.2023

.....

podpis

Poděkování

Děkuji PharmDr. Haně Staňkové za pomoc, odborné vedení, cenné rady a podněty při vedení bakalářské práce a za trpělivost a ochotu pracovníkům z TRS NEMCB. Také bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za velkou podporu při celé délce studia.

Vyšetření dárců rekonvalescentní plazmy anti-SARS-CoV-2

Abstrakt

Rekonvalescentní plazma anti-SARS-CoV-2 je plazma získaná od dárců, kteří prodělali onemocnění Covid-19 a vytvořili si protilátky anti-SARS-CoV-2 v dostatečném titru. V době pandemie Covid-19 před zavedením monoklonální protilátek a specifických antivirotik byla rekonvalescentní plazma jednou z mála dostupných možností léčby onemocnění Covid-19.

Hlavním tématem bakalářské práce je vyšetření dárců rekonvalescentní plazmy anti-SARS-CoV-2. U dárců krve a jejích složek se po odběru vyšetřují markery nejvýznamnějších infekčních chorob přenosných krví a základní imunohematologické znaky. U dárců rekonvalescentní plazmy se navíc vyšetřovalo množství protilátek anti-SARS-CoV-2.

Teoretická část bakalářské práce se zabývá charakteristikou onemocnění Covid-19, viru SARS-CoV-2, historií a současností používání rekonvalescentní plazmy. Při popisování odběrů a vyšetření dárců krve a krevních složek se zaměřuje na specifika rekonvalescentní plazmy.

Praktická část se věnuje vyšetření dárců RP anti-SARS-CoV-2 na analyzátorech NEO Iris a Architect i2000 SR na TRS NEMCB. Dárci RP anti-SARS-CoV-2 museli splnit stejné podmínky k odběru a vyhovět povinným vyšetřením jako dárce při klasických odběrech. Vyšetření zahrnovala jak imunohematologická vyšetření (krevní skupiny AB0, RhD a screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek), tak serologická vyšetření infekčních markerů (anti-HIV-1 + anti-HIV-2, HIV Ag p24; HBsAg; anti-HCV a protilátky proti původci syfilis). U dárců RP anti-SARS-CoV-2 byly serologické testy rozšířeny ještě o průkaz protilátek anti-SARS-CoV-2. Imunohematologické vyšetření se provádělo na analyzátoru NEO Iris firmy APR, infekční markery na analyzátoru Architect i2000 SR firmy Abbott.

Dárce rekonvalescentní plazmy bylo možné odebrat nejdříve 14 po uzdravení nebo po ukončení izolace. Tvorba protilátek začíná zpravidla kolem 2 týdnů od začátku onemocnění a dosahuje maxima kolem 4.- 10. týdne, pak následuje pokles. Právě období s vysokými titry protilátek je optimální pro odběr rekonvalescentní plazmy. Dárce bylo možné odebírat opakovaně, počet odběrů byl limitován postupně klesajícím titrem protilátek. Bakalářská práce se tímto tématem zabývá.

Rekonvalescentní plazma stejně jako „klasická“ byla podávána pacientům kompatibilní v systému AB0. Bakalářská práce se zabývá frekvencí krevních skupin u rekonvalescentní plazmy, zda odpovídala frekvenci krevních skupin v populaci.

Klíčová slova:

COVID-19, RP anti-SARS-CoV-2, protilátky anti-SARS-CoV-2, analyzátor NEO Iris, analyzátor Architect i2000 SR, krevní skupiny AB0 systém

Screening of donors convalescent plasma anti-SARS-CoV-2

Abstract

Convalescent anti-SARS-CoV-2 plasma is plasma obtained from donors who experienced the disease Covid-19 and developed anti-SARS-CoV-2 antibodies in a sufficient titer. During the Covid-19 pandemic before the introduction of monoclonal antibodies and specific antivirals convalescent plasma was one of the few available treatment therapy of Covid-19.

The main topic of this bachelor thesis is the examination donors of anti-SARS-CoV-2 convalescent plasma. Blood donors and its components are examined for markers of the most important blood-borne infectious diseases and basic immunohematological characteristics after collection. In addition, the amount of anti-SARS-CoV-2 antibodies was investigated in convalescent plasma donors.

The theoretical part of the bachelor thesis deals with the characteristics of the disease Covid-19, the SARS-CoV-2 virus, the history and the present of the use of convalescent plasma. When describing the collection and examination of blood donors and blood components, the focus is on the specifics of convalescent plasma.

The practical part is devoted to the examination of RP anti-SARS-CoV-2 donors on NEO Iris and Architect i2000 SR analyzers at TRS NEMCB. Donors of RP anti-SARS-CoV-2 had to have the same conditions for collection and comply with mandatory examinations as donors for classic collections. The examinations included both immunohematological examinations (blood groups AB0, RhD and screening of irregular anti-erythrocyte antibodies) and serological examinations of infectious markers (anti-HIV-1 + anti-HIV-2, HIV Ag p24; HBsAg; anti-HCV and antibodies against the causative agent of syphilis). In the case of RP anti-SARS-CoV-2 donors, serological tests were extended to include the detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies. Immunohematological examination was performed on the NEO Iris analyzer from APR, infectious markers on the Architect i2000 SR analyzer from Abbott.

Donors of convalescent plasma could be collected no earlier than 14 days after recovery or after the end of isolation. The production of antibodies usually begins around 2 weeks after the onset of the disease and reaches a maximum around the 4th-10th weeks, then declines. The period with high antibody titers is optimal for collecting convalescent plasma. Donors could be collected repeatedly, the number of

collections was limited by the gradually decreasing titer of antibodies. The bachelor thesis deals with this topic.

Convalescent plasma as well as "classic" was administered to compatible patients in the ABO system. The bachelor thesis deals with the frequency of blood groups in convalescent plasma, whether it corresponded to the frequency of blood groups in the population.

Key words:

COVID-19, RP anti-SARS-CoV-2, anti-SARS-CoV-2 antibodies, NEO Iris analyzer, Architect i2000 SR analyzer, blood groups ABO system

Obsah:

Úvod.....	10
1. Onemocnění COVID-19.....	11
2. Virus SARS-CoV-2.....	14
3. Historie rekonvalescentní plazmy.....	16
4. Rekonvalescentní plazma anti-SARS-CoV-2.....	17
4.1. <i>RP anti-SARS-CoV-2 – nový transfúzní přípravek.....</i>	<i>17</i>
4.2. <i>Dárci RP anti-SARS-CoV-2 – kritéria pro samotný odběr.....</i>	<i>17</i>
4.3. <i>RP anti-SARS-CoV-2 - odběr plazmy</i>	<i>19</i>
4.3.1. Odběry RP anti-SARS-CoV-2, společné rysy s klasickým odběrem plazmy.....	19
4.3.1.1. Odběr plazmy z plné krve.....	19
4.3.1.2. Odběr plazmy pomocí aferézy.....	19
4.3.1.3. Zamrazení a uskladnění plazmy.....	20
4.3.2. Specifika v odběru RP anti-SARS-CoV-2.....	21
4.4. <i>Laboratorní vyšetření dárce RP anti-SARS-CoV-2.....</i>	<i>22</i>
4.4.1. Imunohematologická vyšetření dárců krve a krevních složek.....	22
4.4.1.1. Analyzátor NEO Iris.....	23
4.4.2. Vyšetření infekčních markerů a protilátek anti-SARS-CoV-2 u dárců krve a krevních složek.....	25
4.4.2.1. Vyšetření infekčních markerů u dárců krve a krevních složek.....	26
4.4.2.2. Vyšetření protilátek anti-SARS-CoV-2 u dárců krve a krevních složek.....	27
4.4.2.2.1. Zavedení a využití virus neutralizačního testu SARS-CoV-2.....	27
4.4.2.2.2. Serologické testy, S-Protein SARS-CoV-2 viru.....	27
4.4.2.3. Analyzátor Architect i2000 SR.....	28
4.5. <i>RP anti-SARS-CoV-2 – uvolnění k použití, indikace a podání.....</i>	<i>29</i>

5. Cíle a hypotézy.....	31
5.1. <i>Cíle práce.....</i>	<i>31</i>
5.2. <i>Hypotézy.....</i>	<i>31</i>
6. Metodika.....	31
6.1. <i>Stanovení protilátek anti-SARS-CoV-2 IgG u dárců RP</i>	
<i>anti-SARS-CoV-2 pomocí analyzátoru Architect i2000 SR.....</i>	<i>31</i>
6.2. <i>Určení KS v AB0 systému u dárců RP anti-SARS-CoV-2</i>	
<i>pomocí analyzátoru NEO Iris.....</i>	<i>36</i>
7. Výsledky.....	43
7.1. <i>Výsledky vyšetření protilátek anti-SARS-CoV-2 dárců RP.....</i>	<i>43</i>
7.2. <i>Výsledky vyšetření krevní skupiny u dárců RP.....</i>	<i>49</i>
8. Diskuze.....	52
9. Závěr.....	55
10. Seznam literatury.....	56
11. Seznam tabulek a obrázků	61
11.1. <i>Tabulky.....</i>	<i>61</i>
11.2. <i>Obrázky.....</i>	<i>62</i>
12. Seznam zkratk.....	63
13. Přílohy.....	67

Úvod

Rekonvalescentní plazma anti-SARS-CoV-2 (RP anti-SARS-CoV-2) byla podávána jako nový transfuzní přípravek v době pandemie onemocnění COVID-19 kvůli absenci jiné účinné léčby. Jedná se o krevní plazmu, která navíc obsahuje protilátky anti-SARS-CoV-2. Předpoklady její účinnosti vycházely z poznatků z již dříve podávaných rekonvalescentních plazem u jiných virových infekcí. Podání rekonvalescentní plazmy představuje způsob pasivní specifické imunizace s očekávatelnou léčebnou odpovědí. Její podání je obecně účinnější u profylaxe než u léčby již rozvinutého onemocnění. Účinnost terapie závisí zejména na množství specifických virus neutralizujících protilátek anti-SARS-CoV-2 obsažených v rekonvalescentní plazmě a včasnosti jejího podání.

Dárci RP anti-SARS-CoV-2 museli splnit stejné podmínky pro odběr plazmy jako dárce při klasických odběrech. Rovněž povinná vyšetření dárců rekonvalescentní plazmy (RP) odpovídala vyšetřením, která jsou předepsaná pro všechny dárce. Povinná vyšetření zahrnují jak imuno hematologická vyšetření (krevní skupiny ABO, RhD a screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek), tak serologická vyšetření infekčních markerů (anti-HIV-1 + anti-HIV-2, HIV Ag p24; HBsAg; anti-HCV a protilátky proti původci syfilis). U dárců RP anti-SARS-CoV-2 byly sérologické testy rozšířeny ještě o průkaz protilátek anti-SARS-CoV-2.

Cílem teoretické části mé práce bylo písemně zpracovat problematiku RP v době pandemie COVID-19 a v praktické části si osvojit vyšetření dárců RP anti-SARS-CoV-2 na analyzátorech NEO Iris a Architect i2000 SR a provést analýzu na vyšetření protilátek.

1. Onemocnění COVID-19

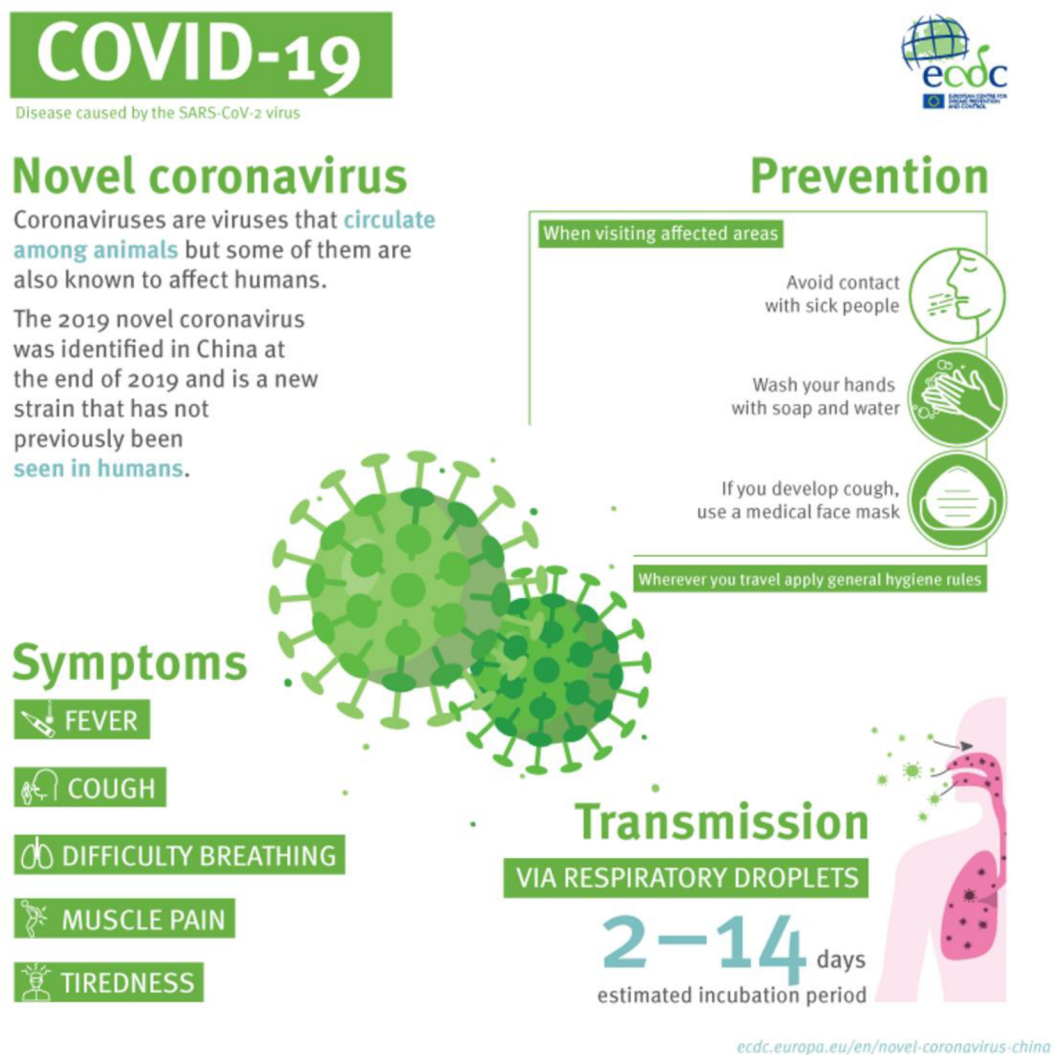
V čínské oblasti Wu-chanu byly koncem roku 2019 popsány první případy závažně probíhající pneumonie nejasného původu. Bylo prokázáno, že původcem onemocnění je nově identifikovaný beta-koronavirus, který byl označen jako SARS-CoV-2 a onemocnění jím vyvolané jako COVID-19 (*coronavirus disease 2019*). Počátkem roku 2020 došlo k významnému rozšíření nákazy do řady světových regionů, proto Světová zdravotnická organizace (WHO) 30. ledna vyhlásila stav ohrožení veřejného zdraví mezinárodního významu a 11. března šíření infekce označila za globální pandemii (Trojáněk et al., 2020).

První případy infekce COVID-19 v České republice byly diagnostikovány 1. března 2020, přičemž u všech nakažených došlo k nákaze pravděpodobně v Itálii (MZ ČR). Od konce prosince 2019 do 6. dubna 2023 bylo celosvětově hlášeno celkem 761,401,518 případů tohoto onemocnění, z toho 6,886,987 nemocných infekci podlehl, mortalita se celosvětově pohybuje okolo 0,91 % (vycházíme z hlášených případů). V České republice bylo ke shodnému datu hlášeno celkem 4,631,804 případů onemocnění a 42,635 úmrtí v souvislosti s COVID-19, mortalita ČR se pohybuje okolo 0,92 % (COVID-19: *Přehled aktuální situace v ČR...* MZČR, 2020).

COVID-19 se podobně jako většina jiných virových respiračních infekcí se přenáší především kapénkovou cestou. K samotnému přenosu infekce dochází nejčastěji vdechnutím nebo přímým zasažením sliznic kapénkami při blízkém kontaktu s infikovanou osobou nebo nepřímo kontaktem s kontaminovanými předměty či povrchy. K vylučování infikovaných částic dochází i u jedinců s asymptomatickým průběhem a u nemocných před rozvojem symptomů. Virus rovněž zůstává detekovatelný v nosohltanu i po ústupu klinických obtíží. Vylučování viru je nejvyšší během prvního týdne onemocnění a infekční virus byl izolován nejdéle 8. den od začátku obtíží, přestože virová RNA byla v nosohltanu přítomna podstatně déle. Virus byl u některých pacientů prokázán i ve stolici. Inkubační doba pro onemocnění COVID-19 je udávána v rozmezí 1-14 dní, u většiny případů se příznaky projeví v rozmezí 3 až 10 dnů (Trojáněk et al., 2020).

K detekci onemocnění COVID-19 se používají rychlé antigenní testy (COVID-19 lateral flow testy) nebo PCR testy, a to především ze vzorků získaných z nosohltanu či respiračních sekretů z dolních cest dýchacích. K nákaze jsou náchylné osoby všech věkových skupin, nezávisle na pohlaví či etnickém původu, přičemž bylo prokázáno, že

u dětí a mladistvých infekce častěji probíhá subklinicky či zcela asymptomaticky, zatímco u seniorů je vyšší riziko závažnějšího průběhu. Obdobně jako u jiných infekcí určitou roli v průběhu nemoci hraje i velikost infekční dávky. Nejběžnější symptomy infekce jsou horečka, suchý dráždivý kašel, bolesti svalů a kloubů, dušnost, únava, bolest hlavy, bolesti v krku, ale časté jsou i gastrointestinální obtíže. Relativně častým symptomem, převážně u varianty delta, je symptom ztráty čichu (anosmie) či chuti (dysgeuzie) (viz. obrázek č.1.).



Obrázek č. 1: Infografika COVID-19,

(zdroj:<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/infographic-covid-19>)

Mezi nejčastější komplikace onemocnění COVID-19 patří závažně probíhající pneumonie, která může vést, až k těžkému syndromu akutní dechové tísně (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS), septickému šoku, akutnímu renálnímu selhání

či kardiálnímu postižení. Na rozdíl od řady jiných infekčních nemocí je pro COVID-19 charakteristický protahovaný průběh, který vede k pozvolnému zhoršování respiračních funkcí. Ke komplikacím dochází obvykle až ve 2. týdnu trvání obtíží. Mezi hlavní rizikové faktory pro závažnější průběh onemocnění patří vyšší věk a přítomnost vybraných interních komorbidit, zejména arteriální hypertenze, kardiovaskulární či cerebrovaskulární onemocnění, vyšší index tělesné hmotnosti (BMI) ≥ 35 kg/m² nebo diabetes mellitus. Co se týká samotné smrtnosti infekce, ta je též závislá na věku postiženého, geografické oblasti a jeho komorbiditách, obvykle bývá udávána mezi 1 až 3 % (Trojáněk et al., 2020).

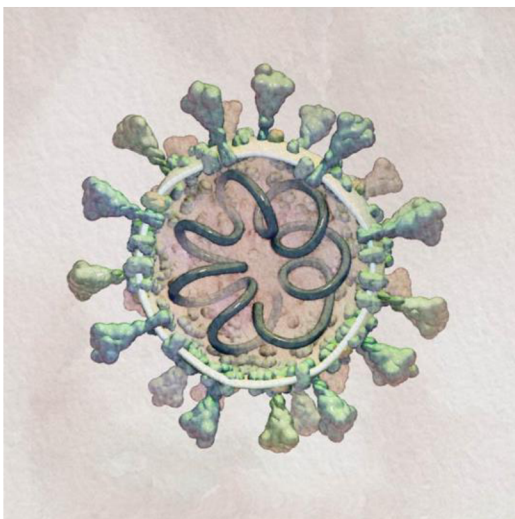
Typické laboratorní nálezy pro onemocnění COVID-19 jsou normální či mírně snížený počet leukocytů, lymfocytopenie, u závažně nemocných se zvyšuje hodnota LDH, D-dimerů, CRP, případně i prokalcitoninu. K primární diagnostice onemocnění COVID-19 se využívá i metoda výpočetní tomografie (CT), senzitivita samotného CT vyšetření pro diagnostiku COVID-19 dosahuje až 95 % (Trojáněk et al., 2020).

Na začátku pandemie onemocnění COVID-19 byla základem terapie při onemocnění symptomatická léčba podle tíže příznaků, od léčby antipyretiky, antitusiky až po oxygenterapii. Farmakoterapií byla rekonvalescentní plazma anti-SARS-CoV-2. V současné době je onemocnění COVID-19 léčeno antivirotyky a monoklonálními protilátkami.

2. Virus SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 je příčinný agens onemocnění COVID-19 (coronavirus disease 2019) a patří do čeledi Coronaviridae. V roce 2019 byl identifikován nový beta koronavirus, který byl nejprve označen jako 2019-nCoV (novel coronavirus), a později jej mezinárodní výbor pro klasifikaci virů (ICTV) pojmenoval jako SARS-CoV-2. Koronaviry patří mezi významné původce akutních respiračních infekcí u zvířat i lidí, u těchto infekcí snadno dochází k mezidruhovému přenosu, což se s největší pravděpodobností stalo i u viru SARS-CoV-2. Většina virů z čeledi Coronaviridae se uplatňují jako původci běžných a obvykle nekomplikovaných infekcí horních či dolních cest dýchacích. Avšak počátkem tohoto století se ukázalo, že koronaviry mohou vyvolat i epidemie závažně probíhajících infekcí. V letech 2002–2003 proběhla epidemie onemocnění SARS (*severe acute respiratory syndrome*), která byla vyvolána novým vysoce patogenním koronavirem SARS-CoV, její smrtnost u hlášených případů byla okolo 9,6 %. Na Blízkém východě byl v roce 2012 popsán výskyt další závažně probíhající koronavirové infekce MERS (*Middle East respiratory syndrome*), u kterého se smrtnost u hlášených případů pohybuje okolo 34,4 % (Trojánek et al., 2020).

Koronaviry jsou středně velké obalené viry (60–140 nm), jejichž genom je tvořen nesegmentovanou jednovláknovou RNA. Název celé čeledi je odvozen od typického vzhledu virionu v elektronovém mikroskopu, neboť povrchové S proteiny připomínají vzhledem sluneční koronu při zatmění nebo věnec (z lat. *corona* = koruna, věnec; (viz. obrázek č.2)).



Obrázek č.2: Vir SARS-CoV-2,

(zdroj: <https://www.biointeractive.org/classroom-resources/biology-sars-cov-2>)

RNA SARS-CoV-2 kóduje čtyři hlavní strukturální proteiny – S (spike, povrchový protein), M (membrane, transmembránový glykoprotein), E (envelope, obalový protein) a N (nucleocapsid, vnitřní fosforylovaný nukleokapsidový protein). Genom viru dále kóduje celkem 16 nestrukturálních proteinů a akcesorní proteiny. Hlavním faktorem virulence je především povrchový S (*spike*) glykoprotein, který vyvolává tvorbu specifických neutralizačních protilátek. Tento S – protein je tvořen dvěma podjednotkami S1 a S2 (Chen et al., 2020).

S1 podjednotka slouží k vytvoření vazby mezi virionem a buněčným receptorem, její struktura ovlivňuje buněčný a hostitelský tropismus viru, zatímco druhá podjednotka (S2) se uplatňuje při fúzi viru s buněčnou membránou. Podjednotka S1 obsahuje doménu vázající se na receptor – RBD. Tato doména má vysokou afinitu k receptoru enzymu konvertujícího angiotenzinu 2 (ACE2 – Angiotensin Converting Enzyme 2), což je exopeptidáza exprimovaná na povrchu hostitelských epitelových buněk plic, tenkého střeva a endotelu. Samotná infekce virem SARS-CoV-2 je tedy umožněná interakcí SARS-CoV-2 RBD s virovým receptorem ACE2. Protilátky proti RBD S-proteinu, mohou inhibovat tuto vazbu na receptor ACE2, a tím vyvolat silnou virus neutralizující odpověď. Široké spektrum vyvíjených vakcín proti COVID-19 využívá anebo využívalo strategie, které vyvolávají protilátkovou odpověď na S-protein (*spike*) a RBD doménu podjednotky S1 (Chen et al., 2020).

Protilátková imunitní reakce u SARS-CoV-2 je obdobná jako u jiných virových respiračních infekcí a spočívá v tvorbě časných IgM, které mizí do 12. týdne, a pozdních IgG protilátek, které jsou specifické proti virovému S a N antigenu (Zhao et al., 2020). V případě buněčné imunity dochází k významnému poklesu CD4+, a především CD8+ T lymfocytů a NK buněk v periferní krvi, avšak zároveň byla pozorována i jejich excesivní aktivace. Právě imunitní reakce se zřejmě významně uplatňuje i v samotné patogenezi onemocnění COVID-19. Bylo prokázáno, že častou příčinou úmrtí pacientů se SARS, MERS, ale i s COVID-19, je rozvoj syndromu akutní dechové tísně (ARDS). Jedna z možných příčin rozvoje ARDS je cytokinová bouře způsobená dysregulovanou tvorbou prozánětlivých cytokinů (Trojáněk et al., 2020).

3. Historie rekonvalescentní plazmy

Rekonvalescentní plazma (dále jen RP) je jednou z dostupných možností léčby infekčního onemocnění. Je to krevní plazma získaná od osob, které již dané onemocnění prodělaly, tedy od rekonvalescentů po určité chorobě. Tento typ plazmy obsahuje určitou specifickou protilátku v dostatečně vysokém titru. Takto podané protilátky představují pasivní způsob specifické imunizace s očekávatelnou léčebnou odpovědí a s minimálním rizikem nežádoucích účinků. RP tedy obsahuje neutralizační protilátky proti příslušné nemoci, které jsou pravděpodobně hlavním zdrojem jejího léčebného potenciálu. Nelze vyloučit ani další imunitní mechanismy, jako je protilátkami indukovaná buněčná cytotoxicita anebo fagocytóza. Nejčastěji je využívána k výrobě specifických imunoglobulinů, které představují účinnou možnost terapie a profylaxe mnoha virových onemocnění jakou jsou vzteklna, hepatitidy A a B a další (Bohoněk et al., 2020).

RP byla v minulosti mnohokrát s úspěchem používána, i přestože informace o její účinnosti a bezpečnosti vycházely pouze z empirických zpráv. Ještě delší tradici v terapeutickém použití má hyperimunní sérum, které bylo od konce 19. století až do nástupu éry antibiotik používáno k prevenci a léčbě řady infekcí, a to jak bakteriálních, jako jsou pneumokoková a meningokoková onemocnění či záškrť, tak i u virových onemocněních, jako například při spalničkách či příušnicích. První rozsáhlejší použití rekonvalescentní plazmy bylo popsáno v období pandemie španělské chřipky v letech 1918-1920. V posledních letech RP byla používána mnohokrát k léčbě řady epidemických virových onemocnění, jako například při léčbě virové horečky ebola, ptačí chřipky, pandemické chřipky H1N1 a také k léčbě mnoha dalších infekcí (Bohoněk et al., 2020).

I přes dlouhou a četnou historii použití rekonvalescentní plazmy s příznivým terapeutickým účinkem stále chybí data o její bezpečnosti a účinnosti, která by vycházela z rozsáhlých klinických studií. Nejdůležitější pro účinnost rekonvalescentní plazmy je její včasné podání a dostatečné množství koncentrace protilátek.

4. Rekonvalescentní plazma anti-SARS-CoV-2

4.1. RP anti-SARS-CoV-2 – nový transfúzní přípravek

Rekonvalescentní plazma anti-SARS-CoV-2 (dále jen RP anti-SARS-CoV-2) se k léčbě začala využívat v průběhu první poloviny roku 2020 v mnoha zemích po celém světě včetně České republiky. Její podání bylo jedno z prvních cílených léčebných postupů při léčbě onemocnění COVID-19. RP anti-SARS-CoV-2 je typ rekonvalescentní plazmy získané od dárců, kteří onemocnění COVID-19 již prodělali a získali tím dostatečné množství protilátek anti-SARS-CoV-2. Výroba RP anti-SARS-CoV-2, její odběry a získávání vhodných dárců se stalo velmi populární. Zdůrazňovala se její relativní dostupnost i nízká a obecně známá rizika. RP anti-SARS-CoV-2 byla indikovaná zejména u těžších případů COVID-19, které vyžadovaly oxygenační podporu. Při podání RP anti-SARS-CoV-2 se vycházelo z dřívějších poznatků, z podání rekonvalescentních plazem u jiných virových onemocnění. Koncentrace protilátek anti-SARS-CoV-2 třídy IgG, obsažená v rekonvalescentní plazmě, se potvrdila jako důležitý faktor, který má významný vliv na léčbu, dokonce i přežití pacientů v závažném stavu, a také brzký čas podání této plazmy, nejlépe do tří dnů po stanovení diagnózy u pacienta má významný vliv na úspěšnost léčby (Xia et al., 2020; Joyner et al., 2020).

4.2. Dárci RP anti-SARS-CoV-2 – kritéria pro samotný odběr

Dárcem rekonvalescentní plazmy, obsahující protilátky anti-SARS-CoV-2, mohla být zpočátku pouze osoba, která prodělala onemocnění COVID-19, nejlépe s klinickými projevy, ve formě zvýšené tělesné teploty a s respiračními příznaky. Později dárce rekonvalescentní plazmy, byli nejen lidé, kteří prodělali onemocnění COVID-19, ale i dárce, kteří prodělali onemocnění COVID-19 a zároveň byli i proti tomuto onemocnění očkovaní. Mezi dárce byli jedinci, kteří byli pravidelnými dárce, ale přicházeli i noví dárce. Odběr rekonvalescentní plazmy byl možný nejdříve za 14 dní po uzdravení z prodělaného onemocnění COVID-19 nebo ukončené izolace. U těžších průběhů onemocnění se interval po uzdravení upravoval individuálně a mohl být prodloužen až na 28 dní, pokud byl dárcem, kvůli závažnějšímu průběhu onemocnění COVID-19 i hospitalizován. V jihočeském kraji byli k darování rekonvalescentní plazmy zvaní

dárci ze široké veřejnosti pomocí kampaně Českého červeného kříže spolu s nemocnicemi. Dárci RP anti-SARS-CoV-2 byl nejdříve proveden laboratorní odběr kontrolního vzorku, ze kterého se vyšetřily protilátky anti-SARS-CoV-2 a další laboratorní hodnoty jako např. parametry krevního obrazu, hladina krevních bílkovin a byla určena krevní skupina. Pouze osoby s dostatečně vysokými hladinami protilátek anti-SARS-CoV-2 a se řádně splněnými kritérii pro odběr plazmy byly pozvány k darování samotné rekonvalescentní plazmy anti-SARS-CoV-2 (Doporučené postupy pro použití RP 2020).

Každý dárci RP anti-SARS-CoV-2 musel splňovat kritéria pro dárci krve a její složky podle vyhlášky č. 143/2008 Sb. (Vyhláška o lidské krvi ve znění pozdějších předpisů). Dárcem se mohl stát jedinec ve věku 18-65 let (prvodárce do 60 let) s tělesnou hmotností větší než 50 kg, s hodnotou hemoglobinu u žen nad 125 g/l, u mužů nad 135 g/l, s vyhovujícím krevním tlakem a tepovou frekvencí. U dárců, kteří darovali plazmu formou aferézy, se navíc sledovala hodnota celkové bílkoviny s výsledkem ≥ 60 g/l a hodnota IgG s výsledkem ≥ 6 g/l. Musely být dodrženy také kritéria, pro která mohl být dárci vyloučen. Mezi ně patří závažné chronické onemocnění (kardiovaskulární, gastrointestinální, urogenitální, respirační, imunitní, onemocnění CNS nebo onemocnění hematologická, metabolická nebo ledvinová), abnormální sklon ke krvácení, diabetes mellitus léčený inzulínem, infekční a zhoubná onemocnění. Překážkou byl i invazivní výkon v posledních měsících jako operace, endoskopická a artroskopická vyšetření, těhotenství, brzká doba po některých očkování, ale i samotný rizikový životní styl, například v podobě užívání drog, atd.. O způsobilosti dárci k odběru a o možném typu odběru RP rozhodoval lékař ze zařízení transfuzní služby. Dárci musel mít celkově dobrý zdravotní stav, musel mít trvalý pobyt v ČR a platné zdravotní pojištění.

Dalším kritériem, pro výběr vhodných dárců rekonvalescentní plazmy anti-SARS-CoV-2 pro přímé klinické použití, bylo snížení rizika TRALI (transfusion - related acute lung injury). Výběr byl tedy zúžen na osoby, které neměly v anamnéze možnou HLA aloimunizaci, a to na muže bez krevní transfuze v anamnéze a ženy bez těhotenství a krevní transfuze v anamnéze, nebo dárci, který měl negativní výsledek z vyšetření antileukocytárních protilátek (negativní na protilátky anti-HLA/HPA/HNA pomocí validovaného testu; Doporučené postupy pro použití RP 2020).

4.3. RP anti-SARS-CoV-2 - odběr plazmy

4.3.1. Odběry RP anti-SARS-CoV-2 společné rysy s klasickým odběrem plazmy

Každý odběr plazmy může být prováděn pouze v zařízení transfuzní služby s platným povolením. Kritéria pro odběr krevní plazmy jsou stanovena vyhláškou č. 143/2008 Sb. (Vyhláška o lidské krvi ve znění pozdějších předpisů). Plazmu lze získat z odběru plné krve anebo plazmaferézou.

4.3.1.1. Odběr plazmy z plné krve

Standardní odběr krve činí 450 ml s přípustnou odchylkou 10 % bez protisrážlivého roztoku a dárci nemá být při jednom odběru odebráno více než 13 % vypočteného objemu krve. Minimální interval mezi dvěma následujícími odběry je 8 týdnů, přičemž celkový počet standardních odběrů provedených v průběhu 12 měsíců je u mužů nejvýše 5 a u žen 4 (Vyhláška č. 143/2008 Sb., Vyhláška o lidské krvi ve znění pozdějších předpisů). Plazma se separuje z odebrané plné krve po centrifugaci vysokými otáčkami a přetlačením lisy do satelitního vaku odběrové soupravy. Z jednoho odběru plné krve se získá 1 transfuzní jednotka plazmy, která musí splňovat kritéria kvality stanovená vyhláškou č.143/2008 Sb.

4.3.1.2 Odběr plazmy pomocí aferézy

Plazmaferéza je selektivní odběr krevní plazmy prováděný pomocí speciálních přístrojů – separátorů, kdy buněčné složky krve jsou převedeny zpět do krevního oběhu dárce, tedy automatická separace plazmy v extrakorporálním oběhu (viz. obrázek č.3).



Obrázek č.3: Plazmaferéza, (zdroj: https://www.europlasma.cz/blog.html/30_272-co-se-deje-s-vasi-plasmou-po-odberu)

Při tomto typu odběru krevní plazmy musí dárce mít hmotnost více jak 60 kg, dobré žíly a v posledních dvou letech mu musel být odebrán alespoň jeden běžný odběr krve. Množství plazmy, které může být odebráno při jednom odběru bez protisrážlivého roztoku, je nejvýše 650 ml, pokud není podán intravenózně náhradní roztok. Množství plazmy odebrané v jednom týdnu je nejvýše 1,5 litru. Celkový objem plazmy bez protisrážlivého roztoku, který může být odebrán v průběhu 12 měsíců, je nejvýše 25 litrů. Minimální interval mezi dvěma přístrojovými odběry plazmy je 14 dní. I u plazmy odebrané pomocí aferézy musejí být splněna kritéria kvality stanovené vyhláškou č. 143/2008 Sb. pro plazmu (příloha 4, část A a B Vyhlášky o lidské krvi ve znění pozdějších předpisů) a při tom to typu odběru plazmy lze vyrobit 1-3 TU (transfuzní jednotky).

4.3.1.3 Zamrazení a uskladnění plazmy

Plazma, získaná jak z plné krve či pomocí plazmaferézy, vždy od jednoho dárce, je zmrazena takovým způsobem a v takové době od odběru, aby labilní koagulační faktory zůstaly ve funkčním stavu (tj. do 6 hodin po odběru je zmrazena ve speciálním mrazicím zařízení, které umožní její úplné zamrazení do jedné hodiny na teplotu - 30 °C). Každá jednotka plazmy obsahuje stabilní koagulační faktory na úrovni normální plazmy, albumin a imunoglobuliny, minimálně 70 % původního množství

faktoru VIII a alespoň podobné množství ostatních labilních koagulačních faktorů a přirozeně se vyskytujících inhibitorů. V plazmě se také nachází jen minimální množství buněčných elementů. Při teplotě < -25 °C může být plazma skladována až po dobu 3 let. Plazma pro klinické využití prochází minimální 6. měsíční karanténou a po této době jsou u dárce plazmy opakovaně vyšetřeny povinné testy na infekční markery. Po ověření vyhovujících výsledků infekčních markerů je plazma uvolněna z karantény pro klinické účely. V tomto bodu se zpracování RP anti-SARS-CoV-2 liší od klasického zpracování plazmy, viz. dále v textu (Specifikace transfuzních přípravků pro klinické účely. TRS NEMCB, *Plazma z aferézy čerstvá zmrazená pro klinické použití*. NCB_TRS_F_578_C)

4.3.2 Specifika v odběru RP anti-SARS-CoV-2

Zásadní rozdíl mezi odběrem krevní plazmy a odběrem RP anti-SARS-CoV-2 je, že RP anti-SARS-CoV-2 je krevní plazmou od dárce, který překonal infekci SARS-CoV-2, tedy nemoc COVID-19. U dárce byly vyšetřené protilátky v dostatečném titru, tudíž každá jednotka této plazmy obsahovala specifické protilátky anti-SARS-CoV-2. RP anti-SARS-CoV-2 byla odebírána v období v maximální předpokládané produkci virus neutralizačních látek, nejčastěji v rozmezí 4-10 týdnů po vymizení klinických příznaků. Aby plazma nemusela procházet 6. měsíční karanténou a mohla být použita co nejdříve, řada transfuzních oddělení, jako například TRS NEMCB vyrábělo RP anti-SARS-CoV-2 patogen inaktivovanou. Plazma byla ošetřena validovanou metodou inaktivace patogenů. Metoda musela být schválena pro dané zařízení transfuzní služby od SÚKL. Na TRS NEMCB se patogen inaktivace prováděla pomocí riboflaminu a UV záření. Takto upravená RP anti-SARS-CoV-2 může být skladována při teplotě < -25 °C po dobu 2 let (Specifikace transfuzních přípravků pro klinické účely. TRS NEMCB, *Plazma z plné krve rekonvalescentní anti-sars-cov-2 patogen inaktivovaná*. NCB_TRS_F_578_C).

V době pandemie COVID-19 jedno z mnoha doporučení umožňovalo u RP anti-SARS-CoV-2 pro klinické použití v případě nedostatku a nutnosti upřednostnit léčbu pacientů, možnost zkrácení minimálního intervalu mezi jednotlivými přístrojovými odběry plazmy ze 14 dní na 7 dní, s maximálním počtem provedených 4 odběrů ve zkráceném intervalu a za dodržení celkového počtu max. 24 odběrů v průběhu 12 měsíců a při neustálé kontrole hodnot celkové bílkoviny a IgG u dárce RP

(Doporučený postup pro použití rekonvalescentní plazmy v léčbě dospělých pacientů s COVID-19, verze 2, 13.10.2020).

4.4. Laboratorní vyšetření dárce RP anti-SARS-CoV-2

Při každém odběru od dárce se provádí vyšetření diagnostických vzorků, získaných v průběhu odběru. Tato vyšetření se dají rozdělit do dvou skupin, a to na imunohematologická vyšetření a na vyšetření infekčních markerů.

4.4.1. Imunohematologická vyšetření dárců krve a krevních složek

Imunohematologické vyšetření dárců krve a krevních složek tvoří součást kritérií pro propuštění transfuzních přípravků pro léčebné použití a suroviny pro další výrobu a provádějí se při každém odběru. Dárci rekonvalescentní plazmy se vyšetřovali jako běžní dárce dle doporučení společnosti pro transfuzní lékařství. Z odběrů dárců RP z plné krve se vyrobily a používaly erytrocytární, ev. i trombocytární transfuzní přípravky. Imunohematologické vyšetření se tedy provádělo v plném rozsahu (ČLS JEP č. STL2012_09 doporučené postupy: *Imunohematologická vyšetření dárců krve a krevních složek*).

Pro potřeby použití krevní plazmy je zásadní vyšetření krevní skupiny a vyšetření nepravidelných antierytrocytárních protilátek. U každého odběru se provádí vyšetření krevní skupiny AB0 RhD a screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek proti erytrocytům. U každého dárce se stanoví Rh fenotyp (C,c,E,e) a antigen Kell, v případě nálezu Kell pozitivivity se vyšetřuje i Cellano.

Imunohematologické vyšetření nových dárců se od dárců z opakovanými odběry liší, je podrobnějším a širší. U nových dárců krve a krevních složek se vyšetření AB0 provádí 2x ze dvou nezávislých vzorků. Alespoň jedno vyšetření musí zahrnovat stanovení antigenů erytrocytů i stanovení protilátek proti nim. Druhé vyšetření AB0 může zahrnovat pouze určení antigenů. U opakovaných dárců krve a krevních složek se standardně vyšetřují alespoň antigeny erytrocytů (1x), za druhé vyšetření se považuje výsledek vyšetření v databázi z předchozích odběrů. Je nutné zajištění shody výsledku vyšetření krevní skupiny s údaji v databázi. K vyšetření se používají minimálně diagnostická séra anti-A a anti-B, diagnostické erytrocyty A1, B (ČLS JEP č. STL_07, verze 4 (2019_09), doporučené postupy: *Základní imunohematologická laboratorní vyšetření červené řady – obecné zásady a technické postupy*).

Antigen D se u nových dárců vyšetřuje také 2x ze dvou nezávislých vzorků. Používají se diagnostická séra anti-D třídy IgM s dvěma různými klony, zároveň se zařazuje kontrola falešné positivity (Rh kontrola). U dárců (na rozdíl od pacientů) se používají diagnostická séra, která zachytávají variantu DVI. U Rh negativních dárců se vyšetřuje slabé/variantní D. U opakovaných dárců se používá diagnostické sérum anti-D třídy IgM a zařazuje se kontrola falešné positivity („Rh kontrola“). Za druhé (referenční) vyšetření se považuje výsledek vyšetření v databázi z předchozích odběrů. Neprovádí se již vyšetření slabého D.

U nového dárce erytrocytů (plné krve, erytrocytů z aferézy) se provádí vyšetření Rh fenotypu (C, c, E, e), které se ještě 1x ověřuje při následujícím odběru nebo lze vyšetřit u prvodárce z druhého nezávislého vzorku. Nevyžadují se dva různé klony diagnostických sér dané specifity. Doporučuje se i vyšetření antigenu Cw. Stejně jako u Rh fenotypu se u každého nového dárce erytrocytů (plná krev, erytrocyty z aferézy) doporučuje stanovit přítomnost či nepřítomnost antigenu Kell, která se ještě 1x ověřuje při následujícím odběru nebo lze vyšetřit u prvodárce z druhého nezávislého vzorku. V případě nálezu Kell positivity se stejným způsobem vyšetřuje i antigen Cellano (ČLS JEP č. STL2022_16, verze 1 (2022_06_01), doporučené postupy *Transfuze – ABO systém a antigen D*).

U každého odběru se provádí vyšetření přítomnosti nepravidelných protilátek přiměřeně citlivou metodou se zaměřením na záchyt klinicky významných protilátek, především anti-D. K vyšetření se mohou použít diagnostické erytrocyty ve směsi. V případě pozitivního výsledku screeningového vyšetření nepravidelných protilátek proti erytrocytům je vhodné provést identifikaci protilátky(-ek). Na TRS NEMCB se imuno hematologická vyšetření dárců krve a jejich složek provádí na analyzátoru NEO Iris.

4.4.1.1. Analyzátor NEO Iris

NEO Iris je mikroprocesorem řízený analyzátor pro plnou automatizaci imuno hematologických in-vitro diagnostických testů lidské krve za použití formátu založeném na mikrotitračních deskách (viz. obrázek č.4). NEO Iris automaticky provádí testy, interpretuje výsledky a zpracovává získaná data. Mezi metody, které mohou být analyzátozem NEO Iris prováděny, patří vyšetření krevní skupiny AB0 a typování antigenu Rh D, screening a identifikace IgG antierytrocytárních protilátek, vyšetření

kompatibility a vyšetření erytrocytárního fenotypu. NEO Iris pracuje jako uzavřený systém, je to tedy robotizovaný systém naprogramovaný k manipulaci s mikrotitračními deskami, s tekutinami kapalných reagentů a krevních vzorků z/do různých zásobníků a pracovních oblastí pro danou metodu ve správném pořadí, jako například prostor pro vkládání vzorků, pozice inkubátorů, promývací jednotka mikrodestiček, centrifuga a kamerový reader.



Obrázek č.4: Analyzátor NEO Iris, (zdroj: autor)

Mikrodestičkový reader analyzátoru NEO Iris používá CCD kamery pro zachycení obrazu mikrodestičky ze spodní strany. Programové vybavení analyzátoru NEO Iris vypočte reakční hodnotu pro každou jamku na základě multiparametrové analýzy obrazu a poté přiřadí výsledek a interpretaci jamkám na základě předdefinovaných kritérií spojených s vypočtenou reakční hodnotou.

Pro identifikaci reagentů, mikrodestiček a vzorků používá NEO Iris čárové kódy. Použitím technologie čárových kódů se zvyšuje počet kroků, které mohou být automatizovány, a také dochází ke snížení možných manipulačních chyb. Čárové kódy vzorků jsou umístěny na zkumavkách vzorků a označují ID vzorku a mohou být propojeny s informacemi o daném vzorku v LIS. Pro vkládání a vyjímání vzorků a reagentů používá NEO Iris zásobníky. NEO Iris je navržen tak, aby bylo možné doplňovat zdroje a spouštět nové metody bez přerušení provádění již spuštěných, anebo plánovaných metod – nepřetržitý přístup. Do přístroje je možné vložit současně až 176 vzorků. Pro maximální efektivitu umí moduly analyzátoru současně pipetovat, inkubovat, centrifugovat a odečítat kontrolní reakce a výsledky, a má také schopnost dynamického plánovače se statimovou funkcí. Analyzátor NEO Iris má vlastní

centrifugu, promývačku, reader se dvěma CCD barevnými kamerami, inkubátor, pipetor, prostory pro vkládání vzorků, diagnostik a reagensů s integrovanými čtečkami čárových kódů, prostor pro vkládání mikrotitračních desek, transportní modul mikrotitračních desek, čtečku čárových kódů mikrotitračních desek a PC včetně obslužného, vyhodnocovacího a řídicího SW. Pro komunikaci s obsluhou slouží obslužný počítač PC, který má LCD monitor s dotykovou obrazovkou, umožňuje propojení s nemocničním externím informačním systémem LIS i komunikaci se samotným analyzátozem NEO Iris. (NCB_TRS_SOP *NEO Iris Uživatelský manuál*).

4.4.2 Vyšetření infekčních markerů a protilátek anti-SARS-CoV-2 u dárců krve a krevních složek

Základem laboratorního screeningu dárců krve a krevních složek na infekční markery jsou serologická vyšetření, která zjišťují přítomnost protilátky na infekční agens nebo přítomnost specifického antigenu. Všechny tyto postupy jsou zatíženy rizikem diagnostického okna, tj období, kdy nákazu nelze provedeným testem prokázat, přestože virus je v organismu přítomen. Jednou z možností, jak dosáhnout snížení rizika diagnostického okna, je zavedení NAT (Nucleic acid testing – vyšetření zjišťující přímo přítomnost nukleové kyseliny daného viru). Vyšší citlivost NAT umožňuje zkrácení diagnostického okna. V současné době jsou ukončeny přípravy novely Vyhlášky o lidské krvi, kde vyšetření infekčních markerů pomocí NAT bude povinné.

Vyšetření infekčních markerů je součástí kritérií pro propuštění transfuzních přípravků pro léčebné použití nebo suroviny pro další výrobu a provádějí se při každém odběru. U dárců RP anti-SARS-CoV-2 byla tato kritéria rozšířena ještě o vyšetření protilátek anti-SARS-CoV-2. Znamky infekce byly vyšetřovány u dárců rekonvalescentní plazmy jako u běžných dárců plazmy dle doporučení společnosti pro transfuzní lékařství.

Krevní transfuzí může být přeneseno jakékoli infekční agens, které se v době odběru vyskytovalo v krevním oběhu dárce, nebo infekční agens, jímž byla kontaminována krev při odběru nebo zpracování. Z praktického hlediska mají největší význam infekce, které v době odběru nevyvolávají u dárce zjevné příznaky, a nejsou tedy rozpoznány. Transfuzí přenosné infekce se projevují jako pozdní komplikace transfuze. Jejich představiteli jsou převážně virové infekce. Mezi doposud známé virové infekce potenciálně přenosné transfuzí patří například hepatitis A, hepatitis B,

hepatitis C, hepatitis E, virus HIV 1,2, HTLV I a II, CMV, lidský parvovirus B 19, virus západonilské horečky. Další mikrobiální agens představuje *Treponema pallidum* či jiné bakteriální infekce (ČLS JEP č. STL2009_05 ze dne 15. 5. 2009 verze 2 (2012_01), doporučené postupy: *Vyšetřování známek infekce u dárců krve a krevních složek*).

4.4.2.1. Vyšetření infekčních markerů u dárců krve a krevních složek

Vyšetření známek infekce u dárců krve a jejich složek stanovuje vyhláška č. 143/2008 Sb. (v platném znění). Vyšetření jsou zaměřena na specifické sérologické markery infekce HIV, HBV, HCV a syfilis, tedy na anti-HIV-1 + anti-HIV-2, HIV Ag p24; HBsAg; anti-HCV; protilátky proti původci syfilis. Některá zařízení v České republice navíc vyšetřuje i antigen HCV kombinovaných testem (HCV Ab/Ag) a protilátky anti-HBc u hepatitidy B.

V případě reaktivity nebo hraničního výsledku některého z vyšetření se vzorek vyšetřuje v dubletu, při opakované reaktivitě není povoleno použít transfuzní přípravky ani suroviny pro další zpracování z daného odběru. Každý opakovaně reaktivní nebo opakovaně hraniční vzorek musí být odeslán ke konfirmaci do národní referenční laboratoře. Konfirmační vyšetření opakovaně reaktivních vzorků je v České republice povinné. Pozitivní výsledek vyšetření infekčních markerů se vždy oznamuje dárci a zároveň se zpětně ověřuje osud transfuzních přípravků i suroviny pro další zpracování pocházejících z předchozích odběrů téhož dárce (look-back).

Ke každému dokončenému odběru se uchovává archivní vzorek (plazma nebo sérum o objemu 0,5 ml) způsobem, který umožňuje jeho následné vyšetření v případě pochybností. Archivní vzorek se uchovává po dobu nejméně 1 roku po uplynutí doby použitelnosti transfuzního přípravku s nejdelsí dobou použitelnosti vyrobeného z daného odběru.

K testování se používá sérum či plazma dárce. Pro odběr nesrážlivé krve je vhodné použít jako protisrážlivé přísady EDTA (chelatonan) či heparin. Při odběru se dbá na to, aby vzorek nebyl nepřiměřeně naředěn (např. antikoagulačním roztokem z odběrové soupravy). Vzorky se odeberou v den darování krve nebo její složky. V odůvodněných a dokumentovaných případech je možno odběr vzorků provést nejdéle 7 dní před darováním krve nebo její složky (ČLS JEP č. STL2009_05 ze dne 15. 5. 2009 verze 2 (2012_01), doporučené postupy: *Vyšetřování známek infekce u dárců krve a krevních složek*).

4.4.2.2. Vyšetření protilátek anti-SARS-CoV-2 u dárců krve a krevních složek

Aby krevní plazma mohla být označována za RP anti-SARS-CoV-2, musela být získána od dárce, který překonal infekci SARS-CoV-2, tedy onemocnění COVID-19. Dárce také musel být vyšetřen na protilátky anti-SARS-CoV-2 a tyto protilátky musely být prokázány v dostatečném množství.

4.4.2.2.1. Zavedení a využití virus neutralizačního testu SARS-CoV-2

Na počátku byl prokázán dostatečný titer protilátek anti-SARS-CoV-2 pro rekonvalescentní plazmu pomocí virus neutralizačního testu. Virus neutralizační test (VNT) je zlatý standard v sérologii virů, slouží k vyšetření protilátek proti danému agens. Principem virus neutralizačního testu je inhibice cytopatického působení viru na buňky v důsledku přítomnosti neutralizačních protilátek ve vzorku. Pro test in vitro se používá tkáňové kultury buněk vnímavých k infekci a virus SARS-CoV-2. Je to funkční biologický test s nároky na způsob provedení a čas. Jedná se o test s relativně malou kapacitou počtu vyšetřovaných vzorků, který probíhá 5 dnů. Lze jej provádět pouze v laboratořích s bezpečnostním režimem BSL-3 nebo BSL-4, takovéto podmínky běžné laboratoře nemocnic či laboratoře zařízeních transfuzních služeb nesplňují (Kabičková et al., 2020). Takto vybavených biologických laboratořích je v ČR pouze několik, například pracoviště Akademie věd v Českých Budějovicích. Výsledek virus neutralizačního testu sloužil pro výběr vhodných dárců pro RP anti-SARS-CoV-2. Proto bylo potřeba hledat adekvátní korelace mezi virus neutralizačním testem a rutinními serologickými testy pro stanovení specifických protilátek, zejména třídy IgG (Enterová a Azeem, 2022).

4.4.2.2.2. Serologické testy – S-Protein SARS-CoV-2 viru

Protilátková imunitní reakce u SARS-CoV-2 je obdobná jako u jiných virových respiračních infekcí a spočívá v tvorbě časných IgM, které mizí do 12. týdne, a pozdních IgG protilátek, které jsou specifické proti virovému S a N antigenu. S-protein (spike) SARS-CoV-2 viru, je jeden ze čtyř hlavních strukturálních proteinů kódovaných RNA SARS-CoV-2 virem. Jedná se o povrchový glykoprotein, který je hlavním faktorem virulence a vyvolává tvorbu specifických neutralizačních protilátek (Trojánec et al., 2020). Sérologické testy prokazují vazbu IgG protilátek na doménu

virového spike-proteinu (anti-spike ectodomain, analyzátor Architect i2000 SR) nebo na receptorový protein (receptor-binding protein; techniky ELISA, CLIA). Po nalezení a potvrzení korelace mezi virem neutralizačním testem a sérologickými testy, začaly sérologické testy nahrazovat virus neutralizační test při vyšetření průkazu protilátek anti-SARS-CoV-2 u dárců. Protilátky anti-SARS-CoV-2 se spolu s infekčními markery nyní vyšetřují pomocí sérologických testů, na TRS NEMCB na imunochemickém analyzátoru Architect i2000 SR.

4.4.2.3 Analyzátor Architect i2000 SR

Analyzátor Architect i2000 SR je imunochemický analyzátor pracující na principu chemiluminiscence. Na TRS NEMCB se používá k sérologickému vyšetření infekčních markerů u infekcí HIV, HBV, HCV a syfilis (protilátek anti – HIV-1/anti-HIV-2, antigenu HIV p24, antigenu HBs, anti-HCV a protilátek proti TP – původci syfilis), a také k průkazu protilátek anti-SARS-CoV-2. Všechna tato vyšetření u vzorku mohou probíhat současně. Analyzátor Architect zpracovává vzorky plazmy nebo séra dárce. Jednotlivé vzorky jsou identifikovány pomocí čárových kódů a do analyzátoru jsou vkládány pomocí nosičů. Tento typ analyzátoru má prostor pro umístění statimových vzorků k přednostnímu vyšetření a automatické zpracování vzorků dle pokynů obsluhy. Analyzátor Architect i2000 SR provádí zcela automaticky jednotlivé testy, kontroluje podmínky testů pro jednotlivé vzorky, je schopen vyřadit vzorky do „Nedokončeno“ při nesplnění podmínek pro dané vyšetření a upozornit na to obsluhu. Dané testy dokáže vyhodnotit, uložit jednotlivé výsledky testů, připravit je pro tisk i je vytisknout dle pokynů obsluhy.



*Obrázek č. 5: Analyzátor Architect i2000 SR,
(zdroj: <https://www.invitro.md/pagins/text-page/83>)*

Mezi nejdůležitější části analyzátoru Architect i2000 SR patří procesní centrum, které může být lokálně řízeno klávesnicí modulu nebo přes monitor analyzátoru. Tato část analyzátoru je rozdělena na hardwarové součásti pro vzorky, které slouží k nasávání a dávkování vzorků, na hardwarové součásti pro reagenty, které slouží k nasávání a dávkování reagentů a na hardwarové součásti procesní části, které slouží k polohování reakčních nádobek pro nasávání vzorků a reagentů, míchání, oplachování a zpracovávání metodou CMIA (chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročasticích). Zde se nachází také CMIA optika, která slouží k měření chemiluminiscenčních emisí vyzařovaných reakčními nádobkami a pozdější výstupní údaje jsou vypočítávány na základě zachycených emisí. Součástí analyzátoru je také barevný dotykový monitor, s klávesnicí a myší (NCB_TRS_SOP_13_210_A, *Obsluha analyzátorů ARCHITECT i2000 SR a i1000 SR*).

4.5. RP anti-SARS-CoV-2 – uvolnění k použití, indikace a podání...

Propuštění transfuzních přípravků (včetně rekonvalescentní plazmy) k použití může provádět jenom „kvalifikovaná osoba“. Při propouštění se ověřuje, že dárcem splňoval daná kritéria, odběr a zpracování proběhly bez závad, výsledky laboratorního vyšetření odpovídají požadavkům.

U rekonvalescentní plazmy navíc byla důležitým parametrem pro uvolnění pro klinické použití hodnota protilátek anti-SARS-CoV-2. Na počátku bylo stanoveno, že

RP anti-SARS-CoV-2 by měla obsahovat protilátky anti-SARS-CoV-2, jejichž koncentrace je ve virus neutralizačním testu v titru $\geq 1:320$ a léčebná dávka byla určena na 400-500 ml, tedy 2 TU plazmy (200-250 ml /1 TU). Později se účinné množství protilátek anti-SARS-CoV-2, které bylo potřeba pro vydání RP k léčbě, snížilo na titer o hodnotě ≥ 160 v případě nedostupnosti RP, mohla být dokonce použita i RP anti-SARS-CoV-2 s hodnotou titru ≥ 80 . Důvodem pro úpravu limitního titru VNT byl, zejména na začátku pandemie, relativně malý počet dárců s dostatečnou protilátkovou odpovědí. U serologických testů se hledala korelace s VNT (Bohoněk et al., 2020 a 2021; Doporučené postupy pro použití RP v léčbě dospělých pacientů s COVID-19).

RP anti-SARS-CoV-2, která byla vydávána k léčbě pacienta, měla mít tedy co nejvyšší dostupný titer protilátek anti-SARS-CoV-2 a transfundovaná dávka plazmy byla určena podle jejího titru neutralizačních protilátek a objemu plazmy příjemce. Pro transfuzi bylo nutné použít plazmu kompatibilní v systému AB0, například plazma skupiny 0 byla určena pouze pro příjemce skupiny 0, plazma skupiny A a B mohla být též aplikována pacientům skupiny 0 a plazma AB, mohla být použita pro všechny pacienty všech krevních skupin, tedy i pro pacienty s neznámou krevní skupinou. U odebrané RP nebylo možné splnit podmínky 6měsíční karantény, proto některá zařízení transfuzní služby zařadila do procesu výroby postup patogen inaktivace plazmy. Po přidání fotoaktivního činidla a následném ozáření UV paprsky dojde k ireverzibilnímu narušení šroubovice nukleové kyseliny případného infekčního agens. Na TRS NEMCB se pořídil systém Mirasol (Terumo), který jako fotoaktivní činidlo používá riboflavin.

Pro každý transfuzní přípravek produkční zařízení transfuzní služby vydává tzv. specifikaci transfuzního přípravku (příbalový leták). Specifikace jsou dostupné všem klinikům na webových stránkách produkčního zařízení, obsahují základní informace o transfuzní přípravku – výrobce, definice, vlastnosti, kontrola jakosti, pokyny pro použití, indikace, nežádoucí účinky apod (ČLS JEP č. STL2015_12, verze 3 (2022_05_01), *Doporučené postupy pro podání transfuzních přípravků; Specifikace transfuzních přípravků pro klinické účely. NCB_TRS_F_578_C Plazma z aferézy reconvalescentní anti-sars-cov-2 patogen inaktivovaná*).

5. Cíle práce a hypotézy

5.1. Cíle práce

1. Literárně zpracovat problematiku rekonvalescentní plazmy v době pandemie COVID-19.
2. Prakticky si osvojit vyšetření dárců rekonvalescentní plazmy anti-SARS-CoV-2 provést analýzu na vyšetření protilátek.

5.2. Hypotézy:

1. Množství protilátek anti-SARS-CoV-2 se s postupem času a počtem odběrů snižuje.
2. Frekvence krevních skupin u dárců rekonvalescentní plazmy odpovídá frekvenci výskytu krevních skupin v populaci.

6. Metodika

Praktická část mé bakalářské práce byla provedena na TRS NEMCB. Veškerá data, která jsem využila ke statistickému zpracování, jsem získala ze záznamů laboratoře. Kapitola je rozdělena na dvě části. První část se zabývá serologickým testem prováděným na imunochemickém analyzátoru Architect i2000 SR Abbott k průkazu protilátek anti-SARS-CoV-2. Ve druhé části popisují imunohepatologické vyšetření krevních skupin AB0 u dárců krve a krevních složek (tj. i dárců RP), které bylo stanovováno na analyzátoru NEO Iris APR.

6.1. Stanovení protilátek anti-SARS-CoV-2 IgG u dárců RP anti-SRAS-CoV-2 pomocí analyzátoru Architect i2000 SR

Architect i2000 SR: imunochemický analyzátor pracující na principu chemiluminiscence.

Metoda:

Metoda SARS-CoV-2 IgG II Quant, je chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročásticích (CMIA – Chemiluminescent Microparticle Immunoassay), která se používá ke kvalitnímu i kvantitativnímu stanovení protilátek IgG proti SARS-CoV-2 v lidském séru a plazmě. V kombinaci s klinickými projevy a dalšími laboratorními testy se používá ke stanovení diagnózy infekce SARS-CoV-2. Také se používá při

hodnocení imunitního stavu jedinců pomocí kvantitativního měření protilátek IgG proti doméně vázající se na receptor S-proteinu SARS-CoV-2.

Princip metody:

Jedná se o automatizovanou dvoukrokovou imunoanalýzu, která využívá technologii chemiluminiscenční imunoanalýzy na mikročasticích (CMIA). Vzorek, paramagnetické mikročastice potažené antigenem SARS-CoV-2 a ředící roztok se míchají a inkubují. Protilátky IgG proti SARS-CoV-2 přítomné ve vzorku se naváží na antigen SARS-CoV-2 na mikročasticích. Směs se promyje a přidá se konjugát protilátek proti lidskému IgG značený akridiniem, čímž vznikne reakční směs a ta se inkubuje. Po promývacím cyklu se přidají roztoky Pre-Trigger a Trigger. Výsledná chemiluminiscenční reakce se měří v relativních světelných jednotkách (RLU – Relative Light Units). Mezi množstvím protilátek IgG proti SARS-CoV-2 a signálem v jednotkách RLU detekovaných optikou systému existuje přímá úměrnost.

Vzorky:

Krevní plazma či krevní sérum, které jsou uchovávány při teplotě 2-8 °C. Pokud vzorky nejsou vyšetřeny do sedmy dnů, odsaje se plazma nebo sérum a uskladní se při teplotě -20 °C a nižší.

Diagnostika a chemikálie:

SARS-CoV-2 IgG II Quant Reagent Kit:

Součásti soupravy:

Microrarticles – 1 lahvička (6,6ml) na 100 testů (purifikovaný rekombinantní antigen SARS-CoV-2 na mikročasticích v TRIS pufru se surfaktantem), konzervace: ProClin 950 a azid sodný

Conjugate – 1 lahvička (5,9ml) na 100 testů (konjugát protilátek proti lidskému IgG (myší monoklonální) značený akridiniem v MES pufru se surfaktantem a proteinovým stabilizátorem), konzervace ProClin 300 a antimikrobiální látky

Assay diluent – 1 lahvička (7,9ml) (MES pufr s proteinovými (bovinními) stabilizátory), konzervace: ProClin 300 a ProClin 950

SARS-CoV-2 IgG II Quant Control Kit:

lahvičky (každá po 4ml, konzervace: azid sodný, antimikrobiální látky)

Negativní kontrola – obsahuje negativní lidskou plazmu

Pozitivní kontrola 1 a Pozitivní kontrola 2 – obsahují lidskou plazmu pozitivní na SARS-CoV-2 IgG

Tabulka č.1 Rozmezí hodnot anti-SARS-CoV-2 IgG kontrol:

Kontrola	AU/ml
Negativní	<18,0
Pozitivní 1	91,3 - 240,7
Pozitivní 2	331,4 - 873,6

Zdroj: NCB_TRS_SOP_20_211_B Vyšetření anti-SARS-CoV-2 II Quant

SARS-CoV-2 IgG II Quant Calibrator Kit:

CAL A – obsahuje fosfátový pufr a proteinový stabilizátor

CAL B – CAL F – obsahují anti-SARS-CoV-2 IgG (myši, monoklonální) ve formátovém pufru s proteinovým (bovinním) stabilizátorem

Kalibrátory obsahují různé koncentrace anti-SARS-CoV-2 IgG.

ARC Probe Conditioning Solution (promývací roztok jehly vzorkového pipetoru)

1 balení – 4 lahvičky po 25ml

Obsahuje rekalifikovanou lidskou plazmu.

Použití: při provádění některých postupů údržby pro promytí jehly vzorkového pipetoru po čištění, aby nedocházelo k nespecifickému navázání analytů v jehle.

ARC Pre-Trigger

1 láhev 975ml, černá barva láhve

1,32 % roztok peroxidu sodného

Použití: k odštěpení akridiniového barviva z konjugátu navázaného na mikročástice.

Tento proces připraví akridiniové barvivo na přidání Triggeru.

ARC Trigger:

1 láhev po 975 ml, přírodní barva láhve

0,35 N roztok hydroxidu sodného

Použití: k vyvolání chemiluminiscenční reakce, která umožňuje provést konečné čtení.

ARC Concentrated Wash Buffer (koncentrovaný promývací pufr)

Dodáván v litrových láhvích.

Před použitím musí být naředěn, obsahuje fyziologický roztok s fosfátovým pufrům.

Použití: jako koncentrovaný promývací pufr, před použitím se ředí

V Průběhu zpracování metody je pumpován do vzorkového a reakčního procesu obou mycích zón a může být doplňován v průběhu činnosti analyzátoru (NCB_TRS_SOP_20_211_B, *Vyšetření anti-SARS-CoV-2 II Quant*).

Další potřebné přístroje a potřebný materiál:

Laboratorní centrifuga

Pipety a špičky k pipetám

Reakční zkumavky a nádobky

Septa a vyměnitelná víčka

Příprava krevní vzorků a reagensů:

Z vakuet s krví dárců odstraníme víčka. Centrifugujeme po dobu 20 minut při otáčkách 3500-4000 ot./min. Před vložením vzorků do analyzátoru musíme odstranit případné bubliny či pěnu ve vzorku.

Před prvním vložením reagenční soupravy do přístroje musíme obsah lahvičky s mikročásticemi promíchat opatrným převrácením asi 30x, aby se rozptýlily mikročástice, které se během přepravy mohly usadit. Z lahviček reagenční soupravy odstraníme uzávěry a nasadíme septa, které brání odpařování a kontaminaci reagensů. Reagensie zůstávají v analyzátoru do svého vypotřebování při konstantní teplotě nebo jsou vyjmuty z analyzátoru a skladovány v chladničce ve svislé poloze.

Vlastní vyšetření:

Celé vyšetření se provádí na analyzátoru Architect. Analyzátor provádí automaticky celé vyšetření včetně vyhodnocení a kontrolních mechanismů. Před

zahájením vyšetření kontrol i vzorků zkontrolujeme stav zásob roztoků a reagensí. Podle potřeby doplníme. Před začátkem samotného vyšetření krevních vzorků je modul podavače a modul analyzátoru v režimu zastaven. Analyzátor převedeme do pracovního režimu a provedeme vyšetření kontrol. Postupně zadáme požadavky. Vložením reagensí do analyzátoru se spustí kontroly pro jednotlivé testy. Po vyhovujícím vyhodnocení kontrol můžeme začít s vlastním vyšetřením vzorků. Vzorky můžeme zadat jako zadání jednotlivých vzorků – na monitoru označíme Objednávky (po jednom vzorku, možnost vkládání statimových vzorků) či jako zadání celé dávky – na monitoru od klikneme Objednávky – Dávka (více vzorků najednou, nelze vkládat do statimové části).

U všech zadávaných vzorků si musíme pohlídat jejich správnou pozici ve stojánku. Samotné vyšetření se spustí vložením stojánků se vzorky do přístroje. Konečné výsledky se postupně objevují na monitoru ve složce přehled výsledků, výsledky zkontrolujeme a uvolníme, na konci pracovního dne vytiskneme. Během jednotlivých měření si musíme neustále hlídat stav reagensí a odpadu. Na konci práce provedeme promytí a denní údržbu. Analyzátor se stisknutím stop převede do stavu zastaven. Poté je možné vypnout monitor a práci s analyzátozem ukončit (NCB_TRS_SOP_13_210_A, *Obsluha analyzátorů ARCHITECT i2000 SR a i1000 SR*).

Kalibrace:

Každá šarže reagensí musí mít platnou kalibrační křivku. Do vzorkového kelímku nakapeme nejméně 4 kapky kalibrátorů. Kalibrátory obsahují různé koncentrace SARS-CoV-2 IgG. Kalibrátory se měří ve dvou opakováních. Při vyhovujícím výsledku je kalibrační křivka označena jako aktivní, při nevyhovujícím výsledku jako neplatná, pak by analyzátor nedovolil šarži používat. Kalibraci musíme opakovat.

Vyšetření kontrol:

Vyšetření kontrol provádíme před vyšetřením vzorků pomocí soupravy SARS-CoV-2 IgG II Quant Control Kit, která obsahuje 2 pozitivní a jednu negativní kontrolu. Výsledky kontrol kontroluje sám analyzátor podle předem nastavených rozmezí. Výsledky kontrol musí být vyhovující. V případě nevyhovujícího výsledku nejdříve vyšetření zopakujeme, pokud nevyhovující výsledky trvají, překalibrujeme metodu.

Vlastní vyšetření vzorků a jejich vyhodnocení:

Minimální objem vzorku pro vyšetření je 150 µl. Vzorky nesmí obsahovat pěnu ani bubliny. Do analyzátoru zadáme požadavky na vyšetření vzorků, po vložení stojánku se vzorky do analyzátoru se automaticky spustí samotné vyšetření. Průběh vyšetření lze sledovat na monitoru. V případě vyloučení vzorku z vyšetření jej lze odeslat k opětovnému vyšetření. Výsledky se ukládají v analyzátoru a po uvolnění je odesíláme do laboratorního informačního systému FONS Openlims. Vyhodnocení výsledků se odvíjí od hodnoty cutoff, která je 50,0 AU/ml. Veškeré naměřené hodnoty, které jsou nižší než 50,0 AU/ml, jsou hodnoceny jako negativní a všechny hodnoty vyšší nebo rovno 50 AU/ml jsou hodnoceny jako pozitivní (viz. tabulky č.2). Analytický rozsah měření je 21,0 – 40 000,0 AU/ml, po nařazení vzorku rozšířený rozsah měření je 40 000,0 – 80 000,0 AU/ml. Za vyhovující výsledek koncentrace protilátek pro rekonvalescentní plazmu byla stanovena hodnota více než 2500 AU/ml (NCB_TRS_SOP_20_211_B, *Vyšetření anti-SARS-CoV-2 II Quant*).

Tabulka č.2 Vyhodnocení a interpretace výsledků

cutoff	50,0 AU/ml
Negativní výsledek	<50,0 AU/ml
Pozitivní výsledek	≥50,0 AU/ml

Zdroj: NCB_TRS_SOP_20_211_B Vyšetření anti-SARS-CoV-2 II Quant

Další metody prováděné na analyzátoru Architect i2000 SR

Na analyzátoru Architect i2000 SR Abbott se na TRS NEMCB vyšetřují známky infekce HIV, HCV, HBV a syfilis u dárců krve a krevních složek při každém odběru. (NCB_TRS_SOP_13_210_A, *Obsluha analyzátorů ARCHITECT i2000 SR a i1000 SR*)

6.2. Určení krevní skupiny v AB0 systému u dárce RP anti-SARS-CoV-2 pomocí analyzátoru NEO Iris

NEO Iris APR: imunohematologický analyzátor pracující s metodou přímé aglutinace na mikrodestičkách a se systémem pevné fáze.

Určení krevní skupin v AB0 RhD za pomoci analyzátoru NEO Iris je prováděno plně automatizovanou metodou v mikrotitrační jamce. Vyšetření krevní skupiny v systému AB0 je založeno na přítomnosti aglutinogenů na povrchu erytrocytů a aglutininů v plazmě/séru. Kompletní vyšetření krevní skupiny (aglutinogeny, aglutininy) se provádí u dárců krve při 1. a 2. odběru, u opakovaných dárců se provádí pouze ověření (aglutinogeny) krevní skupiny (NCB_TRS_SOP_21_213_A *Vyšetření AB0 RhD a krevních podskupin u dárců krve na analyzátoru NEO Iris*).

Princip vyšetření: metoda přímé aglutinace na mikrotitrační destičce.

Krevní vzorky:

krev odebraná do fialové zkumavky vakueta označená čárovým kódem a číslem odběru
centrifugovány 10 minut při otáčkách 4000 otáček za minutu

Diagnostika a chemikálie:

Diagnostické erytrocyty k vyšetření aglutininů – Referencells A1, A2, B, 0

Diagnostická séra k vyšetření antigenů – ImmuClone anti-A Galileo, ImmuClone anti-B Galileo

Galileo Diluent – izotonický aditivní roztok určený k ředění erytrocytů z krevní vzorků

Destilovaná voda – ředění systémové kapaliny (PBS)

Spotřební materiál:

Mikrodestičky – Galileo Mikroplates

Magnetická míchadla – Stir Balls

Přístroje a technická zařízení:

Analyzátor NEO Iris

Centrifuga na zkumavky

Postup vyšetření:

Postup obsluhy analyzátoru:

Pro správné provedení testů na analyzátoru NEO Iris musí být analyzátor řádně spuštěn a přístroj musí být zapnut minimálně 30 minut před započítáním testu, kvůli

správnému nahřátí lampy readeru. Pokud by došlo ke čtení desek před dokončením zahřívací periody, mohlo by to způsobit nesprávné čtení slabě pozitivních reakcí. Před spuštěním samotného testu musíme zkontrolovat odpadní nádobu, jestli je prázdná, pokud ne, odpojíme ji a vyprázdníme, a také zásoby systémové kapaliny, při nedostatku ji doplníme. Musíme též zkontrolovat všechny potřebné reagenty a vzorky podle instrukcí SOP.

Před umístění reagentů do analyzátoru musí být odstraněny zátky a do reagensů, obsahující celulární reagent (erytrocyty), musí být přidána míchací kulička. Tato kulička slouží k tomu, aby byl reagent během testování v suspendovaném stavu, tedy k promíchávání krvinek v průběhu měření. Poté potřebné reagenty umístíme do zásobníků a ty vložíme do příslušných slotů analyzátoru. Do analyzátoru též musíme vložit potřebné množství mikrodestiček, které umístíme nejdříve do transportního rámečku a poté vložíme desky do volné pozice ve vkladací věži (viz. Obrázek č.6).



Obrázek č.6: Vkladací věž na mikrodestičky, (Zdroj: autor)

Mikrodestičky jsou označeny čárový kódem, který předurčuje, na který z testů mají být dané desky použity (pro určení krevní skupiny je to ABO deska). Na obrazovce zkontrolujeme, že analyzátor zaznamenal a načel všechny námi vložené reagentie a mikrodestičky.

Dále pro spuštění potřebných testů musí proběhnout ještě správné načtení vzorků a stažení požadavků z LIS. Pro správné načtení vzorků, se musíme ujistit, že požadované vzorky jsou vloženy do stojánků tak, že štítky s čárovými kódy jsou viditelné skrz mezeru na pravé straně stojánku a ze vzorků musí být odstraněna víčka. Stojánky zasuneme do vstupního prostoru vzorků jeden po druhém pro jejich načtení, poté se ujistíme, jestli všechny čárové kódy byly úspěšně načteny. Po úspěšném načtení vzorků, stáhneme požadované vyšetření z LIS, například určení krevní skupiny.

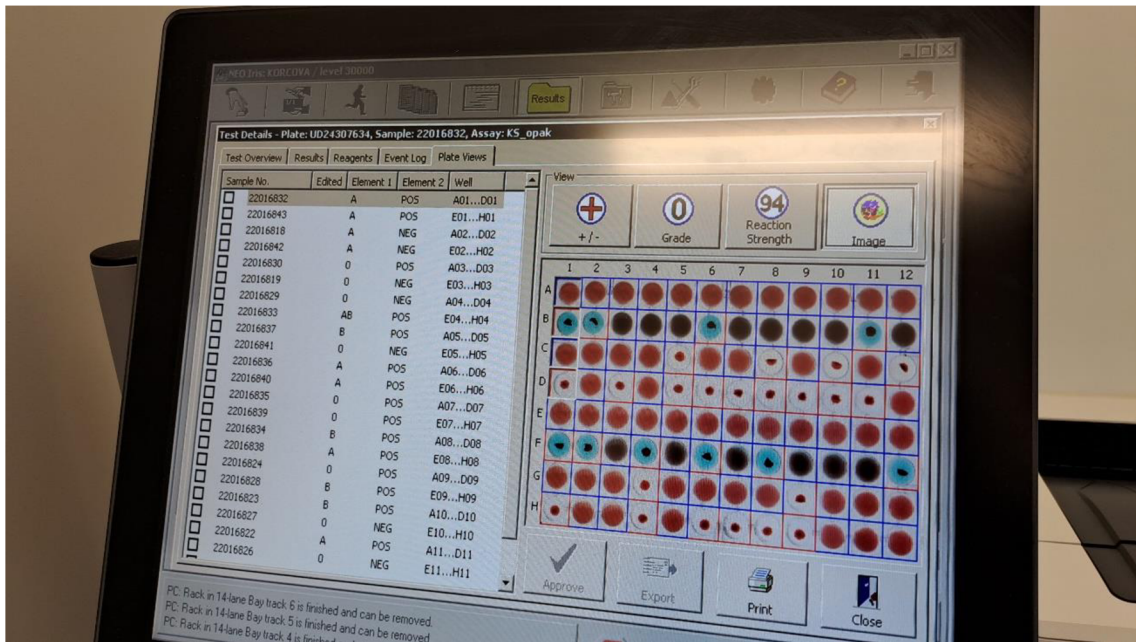
System poté vypočte a zobrazí stav potřebného materiálu pro daný test – jestli má dostupné veškeré desky, reagenty, kontroly a promývací roztoky pro danou destičku. Pokud systém zobrazí zelené zatržení na vybrané desce ve sloupci potřebného materiálu, značí to, že je k dispozici dostatečné množství pro potřebné testování. Jestliže systém zobrazí symbol červeného vykřičníku v jednom ze sloupců pro potřebný materiál, musíme tento materiál doplnit. Samotné spuštění zpracování vzorku může být tedy spuštěno až poté, kdy je všechen potřebný materiál pro daný test v dostatečném množství. Vybereme a označíme desky, které mají být spuštěny a tlačítkem start zahájíme zpracovávání testů. Poté, co analyzátor vzorky zpracuje, uvolníme výsledky, které mohou být archivovány pro další zpracování. U výsledků je také zkontrolováno, zda nedošlo během měření k chybě – např. technické závadě na analyzátoru apod., poté musí být závady odstraněny a testy zopakovány. (SOP: NCB-TRS-SOP-21-212 *NEO Iris Uživatelský manuál*)

Prohlížení, schválení a export výsledků:

Výsledky mohou být zobrazeny dvěma způsoby: dle mikrodesek a dle vzorků. Reakce je možné prohlížet jako + nebo -, stupeň (Grade) 0-4, síla reakce 0-99 nebo jako obrázek jamky (image). Schválené výsledky mohou být exportovány do LIS.

Vyhodnocení krevní skupiny:

Hodnotí se přítomná aglutinace (terčík na dně jamky) v jednotlivých jamkách mikrodestičky (viz Obrázek č.7).



Obrázek č.7: Aglutinace, monitor analyzátoru NEO Iris, (zdroj: autor)

Vyšetření alutinogů:

Pozitivní reakce (aglutinace) – indikuje přítomnost odpovídajícího antigenu na erythrocytech

Negativní reakce – indikuje chybění odpovídajícího antigenu na erythrocytech

Vyšetření aglutininů:

Pozitivní reakce (aglutinace) – indikuje přítomnost odpovídajícího aglutininu v plazmě

Negativní reakce – indikuje chybění odpovídajícího aglutininu v plazmě (viz. Obrázek č.7 a 8; NCB_TRS_SOP_21_213_A *Vyšetření AB0 RhD a krevních podskupin u dárců krve na analyzátoru NEO Iris*)









Procentuální zastoupení krevních skupin (KS) v České republice dle UHKT:

AB0 systém zahrnuje 4 základní fenotypy: A, B, 0, AB. Jsou určeny přítomností či chyběním dvou antigenů na erythrocytech. V plazmě jsou přítomny protilátky proti antigenu, který není přítomen na erythrocytech (viz. tabulka č.3, obrázky č. 8 a 9; Penka et al, 2011).

Tabulka č.3 Krevní skupiny AB0

AB0 skupina	Antigeny na erythrocytech	Protilátky v plazmě	Dárce plazmy pro krevní skupinu
A	A	Anti-B	A nebo 0
B	B	Anti-A	B nebo 0
AB	AB	žádné	A, B, AB, 0
0	žádné	Anti -A a Anti-B	0

Zdroj: autor

	Skupina A	Skupina B	Skupina AB	Skupina 0
Erythrocyty				
Protilátky	 anti-B	 anti-A	Žádné	 anti-A  anti-B

Obrázek č.8: AB0 KS, Antigeny a Aglutininy, (Zdroj: <https://www.cckp9.cz/krevni-skupiny>)

Možnosti transfúze plazmy

dárce →	0	✓			
	B	✓	✓		
	A	✓		✓	
	AB	✓	✓	✓	✓
kompatibilita krve pro přenos plazmy	0	B	A	AB	
		příjemce ↓			

Obrázek č.9: Možnosti transfúze plazmy, (Zdroj: img.geocaching.com)

Celosvětově je nejrozšířenější krevní skupina 0. V České republice, ale například také i ve Švédsku a Norsku, je nejběžnější krevní skupina A. Skupina AB je nejméně častá.

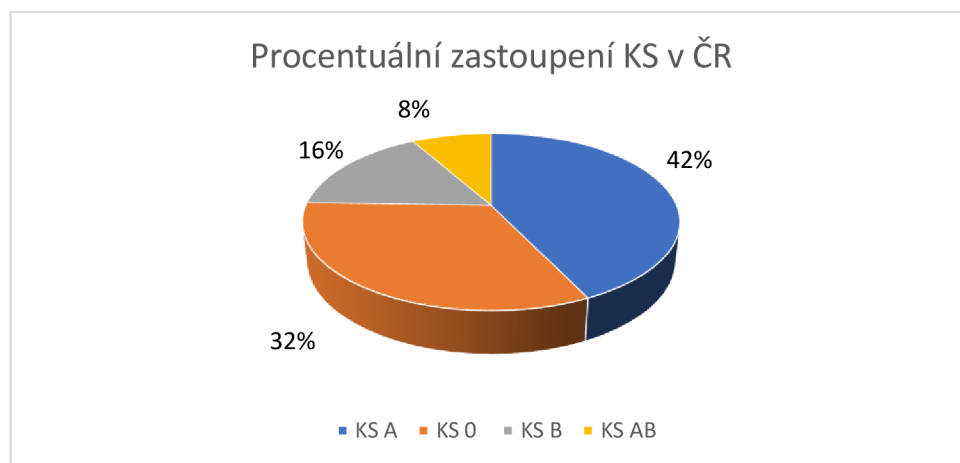
Podíl krevních skupin podle ABO systému v České republice je následující: 40-44 % populace má krevní skupinu A, 30-34 % krevní skupinu 0, 15-18 % krevní skupinu B a 8-9 % populace má krevní skupinu AB (viz. tabulka č.4 a obrázek č.10; Řeháček et al., 2011).

Tabulka č.4 Procentuální zastoupení KS v ČR dle UHKT

Krevní skupina	Procentuální zastoupení KS v ČR (%)
A	40–44 (cca 42)
B	15–18 (cca 18)
AB	8–9 (cca 8)
0	30–34 (cca 32)

Zdroj: autor

Grafické znázornění:



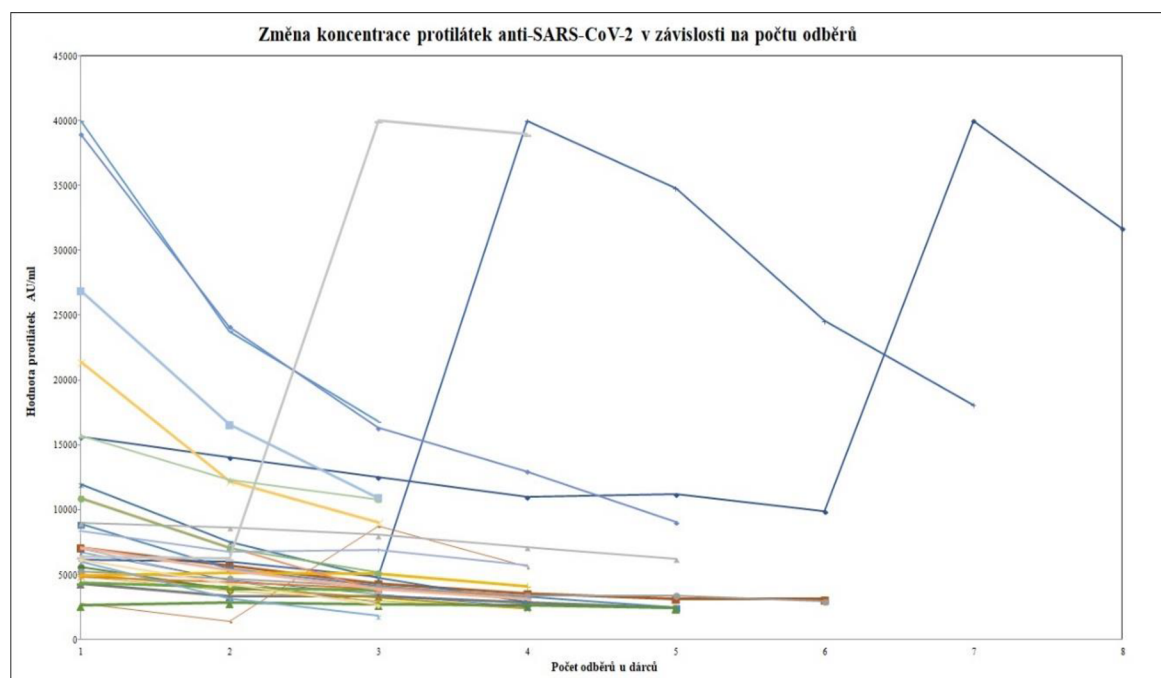
Obrázek č.10: Graf – procentuální zastoupení KS v ČR, (zdroj: autor)

7. Výsledky

Veškerá data, která jsem využila ke statistickému zpracování, jsem získala ze záznamů laboratoře TRS NEMCB. Analýzu na vyšetření protilátek anti-SARS-CoV-2 jsem provedla z odběrů dárců RP v období první poloviny roku 2021. Protilátky byly vyšetřeny na analyzátoru Architect i2000 SR, kde se v té době používal test SARS-CoV-2 IgG Quant ke kvalitnímu a kvantitativnímu stanovení IgG protilátek proti S-antigenu (Spike).

7.1. Výsledky vyšetření protilátek anti-SARS-CoV-2 dárců RP

U 30 dárců, kteří v období první poloviny roku 2021 darovali rekonvalescentní plazmu nejméně třikrát, jsem se snažila zachytit změnu koncentrace protilátek anti-SARS-CoV-2 v závislosti na čase a počtu odběrů. U každého opakovaného dárce jsem sledovala koncentraci protilátek při každém odběru, rozdíl koncentrací mezi jednotlivými odběry v % a časový interval mezi jednotlivými odběry ve dnech (viz tabulky č. 5–9 a obrázky č.11 a 12 - grafy).



Obrázek č.11: Graf – změny koncentrace protilátek anti-SARS-CoV-2, (Zdroj: autor) (zvětšený graf viz příloha č.1)

Tabulka č.5 Změny koncentrace protilátek anti-SARS-CoV-2 v závislosti na čase a počtu odběrů (podle dat z přílohy č. 2)

Pořadové číslo dárce		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Krevní skupina		A	A	0	A	A	A	A	A	A	0
1. odběr	1. odběru	12.1. 2021	15.1. 2021	21.1. 2021	26.1. 2021	28.1. 2021	31.1. 2021	1.2. 2021	2.2. 2021	5.2. 2021	11.2. 2021
	plt (AU/ml)	15648	7092	4290	4995	11947	5564	6117	2737	6968	4834
2. odběr	Dny od 1. odběru	22	17	21	21	18	78	18	22	17	19
	plt (AU/ml)	14026	5696	3329	3960	7526	3825	6007	1367	4527	3705
	Změna plt (%)	-10	-20	-22	-21	-37	-31	-2	-50	-35	-23
3. odběr	Dny od 2. odběru	14	22	19	16	18	21	17	69*	32	16
	plt (AU/ml)	12505	4293	3325	3224	4751	3941	4792	8721	2828	2943
	Změna plt (%)	-11	-25	-0,1	-19	-37	+3	-20	+538**	-38	-21
4. odběr	Dny od 3. odběru	14	22	19	16	18	21	17	69		16
	plt (AU/ml)	10958	3530	2861	2374	2868	3173	>40000	5576		2382
	Změna plt (%)	-12	-18	-14	-26	-40	-20	+735***	-36		-19
5. odběr	Dny od 4. odběru	20	26	22				23			
	plt (AU/ml)	11209	3115	2418				34781			
	Změna plt (%)	+2	-12	-16				-13			
6. odběr	Dny od 5. odběru	49	15					20			
	plt (AU/ml)	9865	3096					24546			
	Změna plt (%)	-12	-0,6					-29			
7. odběr	Dny od 6. odběru	20						28			
	plt (AU/ml)	>40000						18050			
	Změna plt (%)	+306***						-27			
8. odběr	Dny od 7. odběru	21									
	plt (AU/ml)	31683									
	Změna plt (%)	-21									

plt – protilátka, * delší časový odstup mezi odběry z důvodu nemoci, ** zvýšení hodnoty protilátek po opětovném prodělání COVID-19, *** zvýšení hodnoty protilátek po očkování

Zdroj: autor

Pokračování: tabulka č.5

Pořadové číslo dárce		11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Krevní skupina		A	A	B	A	A	A	0	0	0	A
1. odběr	1. odběru	15.2.2021	16.2.2021	18.2.2021	18.2.2021	23.2.2021	24.2.2021	24.2.2021	26.2.2021	8.3.2021	18.3.2021
	plt (AU/ml)	8872	2622	6716	4833	5227	4921	>40000	4328	38956	10923
2. odběr	Dny od 1. odběru	17	17	19	18	16	47	15	17	15	14
	plt (AU/ml)	5431	2818	4594	4416	4691	5147	23776	4032	24126	7071
	Změna plt (%)	-39	+8	-32	-9	-10	+5	-41	-7	-38	-35
3. odběr	Dny od 2. odběru	15	19	15	15	21	15	20	14	20	22
	plt (AU/ml)	4097	2680	3448	3890	4080	5075	16801	3749	16299	3797
	Změna plt (%)	-25	-5	-25	-12	-13	-1	-29	-7	-32	-46
4. odběr	Dny od 3. odběru	15	19	15	15	21	15			20	22
	plt (AU/ml)	3250	2602	2490	3383	3385	4095			12954	
	Změna plt (%)	-21	-3	-28	-13	-17	-19			-21	
5. odběr	Dny od 4. odběru	18	18			12				31	
	plt (AU/ml)	2449	2396			3370				9049	
	Změna plt (%)	-25	-8			-0,4				-30	
6. odběr	Dny od 5. odběru					14					
	plt (AU/ml)					2937					
	Změna plt (%)					-13					
7. odběr	Dny od 6. odběru					14					
	plt (AU/ml)										
	Změna plt (%)										
8. odběr	Dny od 7. odběru										
	plt (AU/ml)										
	Změna plt (%)										

plt – protilátka, * delší časový odstup mezi odběry z důvodu nemoci, ** zvýšení hodnoty protilátek po opětovném prodělání COVID-19, *** zvýšení hodnoty protilátek po očkování

Zdroj: autor

Pokračování: tabulka č.5

Pořadové číslo dárce		21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Krevní skupina		A	A	0	0	A	A	0	AB	0	0
1. odběr	1. odběru	19.3.2021	19.3.2021	24.3.2021	6.4.2021	12.4.2021	15.4.2021	19.4.2021	27.4.2021	3.5.2021	11.5.2021
	plt (AU/ml)	8953	21413	5979	10875	8379	7079	6365	6156	26896	15690
2. odběr	Dny od 1. odběru	18	18	21	15	15	14	12	29	23	21
	plt (AU/ml)	8609	12216	3150	7020	6776	5352	6202	4251	16541	12303
	Změna plt (%)	-4	-43	-47	-35	-19	-24	-3	-31	-39	-22
3. odběr	Dny od 2. odběru	23	16	22	22	28	19	51	20	20	21
	plt (AU/ml)	8040	9024	1799	5175	6898	3878	>40000	2645	10911	10760
	Změna plt (%)	-7	-26	-43	-26	+2	-28	+545***	-38	-34	-13
4. odběr	Dny od 3. odběru	23				28	19	51			
	plt (AU/ml)	7100				5683	3105	38965			
	Změna plt (%)	-12				-18	-20	-3			
5. odběr	Dny od 4. odběru	21									
	plt (AU/ml)	6187									
	Změna plt (%)	-13									
6. odběr	Dny od 5. odběru										
	plt (AU/ml)										
	Změna plt (%)										
7. odběr	Dny od 6. odběru										
	plt (AU/ml)										
	Změna plt (%)										
8. odběr	Dny od 7. odběru										
	plt (AU/ml)										
	Změna plt (%)										

plt – protilátka, * delší časový odstup mezi odběry z důvodu nemoci, ** zvýšení hodnoty protilátek po opětovném prodělání COVID-19, *** zvýšení hodnoty protilátek po očkování

Zdroj: autor

Tabulka č. 6 Průměrné hodnoty časových rozestupů a procentuálních změn hodnot protilátek mezi jednotlivými odběry (data z tabulky č. 5)

pořadové číslo	krevní skupina	dny od 1. odběru	změna ptl. (%)	dny od 2. odběru	změna ptl. (%)	dny od 3. odběru	změna ptl. (%)	dny od 4. odběru	změna ptl. (%)	dny od 5. odběru	změna ptl. (%)	dny od 6. odběru	změna ptl. (%)	dny od 7. odběru	změna ptl. (%)
1	A	22	-10	14	-11	14	-12	20	+2	49	-12	20	+306 ***	21	-21
2	A	17	-20	22	-25	22	-18	26	-12	15	-0,6				
3	0	21	-22	19	-0,1	19	-14	22	-16						
4	A	21	-21	16	-19	16	-26								
5	A	18	-37	18	-37	18	-40								
6	A	78	-31	21	+3	21	-20								
7	A	18	-2	17	-20	17	+735 ***	23	-13	20	-29	28	-27		
8	A	22	-50	69 *	+538 **	69	-36								
9	A	17	-35	32	-38										
10	0	19	-23	16	-21	16	-19								
11	A	17	-39	15	-25	15	-21	18	-25						
12	A	17	+8	19	-5	19	-3	18	-8						
13	B	19	-32	15	-25	15	-28								
14	A	18	-9	15	-12	15	-13								
15	A	16	-10	21	-13	21	-17	12	-0,4	14	-13	14			
16	A	47	+5	15	-1	15	-19								
17	0	15	-41	20	-29										
18	0	17	-7	14	-7										
19	0	15	-38	20	-32	20	-21	31	-30						
20	A	14	-35	22	-46	22									
21	A	18	-4	23	-7	23	-12	21	-13						
22	A	18	-43	16	-26										
23	0	21	-47	22	-43										
24	0	15	-35	22	-26										
25	A	15	-19	28	+2	28	-18								
26	A	14	-24	19	-28	19	-20								
27	0	12	-3	51	+545 ***	51	-3								
28	AB	29	-31	20	-38										
29	0	23	-39	20	-34										
30	0	21	-22	21	-13										
průměr		21	-24	22	-20	23	-19	21	-13	25	-13	21	-27	21	-21

* delší časový odstup mezi odběry z důvodu nemoci, ** zvýšení hodnoty protilátek po prodělání COVID-19 (nezapočítáváno do průměru), *** zvýšení hodnoty protilátek po očkování (nezapočítáváno do průměru)

Ptl. Protilátky

Zdroj: autor

Tabulka č.7 Časový odstup mezi odběry

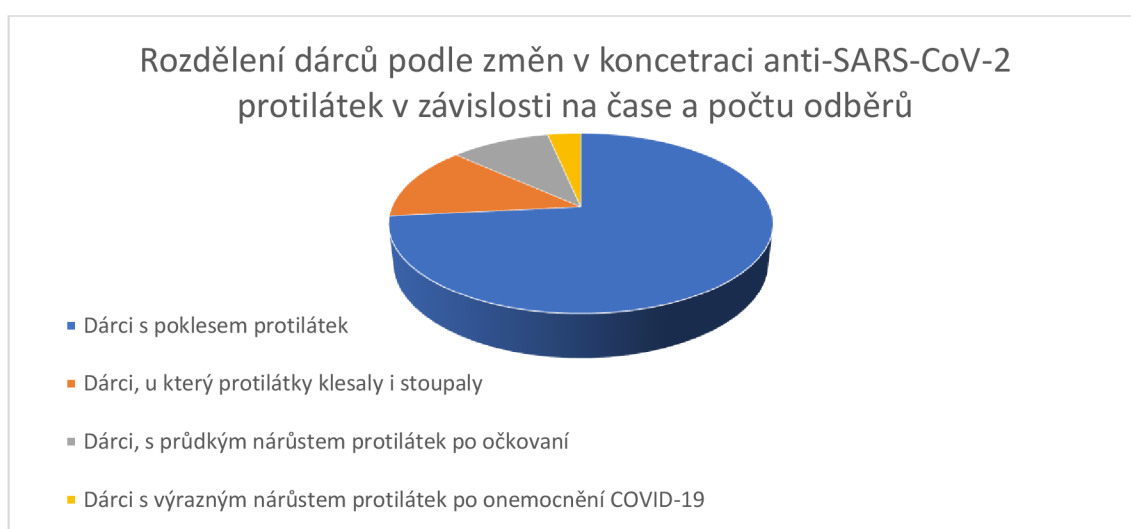
Průměrný časový odstup mezi odběry	22 dní
Min. časový odstup mezi odběry	12 dní
Max. časový odstup mezi odběry	78 dní

Zdroj: autor

Tabulka č.8 Rozdělení dárců podle zvýšení/snížení protilátek anti-SARS-CoV-2 protilátek v závislosti na čase a počtu odběrů

Dárci s opakovanými odběry	Rozdělení dárců podle zvýšení/snížení protilátek počet	Rozdělení dárců podle zvýšení/snížení protilátek (%)
Dárci s poklesem protilátek	22	73
Dárci, u kterých protilátky klesaly i stoupaly	4	13
Dárci s prudkým nárůstem protilátek po očkování	3	10
Dárci s výrazným nárůstem protilátek po onemocnění COVID-19	1	3

Zdroj: autor



Obrázek č.12: Graf – rozdělení dárců podle změn v koncentraci anti-SARS-CoV-2 protilátek v závislosti na čase a počtu odběrů, (Zdroj: autor)

Tabulka č.9 Pokles protilátek anti-SARS-CoV-2 (u odběrů, kde došlo k poklesu)

Průměrná hodnota poklesu protilátek	-20 % AU/ml
Min. hodnota poklesu protilátek	-0,1 % AU/ml
Max. hodnota poklesu protilátek	-50 % AU/ml

Zdroj: autor

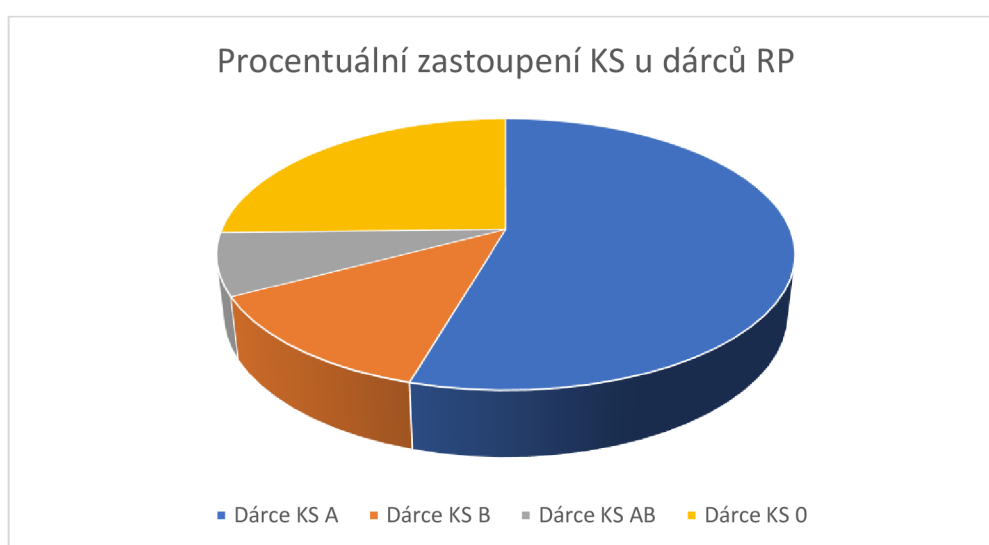
7.2. Výsledky vyšetření krevní skupiny u dárců RP

V první polovině roku 2021 na TRS NEMCB darovalo rekonvalescentní plazmu anti-SARS-CoV-2 189 dárců. Pomocí aferézy bylo odebráno 149 dárců a plnou krev k výrobě rekonvalescentní plazmy darovalo 40 dárců (viz přílohy č.3 a č.4).

Tabulka č.10 Procentuální zastoupení KS u dárců RP za období první poloviny roku 2021

KS	Počet dárců RP celkem	KS u dárců RP (%)	KS v ČR (%)
A	103	54	40–44 (cca 42)
B	24	13	15–18 (cca 18)
AB	14	7	8–9 (cca 8)
0	48	25	30–34 (cca 32)

Zdroj: autor

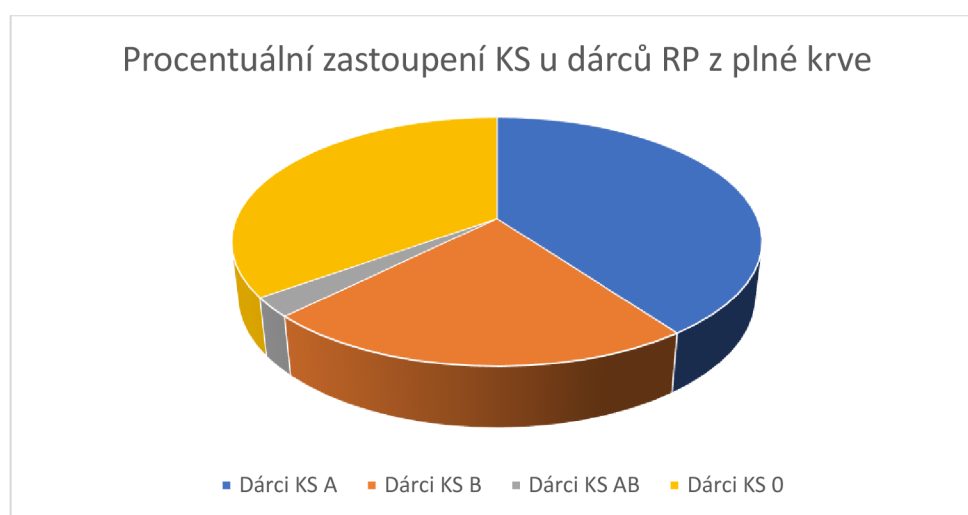


Obrázek č.13: Procentuální zastoupení KS u dárců RP, (zdroj: autor)

Tabulka č.11 Procentuální zastoupení KS u dárců RP z plné krve (za sledované období každý dárce RP z plné krve daroval 1x)

Krevní skupina	Počet dárců RP z plné krve	KS u dárců RP z plné krve (%)	KS v ČR (%)
A	16	40,0	40–44 (cca 42)
B	9	22,5	15–18 (cca 18)
AB	1	2,5	8–9 (cca 8)
0	14	35,0	30–34 (cca 32)

Zdroj: autor



Obrázek č.14: Procentuální zastoupení KS u dárců RP z plné krve, (zdroj: autor)

Tabulka č.12 Procentuální zastoupení KS odběrů RP z aferézy (dárci darovali 1-8 odběrů)

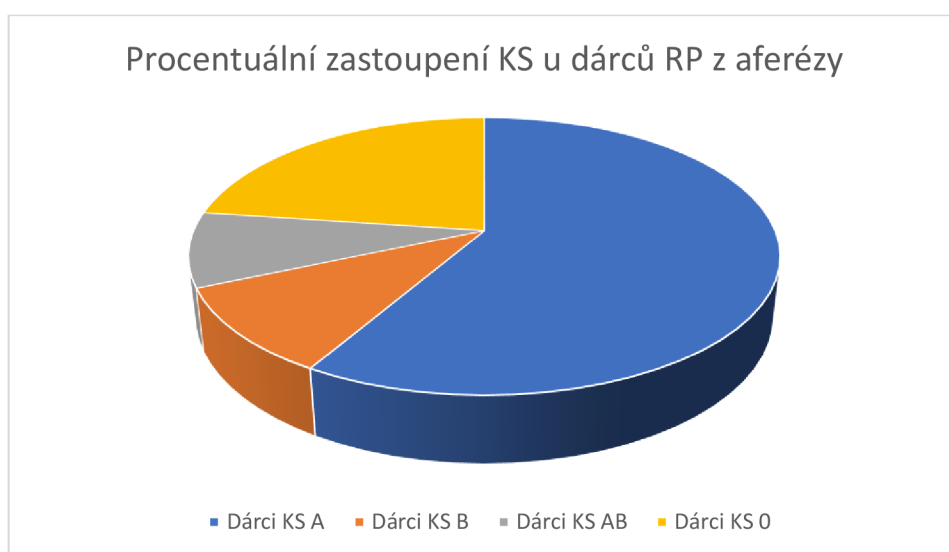
Krevní skupina	Počet odběrů RP z aferézy	KS u odběrů RP z aferézy (%)
A	169	57,7
B	19	6,3
AB	20	7,0
0	85	29,0

Zdroj: autor

Tabulka č. 13 Procentuální zastoupení KS u dárců RP z aferézy

Krevní skupina	Počet dárců RP z aferézy	KS u dárců RP z aferézy (%)	KS v ČR (%)
A	87	58,0	40–44 (cca 42)
B	15	10,0	15–18 (cca 18)
AB	13	9,0	8–9 (cca 8)
0	34	23,0	30–34 (cca 32)

Zdroj: autor



Obrázek č.15: Procentuální zastoupení KS u dárců RP z aferézy, zdroj: autor

Tabulka č.14 Procentuální zastoupení KS u různých skupin dárců RP a v ČR

KS	KS u dárců RP z plné krve (%)	KS u dárců RP aferézy (%)	KS u dárců RP celkem (%)	KS v ČR (%)
A	40	58	54	40–44 (cca 42)
B	22,5	10	13	15–18 (cca 18)
AB	2,5	9	7	8–9 (cca 8)
0	35	23	25	30–34 (cca 32)

Zdroj: autor

8. Diskuze

V době pandemie COVID-19 transfuzní oddělení musela rychle zareagovat na požadavky klinických pracovišť zavedením rekonvalescentní plazmy od dárců, kteří prodělali onemocnění COVID-19 a vytvořili si protilátky anti-SARS-CoV-2 v dostatečném titru. Účinnost terapie rekonvalescentní plazmou závisela zejména na množství specifických virus neutralizujících protilátek anti-SARS-CoV-2 obsažených v rekonvalescentní plazmě a včasnosti jejího podání. Úskalím situace bylo vyšetření protilátek anti-SARS-CoV-2 vyhovujícím testem a odběr vhodných dárců po onemocnění v době s maximálním titrem protilátek

Dárci RP anti-SARS-CoV-2 museli splňovat obecná kritéria pro odběr krve a krevních složek a vyhovět povinným vyšetřením jako při běžných odběrech. Navíc se u dárců zjišťovali potřebné protilátky. Nejvhodnějším testem pro vyšetření protilátek anti-SARS-Co-2 byl doporučen virus neutralizační test, který není možné provádět v laboratořích transfuzního oddělení. Po stanovení korelace s VNT se mohly protilátky anti-SARS-Co-2 začít vyšetřovat serologicky, což už pro transfuzní oddělení nebyl problém. Dále RP nemohla procházet karanténou, na to nebyl čas, proto se u ní prováděla patogen inaktivace. Výběr dárců byl navíc ztížen požadavkem pro snížení rizika akutního poškození plic způsobeného transfuzí (TRALI). Dárce mohly být pouze osoby, které neměly v anamnéze možnou HLA aloimunizaci, a to na muže bez krevní transfuze v anamnéze a ženy bez těhotenství a krevní transfuze v anamnéze. U každého dárce RP byla vyšetřena krevní skupina a byl proveden screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek. Vzhledem k tomu, že odběry RP se prováděly u dárců bez proběhlé imunizace transfuzí nebo těhotenstvím, všichni měly screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek negativní.

Dárce rekonvalescentní plazmy bylo možné odebrat nejdříve 14 po uzdravení nebo po ukončení izolace. Tvorba protilátek začíná zpravidla kolem 2 týdnů od začátku onemocnění a dosahuje maxima kolem 4.-10. týdne, pak následuje pokles. Právě období s vysokými titry protilátek je optimální pro odběr rekonvalescentní plazmy. Dárce bylo možné odebírat opakovaně, počet odběrů byl, ale limitován postupně klesajícím titrem protilátek. Na opakované odběry byli zváni jen dárce s vyhovující hodnotou protilátek, nebyli již zváni dárce s hraniční hodnotou protilátek, protože se předpokládalo, že následná hodnota nebude vyhovující. Většina dárců absolvovala jeden odběr (69 %), dva a více odběrů absolvovalo 31 %.

Potvrzením první hypotézy mé práce jsem se snažila dokázat, že k tomuto postupnému snižování protilátek opravdu dochází. U 30 dárců, kteří v období první poloviny roku 2021 darovali aferetickou rekonvalescentní plazmu nejméně třikrát, jsem se snažila zachytit změnu koncentrace protilátek anti-SARS-CoV-2 v závislosti na čase a počtu odběrů. U 73 % dárců s opakovaným odběrem došlo jen poklesům protilátek mezi jednotlivými odběry. U 13 % dárců docházelo ke střídavým mírným nárůstům a poklesům protilátek. Dárci s prudkým nárůstem protilátek po očkování tvořili 10%. U 3 % dárců došlo výraznému nárůstu protilátek po opětovném prodělání onemocnění COVID-19.

Prudká kladná navýšení koncentrace protilátek, která můžeme vidět na obrázku č. 10, jsou způsobena vakcinací nebo opětovným proděláním onemocnění COVID-19. Dárci s některým odběrem s lehkým navýšením protilátek byly naboostrováni prostředím (v rodině, v zaměstnání). Průměrný časový rozestup mezi jednotlivými odběry byl 22 dní (od 12 do 78 dní). Průměrné snížení protilátek (tam, kde došlo ke snížení) mezi 2 odběry bylo 20 % (od 0,1 do 50 %). Postupným snižováním protilátek anti-SARS-CoV-2 a jejich rychlostí snižování se zabývají i jiné práce viz. Wang et al, 2021; Krátká et al., 2021 a Fejt et al., 2020. Tyto práce se zabývají poklesem protilátek, jak získaných onemocněním COVID-19, tak i poklesem protilátek po očkování. Práce, které zpracovávají poznatky o protilátkách získaných po prodělání nemoci (Wang et al, 2021, Krátká et al. 2021), zachycují pomalejší pokles než práce, které zpracovávají data o protilátkách získaných očkováním (Fejt et al., 2020).

Druhá hypotéza se zabývala frekvencí krevních skupin u dárců rekonvalescentní plazmy, zda odpovídá frekvenci výskytu krevních skupin v populaci. V první polovině roku 2021 na TRS NEMCB darovalo rekonvalescentní plazmu anti-SARS-CoV-2 189 dárců. Pomocí aferézy bylo odebráno 149 dárců a plnou krev k výrobě rekonvalescentní plazmy darovalo 40 dárců. V tabulce č.14 zachycuji porovnání procentuálního zastoupení KS u všech dárců RP, u dárců RP z plné krve a u dárců RP z aferézy s procentuálním zastoupením KS v České republice.

U každé skupiny dárců, tak i v populaci ČR, převažuje skupina A. U dárců RP z aferézy převažuje skupina A velmi výrazně, oproti populaci ČR o cca 16 %. Jedná se o nejpočetnější skupinu, proto se našlo nejvíce dárců vhodných pro aferetický odběr. Nejmenší zastoupení má u všech skupin skupina AB. U této skupiny dochází také k výraznému rozdílu mezi procentuálním zastoupením KS AB u dárců RP z plné krve

a dárců RP z aferézy. Tento rozdíl byl způsoben snahou transfuzního oddělení získat co nejvíce přípravků se skupinou AB odebraných pomocí aferézy. Aferézou se získaly 3 TU RP, z plné krve pouze 1 TU. Od skupiny AB je potřeba pro transfuzi hlavně plazma, méně erytrocyty. Skupina AB je univerzální dárce při darování plazmy a může být podána příjemci každé skupiny ABO systému. Další odchylky u procentuálního zastoupení jednotlivých krevních skupin mohou být způsobeny malým souborem dárců RP k poměru počtu obyvatel České republiky.

9. Závěr

V době pandemie byl na transfuzní oddělení vyvinut ohromný tlak na zajištění dostatečného počtu jednotek RP všech krevních skupin. Transfuzní oddělení si musela rychle poradit s problematikou vyšetření protilátek anti-SARS-CoV-2 a výběrem vhodných dárců.

Obě hypotézy mé bakalářské práce by se daly označit za správné. Množství protilátek anti-SARS-CoV-2 se s postupem času a počtem odběrů snižuje. Tato hypotéza by zcela platila, pokud by nedocházelo ke zvyšování protilátek ať uměle pomocí očkování nebo přirozenou cestou opětovným proděláním nemoci COVID-19 nebo posilujícím působením prostředí („booster“). Za sledované období jsem vyhodnotila protilátky anti-SARS-Co-2 u 30 dárců, kteří darovali RP nejméně 3x, z toho u 22 dárců (tj. 73 %) s každým odběrem docházelo ke snížení množství protilátek.

Zastoupení krevních skupin u dárců RP anti-SARS-CoV-2 zhruba odpovídá zastoupení krevních skupin v populaci obyvatel České republiky. V první polovině roku 2021 na TRS NEMCB darovalo RP celkem 189 dárců, 40 z plné krve a 149 z aferézy. Skupina A je nejpočetnější skupinou v populaci ČR, proto se našlo nejvíce dárců vhodných pro odběr RP z plné krve i aferézy právě u této skupiny. U nejslabší skupiny AB více dárců darovalo RP aferézou než z plné krve. K tomu došlo kvůli významnosti skupiny AB pro odběr plazmy. AB skupina je „univerzálním“ dárcem plazmy. Dárci krevní skupiny 0 a B mají vyšší % zastoupení u dárců z plné krve než z aferézy.

10. Seznam literatury

1) *An EU programme of COVID-19 convalescent plasma collection and transfusion*, 2020, version 1.0. [online]. Competent Authorities for Substance of Human Origin Expert Group (CASoHO E01718) European Commission. [cit.2020-4-4]. Dostupné z: <https://health.ec.europa.eu/>

2) BALÍK, M., BOHONĚK, M., et al., 2020. Doporučený postup pro použití rekonvalescentní plazmy v léčbě dospělých pacientů s COVID-19. *ČLS JEP (STL)* Verze: 1, finální edice: 30.4.2020. Dostupné z: <https://www.transfuznispolecnost.cz/>

3) BALÍK, M., BOHONĚK, M., et al., 2020. Doporučený postup pro použití rekonvalescentní plazmy v léčbě dospělých pacientů s COVID-19. *ČLS JEP (STL)* Verze: 2, finální edice: 13.10.2020. Dostupné z: <https://www.transfuznispolecnost.cz/>

4) BOHONĚK, M., ČERNÝ, V., et al., 2020. Doporučený postup pro použití rekonvalescentní plazmy v léčbě dospělých pacientů s COVID-19 hospitalizovaných na pracovištích intermediární a intenzivní péče. *ČASRIM ČLS JEP* Verze: 1/05-04-20. Dostupné z: <https://www.transfuznispolecnost.cz/>

5) BOHONĚK, M., ČERNÝ, V., et al., 2021. Mezioborové stanovisko k podání rekonvalescentní plazmy u pacientů s COVID-19. *ČASRIM ČLS JEP* evidenční číslo: 18/2021. www.CSARIM.cz

6) BOHONĚK, M., ŘEZÁČ, D., HOLUB, M., 2020. Výroba a použití rekonvalescentní plazmy pro léčbu COVID-19 s přihlédnutím ke zkušenostem v ÚVN Praha. *Časopis lékařů českých* 2020; 159: 175-180. ISSN 1805-4420.

7) Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2015_12, verze 3 (2022_05_01), *Doporučené postupy pro podání transfuzních přípravků*. [online]. [cit.2023-04-20]. Dostupné z: <https://www.transfuznispolecnost.cz/doporucene-postupy>

- 8) Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2012_09 ze dne 19. 04. 2012, *Imunohematologická vyšetření dárců krve a krevních složek*. [online]. [cit.2023-04-20]. Dostupné z: <https://www.transfuznispolecnost.cz/doporucene-postupy>
- 9) Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2007_03, verze 10 (2022_07_28), *Posuzování způsobilosti k dárcovství krve a krevních složek* [online]. [cit.2023-04-20]. Dostupné z: <https://www.transfuznispolecnost.cz/doporucene-postupy>
- 10) Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2015_11 ze dne 2. 11. 2015 verze 1, *Skladování a přeprava krve, krevních složek, suroviny pro další výrobu a transfuzních přípravků*. [online]. [cit.2023-04-20]. Dostupné z: <https://www.transfuznispolecnost.cz/doporucene-postupy>
- 11) Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2022_16, verze 1 (2022_06_01), *Transfuze – AB0 systém a antigen D*. [online]. [cit.2023-04-20]. Dostupné z: <https://www.transfuznispolecnost.cz/doporucene-postupy>
- 12) Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2009_05 ze dne 15. 5. 2009 verze 2 (2012_01), *Vyšetřování známek infekce u dárců krve a krevních složek*. [online]. [cit.2023-04-20]. Dostupné z: <https://www.transfuznispolecnost.cz/doporucene-postupy>
- 13) Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL_07, verze 4 (2019_09), *Základní imunohematologická laboratorní vyšetření červené řady – obecné zásady a technické postupy*. [online]. [cit.2023-04-20]. Dostupné z: <https://www.transfuznispolecnost.cz/doporucene-postupy>
- 14) ENTROVÁ, A., AZEEM, K., 2022. Jak anti-SARS-CoV-2 IgG a IgM predikují titr virus neutralizačních protilátek u dárců rekonvalescentní plazmy proti onemocnění COVID-19? *Transfuze Hematologie Dnes* 2022; 28(4): 203–210. ISSN 1805-4587.

- 15) FEJT, V., KRÁTKÁ, Z., 2020. Stáří není nemoc: Vývoj hladiny ochranných protilátek proti koronaviru SARS-CoV-2 u seniorů z Domova Břevnice. *Časopis lékařů českých* 2020; 159: 303-311. ISSN 1805-4420.
- 16) CHEN, Y., LIU, Q., GUO, F., 2020. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of Medical Virology* 2020; 92(10): 2249. ISSN:1096-9071.
- 17) CHEN, B., TIAN, E-K., et al., 2020. Overview of lethal human coronaviruses. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2020; 5:89. ISSN 2059-3635.
- 18) JOYNER, M. J., SENEFFELD, J.W., et al., 2020. Effect of Convalescent Plasma on Mortality among Hospitalized Patients with COVID-19: Initial Three-Month Experience. *MedRxiv* 2020; 2020.08.12.20169359.
- 19) KOMENDA M., PANOŠKA P., et al., *COVID-19: Přehled aktuální situace v ČR. Onemocnění aktuálně* [online]. Praha: Ministerstvo zdravotnictví ČR, 2020 [cit. 06.04.2023]. Dostupné z: <https://onemocneni-aktualne.mzcr.cz/covid-19>. Vývoj: společné pracoviště ÚZIS ČR a IBA LF MU. ISSN 2694-9423.
- 20) KABÍČKOVÁ, H., CHMEL, M., et al., 2020. Zkušenosti se zavedením a využitím virus-neutralizačního testu SARS-CoV-2, Souhrn abstraktů, *Transfuze a hematologie dnes* 26; Suplementum 1; 2020; str. 22. ISSN 1805-4587
- 21) KRÁTKÁ, Z., FEJT, V., et al., 2021. Protilátky po prodělaném onemocnění COVID-19 poskytují dostatečnou a dlouhodobou ochranu před reinfekcí. *Časopis Lékařů českých* 2021; 160: 167–175. ISSN 1805-4420.
- 22) PENKA, M., TESAŘOVÁ, E. et al., 2011. *Hematologie a transfuzní lékařství I*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3459-0.

- 23) PENKA, M., TESAŘOVÁ, E., et al., 2012. *Hematologie a transfúzní lékařství II*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3460-6.
- 24) ŘEHÁČEK, V., MASOPUST, J. et al, 2013. *Transfúzní lékařství*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4534-3.
- 25) Řízená dokumentace Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice a.s., NCB_TRS_SOP_13_210_A, *Obsluha analyzátorů ARCHITECT i2000 SR a i1000 SR*
- 26) Řízená dokumentace Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice a.s., NCB_TRS_SOP_20_211_B, *Vyšetření anti-SARS-CoV-2 II Quant*
- 27) Řízená dokumentace Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice a.s., NCB_TRS_SOP_21_216_A *Vyšetření nepravidelných antierytrocytárních protilátek u dárců krve na analyzátoru NEO Iris*
- 28) Řízená dokumentace Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice a.s., NCB_TRS_SOP_21_213_A *Vyšetření AB0 RhD a krevních podskupin u dárců krve na analyzátoru NEO Iris*
- 29) Řízená dokumentace Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice a.s., *NEO Iris Uživatelský manuál*, NEO Iris_EU-001-102
- 30) Specifikace transfuzních přípravků pro klinické účely. Transfuzní oddělení Nemocnice České Budějovice, a.s., *Plazma z aferézy čerstvá zmrazená pro klinické použití*. NCB_TRS_F_578_C
- 31) Specifikace transfuzních přípravků pro klinické účely. Transfuzní oddělení Nemocnice České Budějovice, a.s., *Plazma z aferézy reconvalescentní anti-sars-cov-2 patogen inaktivovaná*. NCB_TRS_F_578_C

32) Specifikace transfuzních přípravků pro klinické účely. Transfuzní oddělení Nemocnice České Budějovice, a.s., *Plazma z plné krve rekonvalescentní anti-sars-cov-2 patogen inaktivovaná*. NCB_TRS_F_578_C

33) TROJÁNEK, M., GREBENYUK, V., et al., 2020. Nový koronavirus (SARS-CoV-2) a onemocnění COVID-19. *Časopis lékařů českých*. 2/2020, 159: 55-66. ISSN 1805-4420.

34) Vyhláška č. 143/2008 Sb., Vyhláška o lidské krvi ve znění pozdějších předpisů. O stanovení bližších požadavků pro zajištění jakosti a bezpečnosti lidské krve a jejich složek (vyhláška o lidské krvi), 2008. [online] *Ministerstvo zdravotnictví podle § 114 odst. 1 zákona č. 378/2007 Sb., o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů (zákon o léčivech)*, [cit. 06.04.2023] dostupné z: <https://www.mzcr.cz/>

35) WANG, Z., MUECKSCH, F., et al., 2021. Naturally enhanced neutralizing breadth against SARS-CoV-2 one year after infection. *Nature* volume 595, pages 426–431 (2021). ISSN 1476-4687.

36) XIA, X., LI, K., et al., 2020. Improved clinical symptoms and mortality among patients with severe or critical COVID-19 after convalescent plasma transfusion. *Blood* 2020; 136:755-759. ISSN1528-0020.

37) ZHAO, J., YUAN, Q., et al., 2020. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019. *Clinical Infectious Diseases* 2020;71(16): 2027–34. ISSN 1537-6591.

11. Seznam tabulek a obrázků

11.1. Tabulky

Tabulka č.1 Rozmezí hodnot anti-SARS-CoV-2 IgG kontrol

Tabulka č.2 Vyhodnocení a interpretace výsledků

Tabulka č.3 Krevní skupiny AB0

Tabulka č.4 Procentuální zastoupení KS v ČR dle UHKT

Tabulka č.5 Změny koncentrace protilátek anti-SARS-CoV-2 v závislosti na čase a počtu odběrů

Tabulka č.6 Průměrné hodnoty časových rozestupů a procentuálních změn hodnot protilátek mezi jednotlivými odběry

Tabulka č.7 Časový odstup mezi odběry

Tabulka č.8 Rozdělení dárců podle zvýšení/snížení protilátek anti-SARS-CoV-2 protilátek v závislosti na čase a počtu odběrů

Tabulka č.9 Pokles protilátek anti-SARS-CoV-2

Tabulka č.10 Procentuální zastoupení KS u dárců RP za období první poloviny roku 2021

Tabulka č.11 Procentuální zastoupení KS u dárců RP z plné krve

Tabulka č.12 Procentuální zastoupení KS odběrů RP z aferézy

Tabulka č.13 Procentuální zastoupení KS u dárců RP z aferézy

Tabulka č.14 Procentuální zastoupení KS u různých skupin dárců RP a v ČR

11.2. Obrázky

Obrázek č.1: Infografika COVID-19

Obrázek č.2: Vir SARS-CoV-2

Obrázek č.3: Plazmaferéza

Obrázek č.4: Analyzátor NEO Iris

Obrázek č.5: Analyzátor Architect i2000 SR

Obrázek č.6: Vkládací věž na mikrodestičky

Obrázek č.7: Aglutinace, monitor analyzátoru NEO Iris

Obrázek č.8: AB0 KS, Antigeny a Aglutininy

Obrázek č.9: Možnosti transfuze plazmy

Obrázek č.10: Graf – procentuální zastoupení KS v ČR

Obrázek č.11: Graf – změny koncentrace protilátek anti-SARS-CoV-2

Obrázek č.12: Graf – rozdělení dárců podle změn v koncentraci anti-SARS-CoV-2 protilátek v závislosti na čase a počtu odběrů

Obrázek č.13: Procentuální zastoupení KS u dárců RP

Obrázek č.14: Procentuální zastoupení KS u dárců RP z plné krve

Obrázek č.15: Procentuální zastoupení KS u dárců RP z aferézy

12. Seznam zkratek

2019-nCoV	novel coronavirus, dřívější název pro vir SARS-CoV-2
AB0 systém	základní rozdělení krevních skupin – A, B, AB a 0
ACE2	enzym konvertující angiotenzin 2, exopeptidáza (Angiotensin Converting Enzyme 2)
anti-A a anti-B	protilátky proti krevním skupinám A a B
anti-D	protilátka proti antigenu D (RH1)
anti-HCV	protilátka proti viru hepatitidy C (HCV)
anti-HIV-1	protilátka proti HIV-1 viru
anti-HIV-2	protilátka proti HIV-2 viru
anti-HLA/HPA/HNA	protilátky proti komplexům HLA/HPA/HNA
anti-SARS-CoV-2	protilátka proti SARS-CoV-2 viru
ARC	Architect i2000 SR
ARDS	syndrom akutní dechové tísně (Acute Respiratory Distress Syndrome)
Architect i2000	imunochemický analyzátor pracující na principu chemiluminiscence
BMI	Body mass index, index tělesné hmotnosti
BSL-3/ BSL-4	laboratoře s vysokým stupněm zabezpečení
CAL A	kalibrátor A
CAL B – CAL F	kalibrátor B-F
CD4+	pomocné Th lymfocyty
CD8+	cytotoxické Tc lymfocyty
CLIA	chemiluminescence immunoassay, imunologická metoda

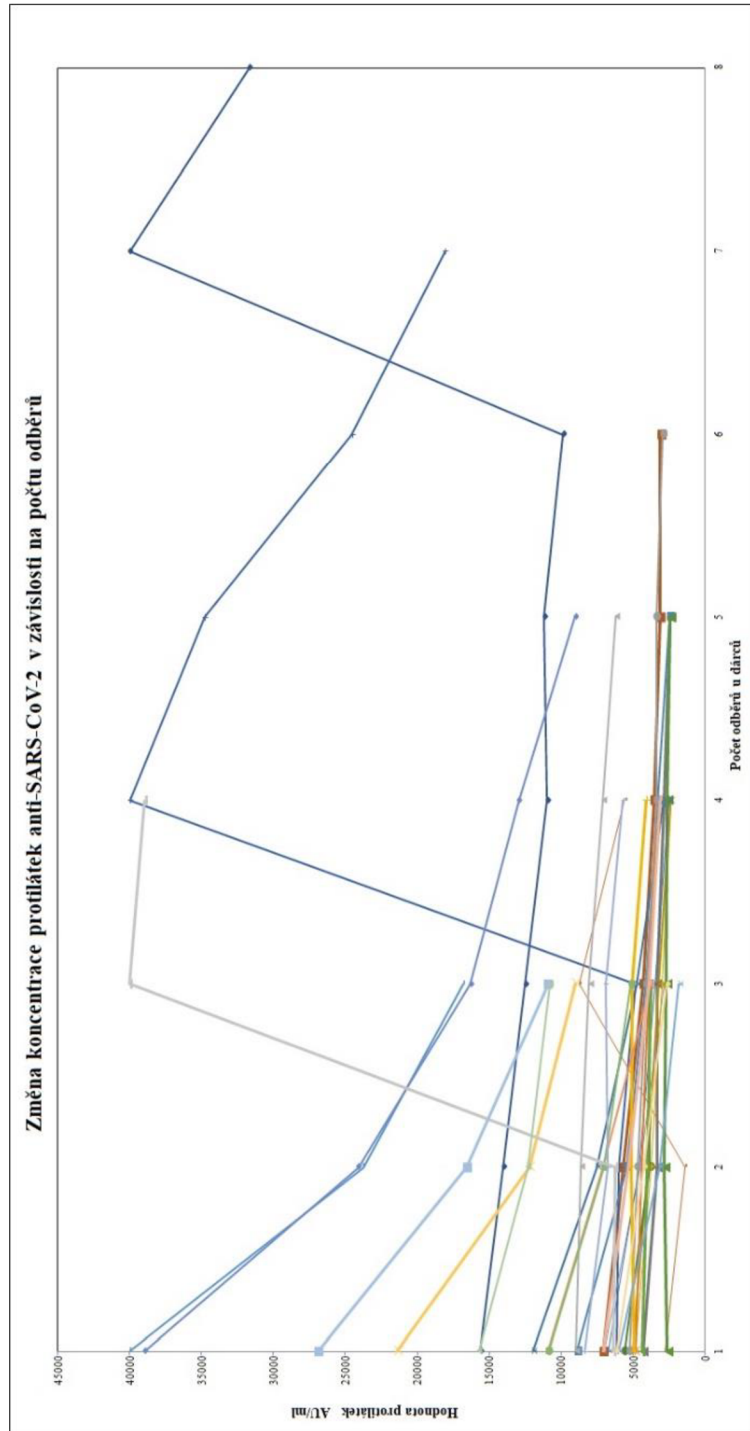
CMIA	chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročásticích)
CMV	cytomegalovirus
CNS	centrální nervová soustava
COVID-19	onemocnění vyvolané virem SARS-CoV-2
CRP	C reaktivní protein
CT	výpočetní tomografie
D-dimer	fragment proteinu, který vzniká, když enzym plazmin odbourává fibrinovou sraženinu
E	obalový protein (envelope) viru SARS-CoV-2
EDTA	organická sloučenina kyselina ethylendiamintetraoctová
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, imunologická metoda
H1N1	chřipkový virus A/H1N1, podtyp viru chřipky A
HBsAg	povrchový antigen HBV (Hepatitis B) viru
HBV/ HCV	hepatitida B a C
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti (Human Immunodeficiency Virus)
HIV Ag p24	HIV-1 antigen p24
HLA	hlavním histokompatibilním systémem u lidí, komplex HLA (Human Leucocyte Antigen)
HTLV I a II	lidský T-lymfotropní virus–typu 1 a 2
ICTV	mezinárodní výbor pro klasifikaci virů (International Committee on Taxonomy of Viruses)
ID vzorku	informace o pacientu/vzorku (rodné číslo, jméno, datum,..)
IgG	imunoglobulin třídy G

IgM	imunoglobulin třídy M
KS	krvní skupina
KS ABO	krvní skupiny A, B, AB, 0
LDH	laktátdehydrogenáza, buněčný enzym, který se vyskytuje v cytoplazmě všech buněk
LIS	laboratorní informační systém
M	transmembránový glykoprotein (membrane) viru SARS-CoV-2
MERS	Middle East respiratory syndrome, jedna z forem koronavirů
MZ ČR	Ministerstvo zdravotnictví České republiky
N	vnitřní fosforylovaný nukleokapsidový protein (nucleocapsid) viru SARS-CoV-2
NAT	nepřímý antiglobulinový test
NEO Iris	imunohematologický analyzátor pracující s metodou přímé aglutinace na mikrodestičkách a se systémem pevné fáze
NK	nukleová kyselina
PC	počítač
PCR test	PCR je molekulární test, který určuje genetický materiál (RNA) viru (pomocí polymerázové řetězové reakce)
ProClin 300	roztok 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one
ProClin 950	roztok 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one
RBD	doména podjednotky S1(S proteinu viru SARS-CoV-2)
RhD	Rh faktor, erytrocytární Rh antigen, antigen D
RLU	relativních světelných jednotkách (Relative Light Units)

RNA	ribonukleová kyselina
Rozmezí S/CO	rozmezí signal-to-cut-off ratio (cutoff – přerušit, zastavit)
RP	rekonvalescentní plazma
RP anti-SARS-CoV-2	rekonvalescentní plazma anti-SARS-CoV-2
S spike	povrchový strukturální protein viru SARS-CoV-2
S1 a S2	podjednotky S proteinu viru SARS-CoV-2
SARS	těžký akutní respirační syndrom (Severe Acute Respiratory Syndrome)
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
SW	Software
TP	Treponema pallidum, původce syfilis
TRALI	akutní poškození plic způsobené transfuzí (transfusion - related acute lung injury)
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan, pufr
TRS NEMCB	laboratoře transfuzní oddělení nemocnice České Budějovice
TU	transfuzní jednotka
UHKT	Ústav hematologie a krevní transfuze
UV záření	ultrafialové záření
varianta DVI	varianta antigenu D
VNT	virus neutralizační test
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

13. Přílohy

Příloha č.1 Graf – změny koncentrace protilátek anti-SARS-CoV-2, (Zdroj: autor)



Příloha č.2: Tabulka s 30 dárci s opakovanými odběry RP

Poř. číslo	KS	1. odběr		2. odběr		3. odběr		4. odběr	
		datum odběru	Plt (AU/ml)	datum odběru	plt (AU/ml)	datum odběru	plt (AU/ml)	datum odběru	plt (AU/ml)
1.	A	12.01.21	15648	03.02.21	14026	17.02.21	12505	05.03.21	10958
2.	A	15.01.21	7092	01.02.21	5696	23.02.21	4293	18.03.21	3530
3.	0	21.01.21	4290	11.02.21	3329	02.03.21	3325	17.03.21	2861
4.	A	26.01.21	4995	16.02.21	3960	04.03.21	3224	31.03.21	2374
5.	A	28.01.21	11947	15.02.21	7526	05.03.21	4751	26.03.21	2868
6.	A	31.01.21	5564	19.04.21	3825	10.05.21	3941	31.05.21	3173
7.	A	01.02.21	6117	19.02.21	6007	08.03.21	4792	20.04.21	> 40000
8.	A	02.02.21	2737	24.02.21	1367	04.05.21	8721	24.05.21	5576
9.	A	05.02.21	6968	22.02.21	4527	26.03.21	2828		
10.	0	11.02.21	4834	02.03.21	3705	18.03.21	2943	07.04.21	2382
11.	A	15.02.21	8872	04.03.21	5431	19.03.21	4097	08.04.21	3250
12.	A	16.02.21	2622	05.03.21	2818	24.03.21	2680	08.04.21	2602
13.	B	18.02.21	6716	09.03.21	4594	24.03.21	3448	13.04.21	2490
14.	A	18.02.21	4833	08.03.21	4416	23.03.21	3890	23.03.21	3383
15.	A	23.02.21	5227	11.03.21	4691	01.04.21	4080	22.04.21	3385
16.	A	24.02.21	4921	12.04.21	5147	27.04.21	5075	28.05.21	4095
17.	0	24.02.21	> 40000	11.03.21	23776	31.03.21	16801		
18.	0	26.02.21	4328	15.03.21	4032	29.03.21	3749		
19.	0	08.03.21	38956	23.03.21	24126	12.04.21	16299	26.04.21	12954
20.	A	18.03.21	10923	01.04.21	7071	23.04.21	3797		
21.	A	19.03.21	8953	06.04.21	8609	29.04.21	8040	27.05.21	7100
22.	A	19.03.21	21413	06.04.21	12216	22.04.21	9024		
23.	0	24.03.21	5979	14.04.21	3150	06.05.21	1799		
24.	0	06.04.21	10875	21.04.21	7020	13.05.21	5175		
25.	A	12.04.21	8379	27.04.21	6776	25.05.21	6898	09.06.21	5683
26.	A	15.04.21	7079	29.04.21	5352	18.05.21	3878	04.06.21	3105
27.	0	19.04.21	6365	07.04.21	6202	28.05.21	> 40000	18.06.21	38965
28.	AB	27.04.21	6156	26.05.21	4251	15.06.21	2645		
29.	0	03.05.21	26896	26.05.21	16541	15.06.21	10911		
30.	0	11.05.21	15690	01.06.21	12303	22.06.21	10760		

Zdroj: autor

Pokračování přílohy č.2

Poř. číslo	KS	5. odběr		6. odběr		7. odběr		8. odběr	
		datum odběru	plt (AU/ml)	datum odběru	plt (AU/ml)	datum odběru	plt (AU/ml)	datum odběru	plt (AU/ml)
1.	A	25.03.21	11209	13.05.21	9865	02.06.21	> 40000	23.06.21	31683
2.	A	13.04.21	3115	28.04.21	3096				
3.	0	08.04.21	2418						
4.	A								
5.	A								
6.	A								
7.	A	13.05.21	34781	02.06.21	24546	30.06.21	18050		
8.	A								
9.	A								
10.	0								
11.	A	26.04.21	2449						
12.	A	26.04.21	2396						
13.	B								
14.	A								
15.	A	04.05.21	3370	18.05.21	2937				
16.	A								
17.	0								
18.	0								
19.	0	27.05.21	9049						
20.	A								
21.	A	17.06.21	6187						
22.	A								
23.	0								
24.	0								
25.	A								
26.	A								
27.	0								
28.	AB								
29.	0								
30.	0								

Zdroj: autor

Příloha č.3: Tabulka odběrů dárců PR z plné krve

Pořadové číslo	Datum odběru	Krevní skupina	Koncentrace protilátek AU/ml
1	06.01.2021	A1+	607
2	07.01.2021	0+	2609
3	11.01.2021	0+	408
4	13.01.2021	B+	13359
5	18.01.2021	0-	1799
6	19.01.2021	0+	5377
7	20.01.2021	B+	3037
8	27.01.2021	B+	3580
9	26.02.2021	0-	4011
10	26.02.2021	B+	3422
11	08.03.2021	0+	11054
12	10.03.2021	A2+	4077
13	10.03.2021	0+	34394
14	17.03.2021	A2+	2542
15	17.03.2021	A1+	> 40000
16	17.03.2021	B+	6491
17	23.03.2021	0-	24175
18	23.03.2021	A1+	3225
19	26.03.2021	B+	4757
20	26.03.2021	A1+	3234
21	29.03.2021	A1+	> 40000
22	01.04.2021	A1-	3761
23	07.04.2021	A1B+	6911
24	07.04.2021	A1+	2548
25	09.04.2021	0+	21072
26	09.04.2021	0+	23073
27	15.04.2021	A1+	2577
28	15.04.2021	0+	5966
29	16.04.2021	0+	16901
30	20.04.2021	0-	6728
31	21.04.2021	0+	5478
32	26.04.2021	A2+	3964
33	26.04.2021	A1+	2205
34	26.04.2021	A1+	5973
35	27.04.2021	B+	> 40000
36	27.04.2021	A1+	3986
37	04.05.2021	B-	> 40000
38	04.05.2021	A1+	16775
39	06.05.2021	A1+	> 40000
40	07.06.2021	B-	21015

Zdroj: autor

Příloha č. 4. Tabulka odběrů dárců PR z aferézy

Poř. číslo	Datum odběru	Krevní skupina	Koncentrace protilátek AU/ml
1	5.1.2021	A	5623
2	5.1.2021	A	7328
3	5.1.2021	A	3241
4	6.1.2021	AB	1094
6	6.1.2021	AB	2855
7	7.1.2021	A	6891
8	7.1.2021	B	1254
9	7.1.2021	A	4640
10	8.1.2021	0	2359
11	8.1.2021	0	735
12	8.1.2021	A	1623
13	8.1.2021	A	2923
14	8.1.2021	0	2584
15	11.1.2021	A	7203
16	11.1.2021	0	5946
17	11.1.2021	A	1074
18	11.1.2021	A	6120
19	12.1.2021	A	15648
20	12.1.2021	0	2810
21	12.1.2021	0	1536
22	12.1.2021	B	707
23	12.1.2021	A	543
24	12.1.2021	A	15649
25	12.1.2021	A	717
26	12.1.2021	A	2364
27	13.1.2021	0	1035
28	13.1.2021	A	6679
29	13.1.2021	B	2650
30	13.1.2021	A	2292
31	13.1.2021	A	784
32	13.1.2021	A	1426
33	13.1.2021	A	1144
34	14.1.2021	0	2294
35	14.1.2021	A	1347
36	14.1.2021	A	3555
37	14.1.2021	A	3574
38	15.1.2021	0	2576
39	15.1.2021	A	782
40	15.1.2021	A	7093
41	18.1.2021	0	707
42	18.1.2021	A	1081

Poř. číslo	Datum odběru	Krevní skupina	Koncentrace protilátek AU/ml
43	18.1.2021	AB	2869
44	19.1.2021	0	3526
45	19.1.2021	A	6397
46	19.1.2021	0	342
47	19.1.2021	A	1469
48	19.1.2021	A	1949
49	20.1.2021	0	3781
50	20.1.2021	AB	823
51	20.1.2021	0	1899
52	21.1.2021	B	911
53	21.1.2021	0	4290
54	22.1.2021	A	2790
55	22.1.2021	A	2933
56	22.1.2021	A	2383
57	25.1.2021	0	2107
58	26.1.2021	A	4996
59	26.1.2021	A	3604
60	26.1.2021	0	5456
61	27.1.2021	A	14026
62	27.1.2021	B	1076
63	27.1.2021	0	4882
64	28.1.2021	A	11948
65	29.1.2021	A	2574
66	29.1.2021	A	3864
67	29.1.2021	0	1756
68	29.1.2021	0	2259
69	1.2.2021	AB	2414
71	1.2.2021	A	5697
72	1.2.2021	A	6118
73	1.2.2021	AB	5721
74	1.2.2021	AB	848
75	1.2.2021	0	1947
76	2.2.2021	A	3368
77	2.2.2021	A	5243
78	2.2.2021	A	2737
79	2.2.2021	A	2608
80	4.2.2021	B	1166
81	4.2.2021	A	6968
82	5.2.2021	A	6968
83	5.2.2021	A	3817
84	8.2.2021	A	2983

Poř. číslo	Datum odběru	Krevní skupina	Koncentrace protilátek AU/ml
85	9.2.2021	AB	2064
86	10.2.2021	B	511
87	10.2.2021	B	2440
88	11.2.2021	0	4835
89	11.2.2021	0	3330
90	15.2.2021	A	2024
91	15.2.2021	A	8872
92	15.2.2021	A	7527
93	15.2.2021	AB	2815
94	16.2.2021	A	2623
95	16.2.2021	A	3960
96	16.2.2021	A	2762
97	16.2.2021	0	3967
98	17.2.2021	A	2180
99	17.2.2021	B	6717
100	17.2.2021	AB	4429
101	17.2.2021	A	12505
102	18.2.2021	B	6716
103	18.2.2021	A	4833
104	18.2.2021	A	1333
105	19.2.2021	A	6007
106	22.2.2021	A	4528
107	23.2.2021	A	5227
108	23.2.2021	A	2764
109	23.2.2021	A	4294
110	23.2.2021	A	4950
111	24.2.2021	A	1368
112	24.2.2021	0	> 40000
113	24.2.2021	B	2089
114	24.2.2021	A	4921
115	24.2.2021	A	4922
116	26.2.2021	0	4329
117	26.2.2021	0	4010
118	26.2.2021	A	2119
119	1.3.2021	A	3609
120	2.3.2021	A	3245
121	2.3.2021	0	3326
123	2.3.2021	0	3705
124	3.3.2021	0	3314
125	4.3.2021	A	5431
126	4.3.2021	A	3224
127	5.3.2021	A	10959
128	5.3.2021	A	2819

Poř. číslo	Datum odběru	Krevní skupina	Koncentrace protilátek AU/ml
129	5.3.2021	A	1975
130	5.3.2021	A	4752
131	8.3.2021	AB	1934
132	8.3.2021	0	38956
133	8.3.2021	A	4792
134	8.3.2021	A	3177
135	8.3.2021	A	2728
136	8.3.2021	A	4416
137	9.3.2021	B	4593
138	10.3.2021	A	4077
139	11.3.2021	A	4691
140	11.3.2021	0	23776
141	12.3.2021	A	2229
142	12.3.2021	AB	4047
143	15.3.2021	0	4032
144	16.3.2021	0	3658
145	16.3.2021	A	4692
146	17.3.2021	0	2862
147	18.3.2021	A	3530
148	18.3.2021	A	10923
149	18.3.2021	0	2943
150	18.3.2021	A	21413
151	19.3.2021	A	4097
152	19.3.2021	A	8953
153	19.3.2021	A	2836
154	22.3.2021	0	2964
155	23.3.2021	0	9442
156	23.3.2021	A	3383
157	23.3.2021	A	1735
158	23.3.2021	A	3890
159	23.3.2021	0	24126
160	24.3.2021	A	2403
161	24.3.2021	A	2680
162	24.3.2021	B	3448
163	24.3.2021	0	5979
164	24.3.2021	B	3924
165	25.3.2021	A	11209
166	26.3.2021	A	2828
167	26.3.2021	A	2868
168	29.3.2021	AB	2064
169	29.3.2021	0	4539
170	29.3.2021	0	3749
171	30.3.2021	A	28461

Poř. číslo	Datum odběru	Krevní skupina	Koncentrace protilátek AU/ml
172	31.3.2021	0	13806
173	31.3.2021	A	5564
174	31.3.2021	A	2374
175	31.3.2021	0	16801
176	31.3.2021	0	2894
177	1.4.2021	A	4080
178	1.4.2021	A	7071
179	1.4.2021	0	2656
180	6.4.2021	A	12216
181	6.4.2021	0	16818
182	6.4.2021	A	8609
183	6.4.2021	0	10875
184	6.4.2021	A	2985
185	7.4.2021	AB	2824
186	7.4.2021	A	3423
187	7.4.2021	0	6202
188	7.4.2021	0	8403
189	7.4.2021	0	2412
190	7.4.2021	0	2382
191	8.4.2021	A	2602
192	8.4.2021	A	3250
193	8.4.2021	0	2418
194	9.4.2021	0	1316
195	12.4.2021	A	3309
196	12.4.2021	A	2030
197	12.4.2021	A	8379
198	12.4.2021	A	5147
199	12.4.2021	0	16299
200	13.4.2021	A	2951
201	13.4.2021	A	4837
202	13.4.2021	B	2490
202	13.4.2021	A	4867
203	13.4.2021	A	3115
204	13.4.2021	0	26681
205	13.4.2021	0	2299
206	14.4.2021	B	2234
207	14.4.2021	A	2107
208	14.4.2021	A	4518
209	14.4.2021	A	7079
210	14.4.2021	0	3150
211	14.4.2021	0	7552
212	15.4.2021	A	17530
213	15.4.2021	A	2543

Poř. číslo	Datum odběru	Krevní skupina	Koncentrace protilátek AU/ml
214	15.4.2021	A	17735
215	15.4.2021	0	2822
216	16.4.2021	A	4134
217	19.4.2021	A	2542
218	19.4.2021	A	3825
219	19.4.2021	0	6365
220	19.4.2021	A	6365
221	20.4.2021	A	3385
222	20.4.2021	0	2344
223	20.4.2021	A	> 40000
224	21.4.2021	AB	15649
225	21.4.2021	AB	2190
226	21.4.2021	AB	2529
227	21.4.2021	0	5478
228	21.4.2021	0	7020
229	21.4.2021	A	2134
230	21.4.2021	A	2194
231	22.4.2021	A	3385
232	22.4.2021	A	9024
233	22.4.2021	0	7020
234	23.4.2021	A	3797
235	23.4.2021	B	4258
236	26.4.2021	0	12954
237	26.4.2021	0	11351
238	26.4.2021	A	2449
239	26.4.2021	A	2396
240	27.4.2021	B	4524
241	27.4.2021	AB	6156
242	27.4.2021	A	5075
243	27.4.2021	A	3383
244	27.4.2021	A	6776
245	28.4.2021	A	3096
246	29.4.2021	A	8040
247	29.4.2021	A	5352
248	30.4.2021	A	2151
249	3.5.2021	0	4997
250	3.5.2021	0	26896
251	4.5.2021	A	8721
252	4.5.2021	A	3370
253	4.5.2021	A	2222
254	4.5.2021	0	2184
255	5.5.2021	A	3031
256	5.5.2021	0	1799

Poř. číslo	Datum odběru	Krevní skupina	Koncentrace protilátek AU/ml
257	5.5.2021	B	37033
256	6.5.2021	0	1799
257	6.5.2021	0	4171
258	10.5.2021	A	3941
259	11.5.2021	0	15690
260	12.5.2021	A	3202
261	12.5.2021	A	2963
262	13.05.2021	A	9865
263	13.05.2021	0	5175
264	13.05.2021	A	34781
265	18.05.2021	0	6515
266	18.05.2021	A	3878
267	18.05.2021	A	2937
268	21.05.2021	A	2522
269	24.05.2021	A	5576
270	25.05.2021	A	6898
271	26.05.2021	AB	4251
272	26.05.2021	0	3870
273	26.05.2021	0	16541
274	27.05.2021	A	2334
275	27.05.2021	A	7100
276	27.05.2021	0	9049
277	28.05.2021	A	2198
278	28.05.2021	0	> 40000
279	28.05.2021	A	4095
280	31.05.2021	A	3173
281	01.06.2021	0	12303
282	02.06.2021	A	24546
283	02.06.2021	A	> 40000
284	04.06.2021	0	5322
285	04.06.2021	A	3105
286	09.06.2021	A	5683
287	15.06.2021	AB	2645
288	15.06.2021	0	10911
289	17.06.2021	A	6187
290	18.06.2021	0	38965
291	22.06.2021	0	10760
292	23.06.2021	A	31683
293	30.06.2021	A	18050

Zdroj: autor