



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

Kontrola jakosti transfuzních přípravků

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Barbora Nováčková

Vedoucí práce: PharmDr. Hana Staňková

České Budějovice 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „*Kontrola jakosti transfuzních přípravků*“ 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 3. 5. 2017

podpis

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat své vedoucí bakalářské práce PharmDr. Haně Staňkové za odborné vedení a poskytnutí informací. Také bych ráda poděkovala za spolupráci s Transfuzním oddělením Nemocnice České Budějovice a. s. Děkuji i rodině za jejich trpělivost a podporu při psaní bakalářské práce.

Kontrola jakosti transfuzních přípravků

Abstrakt

Hlavním tématem bakalářské práce je kontrola jakosti transfuzních přípravků na Transfuzním oddělení v Nemocnici České Budějovice a.s. Ve své bakalářské práci se věnuji nejzákladnějším transfuzním přípravkům vyráběných z plné krve, mezi které patří erytrocyty bez buffy-coatu resuspendované (EBR), plazma (P), trombocyty z buffy-coatu směsné de leukotizované v náhradním roztoku (TBSDR) a trombocyty z buffy-coatu směsné de leukotizované (TBSD). Cílem bakalářské práce je statistické vyhodnocení kontroly kvality vyjmenovaných transfuzních přípravků zpětně za posledních 5 let. U nejnovějšího transfuzního přípravku TBSDR jsem si navíc osvojila vlastní vyšetření kontrolních vzorků.

Teoretická část je zaměřena na kontrolu dárců krve, na metody odběru, zpracování krve a na postupy, jež mohou významně ovlivnit kvalitu transfuzního přípravku. Popisují vyšetřované transfuzní přípravky a proces kontroly kvality. V praktické části se zabývám postupem vyšetření jednotlivých parametrů kontroly kvality transfuzních přípravků a jejich hodnocením. Po výrobě transfuzního přípravku se provádí odběr kontrolních vzorků a kontrola účinných a nežádoucích složek (erytrocyty, leukocyty, trombocyty, hemoglobin, hematokrit). Na konci expirace se u transfuzních přípravků hodnotí jejich stabilita (hemolýza, pH, koagulační faktory) a sterilita. Podrobněji se zaměřím na kontrolu kvality transfuzního přípravku TBSDR měsíc po jeho zavedení do výroby po dobu 6 měsíců.

Při kontrole kvality transfuzních přípravků se uplatňuje statistická kontrola procesu. Za posledních 5 let byla kvalita všech transfuzních přípravků vyhovující. Nově zavedený transfuzní přípravek TBSDR je z mnoha pohledů kvalitnější než dřívější TBSD. TBSDR přináší pro pacienty, ale i pro transfuzní oddělení značné výhody.

Klíčová slova

Transfuzní přípravky; kontrola jakosti; účinné složky; nežádoucí složky; stabilita; sterilita.

Quality control of blood products

Abstract

The main theme of this bachelor thesis is a quality control of blood products which are prepared in the Transfusion Centre in the České Budějovice Hospital. In my thesis, I focus on the rudimentary blood products manufactured from whole blood. These include resuspended erythrocytes without a buffy coat (EBR), plasma (P), mixed thrombocytes without leukocytes from a buffy coat in a spare solution (TBSDR) and mixed thrombocytes without leukocytes (TBSD). The aim of this work is a statistical analysis of quality of the aforementioned blood products used in the past 5 years. Moreover, I have devised my own quality control of the newest blood products TBSDR.

The theoretical part addresses blood donors' control, methods of blood collection, blood processing and procedures which may significantly influence the quality of blood products. I also describe the examined blood products and the quality control process. In the practical part, I deal with the procedure of examining the particular parameters of blood products' quality control and their assessment. After the preparation of blood products, sampling is done as well as the control of both efficient and undesirable components (erythrocytes, leukocytes, thrombocytes, hemoglobin, hematocrit). Assessment of stability and sterility of blood products (hemolysis, pH, coagulation factors) is done at the end of their expiration. I will focus more carefully on the TBSDR blood product quality control which starts one month after the blood product is implemented into a production process and which lasts six months.

Statistical control of the process is applied during the quality control. In the past 5 years, the quality of blood products has been satisfactory. The newly implemented blood product TBSDR is more high-quality than the previous TBDS. TBSDR provides not only patients but also transfusion centers with many advantages.

Key words

Blood products; quality control; efficient components; undesirable components; stability; sterility.

Obsah

Úvod.....	8
1 Teoretická část.....	9
1.1 Kontrola dárců krve	9
1.1.1 Bezpečnost dárcovství krve	9
1.1.2 Práva a povinnosti dárců krve	9
1.1.3 Předodběrové vyšetření	9
1.1.4 Poodběrové vyšetření dárců	10
1.1.4.1 Infekční markery	10
1.1.4.2 Imunohematologické vyšetření	12
1.2 Odběr a zpracování krve	13
1.2.1 Odběr	13
1.2.2 Zpracování krve	14
1.2.3 Postupy zvyšující kvalitu a bezpečnost transfuzních přípravků.....	16
1.2.4 Propuštění	18
1.2.5 Značení transfuzních přípravků	18
1.2.6 Skladování a transport	18
1.3 Transfuzní přípravky TP	19
1.3.1 Erytrocytární transfuzní přípravky z plné krve	20
1.3.2 Plazma	22
1.3.3 Trombocytární transfuzní přípravky.....	23
1.4 Kontrola jakosti transfuzních přípravků	25
2 Cíle práce a hypotézy	28
2.1 Cíle práce	28
2.2 Hypotézy	28
3 Metodika	29
3.1 Statistické zpracování kontroly kvality u hodnocených transfuzních přípravků za posledních 5 let.....	29
3.1.1 EBR	31
3.1.2 Plazma	32
3.1.3 TBSD/TBSDR.....	33
3.1.4 Kontrola sterility.....	34
3.2 Kontrola kvality transfuzního přípravku TBSDR.....	35
3.2.1 Odběr vzorků	35
3.2.2 Měření na analyzátoru CELL-DYN Emerald.....	35

3.2.3	Stanovení počtu bílých krvinek pomocí Nageottovy komůrky v deleukotizovaném trombocytárním koncentrátu TBSDR	40
3.2.4	Měření pH na konci expirace	41
3.2.5	Kontrola sterility	42
4	Výsledky kontroly kvality.....	43
4.1	Výsledky statistického zhodnocení kontroly kvality u hodnocených transfuzních přípravků za posledních 5 let	43
4.2	Výsledky kontroly kvality TBSDR za období 1. 4. do konce září 2016 ..	47
5	Diskuze	50
6	Závěr.....	54
7	Seznam literatury	56
8	Seznam tabulek, obrázků a příloh.....	61
9	Seznam zkratk	62
10	Příloha	64

Úvod

Předmětem této bakalářské práce je kontrola jakosti u vybraných transfuzních přípravků, které se vyrábějí na Transfuzním oddělení Nemocnice České Budějovice a.s.. Transfuzní přípravky jsou považovány za léčiva, a proto podléhají přísné kontrole kvality. Transfuzní přípravek musí splňovat určité parametry, které jsou stanoveny vyhláškou 143/2008 Sb. Vyhláška o lidské krvi. Z jednotlivých druhů transfuzních přípravků se odebírají kontrolní vzorky, které se vyšetřují a statisticky hodnotí. Získaná data z vyšetření kontrolních vzorků jsem zpracovala do tabulek, na jejichž základě jsem vyhodnotila kvalitu vybraných transfuzních přípravků. Vybrané transfuzní přípravky a jejich kontrolované parametry jsem hodnotila retrospektivně za období 2012-2016. Detailněji jsem se seznámila s kontrolou kvality nejnověji vyráběného transfuzního přípravku TBSDR.

Téma „Kontrola jakosti transfuzních přípravků“ jsem si vybrala proto, že se jedná o aktuální a velice rozsáhlou problematiku transfuzního oddělení. Kontrola kvality transfuzních přípravků slouží k zajištění bezpečnější krevní transfuze.

Pro účely bakalářské práce jsem nejvíce čerpala z knih Řeháček et al., 2013 a Penka et al., 2012. A také z dokumentace TRS Nemocnice České Budějovice a.s.

1 Teoretická část

1.1 *Kontrola dárců krve*

1.1.1 *Bezpečnost dárcovství krve*

Dárcovství krve by mělo být dobrovolné a bezplatné, protože bezpříspěvkové dárcovství je významným kritériem bezpečnosti darované krve. Pouze ten dárcce, který není motivován přímou finanční odměnou, je z hlediska moderní transfuzní služby dostatečně bezpečný. Co nejvyšší bezpečnost dárcovství krve je navíc zajištěna předodběrovým a poodběrovým vyšetřením dárců krve, kontrolou kvality vyrobených transfuzních přípravků a systémem jakosti v zařízeních transfuzní služby (Společnost pro transfuzní lékařství, © 2017).

1.1.2 *Práva a povinnosti dárců krve*

Dárcce krve, který přijde na transfuzní oddělení, je nejprve seznámen s „Poučením pro dárcce krve“, kde je informován o svých právech, o rizicích odběru a o možném ohrožení příjemce krevní transfuze. Následně vyplní „Dotazník pro dárcce krve“ týkající se jeho aktuálního zdravotního stavu, prodělaných chorob, rizikového chování a případných návštěv rizikových zemí. Dárcce pravdivost a úplnost uváděných údajů stvrzuje svým podpisem. Hlavním cílem je neohrozit dárcce odběrem a snížit riziko pro příjemce transfuzního přípravku vyrobeného z daného odběru (Společnost pro transfuzní lékařství, © 2017).

1.1.3 *Předodběrové vyšetření*

V rámci předodběrového vyšetření se klade důraz na zhodnocení celkového vzhledu dárcce krve. Hodnotí se dárcův životní styl, výživa, tetování, piercingy, vpichy od injekčních jehel a jiné. Dále se změří krevní tlak, diastolický musí být maximálně 100 mmHg, systolický maximálně 180 mmHg, pulz by měl být 50 – 100 tepů za minutu a tělesná teplota dárcce 36 °C – 37 °C. Pokud se dárci odebírá 450 – 470 ml plné krve, jeho hmotnost by měla být vyšší než 50 kg (Řeháček et al., 2013).

Na TRS České Budějovice a.s. se u všech dárců měří hemoglobin, který by měl mít hodnotu větší nebo rovnou 125 g/l u žen a větší nebo rovnou 135 g/l u mužů. U dárců s předchozím chylózním odběrem nebo u dárců krevních destiček a plazmy se navíc v kapiláře pro hematokrit hodnotí chylozita plazmy a hodnota hematokritu. V kapiláře by se plazma neměla jevit chylózní a hodnota hematokritu by měla být u žen vyšší než 38 % a u mužů vyšší než 40 %. U přístrojových odběrů (plazmaferéz,

trombocytferéz) a dle rozhodnutí lékaře se vyšetření rozšiřuje o další hematologické, biochemické či jiné parametry. Orientační vyšetření krevní skupiny se provádí pouze u prvodárců (NCB_TRS_SOP_13_003_C).

Minimální rozsah předodběrového vyšetření je znázorněn v tabulce (Řeháček et al., 2013).

Tabulka 1 Minimální rozsah předodběrového vyšetření

Druh odběru	Hodnocený parametr	Kritické hodnoty	Frekvence vyšetření
Plná krev	hemoglobin (Hb)	ženy: 125 g/l a vyšší muži: 135 g/l a vyšší	při každém odběru
Plazmaferéza	celková bílkovina	60 g/l a vyšší	1 x za rok
Trombocytferéza	množství trombocytů	150 x 10 ⁹ /l a vyšší	při každém odběru
Erythrocytaferéza	Hb před odběrem	140 g/l a vyšší	při každém odběru
	Hb po odběru	nad 110 g/l	při každém odběru

Zdroj: Řeháček et al., 2013

Posouzení způsobilosti dárce k odběru provádí lékař, který na základě vyplněného dotazníku, předodběrového vyšetření a osobního pohovoru rozhodne, zda dárce propustí k odběru, nebo ho trvale či dočasně vyřadí. Důvodem vyřazení dárce může být interní, neurologické, systémové nebo onkologické onemocnění. Dále vakcinace, rizikové aktivity (např. invazivní lékařský zákrok) a rizikové kontakty, přítomnost infekčního onemocnění (např. HIV, AIDS, hepatitida B, hepatitida C, tuberkulóza, syfilis, mononukleóza, borelióza), riziko exotických infekcí spojených s cestováním (Řeháček et al., 2013).

1.1.4 Poodběrové vyšetření dárců

Po odběru krve se ve vzorku stanovují hlavní imunohematologické parametry a vyšetřují se infekční markery nejdůležitějších chorob, které jsou přenášeny krví. Vzorek krve se odebírá ze satelitního vâčku pro první porci krve, který je součástí odběrové soupravy.

1.1.4.1 Infekční markery

Minimální rozsah vyšetření infekčních markerů je dán evropskou legislativou. Vyšetřují se protilátky proti HIV 1/2 (anti HIV-1, anti HIV-2), protilátky proti HCV (anti-HCV) a povrchový antigen HBV (HBsAg). V České republice je povinné vyšetření rozšířené o vyšetření antigenu p24 HIV a vyšetření protilátek proti *Treponemě*

pallidum (původce syfilis). Asi v 1/3 laboratoří v České republice se také vyšetřuje antigen HCV (Řeháček et al., 2013).

Testy na infekční markery, které se na transfuzních odděleních provádějí u dárců krve, jsou screeningové. Výsledek může být negativní, hraniční (tzv. šedá zóna) nebo reaktivní. Pokud výsledek screeningového vyšetření vyjde reaktivní nebo hraniční, vyšetření téhož vzorku se 2 x zopakuje stejným postupem. V případě opakovaně reaktivního nebo opakovaně hraničního screeningového vyšetření se odběr i transfuzní přípravy z něj vyrobené vyloučí z léčebného použití a dárce se dočasně vyřadí z dárcovství. Laboratoř bezodkladně pošle do NRL pro danou infekci tentýž vzorek v dostatečném objemu ke konfirmačnímu vyšetření. Současně si laboratoř ponechá zmraženou plazmu z daného odběru, dokud neobdrží výsledek konfirmace, pro potřeby případných následných vyšetření. ZTS provede předběžný look-back, pozastaví výdej transfuzních přípravků daného dárce, jsou-li ještě na skladě. ZTS je povinné nahlásit look-back i zpracovateli plazmy. Look-back se používá k vyhledání rizikových odběrů v případě reaktivních výsledků screeningového vyšetření na infekci HIV, HBV, HCV u dárce krve. Za rizikové odběry se považují všechny odběry, které byly provedené v předcházejících šesti měsících poslednímu nereaktivnímu odběru, před odběrem reaktivním (Doporučení STL2009_05).

Po obdržení výsledku konfirmačního vyšetření z NRL se dárce s negativním výsledkem opět zařadí do registru dárců a odběr krve lze u dárce provést s odstupem minimálně 6 měsíců. Dárce s pozitivní konfirmací se trvale vyřadí z dárcovství a je předán k léčbě nebo ke sledování. Dárce s nejasným výsledkem zůstává dočasně vyřazen z dárcovství a po 6 měsících se pozve k dalšímu screeningovému i konfirmačnímu vyšetření kontrolního vzorku (NCB_TRS_SME_12_007_B).

Infekční markery se na TRS v Nemocnici České Budějovice a.s. vyšetřují na analyzátorech Abbott Architect i2000 SR a Abbott Architect i1000 SR. Jedná se o imunochemické analyzátory, které pracují na principu chemiluminiscence. Analyzátory jsou plně automatické. Slouží pro zpracování až 200 vzorků za hodinu. Vlastní vyhodnocení provádí automatický analyzátor. Výsledek je vydáván číselně jako poměr mezi hodnotou vzorku (S) a cut-off (CO) = S/CO . Ke každé kontrole a ke každému vzorku analyzátor vydává i slovní vyhodnocení (Uživatelská příručka systému Architect).

Používaným materiálem je nesražená krev, vzorek se odebírá do 6 ml fialových vakuet s K3EDTA (NCB_TRS_SOP_13_210_A).

Ke každému dokončenému odběru se uchovává archivní vzorek (plazma nebo sérum v objemu min 0,5 ml) způsobem, který umožňuje následné vyšetření v případě pochybností. Archivní vzorek se uchovává po dobu nejméně 1 roku po uplynutí doby použitelnosti transfuzního přípravku, který má nejdelší dobou použitelnosti a je vyroben z daného odběru (Doporučení STL2009_05).



Obrázek 1 Analyzátor Architect

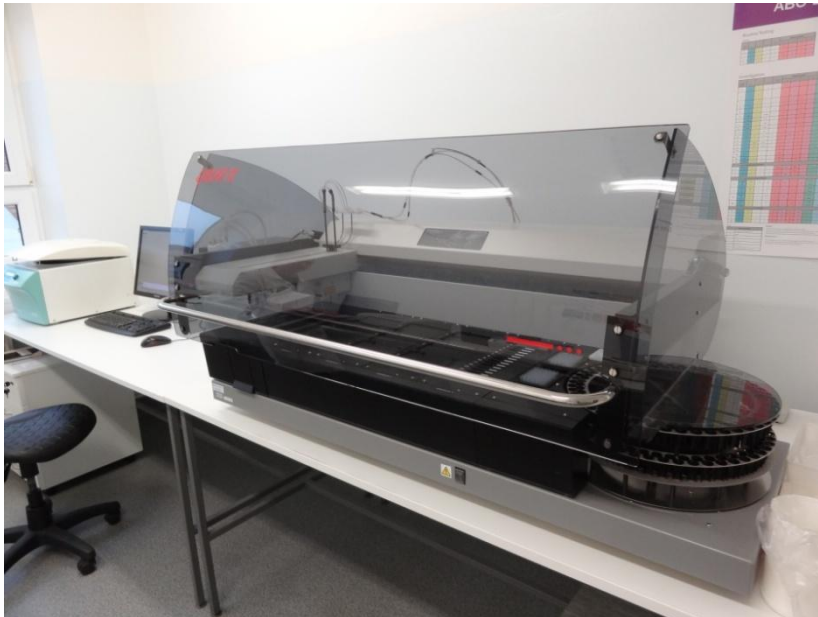
Zdroj: autor

1.1.4.2 Imunohematologické vyšetření

Do povinného imunohematologického vyšetření dárce krve patří zejména vyšetření AB0 skupiny dárce, vyšetření antigenu RhD. Z plazmy dárce se stanovuje přítomnost nepravidelných antierytrocytárních protilátek screeningovým testem s poolovanými diagnostickými erytrocyty pomocí nepřímého antiglobulinového testu. Dále se stanovují další erytrocytární antigeny, ke kterým se řadí základní antigeny Rh systému a antigen K. Antigeny Kell a Rh systému patří k nejsilnějším imunogenům (Penka et al., 2011).

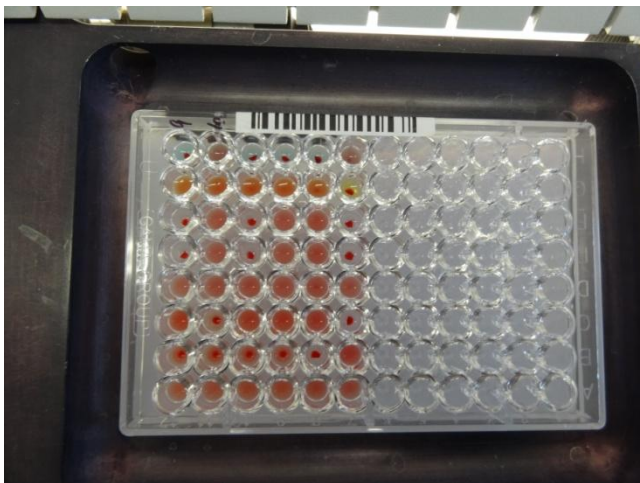
Imunohematologická vyšetření dárců krve se na TRS České Budějovice a.s. zpracovávají na rozplňovacím zařízení Qasar IV a na analyzátoru obrazu Duet Reader firmy Dynex, dohromady tvoří jeden celek. Rozplňovač má za úkol identifikaci krevních vzorků, mikrotitračních destiček pro vyšetření krevních skupin a gelových karet pro vyšetření antierytrocytárních protilátek, dále pipetování vzorků a reagensů.

Analyzátor obrazu provádí fotometrické odečítání výsledků. Příklad výsledky tiskne v podobě primárního laboratorního protokolu a převádí do LIS TRS (NCB_TRS_SOP_13_202_B).



Obrázek 2 Rozplňovač Qasar IV

Zdroj: autor



Obrázek 3 Vyšetření krevní skupiny na mikrotitrační destičce

Zdroj: autor

1.2 Odběr a zpracování krve

1.2.1 Odběr

Dárcům, kteří byli propuštěni k odběru, se odebírá tzv. plná krev, to je krev v podobě, v jaké koluje v cévním řečišti. K odběru krve se využívá uzavřený odběrový systém s odběrovou venepunkční jehlou. Systém se skládá ze sterilních plastových

vaků, které jsou konfigurovány do různých sestav, aby umožňovaly následné zpracování krve v uzavřeném systému. Součástí je vak obsahující protisrážlivý roztok, 1 – 2 prázdné vaky, vak obsahující konzervační roztok a poslední součástí je vzorkovací váček. Tento váček je umístěn za jehlou a slouží k odběru prvních asi 30 ml krve. První porce krve se využívá k laboratorním testům. Celý systém vaků je propojen hadičkami (Řeháček et al., 2013). Přidáním deleukotizačních filtrů mohou odběrové vaky sloužit pro in-line filtraci plné krve nebo erytrocytů. Všechny součásti jsou sterilní a slouží pro jednorázové použití (Penka et al., 2012).

Před odběrem je nutné místo vpichu řádně vydezinfikovat. Při odběru jsou vaky umístěny na míchací váhy. Zde se odebraná krev neustále promíchává s antikoagulačním činidlem, tím se zabrání jejímu srážení. Za normálních okolností se odebírá $450 \text{ ml} \pm 10 \%$ krve. Doba odběru by neměla přesáhnout více než 10 minut. V případě pomalého průtoku krve a trvání odběru nad 12 minut, se odebraná krev nemůžeme použít pro výrobu trombocytového přípravku. Pokud odběr krve trvá déle než 15 minut, krev se nemůže použít pro výrobu plazmy pro farmaceutické zpracování nebo pro klinické použití (Řeháček et al., 2013).

1.2.2 Zpracování krve

Krev by měla být po odběru nejméně 1 hodinu v klidu, nejlépe na speciálních chladicích deskách. Je vhodné stabilizovat teplotu krve, zpracování je pak standardnější. Pro výrobu trombocytů by teplota neměla klesnout pod $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Během hodiny v klidu zároveň v případě kontaminace krve při samotném odběru může dojít k fagocytóze mikrobiálních látek (Řeháček et al., 2013).

Následuje centrifugace, při které se oddělí jednotlivé složky krve na základě rozdílné specifické hmotnosti. Z plné krve se oddělí erytrocyty (červené krvinky), plazma (tekutá složka) a trombocyty (krevní destičky). Podmínkou pro správné rozdělení jednotlivých částí krve je správné vyvážení centrifugy, vhodné přetížení, rychlost otáčení, náběhu i brzdění a také kvalitní technika. Pro centrifugaci se používají velkoobjemové chlazené centrifugy. Součástí centrifugy jsou kyvety, vhodné pro centrifugaci krevních vaků. Rychlost otáčení je až 4000 otáček/minutu. Doba centrifugace trvá 10 – 20 minut (Řeháček et al., 2013).

V průběhu centrifugace se ve spodní části transfuzního vaku usadí erytrocyty. Nad nimi nasedá vrstva leukocytů a trombocytů. Této vrstvě se také říká buffy-coat. Nad buffy-coatem je plazma. Buffy-coat po oddělení obsahuje asi $2/3$ prvotního množství

trombocytů a leukocytů. V plazmě a v erythrocytech se leukocyty a trombocyty nachází jen ve velmi malém množství (Řeháček et al., 2013).

Po centrifugaci se krevní odběrové vaky opatrně přenesou do speciálních lisů. Na TRS České Budějovice a.s. se používají odběrové vaky s horní i dolní výpustí, které umožňují na automatickém lisu přepustit erythrocyty spodem a plazmu horem do satelitních vaků. Buffy-coat zůstane v odběrovém vaku a může sloužit k výrobě trombocytárních přípravků. Ze směsi 4 – 6 jednotlivých buffy-coatů lze vyrobit terapeutickou dávku pro jednoho dospělého člověka (Řeháček et al., 2013).

Po separaci erythrocyty mohou být deleukotizovány filtrací a jsou resuspendovány v roztoku, který umožňuje jejich uchování po delší dobu. Jako roztok pro resuspenzi se nejčastěji používá izotonický roztok chloridu sodného s glukózou, která slouží jako zdroj energie, s adeninem pro metabolismus erythrocytů a s manitolem ke stabilizaci membrány. Roztok nese zkratku SAGM (jedná se o nejčastěji používaný roztok, dostupné jsou ale i jiné roztoky). Hematokrit se po přidání roztoku SAGM upraví na 0,50 – 0,70 (Řeháček et al., 2013).

Separovaná plazma, určená pro kliniku, se musí co nejdříve zmrazit, ideálně do 6 hodin po odběru. Samotný proces zmrazování plazmy musí být rychlý, tzn., že jádro plazmy musí být zmrazeno na teplotu $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ do 1 hodiny, aby během krystalizační fáze nedošlo k denaturaci a inaktivaci koagulačních faktorů. K těmto účelům slouží speciální zmrazovače. Plazma pro průmyslové zpracování se zmrazuje dle požadavků zpracovatele plazmy (Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, 2015).

Výroba trombocytárních přípravků se v poslední době provádí ze směsného buffy-coatu, přidáním náhradního roztoku, centrifugací a deleukotizací. TBSDR je možné vyrábět pouze v rozmezí 2 – 22 hodin po oddělení BC z plné krve, protože vak s BC není propustný pro plyny. Na výrobu jedné terapeutické dávky se 4 – 6 stejnoskupinových vaků s buffy-coatem a vak s náhradním roztokem sterilně navaří na filtrační set. Všechny buffy-coaty se sesají do sběrného vaku filtračního setu. Náhradním roztokem se vaky od buffy-coatů propláchnou do filtračního setu, aby se dosáhlo co největší výtěžnosti. Svářečkou se odstraní prázdné vaky. Následuje centrifugace směsného buffy-coatu s náhradním roztokem, separace a zároveň filtrace na automatických separátorech krevních složek. Celý proces výroby probíhá uzavřeným způsobem (NCB_TRS_SOP_16_118_B).

1.2.3 Postupy zvyšující kvalitu a bezpečnost transfuzních přípravků

Transfuzní přípravky můžeme deleukotizovat, což představuje určitou prevenci komplikací transfuze (Aboul et al., 2017). Leukocyty mohou být příčinou potransfuzních reakcí (FNHTR, TRALI), mohou přenášet intraleukocytární viry z dárce na pacienta (CMV, EBV) a mohou být příčinou nežádoucí aloimunizace. Aplikace deleukotizovaných TP je doporučována a uplatňována v mnoha vyspělých zemích Evropy a světa. Leukocyty mohou být odstraňovány z trombocytů, erytrocytů nebo z plné krve. Deleukotizace znamená snížení počtu leukocytů z TP na hodnotu menší než 1×10^6 na transfuzní jednotku. Ideálním postupem je deleukotizace v den odběru, před uskladněním, tzv. in-line. Provádí se v uzavřeném odběrovém systému pomocí odběrové soupravy s integrovaným filtrem. Ještě standardní je deleukotizace prováděná v průběhu skladování, před výdejem z transfuzního oddělení, tzv. laboratorní. Pak se deleukotizační filtr sterilně připojuje k vaku deleukotizovaného TP. Účinky dodatečné deleukotizace jsou omezeny. Určité množství leukocytů se rozpadá už před deleukotizací a nedojde k odstranění rozpadových produktů. U TP deleukotizovaných na transfuzním oddělení se odebírají kontrolní vzorky a je prováděna kontrola kvality. Jako nestandardní je považována deleukotizace u lůžka pacienta, tzv. bed-side. Z důvodu chybění vzorku není možná kontrola kvality. Tato filtrace je také považována za méně bezpečnou, neboť z filtru může být uvolněn bradykinin, který u pacientů léčených inhibitory acetylcholinesterázy může vyvolat těžkou hypotenzní reakci s rozvojem šoku (Řeháček, 2016).

Dlouhodobá stabilita plazmy při teplotě $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ umožňuje uložení plazmy do karantény, čímž se její bezpečnost zvyšuje. Plazma se v karanténě ponechává minimálně 6 měsíců, po této době ji můžeme ke klinickému použití uvolnit, až po opakovaném přetestování dárce na virové markery s negativními výsledky. Tím se překoná období serologické negativity u čerstvě infikovaného dárce. Pokud se dárce po druhé nedostaví, plazma nemůže být pro klinické účely vydána (Šťastná, 2009).

Riziko bakteriální kontaminace během odběru krve, po celou dobu zpracování i skladování a při další manipulaci je díky použití uzavřeného odběrového systému sterilně napojených hadiček a vaků minimální. Jediným možným místem kontaminace zůstává místo venepunkce. K prevenci bakteriální kontaminace odebrané krve se proto využívá váčku pro první porci krve, který je součástí odběrové soupravy. Prvních 30 ml se použije k provedení laboratorních testů, nikoliv k výrobě transfuzních přípravků,

protože právě tato část krve může být kontaminována bakteriální kožní flórou (Penka at al., 2012).

Dalším postupem zvyšující bezpečnost TP je prevence TRALI - Transfusion Related Acute Lung Injury. Výskyt vzácného, ale velmi závažného akutního plicního selhání vázaného na transfuzi se dává se do spojitosti s anti-HLA nebo anti-HNA protilátkami v plazmě. Vyvíjí se v průběhu transfuze nebo v průběhu 6 hodin po transfuzi krevních složek. Ohrožení se snižuje výběrem dárce plazmy pro klinické využití. Plazma se sníženým rizikem TRALI se vybírá od mužů bez transfuzní anamnézy, od žen bez transfuzní a těhotenské anamnézy, od dárců s prokázanou negativitou HLA protilátek atd (Brettner et al., 2017).

Bakteriální screening u trombocytů se provádí z důvodu rizika bakteriální kontaminace, ke které může dojít hlavně skladováním při teplotě 20 – 24 °C. Proto je v některých zemích povinná kultivace přípravků před výdejem nebo jiná technika, která je schopná detekovat proliferující mikrobiální agens. Účinnost kultivačního postupu je zhruba 50 % (Řeháček et al., 2013).

Další možností zvyšující bezpečnost TP může být také protiinfekční ošetření transfuzních přípravků, které se ale provádí spíše výjimečně. U trombocytů se využívá riboflavin nebo psoralen v kombinaci s UV zářením. Tyto látky mohou poškodit nukleové kyseliny. Tím poté znemožní namnožení přítomného infekčního agens. U plazmy se využívá ošetření methylenovou modří, která denaturuje DNA a RNA, nebo solvent detergentní ošetření. Metoda solvent-detergent narušuje nevratným způsobem viry s lipidovým obalem, mezi které patří viry hepatitidy B, C a HIV (Řeháček et al., 2013).

Pro pacienty se známými protilátkami proti IgA nebo proti plazmatickým bílkovinám se připravují promyté TP. Promytí znamená odstranění zbytkové plazmy z trombocytárního a erytrocytárního transfuzního přípravku. Odstraněná plazma se nahradí fyziologickým nebo náhradním roztokem. Při použití náhradního roztoku se nezkracuje expirace (Řeháček et al., 2013).

Pro pacienty se sníženou imunitou jsou indikovány ozářené TP. Ozáření slouží k předcházení s transfuzí spojenou reakcí štěpu proti hostiteli. Používá se gama záření v dávce 25 – 50 Gray. Ozáření zničí funkčnost T-lymfocytů obsažených v transfuzním přípravku. K vedlejším účinkům ozáření patří částečná destrukce buněčné membrány erytrocytů. Doporučuje se ozařovat erytrocyty do 14 dnů od odběru, jelikož paprsky γ více ničí membrány starších erytrocytů. Navíc po ozáření je třeba zkrátit expiraci erytrocytů na

maximálně 14 dní, expirace trombocytů se nemění, plazma se většinou ozařuje po rozmražení, tj. před vlastním podáním (Řeháček et al., 2013).

Vyšetření infekčních markerů pomocí nukleových kyselin také zvyšuje bezpečnost transfuzního přípravku. Infekční okno je období, ve kterém se infikovaný pacient jeví jako serologicky negativní. U HIV se tato doba odhaduje na 8 – 10 dní. Infekční okno pro HBV je asi 50 – 60 dní, pro HCV až 90 dní. Díky vyšetření nukleových kyselin daného infekčního agens, můžeme docílit zkrácení doby infekčního okna. Vyšetření se provádí v individuálním vzorku nebo ve směsi až 96 vzorků (Řeháček et al., 2013).

1.2.4 Propuštění

Propuštěním je ukončen celý proces zpracování krve. „Propuštění“ označuje konečné rozhodnutí, že přípravek nebo surovina z lidské krve splňují kritéria kvality i bezpečnosti a jsou způsobilé k dalšímu použití. Při propouštění tzv. kvalifikovaná osoba (zodpovědný pracovník) ověřuje, že dárce splňoval daná kritéria, odběr a zpracování proběhly bez závad, výsledky laboratorního vyšetření odpovídají požadavkům, označení hotových jednotek je správné. Transfuzní přípravek uvolní k použití, nebo jej vyřadí. Všechny informace o odběru, zpracování a laboratorním vyšetřením se průběžně vkládají do LIS, kterým musí být vybavena každá laboratoř (Penka et al., 2012).

1.2.5 Značení transfuzních přípravků

Po propuštění jsou vaky s transfuzním přípravkem opatřeny štítky konečného produktu, které jsou tištěné pomocí speciální termotiskárny. V České republice je značení transfuzních přípravků standardizováno. Každý štítek na transfuzním vaku musí obsahovat tyto informace: identifikace výrobce (zařízení transfuzní služby), číslo a název transfuzního přípravku (identifikace výrobce, vročení, číslo odběru a porce), imuno hematologické údaje (minimálně krevní skupina ABO/RhD), údaj o množství, datum odběru, datum expirace, záruka vyšetření infekčních markerů, informace o použitých roztocích, pokyny pro skladování a aplikaci. Důležité informace jsou na štítku také ve formě čárových kódů (Metodické opatření MZ, 2013).

1.2.6 Skladování a transport

Každý typ transfuzního přípravku má stanovenou teplotu pro skladování. Při dodržení těchto teplot je zaručena určitá doba použitelnosti. Všechny prostory, které slouží pro skladování přípravků (termostaty, ledničky, mrazící komory a boxy) musí

v celém prostoru udržovat danou teplotu. Teplotní stav se neustále kontroluje a monitoruje. Pro monitorování v ideálním případě slouží centrální monitorovací jednotka s teplotními čidly. Čidla zaznamenají vychýlení teploty mimo stanovenou mez a odpoví světelným i zvukovým signálem (Řeháček et al., 2013).

Správné skladování slouží pro zajištění ideálních podmínek pro životnost a funkčnost všech transfuzních přípravků. V průběhu skladování nesmí dojít k poškození vaku. Mohlo by dojít ke kontaminaci produktu. Z tohoto důvodu se před každým výdejem transfuzního přípravku kontroluje neporušenost transfuzního vaku (Penka et al., 2012).

Přeprava transfuzních přípravků se provádí ve speciálních termoboxech. Boxy musí být řádně označeny. Teplota boxu se musí co nejvíce blížit skladovací teplotě pro daný transfuzní přípravek. Přeprava erytrocytárních transfuzních přípravků probíhá při teplotě 2 – 10 °C po dobu maximálně 24 hodin. Plazma se přepravuje při teplotě -25° C a trombocytární transfuzní přípravky při teplotě 20 – 24 °C. Přeprava transfuzního přípravku by měla být omezena na minimální dobu. Teplota se během transportu monitoruje a zaznamenává (Doporučení STL2015_11).

1.3 Transfuzní přípravky TP

Za transfuzní přípravky se považují lidská krev a její složky zpracované pro podání člověku za účelem léčení nebo předcházení nemoci, pokud nejde o krevní deriváty. Za lidskou krev se nepovažují krevní kmenové buňky a lymfocyty dárce krvetvorných kmenových buněk určené pro příjemce těchto buněk. Transfuzní přípravky se vyrábí v zařízeních transfuzní služby za podmínek stanovených závaznými právními předpisy. Transfuzní jednotka TU udává množství transfuzního přípravku, který vznikl při zpracování jednoho odběru plné krve, včetně konzervačního či náhradního roztoku. V případě, že byla krevní složka získána technikou aferézy, je množství transfuzního přípravku přepočítáno na ekvivalentní množství transfuzních jednotek. U trombocytárních transfuzních přípravků jsou měrné jednotky označovány jako terapeutické dávky (Penka et al., 2012).

Ke každému transfuznímu přípravku je k dispozici dokument, označovaný jako specifikace transfuzního přípravku, který obsahuje veškeré informace o daném přípravku. Specifikace jsou uveřejněny na webových stránkách výrobců TP. Léčba krví byla v minulosti vázána na použití plné krve. Současná účelná hemoterapie spočívá

v použití jednotlivých krevních složek (transfuzních přípravků), které lze získat zpracováním odebrané plné krve nebo metodou aferézy (Penka et al., 2012).

Transfuzních přípravků je celá řada. Ve své bakalářské práci se však budu věnovat pouze nejzákladnějším a nejpoužívanějším druhům transfuzních přípravků vyráběných z plné krve.

1.3.1 Erytrocytární transfuzní přípravky z plné krve

Léčebnou složkou erytrocytárních transfuzních přípravků jsou erytrocyty. Přípravují se buď z plné krve centrifugací, odběrem dárce na separátoru při erythrocytaferéze nebo multikomponentním odběru. Erytrocyty se skladují při teplotě 2 – 6 °C. Při transportu, který může trvat maximálně 24 hodin, nesmí být překročeno teplotní rozmezí od +2 do 10 °C. Doba použitelnosti závisí na použitém antikoagulačním nebo resuspenzním roztoku. Při použití resuspenzního roztoku SAGM je doba užitelnosti 42 dní (Řeháček et al., 2013).

V praxi jsou nejpoužívanější erytrocyty bez buffy-coatu resuspendované (EBR) a erytrocyty resuspendované deleukotizované (ERD) (Řeháček et al., 2013).

Erytrocyty bez buffy-coatu resuspendované (EBR) se připravují z odběru plné krve od jednoho dárce. Krev se odebírá do antikoagulačního roztoku CPD 63 ml. Po odběru následuje centrifugace, odstranění větší části plazmy a vrstvy buffy-coatu a přidání 100 ml resuspenzního výživného roztoku SAGM. Každá jednotka obsahuje minimálně 43 g hemoglobinu. Stanovená hodnota hematokritu je 0,50 – 0,70. Transfuzní jednotka obsahuje všechny původně odebrané erytrocyty od jednoho dárce kromě malého množství krvinek odstraněných buffy-coatem, menší část původních leukocytů $< 1,2 \times 10^9/\text{TU}$ a malou část původní plazmy. Hodnota hemolýzy na konci doby skladování nepřesahuje hodnoty 0,8 % masy erytrocytů (Specifikace transfuzních přípravků – EBR, 2015).

Erytrocyty resuspendované deleukotizované (ERD) je transfuzní přípravek, u kterého je většina leukocytů odstraněna filtrací v různé fázi přípravy. Deleukotizace se provádí při výrobě uzavřeným systémem pomocí odběrové soupravy s integrovaným filtrem nebo se deleukotizační filtr připojuje sterilním způsobem před vydáním přípravku z transfuzního oddělení. Každá jednotka má minimálně 40 g hemoglobinu. Stanovená hodnota hematokritu je 0,50 – 0,70. Transfuzní jednotka obsahuje všechny původně odebrané erytrocyty od jednoho dárce kromě malého množství krvinek odstraněných buffy-coatem, minimální obsah původních leukocytů $< 1 \times 10^6/\text{TU}$

a malou část původní plazmy. Hodnota hemolýzy na konci doby skladování nepřesahuje hodnoty 0,8 % masy erytrocytů. Přípravek ERD je vhodný k prevenci vzniku aloimunizace, k prevenci febrilních reakcí u pacientů již senzibilizovaných HLA antigeny a k prevenci přenosu cytomegalovirové infekce (Specifikace transfuzních přípravků – ERD, 2015).

Transfuze erytrocytů se indikuje při klinických projevech anémie. U dospělých lze po transfuzi jednotky erytrocytů očekávat vzestup hemoglobinu o 10 g/l nebo vzestup hodnot hematokritu o 3 – 4 %. K transfuzi se zásadně připravují erytrocyty stejné krevní skupiny v AB0 a RhD systému mezi dárce a příjemcem. Z vitální indikace lze podat 0 RhD negativní erytrocyty s následným provedením předtransfuzního vyšetření. Za mimořádných okolností lze při nedostatku stejnoskupinové krve podat erytrocyty i jiné krevní skupiny. Příjemce skupiny AB lze transfundovat erytrocyty A, B, 0. Příjemci skupin A a B mohou být transfundováni erytrocyty skupiny 0. Příjemce skupiny 0 může dostat pouze erytrocyty skupiny 0. RhD pozitivnímu příjemci je možné podat i RhD negativní erytrocyty. RhD negativnímu příjemci lze podat RhD pozitivní krev jen výjimečně, z vitální indikace při nedostatku RhD negativních erytrocytů (Specifikace transfuzních přípravků – EBR, 2015).

Před transfuzí erytrocytů musí být nejprve v laboratoři provedeno předtransfuzní vyšetření, které zahrnuje vyšetření krevní skupiny pacienta, screening nepravidelných protilátek proti erytrocytům (při pozitivním výsledku vyšetření se provede identifikace protilátky a vybírá se transfuzní přípravek bez příslušného antigenu) a testu kompatibility. Před samotným výdejem přípravku se kontroluje značení, neporušenost obalu, vzhled přípravku (Specifikace transfuzních přípravků – EBR, 2015).

Nežádoucí reakce lze rozdělit podle příčiny na imunitní komplikace (hemolytické reakce, febrilní nehemolytické reakce, aloimunizace, TRALI, Ta-GvHD, alergické reakce, anafylaktické reakce apod.), kardiovaskulární a metabolické komplikace (oběhové přetížení, dušnost, hypotermie, hyperkalémie, hypokalcemie, hemosideróza, hypotenze, hypertenze) a transfuzí přenosné infekce (virové, bakteriální a parazitární).

Transfuze erytrocytů by neměla být podávána u anemií, jejichž léčbu lze zajistit medikamentózně (např. Fe, vitamin B12, kys. listovou, erythropoetinem) (Specifikace transfuzních přípravků – EBR, 2015).

1.3.2 Plazma

Plazma je tekutá složka krve, získává se z odběru plné krve centrifugací, při odběru plazmaferézou nebo jako vedlejší produkt při trombocytaferéze nebo erythrocytaferéze. Je zmrazena takovým způsobem a v takové době od odběru, aby labilní koagulační faktory zůstaly ve funkčním stavu (Specifikace transfuzních přípravků – P, 2015).

Plazma se skladuje při teplotě -25 °C a nižší po dobu 36 měsíců, pokud se skladuje při teplotě -18 °C až -25 °C doba použitelnosti je 3 měsíce. Zmrazení a skladování plazmy musí probíhat za takových podmínek, při nichž se zachová minimálně 70 % aktivity labilních koagulačních faktorů. Při transportu má být zajištěna teplota shodná s požadovanou teplotou skladování. Všechny jednotky obsahují stabilní koagulační faktory na úrovni normální plazmy, albumin a imunoglobuliny. Přípravek obsahuje nejméně 70 % prvotního obsahu faktoru VIII a podobná množství ostatních labilních koagulačních faktorů a přirozeně se vyskytujících inhibitorů. Buněčné elementy se vyskytují minimálně (Specifikace transfuzních přípravků – P, 2015).

Plazma z plné krve se získává centrifugací plné krve vysokými otáčkami. Je přetlačena lisou do satelitního vaku odběrové soupravy. Nejpozději do 6 hodin po odběru se přípravek šokově zmrazí, tzn., že úplné zmrazení přípravku na teplotu -30 °C proběhne do jedné hodiny. Plazma z aferézy je odebírána dárci separátorem s automatickou separací plazmy v extrakorporálním oběhu. Zmrazení plazmy musí začít do 6 hodin po ukončení procedury (Specifikace transfuzních přípravků – P, 2015).

Plazma určená pro klinické využití musí projít karanténou. Plazma se zmrazí a poté je uskladněna minimálně na 6 měsíců. Následně se u dárce opakovaně vyšetří povinné testy na infekční markery. Po ověření vyhovujících výsledků infekčních markerů u dárce je plazma uvolněna z karantény a může být použita (Specifikace transfuzních přípravků – P, 2015).

Předtransfuzní vyšetření se v tomto případě neprovádí. Pacientovi se v laboratoři vyšetří krevní skupina. Před vydáním transfuzního přípravku se kontroluje vzhled přípravku, úplnost značení a neporušenost obalu. Při transfuzi se používá plazma kompatibilní v systému AB0. AB plazma neobsahuje aglutininy anti-A a anti-B a lze ji podat příjemci kterékoli krevní skupiny. Před použitím se rozmrazí ve speciálním rozmrazovači a transfunduje co nejdříve, nejpozději do 6 hodin po rozmrazení. Indikace pro podání plazmy se v současné době výrazně omezují. Plazma se podává především v těchto případech: terapie a prevence krvácení u vrozených nebo získaných poruch hemostázy, nelze-li podat protivirově ošetřený koncentrát příslušného faktoru, velké

objemy plazmy se podávají při výměnné plazmaferéze v terapii pacientů s trombotickou trombocytopenickou purpurou (TTP) nebo s hemolyticko – uremickým syndromem (HUS) (Specifikace transfuzních přípravků – P, 2015).

Mezi nežádoucí reakce patří alergická reakce až anafylaktický šok, infekční komplikace, hemolýza při transfuzi AB0 inkompatibilní plazmy, akutní plicní nedostatečnost (TRALI), přetížení krevního oběhu, citrátová intoxikace při převodu většího množství plazmy v krátké době (Specifikace transfuzních přípravků – P, 2015).

1.3.3 Trombocytární transfuzní přípravky

Léčebnou složkou trombocytárních transfuzních přípravků jsou trombocyty. Přípravují se buď z plné krve centrifugacemi nebo odběrem dárce na separátoru (Specifikace transfuzních přípravků – TBSDR, 2016).

Trombocyty se skladují při teplotě 20 – 24 °C za neustálého promíchávání na třepačkách. Při transportu by měla být zajištěna teplota skladování. Doba použitelnosti je 5 dnů, může být prodloužena až na 7 dnů za předpokladu negativního vyšetření bakteriální kontaminace nebo aplikace postupu vedoucího ke snížení bakteriální kontaminace. Koncentráty trombocytů obsahují malá množství leukocytů a erytrocytů (Řeháček et al., 2013).

V transfuzní praxi je nejpoužívanějším transfuzním přípravkem trombocyty z buffy-coatu směsné deleukotizované v náhradním roztoku (TBSDR) a deleukotizované trombocyty z aferézy (TAD).

TBSDR je transfuzní přípravek získaný zpracováním 4 – 6 odběrů plné krve metodou využívající buffy-coaty k výrobě směsného deleukotizovaného koncentrátu trombocytů. Každá terapeutická dávka obsahuje nejméně 200×10^9 trombocytů. Množství leukocytů v transfuzním přípravku je snížen na $< 1 \times 10^6$ na terapeutickou dávku. Výroba trombocytů spočívá ve smísení 4 buffy-coatů, ke kterým se přidá resuspendovaný roztok. Následuje centrifugace a oddělení krevních destiček, které jsou resuspendovány ve směsi plazmy (30 – 40 %) a náhradního roztoku (60 – 70 %). Filtrací přes deleukotizační filtr je snížen obsah leukocytů. Použití náhradního roztoku umožňuje významně snížit obsah zbytkových aglutininů anti-A a anti-B. Zmenšený objem plazmy též snižuje možnost výskytu alergických reakcí na proteiny plazmy (Specifikace transfuzních přípravků – TBSDR, 2016).

Trombocyty z aferézy se připravují pomocí separátorů krevních elementů. Aferéza je metoda, která umožňuje odběr různých složek krve na separátoru. Pro odběr krevních destiček se metoda označuje jako trombocytferéza (Procházková et. al., 2007).

Transfuze trombocytů se podává profylakticky k prevenci krvácení u nemocných, kteří mají nižší počet trombocytů než $5 - 10 \times 10^9/l$, nebo nemocným s nižším počtem trombocytů před invazivním nebo chirurgickým výkonem. K terapeutickým účelům je transfuze trombocytů nutná k zástavě krvácení u nemocných s nižším počtem trombocytů nebo u pacientů s funkčně abnormálními trombocyty (Specifikace transfuzních přípravků – TBSD, 2015).

Před transfuzí trombocytů se neprovádí křížová zkouška. Pacientovi se vyšetří krevní skupina. Doporučuje se dodržení stejné krevní skupiny v ABO systému mezi dárce a příjemcem. V případě nedostatku stejnoskupinových destiček, shoda ABO systému nemusí být dodržena, pokud se jedná o trombokonzentrát resuspendovaný v náhradním roztoku, který obsahuje menší množství aglutininů anti-A, anti-B. Krevní destičky od Rh pozitivních dárců krve by neměly být podány Rh negativním ženám a mladým osobám. Před vydáním transfuzního přípravku se kontroluje značení, neporušenost obalu, vzhled přípravku, swirling fenomén. Swirlign (vířivý) fenomén je založený na lomu světla na pohybujících se neaktivovaných destičkách, je známkou dobré kvality přípravku (Specifikace transfuzních přípravků – TBSD, 2015).

Nežádoucí reakce, stejně jako u erytrocytů, lze rozdělit podle příčiny na imunitní komplikace (hemolytické reakce způsobené transfuzí přípravku obsahujícího ABO inkompatibilní plazmu, nehemolytické reakce jako zimnice, kopřivka, horečka, anafylaktická reakce, aloimunizace, TRALI, Ta-GvHD, alergické reakce, apod.), kardiovaskulární a metabolické komplikace (oběhové přetížení, hypotermie, hypotenze) a transfuzí přenosné infekce (virové, bakteriální a parazitární). Transfuze trombocytů by neměla být podávána u hemolyticko-uremického syndromu, u tromboticko trombocytopenické purpury a u heparinem indukované trombocytopenie (Specifikace transfuzních přípravků – TBSD, 2015).

Transfuzní přípravek TBSDR se na Transfuzním oddělení Nemocnice České Budějovice a.s. vyrábí od 29. 2. 2016. Před zahájením výroby TBSDR se vyráběly trombocyty z buffy-coatu směsné de leukotizované (TBSD), které se lišily postupem výroby. Při primárním zpracování se z jednoho odběru krve vyrobila jedna jednotka erytrocytů, plazmy a jedna jednotka TB. Transfuzní přípravek TBSD se připravil

sesátím 4 – 5 jednotek TB a filtrací přes deleukotizační filtr (Specifikace transfuzních přípravků – TBSD, 2015).

1.4 Kontrola jakosti transfuzních přípravků

Kvalita = Jakost

Kvalita neboli jakost je definována jako „Celkový souhrn vlastností a znaků výrobku nebo služby, které zaručují schopnost uspokojovat předem stanovené nebo předpokládané potřeby zákazníka“ (ČSN ISO 8402).

V České republice je výroba transfuzních přípravků považována za výrobu léčiv, je upravena zákonem č. 378/2007 Sb. (Zákon o léčivech), který je harmonizován s legislativou EU. Veškeré požadavky pro zajištění jakosti a bezpečnosti lidské krve a jejích složek jsou uvedeny ve vyhlášce č. 143/2008 Sb. (Vyhláška o lidské krvi), která respektuje pravidla doporučená v Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components Rady Evropy.

Transfuzní oddělení jsou kontrolována SUKLEM. SUKL v pravidelných intervalech kontroluje a přezkoumává celý systém jakosti a dodržování zásad správné výrobní praxe, na základě inspekce vydává povolení k výrobě transfuzních přípravků. Správná výrobní praxe představuje soubor opatření prováděných s cílem zajistit, aby produkt byl soustavně a kontrolovaně vyráběn v kvalitě odpovídající zamýšlenému použití. Produkt, tj. transfuzní přípravek podléhá tedy přísné kontrole kvality (Sandra et al., 2016).

Kontrolovat transfuzní přípravky na TRS má za úkol kontrolní laboratoř. Kontrolní laboratoře u transfuzních přípravků provádějí kontroly objemu nebo hmotnosti, kontrolu účinných složek, nežádoucích složek a kontrolu ukazatelů účinku, bezpečnosti a stability podle stanovených specifikací. Dále dle vyhlášky kontrolují účinnost dezinfekce místa venepunkce před odběrem krve a jejích složek, zajišťují mikrobiologickou kontrolu transfuzních přípravků za účelem kontroly procesu odběru a zpracování, provádějí mikrobiologickou kontrolu povrchů v prostorech, kde se manipuluje s vaky, odběry a produkty ve vacích bez dalšího obalu (Vyhláška č. 143/2008 Sb.).

Transfuzní přípravky se kontrolují namátkově, ale s dostatečnou četností tak, aby byla zajištěna statistická kontrola procesu. Náhodný výběr je prováděn osobou nezávislou na procesu zpracování. Odebraný vzorek musí odrážet vlastnosti, které jsou

hlavním předmětem kontroly kvality. Pro odběr vzorku a odebrané množství má každá laboratoř vypracovaný přesný postup (Penka et al., 2012).

Ve své bakalářské práci se budu zabývat pouze kontrolou kvality nejčastěji používaných transfuzních přípravků z plné krve: EBR, P a TBSDR.

V následujících tabulkách jsou uvedeny požadavky na kontrolu kvality a frekvence u jednotlivých transfuzních přípravků, které vycházejí z vyhlášky č. 143/2008 Sb. a z Guide to the preparation use and quality assurance of blood components.

U erytrocytárních transfuzních přípravků se sleduje hematokrit, obsah hemoglobinu, množství zbytkových leukocytů, hemolýza na konci expirace a provádí se kontrola sterility.

Tabulka 2 Kontrola jakosti EBR

Parametry	Požadavky	Frekvence kontrol
Objem	min 200 ml	všechny jednotky
Hematokrit	0,50 – 0,70	4 TU/měsíc
Hemoglobin	min 43 g / TU	4 TU/měsíc
Obsah leukocytů	$< 1,2 \times 10^9$ /TU	1 % TU
Hemolýza na konci expirace	$< 0,8$ % masy erytrocytů	4 TU/měsíc
Kontrola mikrobiologické kontaminace	negativní	dle Bensonova vzorce

Zdroj: Specifikace TP: EBR, 2015

U trombocytárních transfuzních přípravků se sleduje obsah trombocytů, obsah zbytkových leukocytů a hodnota pH. Povinná je také kontrola sterility.

Tabulka 3 Kontrola jakosti TBSDR

Parametry	Požadavky	Frekvence kontrol
Objem	> 40 ml na 60×10^9 trombocytů	všechny jednotky
Obsah krevních destiček	$> 200 \times 10^9$ /TD	1 % TD, nejméně však 10 měsíčně
Obsah leukocytů	$< 1,0 \times 10^6$ /TD	1 % TD, nejméně však 10 měsíčně
pH na konci expirace	6,4 – 7,4 korigované na 22 °C	1 % TD, nejméně však 4 měsíčně
Kontrola mikrobiologické kontaminace	negativní	dle Bensonova vzorce

Zdroj: Specifikace TP: TBSDR, 2016

U plazmatických přípravků se před šokovým zmrazením zjišťuje obsah celkové bílkoviny a počet zbytkových erytrocytů, leukocytů a trombocytů, po zmrazení obsah faktoru VIII. Stejně jako u předchozích transfuzních přípravků se kontroluje sterilita.

Tabulka 4 Kontrola jakosti plazmy

Parametry	Požadavky	Frekvence kontrol
Objem	min 200 ml	všechny jednotky
Faktor VIII	průměr (po zmrazení a rozmrazení) > 70 % hodnoty čerstvě odebrané jednotky plazmy	každé 3 měsíce 10 TU z prvního měsíce skladování
Celková bílkovina	> 50 g/l	5 TU/měsíc
Obsah buněčných elementů	erytrocyty < 6,0 x 10 ⁹ /l leukocyty < 0,1 x 10 ⁹ /l trombocyty < 50 x 10 ⁹ /l	1 % TU
Kontrola mikrobiologické kontaminace	negativní	dle Bensonova vzorce

Zdroj: Specifikace TP: Plazma, 2015

Vyšetření sterility se provádí u všech typů transfuzních přípravků s frekvencí kontrol podle tzv. Bensonova vzorce (počet kontrol = 0,4 * √počet vyrobených TP). Provádí se vždy na konci expirační doby. Vlastní vyšetření provádí mikrobiologická laboratoř. Výsledky jsou odrazem bezchybně prováděných postupů při odběru a zpracování odebrané krve (NCB_TRS_SOP_13_409_C).

U všech transfuzních přípravků se kontroluje celkový vzhled, který je charakteristický pro daný transfuzní přípravek. Vizualní kontrolou lze odhalit řadu změn. U erytrocytárního transfuzního přípravku je možné na základě změny charakteristické barvy zjistit zvýšenou hemolýzu. Lze odhalit i vzniklé sraženiny. U trombocytárního přípravku pozorujeme opět zbarvení přípravku, vyšší obsah lipidů (chylozita) a pozoruje se fenomén víření (swirling). Swirling je typický pro trombocyty, které jsou schopné adherovat a agregovat *in vivo*. Charakteristické zbarvení viditelné sraženiny a zakalení se hodnotí také u plazmatických transfuzních přípravků, a to před jejich zmrazením. Mezi vizualní kontrolu patří kontrola neporušenosti obalu a správného značení transfuzního přípravku štítky a čárovými kódy (Penka et al., 2012).

2 Cíle práce a hypotézy

2.1 Cíle práce

Cílem této bakalářské práce je statistické zhodnocení kontroly kvality vybraných transfuzních přípravků za posledních 5 let. Dále osvojení si metody vyšetření trombocytů z buffy-coatu směsných deleukotizovaných v náhradním roztoku TBSDR, které se v Nemocnici České Budějovice a.s. vyrábí novou metodikou a porovnání tohoto transfuzního přípravku s dříve vyráběnými trombocyty z buffy-coatu směsnými deleukotizovanými TBSD.

2.2 Hypotézy

1. Kontrola kvality TP musí být stále na vysoké úrovni, protože se jedná o léčivé přípravky.
2. Nově vyráběný TBSDR je kvalitnější než dřívější TBSD.
3. Nejrizikovější TP z hlediska sterility je trombocytární TP.

3 Metodika

Tato kapitola je rozdělena na dvě části. První část se týká statistického zhodnocení kontroly kvality za uplynulých 5 let u nejčastěji používaných transfuzních přípravků na TRS České Budějovice a.s., které se vyrábějí z plné krve. Ve druhé části jsem se věnovala kontrole kvality nově zavedeného TBSDR za období 6 měsíců, od dubna do konce září 2016. Zde jsem si osvojila postupy a vlastní vyšetření TBSDR. S touto částí jsem se v rámci bakalářské práce zabývala více a zkoumala ji podrobněji.

3.1 Statistické zpracování kontroly kvality u hodnocených transfuzních přípravků za posledních 5 let

Veškerá data, která jsem využila ke statistickému zpracování, jsem získala ze záznamů kontrolní laboratoře TRS Nemocnice České Budějovice a.s.

Kontrolní laboratoř se zabývá zejména odběrem kontrolních vzorků TP, jejich vyšetřením a hodnocením.

Kontrolní vzorky se odebírají jednak ihned po výrobě TP a vyšetřují se s cílem zjistit obsah účinných a příměs nežádoucích složek, a jednak na konci doby expirace se zaměřením na kontrolu stability TP. Pro odběr kontrolních vzorků jsou vypracovány přesné postupy. Kontroly se provádějí dle vyhlášky s dostatečnou četností, aby byla zajištěna statistická kontrola procesu. Na obsah účinných a nežádoucích složek je snaha zkontrolovat minimálně 1 % vyrobených TP. Na TRS České Budějovice a.s. vedoucí kontroly vypracovává týdenní, pro některé kontroly měsíční rozpis. Rozpis vychází z objemu výroby za minulý rok, zohledňuje proces výroby, možnosti laboratoří apod. a minimálně každý rok se aktualizuje. Výsledky pravidelných kontrol se zaznamenávají excelovských tabulek informačního systému kontrolní laboratoře a do připravených formulářů. Každý měsíc se provede měsíční statistické hodnocení, které se pravidelně projednává na poradách vedoucích pracovníků transfuzního oddělení. 1 x ročně se provádí roční statistické hodnocení kvality, výsledky se meziročně srovnávají.

Ke statistickému zpracování získaných dat jsem použila program Microsoft Excel. Sledované parametry jednotlivých TP jsem zhodnotila, vypočítala průměr, porovnávala se specifikacemi a zjistila, kolik hodnot vyhovuje specifikaci relativně, kolik absolutně.

Aritmetický průměr je definován jako statistická veličina, vyjadřující typickou hodnotu popisující soubor hodnot. Jedná se o součet všech hodnot vydělený jejich počtem (Mikulčák, 2007).

Četnost ukazuje, kolikrát se daná hodnota vyskytla. Četnosti jsou buď absolutní, nebo relativní. Větší soubor hodnot je vhodné rozdělit do intervalů. Čísla vyjadřující počet hodnot, které spadají do jednotlivých intervalů, jsou označována jako absolutní četnost. Součtem absolutních četností získáme celkový počet hodnot. Relativní četnost udává počet hodnot v daném intervalu, který je vztažený k celkovému počtu hodnot. Udává, jaké procento hodnot se vyskytuje v daném intervalu (Mikulčák, 2007).

Specifikace je detailní popis. Udává jasné a přesné informace o rozměrech, vlastnostech, kvalitě výrobku (Mikulčák, 2007).

Kontrolní vzorek je vzorek, který při jeho kontrole odráží vlastnosti, jež jsou předmětem prováděné kontroly (NCB_TRS_SOP_13_401_B).

Následující tabulky znázorňují počty kontrolních vzorků jednotlivých TP. Pro odběr kontrolních vzorků, odebíraných ihned po výrobě k vyšetření obsahu účinných a nežádoucích složek, je na TRS vypracován týdenní rozpis. Pro kontrolní vzorky, ze kterých jsou vyšetřovány zejména markery stability, je připraven měsíční rozpis (NCB_TRS_SOP_13_401_B).

Tabulka 5 Týdenní rozpis pro odběr kontrolních vzorků ihned po výrobě

Týdenní rozpis pro odběr kontrolních vzorků – počet vzorků					
	2012	2013	2014	2015	2016
EBR	5	5	5	5-6*	6
P	5	5	5	5-6*	6
TBSD	3	3	3	3	3 (do 2. 2016)
TBSDR					5 (od 2. 2016)
* do května 2015 5 /týdně, od května 2015 6/týdně					

Zdroj: autor

Tabulka 6 Měsíční rozpis pro odběr kontrolních vzorků 2012-2016 /TBSDR od 2. 2016)

Měsíční rozpis pro odběr kontrolních vzorků 2012-2016					
	Hemoglobin	Hemolýza	pH	Sterilita	Faktor VIII
EBR	4	4		10	
P				10	10/3 měsíce
TB			10	10	
TBSDR			4	4	

Zdroj: autor

3.1.1 EBR

Do 28. 2. 2016 byla plná krev odebírána do odběrových čtyřvaků. Od 29. 2. 2016, kdy se na TRS Nemocnice České Budějovice a.s. zavedla výroba TBSDR, je plná krev odebírána do odběrových trojvaků. Po odběru vaky hodinu odpočívají na chladících deskách. Následuje centrifugace na velkoobjemové centrifuze. Pomocí automatických separátorů krevních složek se provede separace na EBR, P a buffy-coat. Po ukončení výroby laborantka kontrolní laboratoře odebere kontrolní vzorky EBR a plazmy. Kontrolní vzorky se odebírají podle týdenního rozpisu.

Ze vzorku EBR se po výrobě vyšetřuje hematokrit a obsah leukocytů. Hematokrit konečného erytrocytového transfuzního přípravku, který se připravil oddělením erytrocytů z plné krve a přidáním konzervačního roztoku, by se měl pohybovat v rozmezí 0,50 – 0,70. Jedná se o poměr mezi objemem erytrocytů a objemem TP. Jeho obsah závisí na velikosti a množství červených krvinek. Obsah leukocytů by neměl být vyšší než $1,2 \times 10^9$ /TU. Parametry centrifugace (otáčky, doba točení, rozjezd, brzda) na velkoobjemových centrifugách a parametry na separátorech krevních složek jsou nastaveny a vyladěny tak, aby co nejvíce leukocytů zůstalo v buffy-coatu a co nejméně kontaminovalo EBR a plazmu (NCB_TRS_SOP_13_101_D).

Při odběru vzorku je vak s EBR nutné řádně míchat po dobu jedné minuty. Obsah hadičky sloužící pro kontrolní vzorek se stahovacími kleštěmi 1 x stáhne. Vak se opět promíchá a hadička se znovu napustí. Konec hadičky je oddělen svářečkou. Tento konec hadičky neobsahuje ideální vzorek a znehodnotí se. Pak se teprve oddělí segment asi 10 cm dlouhý, který je určen pro kontrolu kvality. Takto zhotovený segment je označen číslem a druhem transfuzního přípravku. Odebraný segment laborantka v kontrolní laboratoři přepustí do zkumavky. Vzorek se před měřením promíchá a změří se na analyzátoru CELL-DYN Emerald (NCB_TRS_SOP_13_101_D).

Na konci doby expirace se odebírají kontrolní vzorky za účelem stanovení celkového hemoglobinu a eventuelní hemolýzy. Kontrolují se 4 vzorky měsíčně. Hemoglobin je červené krevní barvivo, které slouží pro přenos krevních plynů. Jedna transfuzní jednotka EBR by ho měla obsahovat minimálně 43 g. Přítomnost volného hemoglobinu v supernatantu je považována za známku poškození membrány erytrocytů. K výpočtu % ztráty erytrocytů hemolýzou potřebujeme znát hodnotu celkového hemoglobinu, hodnotu hematokritu a volného hemoglobinu v supernatantu. Vak s EBR na konci doby expirace je nutné řádně promíchat. Z vaku se odpustí kontrolní vzorek pro stanovení hematokritu a celkového hemoglobinu. Měření se provádí na analyzátoru

CELL-DYN Emerald. Pak se zkumavka se vzorkem centrifuguje 5 min při 2000 G (tj. při 5000 ot./min.). Supernatant je oddělen do další zkumavky. Supernatantem se naplní kyveta Low Hemoglobin a změří se hodnota volného hemoglobinu na fotometru HemoCue Low Hemoglobin. Z hodnot hematokritu, celkového a volného hemoglobinu se vypočítá % ztráta erytrocytů hemolýzou (NCB_TRS_SOP_13_408_B).

$$\text{hemolýza (\%)} = \frac{100 - \text{Htc(\%)} \times \text{volný Hb(g/l)}}{\text{celkový Hb}}$$

Všechny výsledky vyšetření se zapisují do excelovských tabulek, pomocí kterých jsou vyšetřené hodnoty přepočítány na objem transfuzní jednotky. Získaná data jsem porovnávala se specifikacemi, vypočítala jsem průměr hodnot a zjistila, kolik hodnot vyhovuje specifikaci.

3.1.2 Plazma

Kontrolní vzorky plazmy, které se získávají ihned po výrobě, se odebírají zároveň s kontrolními vzorky EBR. To znamená, že po separaci na separátorech krevních složek z jednoho čísla odběru se odeberou kontrolní vzorky EBR i plazmy (NCB_TRS_SOP_13_104_G).

Plazma by měla obsahovat pouze zbytkové množství buněčných elementů. Ze vzorku plazmy se po výrobě vyšetřuje množství trombocytů, které by mělo být menší než $50 \times 10^9/l$, množství erytrocytů by mělo být menší než $6 \times 10^9/l$ a množství leukocytů menší než $0,1 \times 10^9/l$. Plazma by ale měla obsahovat žádoucí množství celkové bílkoviny, více než 50 g/l (NCB_TRS_SOP_13_401_C).

Po ukončení výroby přípravku se obsah vaku asi 1 min řádně míchá. Hadička určená pro kontrolku se 1 x stáhne stahovacími kleštěmi a napustí při současném promísení obsahu vaku. Pomocí svářečky se oddělí segment asi 10 cm dlouhý. Segment se označí číslem a druhem TP. Odebraný segment laborantka v kontrolní laboratoři přepustí do zkumavky (NCB_TRS_SOP_13_401_C).

Trombocyty v plazmě se měří na analyzátoru CELL-DYN Emerald, pokud je jejich obsah příliš nízký a analyzátor je nezměří, pak se počítají pomocí Bürkerovy komůrky. Množství erytrocytů a leukocytů v plazmě vzhledem k nízkému obsahu se počítá také v Bürkerově komůrce (NCB_TRS_SOP_13_403_C), (NCB_TRS_SOP_13_404_C), (NCB_TRS_SOP_12_405_B).

Jednou za měsíc, po vyšetření buněčných elementů, se 6 vzorků plazmy pošle na vyšetření celkové bílkoviny do Laboratoře klinické chemie. Principem vyšetření celkové bílkoviny je fotometrické stanovení pomocí biuretové metody. Celková bílkovina obsahuje plazmatické proteiny, které slouží hlavně pro udržování onkotického tlaku krve, srážení krve a k transportu látek (NCB_TRS_SOP_13_412_B).

Kontrola obsahu celkové bílkoviny a zbytkových buněk je prováděna ze vzorku připraveného před šokovým zmrazením. Obsah faktoru VIII se vyšetřuje ze vzorku po zmrazení a opětovném rozmrazení. Každé 3 měsíce se vyšetřuje 10 vzorků plazmy z prvního měsíce skladování. Plazma určená pro tuto kontrolu se šokově zmrazí. Skladuje se maximálně měsíc a poté se rozmrazí pomocí speciálního rozmrazovače. Z vaku plazmy se odpustí vzorek a zašle se na vyšetření do hematologické laboratoře, kde je vyšetření vždy předem domluveno. Principem metody je měření času srážení za situace, kdy ostatní faktory s výjimkou faktoru VIII jsou doplněny deficitní plazmou. Z výsledků jednotlivých vyšetření jsem vypočítala průměrnou hodnotu faktoru VIII. Průměrná hladina faktoru VIII by měla být vyšší než 70 % hodnoty čerstvě odebrané jednotky plazmy (NCB_TRS_SOP_13_415_B).

Všechny výsledky vyšetření se zapisují do excelovských tabulek. Získaná data jsem porovnávala se specifikacemi, vypočítala jsem průměr hodnot a zjistila, kolik hodnot vyhovuje specifikaci.

3.1.3 TBSD/TBSDR

V době výroby TBSD se při primárním zpracování odběru krve z jednoho odběru vyráběla jedna jednotka erytrocytů, plazmy a jedna jednotka TB. Až na základě požadavku z klinického oddělení se vyrobila jedna nebo více požadovaných terapeutických dávek TBSD (trombocyty z buffy-coatu směsné deleukotizované). Transfuzní přípravek TBSD se vyráběl sesátím 4 – 5 jednotek TB a filtrací přes deleukotizační filtr. Kontrolní vzorky TBSD byly odebírány ihned po výrobě. U vaku se ponechala delší hadička volně komunikující s vakem. Obsah hadičky se kleštěmi stáhl zpět do vaku. Vak se trojnásobným otočením promíchal. Po ukončení promíchání obsahu vaku se kleště uvolnily a hadička se naplnila obsahem vaku. Tento postup se 3 x opakoval. Hadička se oddělila svářečkou. Odebraný segment laborantka v kontrolní laboratoři přepustila do zkumavky. Kontrolní vzorek byl označen číslem a druhem přípravku. Ze vzorku se vyšetřoval žádoucí obsah trombocytů a nežádoucí příměs leukocytů (NCB_TRS_SOP_16_118_B).

Trombocyty se počítaly pomocí analyzátoru CELL-DYN Emerald. Leukocyty se počítaly mikroskopicky v Nageottově komůrce (NCB_TRS_SOP_13_404_B).

Kontrola pH a kontrola sterility u TBSD se neprováděla, protože po výrobě byl TP okamžitě vydán z transfuzního oddělení. Tyto kontroly se ale prováděly u jednotlivých TB na konci expirace. TB se vyráběly do zásoby, které se nespotřebovaly na výrobu TBSD, se použily na kontrolu sterility a pH.

Kontrolou kvality TBSDR se budu podrobně zabývat v další kapitole. Transfuzní přípravek TBSDR (trombocyty směsné deleukotizované v náhradním roztoku) je získán sesátím 4 buffy-coatů stejné krevní skupiny a náhradního roztoku. Tak vznikne jeden směsný buffy-coat ve směsi plazmy a náhradního roztoku. Vak se směsným buffy-coatem se centrifuguje a poté separuje na lisu, při separaci zároveň probíhá deleukotizace pomocí leukocytárního filtru. K výrobě se používá sterilní uzavřená souprava Compostop typ „chobotnice“, kdy nespornou výhodou je, že deleukotizace probíhá již během zpracování. Transfuzní přípravek TBSDR se vyrábí do zásoby. Z kontrolního vzorku se po výrobě vyšetřuje množství trombocytů a leukocytů. Na konci doby expirace se vyšetřuje pH a sterilita jako známky stability trombocytárního TP (NCB_TRS_SOP_16_118_B).

Všechny výsledky vyšetření se zapisují do excelovských tabulek, pomocí kterých jsou vyšetřené hodnoty pře počítány na objem terapeutické dávky. Získaná data jsem porovnávala se specifikacemi, vypočítala jsem průměr hodnot a zjistila, kolik hodnot vyhovuje specifikaci.

3.1.4 Kontrola sterility

Za sledované období se ke kontrole sterility zasílaly TP na konci expirace dle měsíčního rozpisu. Pokud nebylo k dispozici dostatečné množství expirujících TP, počet byl doplněn vzorky připravenými odsátím malého objemu do sterilně navařeného satelitního vaku. Odsátím vzorku nesmělo dojít ke snížení objemu TP pod hranici 1 TU. Objem vzorku ale musel být dostatečný pro kultivaci (NCB_TRS_SOP_13_409_C).

TP na konci expirace a eventuelně vzorky TP se zasílají do laboratoře lékařské mikrobiologie, která pak provádí pomocí kultivačního systému Bact/Alert aerobní a anaerobní kultivaci (NCB_TRS_SOP_13_409_C).

Výsledky se zapisují do formuláře „Seznam transfuzních přípravků ke kontrole sterility“. O provedených vyšetřeních a jejich výsledcích se zpracovává „Měsíční protokol kvality“ (NCB_TRS_SOP_13_409_C).

3.2 Kontrola kvality transfuzního přípravku TBSDR

V této části se zaměřím na vlastní vyšetření kontrolních vzorků nově vyráběného transfuzního přípravku TBSDR. V rámci vyšetření jsem si osvojila odběr vzorků pro kontrolu kvality, princip a postup měření na analyzátoru CELL-DYN Emerald, postup při počítání leukocytů v Nageottově komůrce, měření pH na konci expirace a přípravu vzorků pro kontrolu sterility.

3.2.1 Odběr vzorků

Odběr kontrolních vzorků na vyšetření účinných a nežádoucích složek se provádí ihned po výrobě TBSDR. Kontroluje se 5 vzorků týdně. Vak s vyrobeným trombokoncentrátem jsem důkladně promíchala a kontrolní vzorek jsem přepustila do označeného vzorkovacího váčku, který je součástí vaku. V kontrolní laboratoři jsem vzorek ze vzorkovacího váčku dále přepustila do zkumavky označené typem a číslem transfuzního přípravku a provedla vlastní vyšetření. Obsah trombocytů, jako účinné složky TBSDR, jsem vyšetřila na hematologickém analyzátoru CELL-DYN Emerald a obsah leukocytů, jako nežádoucí příměs, jsem stanovila mikroskopicky pomocí Nageottovy komůrky (NCB_TRS_SOP_13_401_B).

Na konci expirace TBSDR jsem měřila hodnotu pH, jako marker stability trombokoncentrátů a také připravila vaky pro vyšetření sterility (NCB_TRS_SOP_13_401_B).

3.2.2 Měření na analyzátoru CELL-DYN Emerald

Automatický CELL-DYN Emerald je hematologický analyzátor sloužící pro stanovování in vitro vzorků v laboratoři. Systém tohoto přístroje je ovládán nabídkou a řízen mikroprocesorem. Vzorek nasává pomocí nasávací jehly z otevřené zkumavky (Uživatelská příručka systému CELL-DYN Emerald).

Měřené parametry leukocytů

WBC: počet leukocytů

LYM %: procentuální podíl lymfocytů

LYM ≠: absolutní počet lymfocytů

MID %: procentuální podíl buněk střední velikosti

MID ≠: absolutní počet buněk střední velikosti

GRA %: procentuální podíl granulocytů

GRA ≠: absolutní počet granulocytů

Měřené parametry erytrocytů

RBC: počet erytrocytů

HTC: hematokrit

MCV: střední objem erytrocytů

RDW: distribuční šíře objem erytrocytů

Měřené parametry hemoglobinu

HGB: koncentrace hemoglobinu

MCH: střední množství hemoglobinu v erytrocytu

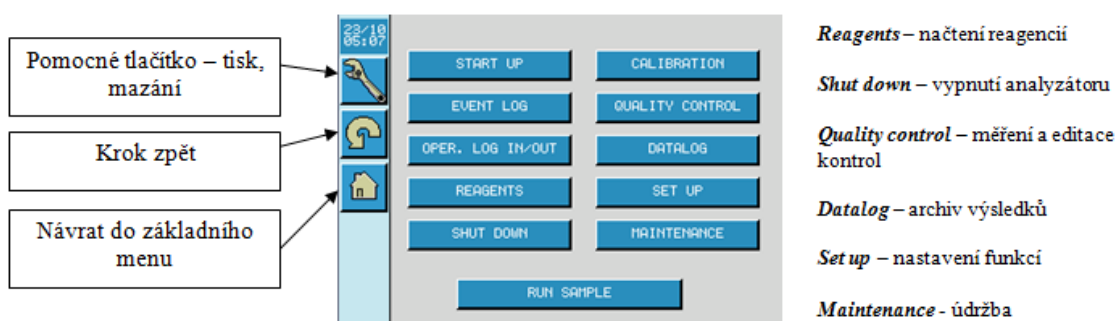
MCHC: střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytu

Měřené parametry krevních destiček

PLT: počet krevních destiček

MPV: střední objem trombocytů

(NCB_TRS_SOP_15_419_B)



Obrázek 4 Hlavní nabídka analyzátoru

Zdroj: NCB_TRS_SOP_15_419_B

- Princip vyšetření: pro počítání, třídění dle velikosti a klasifikace krevních buněk a měření hemoglobinu se používají dva typy měření:

- počítání elektrické impedance- pro měření RBC, WBC a PLT
- absorpční spektrofotometrie- pro měření HGB

- Popis: systém CELL-DYN Emerald se skládá z 8 hlavních součástí - přední panel s LCD displejem a numerickou klávesnicí, sestava hadiček, hlavní deska PCB, napájecí zdroj, prostor pro reagentie, zadní panel, tiskárna, čtečka čárových kódů.

- Chemikálie, reagenty a spotřební materiál:

CELL-DYN Emerald Diluent slouží

- jako diluent pro měření WBC, RBC, PLT a hemoglobinu
- k zachování objemu buněk v průběhu počítání a třídění buněk podle velikosti
- jako vodič pro impedanční počítání a třídění buněk a krevních destiček podle velikosti
- k propláchnutí nasávací jehly a sestavy hadiček

CELL-DYN Emerald CN FREE LYSE slouží

- k rychlé hemolýze RBC a minimalizaci vzniku buněčné vazivové tkáně (stroma)
- k nahrazení membrány WBC pro umožnění difuze cytoplazmy a vytvoření membrány okolo jádra a přítomnosti granulí
- k přeměně hemoglobinu na modifikovaný hemoglobin, který lze měřit při vlnové délce 555 nm

CELL-DYN Emerald CLEANER

- je enzymatický čistící roztok, který slouží k čištění měřicího systému a sestavy hadiček

CELL-DYN 18 Plus Control, Full-Pack, Half-Pack

- jedná se o komerční kontroly, které slouží ke každodennímu ověřování kalibrace
- obsahují známý počet buněk
- kontroly jsou k dispozici ve třech hladinách: L – nízká, N – normální, H – vysoká (NCB_TRS_SOP_15_419_B)

- Podrobný postup vyšetření:

Spuštění přístroje, přihlášení uživatele

- 1) Hlavním vypínačem jsem zapnula analyzátor, proběhla inicializace přístroje a kontrola motorů (kontrolka led svítila červeně).
- 2) Po dokončení inicializace se zobrazila obrazovka pro přihlášení uživatele, klikla jsem do kolonky Login a poté na tlačítko A – Z. Zapsala jsem jméno uživatele.
- 3) Potvrdila jsem tlačítkem OK.

Denní spouštění systému

- 1) V základním menu jsem inicializovala analyzátor stisknutím START UP pro zahájení cyklu pro spuštění. Během spuštění došlo k propláchnutí a čištění systému a kontrole mechanických a elektronických součástí. Na konci proběhlo automatické měření pozadí.

- 2) Před zpracováním kontrol nebo vzorků jsem musela zkontrolovat, zda se hodnoty měření pozadí nacházejí v přijatelném rozmezí.
- 3) Zkontrolovala jsem objem reagensů, v případě potřeby jsem reagensie vyměnila a vyprázdnila nádobu na odpad.

Tabulka 7 Specifikace pozadí

Specifikace pozadí	
Parametr	Specifikace
WBC	$\leq 0,5 \text{ K}/\mu\text{l}$
RBC	$\leq 0,1 \text{ M}/\mu\text{l}$
HGB	$\leq 0,2 \text{ g/dl}$
PLT	$\leq 10,0 \text{ K}/\mu\text{l}$

Zdroj: NCB_TRS_SOP_15_419_B

Měření kontrol

- 1) Před vyšetřením jsem kontroly řádně zahřála na laboratorní teplotu a promíchala.
- 2) V hlavní nabídce MAIN jsem stiskla tlačítko QUALITY CONTROL.
- 3) Otevřela jsem soubor dat o kontrole kvality klepnutím na odpovídající typ kontroly (L – nízká, N – normální, H – vysoká). Stiskla jsem tlačítko RUN AND RESULTS.
- 4) Z dostatečně promíchané vzorkové zkumavky obsahující kontrolu jsem sejmula víčko a otevřenou zkumavku umístila pod nasávací jehlu. Zvedla jsem zkumavku tak, aby byla jehla ponořena hluboko do vzorku.
- 5) Stiskla jsem spouštěcí spínač za nasávací jehlou.
- 6) Jakmile se jehla zasunula, odstranila jsem zkumavku.
- 7) Výsledky se zobrazily v dolní části tabulky s výsledky kontroly kvality. Zkontrolovala jsem, zda se výsledky kontrol nacházely v přijatelném rozmezí.
- 8) Klepla jsem na rozbalovací nabídku QUALITY CONTROL LOTS pro výběr další hladiny kontrol.
- 9) Vyšetřila jsem ostatní hladiny kontrol.

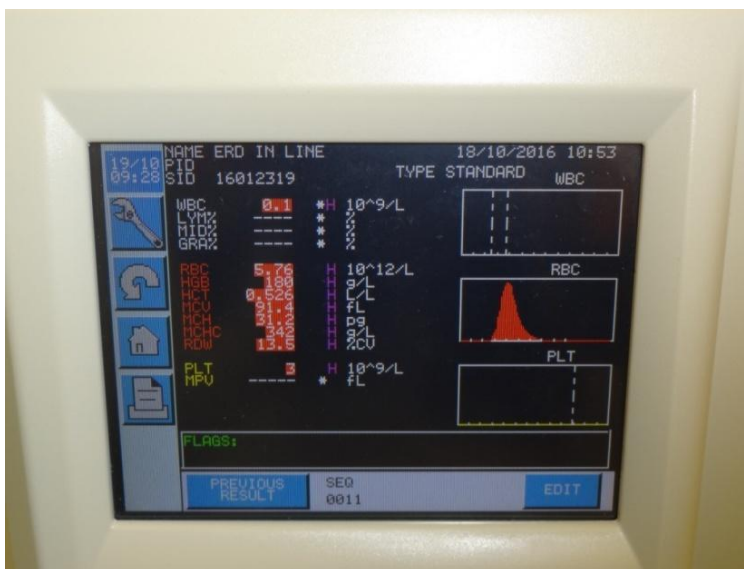
Měření vzorku

- 1) Před vyšetřením jsem vzorky míchala 10 minut na třepačce.
- 2) Provedla jsem identifikaci vzorku – v základním Menu jsem stiskla tlačítko RUN SAMPLE, poté NEXT SAMPLE.

- 3) Do pole NAME jsem zadala druh TP (TBSDR). Pro potvrzení a přesunutí kurzoru do dalšího pole jsem stiskla ENTER.
- 4) Pole PID se nevyplňuje.
- 5) Do pole SID jsem zapsala číslo TP. Pro potvrzení a přesunutí kurzoru do dalšího pole jsem stiskla ENTER.
- 6) Identifikaci vzorku jsem potvrdila pomocí CONFIRM, došlo k uložení a návratu na obrazovku RUN SAMPLE.
- 7) Ponořila jsem jehlu do řádně promíchaného vzorku a stiskla spouštěcí spínač, vizuálně jsem kontrolovala, zda je jehla dostatečně ponořena ve vzorku. LED dioda umístěná přímo nad nasávací jehlou začala blikat červeně.
- 8) Přidržela jsem zkumavku pod jehlou, dokud LED dioda nezačala svítit zeleně a jehla se neposunula směrem nahoru, pak jsem odložila zkumavku.
- 9) Po dokončení analýzy se na displeji objevily výsledky.
- 10) Tlačítkem NEXT SAMPLE bylo možné pokračovat v analýze dalšího vzorku.

Denní ukončení práce

- 1) Provedla jsem propláchnutí analyzátoru a v případě potřeby čištění dezinfekčním roztokem.
- 2) V hlavní nabídce MAIN jsem stiskla tlačítko SHUT DOWN. Po provedení cyklu ukončení práce se přístroj vypnul (NCB_TRS_SOP_15_419_B).



Obrázek 5 Výsledky měření

Zdroj: autor

3.2.3 Stanovení počtu bílých krvinek pomocí Nageottovy komůrky v deleukotizovaném trombocytárním koncentrátu TBSDR

Nageottova komůrka: je počítací komůrka dle Nageotta, která slouží pro počítání bílých krvinek v deleukotizovaných TP (Petersson et al., 2017).

- Princip: bílé krvinky se počítají v daném množství proužků (tj. v daném objemu) v Nageottově komůrce, a to podle pravidla dvou stran, tj. počítají se veškeré leukocyty, které se dotýkají námi dvou zvolených, na sebe kolmých stran.

- Použité chemikálie: Türckův roztok – Sloužící k počítání bílých krvinek a způsobuje rozpad nežádoucích elementů a k obarvení jader leukocytů.

- Přístroje a pomůcky: Nageottova komůrka o hloubce 0,5 mm, mikroskop, třepačka, pipety, Petriho miska

- Postup počítání leukocytů v Nageottově komůrce:

- 1) Zkumavky se vzorky jsem nechala třepat na třepačce po dobu 3 minut.
- 2) Do další umělohmotné zkumavky jsem napipetovala 900 μ l Türckova roztoku a do spodních vrstev tohoto roztoku jsem přenesla 100 μ l vyšetřovaného vzorku. Pipetu jsem opakovaně protáhla roztokem. Tím jsem naředila vzorek 10 x.
- 3) Naředěný vzorek jsem promíchala a nechala stát 10 minut.
- 4) Protřepala jsem jej na třepačce a naplnila jím komůrku.
- 5) Komůrku jsem umístila do vlhké komůrky v Petriho misce na 15 minut.
- 6) Po této době jsem počítala leukocyty ve všech 40 proužcích komůrky.
- 7) Výsledné hodnoty jsem zaznamenala do Knihy denních záznamů kontroly kvality TP a do výpočetního systému kontrolního úseku (NCB_TRS_SOP_13_404_C).

Vzoreček pro výpočet leukocytů v deleukotizovaném trombocytovém koncentrátu:

$$c = \frac{\text{počet LEU} \times 10}{5 \times 10^{-5}} = \text{počet LEU} \times 0,2 \times 10^6/l$$

c = koncentrace

3.2.4 Měření pH na konci expirace

- pH: záporný dekadický logaritmus koncentrace oxoniových iontů
- Princip: potenciometrie
- Chemikálie: roztoky pufrů sloužící ke kalibraci (Hamilton Duracal Buffer pH 4, 7, 10), 3M roztok KCl, purifikovaná voda
- Přístroje: pH metr inoLab pH 720, kombinovaná pH elektroda SenTix 81 s vestavěným teplotním čidlem, kádinky
- Materiál: vzorky trombocytárního koncentrátu na konci expirace
- Odběr vzorku: vak s trombocyty jsem řádně promíchala a část materiálu jsem převedla do kádinky. Z tohoto vzorku jsem následně prováděla měření pH.
- Postup měření pH:
 - 1) pH metr jsem zapojila do sítě a zapnula klávesou ON/OFF. Připojila jsem pH elektrodu a teplotní čidlo. Z elektrody jsem sejmula ochranný kryt s 3M KCl a otevřela plnicí otvor.
 - 2) Provedla jsem kalibraci elektrody. Opakovaně jsem stiskla CAL, na displeji se zobrazil symbol AutoCal TEC 1 a Ct1. Elektrodu jsem ponořila do prvního pufru s pH 4. Tlačítkem RUN ENTER jsem zahájila kalibraci. V okamžiku, kdy přístroj zjistil stabilní hodnotu pufru, na displeji se zobrazila značka Ct2. Po měření je nutné opláchnout elektrodu destilovanou vodou. Elektrodu jsem ponořila do pufru s pH 7 a pokračovala jsem v kalibraci tlačítkem RUN ENTER. Přístroj zjistil stabilní hodnotu, na displeji se zobrazila hodnota strmosti (vyhodnocení elektrody po dvoubodové kalibraci). Stiskla jsem klávesu RUN ENTER pro zobrazení hodnoty asymetrie. Potvrdit tlačítkem RUN ENTER a na displeji se zobrazilo Ct3. pH elektrodu jsem opět opláchnula. Poslední kalibraci jsem provedla ponořením elektrody do pufru s pH 10. Opět zmáčkla RUN ENTER. Přístroj zjistil stabilní hodnotu, na displeji se zobrazila hodnota strmosti. Stiskla jsem klávesu RUN ENTER pro zobrazení hodnoty asymetrie.

Po kalibraci jsem vyhodnotila senzorový symbol, hodnotu asymetrie a strmosti. Hodnoty musí odpovídat předepsaným parametrům.

- 3) Po kalibraci jsem zahájila proces vlastního měření. Stiskla jsem klávesu M. Elektrodu jsem ponořila do kádinky s měřeným vzorkem. Stisknutím klávesy M jsem se dostala do fáze měření pH. Klávesou AR jsem aktivovala funkci AutoRead a zmáčknutím RUN ENTER jsem tuto funkci zahájila. Na displeji blikal symbol AR, v okamžiku ustálení hodnoty pH se odečetla hodnota pH a symbol AR přestal blikat.
- 4) Výsledné pH jsem zaznamenala do formuláře „Kontrola pH v TP“.
- 5) Po ukončení měření jsem přístroj vypnula, odpojila ze sítě a elektrodu a teplotní čidlo opláchla destilovanou vodou. Uzavřela plnicí otvor a na elektrodu nasadila ochranný kryt s 3 M KCl (NCB_TRS_SOP_13_407_B).

3.2.5 *Kontrola sterility*

- Sterilita: nepřítomnost bakterií a hub v transfuzním přípravku

- Princip: provádí se pomocí mikrobiologického vyšetření v hemokultivačních lahvičkách automatického systému Bact/Alert.

- Materiál: TBSDR na konci expirace

- Chemikálie: hemokultivační lahvičky BactAlert SA - pro aerobní kultivaci, hemokultivační lahvičky BactAlert SN - pro anaerobní kultivaci

- Odběr vzorku: ke kontrole sterility se zasílají celé vaky TBSDR spolu s hemokultivačními lahvičkami. Vlastní vyšetření provádí Laboratoř lékařské mikrobiologie.

- Vyhodnocení: výsledky s negativní kultivací jsou hodnoceny jako vyhovující. Výsledky s pozitivní kultivací jsou neprodleně hlášeny vedoucímu kontroly kvality a primáři oddělení. Výsledky se zapisují do formuláře „Seznam transfuzních přípravků ke kontrole sterility“ (NCB_TRS_SOP_13_409_C).

4 Výsledky kontroly kvality

4.1 Výsledky statistického zhodnocení kontroly kvality u hodnocených transfuzních přípravků za posledních 5 let

Tabulky číslo 8 a 9 znázorňují kontrolované parametry u transfuzního přípravku **EBR** za posledních 5 let. Požadované hodnoty kontrolovaných parametrů jsou: hematokrit 0,50 – 0,70; obsah leukocytů $< 1,2 \times 10^9/\text{TU}$; hemoglobin $> 43 \text{ g/TU}$; hemolýza na konci expirace $< 0,8 \%$ ztráty erytrocytů (Specifikace transfuzních přípravků – EBR, 2015).

V roce 2015 se na TRS České Budějovice a.s. dokoupil další separátor krevních složek (lis), proto se na TRS zvýšil počet kontrolních vzorků týdně. Každý týden se odebírají kontrolní vzorky EBR a plazmy rovnoměrně ze všech lisů.

V roce 2015 byl zvýšen objem odebírané krve ze 450 ml na 460 ml. Vliv na objem EBR a plazmy mělo i zavedení výroby TBSDR, protože objem jednotlivých BC byl snížen přibližně o 20 ml. Zvýšením objemů EBR došlo k lehkému zvýšení i parametrů kontroly, které se přepočítávají na objem transfuzní jednotky.

Tabulka 8 Parametry EBR

EBR								
Specifikace: hematokrit 0,50 - 0,70; leukocyty $< 1,2 \times 10^9/\text{TU}$								
	Hematokrit				Leukocyty $10^9/\text{TU}$			
Rok	Průměr	Počet vzorků	Vyhovuje absolutně	Vyhovuje relativně v %	Průměr $10^9/\text{TU}$	Počet vzorků	Vyhovuje absolutně	Vyhovuje relativně v %
2012	0,56	275	266	96,4	0,49	275	259	94,2
2013	0,57	263	256	97,3	0,51	263	256	97,3
2014	0,57	260	256	98,5	0,48	260	254	97,7
2015	0,56	301	281	93,4	0,64	301	279	92,7
2016	0,56	305	301	98,7	0,67	305	296	97,0

Zdroj: autor

Tabulka 9 Parametry EBR

EBR								
Specifikace: hemoglobin > 43 g/TU; hemolýza na konci expirace < 0,8 % ztráty erytrocytů								
Rok	Hemoglobin g/TU				Hemolýza na konci expirace v %			
	Průměr g/TU	Počet vzorků	Vyhovuje absolutně	Vyhovuje relativně v %	Průměr % hemolýza ery	Počet vzorků	Vyhovuje absolutně	Vyhovuje relativně v %
2012	51,37	48	46	95,8	0,28	48	47	97,9
2013	50,09	48	44	91,7	0,30	48	47	97,9
2014	48,28	48	44	91,7	0,36	48	47	97,9
2015	51,89	48	45	93,8	0,38	48	48	100,0
2016	54,72	48	47	97,9	0,41	48	47	97,9

Zdroj: autor

Tabulky číslo 10, 11 a 12 znázorňují kontrolované parametry u transfuzního přípravku **plazmy**. Požadované hodnoty kontrolovaných parametrů jsou: obsah trombocytů < 50 x 10⁹/l; leukocytů < 0,1 x 10⁹/l; erytrocytů < 6 x 10⁹/l; celková bílkovina > 50 g/l; faktor VIII průměr > 70 % hodnoty čerstvě odebrané jednotky plazmy (Specifikace transfuzních přípravků – P, 2015).

Tabulka 10 Parametry plazmy

Plazma								
Specifikace: trombocyty < 50 x 10 ⁹ /l; leukocyty < 0,1 x 10 ⁹ /l								
Rok	Trombocyty 10⁹/l				Leukocyty 10⁹/l			
	Průměr 10 ⁹ /l	Počet vzorků	Vyhovuje absolutně	Vyhovuje relativně v %	Průměr 10 ⁹ /l	Počet vzorků	Vyhovuje absolutně	Vyhovuje relativně v %
2012	10	265	265	100,0	0,04	265	257	96,9
2013	9	263	263	100,0	0,03	263	258	98,1
2014	6	269	269	100,0	0,04	269	256	95,2
2015	8	298	298	100,0	0,03	298	284	95,3
2016	7	305	305	100,0	0,03	305	303	99,3

Zdroj: autor

Tabulka 11 Parametry plazmy

Plazma								
Specifikace: erytrocyty $< 6 \times 10^9/l$; celková bílkovina $> 50 \text{ g/l}$								
	Erytrocyty $10^9/l$				Celková bílkovina g/l			
Rok	Průměr $10^9/l$	Počet vzorků	Vyhovuje absolutně	Vyhovuje relativně v %	Průměr g/l	Počet vzorků	Vyhovuje absolutně	Vyhovuje relativně v %
2012	0,7	265	265	100,0	59	60	60	100,0
2013	0,6	263	263	100,0	60	60	60	100,0
2014	0,8	269	268	99,6	60	60	60	100,0
2015	0,6	298	298	100,0	61	67	67	100,0
2016	0,6	305	305	100,0	60	72	72	100,0

Zdroj: autor

Tabulka 12 Parametry plazmy

Plazma				
Specifikace: faktor VIII průměr $> 70 \%$ hodnoty čerstvě odebrané jednotky plazmy				
faktor VIII				
Rok	Průměr	Počet vzorků	Vyhovuje absolutně	Vyhovuje relativně v %
2012	127	4 x průměr z 10 vzorků	4	100
2013	147	4 x průměr z 10 vzorků	4	100
2014	115	4 x průměr z 10 vzorků	4	100
2015	137	4 x průměr z 10 vzorků	4	100
2016	133	4 x průměr z 10 vzorků	4	100

Zdroj: autor

Tabulka číslo 13 znázorňuje kontrolované parametry u transfuzních přípravků **TBSD a TBSDR**. Transfuzní přípravek TBSDR se v Nemocnici České Budějovice a.s. začal vyrábět od konce února 2016. Požadované hodnoty kontrolovaných parametrů jsou: trombocyty $> 200 \times 10^9/TD$; leukocyty $< 1,0 \times 10^6/TD$ (Specifikace transfuzních přípravků – TBSDR).

Tabulka 13 Parametry TBSD/ TBSDR

TBSD/ TBSDR								
Specifikace: trombocyty > 200 x 10⁹/TD; leukocyty < 1,0 x 10⁶/TD								
	Trombocyty 10⁹/TD				Leukocyty 10⁶/TD			
Rok	Průměr 10 ⁹ /TD	Počet vzorků	Vyhovuje absolutně	Vyhovuje relativně v %	Průměr 10 ⁶ /TD	Počet vzorků	Vyhovuje absolutně	Vyhovuje relativně v %
2012*	256	142	126	88,7	0,14	142	142	100,0
2013*	239	103	90	87,4	0,09	103	103	100,0
2014*	255	133	118	88,7	0,08	133	133	100,0
2015*	244	156	134	85,9	0,16	156	155	99,4
2016*	231	18	16	88,9	0,09	18	18	100,0
2016**	264	207	193	93,0	0,10	207	207	100,0
2012*- 2.2016 * TBSD / 2016** TBSDR								

Zdroj: autor

Tabulka číslo 14 představuje kontrolu pH u transfuzních přípravků TB a TBSDR. Požadovaná hodnota pH je v rozmezí 6,4 – 7,4 (Specifikace transfuzních přípravků – TBSDR, 2016).

Tabulka 14 Kontrola pH

TB/ TBSDR				
Specifikace: pH 6,4-7,4				
	pH			
Rok	Průměr pH	Počet vzorků	Vyhovuje absolutně	Vyhovuje relativně v %
2012*	7,24	120	115	95,8
2013*	7,30	120	112	93,3
2014*	7,28	120	113	94,2
2015*	7,24	120	120	100,0
2016*	7,25	20	20	100,0
2016**	7,32	40	40	100,0
2012*- 2.2016 * TB / 2016** TBSDR				

Zdroj: autor

V tabulce č. 15 je uveden počet jednotlivých transfuzních přípravků, u kterých byla provedena kontrola sterility. Za období 5 let byla zjištěna pozitivita pouze u jednoho transfuzního přípravku TBSDR.

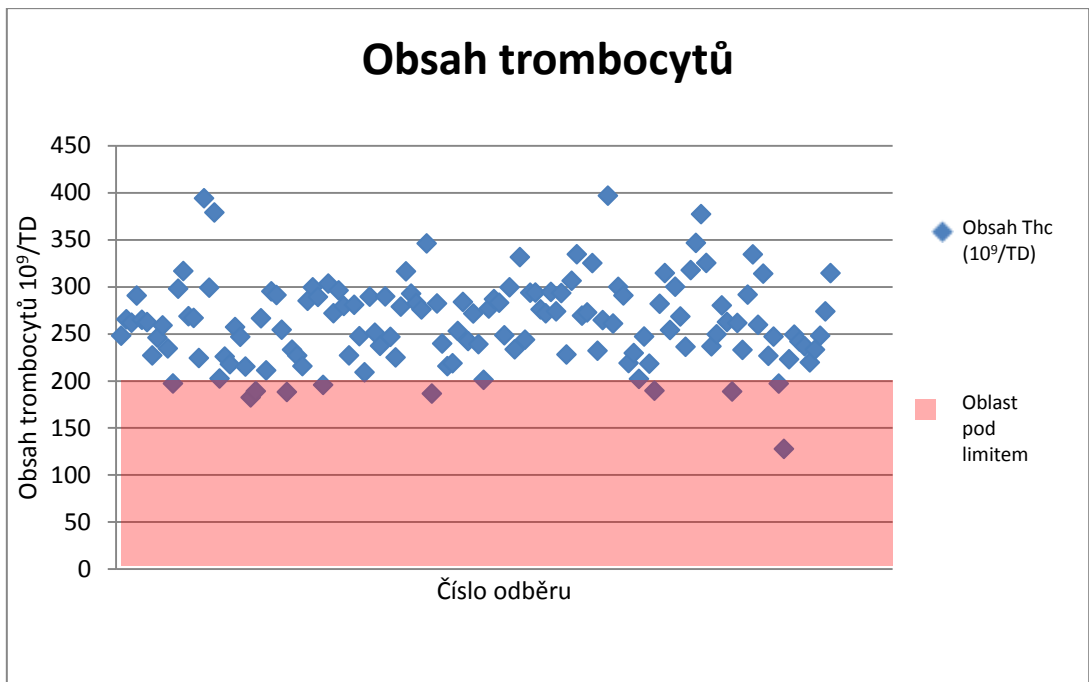
Tabulka 15 Kontrola sterility

Kontrola sterility					
Rok	EBR	Plazma	TB	TBSDR	Vyhovuje relativně v %
2012	121	120	120		100,0
2013	121	121	120		100,0
2014	121	120	120		100,0
2015	121	120	120		100,0
2016	122	120	20*	40**	97,5
* Do února 2016 TB / ** Od března 2016 TBSDR					

Zdroj: autor

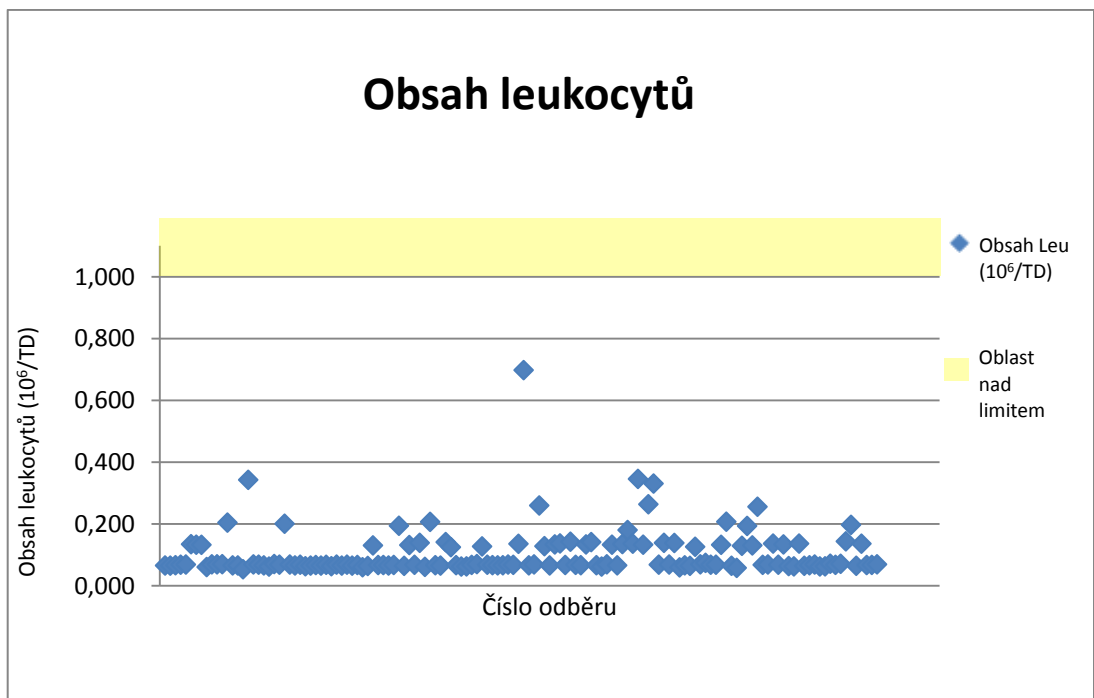
4.2 Výsledky kontroly kvality TBSDR za období 1. 4. do konce září 2016

V této části se budu zabývat zhodnocením kontroly kvality transfuzního přípravku TBSDR, a to za období od 1. 4. do 30. 9. 2016. V tomto období jsem v Nemocnici České Budějovice a.s. sbírala data, která jsem použila pro zpracování grafů a následného vyhodnocení. Také jsem si osvojila metody vyšetřování vzorků pro kontrolu kvality TBSDR. Data, ze kterých jsem čerpala, jsou k dispozici v příloze. Ke statistickému zpracování získaných dat byl použit program Microsoft Excel. Následující grafy (obrázek číslo 6 a 7) znázorňují obsah trombocytů a leukocytů v transfuzním přípravku TBSDR za dané období.



Obrázek 6 Obsah trombocytů v TBSDR

Zdroj: autor



Obrázek 7 Obsah leukocytů v TBSDR

Zdroj: autor

V tabulce číslo 16 je uvedena kontrola pH transfuzního přípravku TBSDR za dané období. Dle Vyhlášky o lidské krvi musí pH na konci expirační doby odpovídat rozmezí 6,4 – 7,4 (NCB_TRS_SOP_13_407_B).

Tabulka 16 Kontrola pH TBSDR

TBSDR					
<i>Kontrola pH za období od 1. 4. do konce září 2016</i>					
Měsíc	Pořadové číslo	pH	Měsíc	Pořadové číslo	pH
Duben	1.	7,38	Červenec	1.	7,39
	2.	7,31		2.	7,38
	3.	7,40		3.	7,40
	4.	7,34		4.	7,32
Květen	1.	7,31	Srpen	1.	7,40
	2.	7,40		2.	7,36
	3.	7,29		3.	7,37
	4.	7,24		4.	7,31
Červen	1.	7,28	Září	1.	7,10
	2.	7,37		2.	7,33
	3.	7,33		3.	7,31
	4.	7,35		4.	7,29
Průměr pH: 7,33					

Zdroj: autor

5 Diskuze

Ve své bakalářské práci jsem se věnovala pouze základním transfuzním přípravkům vyráběným z plné krve během posledních 5 let na TRS CB, a to jsou EBR (erytrocyty z buffy-coatu resuspendované), P (plazma), TBSD (trombocyty z buffy-coatu směsné delukotizované) a nově zavedené TBSDR (trombocyty z buffy-coatu směsné deleukotizované v náhradním roztoku). Zvažovala jsem i ERD, protože jeho význam a používání stále stoupá, ale rozsah bakalářské práce mi to už nedovolil. Společnost pro transfuzní lékařství podporuje stále větší používání ERD. Dle přednášky Řeháčka (2016) minimálně 3 pracoviště v České republice zavedlo plošnou deleukotizaci a EBR již nevyrábí (FNHK od 2011, Trutnov a UVN Praha od 2016).

Statistické hodnocení výše jmenovaných TP jsem zpracovala do tabulek, původní záměr zpracovat výsledky ve formě grafů jsem opustila, protože hodnocení TP během 5 sledovaných let se prakticky neměnil, a tudíž grafy neměly žádnou výpovědní hodnotu. Naopak při hodnocení nově zavedeného a podrobněji zpracovaného transfuzního přípravku TBSDR grafické zpracování ve formě grafů bylo výhodné a přehledné.

Kontrola kvality transfuzních přípravků má svoje specifika, protože dle Penky et al., (2012) šarži vlastně představuje jeden TP z jednoho odběru. Proto je nutná statistická kontrola procesu, která celý výrobní proces napomáhá udržet ve stabilním stavu a vede k vyšší standardizaci vyrobených TP. Počet kontrol musí odpovídat kvantitě výroby na ZTS. Dle Polokové (2017) pracovník kontrolní laboratoře musí pracovat nezávisle na ostatních úsecích výroby, aby byla zajištěna nezávislost kontroly. Všechny neshody a odchylky od nastavených limitů se musí řešit okamžitě z důvodů odstranění příčiny co nejdříve, aby kvalita vyrobených TP nebyla ovlivněna.

V průběhu posledních 5 let se průměrný hematokrit u EBR prakticky neměnil. Více než 93% vzorků ročně vždy vyhovovalo specifikaci. Vzorky s nevyhovujícím hematokritem většinou pocházely z odběrů od žen s nižším hemoglobinem. Obsah nežádoucích leukocytů v EBR během sledovaných let byl nízký, hluboko pod hranicí specifikace a v každém sledovaném roce více než 92 % vzorků vyhovovalo specifikaci. Obsah leukocytů v TP může být ovlivněn řadou faktorů. Těmito faktory se např. zabývá Jamborová ve své bakalářské práci na téma „Kontrola jakosti transfuzních přípravků-analýza trendů“ (2009). Uvádí, že mezi faktory ovlivňující množství leukocytů v TP

patří osoba dárce (každý dárce má jiný počet leukocytů), výroba (např. kvalita centrifug) a také vlastní zpracování (lidský faktor, pečlivost při zpracování). Průměrná hodnota celkového hemoglobinu se v jednotlivých letech pohybovala v rozmezí od 48,3 do 54,7 g/TU. Nejnižší počet vyhovujících vzorků 91,7 % byl v roce 2013 a 2014, nejvyšší 97,9 % v roce 2016. Stejně jako u hematokritu vzorky s nevyhovujícím hemoglobinem většinou pocházely z odběrů od žen s nižším vstupním Hb, objemy EBR z těchto odběrů byly podprůměrné. Hemolýza nad hranicí specifikace byla zjištěna maximálně u jednoho EBR ročně, vždy se jednalo o hodnotu těsně nad hranicí specifikace 0,83; 0,84 a 0,86 % ztráty erytrocytů hemolýzou.

Kvalita transfuzního přípravku plazmy za sledované období je stále na vysoké úrovni, a to ve všech sledovaných parametrech. Nízká kontaminace plazmy erytrocyty, leukocyty i trombocyty, vyhovující hodnota celkové bílkoviny i faktoru VIII, dělá plazmu kvalitním transfuzním přípravkem. Na TRS navíc kromě pravidelných kontrol provádějí v rámci validačních studií stanovení hladiny faktoru VIII u plazmy na konci expirace, tj. po 3 letech skladování. Výsledky jsou srovnatelné s hodnotami faktoru VIII plazmy kontrolované v prvním měsíci skladování.

Dalším sledovaným TP je TBSD, na TRS vyráběný do konce února 2016. V jednotlivých letech se průměrný obsah trombocytů v TBSD pohyboval od 231 do 256 x 10⁹/TD, byl vždy nad hranicí specifikace. Počet vyhovujících vzorků se nacházel v rozmezí od 85,9 % do 88,9 %. Obsah nežádoucích leukocytů byl tradičně nízký. Na obsah leukocytů v letech 2012 až 2014 bylo vyhovujících 100 % vzorků. Pouze v roce 2015 byl jeden transfuzní přípravek s vyšším počtem leukocytů těsně nad hranicí specifikace (leu < 1,0 x 10⁶/TD).

V roce 2016 během sledovaných 10 měsíců průměrný obsah trombocytů v novém TBSDR byl 264 x 10⁹/TD, z hlediska obsahu trombocytů specifikaci vyhovovalo 93 % vzorků. Obsah leukocytů byl nízký, pod hranicí specifikace, 100 % vzorků splňovalo kritérium kvality.

Kontrolou pH prošly všechny kontrolované trombocytární transfuzní přípravky, protože ani u jednoho přípravku nedošlo k vychýlení hodnot pH mimo stanovenou normu. Průměrná hodnota pH se nachází při horní hranici specifikace. Metabolickými a morfologickými změnami krevních buněk během skladování, a s tím související změna pH, se zabývá ve své práci Markery poškození krevních buněk Dr. Procházková z transfuzního oddělení Liberec. Uvádí, že poškození trombocytů souvisí s pH, za kritický pro viabilitu a funkci trombocytů je považován pokles pH pod hodnotu 6,2.

Dle Vyhlášky o lidské krvi je specifikace pro pH v rozmezí 6,4 – 7,4, ale Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components uvádí pouze dolní hranici pH 6,4.

Každý rok se kontrolovala sterilita průměrně u 120 EBR, 120 P, 120 TB a v posledním sledovaném roce u 40 TBSDR. Dle SUKLu sterilní přípravek je zárukou, že odběr a pracování krve proběhlo dle zásad správné výrobní praxe. Jeden pozitivní přípravek za celých 5 let TBSDR v roce 2016 byl pravděpodobně kontaminován kožní florou při venepunkci, což je při používání uzavřené odběrové soupravy jediným možným místem kontaminace TP. Proto je velmi důležité správně provádět dezinfekci místa venepunkce a Vyhláška o lidské krvi nařizuje dezinfekci místa venepunkce kontrolovat.

29. 2. 2016 na TRS začaly s výrobou TBSDR. Moje detailnější sledování jsem začala provádět po prvním měsíci rutinního provozu výroby TBSDR, tj. od 1. dubna, celkem 6 měsíců. Za sledované období se vyšetřilo 138 vzorků TBSDR. Průměrná hodnota obsahu trombocytů byla $263 \times 10^9/\text{TD}$, z celkového počtu absolutně vyhovovalo specifikaci 128 vzorků, tj. relativně 93 %. Průměrná hodnota obsahu leukocytů byla velmi nízká $0,104 \times 10^6/\text{TD}$. Všechny vzorky z hlediska obsahu leukocytů vyhovovaly specifikaci. Každý měsíc bylo změřeno pH u 4 přípravků, u všech se hodnota pH nacházela v požadovaném rozmezí. Sterilita TBSDR se vyšetřovala u 40 přípravků, u jednoho přípravku byl zjištěn pozitivní anaerobní nález, jak už je výše zmíněno.

K výrobě TBSDR se přistoupilo, protože takto vyrobené trombocytární koncentráty přinášejí pacientům i transfuznímu oddělení značné benefity. Výroba TBSDR přinesla příznivou změnu v organizaci výroby transfuzních přípravků. Na úseku výroby při primárním zpracování se vyrobí erytrocytární transfuzní přípravky, plazma a BC. Až po propuštění primární výroby je možné vyrábět TBSDR, a to v den odběru minimálně 2 hodiny od výroby BC nebo druhý den ráno, a to maximálně 22 hodin od výroby BC. Na základě validace se preferuje se výroba TBSDR druhý den ráno vzhledem k lepším výsledkům kontroly kvality.

Změna také přinesla velkou výhodu pro pohotovostní službu. V případě požadavku z klinického oddělení je trombocytární koncentrát již připraven k výdeji a laborant v pohotovostní službě ho nemusí teprve vyrábět, jak tomu bylo u TBSD.

Výroba TBSDR umožňuje použití levnějších trojvaků k odběrům plné krve. Dosud se používaly čtyřvaky. K výrobě 1 TD TBSDR se používají buffy-coaty standardně od

4 dárců. U TBSD se využívaly TB většinou od 5 dárců, což představovalo větší imunizaci pro pacienty a k výrobě stejného počtu trombocytárních přípravků bylo potřeba více dárců. U TBSDR probíhá deleukotizace již během zpracování, což je deleukotizace časnější a tudíž účinnější než u TBSD, kdy se deleukotizace prováděla po celou dobu používání TB až v případě požadavku z klinického oddělení. Při výrobě TBSDR se k resuspenzi trombocytů využívá místo větší části plazmy náhradní roztok, který je schopen zajistit podmínky pro skladování trombocytů stejně jako plazma. Snížením obsahu plazmy o 60 – 70 % se snižuje výskyt TRALI a dalších potransfuzních reakcí způsobených plazmou. Snížením obsahu plazmy také dochází ke snížení titrů aglutininů, což umožňuje univerzálnější použití trombocytů. Jako poslední výhodu TBSDR vidím vyšší obsah trombocytů v TD pro pacienty. Vzhledem ke krátké expiraci se určitou nevýhodou může zdát nutné pečlivé plánování výroby, aby co nejméně vyrobených TBSDR exspirovalo.

6 Závěr

V této části se pokusím potvrdit, nebo vyvrátit předem stanovené hypotézy.

Hypotéza č. 1 Kontrola kvality TP musí být stále na vysoké úrovni, protože se jedná o léčivé přípravky: Na TRS Nemocnice České Budějovice a.s. byl za posledních 5 let u 1404 vzorků EBR vyšetřen hematokrit a obsah leukocytů, u 240 vzorků celkový hemoglobin a hemolýza na konci expirace. Na hematokrit vyhovovalo specifikaci 96,9 % přípravků, na obsah leukocytů 95,8 %, hemoglobin byl vyhovující u 94,2 % přípravků a hemolýza byla zjištěna maximálně u jednoho přípravku za rok a vždy se jednalo o hodnoty jen velmi lehce zvýšené nad hranici specifikace.

Na obsah buněčných elementů bylo za sledované období vyšetřeno 1400 vzorků plazmy. Plazma byla stále na vysoké úrovni, a to ve všech sledovaných parametrech. Vyšetřením byla potvrzena nízká kontaminace plazmy erytrocyty (99,9 % vyhovujících), leukocyty (97,0 % vyhovujících) i trombocyty (100 % vyhovujících). U 100 % vzorků byla zjištěna vyhovující bílkovina i faktor VIII.

Z vyráběných TBSD bylo za 4 roky a 2 měsíce odebráno 552 vzorků, u kterých se vyšetřil obsah trombocytů a obsah leukocytů. Leukocyty vyhovovaly specifikaci prakticky u 100 % přípravků (pouze jeden nevyhověl s hraniční hodnotou), obsah trombocytů byl vyhovující u 84,7 % přípravků, jeho průměrná hodnota byla $245 \times 10^9/\text{TD}$. Nový TBSDR byl sledován celkem 10 měsíců, podrobněji 6 měsíců. Během této doby průměrná hodnota obsahu trombocytů byla $264 \times 10^9/\text{TD}$, vyšší než průměr TBSD ze sledovaného období. Leukocyty byly opět vyhovující ve 100 %.

Z výsledků vyšetření se dá vyvodit, že kvalita TP je na vysoké úrovni. Hypotéza č. 1 se potvrdila. Navíc nejnižší výsledek vyhovujících hodnot obsah trombocytů v TBSD se vyřešil zavedením výroby TBSDR.

Hypotéza č. 2 Nově vyráběný TBSDR je kvalitnější než dřívější TBSD: Nově zavedený TBSDR má nesporně několik výhod oproti dříve používanému TBSD. Pro pacienty je benefitem výroba TBSDR z odběrů pouze od 4 dárců, časná deleukotizace, snížení obsahu plazmy a zvýšení obsahu trombocytů v jedné terapeutické dávce. Pro transfuzní oddělení přineslo zavedení TBSDR určité změny. Výroba TBSDR umožňuje použití levnějších trojvaků k odběru plné krve, k výrobě TBSD se používaly čtyřvaky. Trombocyty jsou resuspendovány ve směsi plazmy a náhradního roztoku a získaná plazma se využije pro frakcionaci. Změna přinesla velkou výhodu pro

pohotovostní službu. V případě požadavku z klinického oddělení je trombocytární koncentrát již připraven k výdeji.

Hypotézou č. 2 se podařilo prokázat, že TP TBSDR je kvalitnější než TBSD. Hypotéza č. 3 Nejrizikovější TP z hlediska sterility je trombocytární TP: Během sledovaných 5 let byla zjištěna bakteriální kontaminace pouze u jednoho transfuzního přípravku, a to právě u trombocytárního TBSDR. Při anaerobní kultivaci byl zjištěn *Staphylococcus epidermidis* a *Propionibacterium acnes*. Jedná se o bakterie kožní flóry, které pravděpodobně kontaminovaly TP při venepunkci. Ke kontrole sterility byly zaslány i ostatní TP z odběrů, ze kterých byly vyrobeny kontaminované TBSDR. Jejich aerobní i anaerobní kultivace byly negativní. Pravděpodobně teplota skladování trombocytárního přípravku byla pro zmíněné bakterie příznivá, proto se trombocytární TP jeví z hlediska sterility jako nejrizikovější. Hypotéza č. 3 byla potvrzena, i když pouze na 1 příkladu.

7 Seznam literatury

1. ABOUL, E., A., ABDEL, R., H., ABDEL, M., M., EL, S., H., 2017. *The effect of different methods of leucoreduction on plasma coagulation factors* [databáze]. Blood Coagul Fibrinolysis [cit.2017-03-08]. DOI: 10.1097/MBC.0000000000000548. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28182588>
2. BRETTNER, F., von DOSSOW, V., CHAPPELL, D., 2017. *The endothelial glycocalyx and perioperative lung Injury* [databáze]. View Journal Information [cit.2017-03-08]. DOI: 10.1097/ACO.0000000000000434. Dostupné z: http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=20&SID=2Ab8SUiH4PciUiEAyTL&page=1&doc=1&caheurlFromRightClick=no
3. ČSN ISO 8402, © 2005-2015. *Management jakosti a zabezpečování jakosti. Slovník* [online]. [cit.2017-2-22]. Dostupné z: http://www.technicke-normy-csn.cz/010300-csn-iso-8402_4_18202.html
4. DIRECTORATE FOR THE QUALITY OF MEDICINES & HEALTHCARE OF THE COUNCIL OF EUROPE (EDQM). 2015. *Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components*. 18th Edition . Strasbourg: Council of Europe Pub, p. 97-99. ISBN 978-92-871-8071-1.
5. Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP, č. STL2009_05 ze dne 15. 5. 2009 verze 2 (2012_01), *Výšetřování známek infekce u dárců krve a krevních složek* [online]. [cit.2016-12-20]. Dostupné z: http://www.transfuznispolecnost.cz/index.php?page=dokumenty&identifikator_kategorie=DOPORUCENE_POSTUPY
6. 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.2016-11-23]. Dostupné z: http://www.transfuznispolecnost.cz/index.php?page=dokumenty&identifikator_kategorie=DOPORUCENE_POSTUPY
7. JAMBOROVÁ, I., 2009. *Kontrola jakosti transfuzních přípravků- analýzy trendů*. Brno. Bakalářská práce. Masarykova univerzita. 36 s.

8. Metodické opatření MZ, 2013. *Standard značení transfuzních přípravků* [online]. [cit.2017-1-15]. Dostupné z: <http://www.transfuznispolecnost.cz/index.php?page=novinky>
9. MIKULČÁK, J., 2007. *Matematické, fyzikální a chemické tabulky pro střední školy*. 4. vydání. Praha: Prometheus, s. 30-31. ISBN 978-80-719-6345-5.
10. PENKA, M., TESAŘOVÁ, E., a kol., 2011. *Hematologie a transfuzní lékařství I: Hematologie*. Praha: Grada. 98 s. ISBN 9788-0247-3459-0.
11. PENKA, M., TESAŘOVÁ, E., a kol., 2012. *Hematologie a transfuzní lékařství II: Transfuzní lékařství*. 1. vydání. Praha: Grada, s. 27-40, 115-117, 123-128. ISBN 978-80-247-3460-6.
12. PETERSSON, A., EKBLÖM, K., 2017. *Methods for counting residual leukocytes in leukocyte-depleted plasma-a comparison between a routine hematology instrument, the Nageotte chamber, flow cytometry, and a fluorescent microscopy analyzer* [databáze]. Transfusion [cit.2017-03-08]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28130849>
13. PROCHÁZKOVÁ, R., 2013. Markery poškození krevních buňek. *Transfuze a hematologie dnes*, roč. 13, č. 4, s. 240-243. ISSN 1213-5763.
14. PROCHÁZKOVÁ, R., ANDRÝS, C., HUBÁČKOVÁ, L., KREJSEK, J., 2007. *Markers of platelet activation and apoptosis in platelet concentrates collected by apheresis* [databáze]. Transfusion and apheresis science [cit.2017-03-08]. ISSN: 1473-0502. Dostupné z: <http://www.medvik.cz/bmc/view.do?gid=831443>
15. ŘEHÁČEK, V., 2016. Přednášky 10. Střešovický transfuzní den, *Deleukotizace transfuzních přípravků - dočká se český pacient?* [online]. [cit.2017-3-28]. Dostupné z: [file:///C:/Users/uzivatel/Downloads/02_rehacek Stresovice deleukotizaceTP de f.pdf](file:///C:/Users/uzivatel/Downloads/02_rehacek_Stresovice_deleukotizaceTP_de_f.pdf)
16. ŘEHÁČEK, V., MASOPUST, J., a kol., 2013. *Transfuzní lékařství*. 1. vydání. Praha: Grada, s. 23-35. ISBN 978-80-247-4534-3.
17. Řízená dokumentace Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice a.s., NCB_TRS_SOP_13_401_C, *Odběr vzorků transfuzních přípravků kontroly kvality*

18. Řízená dokumentace Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice a.s.,
NCB_TRS_SME_12_007_B, *Postup při záchytu reaktivních výsledků vyšetření
infekčních markerů krve a jejích složek*
19. Řízená dokumentace Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice a.s.,
NCB_TRS_SOP_13_003_C, *Vyšetření před odběrem plné krve*
20. Řízená dokumentace Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice a.s.,
NCB_TRS_SOP_13_409_C, *Kontrola sterility transfuzních přípravků,
meziproduktů a suroviny pro další výrobu*
21. Řízená dokumentace Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice a.s.,
NCB_TRS_SOP_13_404_C, *Kontrola počtu leukocytů v transfuzních
přípravcích (vyšetření v počítacích komůrkách)*
22. Řízená dokumentace Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice a.s.,
NCB_TRS_SOP_13_412_B, *Kontrola celkové bílkoviny v transfuzních
přípravcích*
23. Řízená dokumentace Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice a.s.,
NCB_TRS_SOP_13_415_B, *Kontrola hladiny faktoru VIII v plazmě*
24. Řízená dokumentace Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice a.s.,
NCB_TRS_SOP_13_407_B, *Kontrola pH v transfuzních přípravcích*
25. Řízená dokumentace Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice a.s.,
NCB_TRS_SOP_15_419_B, *Kontrola obsahu účinných a nežádoucích složek v
TP na analyzátoru CELL-DYN Emerald*
26. Řízená dokumentace Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice a.s.,
NCB_TRS_SOP_13_210_A, *Obsluha analyzátorů ARCHITECT i2000 SR a
i1000 SR*
27. Řízená dokumentace Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice a.s.,
NCB_TRS_SOP_13_202_B, *Obsluha rozplňovacího zařízení QASAR IV a Duet
Reader*
28. Řízená dokumentace Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice a.s.,
NCB_TRS_SOP_13_401_B, *Odběr vzorků transfuzních přípravků pro kontrolu
kvality*
29. Řízená dokumentace Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice a.s.,
NCB_TRS_SOP_16_118_B, *Trombocyty z buffy-coatu směsné deleukotizované
v náhradním roztoku (TBSDR)*

30. Řízená dokumentace Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice a.s.,
NCB_TRS_SOP_13_104_G, *Plazma z plné krve pro klinické použití (P)*
31. Řízená dokumentace Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice a.s.,
NCB_TRS_SOP_13_101_D, *Erytrocyty bez buffy-coatu resuspendované (EBR)*
32. Řízená dokumentace Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice a.s.,
NCB_TRS_SOP_13_403_C, *Kontrola počtu trombocytů v transfuzních
přípravcích (vyšetření v Bürkerově komůrce)*
33. Řízená dokumentace Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice a.s.,
NCB_TRS_SOP_13_404_B, *Kontrola počtu leukocytů v transfuzních
přípravcích (vyšetření v počítacích komůrkách)*
34. Řízená dokumentace Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice a.s.,
NCB_TRS_SOP_12_405_B, *Kontrola počtu erytrocytů v transfuzních
přípravcích (vyšetření v Bürkerově komůrce)*
35. Řízená dokumentace Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice a.s.,
NCB_TRS_SOP_13_408_B, *Kontrola celkového a volného hemoglobinu
v transfuzních přípravcích (pomocí fotometru HemoCue)*
36. SANDRA, R., A., DENESE, C., M., JASON, P., A., WILLIAM, P., S., 2016.
Quality and Safety of Blood Products [databáze]. J Blood Transfus [cit.2017-03-
08]. DOI: 10.1155/2016/2482157. Dostupné z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5227165/>
37. SlidePlayer, © 2017. *Kontroly jakosti v ZTS MVDr. Nad'a Poloková, TTO FN
Brno* [online]. [cit.2017-3-28]. Dostupné z: <http://slideplayer.cz/slide/11438057/>
38. Specifikace transfuzních přípravků Nemocnice České Budějovice a.s. pro
klinické účely, 2015. *Erytrocyty bez buffy-coatu resuspendované-EBR*
39. Specifikace transfuzních přípravků Nemocnice České Budějovice a.s. pro
klinické účely, 2015, *Erytrocyty resuspendované deleukotizované-ERD*
40. Specifikace transfuzních přípravků Nemocnice České Budějovice a.s. pro
klinické účely, 2016, *Trombocyty z buffy-coatu směsné deleukotizované v
náhradním roztoku-TBSDR*
41. Specifikace transfuzních přípravků Nemocnice České Budějovice a.s. pro
klinické účely, 2015, *Trombocyty z buffy-coatu směsné deleukotizované-TBSD*
42. Specifikace transfuzních přípravků Nemocnice České Budějovice a.s. pro
klinické účely, 2015, *Plazma-P*

43. Společnost pro transfuzní lékařství, © 2017. *Pro dárce* [online]. [cit.2017-2-22].
Dostupné z: http://www.transfuznispolecnost.cz/index.php?page=pro_darce
44. Státní ústav pro kontrolu léčiv, 2007. *Informace SÚKL pro kontrolní laboratoře provádějící mikrobiologické zkoušení nesterilních výrobků* [online]. [cit.2017-3-30]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/informace-sukl-pro-kontrolni-laboratore-provadejici>
45. ŠŤASTNÁ, J., 2009. *Výroba transfuzních přípravků z odběru plné krve*. Brno. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, s. 18-19.
46. Uživatelská příručka systému Architect
47. Uživatelská příručka systému CELL-DYN Emerald
48. VYHLÁŠKA č. 143/2008 Sb. ze dne 15. dubna 2008, *O stanovení bližších požadavků pro zajištění jakosti a bezpečnosti lidské krve a jejích složek (Vyhláška o lidské krvi)* [online]. [cit.2017-2-22]. Dostupné z: http://www.transfuznispolecnost.cz/index.php?page=dokumenty&identifikator_kategorie=LEGISLATIVNI_NORMY

8 Seznam tabulek, obrázků a příloh

Tabulka 1 Minimální rozsah předodběrového vyšetření.....	10
Tabulka 2 Kontrola jakosti EBR	26
Tabulka 3 Kontrola jakosti TBSDR	26
Tabulka 4 Kontrola jakosti plazmy	27
Tabulka 5 Týdenní rozpis pro odběr kontrolních vzorků ihned po výrobě.....	30
Tabulka 6 Měsíční rozpis pro odběr kontrolních vzorků 2012-2016 /TBSDR od 2. 2016).....	30
Tabulka 7 Specifikace pozadí	38
Tabulka 8 Parametry EBR.....	43
Tabulka 9 Parametry EBR.....	44
Tabulka 10 Parametry plazmy.....	44
Tabulka 11 Parametry plazmy.....	45
Tabulka 12 Parametry plazmy.....	45
Tabulka 13 Parametry TBSD/ TBSDR	46
Tabulka 14 Kontrola pH.....	46
Tabulka 15 Kontrola sterility	47
Tabulka 16 Kontrola pH TBSDR.....	49
Obrázek 1 Analyzátor Architect.....	12
Obrázek 2 Rozplňovač Qasar IV	13
Obrázek 3 Vyšetření krevní skupiny na mikrotitrační destičce	13
Obrázek 4 Hlavní nabídka analyzátoru	36
Obrázek 5 Výsledky měření	39
Obrázek 6 Obsah trombocytů v TBSDR.....	48
Obrázek 7 Obsah leukocytů v TBSDR	48
Příloha 1: Data pro kontrolu kvality TBSDR.....	64

9 Seznam zkratek

- AIDS** – acquired immune deficiency syndrome
- BC** – buffy-coat
- CB** – České Budějovice
- CMV** – cytomegalovirus
- CPD** – citronan-fosforečnan-glukosy
- ČSN** – Československá státní norma
- DNA** – deoxyribonukleová kyselina
- EBR** – erytrocyty bez buffy-coatu nesuspendované
- EBV** – Epstein Barrové viru
- ERD** – erytrocyty resuspendované deleukotizované
- EU** – Evropská unie
- FNHK** – Fakultní nemocnice Hradec Králové
- FNHTR** – febrilní non-hemolytická transfuzní reakce
- GvHD** – reakce štěpu proti hostiteli
- Hb** – hemoglobin
- HBV** – hepatitida B
- HCV** – hepatitida C
- HIV** – human immunodeficiency virus
- HLA** – human leukocyte antigen
- HNA** – human neutrophil antigen
- HTC** – hematokrit
- HUS** – hemolyticko-uremický syndrom
- IgA** – imunoglobulin A
- LEU** – leukocyty
- LIS** – laboratorní informační systém
- MZ** – Ministerstvo zdravotnictví
- NCB** – Nemocnice České Budějovice
- NRL** – Národní referenční laboratoř
- P** – plazma
- PLT** – počet krevních destiček
- RBC** – počet erytrocytů
- RNA** – ribonukleová kyselina

SOP – standardní operační postupy
SPC – statistická kontrola procesu
STL – Společnost pro transfuzní lékařství
SUKL – Státní ústav pro kontrolu léčiv
SVP – správná výrobní praxe
TB – trombocytové přípravky z buffy-coatu
TBSD – trombocyty z buffy-coatu směsné delukotizované
TBSDR – trombocyty z buffy-coatu směsné deleukotizované v náhradním roztoku
TD – terapeutická dávka
The – trombocyty
TP – transfuzní přípravek
TRALI – transfusion related acute lung injuri
TRS – transfuzní oddělení
TTP – trombotická trombocytopenická purpura
TU – transfuzní jednotka
UV – ultrafialové záření
UVN – Ústřední vojenská nemocnice
WBC – leukocyty
WBC – počet leukocytů
WHO – World health organisation
ZTS – zařízením transfuzní služby

10 Příloha

Příloha č. 1 Data pro kontrolu kvality TBSDR

TBSDR za období 1. 4. do konce září 2016						
Specifikace:						
Obsah trombocytů: > 200 x 10 ⁹ /TD, Obsah leukocytů: < 1,0 x 10 ⁶ /TD						
Datum výroby TP	Číslo TP	Objem TP (ml)	Obsah Thc (10 ⁹ /l)	Obsah Thc (10 ⁹ /TD)	Obsah Leu (10 ⁶ /l)	Obsah Leu (10 ⁶ /TD)
1. 4. 2016	16600277	329	754	248	0,2	0,066
1. 4. 2016	16600278	327	812	266	0,2	0,065
1. 4. 2016	16600279	334	784	262	0,2	0,067
1. 4. 2016	16600280	342	850	291	0,2	0,068
1. 4. 2016	16600281	345	768	265	0,2	0,069
4. 4. 2016	16600289	337	779	263	0,4	0,135
4. 4. 2016	16600290	333	682	227	0,4	0,133
5. 4. 2016	16600291	332	741	246	0,4	0,133
7. 4. 2016	16600297	304	852	259	0,2	0,061
11. 4. 2016	16600301	348	674	235	0,2	0,070
11. 4. 2016	16600304	348	567	197	0,2	0,070
12. 4. 2016	16600305	351	849	298	0,2	0,070
12. 4. 2016	16600306	341	929	317	0,6	0,205
12. 4. 2016	16600308	331	812	269	0,2	0,066
15. 4. 2016	16600312	330	809	267	0,2	0,066
15. 4. 2016	16600314	269	834	224	0,2	0,054
18. 4. 2016	16600321	343	1149	394	1,0	0,343
18. 4. 2016	16600322	347	862	299	0,2	0,069
18. 4. 2016	16600323	343	1105	379	0,2	0,069
2. 5. 2016	16600364	331	612	203	0,2	0,066
2. 5. 2016	16600366	312	724	226	0,2	0,062
2. 5. 2016	16600367	353	617	218	0,2	0,071
3. 5. 2016	16600368	343	750	257	0,2	0,069

Datum výroby TP	Číslo TP	Objem TP (ml)	Obsah Thc (10⁹/l)	Obsah Thc (10⁹/TD)	Obsah Leu (10⁶/l)	Obsah Leu (10⁶/TD)
9. 5. 2016	16600384	330	553	182	0,2	0,066
9. 5. 2016	16600385	342	553	189	0,2	0,068
10. 5. 2016	16600386	317	841	267	0,2	0,063
10. 5. 2016	16600387	328	644	211	0,2	0,066
11. 5. 2016	16600389	337	876	295	0,2	0,067
11. 5. 2016	16600390	328	888	291	0,2	0,066
16. 5. 2016	16600401	341	746	254	0,2	0,068
16. 5. 2016	16600402	318	592	188	0,2	0,064
16. 5. 2016	16600403	344	678	233	0,2	0,069
16. 5. 2016	16600404	328	692	227	0,2	0,066
17. 5. 2016	16600406	343	629	216	0,2	0,069
23. 5. 2016	16600427	327	872	285	0,2	0,065
23. 5. 2016	16600428	338	886	299	0,2	0,068
23. 5. 2016	16600429	301	961	289	0,2	0,060
23. 5. 2016	16600430	322	608	196	0,2	0,064
23. 5. 2016	16600431	327	928	303	0,4	0,131
31. 5. 2016	16600458	337	807	272	0,2	0,067
31. 5. 2016	16600459	337	879	296	0,2	0,067
31. 5. 2016	16600460	329	850	280	0,2	0,066
31. 5. 2016	16600461	338	672	227	0,2	0,068
2. 6. 2016	16600462	324	867	281	0,6	0,194
2. 6. 2016	16600464	324	764	248	0,2	0,065
2. 6. 2016	16600465	330	634	209	0,4	0,132
6. 6. 2016	16600472	341	849	290	0,2	0,068
6. 6. 2016	16600473	348	722	251	0,4	0,139
6. 6. 2016	16600475	307	773	237	0,2	0,061
6. 6. 2016	16600476	345	840	290	0,6	0,207
6. 6. 2016	16600477	334	739	247	0,2	0,067
13. 6. 2016	16600501	328	686	225	0,2	0,066
13. 6. 2016	16600502	354	788	279	0,4	0,142

Datum výroby TP	Číslo TP	Objem TP (ml)	Obsah Thc (10⁹/l)	Obsah Thc (10⁹/TD)	Obsah Leu (10⁶/l)	Obsah Leu (10⁶/TD)
13. 6. 2016	16600504	335	874	293	0,2	0,067
13. 6. 2016	16600505	313	903	283	0,2	0,063
13. 6. 2016	16600503	315	876	276	0,2	0,063
20. 6. 2016	16600519	339	1021	346	0,2	0,068
20. 6. 2016	16600520	352	530	187	0,2	0,070
21. 6. 2016	16600521	319	885	282	0,4	0,128
21. 6. 2016	16600522	342	701	240	0,2	0,068
22. 6. 2016	16600525	335	644	216	0,2	0,067
28. 6. 2016	16600538	332	659	219	0,2	0,066
28. 6. 2016	16600539	333	760	253	0,2	0,067
28. 6. 2016	16600540	345	823	284	0,2	0,069
28. 6. 2016	16600544	340	713	242	0,2	0,068
28. 6. 2016	16600545	340	799	272	0,4	0,136
7. 7. 2016	16600573	349	685	239	2,0	0,698
7. 7. 2016	16600574	332	606	201	0,2	0,066
7. 7. 2016	16600575	347	798	277	0,2	0,069
7. 7. 2016	16600576	325	883	287	0,8	0,260
7. 7. 2016	16600577	321	882	283	0,4	0,128
11. 7. 2012	16600586	330	753	248	0,2	0,066
11. 7. 2012	16600589	335	894	299	0,4	0,134
12. 7. 2016	16600590	343	681	234	0,4	0,137
12. 7. 2016	16600595	338	981	332	0,2	0,068
12. 7. 2016	16600596	357	683	244	0,4	0,143
18. 7. 2016	16600610	340	864	294	0,2	0,068
18. 7. 2016	16600616	334	880	294	0,2	0,067
19. 7. 2016	16600617	335	824	276	0,4	0,134
20. 7. 2016	16600618	354	768	272	0,4	0,142
22. 7. 2016	16600621	334	882	295	0,2	0,067
22. 7. 2016	16600623	312	878	274	0,2	0,062
25. 7. 2016	16600634	348	843	293	0,2	0,070

Datum výroby TP	Číslo TP	Objem TP (ml)	Obsah Thc ($10^9/l$)	Obsah Thc ($10^9/TD$)	Obsah Leu ($10^6/l$)	Obsah Leu ($10^6/TD$)
27. 7. 2016	16600639	332	923	306	0,2	0,066
29. 7. 2016	16600640	338	990	335	0,4	0,135
29. 7. 2016	16600643	301	895	269	0,6	0,181
1. 8. 2016	16600651	341	800	273	0,4	0,136
1. 8. 2016	16600652	346	940	325	1,0	0,346
1. 8. 2016	16600653	333	697	232	0,4	0,133
2. 8. 2016	16600654	330	802	265	0,8	0,264
2. 8. 2016	16600656	331	1199	397	1,0	0,331
8. 8. 2016	16600676	343	760	261	0,2	0,069
8. 8. 2016	16600678	348	862	300	0,4	0,139
8. 8. 2016	16600679	345	843	291	0,2	0,069
9. 8. 2016	16600681	347	632	219	0,4	0,139
12. 8. 2016	16600695	299	768	230	0,2	0,060
17. 8. 2016	16600708	332	609	202	0,2	0,066
17. 8. 2016	16600709	324	763	247	0,2	0,065
18. 8. 2016	16600711	316	691	218	0,4	0,126
18. 8. 2016	16600713	348	545	190	0,2	0,070
18. 8. 2016	16600715	372	758	282	0,2	0,074
23. 8. 2016	16600726	342	920	315	0,2	0,068
23. 8. 2016	16600727	342	743	254	0,2	0,068
23. 8. 2016	16600728	332	904	300	0,4	0,133
23. 8. 2016	16600729	346	776	268	0,6	0,208
23. 8. 2016	16600730	325	727	236	0,2	0,065
30. 8. 2016	16600747	291	1092	318	0,2	0,058
30. 8. 2016	16600748	324	1070	347	0,4	0,130
30. 8. 2016	16600749	323	1168	377	0,6	0,194
30. 8. 2016	16600750	327	995	325	0,4	0,131
30. 8. 2016	16600755	320	740	237	0,8	0,256
5. 9. 2016	16600771	340	734	250	0,2	0,068
5. 9. 2016	16600772	346	810	280	0,2	0,069

Datum výroby TP	Číslo TP	Objem TP (ml)	Obsah Thc (10⁹/l)	Obsah Thc (10⁹/TD)	Obsah Leu (10⁶/l)	Obsah Leu (10⁶/TD)
5. 9. 2016	16600774	342	552	189	0,2	0,068
5. 9. 2016	16600775	335	781	262	0,4	0,134
12. 9. 2016	16600799	320	727	233	0,2	0,064
12. 9. 2016	16600800	315	926	292	0,2	0,063
12. 9. 2016	16600801	342	978	334	0,4	0,137
12. 9. 2016	16600802	325	799	260	0,2	0,065
14. 9. 2016	16600806	333	943	314	0,2	0,067
14. 9. 2016	16600807	345	657	227	0,2	0,069
14. 9. 2016	16600808	314	787	247	0,2	0,063
19. 9. 2016	16600824	316	624	197	0,2	0,063
19. 9. 2016	16600825	358	357	128	0,2	0,072
19. 9. 2016	16600826	340	656	223	0,2	0,068
19. 9. 2016	16600829	357	698	249	0,2	0,071
22. 9. 2016	16600831	360	672	242	0,4	0,144
23. 9. 2016	16600833	329	720	237	0,6	0,197
26. 9. 2016	16600840	325	676	220	0,2	0,065
26. 9. 2016	16600841	341	684	233	0,4	0,136
26. 9. 2016	16600842	337	736	248	0,2	0,067
26. 9. 2016	16600843	339	808	274	0,2	0,068
26. 9. 2016	16600844	348	904	315	0,2	0,070
Průměr:				263		0,104
Směrodatná odchylka:				44,21		0,08
Variační koeficient v %:				16,83		74,12
Celkový počet vzorků:				138		138
Specifikaci absolutně vyhovuje:				128		138
Specifikaci relativně vyhovuje v %:				92,75		100,00

Zdroj: autor