

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

Vyšetření hladiny iontů v krvi před a po plazmaferéze

bakalářská práce

Autor práce:	Iva Valentová
Studijní program:	Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor:	Zdravotní laborant
Vedoucí práce:	prof. MUDr. Miloš Velemínský, CSc., dr.h.c.
Datum odevzdání práce:	3. 5. 2013

Abstrakt

Vyšetření hladiny iontů v krvi před a po plazmaferéze

Ve své bakalářské práci se zabývám tématem, jehož hlavním cílem je zvládnutí teoretické a praktické části stanovení vybraných iontů (Na, K, Ca, P) z krve před a po výkonu plazmaferézy.

K tomuto účelu byla odebrána krev 25 dárčům, kteří souhlasili s poskytnutím vzorků krve pro výzkumné účely, ve spolupráci s plazmaferetickým centrem v Českých Budějovicích. U každého dobrovolníka byla odebrána jedna zkumavka před výkonem plazmaferézy a po dokončení odběru plazmy. Druhá zkumavka byla odebrána po 10-ti minutách.

Plazmaferéza je separační metoda, která spočívá v odběru, léčbě a následnému vrácení krevní plazmy do krevního oběhu. Mezi metody získání bezbuněčné plazmy, se řadí využití plasmaferetického odběrového systému, které fungují na principech centrifugace nebo membránové filtrace. U procesu léčebné plazmaferézy bývá nejčastěji využito metody kontinuálního separátoru, který využívá dva žilní přístupy. V případě mé bakalářské práce jsem byla seznámena s procesem plazmaferézy, jehož funkce sloužila k získávání plazmy pro dárcovské účely a další zpracování plazmy. Plazmaferetické centrum Plasmafera s.r.o. se sídlem v Českých Budějovicích disponuje automatickými plazmaferetickými separátory značky Autopheresis-C. Tento systém plazmaferézy využívá na rozdíl od léčebného procesu jeden žilní přístup, kterým se vyznačuje metoda diskontinuálního separátoru. Podstatou diskontinuálního separátoru je proces probíhající ve dvou fázích. Fáze odběru čerpá plnou krev ze žíly dárce a provádí separaci prostřednictvím centrifugace na buněčné komponenty a plazmu, která je odebírána do sběrného vaku. V druhé fázi reinfuze probíhá navrácení buněčné složky krve dárci zpět do žíly. Tyto dvě fáze se střídají, dokud není docíleno požadovaného objemu plazmy ve sběrném vaku.

V druhé části práce jsem provedla měření 50-ti získaných vzorků od dárců plazmy. Hlavním cílem byla spolupráce s biochemickou laboratoří během stanovení minerálů sodíku, draslíku, vápníku a fosforu a zvládnutí jako teoretické, tak praktické části práce. Vzorky krve jsem vyšetřovala ve spolupráci s Laboratoří klinické biochemie Nemocnice v Českých Budějovicích, a. s. Vyšetření iontů z krve a moče patří mezi rutinní metody v biochemických laboratořích. Stanovení hodnoty iontů se požaduje v případě sodíku při podezření na nepřiměřenou sekreci antidiuretického hormonu, Addisonovu nemoc a další případy, které souvisí s výraznými změnami v rovnováze vody a soli v organismu. Vyšetření draslíku je požadováno pro monitorování elektrolytové rovnováhy při diagnóze a léčení primárního aldosteronismu, metabolické alkalózy, průjmu, těžkého zvracení, diuretické správy, diabetické ketoacidózy a jiných nemocí. Stanovení vápníku se používá při diagnostice a léčení parathyroidní nemoci, celé řadě kostních nemocí, chronického renálního selhání a při tetanii. Dále bylo provedeno kvantitativní stanovení fosforu, které se využívá při diagnóze a léčbě onemocnění ledvin, poruch příštítné žlázy a nerovnováze vitamínu D.

V současné době jsou pro měření iontů využívány metodiky, které mohou být automatizovány, což je velmi přínosné především pro velkokapacitní laboratoře, pro které jsou tyto stanovení rutinní záležitostmi.

Měření koncentrace iontů ve vzorku krve bylo provedeno prostřednictvím automatického biochemického analyzátoru ADVIA 1800 od společnosti Siemens, který vyšetřuje vzorky lidského séra, plazmy nebo moče metodou potenciometrického měření prostřednictvím iontově selektivní elektrody (ISE) pro měření sodíku, draslíku a chloridů a metodou fotometrickou, která probíhá prostřednictvím spektrofotometru pro stanovení vápníku a fosforu.

Měření na principu ISE se řadí do kategorie potenciometrie. Základem potenciometrie je změna potenciálu vyvolaná akumulací náboje na rozhraní elektrody s roztokem. U ISE nastává mezi měřeným roztokem a povrchem elektrody výměna iontů, což je důsledek změny elektrického potenciálu elektrody.

Tato změna v porovnání s potenciálem referentní elektrody umožňuje výpočet koncentrace iontů v roztoku.

Měření koncentrace vápníku bylo založeno na fotometrickém principu metodou stanovení s Arsenazo III, která se vyznačuje tvorbou komplexu modré barvy, jehož intenzita zabarvení je dána koncentrací iontu ve vzorku.

Pro stanovení fosforu byla aplikována molybdenová metoda, která se vyznačuje vznikem komplexu určujícího koncentraci měřených iontů dle intenzity zabarvení.

Během praktické části byla změřena hladina požadovaných minerálů u 25 dárců, přičemž každý dárce poskytl vzorek krve před provedením plazmaferézy a po plazmaferéze. Díky spolupráci s plazmaferetickým centrem jsem získala užitečné informace o průběhu poučení a přijetí dárce do dárcovského programu, metodě odběru plazmy na automatickém diskontinuálním separátoru a kritériích, která jsou spojena s propouštěním plazmy pro další zpracování.

V Laboratoři klinické biochemie Nemocnice v Českých Budějovicích, a. s. jsem se seznámila s požadavky v průběhu preanalytické fáze laboratorní i mimolaboratorní. Bylo mi umožněno se účastnit pod dohledem laborantky celého laboratorního procesu, jehož výsledkem bylo získání naměřených koncentrací požadovaných iontů.

Abstract

In my bachelor thesis I worked on the topic which is focused on the managing and measuring of the chosen ion levels (Na, K, Ca, P) before and after plasmapheresis. This thesis consists of the theoretical and practical part.

The blood sample was collected from each of 25 donors who agreed with the providing their blood samples for research purposes, in cooperation with the plasmapheretic centre in České Budějovice. The first tube of blood was collected from each volunteer before plasmapheresis and the second tube was collected after plasmapheresis. The second blood sample was collected after the break of 10 minutes.

Plasmapheresis is a separation method, which consists of the collection, treatment and return part of blood plasma into the blood circulation. There are two methods of obtaining plasma. There are plasmaferetic systems which work on the principle of centrifugation or membrane filtration. For therapeutic plasmapheresis process is often used the method of the continuous separator, which uses two vein accesses. In my thesis, I was acquainted with the process of plasmapheresis, whose function was focused on collecting plasma for donor purposes and other plasma processing. The plasmapheretic center named Plasmafera s.r.o. based in České Budějovice works with automatic plasmapheretic separator Autopheresis-C. This system uses a plasmapheresis system, which is characterized by a discontinuous separator method. The principle of the discontinuous separator is a process which can be divided into two phases. The first phase pumps blood from a vein in the separator and applies the method of the separation by centrifugation. The blood is divided into the cellular components and plasma during this process. The plasma is collected in the plasma bag. The second phase is based on the return of the cell compartments back into the vein. These two phases are repeated until the plasma bag obtained the full volume of required plasma.

In the second part, I have measured 50 obtained blood samples from the plasma donors. The main goal was based on the collaboration with the laboratory during the measuring of minerals sodium, potassium, calcium and phosphorus. I have measured

the blood samples in the cooperation with the Laboratory of clinical chemistry in the hospital in České Budějovice. Examination of ion levels from the blood and urine ranks among routine methods in biochemical laboratories. Determination of mineral values from serum, plasma or urea is required in the case of sodium suspicion of inappropriate secretion of antidiuretic hormone, Addison's disease and other cases related to significant changes in the balance of water and salt in the organism. The examination of potassium is required to monitor the electrolyte balance in the diagnosis and treatment of primary aldosteronism, metabolic alkalosis, diarrhea, extreme vomiting, diuretic administration, diabetic ketoacidosis and other diseases. The measuring of calcium is used in the diagnosis of the parathyroid disease, a number of bone diseases, chronic renal failure and others. The laboratory determination of phosphorus is used in the diagnosis and treatment of the kidney diseases, disorders of the parathyroid glands and vitamin D.

Nowadays there are methods used for measuring ion levels which can be automatized. This is very useful especially for the large-scale laboratory which are these assessments matter routine.

For the measurement of ion levels in the blood sample was used automatic analyzer ADVIA 1800, which examines the serum, plasma and urine samples using the method of potentiometric measurements by ISE for the measuring of sodium, potassium and chloride concentration and by the photometric method, which works via the spectrophotometer for the determination of calcium and phosphorus levels.

Measurements on the principle of ISE belongs to the category of potentiometry. The basis of potentiometry is the change in potential caused by the accumulation of charge on the electrode interface with the solution. The ISE is between the measured solution and electrode surface ion exchange, which is a impact of the change in electric potential electrodes. This change in comparison with the potential of reference electrode enables the calculation of the concentration of ions in solution.

Measurement of the concentration of calcium was based on the principle of photometric determination method with Arsenazo III, which is characterized by

complex formation. The intensity of color is determined by the ion concentration in the sample.

For the determination of phosphorus was applied molybdenum method, which is characterized by complex formation determining the concentration of ions to be measured by the intensity of color.

During the practical part I took a measure of minerals required for 25 donors. Each donor gave a blood sample before and after the plasmapheresis plasmapheresis. By working with plazmaferetickým center I gained useful information about the course of instruction and acceptance donor to donor program, sampling plasma for automatic batch separator and criteria that are associated with the release of plasma for further processing.

In the Laboratory of clinical chemismy in the hospital in České Budějovice I have gain a lot of information about the requirements during the pre-analytical phase in the laboratory and out of the laboratory. It was allowed me to participate the whole laboratory process under the supervision of the laboratory technician. The result of this process was obtaining the measured concentrations of the chosen ions.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval(a) samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne 3. 5. 2013

.....

Podpis studenta

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala svému školiteli panu prof. MUDr. Miloši Velemínskému, CSc., dr.h.c. za odborné vedení a poskytnutí cenných informací při psaní mé bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala paní Ing. Marii Kašparové za ochotu a pomoc s vyhodnocováním výsledků. Díky patří také kolektivu Laboratoře klinické chemie Nemocnice České Budějovice, a. s. za jejich spolupráci a pomoc při praktické části práce. Dík patří i panu MUDr. Karlu Blažkovi a celému kolektivu plazmaferetického centra Plasmafera s. r. o. za vstřícnou pomoc při realizaci praktické části bakalářské práce.

Obsah:

Seznam použitých zkratk	1
Úvod	2
1. Současný stav	3
1.1 Plazmaferéza	3
1.1.1 Klinické studie pro využití léčebné plazmaferézy	3
1.1.2 Historie plazmaferézy a jejího léčebného využití	4
1.1.3 Základní princip plazmaferézy	5
1.1.3.1 Diskontinuální separátor	5
1.1.3.2 Kontinuální separátor	5
1.1.4 Plazmaferetické centrum	6
1.1.4.1 Rizika a komplikace pro dárce plazmy	6
1.2 Vnitřní prostředí organismu	7
1.2.1 Intracelulární tekutina	7
1.2.2 Extracelulární tekutina	8
1.2.3 Koncentrace iontů v ECT a ICT	8
1.2.4 Regulace iontů mezi tekutinami	9
1.2.4.1 Donnanova rovnováha	9
1.2.4.2 Iontové pumpy	9
1.2.5 Bilance tekutin	9

1.3 Laboratorní kvantitativní stanovení minerálů.....	10
1.3.1 Preanalytická část	10
1.3.1.1 Preanalytická fáze – mimolaboratorní	11
1.3.1.1.1 Příprava pacienta pro odběr biologického materiálu	11
1.3.1.1.2 Biologické vlivy ovlivnitelné.....	11
1.3.1.1.2.1 Fyzická zátěž.....	11
1.3.1.1.2.2 Stravovací návyky.....	12
1.3.1.1.2.2.1 Vegetariáni	12
1.3.1.1.2.2.2 Tekutiny	12
1.3.1.1.2.2.3 Kofein	12
1.3.1.1.2.2.4 Alkohol	13
1.3.1.1.2.3 Psychický stres.....	13
1.3.1.1.2.4 Léky a drogy	13
1.3.1.1.3 Biologické vlivy neovlivnitelné.....	14
1.3.1.1.3.1 Pohlaví	14
1.3.1.1.3.2 Věk.....	14
1.3.1.1.3.3 Gravidita	15
1.3.1.1.3.4 Biorytmy	15
1.3.1.1.4 Odběr biologického materiálu	16
1.3.1.1.4.1 Odběr krve	16
1.3.1.1.4.2 Odběr kapilární krve	17
1.3.1.1.4.3 Odběr venózní krve.....	17
1.3.1.1.5 Odběrové zkumavky	17
1.3.1.1.6 Transport.....	19

1.3.1.2	Preanalytický proces v laboratoři	20
1.3.2	Analytická fáze	20
1.3.2.1	Sodík	20
1.3.2.1.1	Kvantitativní stanovení sodíku	21
1.3.2.1.1.1	Potenciometrie	21
1.3.2.1.1.1.1	Referenční elektrody	22
1.3.2.1.1.1.2	Měrné elektrody	22
1.3.2.1.1.2	Plamenová emisní spektrofotometrie.....	24
1.3.2.1.1.2.1	Plamenový fotometr.....	24
1.3.2.2	Draslík.....	25
1.3.2.2.1	Kvantitativní stanovení draslíku	26
1.3.2.3	Vápník.....	26
1.3.2.3.	Kvantitativní stanovení vápníku	27
1.3.2.3.1	Stanovení s o-kresonftaleinkomplexonem.....	27
1.3.2.3.2	Stanovení s Arsenazo III.....	27
1.3.2.4	Fosfor	27
1.3.2.4.1	Kvantitativní stanovení fosforu	28
2.	Cíle práce.....	29
3.	Metodika.....	30
3.1	Plazmaferetické centrum.....	30
3.1.1	Příjem a vyšetření dárců	30
3.1.2	Poučení dárce před odběrem.....	31
3.1.3	Vyšetření dárce	31

3.1.4 Odběrová místnost	32
3.2 Systém Autopheresis-C.....	32
3.2.1 Vstupní kontrola separátoru před odběrem.....	32
3.2.2 Venepunkce a připojení na automatický separátor	34
3.2.3 Fáze odběru.....	36
3.2.4 Fáze reinfuze.....	37
3.2.5 Ukončení odběru.....	38
3.2.6 Vyšetření odebrané plazmy	38
3.2.6.1 Detekce a likvidace nevyhovující plazmy	39
3.3 Transport.....	40
3.4 Preanalytická fáze (laboratorní).....	40
3.4.1 Laboratorní informační systém.....	41
3.4.1.1 Odmítnutí biologického materiálu	41
3.4.2 Centrifugace.....	42
3.4.3 Sekundární analytické vzorky.....	42
3.5 Analytická fáze	43
3.5.1 ADVIA 1800.....	43
3.5.1.1 Vzorkový disk.....	44
3.5.1.2 Pipetovací jehla.....	45
3.5.1.3 Disk ředících činidel	46
3.5.1.4 Reakční disk.....	46
3.5.1.5 Spektrofotometr	47
3.5.1.6 Reagenční disky.....	47
3.5.1.7 ISE analyzátor.....	48

3.5.2 Metody kvantitativního stanovení minerálů	49
3.5.2.1 Laboratorní stanovení natria a kalia.....	49
3.5.2.2 Laboratorní stanovení vápníku	50
3.5.2.3 Laboratorní stanovení fosforu.....	50
3.5.2.4 Průběh analýzy při fotometrickém měření.....	50
3.5.2.5 Reagencie.....	51
3.5.2.5.1 ISE pufr.....	51
3.5.2.5.2 Reagencie pro stanovení vápníku	51
3.5.2.5.3 Reagencie pro stanovení fosforu.....	52
3.5.2.6 Kalibrace	52
3.5.2.7 Kontrola kvality	52
1.5.3 Postanalytická fáze	53
4. Výsledky.....	54
4.1 Sodík	54
4.2 Draslík.....	56
4.3 Vápník.....	57
4.4 Fosfor	59
5. Diskuze	64
6. Závěr.....	66
7. Seznam použité literatury	67
8. Klíčová slova	70

9. Přílohy	71
------------------	----

Seznam použitých zkratek

ALP	Alkalická fosfatáza
ALT	Alaninaminotransferáza
AST	Aspartátaminotransferáza
ATP	Adenosintrifosfát
ATP	Adenosintrifosfát
CTV	Celková tělesná voda
ECT	Extracelulární tekutina
EDTA	Ethylendiaminotetraoctová kyselina
GGT	γ -glutamyltransferáza
GIT	Gastrointestinální trakt
H ⁺	Vodíkový kationt
ICT	Intracelulární tekutina
ISE	Iontově selektivní elektroda
K ⁺	Draselný kationt
KO	Krevní obraz
LD	Laktátdehydrogenáza (LDH)
LIS	Laboratorní informační systém
Na ⁺	Sodíkový kationt
PCR	Polymerasová řetězová reakce
PES	Plamenová emisní spektrofotometrie

Úvod

Uvedená bakalářská práce je zaměřena na laboratorní metodiku a práci s plazmaferetickým automatickým separátem, metodiku stanovení vybraných iontů v krvi (sodík, draslík, vápník, fosfor) na automatickém biochemickém analyzátoru a stanovení změn v hodnotách jednotlivých iontů vlivem odběru plazmy na lidský organismus.

V současné době se stále rozšiřuje odběr plazmy za léčebným účelem. Je pravděpodobné, že odběrem plazmy dochází k určitým změnám v hladinách iontů, které mají zásadní vliv na celkovou funkci lidského organismu. Cílem mé práce bude tyto hodnoty vyšetřit ve spolupráci s laboratoří a zjistit, jaký vliv má odběr plazmy na koncentraci vybraných minerálů.

Má bakalářská práce se skládá ze dvou částí. První částí je teoretická část, ve které je uveden základní princip a význam plazmaferézy, charakteristika vnitřního prostředí organismu a metody kvantitativního stanovení sodíku, draslíku, vápníku a fosforu. Důležitou kapitolu zaujímá preanalytická fáze, která hraje z hlediska správného dodržení podmínek důležitou roli v laboratorní diagnostice. Druhou částí je praktická část, která obsahuje popis přístrojů ADVIA 1800 a Autophoresis-C, postup a metodiku odběru vzorků krve před a po plazmaferéze, následné zpracování vzorků na základě principů konkrétního biochemického analyzátoru a zpracování výsledků v podobě tabulek a grafů.

Cílem práce bylo naučit se ovládat teoretické i praktické vyšetření iontů v krvi a zjistit hodnoty vzorků krve před a po plazmaferéze. Tyto vzorky byly odebrány a vyšetřovány ve spolupráci s plazmaferetickým centrem Plasmafera s.r.o a Laboratoří klinické chemie Nemocnice České Budějovice, a. s.

1. Současný stav

1.1 Plazmaferéza

Plazmaferéza je separační metoda, jejíž využití se stále rozšiřuje za léčebným účelem jako mimotělní terapie, která umožňuje snadnější analýzu patofyziologických mechanismů mnoha chorob. Plazmaferéza je všeobecně známá jako jedna z možností léčebných postupů pro řadu onemocnění revmatologických, metabolických, hematologických, neurologických a renálních. Na základě studií bylo dokázáno, že plazmaferéza je úspěšná pro léčbu akutních humorálních odmítnutí po renální transplantaci (O.Gugor et. al. 2011).

Plazmaferéza je tedy metoda fungující na principu odstranění patologických látek z organismu. Dle typu onemocnění lze plazmaferézu doporučit jako standardní léčebný postup, doplňkovou, či podpůrnou léčbu (Valbonesi, 2006).

V současné době se také rozšiřuje odběr plazmy za účelem výroby různých léčiv, pro které je plazma důležitým derivátem. Pro tyto účely jsou vedena aferetická centra, ve kterých je prováděn odběr plazmy prostřednictvím automatických separátorů, které fungují na principu centrifugace - separace krevních elementů od plazmy (Bednařík, 2011).

1.1.1 Klinické studie pro využití léčebné plazmaferézy

Pro klinické využití plazmaferézy byla provedena řada studií, jejichž cílem je zhodnotit vliv léčebné plazmaferézy při určitých chorobách

V USA byla provedena studie k plazmaferézní léčbě v případě autoimunitního onemocnění Pemphigus vulgaris. Byla zjištěna vysoká úspěšnost léčby a plazmaferéza byla zhodnocena jako účinná léčba pro PV v případech, které vykazují neefektivnost konvenční terapie (podání systémových kortikosteroidů a imunosupresiv, které mohou mít při vysokých dávkách nepříznivé vedlejší účinky) (Matthew S. Turner, 2000).

Cílem další studie bylo zjistit účinky peroperační plazmaferézy. Studie se účastnilo 293 pacientů, z nichž každý podstoupil operaci kardiopulmonální bypassu. Plazmaferéza byla provedena po indukci anestezie prostřednictvím sběrných systémů (Haemonetics Ultralite, Haemonetics Corp, Braintree, MA) založených na diskontinuální průtokové technice centrifugace. Tato metoda spočívá v čerpání krve do odstředivky – separace centrifugací. Do krve byl použit antikoagulační roztok citrátu sodného v poměru 1:12. Průtok byl změřen na 50 až 60 ml / min, a krev byla odstředěna při 2400 až 3400 otáčkách/min. Po separaci plazmy byly krevní elementy vráceny zpět. Čas potřebný k provedení metody se pohyboval v rozmezí od 45 do 60 minut. Plazmaferéza by mohla v tomto případě ovlivnit snížení krevní ztráty, omezit využití krevních bank a optimalizovat koagulační systém u pacientů při operaci (Gabriele Armellin et. al. 1997).

1.1.2 Historie plazmaferézy a jejího léčebného využití

První využití plazmaferézy bylo provedeno roku 1914 Johnem J. Abelem ve farmakologické laboratoři Hopkinsovy univerzity. Metoda byla tehdy použita jako odstranění plazmy při pokusech na psech.

Až později v padesátých letech minulého století bylo použito novodobé pojetí plazmaferézy, a to léčebné plazmaferézy, která odebranou plazmu nahrazuje příslušnými roztoky. Pro tento způsob odběru se používá název: léčebná výměnná plazmaferéza. Cílem této metody se rozumělo odstranění nežádoucích látek v plazmě.

Využití léčebné plazmaferézy se začalo rozšiřovat v rámci terapie pro různé choroby. Jednalo se o onemocnění hematologické, revmatologické, metabolické, renální a jiné. Monitorování průběhu vyšetření poukazovalo na zlepšení klinického stavu nemocných a tímto na úspěšnou terapii. Přiřazení terapie plazmaferézou vyžadovalo vhodný stav pacienta a okolnosti onemocnění (Bednařík, 2011).

Pro rozvoj a další výzkum léčebné plazmaferézy vznikla v USA samostatná společnost pro aferézu – ASFA (American Society for Apheresis). V Evropě byla

následně založena hemaferetická společnost ESFH (European Society for Hemapheresis). Tyto společnosti se věnují výzkumu účinků plazmaferézy u jednotlivých chorob. K roku 2010 vydala ASFA doporučení přímé terapie léčebné plazmaferézy u 67 chorob a klinických příznaků (Bednařík, 2011).

1.1.3 Základní princip plazmaferézy

Princip plazmaferézy je založen na separaci plazmy na základě rozdílů specifických hmotností složek krve. Separace se provádí na automatických separátorech. Proces probíhá v uzavřeném jednorázovém odběrovém setu. Každý automatický systém je vybaven separačním zařízením, které provádí separaci plazmy, soustavou hadiček, vaků, čerpadel a rezervoárů (Linker, 1983).

Z hlediska žilních přístupů se automatické separátory dělí na diskontinuální, které používají pouze jeden žilní přístup a kontinuální separátory se dvěma žilními přístupy (Bednařík, 2011).

1.1.3.1 Diskontinuální separátor

Diskontinuální separátory se používají především k dárcovským účelům a používají jeden žilní přístup. Plazmaferetický odběr probíhá v opakujících se cyklech. Při jednom cyklu je odebráno cca 2dcl krve, která je separována na plazmu a buněčné komponenty, metodou odstředění nebo membránovou filtrací. Plazma je následně kompletována do sběrného vaku. Část odebraného objemu je dárci hrazena dodávkou fyziologického roztoku (Linker, 1983).

1.1.3.2 Kontinuální separátor

Kontinuální separátor se využívá k léčebným účelům. Krev, odebraná pacientovi, musí být antikoagulována citrátovým roztokem. Následně krev vstupuje do odstředivky a probíhá centrifugace, při které je krev separována na plazmu a buněčné

komponenty. Plazma je odváděna do sběrače a buněčné komponenty jsou spolu s náhradním roztokem vráceny pacientovi. Část odebraného materiálu se hradí albuminem, zmraženou plazmou a fyziologických roztokem (Linker, 1983).

1.1.4 Plazmaferetické centrum

Zařízení, která se specializují na sběr plazmy od vhodných dárců se nazývají plazmaferetická centra. Jejich funkcí je zajistit bezpečný odběr v souladu s předpisy, vyšetření dárců pro případnou identifikaci chorob, které by mohli darovanou plazmu znehodnotit a propouštění plazmy určené k dalšímu zpracování (SOP - Plasmafera, 2010).

1.1.4.1 Rizika a komplikace pro dárce plazmy

Rizika pro dárce se odvíjí od jeho zdravotního stavu. Vzhledem k tomuto faktu dárce podstupuje základní vyšetření, za účelem tyto rizika minimalizovat.

Nejčastějším rizikem je nežádoucí reakce na odběr. Jako komplikace se může objevit v místě venózního vstupu. Mezi tyto komplikace se řadí: krevní výron, způsobený špatným vpichem, nebo krvácením do podkoží po vpichu. Toto riziko lze redukovat stlačením místa vpichu po odběru (Bednařík, 2011; SOP - Plasmafera, 2010).

Dalším rizikem je nedostatečně rychlou přizpůsobivostí krevního oběhu na odběr. K takovým nežádoucím účinkům patří především arteriální hypotenze, nebo dyspnoe. V dalším případě mohou nastat mdloby. Mdloby jsou příčinou např. hladovění před odběrem, velkou psychickou zátěží, nebo fyzickou námahou před odběrem (Bednařík, 2011; SOP - Plasmafera, 2010).

Méně časté jsou komplikace způsobené přenosem infekce do místa venózního vstupu. Tomuto riziku lze zamezit dodržováním předpisů správné laboratorní práce a předodběrovým vyšetřením pacienta (SOP - Plasmafera, 2010).

Riziko může být způsobeno také aplikací protisrážlivého činidla (citrátu) během procesu odběru. Antikoagulans v podobě citrátu vyvazují z krve ionty Ca^{2+} , čímž inaktivují koagulační kaskádu. Mohou tedy způsobit kolísání hladiny vápníku v organismu, což může vést ke vzniku citrátové hypokalcemie a metabolické alkalózy, která se může projevit až hypokalcemickou tetanií (svalové záškuby a trnutí jazyka). V tomto případě je nutné změny korigovat upravením rychlosti odběru, snížení přívodu citrátu, nebo intravenózním doplněním hladiny kalcia během výkonu. Některá rizika mohou být spojena s užíváním léků (SOP - Plasmafera, 2010).

1.2 Vnitřní prostředí organismu

Vnitřní prostředí utváří optimální prostředí pro průběh metabolických a všech ostatních dějů důležitý pro správnou funkci lidského organismu. Ve vodném prostředí mezi sebou reagují různé látky. Ve vnitřním prostředí je obsažena především voda, která se dělí na několik podskupin z hlediska jejich působení a funkce v organismu. Pro udržení stálosti vnitřního prostředí jsou určeny principy regulace. Základ vnitřního prostředí tvoří tělesné tekutiny. Celková tělesná voda zaujímá přibližně 55 – 60% hmotnosti organismu. Její množství je přímo závislé na pohlaví, věku, hydrataci a množství tělesného tuku. CTV se dělí na dvě složky dle funkce a složení na tekutinu extracelulární a intracelulární (Racek, 2006).

1.2.1 Intracelulární tekutina

ICT se nazývá také nitrobuněčná tekutina, díky jejímu uložení uvnitř buňky. Představuje přibližně dvě třetiny CTV (Racek, 2006).

1.2.2 Extracelulární tekutina

Extracelulární tekutina se nachází vně buňky, tzv. mimobuněčná tekutina. Zhruba jedna čtvrtina ECT se nazývá tekutina intravaskulární a je lokalizována uvnitř cév (voda plazmy). Další dvě třetiny ECT jsou nazývány intersticiální tekutinou, z důvodu jejího umístění v mezibuněčném prostoru – mezibuněčná tekutina. Mezi ECT se zároveň řadí i transcelulární tekutina, která se nachází v tělesných dutinách, gastrointestinálním traktu a močových cestách – tzv. třetí prostor. Za běžných okolností se nachází ve velmi malém množství, ale za patologických stavů se objem může navýšit na několik litrů (Racek, 2006).

1.2.3 Koncentrace iontů v ECT a ICT

Funkce a propustnost membrán pro živiny a minerály je nesmírně důležitá pro správnou funkci organismu, např. neuromuskulární dráždivost (Dastyh M., 2008).

Tabulka1: Průměrné koncentrace iontů v jednotlivých tělesných tekutinách

	Plazma [mmol/]	Intersticiální tekutina [mmol/]	Intracelulární tekutina [mmol/]
Na ⁺	140	142	10
K ⁺	4	4	155
Ca ²⁺	2.5	1.3	< 0.001
Mg ²⁺	1	0.7	15
Cl ⁻	102	113	8
HCO ₃	24	28	10
Fosfáty	1	1	65

Sulfáty	0.5	0.5	10
Organické kyseliny	4	5	2

(Dastych M., 2008)

1.2.4 Regulace iontů mezi tekutinami

1.2.4.1 Donnanova rovnováha

Donnanova rovnováha nastává mezi dvěma elektrolyty. Udržuje rozdíly v koncentraci iontů mezi ICT a ECT na základě oddělení obou prostorů semipermeabilní membránou, která umožňuje průnik menších iontů a molekul (Racek, 2006).

1.2.4.2 Iontové pumpy

Mají funkci zprostředkovatele aktivního transportu látek v organismu. Nejčastěji mají charakter proteinu obsahující enzym ATPázu a nacházejí se v buněčné membráně. Mezi typy transportu se řadí transport vytvářející koncentrační gradient, tzv. aktivní transport, při kterém je významná spotřeba energie z ATP. Tímto způsobem transportu se přenáší sodné, draselné, vápenné, vodíkové a další ionty (Trojan, 1999).

1.2.5 Bilance tekutin

Rozdíl mezi příjmem a ztrátami tekutin z organismu přímo ovlivňuje množství CTV. Ideální stav mezi příjmem a ztrátou je rovnovážný. V organismu někdy dochází vlivem patologických nebo fyziologických stavů k poruše rovnováhy bilance tekutin.

Tyto rozdíly mohou být vyvažovány přirozenými regulátory, nebo alespoň udržovány v přijatelných hodnotách (Racek, 2006).

1.3 Laboratorní kvantitativní stanovení minerálů

Provádí se ze séra nebo moči, která je odebrána do odběrové zkumavky tvarem přizpůsobené pro přímé vložení do automatického analyzátoru, který provede požadované vyšetření. Pro správné podmínky pro analýzu vzorku je nutné dodržet preanalytickou fázi mimo i v laboratoři (Racek, 2006).

1.3.1 Preanalytická část

Preanalytická fáze zahrnuje veškeré postupy a činnosti, od indikace vyšetření, až po vložení analytického vzorku do automatického analyzátoru, nebo zahájení manuálně prováděné metody. Během této fáze vznikne až 60%, které mohou způsobit znehodnocení odebraného biologického materiálu a následné chyby ve výsledku měření. Proto je v průběhu preanalytické fáze vyžadována správná práce zdravotnického personálu pro minimalizaci kontaminací, mechanických a jiných poškození biologického materiálu (Elston, 2008).

Zásadní úlohu hraje také lékař, který musí správně zhodnotit potřebu a nutnost daného vyšetření pro pacienta. Je také vhodné vybrat co nejvíce specifickou metodu potřebnou pro vyloučení nebo potvrzení diagnózy, laboratorní monitoring léčby a sledování průběhu choroby (Adolfo Romero, 2012).

Preanalytická fáze se dělí na dvě části. Preanalytickou fází mimolaboratorní, která zahrnuje přípravu pacienta na odběr, odběr vzorku, uchování a transport do laboratoře a fází preanalytickou laboratorní, do které řadíme manipulaci se vzorkem v laboratoři, jeho uchování před analýzou a zahájení analyzování vzorku, čímž analytická fáze končí (Elston, 2008).

1.3.1.1 Preanalytická fáze – mimolaboratorní

Do preanalytické fáze mimolaboratorní zahrnujeme veškeré postupy a operace provedené mimo laboratoř. Zpravidla se do této fáze řadí příprava pacienta k odběru, odběr biologického materiálu, skladování materiálu a jeho podmínky při transportu do příslušné laboratoře. Fáze mimolaboratorní končím dopravením biologického materiálu a jeho příjmem v laboratoři (Zima, 2007; Dastyh, 2008).

1.3.1.1.1 Příprava pacienta pro odběr biologického materiálu

Pacient by měl být před odběrem podrobně informován o podmínkách odběru a poučen o požadovaných zásadách, které budou potřebné pro dané vyšetření. Poučení hospitalizovaných pacientů je poměrně snažší, z důvodu přípravy na odběr prostřednictvím zdravotnického personálu. V rámci osoby pacienta je třeba zvážit i případné faktory, které mohou být jak neovlivnitelné, tak ovlivnitelné, které je možno v případě zjištění eliminovat (Rozsypalová, 2002).

1.3.1.1.2 Biologické vlivy ovlivnitelné

1.3.1.1.2.1 Fyzická zátěž

V rámci tohoto vlivu je třeba vzít v úvahu velikost změn, které ovlivňuje trénovanost pacienta a délka fyzické zátěže. Zvýšená fyzická aktivita pacienta ovlivňuje z hlediska změn koncentrace látek, které se přímo podílejí na energetickém metabolismu. Mezi tyto látky řadíme např. laktát, jehož koncentrace vlivem tělesné zátěže stoupá, nebo glukózu, přičemž glykémie má v první fázi vzestupný charakter a při vyčerpání glykogenových zásob v druhé fázi klesá, což má za následek ketonémii a ketonurii (Ráček, 2006).

1.3.1.1.2.2 Stravovací návyky

Vlivem příjmu potravy dochází ke změnám koncentrace vyšetřovaných látek a vyplavováním hormonů a enzymů. Požití jídla má největší vliv na koncentraci glukózy, železa, lipidů (triacylglycerolů) a alkalické fosfatázy ALP. Strava bohatá na proteiny způsobí zvýšení fosfátů, močoviny a kyseliny močové. Potrava s vysokým obsahem lipidů zvyšuje hladinu triacylglycerolů a zároveň snižuje podíl dusíkatých látek (např. močoviny). Zvýšení ALP a LD způsobí strava s vysokým obsahem sacharidů. Zároveň také snižuje hladinu triacylglycerolů, cholesterolu a celkové bílkoviny (Zima, 2008).

Optimalizace látkových hodnot zároveň závisí na fyzickém stavu pacienta. Hladina glykémie se u zdravého člověka normalizuje podstatně rychleji, než u pacienta s diabetem (Racek, 2006).

1.3.1.1.2.2.1 Vegetariáni

U vegetariánů jsou běžné velmi nízké hodnoty jak LDL tak VLDL a zároveň i celkového cholesterolu. Alkaličtější je vyskytuje také pH moče, což způsobuje zvýšená spotřeba ovoce a zeleniny (Zima, 2008).

1.3.1.1.2.2.2 Tekutiny

Množství příjmu tekutin má za následek míru koncentrace moči a hemokoncentraci (Dastych M., 2008)

1.3.1.1.2.2.3 Kofein

Požití nápoje s obsahem kofeinu může způsobit zvýšenou koncentraci katecholaminů, glukózy a volných mastných kyselin (Zima, 2008).

1.3.1.1.2.2.4 Alkohol

V důsledku požití alkoholu můžeme u pacienta pozorovat změny v koncentracích některých látek. U konzumace alkoholu je třeba vzít v úvahu, zda se jedná o akutní nebo chronický abúzus. V případě akutního abúzu pozorujeme zvýšenou koncentraci triacylglycerolů (které mohou způsobit až chylózní sérum) a aldosteronu, naopak klesá prolaktin antidiuretický hormon a kortizol. Při chronickém abúzu dochází ke zvýšení ALT, AST, GGT, kortizolu, adrenalinu a estradiolu. Pokud nastane situace dlouhodobého abúzu, bývá vyhodnocena hypoglykémie a ketoacidóza, zvyšuje se koncentrace laktátu a kyseliny močové (Zima, 2008).

1.3.1.1.2.3 Psychický stres

Zátěž na psychiku se může objevit už při samotném odběru, což platí zejména u dětí nebo anxiózních pacientů. V těchto případech dochází k vyplavení hormonů kůry a dřeně nadledvin a jejich účinky na metabolismus. Mezi tyto účinky lze zařadit hyperglykémii, zvýšená koncentrace volných mastných kyselin atd. Stres může také ovlivnit funkční testy ledvin, GIT apod. (Racek, 2006).

1.3.1.1.2.4 Léky a drogy

Pokud pacient užívá některé léky, které by mohli do jisté míry narušit měření a způsobit tak chybu ve výsledku, je třeba, aby byly informace o léku uvedeny na žádance. Zároveň je třeba konzultovat nejasné nálezy s laboratoří v případě podezření na medikovaného pacienta.

Užívání léků může výsledek biochemického vyšetření ovlivňovat dvěma způsoby:

1. Působením na metabolismus stanovované látky (mění rychlost metabolismu buď indukci syntézy, nebo naopak inhibicí enzymů, ovlivňují vazbu na transportní bílkovinu apod.
2. Interferují při vlastní chemické reakci (příkladem může být pokus o maskování přítomnosti glukózy či krve v moči použitím kyseliny askorbové při stanovení papírkovým testem (Racek, 2006).

Mezi další ovlivnitelné faktory můžeme zařadit mechanické vlivy (tlak dělohy u gravidních žen, intramuskulární injekce, operace), vlivy zevního prostředí (teplota prostředí, nadmořská výška), tělesná poloha a kouření (Dastych, 2008).

1.3.1.1.3 Biologické vlivy neovlivnitelné

1.3.1.1.3.1 Pohlaví

V případě rozdílů hodnot stanovovaných látek je třeba zmínit hladinu kreatininu, která se u mužů vyskytuje ve vyšší koncentraci než u žen, z důvodu většího podílu svalové hmoty. Rozdíly v koncentracích dále vykazují pohlavní hormony, kyseliny močové, železo, hemoglobin, haptoglobin, ceruloplasmin a gama-glutamyltransferáza (GMT). V podstatě je většina látek vyšší u mužů než u žen (Racek, 2006).

1.3.1.1.3.2 Věk

Pro většinu biochemických stanovení platí rozdílné referenční hodnoty pro konkrétní věkové hranice. Je proto třeba vzít v úvahu pacientův věk a zařadit ho do příslušné věkové hranice z důvodu správné interpretace nálezu. Určité biochemické procesy jsou totiž zaměřeny na konkrétná vývojové stupně člověka (Zima, 2008).

Z hlediska imunoglobulinů koncentrace IgM a IgA od narození stoupá z důvodu zvýšené syntézy u novorozence. V případě ALP dochází k vysoké koncentraci v dětství, přičemž maxima dosahuje v období 10-16 let (vývoj skeletu) a následně pozorujeme prudký pokles. Mezi další analyty, jejichž koncentrace se přímo odvíjí od věku pacienta, se řadí ferritin. Koncentrace ferritinu je nízká u žen ve fertilním věku, později nárůstá, až může dokonce dosáhnout hodnot mužské populace (Zima, 2008).

1.3.1.1.3.3 Gravidita

Těhotenství způsobuje gravidní ženě zvýšenou fyzickou zátěž, změnu biochemických dějů. Ze vzorku krve, eventuálně moče matky můžeme pozorovat výskyt bílkovin a dalších látek, které jsou produkovány trofoblastem a orgány plodu. Změny koncentrací analytů mohou být způsobeny mechanismy, jako je indukce zvýšením plazmatických transportních proteinů v plazmě, hemodiluce (pokles koncentrace hemoglobinu, která vede ke zvýšení aktivity glomerulární filtrace, čímž vzniká nižší koncentrace kreatininu a močoviny v séru), zvýšení tělesného objemu (zvýšení clearance kreatininu) a zvýšení CRP až nad referenční hranice (Racek, 2006).

1.3.1.1.3.4 Biorytmy

Biorytmy můžeme charakterizovat jako pravidelně se opakující (periodické) cykly změn v lidském organismu. Některé laboratorní parametry se během cyklických změn mění v různých časových úsecích. Můžeme je dělit z hlediska časového rozmezí, za které proběhne právě jeden cyklus.

1. Ultradiánní – trvají méně než 20 hodin
 - vychýlení koncentrace kortikosteroidů, inzulínu a somatotropinu
2. Cirkadiánní – denní, cyklus trvá v rozmezí 20 až 28 hodin
 - změna koncentrace hormonů, železa, K⁺, močovina, kreatinin, apod.

3. Infradiánní – perioda přesahuje 28 hodin
- a) Lunární – cyklus trvá 4 týdny
- dochází ke vlivu fertlních hormonů (menstruační cyklus)
- b) Cirkanuální – jeden cyklus zabere přibližně rok (10-12 měsíců)
- zvýšená syntéza vitamínu D během letní sezóny, aktivita AST, ALT

(Zima, 2007)

1.3.1.1.4 Odběr biologického materiálu

V první řadě je třeba provést přesnou a spolehlivou identifikaci biologického materiálu, dále je nutno prokázat schopnost provést odběr správným způsobem do příslušné nádoby a v neposlední řadě odběr materiálu závisí i na správně poučeném a informovaném pacientovi a jeho schopnosti dodržení doporučených příprav na odběr.

Prostřednictvím biologického materiálu lze správným vyšetřením určit správnou diagnózu a následně i žádoucí léčbu. Z tohoto důvodu má odběr a vyšetření materiálu pro lékaře zásadní význam v rozhodování o postupu léčby pacienta (Rozsypalová, 2002).

1.3.1.1.4.1 Odběr krve

Při odběru krve je nutné se zaměřit na polohu pacienta při odběru. V zásadě je nejvíce preferovaným způsobem odběru poloha vsedě, kdy nedochází k ovlivnění koncentrací analys. Mezi další metody odběru krve se řadí odběr tepenné a arteriální krve (Zima, 2008)

1.3.1.1.4.2 Odběr kapilární krve

Odběr kapilární krve se provádí z bříška prstů na ruku u dospělých nebo z paty u malých dětí a kojenců. Dobré prokrvení místa vpichu lze pojistit mírným třením nebo prohřátím místa, ze kterého je odběr prováděn (Rozsypalová, 2002).

K běžnému postupu při odběru kapilární krve patří dezinfekce (zamezit kontaktu krve s dezinfekčním prostředkem, v opačném případě dochází k hemolýze), vpich, otření první kapky, odběr do kapilár (bez vzduchových bublin), nebo do kepu (mikrozkumavky), krev musí volně kapat (při stlačení dochází k naředění tkáňovým mokem = přesun tekutiny z intravazálního prostoru do intersticia) a ošetření místa vpichu (Racek, 2006; Rozsypalová, 2002).

1.3.1.1.4.3 Odběr venózní krve

Venózní krev se řadí mezi nejčastěji vyšetřovaný krevní materiál získaný venepunkcí. Provedení venepunkce musí být v souladu s daným opatřením. Pacient musí být v klidu, paže bez velkých jizev, hematomů a zavedených infuzí má být natažena. Venepunkce se provádí z kubitální žíly ve fossa antebrachii nebo žíly v loketním ohbí. Lze využít i veny na hřbetu ruky, je však zásadní vzít v úvahu fyzický stav pacienta (vznik trofických defektů u diabetiků a osob se špatnou cirkulací) (Rozsypalová, 2002; Zima, 2008).

1.3.1.1.5 Odběrové zkumavky

a) Zkumavky na srážlivou krev

Uvedené zkumavky jsou obvykle používány pro vyšetření séra v oblasti klinické biochemie a sérologie. Zkumavky obsahují aditivum oxidu křemičitého pro aktivní srážení.

Plastové sérové zkumavky mají pro urychlení koagulace vnitřní stěnu potaženou vrstvou oxidu křemičitého. Ve skleněných zkumavkách je proces koagulace krve zahájen přirozeně povrchem skla, a proto tyto zkumavky nejsou upraveny oxidem křemičitým.

b) Koagulační zkumavky (citrát sodný)

Citrátové zkumavky jsou obvykle používány při měření koagulace. Citrátové zkumavky obsahují pufrovaný roztok citrátu, který je používán při vyšetření koagulace jako antikoagulační činidlo.

c) Zkumavky pro separaci séra

Zkumavky pro separaci séra jsou obvykle používány při biochemickém vyšetření séra. Zkumavky obsahují oxid křemičitý pro aktivaci koagulace odebraného vzorku a gel, který vytvoří bariéru mezi sérem a koagulem oddělenými odstředěním.

d) Zkumavky s EDTA

Zkumavky EDTA jsou obvykle používány pro hematologická vyšetření plné krve. Jako antikoagulační činidlo se používá K_2EDTA nebo K_3EDTA (di- nebo tri-draselná sůl kyseliny etylen-diamin-tetraoctové). V plastových zkumavkách je suché aditivum naneseno na vnitřní stěnu, u skleněných zkumavek je aditivum tekuté.

Zkumavky K_3EDTA jsou určeny pro vyšetření, která obsahují inhibitor proteolytických enzymů. Zkumavky K_3EDTA mají běžný růžový uzávěr.

e) Zkumavky pro analýzu plazmy

Plazmové zkumavky obsahují natrium nebo lithium heparin a jsou obvykle používány pro biochemická vyšetření plazmy. Aditivum je v plastových zkumavkách aplikováno na vnitřní stěnu, ve skleněných je buď lyofilizované nebo vakuem vysušené. Heparinové zkumavky se mohou centrifugovat bezprostředně po odběru, není třeba čekat na proběhnutí koagulace

f) Zkumavky pro stanovení glykemie

Zkumavky s fluoridem sodným/oxalátem draselným jsou používány při stanovení glukózy. Množství glukózy v neošetřeném vzorku krve rychle po odběru klesá, protože je metabolizována krevními elementy. Aditiva obsažená v těchto zkumavkách - fluorid sodný/oxalát draselný stabilizují hladinu glukózy v odebrané krvi až 24 hodin.

g) Zkumavky pro analýzu stopových prvků

Tyto zkumavky jsou obvykle používány pro stanovení určitých stopových prvků v krevním vzorku. Zkumavky obsahují minimální množství určitých stopových prvků (Katalog BD diagnostics, 2004).

1.3.1.1.6 Transport

Transport biologického materiálu je třeba provést co nejrychleji za co nejkvalitnějších podmínek. Obecně platí, že je příhodnější zasílat hotové sérum, čímž zabráníme případné mechanické hemolýze, která může nastat v případě transportu plné krve (Racek, 2006).

Podmínky transportu biologického materiálu se liší z hlediska typu materiálu a požadovaného vyšetření. Výhodnější přeprava z hlediska šetrnosti je přeprava probíhající prostřednictvím donášky nebo automobilové dopravy v případě větší vzdálenosti. K dispozici je vybavení v podobě chladících boxů, které zařídí optimální podmínky z hlediska teploty a působení světla, protože velké teplotní výkyvy mohou nenávratně znehodnotit biologický materiál a vystavení vzorku krve světlu vede k odbourávání bilirubinu. Při extrémně zvýšené teplotě dochází k inaktivaci enzymů a klesá koncentrace glukózy. Při extrémně snížené teplotě naopak může zapříčinit hemolýzu (Dastych, 2008; Zima, 2008).

Dalším typem transportu probíhá prostřednictvím potrubní pošty. Tento způsob transportu je nejméně časově náročný, ovšem vlivem nešetrného zacházení může dojít k mechanickému poškození např. hemolýze (Dastych, 2008).

1.3.1.2 Preanalytický proces v laboratoři

Preanalytická fáze laboratorní je zahájena příjmem biologického materiálu a končí vlastní analýzou vzorku. Prvotně je důležité zkontrolovat kompatibilitu odběrové nádoby a biochemické žádanky, které na příjmu převezme od transportu přítomná laborantka (Romero, 2012; Masopust, 1998)

Následně probíhá příprava vzorku k analýze. Do přípravné fáze řadíme odstředění, neboli centrifugaci, čímž docílíme oddělení séra či plazmy. Poté se provádí deproteinace vzorku analýzou, zahuštění vzorku a v některých případech se používají i další postupy např. promývání erytrocytů (Schneiderka; Racek, 2006).

Pro zajištění správné manipulace se vzorky dodržení zásad správné laboratorní práce, která má z velké části vliv na kvalitu analytického vzorku je vhodné se držet zásad logistické oblasti, která se skládá ze správné manipulace a uchovávání vzorku před analýzou. Nesprávné uchování vzorku může u některých laboratorních vyšetření způsobit znehodnocení vzorku a následnou chybu v hodnocení vyšetření. Součástí správnosti vyšetření je také kontrola reagenčních setů, jejichž komplementarita je nezbytná ke správné analýze vzorku (Zima, 2008; Masopust 1998).

1.3.2 Analytická fáze

1.3.2.1 Sodík

Sodík je minerální prvek, jehož hlavní funkcí je udržování acidobazické rovnováhy, osmolarity, osmotického tlaku vody a distribuci H_2O . Sodík je z 50 % obsažen v ECT, 40 % je vázáno v kostní tkáni a jen asi 10 % se nachází v ICT. Sodík je tedy hlavní extracelulární kation a jako takový se největší měrou podílí na osmotickém tlaku ECT.

Sodík se v ECT vyskytuje téměř výhradně ve formě sodného kationtu (Na^+). Důležitý je fakt, že ze všech iontů na sebe váže nejvíce vody; retence sodíku je proto

vždy doprovázena retencí vody a naopak. Průměrná koncentrace Na^+ v plazmě (ECT) je 132 - 145 mmol/l. Koncentrace Na^+ v ICT se pohybuje v rozmezí 3 - 10 mmol/l, v erythrocytech je kolem 15 mmol/l. V organismu se vyskytuje Nejčastěji je přijímán ve formě chloridu sodného a je vylučován močí, stolicí a potem (Wilhelm, 2006; Racek, 2006; Masopust 1998).

1.3.2.1.1 Kvantitativní stanovení sodíku

V současné době se nejvíce upřednostňuje metoda ISE stanovení. Její velkou výhodou je možnost automatizace, což je v případě rutinních metod velkým přínosem pro biochemická zařízení. Mezi další metody vyšetření sodíku patří plamenová emisní fotometrie a fotometrická enzymatická metoda. Tyto metody se v laboratořích již standardně nevyužívají. V případě fotometrické enzymatické metody se stanovení touto cestou nedoporučuje (Dastyh M., 2008; Schneiderka).

1.3.2.1.1.1 Potenciometrie

Princip potenciometrického měření je založen na základě měření rovnovážného napětí galvanického článku. Jedná se o elektrochemický jev, při kterém dochází k výměně náboje mezi analytem a jinou nemísitelnou fází (další roztok, nebo pevný povrch) a vytváří tak na fázovém rozhraní potenciál. Galvanický článek se skládá z měrné elektrody, jejíž potenciál je závislý na koncentraci sledované látky a z referentní elektrody, jejíž potenciál zůstává konstantní. Míru koncentrace sledované látky udává rovnovážné napětí, což je rozdíl těchto dvou potenciálů (Drbal, 1999).

Potenciometrie je kvantitativní metoda. Jestliže je kov M ponořen do roztoku obsahující vlastní Mn^+ ionty, hodnota elektrického potenciálu je dána Nernstovou rovnicí.

$$E = E_0 + (RT/nF) \ln (c_{Ox}/c_{Red})$$

E - potenciál elektrody

E₀- standardní elektrodový potenciál (je konstantní)

R – molární plynová konstanta (8,314 J/K.mol)

T – teplota v kelvinech (teplota ve °C + 273,15)

n – počet vyměněných elektronů

F – Faradayova konstanta (96485 C/mol)

c_{Ox} – oxidované formy prvku

c_{Red} – redukované formy prvku

(Zdroj: Drbal, 1999)

1.3.2.1.1.1. Referenční elektrody

Referenční elektroda je taková, jejíž potenciál je konstantní. Mezi nejčastěji používanou elektrodu referenční patří kalomelová. Je tvořena kovovou rtutí, vrstvou chloridu rtuťnatého (kalomelu), který je ve styku s roztokem chloridu draselného o známé koncentraci. Elektroda se ponoří do zkoumaného roztoku (Drbal, 1999).

1.3.2.1.1.1.2. Měrné elektrody

a) Oxidačně redukční elektrody

Mezi tyto elektrody se řadí vodíková elektroda, kterou tvoří platinový plíšek (inertní kov), pokrytý platinovou černí, ponořený do roztoku obsahujícího dvě redoxní formy určité látky. Povrchem elektrody je zprostředkována výměna elektronů mezi částicemi redoxního páru (Drbal, 1999).

b) Iontově selektivní elektrody (ISE)

Iontově selektivní elektroda funguje na principu výměny iontů mezi měřeným roztokem a povrchem elektrody, čehož je důsledek změny elektrického potenciálu elektrody. Tato změna v porovnání s potenciálem referentní elektrody umožňuje výpočet koncentrace iontů v roztoku. ISE přednostně reagují na určitý konkrétní druh iontů podle typu membrány, která odděluje analyt od elektrodového roztoku ve vnitřku elektrody. Roztoky obsahují ionty, pro které je membrána selektivní. Ve vnitřním roztoku je ponořena vnitřní srovnávací elektroda, pomocí které je iontově selektivní elektroda napojena na měřicí přístroj. Pro měření s iontově selektivními elektrodami lze použít elektronický potenciometr nebo pH-metr, které mají dostatečně velký vstupní odpor (Klouda, 2003).

Nejčastějším typem membránové ISE je v současné době skleněná elektroda, která se používá ke stanovení vodíkových iontů. Elektroda se sestává z elektrochemické membrány ve formě baňky ze speciálního skla natavené na skleněné trubičce. Uvnitř baňky se nachází roztok, do kterého je ponořena chloridostříbrná elektroda.

Mezi další typy ISE lze zařadit fluoridovou ISE, která se vyznačuje pevnou membránou (Drbal, 1999).

Potenciometrie se za použití ISE dělí na dvě metody:

1) Přímá potenciometrie

Přímá potenciometrie je metoda stanovení, při kterém nebylo provedeno ředění vzorku před měřením. Nejčastějším případem je měření pH nebo stanovení různých iontů pomocí iontově selektivních elektrod.

2) Nepřímá potenciometrie

Metoda nepřímé potenciometrie se vyznačuje ředěním vzorku vhodným ředícím roztokem o vysoké iontové síle. U této metody se využívá stanovení zředěného materiálu pomocí iontově selektivních elektrod. Tato metoda je v laboratořích široce využívána díky možnosti snadné automatizace zejména pro rutinní analýzy. ISE jsou obvykle umístěny v blocích, proto lze z jednoho naředěného vzorku stanovit více iontů najednou (Schneiderka).

1.3.2.1.1.2 Plamenová emisní spektrofotometrie

Plamenová emisní spektrofotometrie je založena na měření intenzity zbarvení plamene. V klinické biochemii jsou využívány plamenové fotometry, které jsou konstruované především pro paralelní stanovení koncentrace sodných a draselných iontů. U běžných plamenových fotometrů je palivem propan, který ve směsi se vzduchem poskytuje teplotu 1930 °C. Některé další plamenové fotometry používají palivo acetylen-vzduch, mají výhřevnější plamen a díky tomu umožňují stanovení vápenatých iontů. Když je roztok stanovovaného vzorku vnesen do plamene, prvky ve sloučenině jsou částečně převedeny do atomárního stavu. V tomto stavu jsou elektrony nestabilní a rychle se vrací na svou původní energetickou hladinu. Při této změně emitují světlo. Za kontrolovaných podmínek je množství emitovaného světla přímo úměrné počtu atomů, které byly excitovány, což je úměrné i koncentraci látky ve vzorku.

PES je poměrně spolehlivá a levná metoda. V laboratorní praxi je ale opouštěna, neboť plamenové spektrofotometry se poměrně obtížně integrovaly do automatických analyzátorů (na rozdíl od ISE) (Schneiderka).

1.3.2.1.1.2.1 Plamenový fotometr

Plamenový spektrofotometr je složen ze zmlžovací komory, do které ústí nasávací kapilára, přívod stlačeného vzduchu a topného plynu. Součástí jsou také interferenční filtry pro jednotlivé prvky, hořák, fotodetektor a vyhodnocovací systém, který převádí vzniklou elektrickou energii na digitální zobrazení.

Do bezbarvého plamene se vhání roztok ve formě aerosolu, který se mísí s topným plynem. Díky teplotě plamene dochází k odpaření vodného rozpouštědla a disociaci molekul na volné atomy. Volné atomy jsou excitovány s následnou emisí záření, které je rozloženo jednoduchým disperzním systémem a měřeno fotoelektrickým článkem. K izolaci spektrálních čar se používá interferenčních filtrů a jako detektor intenzity emitovaného světelného toku slouží fotonka. Aby měření probíhalo za konstantních

podmínek, je třeba použít vnitřního standardu, kterým je roztok LiCl nebo CsCl. Vždy se měří současně spektrální linie kovu vnitřního standardu a stanovovaného kovu. Tímto způsobem je kompenzován vliv změn tlaku plynné směsi a viskozity roztoku. Ředění vzorků se musí provést před samotným měřením, které probíhá buď automaticky pomocí dilutoru, který je součástí plamenového spektrofotometru, nebo manuálně.

(Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi, 2007; Schneiderka).

1.3.2.2 Draslík

Draslík je hlavní intracelulární kation. V organismu je obsaženo asi 3,5 tisíc mmol draslíku; 98 % se nachází v ICT, na ECT připadají jen asi 2 % celkového draslíku. Zatímco extracelulární draslík je prakticky úplně ionizován (jako kation K^+), velká část intracelulárního draslíku je vázána na makromolekulární struktury, hlavně bílkoviny a polysacharidy (Racek, 2006; Wilhelm, 2006).

Fyziologické rozmezí koncentrace draslíku v plazmě (ECT) je 3,8 - 5,2 mmol/l, průměrně 4,5 mmol/l. Naproti tomu v buňkách je koncentrace draslíku až o dva řády vyšší; pohybuje se v rozmezí 110 - 160 mmol/l, v erytrocytech kolem 95 mmol/l. Zachování tohoto poměru je nezbytné pro správnou funkci buněk - nervosvalovou dráždivost a dráždivost buněk převodního systému myokardu (Dastych M., 2008; Racek, 2006).

Distribuce draslíku s převahou v ICT a sodíku s převahou v ECT je zajišťována aktivní činností tzv. „sodíkové pumpy“ - enzymu Na^+-K^+ -adenosintrifosfatázy, který ke své činnosti vyžaduje ATP; většina klidové spotřeby energie (tzv. bazální metabolismus) je využita právě k zajištění membránového přenosu iontů proti koncentračnímu gradientu. Činností uvedeného enzymu se vyměňují 3 Na^+ za 2 K^+ a H^+ za spotřeby jedné molekuly ATP (Racek, 2006).

Při nedostatku energie v buňce se snižuje činnost sodíkové pumpy a draslík uniká z buněk. To může nastat in vivo u nemocného v katabolismu, ale i in vitro: stojí-li delší dobu odebraná krev, erytrocyty spotřebují glukózu a nemají již energii na udržení membránových dějů. Při uchovávání plné krve v chladnici se činnost sodíkové pumpy

zastavuje ihned a únik draslíku do plazmy nastává dříve než při pokojové teplotě (Wilhelm, 2006; Dastyh M., 2008; Racek, 2006).

1.3.2.2.1 Kvantitativní stanovení draslíku

Pro kvantitativní stanovení draslíku se v mnoha případech používá metoda ISE. Toto vyšetření je stejně tak jako v případě sodíku výhodné z hlediska automatizace. Plamenová emisní spektrofotometrie byla také v minulosti používána jako rutinní metoda stanovení. Dnes už se rutinně nepoužívá. Spektrofotometrická enzymatická metoda je jako u sodíku nedoporučovaná (Schneiderka).

1.3.2.3 Vápník

Převážná část vápníku (99 %) je obsažena v kostní tkáni ve formě hydroxyapatitu. Tato forma vápníku však nemá zdaleka význam pouze pro zajištění mechanické pevnosti kostí. I u zdravého člověka dochází k neustálé remodelaci kosti a vápník v kostech slouží jako pohotová zásoba pro jeho extracelulární potřebu. Zbytek vápníku je prakticky všechen obsažen v extracelulární tekutině, neboť jeho koncentrace v buňkách je velmi nízká.

Denní příjem vápníku je asi 25 mmol (1 g). Z tohoto množství se vstřebá 35 - 50 %, a to v proximální části tenkého střeva; zbytek se vyloučí stolicí. Ledviny vylučují vápník glomerulární filtrací, avšak 98 - 99 % profiltrovaného množství se v tubulárním systému opět vstřebá. Většina resorpce (65 %) probíhá v proximálním tubulu, 25 % v Henleho kličce a zbylých přibližně 10 % v distálním tubulu; resorpce v distálním tubulu je závislá na resorpci sodíku (dochází ke kompetici obou těchto iontů) (Wilhelm, 2006; Racek, 2006).

1.3.2.3. Kvantitativní stanovení vápníku

Nejvíce využívané jsou fotometrické metody stanovení z důvodu možnosti automatizace metod v rutinním provozu. Mezi doporučené metody patří také plamenová atomová emisní spektrofotometrie a plamenová atomová absorpční spektrofotometrie, které ovšem nejsou rutinně prováděny (Dastyh, 2008).

1.3.2.3.1 Stanovení s o-kresonftaleinkomplexonem

Podstatou stanovení je reakce vápenatých iontů s o-kresonftaleinkomplexonem. Tato metoda stanovení je vysoce citlivá na vzdušný CO₂. Z tohoto důvodu je důležité minimalizovat kontakt reagenční plochy se styčnou plochou mezi atmosférou a reagensy. Reakce probíhá v zásaditém prostředí (pH 12). Výsledkem měření je vznik purpurového komplexu a absorpční maximem při 600nm.

1.3.2.3.2 Stanovení s Arsenazo III

Stanovení je postaveno na fotometrickém principu měření kdy se v imidazolovém pufru měří komplex modré barvy reakcí vápenatých iontů s Arsenazo III. Intenzita zabarvení je dána koncentrací iontu ve vzorku (Siemens, ADVIA 1800, technický manuál).

1.3.2.4 Fosfor

Zatímco intracelulární fosfor představují z velké části organické estery kyseliny fosforečné, je většina fosforu extracelulárně uloženého anorganická; v plazmě většinu organicky vázaného fosforu tvoří fosfolipidy. Anorganický fosfor v plazmě (séru) je směs hydrogenfosforečnanů (HPO₄²⁻) dihydrogenfosforečnanů (H₂PO₄⁻), při pH 7,4 v poměru 4 : 1. Fyziologické rozmezí koncentrace anorganického fosforu v séru

(plazmě) je 0,7 - 1,6 mmol/l u dospělých, u dětí až 2,2 mmol/l; souvisí to s růstem kostí. Močí se vylučuje denně 16 - 40 mmol anorganického fosforu. Jeho vylučování je pod kontrolou parathormonu, který brání zpětné resorpci fosfátů (Dastyh, 2008; Racek, 2006).

1.3.2.4.1 Kvantitativní stanovení fosforu

Pro kvantitativní stanovení fosforu se aplikuje molybdatová metoda. Reakce může probíhat dvěma způsoby. Prvním způsobem je stanovení prostřednictvím molybdenanu a vanadičnu amonného. Touto reakcí vzniká v kyselém prostředí molybdatovanadátosfosforečná. Metoda není vhodná k automatizaci z důvodu nutnosti provedení hodnocení až po vysrážení bílkovin. Druhá metoda stanovení prostřednictvím molybdenanu amonného má lepší podmínky pro automatizaci, proto se hojněji využívá. Podstatou reakce je vznik fosfomolybdatového komplexu v kyselém prostředí (Siemens, ADVIA 1800, technický manuál).

2. Cíle práce

- 1) Naučím se ovládat metodiku vyšetření iontů ze vzorku krve.
- 2) Zjistím hodnoty stanovení vybraných minerálů a budu je vyšetřovat ve spolupráci s laboratoří.

3. Metodika

V praktické části bakalářské práce uvedu způsob, jakým jsem vzorky biologického materiálu vyšetřovala. Bude zde popsán postup získání vzorků krve ve spolupráci s personálem plazmaferetického oddělení Plasmafera s.r.o., zpracování biologického materiálu včetně jeho přípravy k vlastní analýze a bude charakterizován princip metody, která byla k analýze použita. Vyšetřila jsem celkem 50 vzorků venózní krve v Laboratoři klinické chemie v Nemocnici v Českých Budějovicích a.s. Jména vyšetřovaných pacientů jsou z důvodu povinné mlčenlivosti utajena a nahrazena čísly. V obou laboratořích jsem se řídila operačními postupy danými pro příslušné úkony.

3.1 Plazmaferetické centrum

Má praktická část započala v plazmaferetickém centru Plasmafera s.r.o., která se specializuje na odběr plazmy určené pro další zpracování. Díky tomuto zařízení jsem měla možnost získat vzorky pro svou analýzu a získat informace o přípravě dárce k vyšetření, odběru plazmy a propouštění plazmy (SOP - Plasmafera).

3.1.1 Příjem a vyšetření dárců

Před tím, než byl dárci umožněn odběr se byla prováděna řada opatření. Dárce byl v první řadě na recepci evidován do systému dárců, byl mu změřen puls, teplota a váha a byl poučen o postupu odběru plazmy. Poté dárce vyplnil dotazník, který na základě uvedených kritérií rozhodoval o vyhovujícím, či nevyhovujícím stavu dárce pro odběr. Po úspěšném vyplnění dotazníku následovala identifikace dárce a jeho registrace do počítačového systému plazmaferetického centra. Následně sestra na recepci dárce vystavila úvodní list odběru, který obsahoval mimo jiné naměřené hodnoty – puls, teplota, váha a návrh možného odebraného množství plazmy v ml.

3.1.2 Poučení dárce před odběrem

Dárce byl povinen dodržovat intervaly návštěv mezi odběry, které nesmělo být kratší než 14 dní. Zároveň také nesměl celkový objem odebrané plazmy za rok přesáhnout 25 litrů (SOP - Plasmafera).

Vzhledem k citlivosti složení plazmy na lipidy přijímané v potravě, bylo nutné dodržovat cca 14-16 hodin před odběrem dietu, která vylučovala konzumaci tučných a mastných pokrmů, které by mohli narušit složení plazmy a způsobit tak odpojení z přístroje v začátku odběru, z důvodu chylózní plazmy, kterou by nebylo možné použít k farmaceutickým účelům. Zároveň bylo důležité, aby dárce před odběrem nehladověl. Doporučuje se konzumovat lehká jídla, ovoce a zeleninu (SOP - Plasmafera).

Pro dodržení jakosti odebrané plazmy bylo důležité, aby se dárce zúčastnil odběru dvakrát, s časovým odstupem kratším, než 3 měsíce. Při nedodržení tohoto kritéria by byla plazma z prvního odběru likvidována (SOP - Plasmafera).

3.1.3 Vyšetření dárce

Po poučení byl dárce pozván do vyšetřovny a konzultoval svůj vyplněný dotazník s vyšetřujícím lékařem, který dárce provedl fyzickou prohlídku a na základě konzultace vyhodnotil dárceův zdravotní stav jako vyhovující či nevhovující. Při vyhovujících podmínkách si dárce vyzvedl odběrový box, který obsahoval odběrové zkumavky na biochemické a sérologické vyšetření, vyšetření krevního obrazu a vyšetření PCR.

Díky počítačovému systému plazmaferetického centra se dárce na základě číselného zvacího systému dostavil do přípravný dárceů, kde byl očekáván zdravotní sestrou. Sestra provedla kontrolu totožnosti dárce za základě počítačového systému, ve kterém už byly zaevidované informace o dárce z recepce, zkontrolovala také dostupnost a kvalitu žil a vytiskla štítky z čárovým kódem pro odběrové zkumavky (3krát pro zkumavku pro laboratorní vyšetření, 1krát pro segment z odběrové soupravy, 1krát pro odběrový vak – při větším objemu by byly odběrové vaky dva) (SOP - Plasmafera).

3.1.4 Odběrová místnost

Po kontrole sestry dárce odvedla k volnému separátoru Autopheresis-C, uložila dárce do odběrového křesla a nalepila čárové kódy na příslušné zkumavky a odběrové vaky.

3.2 Systém Autopheresis-C

Systém Autopheresis-C je plně automatizovaný plasmaferetický systém, skládající se z přístroje Autopheresis-C a jednorázové odběrové soupravy Plasmacell-C. Systém provádí separaci plné krve na koncentrované buněčné složky a plazmu zbavenou buněčných složek. Buněčné složky se zpětně refundují do žíly dárce a separací oddělená plazma je sbírána do sběrného vaku.

Proces odběru plné krve a návrat buněčné složky vyžadoval jednojehlovou venepunkci. Byl tedy používán jeden cévní přístup. Z toho důvodu proces probíhal v opakujících se cyklech, kdy se střídaly dvě fáze odběru. V první fázi odběru byla plazma separována a sbírána a v druhé fázi reinfuze byly navraceny buněčné složky zpět do žíly dárce. Počet cyklů se odvíjel od stanoveného množství odebrané plazmy. V průběhu plasmaferézy byl monitorován žilní tlak dárce, jednak z důvodu optimálního průtoku a jednak z důvodu zamezení přetížení kapacity žíly dárce.

3.2.1 Vstupní kontrola separátoru před odběrem

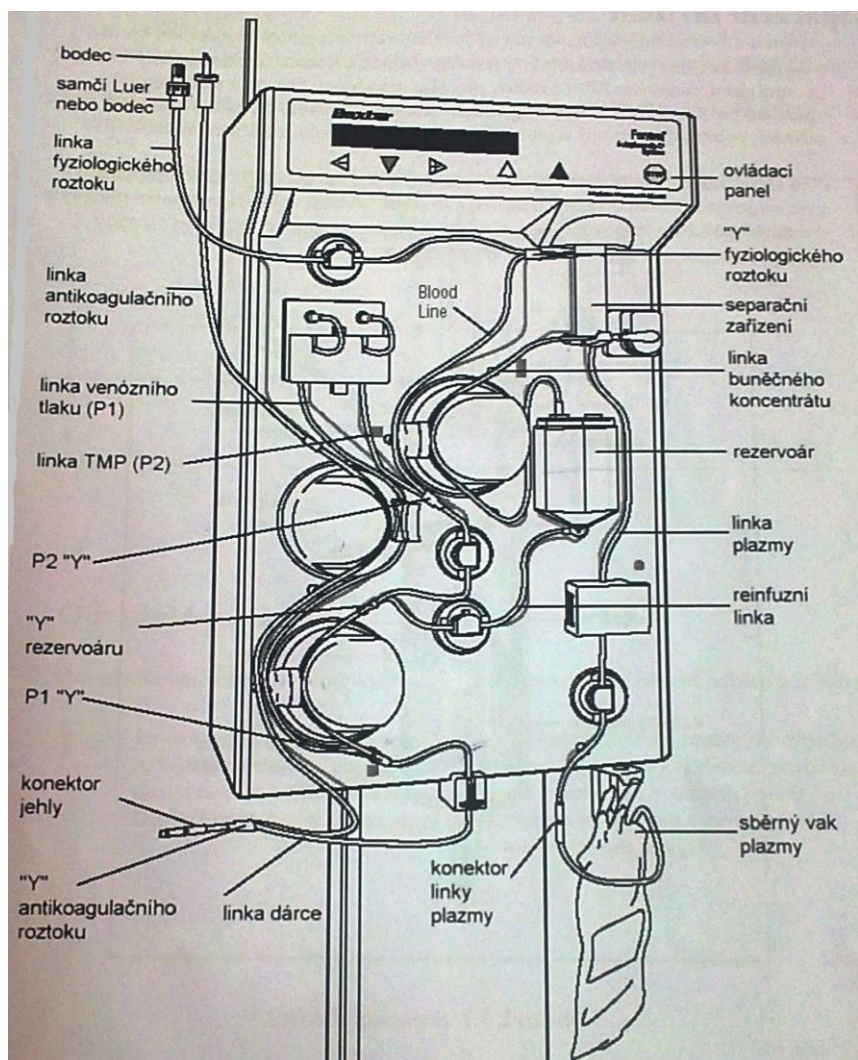
Laborantka provedla vstupní kontrolu, při které zjistila, zda jsou k separátoru správně připojeny vaky s fyziologickým a antikoagulačním roztokem a jednorázová souprava Plasmacell-C, která se skládá s integrálně připojeného separačního zařízení, reinuzního rezervoáru a soustavy hadiček, kterými se čerpá krev a roztoky v uzavřeném sterilním systému. Pokud by cokoliv z výše uvedeného připojené nebylo, laborantka by připojení provedla před odběrem. Poté laborantka provedla připojení odběrového vaku na linku plazmy. Součástí připojení vaku byla i jeho kontrola, pokud nedošlo

k mechanickému poškození, pokud je správně nalepen čárový kód atd. Po vstupní kontrole laborantka seznámila dárce o následujících krocích a informovala ho o průběhu plazmaferézy a o možnostech nežádoucích účinků jako jsou např. mdloby, zvracení, hypoventilace (SOP - Plasmafera).



Obr. 1: Systém Autopheresis-C s odběrovým lůžkem, zdroj: vlastní foto

Obr. 2: Detail systému Autopheresis-C s jednorázovou soustavou Plasmacell-C, zdroj: vlastní foto

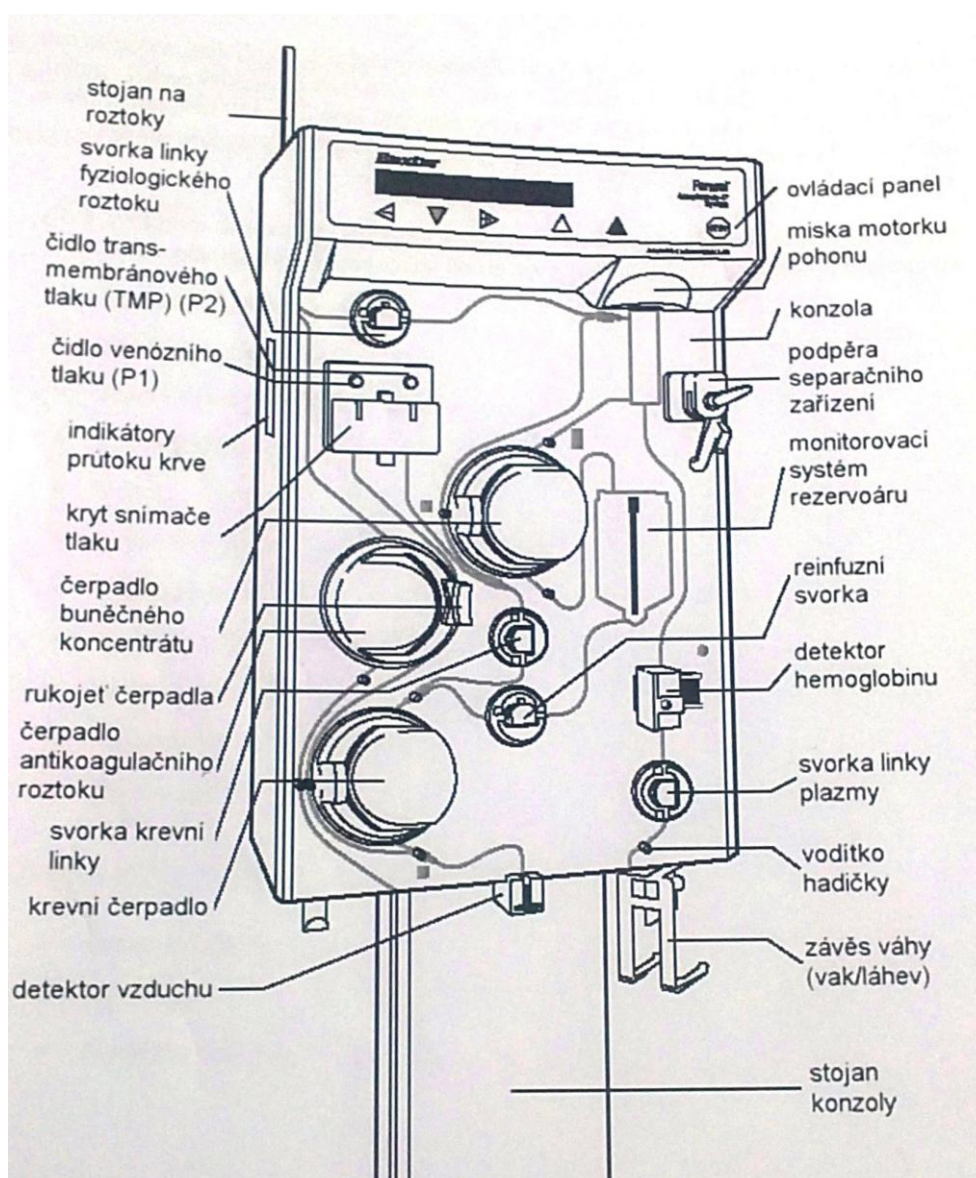


Obr. 3: Jednorázová souprava Plasmacell-C umístěna v systému, zdroj SOP - Plasmafera s.r.o.

3.2.2 Venepunkce a připojení na automatický separátor

Po přípravě dárce na plazmaferézu provedla laborantka venepunkci následujícím způsobem. V první řadě dárce nasadila tlakovou manžetu a ve spolupráci s ukazatelem hodnoty tlaku manžety nastavila optimální tlak. Následně laborantka zvolila žílu pro venepunkci a pomocí tlačítka pro snížení tlaku vypustila manžetu. Poté laborantka připravila místo venepunkce prostřednictvím desinfekce, přidáním tlaku nafoukla zpět manžetu, hemostatem uzavřela hadičku jehly v blízkosti konektoru Luer a provedla venepunkci. Po venepunkci laborantka provedla odběr venózní krve nejprve na

vyšetření krevního obrazu, poté odebrala krev pro mé vyšetření na minerály do plastové odběrové nádoby na biochemické vyšetření. Dále byla v rámci standardního vyšetření odebrána krev na biochemické a sérologické vyšetření, vyšetření KO a vyšetření PCR. Poté laborantka připojila aferézní jehlu ke konektoru na konci linky dárce jednorázové soupravy Plasmacell-C a nastavila tlak manžety na optimální úroveň pro plazmaferézu. V konečné fázi laborantka sejmula hemostaty z hadičky aferézní jehly a z hadičky linky dárce a provedla předplnění krví (SOP - Plasmafera).

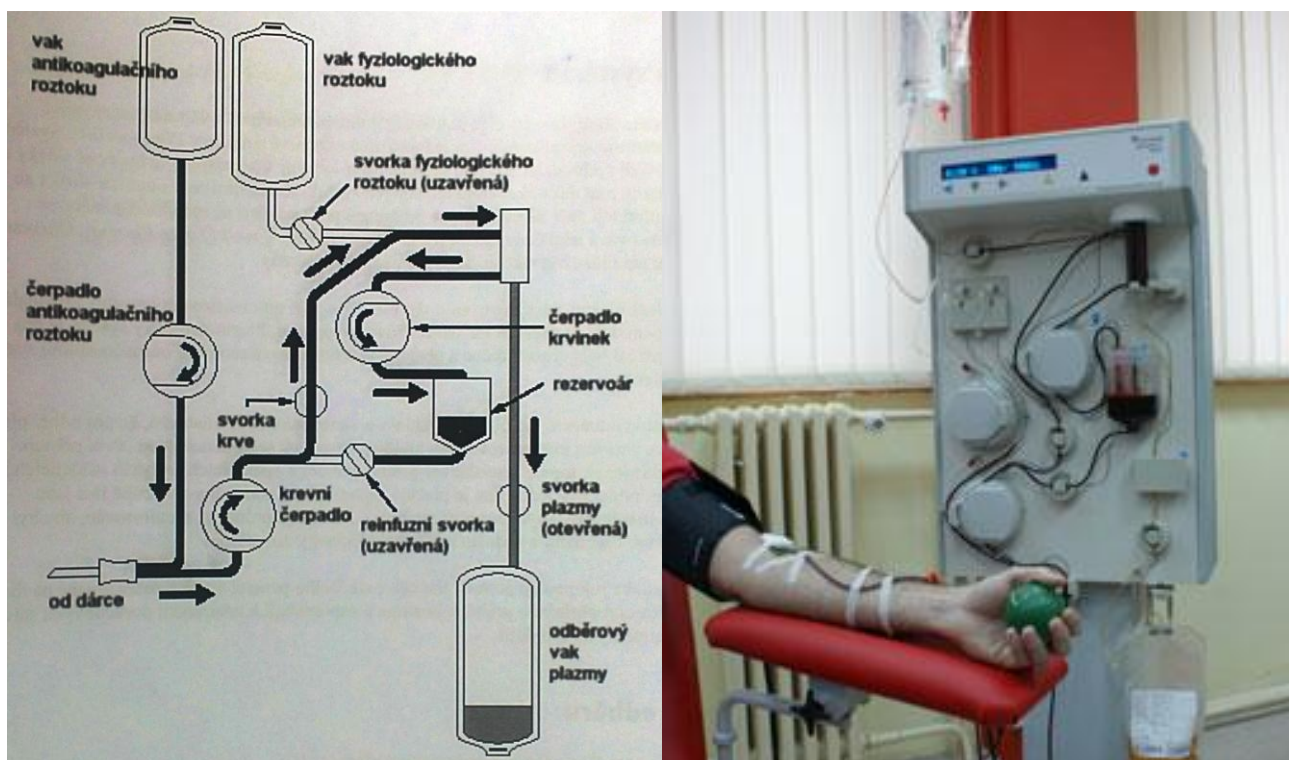


Obr. 4: Automatický separátor Autopheresis-C (detail), zdroj: SOP - Plasmafera s.r.o.

3.2.3 Fáze odběru

Každá fáze odběru probíhala v několika krocích. V této fázi docházelo v první části ke smíchání antikoagulačního roztoku s plnou krví a následně její natečení do separačního zařízení. V průběhu fáze byla reinfuzní svorka a svorka fyziologického roztoku uzavřeny. Díky krevnímu čerpadlu a čerpadlu krvinek byla krev pumpována do systému, čímž byl umožněn optimální průběh celého procesu.

Během fáze odběru plazma přitékala do odběrového vaku, zatímco koncentrát krvinek byl čerpán do rezervoáru, ve kterém se shromažďovala buněčná složka krve pro navrácení zpět dárci v druhé fázi odběru. Po naplnění rezervoáru přibližně do $\frac{3}{4}$ objemu, zahájil přístroj fázi reinfuze (SOP - Plasmafera).



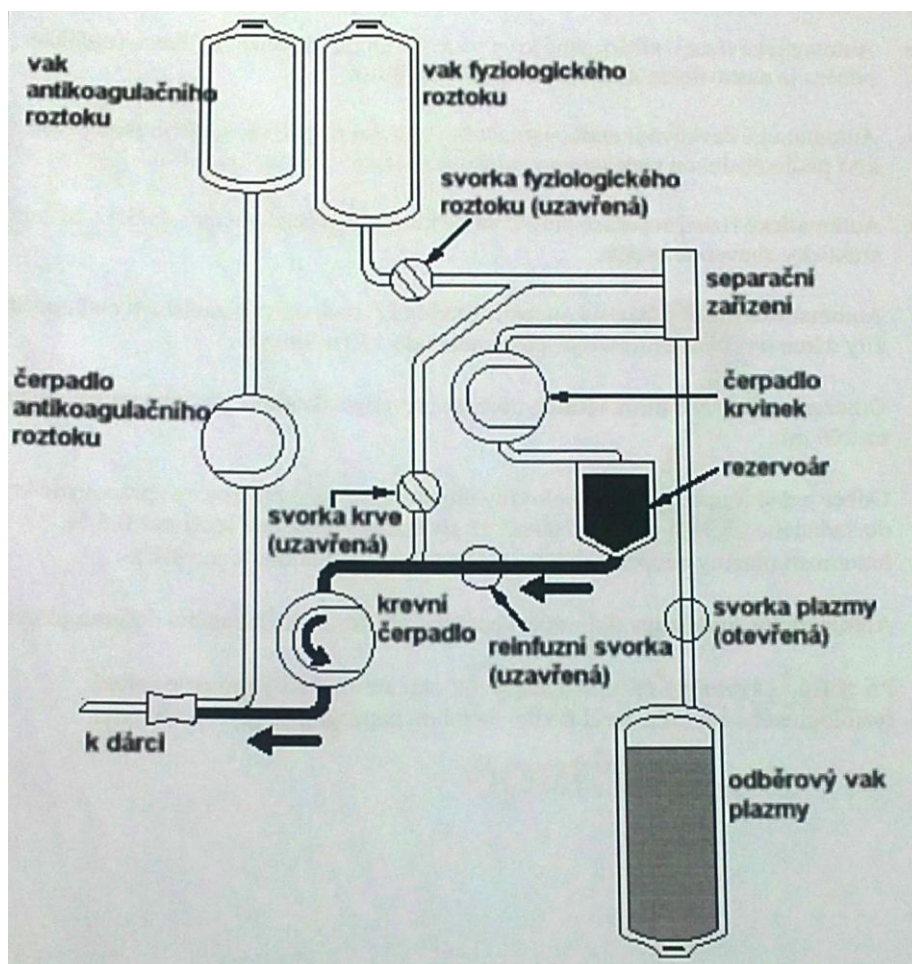
Obr. 5 Fáze odběru, detail, zdroj: SOP centra Plasmafera s.r.o.

Obr. 6 Fáze odběru, zdroj <http://www.plasmafera.eu/>

3.2.4 Fáze reinfuze

Fáze reinfuze se zahájila po dokončení fáze odběru. V prvním kroku se uzavřela krevní svorka a otevřela se reinfuzní svorka. Krevní čerpadlo následně obrátilo směr čerpání a navracelo buněčný obsah rezervoáru zpět dárci. Venózní tlak bylo třeba neustále monitorovat z důvodu rizika překročení kapacity žíly dárce (SOP - Plasmafera).

Obě dvě fáze se opakovaly, dokud nebyl nashromážděn předem stanovený objem plazmy. Poté co systém dosáhl požadovaného objemu, spustil poslední fázi reinfuze. Plasmaferetický odběr obvykle dosáhne 8-12-ti plných cyklů (SOP - Plasmafera).



Obr. 7: Fáze reinfuze, zdroj: SOP centra Plasmafera s.r.o.

3.2.5 Ukončení odběru

Po dokončení odběru plazmy byl odpojen odběrový vak plazmy před proplachem fyziologickým roztokem a infuzí. Jejím zředěním by mohli být vyhodnoceny falešně negativní výsledky. Před vyjmutím jehly bylo dárci odebráno 200ml krve do injekční stříkačky pro odčerpání části fyziologického roztoku z důvodu předcházení zkreslení výsledků biochemického vyšetření. Poté laborantka odebrala krev určenou pro mé stanovení minerálů po plazmaferéze. Po odběru laborantka vyjmula aferézní jehlu z žíly dárce a provedla ošetření místa venepunkce. Souprava byla následně uzavřena v požadovaných místech, svorky, čerpadla, dvířka detektoru hemoglobinu a detektoru vzduchu zůstanou otevřeny. Zbytek jednorázové soupravy a roztoky z přístroje byly odpojeny a zlikvidovány. Sběrný vak s odebranou plazmou byl přesunut do odběrového boxu a předával se pracovníkovi výroby k dalšímu vyšetření. V konečné fázi se dárce dostavil zpět na recepci s odběrovým listem, kde byla sestrou překontrolována shoda dat a potvrzen úspěšný odběr plazmy a dárce byl propuštěn z plazmaferetického centra (SOP - Plasmafera).

3.2.6 Vyšetření odebrané plazmy

Laboratorní vyšetření bylo prováděno k vyhodnocení vhodnosti dárce pro odběr. V rámci plazmaferézy se provádělo stanovení krevního obrazu prostřednictvím hematologického analyzátoru Beckman coulter HmX-AL. Dále byl dárci odebrán vzorek krve pro sérologické vyšetření a vyšetření PCR (SOP - Plasmafera).

Každá odebraná plazma byla v rámci vyloučení rizika infekce sérologicky vyšetřována na onemocnění:

- HBV (žloutenka B)
- HCV (žloutenka C)
- HIV
- Syfilis

Průkaz přítomnosti infekce minimálně jednoho z uvedených typů bylo důvodem k okamžitému vyloučení z dárcovství (SOP - Plasmafera).

3.2.6.1 Detekce a likvidace nevyhovující plazmy

Předpokladem pro získání kvalitní plazmy vhodné k zpracování na další produkty je splnění požadavků, kterými by se měl každý dárcce řídit. V opačném případě zdravotnický personál plazmu vyřazoval k likvidaci do likvidačního kontejneru. Během mé účasti při transfuzích byla laborantkou detekována pouze jedna chylózní plazma, která musela být vyřazena z procesu. Mezi možné případy nevyhovující plazmy řadíme:

1) Reaktivitu virových markerů a syfilis

Toto vyšetření patří mezi standardní laboratorní test, které se vyšetřuje z důvodu zamezení infekce odebrané plazmy. Pokud by vyšetření prokázalo pozitivní nález, byla by plazma likvidována a dárcce by byl vyloučen z dárcovského programu.

2) Nestandardní vzhled plazmy

Chylózní plazma se vzhledově jeví jako zakalená a prakticky je nevhodná k dalšímu použití. Pokud dojde k tomuto znehodnocení plazmy, je na vině dárcce, který nedodržel stravovací požadavky např. omezit tučná jídla před odběrem plazmy.

Plazma může být vzhledově znehodnocena i jinak. Mezi tyto vady řadíme plazmu s příměsí erytrocytů, plazmu s nízkou hmotností, apod.

3) Nestandardní podmínky skladování

K tomuto typu znehodnocení by mohlo dojít v případě, že zdravotnický personál nedodrží podmínky uchovávání plazmy po odběru. Pokud dojde k této chybě, nastává ireverzibilní znehodnocení jakosti plazmy.

4) Porušení vaku

Porušení vaku by mohl způsobit zdravotnický personál při odběru, při skladování, nebo při balení. Pokud by došlo k jakémukoli poškození odběrového vaku s plazmou, bylo by nutné plazmu zlikvidovat (SOP - Plasmafera).

3.3 Transport

V rámci dodržení zásad mimolaboratorní preanalytické fáze jsem dopravila vzorky spolu s biochemickými žádankami do biochemické laboratoře Nemocnice v Českých Budějovicích za optimálních transportních podmínek. Transport proběhl rychle, šetrně v uzavřeném prostoru za stálých teplotních podmínek a bez přístupu světla. Při nedodržení vhodných podmínek při transportu by mohli být vzorky nenávratně znehodnoceny, např. rozkladem bilirubinu při účinku světla, poškozením odběrových nádobek, hemolýzou apod. (Racek, 2006).

3.4 Preanalytická fáze (laboratorní)

Laboratorní preanalytická fáze započala příjmem biologického materiálu do laboratoře. Při příjmu jsem provedla kontrolu vzorků a identifikaci biologického materiálu. Pod dohledem zdravotní laborantky jsem vložila údaje o dárci do laboratorního informačního systému. LIS následně přiřadil dárci čárový kód, který obsahoval informace o druhu biologického materiálu a požadovaném vyšetření.

V případě příjmové části laboratoře může dojít k závažné chybě, pokud laborantka nedopatřením zamění vzorky mezi sebou. Jestliže by příjmová laborantka zaměnila vzorky a přiřadila čárový kód na nesprávný vzorek, mohla by tak ve velké míře ohrozit pacientův život vyhodnocením nesprávného výsledku (Adolfo Romero, 2012; Racek, 2006).

3.4.1 Laboratorní informační systém

V laboratoři klinické chemie Nemocnice České Budějovice a.s. se v současné době využívá systém LISNET zajišťovaný společností STAPRO s.r.o. v Pardubicích. Do systému jsem navolila požadovaná vyšetření na stanovení minerálů Na, K, Ca a P. LIS v poslední fázi vygeneroval každému dárci jeho vlastní identifikační číslo a čárový kód s informacemi o typu biologického materiálu a názvu vyšetření, které bylo prováděno. V této fázi byla odběrová zkumavka polepena štítkem s čárovým kódem a připravena k centrifugaci. Po úspěšném příjmu materiálu jsem vzorky umístila do systému linky, který automaticky provedl přípravu analytických vzorků pro další použití.

3.4.1.1 Odmítnutí biologického materiálu

Biologický materiál je odmítnut v případě, že

- a) na žádance nebo na odběrové zkumavce nejsou uvedeny nebo jsou nečitelné údaje důležité pro identifikaci vzorku a pro styk se zdravotní pojišťovnou a pokud není možné tyto údaje doplnit telefonickým kontaktováním ordinace lékaře
- b) odběrová zkumavka není dostatečně označena nebo údaje jsou nečitelné
- c) nesouhlasí-li údaje uvedené na žádance a na odběrové zkumavce (za závazné jsou vždy považovány údaje uvedené na odběrové zkumavce)
- d) materiál, u něž zjevně došlo k porušení zásad při odběru, transportu či uložení a je znehodnocen natolik, že jej nelze vyšetřit
- e) došlo-li ke kontaminaci žádanky nebo odběrové zkumavky biologickým materiálem
- f) laboratoř požadovaná vyšetření neprovádí.

3.4.2 Centrifugace

Centrifuga je jednoduché laboratorní zařízení, které působením odstředivé síly odděluje látky s různou specifickou hustotou. Základem každé centrifugy je elektromotor s možností plynulé regulace otáček. Běžné typy centrifug určené k centrifugaci krevních vzorků mají rozsah do 5 000 ptáček za minutu, přičemž počet otáček a dobu centrifugace je možné nastavit předem (Zima, 2007).

Zkumavky s biologickým materiálem byly vkládány robotickým ramenem do válcových otvorů rotoru tak, aby bylo jejich rozložení správně vyvážené. V případě této centrifugy probíhalo symetrické rozložení automaticky. U manuálně obsluhovaných odstředivek by při nedostatečném vyvážení docházelo k vibracím, při kterých by se rotor centrifugy automaticky vypnul a zabránil by tak poškození centrifugovaných zkumavek i samotného rotoru centrifugy.

Po naplnění rotoru robotickým ramenem byl kryt centrifugy uzavřen. Na digitálním displeji byl přednastaven standartní počet otáček za minutu a doba odstředování. Centrifuga byla nastavena pro odstředování po dobu 4min při 3500 otáčkách za minutu a teplotě 20°C. Po naplnění V případě nastavení všech paramentřů byla centrifuga uvedena do chodu.

Po skončení centrifugace se systém vyjmul zkumavky z rotoru centrifugy. Po odstředění srážlivé krve můžeme pozorovat v horní části zkumavky čiré sérum, v mezivrstvě vidíme separační gel a ve spodní části zkumavky nacházíme sraženou krev, obvykle označovanou jako krevní koláč.

3.4.3 Sekundární analytické vzorky

System linky prováděl tvorbu aliquotů automaticky dle informací získaných po přečtení čárového kódu, který v databázy obsahoval informace o požadovaných

vyšetřeních. Systém na základě toho vygeneroval a vytisknul požadovaný počet sekundárních štítků s čárovými kódy. Sekundární štítky byly automaticky aplikovány na prázdné zkumavky a pipetou systém provedl aliquoting části séra, čímž vytvořil sekundární vzorky. Po vytvoření aliquotů systém prostřednictvím automatického postupu provedl dopravu analytických vzorků k příslušnému analyzátoru, čímž byla spuštěna analytická fáze diagnostického procesu (Zima, 2007).

3.5 Analytická fáze

Podstatou analytické fáze bylo provést požadované vyšetření biologického materiálu, na jehož konci byl vyhodnocen výsledek měření. Stanovení minerálů probíhalo na automatickém analyzátoru ADVIA 1800 od firmy Siemens.

3.5.1 ADVIA 1800

Vlastní neměření vzorků bylo provedeno na biochemickém analyzátoru ADVIA 1800 od společnosti Siemens. Jedná se o plně automatický biochemický analyzátor, určený pro diagnostické použití in vitro. Analyzátor je opatřen měřicími moduly pro absorpční spektrofotometrii, fluorescenční polarizaci, turbidimetrii a potenciometrické měření iontově selektivními elektrodami (ISE). Umožňuje automatické provedení analýz z lidského séra, plazmy nebo moče s kapacitou 1200 fotometrických testů a 600 ISE testů za hodinu. Nedílnou součástí analyzátoru je datová stanice, která se skládá z PC, LCD monitoru, klávesnice, myši, tiskárny a software (Siemens, ADVIA 1800, technický manuál).



Obr 8: Systém ADVIA 1800, Siemens, zdroj:

https://www.cee.siemens.com/web/sk/sk/healthcare/lab/klinicka/Pages/advia_1800.aspx

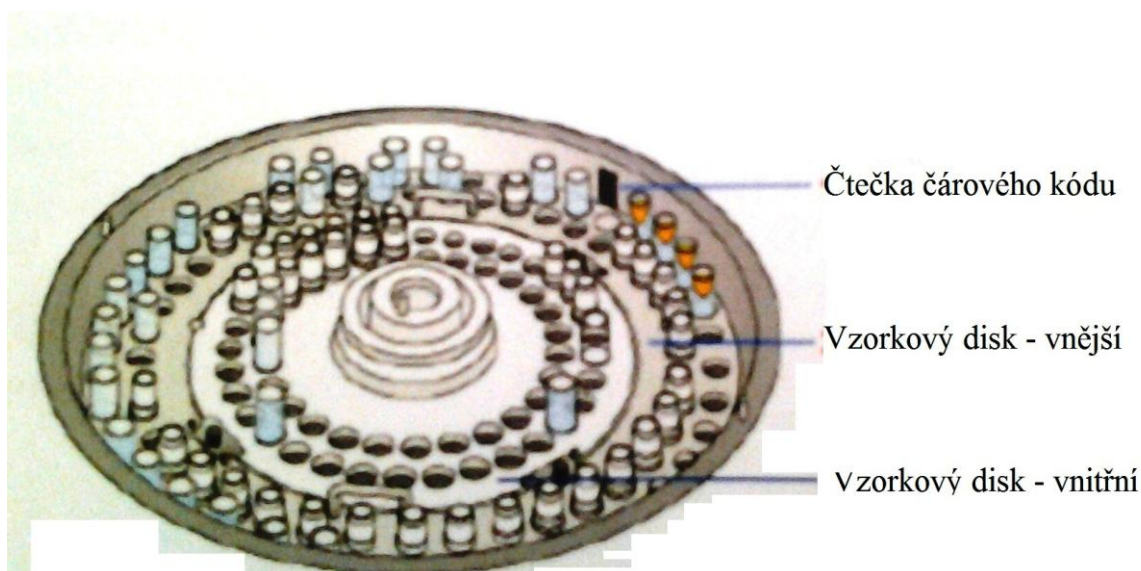
Analytické vzorky byly automaticky dopraveny linkovým systémem k analyzátoru ADVIA 1800, kde byl načten čárový kód kódovou čtečkou pro kontrolu, že se jedná o správný vzorek, ke kterému byla analýza požadována. V této fázi byla zahájena analýza vzorku. Automatický analyzátor se skládal z několika částí.

3.5.1.1 Vzorkový disk

Vzorkový disk sloužil k umístění kalibrátorů, provedení kontrol a vložení vzorků potřebných k analýze. Z důvodu nepřetržitého provozu přístroje byly vkládány statimové vzorky, potřebné pro okamžité vyhodnocení. Vzorkový disk se sestával se dvou částí:

- a) Vnější části, která se používala pro vzorky a standardy v případě vícebodové kalibrace. Obsahovala 2 řady s 42 pozicemi.

- b) Vnitřní části, která byla určena pro kalibrátory, kontroly a speciální diluenty. Skládala se ze dvou řad s celkem 61 pozicemi. Vnější část měla 34 pozic a vnitřní 27 pozic. Součástí vnitřní části bylo chlazení vodou.



Obr. 9: Vzorkový disk, zdroj: technický manuál k analyzátoru ADVIA 1800, Siemens

3.5.1.2 Pipetovací jehla

Ze vzorkového disku odebírala vzorky pipetovací jehla na ředění vzorků. Pipetovací jehla byla opatřena detektorem pro sraženiny, který byl založen na monitoringu tlakovým snímačem, kontrolujícím tlak v systému jehly. Pokud by došlo k ucpaní jehlou, nastalo by riziko nesprávného vyhodnocení výsledku, nebo ucpaní přístroje. V obou případech by přístroj upozornil zdravotnický personál varovným signálem. Dalším detekujícím prvkem pipetovací jehly byla kontrola hladiny kapaliny pro zajištění dostatečného objemu vzorku. V případě nedostačeného objemu by přístroj vygeneroval varovnou zprávu. Součástí detekčních prvků byla v poslední řadě funkce

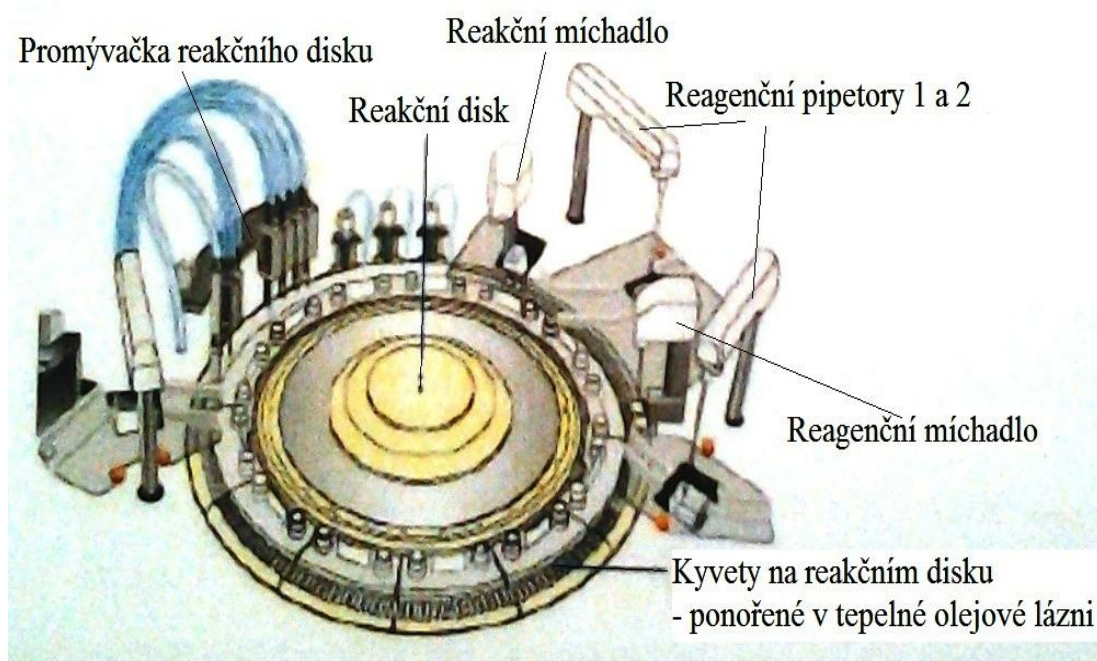
detekce nárazu. V případě nárazu pipetovací jehly na překážku by přístroj proces pipetování zastavil a opět by vygeneroval varovné hlášení pro zdravotnický personál (Siemens, ADVIA 1800, technický manuál).

3.5.1.3 Disk ředících činidel

Disk ředících činidel bylo prostředí, ve kterém byly do kyvet umístěny analytické vzorky zředěné ředící jehlou. Součástí disku bylo ředící míchadlo s funkcí promíchání zředěného vzorku. V případě, že byl zředěný vzorek odpipetován do vedlejšího reakčního disku, byla prázdná kyveta vymyta ředící promývačkou a připravena k opětovanému použití. Vzorkový pipetor dávkoval požadované množství zředěného roztoku z disku ředících činidel do reakčního disku do kyvet s reagensy. (Siemens, ADVIA 1800, technický manuál).

3.5.1.4 Reakční disk

Reakční disk byl místem, kde byly dodávány zředěné vzorky z disku ředících činidel, reagensie R1 reagenční jehlou č.1 z reagenčního disku 1 a reagensie R2 prostřednictvím reagenčního pipetoru 2 z reakčního disku č.2. Reakční disk byl umístěn do reakční vany, skládající se ze dvou senzorů na měření hladiny a z olejové nereaktivní lázně, která udržovala konstantní teplotu v kyvetách na 37°C. Teplota lázně byla řízena ohříváčem a termostatem. Součástí reakčního disku bylo reakční míchadlo, které jemnými vibracemi promíchávalo vzorek s reagensy (Siemens, ADVIA 1800, technický manuál).



Obr. 10, Reakční disk, zdroj: technický manuál k analyzátoru ADVIA 1800, Siemens

3.5.1.5 Spektrofotometr

Po promíchání obsahu kyvety byl vzorek připraven k fotometrickému měření prostřednictvím spektrofotometru, který se sestával z fotometru, halogenové žárovky a chladicí nádržky. Dalším prvkem disku byla promývačka reakčního disku, která dekontaminovala změřené vzorky v kyvetách díky sedmistupňovému systému promývání (Siemens, ADVIA 1800, technický manuál).

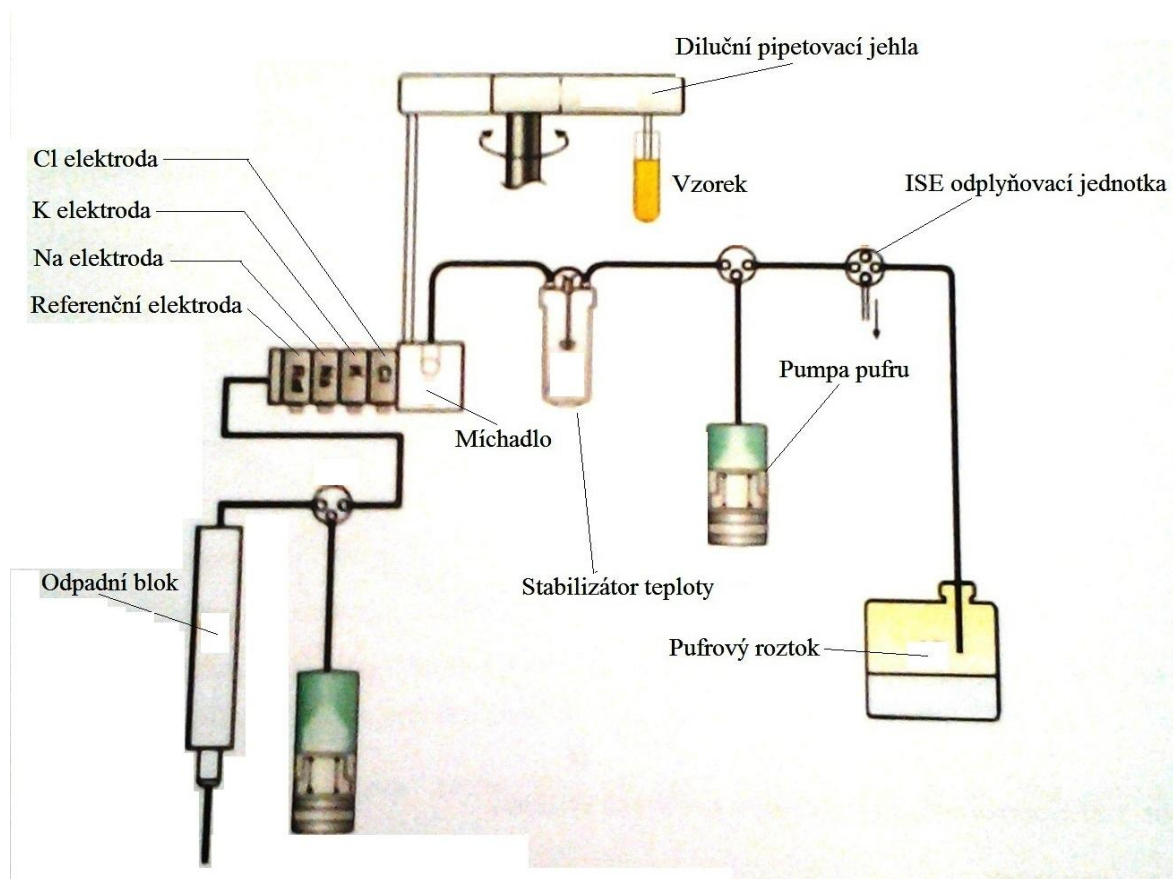
3.5.1.6 Reagenční disky

Reagenční disky 1 a 2 obsahovaly reagentie pro uskutečnění analytické reakce a detergenty, které byly používány pro denní promývání jako prevence proti kontaminaci. Reagentie byly nasávány pomocí reagenčních jehel 1 a 2 a nadávkovány v požadovaném množství do kyvet v reakčním disku pro uskutečnění požadovaného procesu. Každý disk obsahoval 56 pozic a čtečku čárového kódu pro načtení reagentií.

Štítky s čárovými kódy obsahovaly název testu, datum expirace, číslo šarže a identifikační číslo nádoby (Siemens, ADVIA 1800, technický manuál).

3.5.1.7 ISE analyzátor

ISE analyzátor měří hodnotu sodíku, draslíku a chloridu v analytickém vzorku. Pro analýzu bylo třeba neředěného vzorku. Proto byl vzorek do ISE analyzátoru aplikován před procesem ředění pro fotometrickou metodu diluční pipetovací jehlou. Jako reagentie byl v tomto případě analýzy použit pufr. Analyzátor pracoval ve dvou fázích. V první fázi bylo změřeno napětí pufru a v druhé fázi proběhlo měření vzorku. Koncentraci minerálu ve vzorku určoval rozdíl mezi hodnotami napětí, referenčního napětí a teplot kapalin.



Obr. 11: ISE analyzátor, zdroj: technický manuál k analyzátoru ADVIA 1800, Siemens

3.5.2 Metody kvantitativního stanovení minerálů

Za pomoci analyzátoru ADVIA 1800 bylo možno stanovit koncentrace jednotlivých minerálů prostřednictvím potenciometrické metody ISE, kterou byly naměřeny hladiny sodíku a draslíku a fotometrické metody prováděnou spektrofotometrem měřícím koncentrace vápníku a fosforu (Siemens, ADVIA 1800, technický manuál).

3.5.2.1 Laboratorní stanovení natria a kalia

Metoda stanovení sodíku a draslíku na analyzátoru ADVIA 1800 je založena na nepřímém potenciometrickém měření, které používá ion selektivní elektrodu (ISE) pro diagnostické stanovení in vitro. Praktické provedení potenciometrického stanovení iontů v krevním séru potenciometricky musí respektovat základní požadavky zahrnující nároky na rychlost a robustnost k individuálnímu složení matrice vzorků. Měření probíhá v průtokovém systému, kdy je elektroda omývána po sobě jdoucími vzorky, nebo referenčním roztokem. Měření jednoho vzorku tak trvá přibližně jednu minutu. Vzorek může být měřen přímo stykem krevního séra s povrchem elektrody, nebo po naředění roztokem o velké iontové síle čímž se sníží matriční rozdíly mezi jednotlivými vzorky. Rozlišujeme podle toho potenciometrii na přímou bez ředění a nepřímou s ředěním. Vzorky moče bývají natolik rozdílného složení a širokého spektra iontové síly, že se využívá ředění vždy. Vyšetřovaný vzorek je nasát jehlou ze zkumavky v množství asi 20-80 µl a naředěn ředícím roztokem k ujednocení svých matričních vlastností. Poté protéká kolem iontověselektivní indikační elektrody. Většinou jsou všechny tři, tedy draslíková, sodíková a chloridová elektroda seřazeny těsně za sebe do jednoho modulu a všechny tři základní ionty se tak měří najednou v čase i prostoru. Potenciál se měří proti referenční elektrodě, která je oddělena solným můstkem. Ten může být buď jako stabilní, nebo průtokový s odchodem roztoku solného můstku po smísení s vzorkem v prostoru za elektrodami do společného odpadu. Naměřený potenciál je jednak porovnáván s referenčním roztokem, který kolem elektrod protéká mezi vzorky a dále je využíváno kalibračního srovnání pomocí periodicky prováděné kalibrace.

3.5.2.2 Laboratorní stanovení vápníku

Vápníková metoda je založena na vznik barevného komplexu reakcí vápenatých iontů s Arsenázo III. Množství vápníku přítomného ve vzorku je přímo úměrné intenzitě vytvořeného barevného komplexu.

Rovnice reakce:

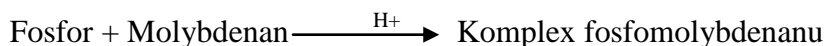


(Siemens, ADVIA 1800, technický manuál).

3.5.2.3 Laboratorní stanovení fosforu

Vyšetřovací metoda je založena na vzniku komplexu mezi fosforem a molybdenanem, který absorbuje v UV oblasti. Anorganický fosfor reaguje s molybdenanem amonným v přítomnosti kyseliny sírové, za vzniku neredukovaného komplexu fosfomolybdenanu. Jeho absorbance se měří 340/658 nm.

Rovnice reakce:



(Siemens, ADVIA 1800, technický manuál)

3.5.2.4 Průběh analýzy při fotometrickém měření

Prvním krokem bylo nasátí první reagensie pro test z reagenčního disku č.1 a její nadávkování reagenční jehlou do kyvety v reakčním disku. V případě, že byly vzorky dodány buď prostřednictvím odběrové nádoby ve vzorkovém disku, nebo byly transportovány automatickou linkou systému k analyzátoru, provedla ředící jehla nasátí a rozředění vzorku. Následně byl naředený vzorek aplikován do kyvet na ředícím disku, kde došlo k promíchání vzorku ředícím míchadlem. Po promíchání byl vzorek připraven k nepipetování požadovaného množství vzorkovým pipetorem do kyvet obsahujících první reagensii na reakčním disku. Poté reakční míchadlo provedlo promíchání

jemnými vibracemi naředěného vzorku s první reagentií. Následně provedl druhý reagenční pipetor nadávkování reagenční jehlou reagentií č.2 do reakčního disku do kyvet obsahujících promíchaný naředěný vzorek s první reagentií. Po nepipetování druhé reagentie byl obsah kyvety opět promíchán prostřednictvím reakčního míchadla. V tomto kroku byl vzorek připraven pro fotometrické měření, které bylo prováděno spektrofotometrem. Spektrofotometr měřil koncentraci každých 6 sekund. Výsledek byl automaticky přenesen do LIS ke kontrole laborantkou. Po ukončení měření byly použité kyvety promyty reakční mycí stanicí. Zároveň byla na každé vlnové délce automaticky zkontrolována energie žárovky.

3.5.2.5 Reagencie

3.5.2.5.1 ISE pufr

Reagencie pro stanovení sodíku a draslíku jsou dostupné od výrobce pod názvem ISE pufr. Skladují se v teplotních podmínkách 5-25°C. ISE pufr se skládá z několika složek o daných koncentracích. Formaldehyd s koncentrací 0,5%, sodík s koncentrací 1 mmol/l, draslík v koncentraci 0,05mmol/l a chloridy v koncentraci 1 mmol/l. Dále reagencie obsahuje pufrы a konzervační prostředky. Reagencie jsou připraveny k použití. Stabilita reagencie v analyzátoru vykazuje lhůtu 30 dnů. Pro zjištění stability neotevřené reagencie se zdravotnický personál řídí informací o datu expirace, které je vytištěno na štítku obalu reagencie (Siemens, ADVIA 1800, technický manuál).

3.5.2.5.2 Reagencie pro stanovení vápníku

Vápníková reagencie je rovněž dostupná od výrobce společnosti Siemens. Složení vápníkové reagencie je: octan sodný, pH 5,9 při koncentraci 54,2 mmol/l, Arsenazo III v koncentraci 188 µmol/l a nereaktivní stabilizátory.

Před použití reagencie je doporučováno lahvičku promíchat kvůli uvolnění bublin a zajištění homogenity. Stabilita reagencie v analyzátoru je 30 dnů. Pro neotevřené lahvičky platí datum expirace, v případě, že jsou skladovány v teplotních podmínkách +15 - +25°C (Siemens, ADVIA 1800, technický manuál).

3.5.2.5.3 Reagencie pro stanovení fosforu

Pro fotometrické stanovení fosforu jsou od společnosti Siemens dodávány dvě reagencie. Reagencie 1 v podobě kyseliny sírové zaujímá 0,36mol/l koncentrace. Reagencie 2 se skládá rovněž z kyseliny sírové v koncentraci 0,36mol/l, zároveň také obsahuje molybdenan amonný v koncentraci 3,50 mmol/l pro uskutečnění reakce (Siemens, ADVIA 1800, technický manuál).

3.5.2.6 Kalibrace

Kalibrace se v případě analyzátoru ADVIA 1800 provádí minimálně denně z důvodu nepřetržitého provozu během dne. Kalibrace jsem se účastnila ve spolupráci s vrchní laborantkou, která mě celým procesem kalibrace provedla (Siemens, ADVIA 1800, technický manuál).

3.5.2.7 Kontrola kvality

Frekvence kontroly kvality závisí na národních předpisech nebo akreditačních nařízeních. Siemens doporučuje použití dostupných komerčních materiálů kontrol kvality, s minimálně dvěma hladinami (nízkou a vysokou). Uspokojivé úrovně kontroly je dosaženo, pokud jsou dosažené hodnoty analytu, pro každou kontrolu, mezi akceptovatelným rozmezím kontroly pro daný systém nebo v rámci vašeho rozmezí, jak je určeno příslušným interním schématem kvality kontroly laboratoře. Aktuální frekvence kontroly v laboratoři, je založena na mnoha faktorech, jako je pracovní proces, zkušenosti se systémem a vládní směrnice. Každá laboratoř by měla vyhodnotit

frekvence kontrol, na základě směrnic ustanovených konkrétní laboratoří. Pokud je metoda prováděna, je doporučeno analyzovat nejméně dvě hladiny kontrol denně. Také je třeba provést kontrolní rozbor kdykoli použijete novou šarži reagentie po provedení jakékoli údržby systému, čištění nebo řešení problémů po provedení nové kalibrace (ADVIA 1800, technický manuál).

1.5.3 Postanalytická fáze

Postanalytická fáze spočívá v interpretaci výsledků ve vztahu k fyziologickým hodnotám, k výsledkům dalších vyšetření a ke klinickému obrazu pacienta.

4. Výsledky

Vyšetření jsem prováděla v Laboratoři klinické chemie Nemocnice v Českých Budějovicích a.s. Naměřené laboratorní hodnoty sodíku, draslíku, vápníku a fosforu byly zpracovány do přehledných tabulek a barevných grafů v počítačovém programu Microsoft Excel. Tabulka s naměřenými výsledky je uvedena v příloze č.1. Doplňující informace o dárcích (pohlaví, věk, množství odebrané plazmy) jsou uvedeny v příloze č.2. Ze získaných dat byly vypočítány základní statistické parametry (aritmetický průměr, směrodatná odchylka, medián, maximum a minimum).

4.1 Sodík

Tabulka 2: Popisná statistika souboru dat u natria před odběrem [mmol/l]

Průměr	140,6
Směrodatná odchylka	2,02
Medián	140,3
Minimum	136
Maximum	147,2

(Zdroj: vlastní výzkum)

Tabulka 3: Popisná statistika souboru dat u natria po odběru [mmol/l]

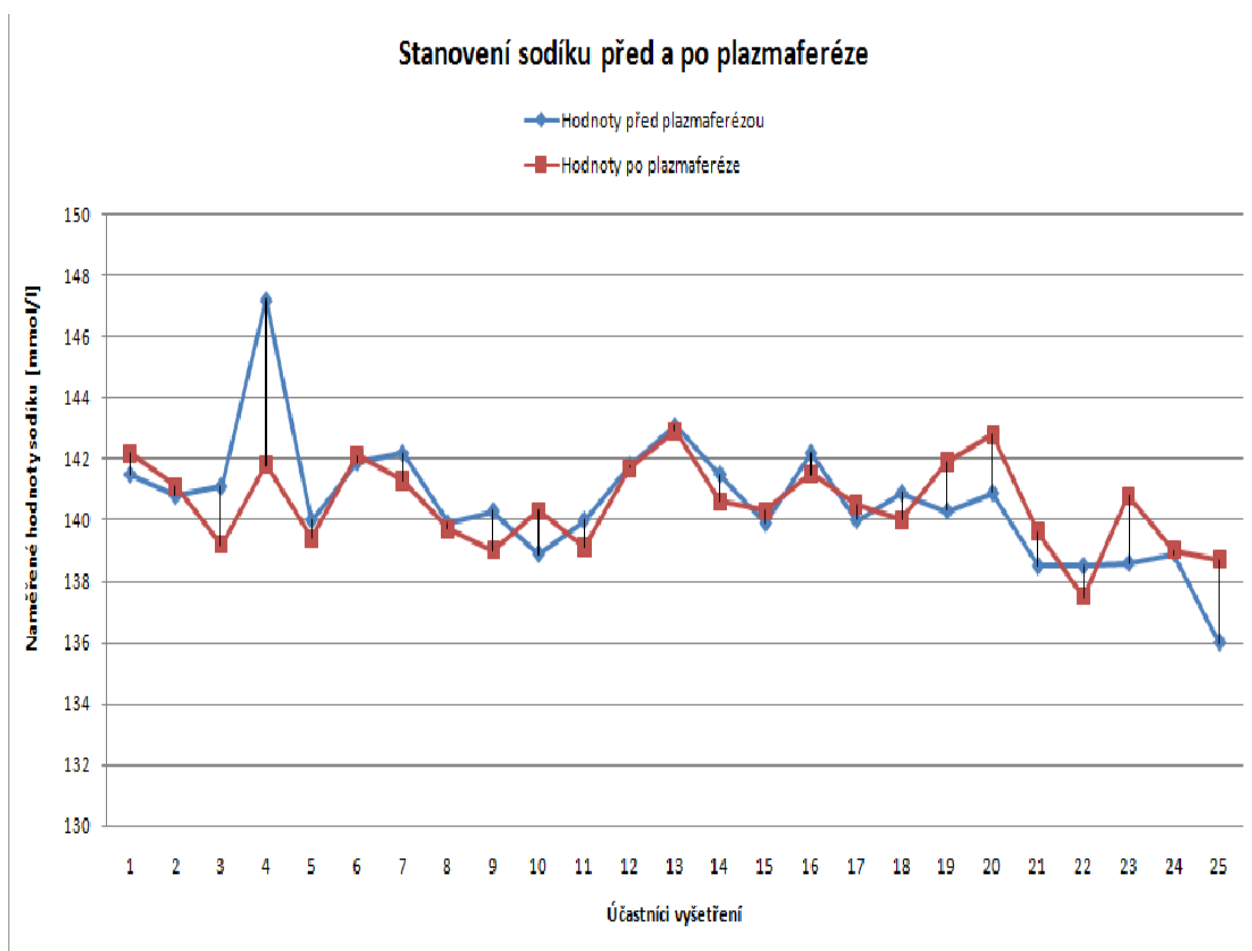
Průměr	140,52
Směrodatná odchylka	1,37
Medián	140,5

Minimum	137,5
Maximum	142,9

(Zdroj: vlastní výzkum)

Tabulka č.2 zobrazuje statistické údaje o hodnotách sodíku vyšetřenoého před plazmaferézou. Tabulka č.3 dokumentuje statistické údaje po plazmaferéze. Z grafu č.1 můžeme vidět, že vlivem diskontinuálního odběru plazmaferézy nedochází k výrazným změnám v koncentraci sodíku v krvi.

Graf 1: Hodnoty sodíku před a po plazmaferéze



(Zdroj: vlastní výzkum)

4.2 Draslík

Tabulka 4: Popisná statistika souboru dat u kalia před odběrem [mmol/l]

Průměr	4,3
Směrodatná odchylka	0,36
Medián	4,3
Minimum	3,5
Maximum	5,2

(Zdroj: vlastní výzkum)

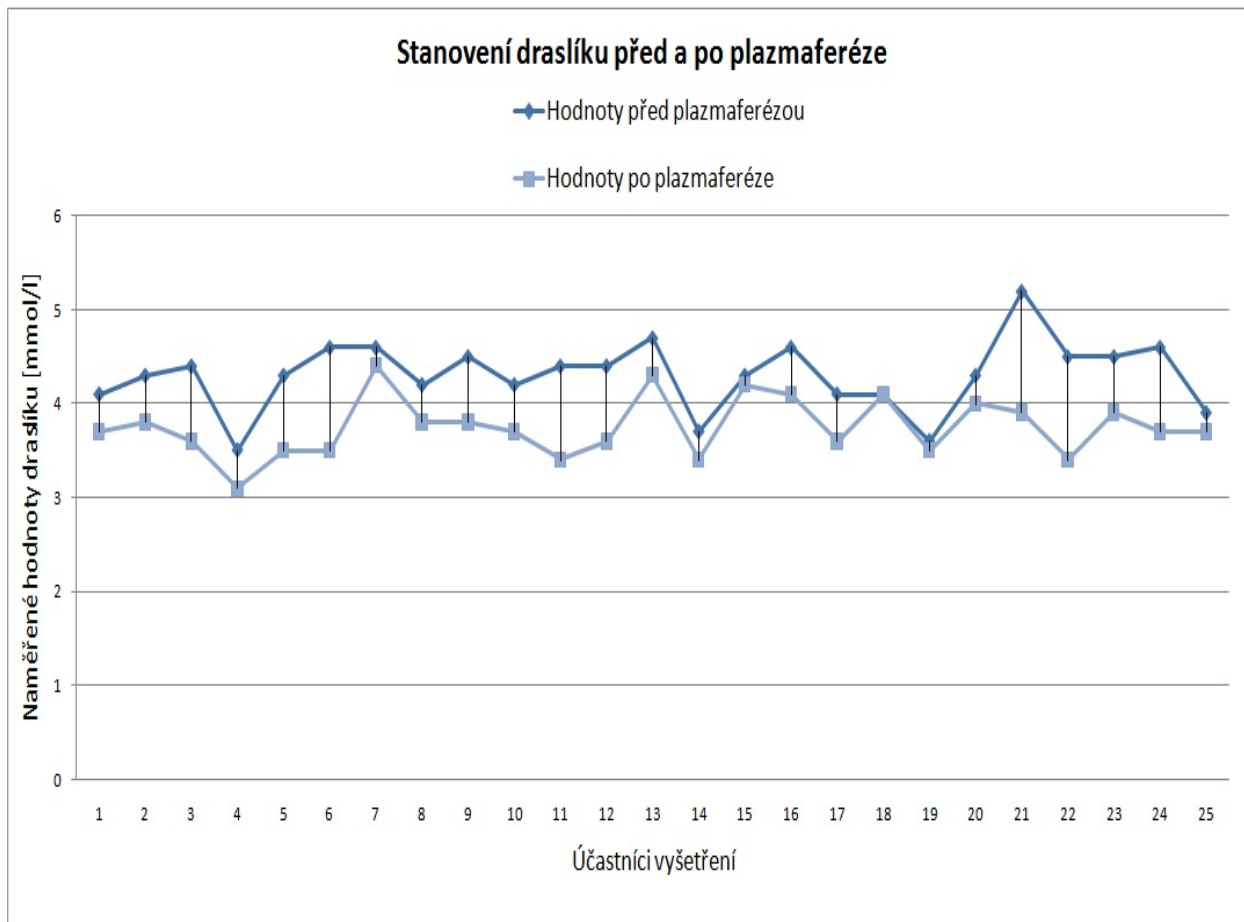
Tabulka 5: Popisná statistika souboru dat u kalia po odběru [mmol/l]

Průměr	3,75
Směrodatná odchylka	0,31
Medián	3,7
Minimum	3,1
Maximum	4,4

(Zdroj: vlastní výzkum)

Tabulka č.4 zobrazuje statistické údaje v naměřených hodnotách draslíku před plazmaferézou. Tabulka č.5 popisuje statistiku souboru dat ve stanovených hodnotách draslíku po odběru. Z grafu č. 2 je možné vidět výraznější rozdíl v hodnotách před odběrem a po odběru.

Graf 2: Hodnoty draslíku před a po plazmaferéze



(Zdroj: vlastní výzkum)

4.3 Vápník

Tabulka 6: Popisná statistika souboru dat u kalcia před odběrem [mmol/l]

Průměr	2,3
Směrodatná odchylka	0,07
Medián	2,31

Minimum	2,17
Maximum	2,5

(Zdroj: vlastní výzkum)

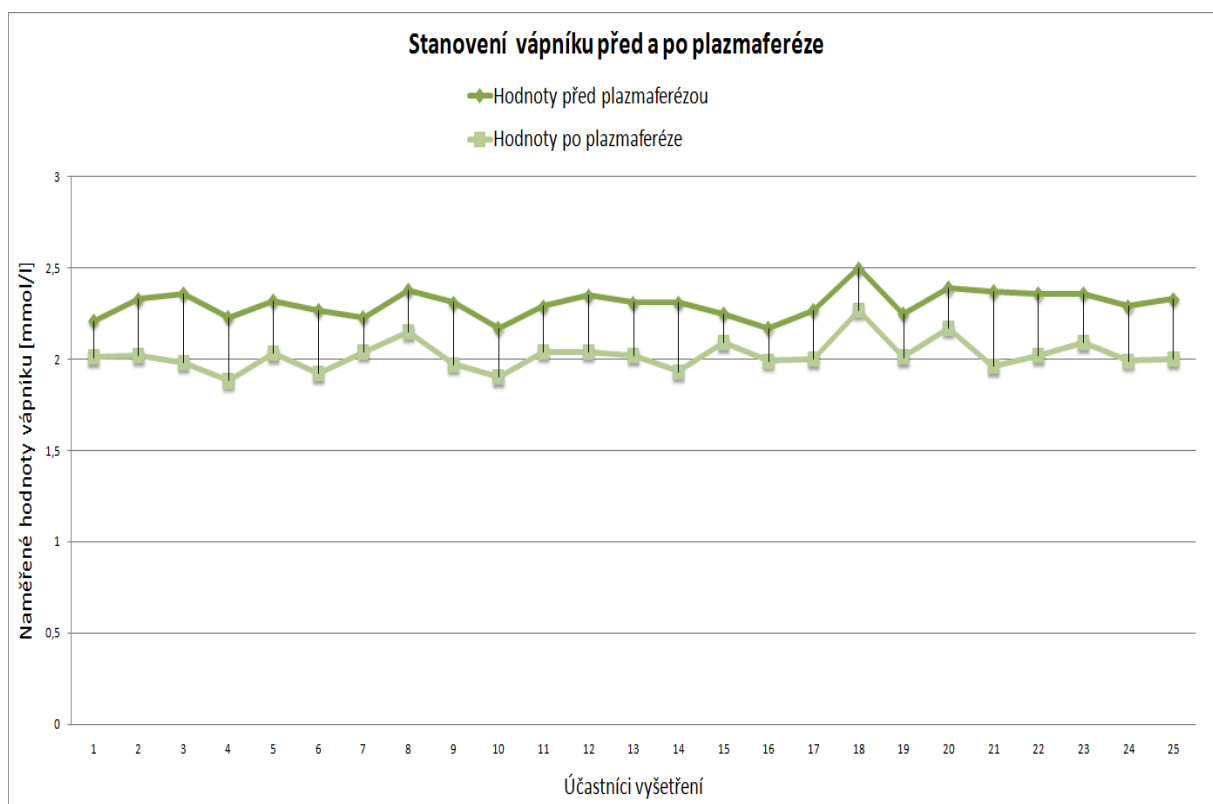
Tabulka 7: Popisná statistika souboru dat u kalcia po odběru [mmol/l]

Průměr	2,02
Směrodatná odchylka	0,08
Medián	2,01
Minimum	1,88
Maximum	2,27

(Zdroj: vlastní výzkum)

Na základě informací z tabulky č.6 a tabulky č.7 můžeme pozorovat výraznější změnu v koncentracích kalcia před odběrem a po odběru plazmy. Graf č.3 znázorňuje křivky hodnot před odběrem a po odběru.

Graf 3: Hodnoty vápníku před a po plazmaferéze[mmol/l].



(Zdroj: vlastní výzkum)

4.4 Fosfor

Tabulka 8: Popisná statistika souboru dat u fosforu před odběrem[mmol/l]

Průměr	1,06
Směrodatná odchylka	0,19
Medián	1,05
Minimum	0,62
Maximum	1,35

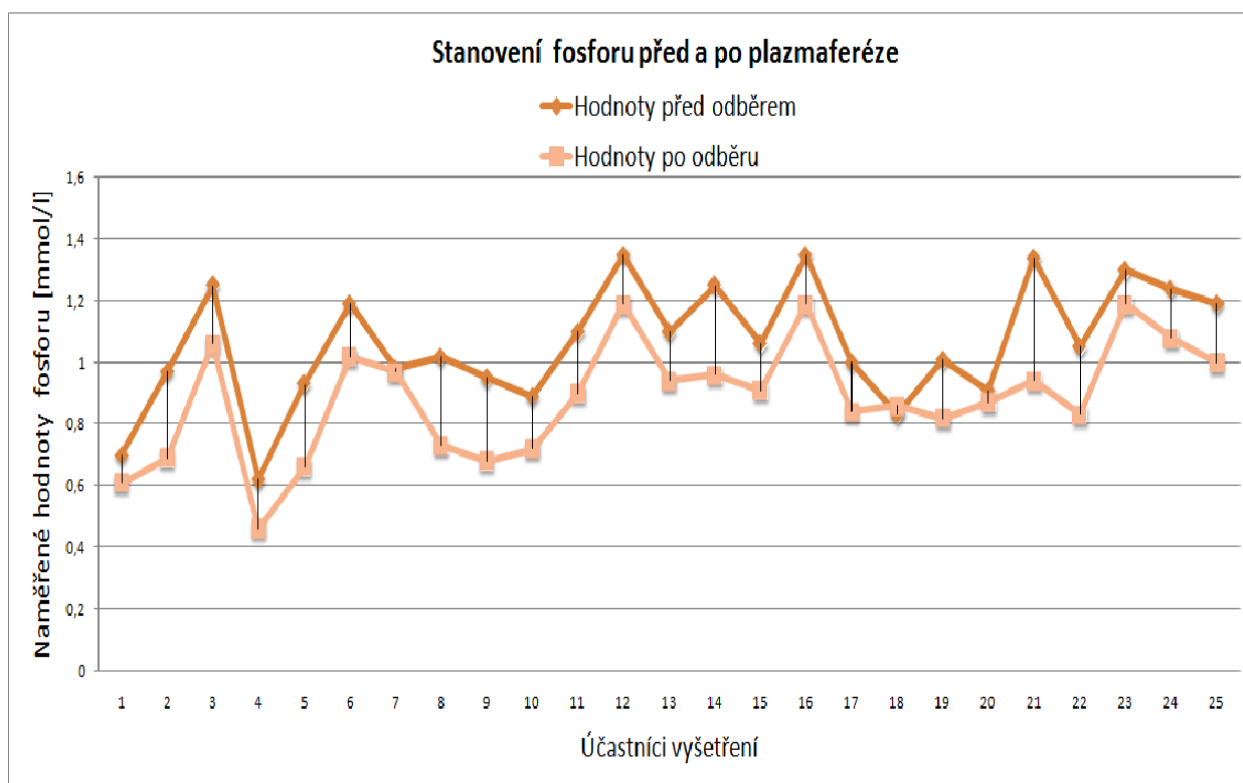
(Zdroj: vlastní výzkum)

Tabulka 9: Popisná statistika souboru dat u fosforu po odběru:

Průměr	0,88
Směrodatná odchylka	0,18
Medián	0,9
Minimum	0,46
Maximum	1,19

(Zdroj: vlastní výzkum)

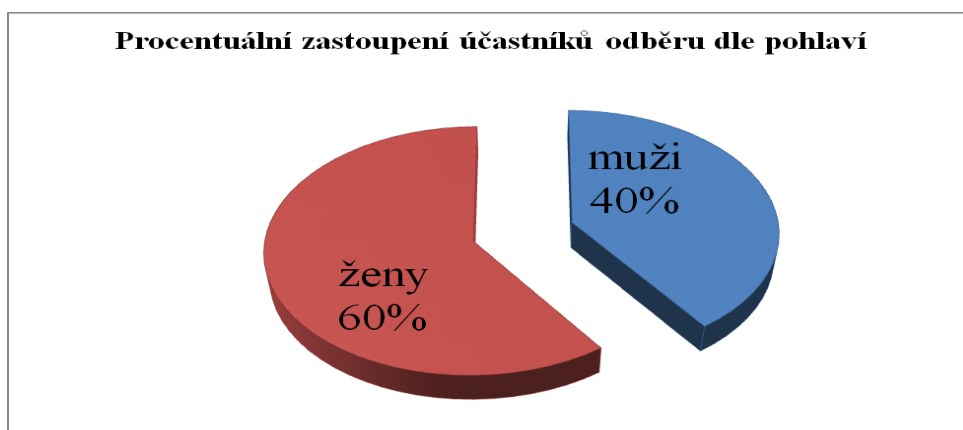
Graf 4: Hodnoty fosforu před a po odběru [mmol/l].



(Zdroj: vlastní výzkum)

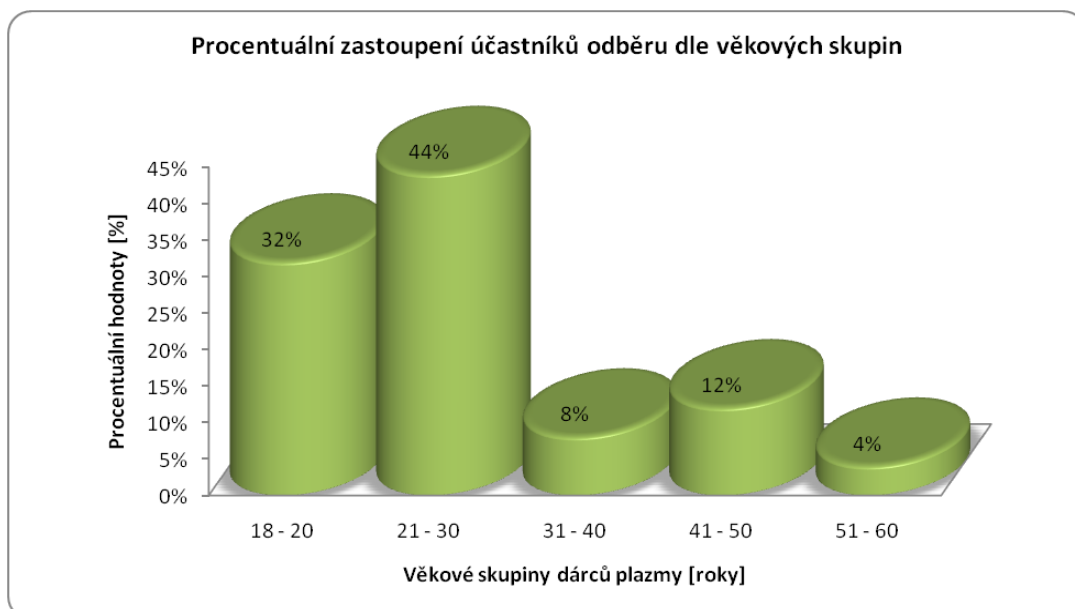
Tabulka č.8 zobrazuje statistické údaje v naměřených hodnotách fosforu před plazmaferézou. Tabulka č.9 popisuje statistiku souboru dat ve stanovených hodnotách fosforu po odběru. Z grafu č.4 je možné vidět výraznější rozdíl v hodnotách před odběrem a po odběru.

Graf 5: Procentuální zastoupení mužů a žen účastnících se výzkumu:



(Zdroj: vlastní výzkum)

Graf 6: Procentuální zastoupení účastníků dle věkových skupin:



(Zdroj: vlastní výzkum)

Tabulka 10: Naměřené hodnoty iontů před a po plazmaferéze – výsledky

číslo vzorku	Na [mmol/l]		K [mmol/l]		Ca [mmol/l]		P [mmol/l]	
	Před	Po	Před	Po	Před	Po	Před	Po
1	141,5	142,2	4,1	3,7	2,21	2,01	0,7	0,61
2	140,8	141,1	4,3	3,8	2,33	2,02	0,97	0,69
3	141,1	139,2	4,4	3,6	2,36	1,98	1,25	1,06
4	147,2	141,8	3,5	3,1	2,23	1,88	0,62	0,46
5	140	139,4	4,3	3,5	2,32	2,03	0,93	0,66
6	141,9	142,1	4,6	3,5	2,27	1,92	1,19	1,02
7	142,2	141,3	4,6	4,4	2,23	2,04	0,98	0,97
8	139,9	139,7	4,2	3,8	2,38	2,15	1,02	0,73
9	140,3	139	4,5	3,8	2,31	1,97	0,95	0,68
10	138,9	140,3	4,2	3,7	2,17	1,9	0,89	0,72
12	140	139,1	4,4	3,4	2,29	2,04	1,1	0,9
13	141,8	141,7	4,4	3,6	2,35	2,04	1,35	1,19
14	143,1	142,9	4,7	4,3	2,31	2,02	1,1	0,94
15	141,5	140,6	3,7	3,4	2,31	1,93	1,25	0,96
16	139,9	140,3	4,3	4,2	2,25	2,09	1,06	0,91
17	142,2	141,5	4,6	4,1	2,17	1,99	1,35	1,19
18	140	140,5	4,1	3,6	2,27	2	1	0,84
19	140,9	140	4,1	4,1	2,5	2,27	0,83	0,86
20	140,3	141,9	3,6	3,5	2,25	2,01	1,01	0,82
21	140,9	142,8	4,3	4	2,39	2,17	0,91	0,87
22	138,5	139,6	5,2	3,9	2,37	1,96	1,34	0,94
23	138,5	137,5	4,5	3,4	2,36	2,02	1,05	0,83
24	138,6	140,8	4,5	3,9	2,36	2,09	1,3	1,19
25	138,9	139	4,6	3,7	2,29	1,99	1,24	1,08
26	136	138,7	3,9	3,7	2,33	2	1,19	1

(Zdroj: vlastní výzkum)

Tabulka 11: Doplňující informace o účastnících plazmaferetického odběru a biochemického stanovení iontů

číslo vzorku	pohlaví	věk [roky]	váha [kg]	mn.odebrané plazmy [ml]
1	m	47	98	880
2	ž	21	55	650
3	ž	22	72	800
4	m	43	99	880
5	ž	25	114	880
6	ž	32	61	700
7	m	58	84	880
8	m	32	87	880
9	ž	24	66	751
10	ž	19	79	852
12	ž	19	58	658
13	ž	50	57	650
14	m	22	67	750
15	ž	20	65	751
16	m	27	119	880
17	m	19	85	880
18	ž	27	66	751
19	m	20	105	880
20	ž	20	58	650
21	m	22	88	880
22	ž	22	60	700
23	ž	23	65	751
24	m	20	73	800
25	ž	19	79	851
26	ž	22	58	650

(Zdroj: vlastní výzkum)

5. Diskuze

Pro svou bakalářskou práci jsem pod dohledem zdravotnického personálu změřila u celkem 50 vzorků krve předem dané ionty – sodík, draslík, vápník a fosfor. Vzorky krve byly odebrány od 25 dárců plazmy z plazmaferetického centra Plasmafera s.r.o a vyšetřovány v Laboratoři klinické chemie Nemocnice v Českých Budějovicích. Vyšetření vybraných iontů patří mezi rutinní vyšetření v biochemických laboratořích. Prostřednictvím těchto stanovení lze definovat onemocnění související s elektrolytovou nerovnováhou, srážením krve a dalších. Vyšetření uvedených iontů ze séra nebo z moče je vyžadováno v kombinaci s dalšími ionty v organismu, aby bylo možné zjistit souvislosti mezi jednotlivými vyšetřeními (Racek, 2006).

V případě stanovení sodíku (rozdíly zobrazené v grafu č. 1) byla použita elektrochemická metoda založená na principu ISE. Tento princip stanovení je z všech výše uvedených nejvhodnější z důvodu automatizace metody, což je při rutinním provozu ve velkých laboratořích vhodné. Z vyšetření koncentrace sodíku není v tomto případě zaznamenána výrazná změna v naměřených výsledcích před a po plazmaferéze (statistické údaje, medián: 140,3 před odběrem a 140,5 po odběru). Výraznější rozdíly mezi hodnotami jsou pozorovány v případě dárce č. 4, který podstupoval svůj první odběr, se mohlo jednat o prvotní zvýšenou zátěž na organismus. Minimálně změněné hodnoty natria mohou být zdůvodněny použitím fyziologického roztoku při procesu odběru plazmy. I v případě odebrání vzorku krve po plazmaferéze s přestávkou 10 minut od odběru a odebrání 200ml prvotní krve před samotným odběrem, může dojít ke zkreslení výsledku aplikací fyziologického roztoku.

Stanovené hodnoty draslíku (křivky obsahující údaje před a po odběru jsou vyhodnoceny na grafu č.2) vykazují větší rozdíl v naměřených výsledcích před a po odběru plazmy (statistické údaje, medián: 4,3 před plazmaferézou a 3,7 po plazmaferéze. V tomto případě vykazuje celkem 13 dárců sníženou hladinu draslíku pod hraniční hodnotu. Zde jsou výsledné hodnoty pravděpodobně ovlivněny samotným odběrem plazmy. Dárci zároveň vykazovali příznaky malátnosti a únavy, kterou doprovází snížená hodnota draslíku. Koncentrace draslíku byla vyhodnocena

prostřednictvím stejné metody jako v případě sodíku - ISE, která se řadí do metod potenciometrie.

Hodnocení vápníku probíhalo na základě fotometrické metody. Spektrofotometr byl plně automatizovanou součástí biochemického analyzátoru. Ve výsledcích z tabulky č. 6 a č. 7 statistických dat můžeme vidět znatelné rozdíly v naměřených koncentracích před a po výkonu plazmaferézy. Dle naměřených hodnot vykazuje všech 25 dárců výraznější pokles hodnoty koncentrace vápníku. 22 dárců vykazuje dle naměřených hodnot snížení koncentrace pod referenční hodnoty. Tento pokles se u mnoha účastníků odběru projevoval narušením nervosvalového přenosu – zvýšenou dráždivostí (Trojan, 1999; Wilhelm, 2006).

Koncentrace fosforu byla stejně jako koncentrace vápníku hodnocena fotometrickou metodou prostřednictvím spektrofotometru. Na tabulce č.8 a č.9 jsou vidět statistické hodnoty výsledků před plazmaferézou a po plazmaferéze. Na výsledcích můžeme vidět značný pokles v naměřených hodnotách fosforu. Hodnoty fosforu a vápníku jsou velice úzce spojeny. V tomto případě by mohla být snížená hodnota způsobena nadměrnou činností příštítných tělísek, které svou činností kompenzují pokles hladiny vápníku. Za prvotní příznaky při snížení hodnot fosforu se nepozorují žádné specifické příznaky (Trojan, 1999; Wilhelm, 2006).

Poslední dva grafy obsahují hodnoty procentuálního zastoupení účastníků z hlediska pohlaví a z hlediska vybraných věkových skupin.

Preanalytická fáze zahrnující i přípravu dárce na odběr představuje důležitou složku celého procesu. V mnoha případech kdy dárce nedodrží požadavky ze strany plazmaferetického centra, může dojít až k ukončení odběru před dosáhnutím stanoveného množství (např. mdloby). Při požadovaném vyšetření na koncentrace iontů v krvi je vždy požadována kombinace vyšetření iontů. Při poklesu uvedených iontů bylo možné na účastníkovi odebrané plazmy pozorovat příznaky jako je únava a nechutenství. Pokud dárce podstupuje častější a pravidelné odběry plazmy, poklesy hladin a jejich následná kompenzace může pro organismus představovat velkou zátěž.

6. Závěr

Cílem bakalářské práce bylo zvládnout teorii biochemického vyšetření krve u vybraných minerálů (sodík, draslík, vápník, fosfor) a zjistit hodnoty iontů ze vzorku krve před a po výkonu plazmaferézy.

Vyšetření minerálů patří mezi rutinní vyšetření v klinické biochemii. Zásadní význam pro získání správného a spolehlivého výsledku má však preanalytická fáze. Nerespektování pravidel preanalytické fáze může vést k výsledku biochemických analýz, které neodpovídají skutečnosti a ve svém důsledku mohou vést k chybné diagnóze v případě např. elektrolytické nerovnováhy a následně k chybnému postupu v rozhodování o léčbě těchto nemocných.

V průběhu laboratorní praxe k bakalářské práci jsem si osvojila praktické dovednosti při manipulaci s biologickým materiálem od jeho příjmu až po jeho vložení do analyzátoru. Rovněž jsem se naučila metodiku stanovení minerálů, čímž jsem cíl této práce splnila.

7. Seznam použité literatury

Analyzátor ADVIA 1800, Siemens, dostupné z:

<http://healthcare.siemens.com/laboratory-automation/systems/advia-automation-solutions>

Armellin G, Sorbara C, Bonato R, Pittarello D, Cero P, Giron G. Intraoperative plasmapheresis in cardiac surgery. *Journal of Vardiathoracic and Vascular Anesthesia*. 11: 1053-0770, 1997.

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

Dastych, M., Breinek, P. *Klinická biochemie*. Brno : Masarykova univerzita, 2008. ISBN 978-80-210-4572-9.

Drbal, K., Křížek, M. *Analytická chemie*. České Budějovice : Jihočeská univerzita, zemědělská fakulta, 1999. ISBN 80-7040-352-7.

Elston, Dirk M. Opportunities to Improve Quality in Laboratory Medicine. *Clinics in Laboratory Medicine*. Sv. 2, 2008.

Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi, 2007. Dostupné z: http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd_ds4/hypertext/AJELW.htm

Gungor O, Sen S, Kircelli F, Yilmaz M, Sarsik B, Ozkahya M, Hoscoskun C, Ok E, Toz H. Plasmapheresis therapy in renal transplant patients. *Five-year experience transplantation proceedingsa*. 43: 0041-1345, 2011.

Jabor, A. a kol. Vnitřní prostředí. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-1221-5.

Katalog BD diagnostic, Preanalytical systems, Ema edition, 2004. Dostupné z: http://www.arsaudio.cz/downloads/BD_Vacutainer.pdf

Klouda, P., *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.

Linker, Charles. 1983. Plasmapheresis in Clinical Medicine. *West J Med.* 138(1): 1010-6323, 1983.

Masopust, J. Klinická biochemie - požadování a hodnocení biochemických vyšetření I. část. Praha.:Karolinum, 1998. s. 63-66. ISBN 80-7184-648-1.

Opekar, Jelínek, Rychlovský, Plzák. *Základní analytická chemie.* Praha : Karolinum, 2003. ISBN 80-246-0553-8.

Plasmafera s. r. o. dostupné z: <http://www.plasmafera.eu/>

Racek, J. *Klinická biochemie, 2. vydání.* Praha : Galén, 2006. ISBN 80-7262-324-9.

Romero A, Cobos A, Gómez J, Muñoz M. Role of training activities for the reduction of pre-analytical errors in laboratory samples from primary care. *Clinica Chimica Acta.* Sv. 1-2, 413, 2012.

Rozsypalová, Haladová, Šafránková. *Ošetrovatelství 2.* Praha : Informatorium, 2002. ISBN 80-246-055.

Schneiderka, P. a kol. Vybrané kapitoly z klinické biochemie. Dostupné z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/biochem/text.htm>

Standartní operační postup . České Budějovice : Plasmafera s.r.o.

Technický manuál. ADVIA 1800. Siemens.

Trojan, S. *Lékařská fyziologie, 3.vydání.* Praha : Grada, 1999. ISBN 80-7169-788-5.

Turner M, Sutton D, Sauder D. The use of plasmapheresis and immunosuppression in the treatment of pemphigus vulgaris. *Journal of the American Academy of Dermatology.* 43: 0190-9622, 2000.

Valbonesi M. Therapeutic plasmapheresis and cascade filtration - Advances in technology and clonical applications. *Transfusion and apheresis.* Science, 34: 1473-0502, 2006.

Wilhelm. Co je dobré vědět o draslíku. *Praktické lékárenství.* 2006, Sv. 2, 5, 2006.

Wilhelm. Co je dobré vědět o sodíku. *Praktické lékárenství.* 2006, Sv. 2, 2006.

Wilhelm. Co je dobré vědět o vápníku. *Praktické lékařství*. 2006, Sv. 5, 2, 2006.

Zima, T. *Laboratorní diagnostika, 2.vydání*. Praha : Galén, 2007. ISBN 978-80-7262-372-3.

Zima, T. Zásady přípravy pacienta k odběru krve a preanalytická část laboratorního vyšetření. *Med. pro praxi.*, Sv. 5(9): 335-338, 2008.

8. Klíčová slova


Plazmaferéza

Vnitřní prostředí


Kvantitativní stanovení iontů

9. Přílohy

Obr. 12 Dotazník dárce plazmy 1. Část (Plasmafera s.r.o.)

 Plasmafera s.r.o.			
DOTAZNÍK DÁRCE PLASMY Označení dokumentu : F1			
PŘÍJMENÍ:	JMÉNO		NEVYPLŇUJTE (ZVACÍ ČÍSLO VYPLŇÍ RECEPCE)
RODNÉ ČÍSLO:	titul	pojišťovna	
<p>Vyplňte, prosím, zodpovědně a úplně všechny údaje a otázky <u>Správnou odpověď zakroužkujte!</u> Před vyplněním dotazníku se seznamte, prosím, s <u>„Poučením dárce krve“</u></p>			
1.	Seznámil(a) jste se s poučením o rizikovém chování z hlediska darování krve a rozumíte mu?	ANO	NE
2.	Patříte do některé skupiny s rizikovým chováním? (viz „ POUČENÍ DÁRCE KRVE “)	ANO	NE
<u>SOUČASNÝ ZDRAVOTNÍ STAV</u>			
3.	Cítíte se zdrav(a)?	ANO	NE
4.	Užíváte pravidelně léky? (uvedte všechny, včetně např. acylpyrinu, antikoncepce) Pokud Vaše odpověď zní ano, uveďte jaké:	ANO	NE
5.	Užil(a) jste v posledních 4 týdnech nějaké jiné léky? (pravidelně užívané léky již neuvádějte) Pokud Vaše odpověď zní ano, uveďte jaké:	ANO	NE
6.	Léčíte se nebo jste sledován(a) pro nějaké onemocnění (včetně infekčního)?	ANO	NE
7.	Potíte se v noci v nadměrné míře, pozorujete zvýšené teploty, zduřelé uzliny?	ANO	NE
8.	Hubnete v poslední době bez zjevné příčiny?	ANO	NE
9.	Prodělal(a) jste v posledních 4 týdnech nějaké onemocnění (nachlazení, průjem apod.)?	ANO	NE
10.	Podstoupil(a) jste v posledních 7 dnech trhání zubů nebo malý chirurgický výkon?	ANO	NE
11.	Měl(a) jste v posledních 4 týdnech přísáté klišťe?	ANO	NE

Obr. 13 Dotazník pro dárce plazmy 2. Část (Plasmafera s.r.o.)



Plasmafera s.r.o.

DOTAZNÍK DÁRCE PLASMY

Označení dokumentu : F1

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

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


ODBĚRY KRVE V MINULOSTI

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

PRODĚLANÉ CHOROBY – ANAMNÉZA (od narození do dnešního dne)

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

Obr. 14 Dotazník pro dárce plazmy 3. Část (Plasmafera s.r.o.)



Plasmafera s.r.o.

DOTAZNÍK DÁRCE PLASMY

Označení dokumentu : F1

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

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

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

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

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

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

Obr. 14 Dotazník pro dárce plazmy 3. Část (Plasmafera s.r.o.)



Plasmafera s.r.o.

DOTAZNÍK DÁRCE PLASMY

Označení dokumentu : F1

Byl(a) jsem poučen(a), že v případě nevyhovujících laboratorních vyšetření budu informován(a). Prohlašuji, že nepřicházím darovat krev za účelem vyšetření na AIDS. Beru na vědomí, že nejméně 30 minut po odběru bych měl(a) odpočívat a teprve poté se aktivně účastnit silničního provozu.

Souhlasím s tím, že mé osobní údaje a údaje o mém zdravotním stavu budou evidovány při dodržování povinné mlčenlivosti dle platného zákona a při dodržování zásad lékařského tajemství budou využívány v rámci transfuzní služby (např. referenční laboratoře pro infekční choroby, registr vyřazených dárců krve, registr dárců krve se vzácnou krevní skupinou, aj.) a v rámci výuky studentů ve zdravotnictví.

Souhlasím s tím, že mé osobní údaje budou sděleny subjektům ČČK pro potřeby oceňování dárců.

Souhlasím s tím, aby léčivé přípravky, vyrobené z mé krve (nebo plazmy), byly použity v souladu s medicínskými, etickými a humanitárními principy k léčbě nemocných v rámci platné legislativy pouze v případě, že budou vyhovovat požadavkům na jejich bezpečnost a jakost. V případě vzniku přebytku vyrobených léčivých přípravků v ČR souhlasím s jejich vývozem za účelem léčby nemocných v jiných zemích.

Žádám tímto plasmaferetické centrum o úhradu účelně, hospodárně a prokazatelně vynaložených výdajů spojených s odběrem krve a jejích složek v souladu s ustanovením § 32 odst. 2 zákona č. 373/2011 Sb., o specifických zdravotních službách a stvrzuji, že poskytnutá finanční náhrada, kterou požaduji nepřesáhne částku ve výši 5% minimální mzdy, tedy 400,- Kč. Zároveň tímto prohlašuji, že výše finanční náhrady, o kterou jsem požádal(a), odpovídá skutečné výši mnou účelně, hospodárně a prokazatelně vynaložených výdajů spojených s odběrem krve a jejích složek.


Datum

Podpis dárce

VYHODNOCENÍ DOTAZNÍKU OSOBOU ODPOVĚDNOU ZA PROPUSŤENÍ DÁRCE K ODBĚRU

Dárce vyhovuje?	ANO	NE
Nevyhovuje pro:.....		
.....		
Datum:.....podpis odpovědné osoby:.....		

Obr. 15 Biochemická žádanka, Nemocnice České Budějovice

		NEMOCNICE ČESKÉ BUDĚJOVICE, a.s. – LABORATOŘ KLINICKÉ CHEMIE Boženy Němcové 54 PŘÍJEM MATERIÁLU tel.: 38 787 3535 www.nemcb.cz	
BIOCHEMICKÉ VYŠETŘENÍ KRVE			
R. Č.: Příjmení, jméno: Oddělení: Dg.:		ZP: Tel.:	
BIOLOGICKÝ MATERIÁL			
DATUM A ČAS ODBĚRU KRVE.....			
<input type="checkbox"/> MOČOVINA <input type="checkbox"/> KREATININ <input type="checkbox"/> KYSELINA MOČOVÁ <input type="checkbox"/> CYSTATIN C <input type="checkbox"/> SODÍK <input type="checkbox"/> DRASLÍK <input type="checkbox"/> CHLORIDY <input type="checkbox"/> VÁPŇÍK <input type="checkbox"/> FOSFOR <input type="checkbox"/> HOŘČÍK <input type="checkbox"/> OSMOLALITA <input type="checkbox"/> GLUKÓZA <input type="checkbox"/> BILIRUBIN CELKOVÝ <input type="checkbox"/> BILIRUBIN KONJUGOVANÝ <input type="checkbox"/> ALT <input type="checkbox"/> AST <input type="checkbox"/> GGT (γ -glutamyltransferáza) <input type="checkbox"/> CHS (cholinesteráza) <input type="checkbox"/> ALP (alkalická fosfatáza) <input type="checkbox"/> LD (laktátdehydrogenáza) <input type="checkbox"/> CK (kreatinkináza) <input type="checkbox"/> CK-MB IZOENZYM <input type="checkbox"/> AMS (α -amyláza) <input type="checkbox"/> AMS - PANKREATICKÝ IZOENZYM <input type="checkbox"/> LPS (lipáza) <input type="checkbox"/> CHOLESTEROL <input type="checkbox"/> HDL CHOLESTEROL <input type="checkbox"/> LDL CHOLESTEROL <input type="checkbox"/> TAG (triacylglyceroly)	<input type="checkbox"/> APOLIPOPROTEIN AI <input type="checkbox"/> APOLIPOPROTEIN B <input type="checkbox"/> HOMOCYSTEIN (3) <input type="checkbox"/> CELKOVÁ BÍLKOVINA <input type="checkbox"/> ALBUMIN <input type="checkbox"/> ELFO BÍLKOVIN <input type="checkbox"/> PREALBUMIN <input type="checkbox"/> HAPTOGLOBIN <input type="checkbox"/> CRP <input type="checkbox"/> FIBRINOGEN (1) <input type="checkbox"/> β -2-MIKROGLOBULIN <input type="checkbox"/> IgA <input type="checkbox"/> IgG <input type="checkbox"/> IgM <input type="checkbox"/> IMUNOFIXAČNÍ ELFO BÍLKOVIN <input type="checkbox"/> MĚĎ <input type="checkbox"/> CERULOPLAZMIN <input type="checkbox"/> ŽELEZO <input type="checkbox"/> TRANSFERIN <input type="checkbox"/> FERITIN <input type="checkbox"/> VITAMIN B12 (3) <input type="checkbox"/> FOLÁT (3) <input type="checkbox"/> ELFO HEMOGLOBINU (1) <input type="checkbox"/> GLYKOVANÝ PROTEIN <input type="checkbox"/> GLYKOVANÝ HEMOGLOBIN (1) <input type="checkbox"/> INZULÍN <input type="checkbox"/> C-PEPTID (3) <input type="checkbox"/> CDT (karbohydrát-deficientní transferin)	<input type="checkbox"/> TSH <input type="checkbox"/> FT4 (volný tyroxin) <input type="checkbox"/> T4 (tyroxin) <input type="checkbox"/> T3 (triiodtyronin) <input type="checkbox"/> TG (tyreoglobulin) <input type="checkbox"/> ANTI-TG (autoprotiřátky proti tyreoglobulinu) <input type="checkbox"/> ANTI-TPO (autoprotiřátky proti tyreoperoxidáze) <input type="checkbox"/> TRAK (protiřátky proti TSH-receptorům) <input type="checkbox"/> PARATHORMON (3) <input type="checkbox"/> KORTIZOL <input type="checkbox"/> ACTH (4) <input type="checkbox"/> ALDOSTERON <input type="checkbox"/> STH (GH, růstový hormon) <input type="checkbox"/> HCG <input type="checkbox"/> 17-OH-PROGESTERON <input type="checkbox"/> DHEA-S (dehydroepiandrosteron sulfát) <input type="checkbox"/> ESTRADIOL 17- β (E2) <input type="checkbox"/> FSH (folitropin) <input type="checkbox"/> LH (lutropin) <input type="checkbox"/> PROGESTERON (PRG) <input type="checkbox"/> PRL (prolaktin) <input type="checkbox"/> SHBG (sexuální hormony vázající globulin) <input type="checkbox"/> TESTOSTERON CELKOVÝ (TS) <input type="checkbox"/> TESTOSTERON VOLNÝ (free-TS)	<input type="checkbox"/> AFP <input type="checkbox"/> CEA <input type="checkbox"/> PSA <input type="checkbox"/> tPSA (volný PSA) <input type="checkbox"/> IGF-I <input type="checkbox"/> IGFBP-3 <input type="checkbox"/> PRA (plazmatická reninová aktivita) (5) <input type="checkbox"/> TRYPSIN <input type="checkbox"/> ERYTROPOETIN <input type="checkbox"/> METHEMOGLOBIN (2) <input type="checkbox"/> 25-OH VITAMIN D <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
PODMÍNKY ODBĚRU		DATUM, RAZÍTKO ODDĚLENÍ, PODPIS LÉKAŘE	
(1) odběr do fialové vakuety (nesrážlivá krev EDTA) (2) odběr do černé vakuety (nesrážlivá krev CITRÁT) (3) krev nutno ihned dopravit do laboratoře (případně zaslat zmražené sérum, -20°C) (4) odběr do předchlazené fialové vakuety (EDTA), nutno ihned zaslat do laboratoře (5) (4) + ihned zaslat v ledové tříšti do laboratoře			