

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

**Aspekty laboratorní diagnostiky novorozenecké žloutenky,
porovnání dvou laboratorních metod a POCT metody
stanovení bilirubinu**

Bakalářská práce

Autor práce: Martina Slámová
Studijní program: Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor: Zdravotní laborant
Vedoucí práce: Ing. Václav Šojdel

Datum odevzdání práce: 3. 5. 2013

Abstrakt

Tématem mojí bakalářské práce byla laboratorní diagnostika žloutenky novorozenců. Laboratorní diagnostika spočívá ve stanovení koncentrace bilirubinu v plné krvi nebo v plazmě. Hodnotila jsem vzájemnou korelaci a možnost zastupitelnosti dvou laboratorních metod založených na různých principech stanovení, v různých typech biologických materiálů, pomocí statistického vyhodnocení laboratorních výsledků. Problematiku stanovení bilirubinu u novorozenců jsem pojala komplexně a do hodnocení jsem zahrнула i porovnání POCT měření hladiny bilirubinu s laboratorně stanovenou koncentrací bilirubinu v krvi.

Teoretická část obsahuje obecné údaje o typech žloutenek a metabolismu bilirubinu v organismu. Dále pak informace týkající se samotné žloutenky novorozenců. Popsala jsem zde příčiny vzniku, zdravotní rizika pro novorozence, která z hyperbilirubinémie vyplývají a uvedla také možnosti terapie.

Podklady pro vyhodnocení metod stanovení bilirubinu jsem získala na základě experimentu. Probíhal v Nemocnici Jindřichův Hradec, a.s. na souboru 120 novorozenců. Soubor tvořili termínoví i předtermínoví novorozenci, 37 z nich bylo v průběhu experimentu léčeno fototerapií.

Laboratorní stanovení koncentrace bilirubinu jsem prováděla na oddělení klinické biochemie téže nemocnice. Ve vzorku plné krve jsem stanovila koncentraci bilirubinu metodou přímé fotometrie na analyzátoru Cobas b221. Zbýlý materiál v odběrové nádobce jsem odstředila a v separované plazmě stanovila koncentraci bilirubinu chemickou azokopulační metodou na analyzátoru Integra 400 plus.

Měření POCT prováděly dětské zdravotní sestry na oddělení. Jedná se o neinvazivní měření bilirubinu novorozenců pomocí transkutánního bilirubinometru JM-103 Konica Minolta Hill-Room Air-Shields.

K posouzení korelace výsledků jsem použila statistickou metodu lineární regrese (Passing-Bablok) a metodu diferenčního grafu (Bland-Altman).

Ze statistického vyhodnocení vyplývá, že laboratorní metody vůči sobě vykazují velmi dobrou korelaci vyjádřenou korelačním koeficientem $r = 1,025$ a průměrnou diferencí $-1,41 \mu\text{mol/l}$.

Pro posouzení měření bilirubinu POCT, jsem použila metodu přímé fotometrie, jako metodu srovnávací. Korelační koeficient sice dosahoval hodnoty $r = 0,803$, ale průměrná diference mezi oběma metodami činila $-45,6 \mu\text{mol/l}$. Z těchto údajů vyplývá, že hladiny bilirubinu novorozenců měřené transkutánním bilirubinometrem byly nižší v porovnání s koncentrací bilirubinu stanovenou laboratorní metodou.

Z řady studií vyplývá, že měření bilirubinu v režimu POCT, pomocí transkutánního bilirubinometru uvedeného typu, poskytuje mnohdy podhodnocené výsledky. Z tohoto důvodu je nutné, výsledky měření z oblasti diskriminačních hodnot, ověřit v laboratoři. Transkutánní měření bilirubinu novorozenců je spolehlivá screeningová metoda, která eliminuje četnost krevních odběrů u novorozenců a především snižuje trauma novorozence vlivem odběrů krve. Obecně se nedoporučuje provádět transkutánní měření za podmínek fototerapie, což jsem potvrdila výsledky svého experimentu, kdy u léčených novorozenců došlo k velmi výraznému podhodnocení výsledků. Jediný způsob sledování efektu této terapie, při jejím současném provádění, je laboratorní stanovení koncentrace bilirubinu.

Z výsledků mého studie vyplývá, že stanovení koncentrace bilirubinu novorozenců metodou přímé fotometrie v plné krvi výborně koreluje se stanovením chemickou metodou v plazmě na biochemickém analyzátoru. Tato metoda může plnohodnotně nahradit metodu chemickou. Upřednostňuji metodu přímé fotometrie v plné krvi pro její nesporné výhody. Na vyšetření je potřeba malé množství vzorku, před analýzou není třeba separace, výsledek je rychle dostupný, obsluha i údržba analyzátoru je jednoduchá.

V současné době bývá rovněž obvyklé, že tyto typy analyzátorů, opatřené modulem pro přímé měření novorozeneckého bilirubinu, fungují jako POCT přístroje u lůžka pacienta.

Abstract

The topic of my Bachelor Thesis was laboratory diagnostics of newborn jaundice. Laboratory diagnostics consists in determining full blood or plasma bilirubin concentration. I assessed the cross-correlation and the possible interchangeability of two laboratory methods based on different principles of determination, in different types of biological material, by means of statistical evaluation of lab results. I treated the topic of bilirubin determination in newborns from a complex perspective, and I included a comparison of POCT bilirubin level measurements with lab-determined blood bilirubin concentrations in the assessment.

The theoretical part contains general facts about types of icterus and about bilirubin metabolism in the organism. It also contains information pertaining of newborns jaundice as such. I have described the causes, the health risks for the newborn implied by their hyperbilirubinemia, and I have also specified the possible therapy.

I have collected the backgrounds for the assessment of the methods of bilirubin determination experimentally. The population consisted of normal term and pre-term babies, 37 of whom were treated with phototherapy during the experiment.

I did the lab determinations of bilirubin concentration at the Clinical Biochemistry Department of the same Hospital. I determined the bilirubin concentration in a full blood sample by means of direct photometry on a Cobas b221 analyzer. I centrifuged the remaining material in the collection tube, and I determined the bilirubin concentration in the separated plasma by chemical azo coupling method on the Integra 400 plus analyzer.

The POCT measurements were carried out by the pediatric nurses on the department before every blood sampling. They were non-invasive bilirubin measurements in newborns by means of the transcutaneous bilirubinometer JM-103 Konica Minolta Hill-Room Air-Shields.

In order to assess the correlation of results, I used the linear regression (Passing-Bablok) statistical method, and the difference chart (Bland-Altman) method.

The statistical evaluation implies that the lab methods show very good mutual correlation, which can be expressed with a correlation coefficient of $r = 1,025$ and a mean difference of $-1,41 \mu\text{mol/l}$.

I used direct photometry method as a comparison method to assess the bilirubin measurements done by the POCT method. While the correlation coefficient reached the value $r = 0,803$, the average difference between both methods amounted to $-45,6 \mu\text{mol/l}$. This data clearly shows that newborn bilirubin levels measured by transcutaneous bilirubinometer are lower compared to the bilirubin concentration determined by the lab method.

Many studies imply that bilirubin measurements in the POCT mode using transcutaneous bilirubinometer of the stated type often yield rather underestimated results. Measurement results from the discrimination range must be re-checked in the lab. Transcutaneous measurement of newborn bilirubin is a reliable screening method eliminating the numerous blood takings in newborns most importantly reducing the trauma suffered by the newborn during the blood takings. Making transcutaneous measurements during phototherapy conditions is not generally recommended, which was confirmed by my experimental results, when the results in newborns under phototherapy treatment have been very significantly underestimated. The only way of how to monitor the effect of this therapy while the therapy is going on, is by means of lab determination of bilirubin concentration.

The results of my study imply that full blood bilirubin concentration determination by direct photometry method in newborns correlates excellently with the plasma determination by the chemical method on the biochemical analyzer. This method is fully capable to be used as a substitute for the chemical method. I prefer this full-blood determination method, because of its indisputable advantages. The examination requires only a small quantity of the sample, the sample does not require separation before analysis, the result is available quickly, and analyzer operation and maintenance are simple.

Analyzers of this type, equipped with modules for direct bilirubin measurement in newborns are often used as POCT instruments near the patient's bed.

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 (datum)

.....

(jméno a příjmení)

Poděkování

Velice ráda bych poděkovala Ing. Václavu Šojdelovi za věnovaný čas, ochotu a odborné informace při vedení méj bakalářské práce. Mé poděkování patří i kolektivu pracovníků obou novorozeneckých oddělení Nemocnice Jindřichův Hradec, a.s. především primáři MUDr. Miroslavu Tomsovi za cenné rady a staniční sestře Mgr. Janě Batókové za spolupráci při získávání dat POCT. V neposlední řadě děkuji i všem kolegyním z mého pracoviště za podporu v průběhu studia.

Obsah

Seznam použitých zkratek	10
Úvod	11
1 Teoretická část	12
1.1 Žloutenka.....	12
1.2 Bilirubin	13
1.2.1 Mechanismus syntézy bilirubinu.....	14
1.2.2 Eliminace bilirubinu z organismu	16
1.2.3 Frakce bilirubinu v krvi.....	17
1.3 Žloutenka novorozence	18
1.4 Fyziologická žloutenka novorozence	18
1.4.1 Zvýšená syntéza bilirubinu.....	19
1.4.2 Specifika metabolismu bilirubinu novorozence	20
1.4.3 Funkční nevyzrálost jater	20
1.4.5 Hyperbilirubinémie kojených novorozenců	21
1.5 Patologická žloutenka novorozence	22
1.5.1 Inkompatibilita mezi krví matky a plodu	22
1.5.2 Jádrový ikterus	23
1.6 Diagnostika žloutenky novorozence	24
1.7 Terapie žloutenky novorozence	24
1.7.1 Fototerapie.....	24
1.7.2 Výměnná transfuze.....	25
1.7.3 Imunoterapie.....	25
2 Cíle práce a hypotézy.....	26
3 Metodika výzkumu	27
3.1 Volba souboru	27
3.2 Metodika experimentu	27
3.3 Preanalytická fáze	28
3.4 Vnitřní kontrola kvality.....	30

3.5 Externí hodnocení kvality	30
4 Laboratorní činnost	31
4.1 Stanovení koncentrace bilirubinu novorozenců metodou přímé fotometrie v plné krvi.....	31
4.1.1 Instrumentace	31
4.1.2 Princip metody	31
4.1.3 Postup stanovení.....	32
4.2 Stanovení koncentrace bilirubinu novorozenců chemickou metodou v plazmě	33
4.2.1 Instrumentace	33
4.2.2 Princip metody	33
4.2.3 Postup stanovení.....	34
5 POCT	35
5.1 Transkutánní měření v režimu POCT	35
5.1.1 Instrumentace	35
5.1.2 Princip měření	36
6 Výsledky.....	37
6.1 Hodnocení VKK obou laboratorních metod stanovení bilirubinu novorozenců	39
6.2 Hodnocení EHK chemické metody stanovení bilirubinu novorozenců v séru	40
6.3 Tabulka koncentrací bilirubinu novorozenců měřené v laboratoři i POCT	41
6.4 Korelace metody přímé fotometrie a chemické metody	44
6.5 Korelace metody přímé fotometrie a POCT	45
6.5.1 Korelace přímé fotometrie a POCT bez novorozenců na fototerapii	46
7 Diskuse	47
8 Závěr	49
9 Seznam informačních zdrojů	50
10 Přílohy.....	54

Seznam použitých zkratk

ČLS JEP	Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně
ČNeoS	Česká neonatologická společnost
EHK	Externí hodnocení kvality
IVD	In vitro diagnostika
LIS	Laboratorní informační systém
NIS	Nemocniční informační systém
POCT	Point of Care Testing
RES	Retikuloendoteliální systém
SEKK	System externí kontroly kvality
UDP	Uridindifosfát
VKK	Vnitřní kontrola kvality

Úvod

Žloutenka novorozence je nejčastější diagnóza, která se v novorozeneckém období objevuje. Příčinou je nadprodukce bilirubinu, který vzniká zvýšeným katabolismem hemu v důsledku rozpadajících se erytrocytů po porodu. I když je zvýšená hladina bilirubinu v novorozeneckém období fyziologickým jevem, neměla by přesáhnout definované meze. V opačném případě se jedná o patologickou žloutenku novorozence se všemi zdravotními riziky pro další vývoj novorozence. Pouze přesná a správná laboratorně stanovená koncentrace bilirubinu v krvi je rozhodujícím kritériem pro zahájení účinné terapie hyperbilirubinémie.

Námětem pro volbu tématu mojí bakalářské práce byla praktická zkušenost z laboratoře, kde jsem zaměstnaná. Vedení laboratoře řešilo možnost stanovovat hladinu bilirubinu novorozenců v plné krvi na analyzátoru krevních plynů, pro její nesporné výhody, výměnou za stávající chemickou analýzu bilirubinu v plazmě. Před konečným rozhodnutím bylo třeba vzájemnou korelaci obou metod ověřit, protože případný nesoulad by mohl negativně ovlivnit terapii novorozenecké žloutenky. Na podkladech odborné literatury a četných zahraničních studií zabývajících se diagnostikou žloutenky novorozenců, jsem také získala informace o transkutánním měření v režimu POCT. Na základě těchto faktů jsem se rozhodla zpracovat téma diagnostiky novorozenecké žloutenky do bakalářské práce a formulovat základní cíle.

Stanovit hladinu bilirubinu novorozenců v plné krvi a v plazmě z téhož vzorku. Pomocí statistických postupů, jako je lineární korelace (Passing- Bablok) a diferenční graf (Bland – Altman) prokázat těsnou korelaci obou laboratorních metod a tím i jejich zastupitelnost. Dále posoudit kvalitu transkutánního měření POCT porovnáním s laboratorním stanovením koncentrace bilirubinu, definovat jeho použití v praxi na základě faktů vyplývajících ze studií ve srovnání s vlastním měřením.

1 Teoretická část

1.1 Žloutenka

Příčiny vzniku

Hyperbilirubinémie je projevem patologického metabolismu bilirubinu, kdy stoupá jeho koncentrace v krvi. Vzniká poruchou rovnováhy mezi vznikem, samotným průběhem metabolismu a vyloučením bilirubinu z organismu. Vyznačuje se zvýšenou koncentrací bilirubinu v krvi nad 17 $\mu\text{mol/l}$ (18, 23, 35).

Bilirubin prostupuje z cév do okolních tkání, převážně do těch s vyšším podílem fosfolipidů. Rozpouští se a způsobuje jejich žluté zbarvení (18), což se klinicky projevuje žlutozeleným zbarvením sliznic a kůže – žloutenkou (ikterem). Tento klinický příznak je patrný až po překročení sérové koncentrace 43 $\mu\text{mol/l}$ bez ohledu na věk (13, 14).

Typy žloutenek

Existují tři typy, které nesou označení podle nejdůležitějšího orgánu v metabolismu a vylučování bilirubinu a tím jsou játra (hepar). Podle lokalizace příčiny vzniku žloutenky se také odvíjejí jejich názvy (23) :

- Prehepatální ikterus

Příčinou je zvýšený rozpad erytrocytů např. při hemolytické anémii nebo neúčinné erythropoéze. Z uvolněného hemoglobinu tak vzniká velké množství bilirubinu. Játra nejsou schopna takového množství bilirubinu metabolizovat.

- Hepatální ikterus

Příčina je přímo v játrech. Jedná se o různé poruchy na řadě míst v jaterním metabolismu bilirubinu. Jde především o vychytávání bilirubinu z krevního oběhu, jeho konjugace, sekrece z hepatocytu, uvolňování do žluče. Patří sem i poškození nebo dokonce úplný zánik samotného hepatocytu.

- Posthepatální ikterus

Příčinou je porucha odtoku žluči způsobená uzávěrem žlučových cest (36).

Každý z vyjmenovaných typů ikterů je charakteristický hyperbilirubinemií určitého typu, nálezem produktů metabolismu bilirubinu v moči nebo změnou barvy stolice. Všechny zmíněné parametry se vyšetřují v laboratoři. Laboratorní výsledky tak přinášejí cenné informace pro lékaře, který může zvolit adekvátní způsob léčby.

1.2 Bilirubin

Historie bilirubinu

První zmínky o bilirubinu byly publikovány v odborném článku v roce 1847, jehož autorem byl Rudolf Virchow. Popisoval v něm strukturu krystalů červeného pigmentu v prokrvácených tkáních a pojmenoval ho hematoidin. Bilirubinem poprvé nazval tmavě červený pigment izolovaný ze žluče v roce 1864 Georg Städeler. Právě on také vyslovil hypotézu vzniku bilirubinu z hemu a objasnil souvislosti mezi žlutým zabarvením kůže i sliznic a onemocněním jater. Samotné slovo bilirubin je složeninou dvou názvů pocházejících z latiny, bilis (žluč) a ruber (červený) (34).

Bilirubin je považován za potenciálně toxický produkt katabolismu hemu. V lidském organismu existuje mnoho složitých fyziologických mechanismů pro jeho detoxikaci. Znalost těchto mechanismů je nutná pro interpretaci klinického významu, především, vysoké koncentrace bilirubinu v séru (20).

V literatuře se můžeme setkat se zmínkou o prognostickém významu koncentrace bilirubinu ve vztahu k některým onemocněním. Patří mezi ně postižení jater, onemocnění způsobená oxidačním stresem, jako je ateroskleróza. Na základě nových studií je považována hladina bilirubinu již pod 10 $\mu\text{mol/l}$ za rizikovou pro vznik těchto onemocnění (34, 38).

1.2.1 Mechanismus syntézy bilirubinu

Za fyziologických podmínek se v organismu syntetizuje kolem 250 mg bilirubinu denně. Z toho 80–85 % produkce pochází z erytrocytů po skončení jejich životnosti. Jedná se přibližně o 120 dní staré erytrocyty. Pomocí makrofágů RES jsou transportovány především do sleziny. Z erytrocytů se uvolní hemoglobin, který podléhá další degradaci. Z 1g hemoglobinu vznikne 34 mg bilirubinu. Molekula hemoglobinu se rozpadne na jednotlivé složky:

- Globin - podlehne dalšímu metabolizování
- Železo - naváže se na transferin
- Hem - oxidací, pomocí enzymu hemoxygenázy, se hemový kruh otevře a dojde přitom k uvolnění oxidu uhelnatého

Z hemu vzniká zelený pigment biliverdin, který vstupuje do další enzymatické reakce. Pomocí biliverdinreduktázy je teprve přeměněn na bilirubin (23, 32, 38).

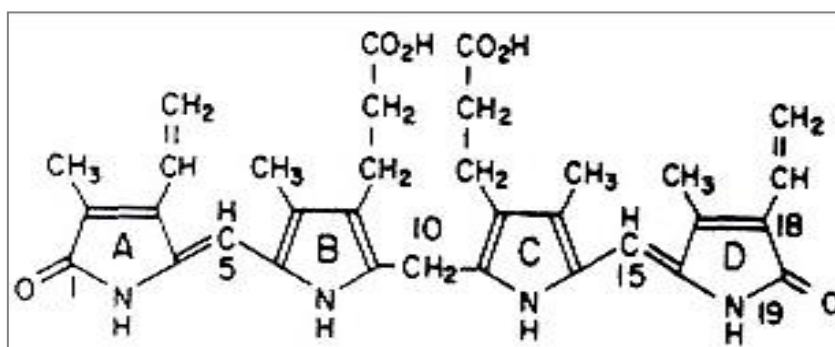
Syntéza bilirubinu probíhá také v jiných tkáních jako je kostní dřev (z neúčinné erythropoézy), játra (Kupfferovy buňky), kůže (tkáňové makrofágy). Zbývajících 15–20 % denní produkce bilirubinu pochází z dalších hemoproteinů - myoglobinu, cytochromů a kataláz (13, 23, 32).

Chemická struktura molekuly bilirubinu

Bilirubin řadíme mezi žlučová barviva, což jsou degradační produkty porfyrinů. Jsou to heterocyklické sloučeniny, které obsahují čtyři pyrolová jádra navzájem spojená metinovými můstky (11, 23).

Molekula bilirubinu je v plazmě transportována prostřednictvím albuminu, ke kterému je navázána nekovalentní vazbou. Albumin disponuje dvěma vazebnými místy pro bilirubin. Obě místa nemají stejnou vazebnou afinitu vůči bilirubinu. Toto uspořádání bilirubinu s albuminem se nazývá nekonjugovaný bilirubin (13).

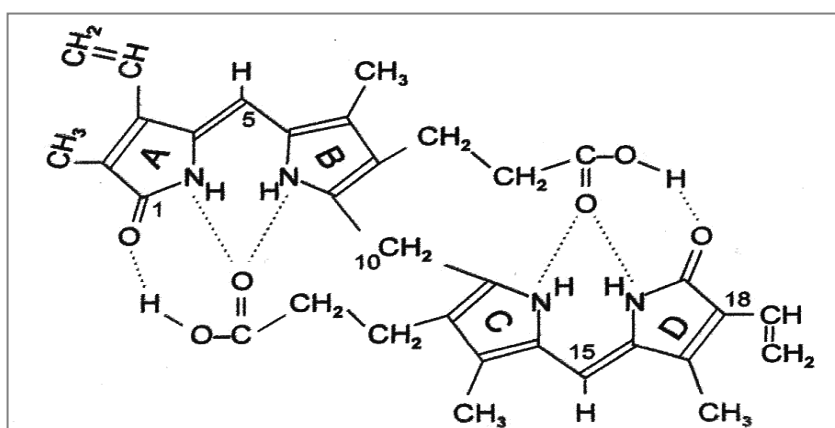
Nekonjugovaný bilirubin je extrémně nepolární, prakticky nerozpustný ve vodě při fyziologickém pH a tělesné teplotě (32). Přirozeně se vyskytuje bilirubin označovaný jako 4Z, 15Z – bilirubin IX α , jehož chemická struktura je znázorněna na obrázku 1.



Obrázek 1. Konvenční „lineární tetrapyrrolová“ forma izomeru bilirubinu IXa (4Z,15)

Zdroj: (Vítek et al. 2003, 35) s.24

Jak ze samotného názvu bilirubinu vyplývá, vzniká z izomeru IX protoporfyrinu, štěpením α – metinového můstku porfyrinového makrocyklu. Obsahuje dvojné vazby v poloze 4 a 15 v konfiguraci Z. Díky tomuto uspořádání může v molekule vzniknout šest vodíkových můstků, jak je patrné z obrázku 2. Tyto intramolekulární můstky způsobují blokaci exponovaných polárních skupin molekuly vodným rozpouštědlem, což je podstatou hydrofobního charakteru bilirubinu. Zajišťují také stabilitu celé molekuly (11, 32).



Obrázek 2 .Planární model trojrozměrné konformace molekuly bilirubinu IXa s vodíkovými můstky

Zdroj: (Vítek et al. 2003, 35) s.24

1.2.2 Eliminace bilirubinu z organismu

Nekonjugovaný bilirubin není filtrován ledvinami podobně jako jiné sloučeniny, které jsou také navázané na albumin. Hlavní cesta k jeho vyloučení z organismu je do žluče přes játra. Zde dochází ke konjugaci s kyselinou glukuronovou, která zajišťuje rozpustnost ve vodě a tím vyloučení do žluče (8, 34).

Konjugace bilirubinu v játrech

Po transportu bilirubinu do jater ze systémové cirkulace proběhne jeho translokace přes bazolaterální membránu hepatocytu. Uvolněný bilirubin je dále transportován přes membránu prostřednictvím aktivního nosiče do cytosolu. Zde se naváže na dva druhy transportních proteinů: protein Y (jaterní ligandin) a protein Z. Cytosolové proteiny umožňují transport nekonjugovaného bilirubinu hepatocytem, zabraňují pasivnímu refluxu bilirubinu nazpět do cirkulace, přesouvají bilirubin do hladkého plazmatického retikula, kde je konjugován s kyselinou glukuronovou. Reakce je katalyzovaná mikrosomální bilirubin-UDP-glukuronyltransferasou. Tímto způsobem vznikají konjugáty netoxické a rozpustné ve vodě. Z 90% je tvoří diglukuronid, z 10% monoglukuronid. Konjugovaný bilirubin se dostává přes kanalikulární membránu hepatocytu pomocí aktivního transportu (5, 17).

Metabolismus bilirubinu ve střevě

Po vyloučení z jaterní buňky se dostává, přes systém žlučových, do tenkého a dále tlustého střeva. Bilirubin zde vstupuje do střevního metabolismu a podléhá dekonjugaci působením β -glukuronidázy pocházející z bakterií a v menší míře také z enterocytů. Část dekonjugovaného bilirubinu je prostřednictvím enterohepatálního oběhu opět zachycena hepatocyty. Další část je zredukována enzymy produkujícími střevní bakterie na deriváty bilirubinu. Oxidoredukční enzymatické reakce probíhají v tlustém střevě, protože má nejmohutnější bakteriální osídlení z celého střevního traktu. Anaerobní bakterie zde převažují nad aerobními. Vzniklé deriváty bilirubinu jsou bezbarvé tetrapyroly, které mají společný název urobilinogeny. Mezi nejznámější patří sterkobilinogen, mesobilinogen a urobilinogen. Největší množství urobilinogenů se dostává dál, do tlustého střeva, kde samovolně oxidují na hnědo-oranžové pigmenty

způsobující charakteristické zbarvení stolice. Další část urobilinogenů se vstřebává ze střeva do portálního řečiště a játry je sekretována do žluče. Jen malá část se dostává do krevního oběhu a ledvinami je vyloučená do moče (5, 17).

1.2.3 Frakce bilirubinu v krvi

Jednotlivé typy bilirubinu vznikají v organismu postupně, v průběhu jeho metabolismu a dají se také stanovit v laboratoři:

- Celkový bilirubin – skládá se z konjugovaného, nekonjugovaného a δ -bilirubinu. δ -bilirubin je konjugovaný bilirubin kovalentně navázaný na albumin, s poločasem 19 dní, fyziologicky se u zdravých jedinců nevyskytuje.

- Přímý bilirubin – je tvořen z větší části konjugovaným bilirubinem, dále delta-bilirubinem, také částečně bilirubinem nekonjugovaným.

- Konjugovaný bilirubin – tvoří ho mono- a diglukosiduronát, nachází se převážně ve žluči, je ve vodě rozpustný, poločas má několik hodin.

- Nepřímý bilirubin – jeho koncentrace lze vypočítat jako rozdíl mezi bilirubinem celkovým a přímým (13, 14).

Označení přímý a nepřímý bilirubin vzniklo na základě výsledku chemické reakce při laboratorním vyšetřování. Jedná se o azokopulační reakci v přítomnosti akcelérátoru, kterým může být metanol nebo kofein. V první fázi reaguje (přímo, bez přidání akcelérátoru) přímý bilirubin. Touto reakcí jsou nadhodnocovány nízké a podhodnocovány vysoké koncentrace přímého bilirubinu (8). V druhé fázi dojde k uvolnění vazby mezi nekonjugovaným bilirubinem a albuminem reakcí s akcelérátorem. Odtud pochází synonymum nepřímý bilirubin pro bilirubin nekonjugovaný (14).

Naprostě spolehlivých výsledků stanovení obou frakcí se dá dosáhnout chromatografickými metodami. Toto vyšetření se provádí jen v několika specializovaných laboratořích, pro svoji náročnost se v rutinní laboratorní praxi neuplatnila (8).

1.3 Žloutenka novorozence

Problematiku novorozenecké žloutenky jsem si zvolila jako téma bakalářské práce. Je to typ žloutenky, který se vyznačuje řadou specifík. Žloutenka novorozence je fyziologickou součástí novorozeneckého období. Postihuje 60 % všech novorozenců. Je způsobena hyperbilirubiněmií nekonjugovaného typu (21, 28, 35).

Typickým klinickým symptomem je ikterus, žluté zabarvení - nejdříve sklér, později kůže i sliznic. Tento příznak je možný u novorozence pozorovat od koncentrace 85 $\mu\text{mol/l}$ bilirubinu v séru (13). Intenzita i délka trvání žloutenky je u každého dítěte individuální a je ovlivněna řadou faktorů. Podle toho se dá žloutenka novorozence rozdělit do dvou skupin:

- Fyziologická žloutenka novorozence (icterus neonatorum)
- Patologická žloutenka novorozence (icterus neonatorum gravis) (36)

Každý z obou typů má charakteristický klinický obraz i délku trvání. Je charakterizován určitými parametry. Mezi základní parametry diference novorozenecké žloutenky se uvádí gestační a postnatální věk dítěte a koncentrace bilirubinu v krvi. Tyto údaje jsou zpracovány do Hodrova-Poláčkova grafu. Novorozenci jsou tak zařazeni do příslušného pásma rizikovosti, které nabízí konkrétní řešení terapie (viz příloha 1).

Laboratorní stanovení koncentrace celkového bilirubinu je jediným správným kritériem měření míry hyperbilirubinémie, které vede k řádné klinické diagnostice novorozenecké žloutenky. Patologické hodnoty bilirubinu v novorozeneckém období by mohly zanechat nevratné následky na zdraví dítěte (16).

1.4 Fyziologická žloutenka novorozence

Za fyziologickou hyperbilirubiněmií novorozence je považována koncentrace bilirubinu v krvi s maximální hodnotou do 204 $\mu\text{mol/l}$ u termínového novorozence. Nastupuje přibližně 3. den po porodu a mizí do konce prvního týdne života. Vzestup

hladiny bilirubinu by měl být do 85 $\mu\text{mol}/\text{den}$. Tento typ žloutenky novorozence nevyžaduje léčbu a odezní spontánně bez zdravotních komplikací (13, 29).

Jiná situace nastává u předtermínového novorozence. Intenzitu i délku trvání žloutenky zhoršuje celková nezralost dítěte, především jaterní glukuronkonjugační a transportní systémy. Žloutenka nastupuje 3. - 4. den života, koncentrace bilirubinu v krvi je vyšší, dosahuje hodnot až 257 $\mu\text{mol}/\text{l}$, celková doba trvání je 7-9 dní. U většiny těchto novorozenců je indikována terapie (15, 24).

Příčinami vzniku novorozenecké žloutenky je zvýšené hromadění nekonjugovaného bilirubinu z důvodů, které jsem popsala v následujících kapitolách.

1.4.1 Zvýšená syntéza bilirubinu

V průběhu nitroděložního života potřebuje plod vysokou koncentraci hemoglobinu, aby mohl účinně získávat kyslík z mateřské krve a dodávat ho do vlastních tkání. Ihned po porodu novorozenec získává kyslík vlastními plícemi. Potřeba vysoké hladiny hemoglobinu u něj klesá. Životnost erytrocytů novorozence ve srovnání s dospělými je snížena. Proto se rozpadají a vyplavuje se z nich velké množství hemoglobinu do organismu. Hemoglobin musí být přeměněn na bilirubin a vyloučen z organismu bezprostředně v poporodním období. Nadprodukce bilirubinu je dvojnásobná než v dospělém věku (8-10 mg na kilogram tělesné váhy). Souběžně je nahrazován fetální hemoglobin adultním (10, 35).

Role fetálního hemoglobinu v ontogenezi

Od 12. týdne těhotenství probíhá červená krvetvorba v játrech i ve slezině (hepato-lineální období). Erytrocyty tohoto období se spíše podobají makrocytům. Nemají jádro, obsahují fetální hemoglobin HbF, který z 90-95 % představuje hlavní hemoglobin plodu až do 32. týdne. Zbylých 10-15 % tvořeno hemoglobinem dospělého typu HbA. Po 32. týdnu nitroděložního života začíná postupná výměna HbF za HbA. Tato obměna končí asi 6 měsíců po narození, ale nepatrná část HbF (asi 0,5%) zůstává po zbytek života. U novorozence probíhá erythropoéza v kostní dřeni všech kostí. V krvi

se nevyskytují téměř žádné červené buňky s jádrem, pouze 4-5% retikulocytů. Erytrocyty jsou větší než u dospělého. Mají objem 110 fl a životnost 90 dní (33).

Plod má pro svůj intrauterinní vývoj k dispozici poměrně málo kyslíku. Je to způsobeno daleko nižším pO_2 v placentě než v plicích matky. Proto erytrocyty plodu obsahují HbF, který má vyšší afinitu ke kyslíku než HbA. Tím se dokáže plně nasytit a zajistit dostatečné okysličení plodu (19). Fetální hemoglobin se od adultního liší také svým molekulárním složením v globinové složce. Obsahuje dva řetězce α a dva řetězce γ na rozdíl od adultního, se dvěma řetězci α a dvěma β (HbA1) nebo dvěma řetězci α a dvěma δ (HbA2) (21).

1.4.2 Specifika metabolismu bilirubinu novorozence

U dítěte v novorozeneckém období se zvýšenou měrou uplatňuje tzv. enterohepatální reabsorbce bilirubinu. Ve střevě je prokázána značná aktivita enzymu β -glukuronidázy pocházející z mateřského mléka. Snadno dochází k přeměně již konjugovaného bilirubinu opět na nekonjugovaný, který se dostává ze střeva do krevního oběhu a ještě více zvyšuje již tak vysokou hladinu bilirubinu (35).

Velké množství bilirubinu je také obsaženo ve smolce. Čím déle zůstává ve střevě, tím více podporuje reabsorbci bilirubinu do krve (28).

1.4.3 Funkční nevyzrálost jater

Funkční nevyzrálost jater je míněna ve smyslu konjugace bilirubinu. Zapříčiňují to dva faktory. Prvním je nedostatek aktivních transportních proteinů v hepatocyty. Jejich exprese se zvyšuje po několika týdnech života. Druhým faktorem je nedostatečná aktivita enzymu bilirubin-UDP-glukuronyltransferasy. Tím vzniká porucha v glukuronidizaci bilirubinu (35).

1.4.4 Chybějící střevní mikroflóra

V novorozeneckém období dochází k resorpci nekonjugovaného bilirubinu z tenkého střeva. Chybí intersticiální mikroflóra, která kontroluje zpětnou resorpci nekonjugovaného bilirubinu do portálního oběhu. V tenkém střevě také není dostatek bilirubin redukujících bakterií, proto i tvorba bilirubinoidů je omezená. Dostatečné osídlení zažívacího traktu bakteriální mikroflórou, zajišťující fyziologickou produkci urobilinoidů jako v dospělosti, začíná od šestého týdne života (35).

1.4.5 Hyperbilirubinémie kojených novorozenců

Na vzniku žloutenky kojených novorozenců se podílí více faktorů. Přítomnost inhibitorů glukuronizace, zvýšený obsah mastných kyselin s dlouhým řetězcem v mateřském mléce, snížená jaterní clearance bilirubinu, snížený příjem kalorií, genetické vlivy, zvýšení reabsorbce bilirubinu v gastrointestinálním traktu. Vlivem těchto faktorů dochází k velmi pozvolnému poklesu hladiny bilirubinu až do 12. týdne života. Výskyt žloutenky u kojených novorozenců je častým důvodem k opětovné hospitalizaci (17, 29).

Na vzniku novorozenecké žloutenky se podílejí ještě další faktory: ukončení clearance přebytečného bilirubinu placentou, poporodní hematomy, geneticky dané hemolytické anémie, hypotyreóza, vrozené konjugační defekty, častější výskyt u dětí diabetiček (13).

1.5 Patologická žloutenka novorozence

Hlavním indikátorem patologické žloutenky novorozence je časnost nástupu a to v prvních 24 hodinách po porodu. Charakteristickým kritériem pro patologii novorozeneckého ikteru je koncentrace bilirubinu v krvi přesahující hodnotu 220 $\mu\text{mol/l}$ u donošených a 256 $\mu\text{mol/l}$ u nedonošených novorozenců. Hladina bilirubinu stoupá o více než 85,5 $\mu\text{mol/den}$, začíná ustupovat po 1 týdnu u donošených a po 2 týdnech u nedonošených novorozenců.

Vždy patologickým nálezem je konjugovaná hyperbilirubinémie, kdy koncentrace konjugovaného bilirubinu tvoří > 15 % celkového bilirubinu (29, 33). Příčiny vzniku konjugované hyperbilirubinémie novorozence jsou: jaterní onemocnění (vrozené metabolické vady, infekce, sepse, toxické látky), onemocnění žlučových cest, parenterální výživa (13).

1.5.1 Inkompatibilita mezi krví matky a plodu

Neslučitelnost krve matky a plodu se projevuje již v průběhu těhotenství. Matka je nositelkou jiného typu krve než plod, který jej zdědil po otci.

Nejčastěji se vyskytuje inkompatibilita v systému Rh, způsobená D-antigenem, Rh-negativní matka a Rh-pozitivní plod. Během těhotenství dochází, téměř vždy, k přestupu malého množství krve plodu do krevního oběhu matky přes placentu. Rh-pozitivní fetální erytrocyty způsobují tvorbu protilátek v krvi matky. Tyto protilátky zůstávají v oběhu v pohotovostním stavu. V případě opakovaného setkání s Rh-pozitivními erytrocyty je jejich tvorba daleko rychlejší. Po senzibilizaci vznikají v krvi matky protilátky typu G. Díky své malé molekule snadno přestupují přes placentu do těla dítěte, kde napadají a likvidují jeho Rh-pozitivní erytrocyty ještě před narozením. Důsledkem rozpadu erytrocytů je anémie a žloutenka, která je patrná již při narození.

V laboratoři se také vyšetřuje amniová tekutina, v které je rovněž hladina bilirubinu vysoká (15, 28, 36).

Dalším typem je inkompatibilita v ABO-systému. Vyskytuje se ve 20-25 % těhotenství, ale klinicky manifestuje jen v 10 % (21). Vzniká v případě, kdy matka má krevní skupinu 0, dítě A nebo B nebo AB. Tento druh inkompatibility má mírnější následky pro plod než neslučitelnost v Rh-systému. Anémie i žloutenka mají lehčí charakter. Je to způsobeno přirozenou přítomností protilátek anti-A a anti-B v krvi matky. Placentou procházejí jenom v omezené míře, na rozdíl od inkompatibility v Rh-systému (15, 21).

Existují aloimunizace, které jsou způsobené atypickými antigeny. Nejčastěji se jedná o antigeny c, E, Kell (28).

1.5.2 Jádrový ikterus

Jádrový ikterus (kernikterus) je nejzávažnější onemocnění novorozenců, které vzniká v důsledku hyperbilirubinémie. Hydrofóbní, ale v tucích rozpustný nekonjugovaný bilirubin, proniká do centrálního nervového systému. Tento přestup nekonjugovaného bilirubinu ještě více podporuje hypalbuminémie, takže možnost vazby albumin-bilirubin je nedostatečná. Za fyziologických podmínek takto vázaný volný bilirubin přes hematoencefalickou bariéru neproniká (29).

Toxicita bilirubinu, na buněčné úrovni, spočívá v poškozování buněčných membrán, jejich permeability i transmembránových transportů. Velkou měrou negativně zasahuje i do oxidativní fosforylace v mitochondriích (14).

Následky toxického působení bilirubinu na mozkovou tkáň dítěte jsou nevratné a zanechají následky v podobě chronických onemocněních jako je vývojová a mentální retardace, motorické postižení nebo hluchota (29).

Pro diagnostiku jádrového ikteru u novorozenců neexistuje limitní hodnota cut-off pro bilirubin. Jeho rozvoj je ovlivňován mnoha faktory jako je např. stupeň zralosti novorozence, hemolýza, předčasný porod, sepse, acidóza (14).

1.6 Diagnostika žloutenky novorozence

Nejprve je intenzita žloutenky hodnocena ošetřujícím lékařem a zkušenou sestrou optometricky za optimálních světelných podmínek dle doporučených ošetrovatelských postupů ČNeoS.

Poté následuje transkutánní měření. Toto vyšetření je orientační a slouží pro sledování vývoje žloutenky. V případě nálezů patologických hodnot následuje vyšetření koncentrace celkového bilirubinu v laboratoři, které je pro správnou diagnostiku a léčbu hyperbilirubinémie nezbytné (3). Požadavek ze strany lékařů na klinickou laboratoř je tedy stanovení koncentrace bilirubinu přesně s povolenou mírou nejistoty. Velmi důležité je také zmínit požadavek na včasnost vyšetření. V laboratoři je stanovení zařazeno do režimu statim, tedy povinnost dostupnosti výsledku do hodiny od příjmu vzorku laboratoři.

Možnostmi stanovení hladiny bilirubinu, včetně laboratorní diagnostiky žloutenky novorozenců se budu podrobně zabývat v následujících kapitolách.

1.7 Terapie žloutenky novorozence

1.7.1 Fototerapie

Základní léčebnou metodou ke snížení hladiny bilirubinu vyloučením z organismu novorozence je fototerapie. Jak je již z názvu patrné, jedná se o léčbu za pomoci světla. Nejvyšší účinnost při fototerapii má modré světlo o vlnové délce 460 nm, protože tato vlnová délka odpovídá absorpčnímu maximu bilirubinu.

Princip fototerapie souvisí s chemickou strukturou uspořádání molekuly bilirubinu a jeho fyzikálními vlastnostmi. Molekula přirozeného izomeru bilirubinu 4Z, 15Z absorbuje foton, změní svojí strukturu za vzniku izomerů ZE/EZ (viz příloha 3). Tato konfigurace derivátů bilirubinu je hydrofilní. Díky této změně na hydrofilní charakter, můžou být produkty fototerapie vyloučeny prostřednictvím jater do žluče i do moče, bez

potřeby konjugace. Tím se daří účinně snižovat hyperbilirubiněmi novorozence (29, 34).

Fototerapie, vedle léčebných účinků, sebou přináší i určitá rizika pro novorozence. Patří mezi ně hypertermie, hypotermie, dehydratace, mění se i barva moči a stolice v průběhu fototerapie aj. (3).

1.7.2 Výměnná transfuze

Výměnná (exsanguinační) transfuze je léčebná metoda účinná, ale invazivní. Je indikována při hemolytické nemoci novorozence, kdy dojde k odstranění velké části bilirubinu, senzibilizovaných erytrocytů i protilátek, které se na vzniku hemolýzy podílejí. Použití výměnné transfuze představuje pro dítě závažná rizika, jako jsou: vzduchová embolie, infekce nebo náhlé úmrtí. K provedení tohoto výkonu lékaři přistupují jenom v závažných případech a po neúspěšných výsledcích použití všech ostatních terapií. Provádění se proto soustřeďuje do Perinatologických center na neonatologická pracoviště (3, 29).

1.7.3 Imunoterapie

Patří do skupiny farmakologické léčby. Má profylaktickou povahu. Spočívá v intravenózním podání imunoglobulinů, které dokážou vyvázat protilátky pocházející z těla matky. Tím je sníženo riziko hemolýzy. Aplikace imunoglobulinů je indikována u novorozenců s rozvinutým izoimunním hemolytickým onemocněním, kteří nesplňují dané podmínky pro výměnnou transfuzi (3, 29).

2 Cíle práce a hypotézy

- Stanovit koncentraci bilirubinu v krvi novorozenců pomocí dvou laboratorních metod u téhož souboru novorozenců metodou přímé fotometrie v plné krvi a poté metodou chemickou v krevní plazmě z téhož vzorku krve.
- Výsledky zpracovat statistickými postupy aplikovanými v klinické biochemii při porovnávání výsledků stanovení jednoho analytu pomocí dvou metod na rozdílných principech, lineární korelací (Passing-Bablok) a diferenčním grafem (Bland-Altman).
- Vyhodnotit míru porovnatelnosti laboratorních metod, posoudit výhody a nevýhody obou metod, navrhnout použitelnost pro klinickou praxi.
- Posoudit spolehlivost výsledků stanovení koncentrace bilirubinu naměřenými v režimu POCT pomocí transkutánního bilirubinometru a porovnat je s laboratorními výsledky pomocí týchž statistických postupů jako v případě laboratorních metod.

Na základě teoretických znalostí o vzniku, průběhu, léčby novorozenecké žloutenky a prostudováním odborné zahraniční literatury, zabývající se především otázkami měření koncentrace bilirubinu u novorozenců, jsem formulovala tyto hypotézy:

1) Stanovení koncentrace bilirubinu novorozenců je možné provádět dvěma laboratorními metodami založenými na různých principech, které vykazují těsnou korelaci a jsou pro diagnostiku novorozenecké hyperbilirubinémie zcela zaměnitelné.

2) Stanovení bilirubinu screeningovou metodou POCT s použitím transkutánního bilirubinometru má z pohledu korelace s laboratorními metodami svá omezení, která je třeba vzhledem k diagnostice hyperbilirubinémie respektovat a vyšetření POCT provádět náležitým způsobem.

3 Metodika výzkumu

3.1 Volba souboru

Vyšetřovaný soubor tvořilo 120 novorozenců. 37 z nich bylo léčeno fototerapií pro závažnost hyperbilirubinémie. Všichni byli hospitalizováni v Nemocnici Jindřichův Hradec, a.s. na novorozeneckém oddělení nebo na jednotce intermediární péče pro novorozence. Experimentální měření probíhalo od 9. 2. 2012 do 17. 9. 2012. Neuvádím jména ani rodná čísla novorozenců v rámci dodržování zákona o ochraně osobních údajů. Označila jsem je pouze pořadovými čísly.

3.2 Metodika experimentu

Základem mojí bakalářské práce je experiment, který spočíval v měření koncentrace bilirubinu novorozenců.

První měření provedly dětské zdravotní sestry přímo u lůžka pacienta pomocí transkutánního bilirubinometru. Dle ordinace lékaře byl proveden odběr krve a vystavena žádanka na laboratorní vyšetření bilirubinu v krvi.

Vlastní laboratorní měření jsem prováděla na oddělení klinické biochemie Nemocnice Jindřichův Hradec, a.s., kde jsem také zaměstnaná.

Nejprve jsem stanovila bilirubin metodou přímé fotometrie v plné krvi. Zkumavku se zbytkem materiálu jsem odstředila a následně provedla stanovení bilirubinu chemickou metodou v krevní plazmě. Metoda stávající, dosud používaná, byla chemická, porovnávaná byla metoda přímé fotometrie. Všechny typy stanovení bilirubinu u novorozenců jsem zaznamenala do tabulky 4.

Naměřené výsledky jsem zpracovala následovně:

1) Porovnání metody přímé fotometrie stanovení bilirubinu v plné krvi s chemickou metodou v krevní plazmě pomocí lineární korelace (Passing-Bablok) (viz obrázek 6) a diferenčního grafu (Bland-Altman) (viz obrázek 7).

2) Porovnání metody přímé fotometrie stanovení bilirubinu v plné krvi s metodou měření v režimu POCT pomocí transkutánního bilirubinometru opět lineární korelací (Passing-Bablok) (viz obrázek 8) a diferenčním grafem (Bland-Altman) (viz obrázek 9).

3) Porovnání metody přímé fotometrie stanovení bilirubinu v plné krvi s metodou měření v režimu POCT pomocí transkutánního bilirubinometru opět lineární korelací (Passing-Bablok) (viz obrázek 10) a diferenčním grafem (Bland-Altman) (viz obrázek 11). Do uvedeného porovnání nebyli zahrnuti novorozenci podstupující fototerapii v průběhu experimentu.

S průběhem experimentu byl seznámen primář dětského oddělení MUDr. Miroslav Toms i hlavní sestra nemocnice Bc. Dana Běhounová. Metodiku jsem nastavila tak, aby celý výzkum probíhal paralelně s ordinací lékaře v souladu s příslušnými SOP pro stanovení koncentrace bilirubinu novorozenců na lůžkových odděleních.

3.3 Preanalytická fáze

Nedílnou součástí laboratorních analýz je preanalytická fáze. Zahrnuje parametry, které významnou měrou ovlivňují laboratorní výsledky. Tyto vlivy se nacházejí před, ale i při samotném odběru biologického materiálu, dále také mezi odběrem a zpracováním biologického materiálu laboratoří (17).

Nedodržování instrukcí a doporučení, vycházejících ze strany laboratoře a týkajících se preanalytických postupů, je zdrojem více než 50 % laboratorních chyb. Některé zdroje uvádějí až 70-80 % chyb. V rámci bezpečné péče o pacienty je v klinických laboratořích zaváděn systém odmítnutí vzorku. Tento systém napomáhá eliminovat chyby spojené s preanalytickou fází. Konkrétně se jedná o přítomnost hemolýzy, chybnou identifikaci vzorku a žádanky, nedodané nebo ztracené vzorky, chybná volba odběrového systému, opožděný transport vzorku ve vztahu ke stabilitě analytu,

nedodržování doporučeného poměru materiálu a aditiva, nevhodné antikoagulační činidlo (2).

Faktory preanalytické fáze ovlivňující laboratorní stanovení koncentrace bilirubinu:

■ Odběr krve

Krev byla novorozencům odebírána na lůžkových odděleních. Odběr krve je řízen SOP a pokyny výrobce odběrového systému (viz příloha 2). Na vyšetření bilirubinu je do laboratoře zasílán vzorek venózní nebo kapilární krve z patičky. Doporučeným odběrovým systémem je BD Vacutainer® Microtainer™ s přidavkem aditiva Lithium heparin. Je nutné dodržet uvedený objem vzorku z důvodu dodržení správného poměru vůči aditivu.

■ Identifikace vzorku a žádanky

Označení vzorku krve a žádanky na vyšetření musí mít shodnou identifikaci. Obojí musí obsahovat všechny náležitosti dle příslušných SOP. V případě nejednoznačné nebo nepřesné identifikace laboratoř tento vzorek odmítne. Pro pacienta by to, v opačném případě, znamenalo velké riziko s vážnými až fatálními následky (2).

■ Stabilita bilirubinu za podmínek uskladnění v místech bez přístupu světla.

Bilirubin je stabilní: 2 dny při 20 až 25°C

7 dnů při 4 až 8°C

1 rok při -20°C

■ Transport vzorku

Čas od odběru vzorku až po samotné vložení do analyzátoru musí být omezen na minimum z důvodu omezené stability vůči přímému slunečnímu záření. Koncentrace bilirubinu může takto klesnout až o 30 % za hodinu (14). Přeprava zkumavky z ordinujícího oddělení do laboratoře musí být zajištěna v uzavřeném boxu bez přítomnosti světla.

■ Interference

Nejčastějšími interferenčními faktory ovlivňujícími stanovení bilirubinu v plazmě chemickou metodou je hemolýza a lipémie. Výrobce reagentů (firma Roche), které jsem používala ke stanovení ve svém experimentu, uvádí významný vliv hemolýzy od H indexu 1000 a v případě lipémie od L indexu 1400 (26).

3.4 Vnitřní kontrola kvality

VKK je stanovený soubor postupů osvojený a prováděný pracovníky laboratoře, vedoucí ke kontinuálnímu hodnocení laboratorní práce a zajištění požadavků na kvalitu. Cílem VKK je rozhodnutí, jestli naměřené výsledky analytické série jsou dostatečně spolehlivé, aby mohly být vydány. Každý laboratorní výsledek představuje pouze odhad skutečné koncentrace nebo obsahu analytu. Jeho součástí je tzv. nejistota výsledku. Určení míry nejistoty výsledku se stanovuje na základě stanovení mezilehlé přesnosti a hodnoty bias (vychýlení), které jsou součástí kontrolního systému (VKK a EHK) Mezilehlá preciznost je vyjádřena směrodatnou odchylkou (SD), resp. hodnotou variačního koeficientu (CV%) a bias, jako rozdíl mezi střední hodnotou výsledku stanovení a referenční hodnotou (22, 23, 30).

Kontrolní systém pro stanovení bilirubinu byl hodnocen v programu Unity Real Time, Bio-Rad v souladu s Westgardovými pravidly s použitím komerčních kontrolních materiálů.

3.5 Externí hodnocení kvality

EHK je v České republice zajišťováno SEKK spol. s r.o. Pardubice. EHK je součástí procesu zajišťování kvality laboratorních měření. Smyslem EHK je vyhodnocování výkonnosti jednotlivých účastníků prostřednictvím mezilaboratorního porovnávání výsledků dosažených v rozeslaných materiálech do více laboratoří. Výsledky jsou statisticky zpracovány a vyjádřeny graficky. Účastníkům jsou potom výsledky zpětně sdělovány (22).

4 Laboratorní činnost

4.1 Stanovení koncentrace bilirubinu novorozenců metodou přímé fotometrie v plné krvi

4.1.1 Instrumentace

Koncentraci bilirubinu novorozenců v plné krvi jsem stanovovala na analyzátoru Cobas b221 firmy Roche (viz příloha 4). Tento typ přístroje měří pouze celkový bilirubin novorozenců, neumožňuje měřit konjugovanou a nekonjugovanou formu.

Jedná se o analyzátor, který umožňuje měřit parametry v různých typech biologických materiálů jako je sérum, plazma, plná krev nebo i dialyzační roztoky. Poměrně široká je i škála měřených parametrů od substrátů, iontů přes parametry acidobazické rovnováhy až po deriváty hemoglobinu a bilirubin novorozenců. Pro měření koncentrace bilirubinu, spolu s celkovým hemoglobinem a jeho deriváty musí být nainstalován speciální tzv. COOX modul. Měření ostatních parametrů, založené na elektrochemických principech, vyžaduje přítomnost speciálních elektrod.

COOX modul se skládá z hemolyzéry a měřicí kyvety. Pro vlastní měření musí být vzorek plné krve hemolyzován, aby nedocházelo k rozptylu světla červenými krvinkami. K hemolýze vzorku dochází působením ultrazvuku. Důležitými součástmi optického systému je halogenová lampa a polychromátor, který umožňuje měření v rozsahu vlnových délek 450-670 nm s odezvou 512 signálů (25).

4.1.2 Princip metody

Hemolyzovaný vzorek je proměřován světlem pocházejícím z halogenové lampy, v uvedeném rozsahu vlnových délek. Jeho částečným pohlcením vzniká absorpční spektrum (viz příloha 9). Absorpční křivka typická pro bilirubin se nachází v rozmezí

vlnových délek cca 460-520 nm. Nepohlčené světlo je optickým vláknem směřováno na polychromátor, kde se láme a dopadá na fotosenzitivní přijímač. Velikost výsledného elektrického signálu je přepočtena na absorpci. Výsledná koncentrace celkového bilirubinu se vypočítá pomocí složitého výpočetního algoritmu (9) na základě Lambert-Beerova zákona.

Tato spektrofotometrická metoda pokrývá měřicí rozsah dostatečný i pro případ velmi patologické hladiny bilirubinu a to 51,3-855,0 $\mu\text{mol/l}$. Stanovení je ovlivněno přítomností absorbujících látek jako jsou diagnostická a terapeutická barviva nebo vysoká koncentrace mastných emulzí (25).

4.1.3 Postup stanovení

Dle metodiky mého experimentu jsem nejprve stanovila bilirubin u novorozenců v plné krvi. Ihned po doručení vzorku krve jsem zkontrolovala údaje na zkumavce s údaji na žádance. Elektronickou žádanku jsem přijala do LISu, poté se vytiskl čárový kód s příslušnými údaji o vzorku a vyšetření. Pomocí adaptéru byl nasát příslušný objem vzorku 111 μl do měřicího prostoru analyzátoru (viz příloha 5). Identifikace novorozence se přenesla do analyzátoru elektronicky. Po uplynutí 110 s (25) byla výsledná koncentrace bilirubinu vytištěna na souhrnném výsledkovém listu na termotiskárně analyzátoru a zároveň byla ihned dostupná v LISu, který byl propojen s analyzátozem on-line. Po kontrole laborantkou byl výsledek odeslán do NISu na ordinující oddělení. V tištěné podobě byl výsledek dostupný po lékařské kontrole.

VKK byla zajišťována pomocí doporučených komerčních kontrolních materiálů na třech hladinách a to COMBITROL PLUS 1,2,3. Analyzátor Cobas b221 je plně automatický přístroj z hlediska recalibrací metod. Jednotlivé hladiny kontrolních materiálů se pravidelně střídají v průběhu týdne. Výsledky jsou vyhodnocovány programem Unity Real Time, Bio-Rad (viz obrázek 3).

EHK pro stanovení bilirubinu v plné krvi není zavedeno, protože v kontrolních cyklech SEKK není nabízen vhodný kontrolní materiál.

4.2 Stanovení koncentrace bilirubinu novorozenců chemickou metodou v plazmě

4.2.1 Instrumentace

Bilirubin v plazmě novorozenců jsem vyšetřovala pomocí biochemického analyzátoru COBAS INTEGRA 400 *plus* (viz příloha 6). Jedná se o analyzátor, který je možné používat v běžném rutinním, ale i statimovém režimu, popřípadě může být využit i pro speciální účely. Analyzátor pracuje s uzavřeným systémem reagensí, které jsou plněny do kazet opatřených čárovým kódem, který zajišťuje automatickou registraci údajů o nich. Reagenční kazety jsou do analyzátoru vkládány ve stojáncích, jak demonstruje příloha 7. Analýza probíhá v měřicím modulu v plastových kyvetách. Připojení na LIS umožňuje oboustranný automatický přenos laboratorních výsledků a požadavků (27).

4.2.2 Princip metody

Celkový bilirubin reaguje s diazoniovými ionty v přítomnosti vhodného solubilizačního činidla při pH 1-2 za vzniku barevného produktu azobilirubinu. Intenzita zbarvení vniklého azobarviva je přímo úměrná koncentraci bilirubinu a měří se fotometricky. Tento typ reakce označován jako azokopulace.



Výrobce reagenční kazety uvádí měřicí rozsah metody 1,7-430,0 $\mu\text{mol/l}$. Tento rozsah je dostatečný pro diagnostiku a monitorování léčby novorozence i s velmi patologickou žloutenkou. Vzorky, u nichž je i tento koncentrační limit překročen, jsou automaticky naředěny analyzátozem a výsledek je přepočítán příslušným ředícím faktorem (26).

4.2.3 Postup stanovení

Vždy před zahájením měření vlastního vzorku jsem provedla VKK na dvou hladinách bilirubinu. Používala jsem komerční kontrolní materiály BIO-RAD Lyphochek[®] Unassayed Chemistry Control (Human) s koncentrací bilirubinu na dolní hladině referenčního rozmezí novorozenecké žloutenky a materiál ROCHE Precibil s deklarovanou hodnotou koncentrace bilirubinu, která se nachází nad referenčními mezemi, v oblasti patologické. Výsledky analýz obou kontrol v jednotkách $\mu\text{mol/l}$ jsem zapsala do kontrolního softwaru Unity Real Time, Bio-Rad (viz obrázek 4). V případě nesouladu kontrolního systému jsem provedla recalibraci metody pomocí kalibrátoru C.f.a.s. doporučeného výrobcem reagensů.

Krevní plazmu jsem separovala centrifugací po dobu 10 minut při 2000 g. Zkumavku jsem označila čárovým kódem obsahující informace o identifikaci vzorku a pak vložila ve vzorkovém stojanu do analyzátoru (viz příloha 8). Po odstartování začne probíhat vlastní analýza. Prostřednictvím počítače analyzátoru, který je on-line připojen na laboratorní informační systém, dojde k načtení požadavku na stanovení bilirubinu u vzorku s příslušnou identifikací. Analýza začíná pipetováním plazmy v příslušném objemu do plastové měřicí kyvety. Později následuje přidavek příslušného objemu reagensů. Od tohoto okamžiku začíná probíhat chemická reakce, která je zároveň principem metody. Výsledná koncentrace analytu je vypočítána automaticky pro každý vzorek na základě kalibrační křivky v jednotkách $\mu\text{mol/l}$. Výsledek je z analyzátoru přenesen do laboratorního informačního systému. Odtud je výsledek uvolněn laborantkou na ordinující oddělení. Po následné kontrole lékařem oddělení je nakonec uvolněn k tisku.

V průběhu mého výzkumu jsem také měla možnost účastnit se dvou kontrolních cyklů EHK organizovaných SEKK.

Výsledek stanovení novorozeneckého bilirubinu v rámci EHK je uveden v tabulce 3, grafické vyhodnocení (viz příloha 10 a 11).

5 POCT

Obecně je hlavním úkolem POCT technik optimalizování diagnostického procesu, ale i další monitorování léčby přímo v místě péče o pacienta. Znamená to možnost používání přístrojů POCT u lůžka pacienta, v ambulancích nebo používání zařízení samotným pacientem. POCT je však nedílnou součástí laboratorní diagnostiky (1).

5.1 Transkutánní měření v režimu POCT

Četné studie ukazují, že nejčastějším důvodem odběru krve u novorozenců je stanovení bilirubinu v souvislosti s novorozeneckou žloutenkou. Samotný odběr krve je bolestivý invazivní proces, přinášející riziko vzniku infekce. Pro rodiče i samotného novorozence představuje stresovou situaci, pro ošetřující personál časovou zátěž.

Aby se počet odběrů krve snížil, byly zkonstruovány přístroje pro neinvazivní vyšetření bilirubinu – transkutánní bilirubinometry. Od roku 1980, kdy byl na trh uveden první tento přístroj, prošly celou řadou technických inovací. Mezi novinkami bych uvedla že, výsledky jsou vyjádřené rovnou v $\mu\text{mol/l}$ bez předešlé kalibrace přístroje za účelem převodu arbitrárních jednotek na koncentraci bilirubinu, výsledky dále nejsou ovlivněné rasou ani věkem novorozence (6).

5.1.1 Instrumentace

Zařízení, kterým byl měřen bilirubin novorozenců v průběhu mého experimentu, je transkutánní bilirubinometr JM-103 Konica Minolta Hill-Room Air-Shields (viz příloha 11). Samotné měření probíhá na místech s dostatečnou cirkulací krve. Doporučovanými měřícími body jsou: čelo, sternum nebo břicho novorozence. Měření proběhne

automaticky, po přitlačení bilirubinometru měřící sondou na tělo novorozence, výsledek je zobrazen na displej v $\mu\text{mol/l}$ (12).

5.1.2 Princip měření

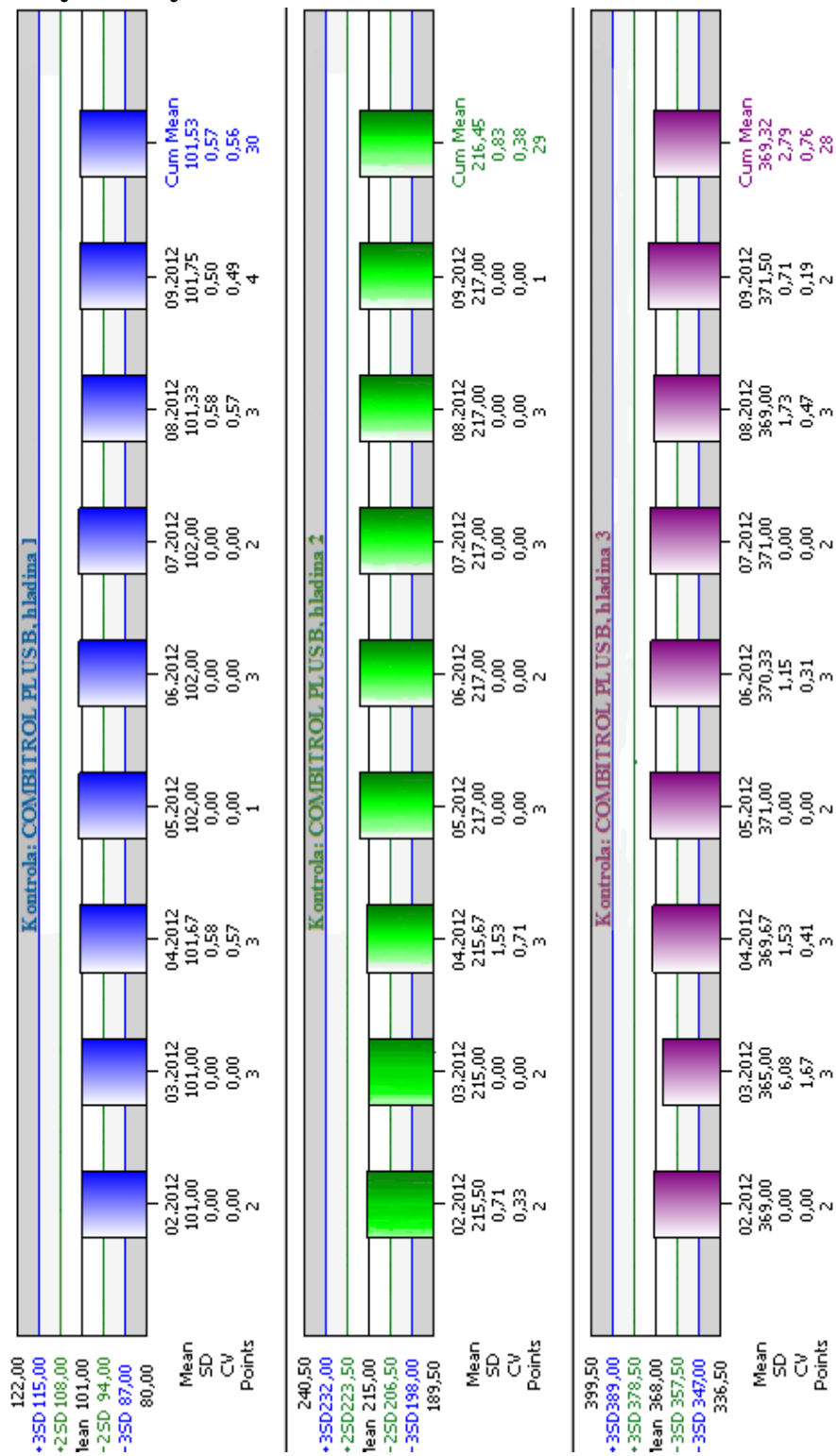
Tímto způsobem se neměří přímo koncentrace bilirubinu v krvi novorozence, ale stupeň intenzity žlutého zabarvení subkutánní tkáně. Vlastní princip spočívá v rozdílné absorpci světla, která je proměřovaná krátkou a dlouhou optickou dráhou světelného paprsku při dvou vlnových délkách (viz příloha 12). Používá se světlo modré o vlnové délce 400 nm a světlo zelené o vlnové délce 500 nm. Přístroj je konstruován tak, aby byl minimalizován vliv melaninu a stupeň zralosti pokožky novorozence (12).

Výrobce deklaruje měřící rozsah od 0 až $425\mu\text{mol/l}$ s přesností $\pm 25 \mu\text{mol/l}$.

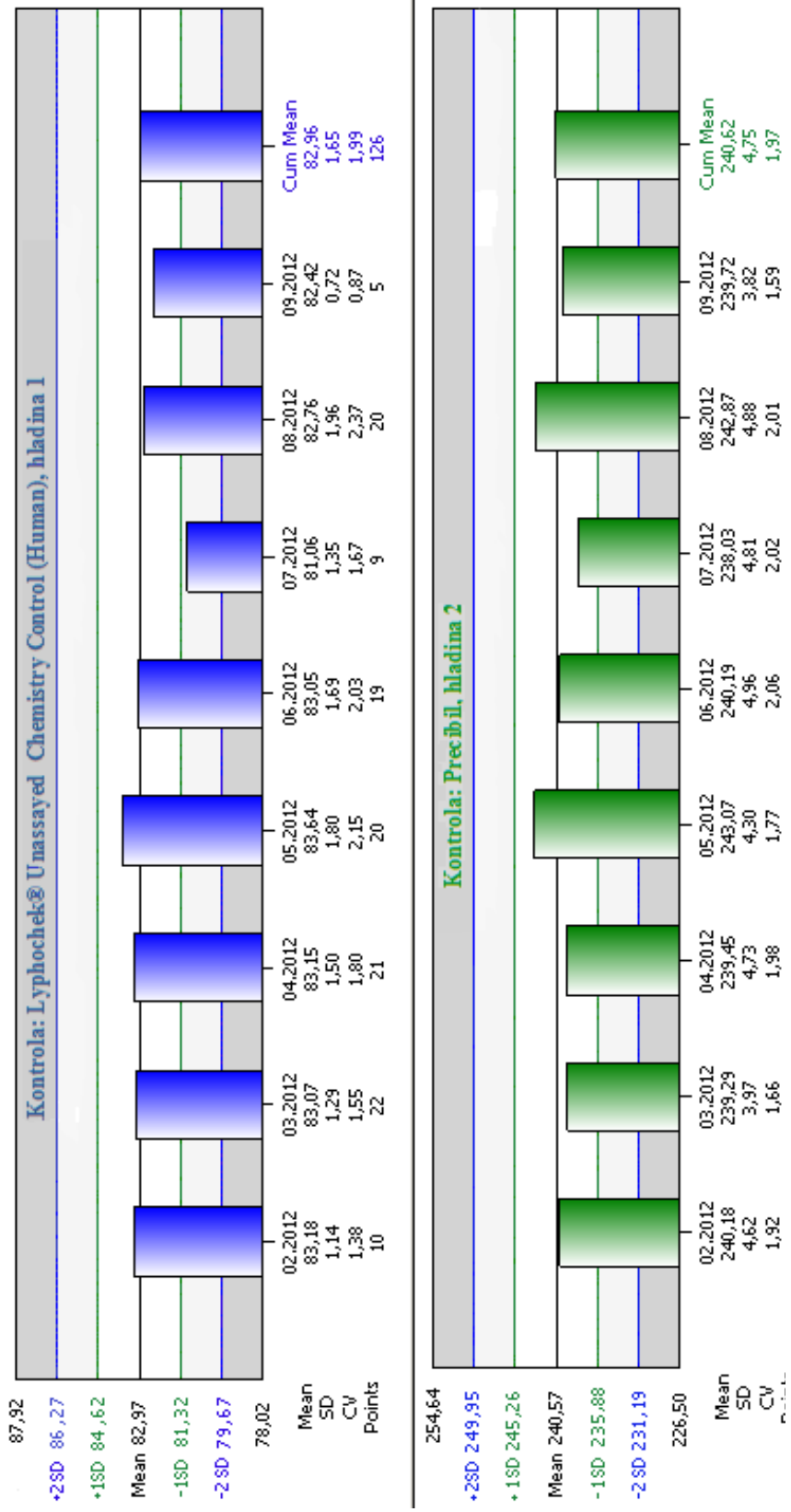
Významnou interferencí je fototerapie. Vlivem působení světla dochází ke snížení koncentrace bilirubinu v subkutánní tkáni, což nekoreluje s koncentrací bilirubinu v krvi (12).

Postup stanovení i kontrolní systém, na příslušných lůžkových, je řízen doporučením výrobce přístroje.

6 Výsledky



Obrázek 3. VKK stanovení koncentrace bilirubinu novorozenců v plné krvi za období od 9.2.2012 do 17.9.2012
 Legenda k obrázku: CV variční koeficient, SD směrodatná odchylka
 Zdroj: software Unity Real Time, Bio Rad Laboratories



Obrázek 4. VKK stanovení koncentrace bilirubinu novorozenců v séru za období od 9.2.2012 do 17.9.2012
 Legenda k obrázku: CV variační koeficient, SD směrodatná odchylka
 Zdroj: software Unity Real Time, Bio Rad Laboratories

6.1 Hodnocení VKK obou laboratorních metod stanovení bilirubinu novorozenců

Pro grafické hodnocení VKK obou laboratorních metod jsem zvolila sloupcový graf, který je generován softwarem Unity Real Time, Bio-Rad. Umožňuje detailnější pohled na průběh kontrolního systému. Celkové výsledky mezilehlé preciznosti za období mého experimentu jsem zpracovala do tabulky 1.

Tabulka 1. Hodnocení mezilehlé preciznosti laboratorních metod

METODA PŘÍMÉ FOTOMETRIE				CHEMICKÁ METODA			
NÁZEV KONTROLY	MEAN	HODNOCENÍ		NÁZEV KONTROLY	MEAN	HODNOCENÍ	
		SD	CV%			SD	CV%
COMBITROL1	101	0,57	0,56	LYPHOCHEK	82,97	1,65	1,99
COMBITROL2	215	0,83	0,38				
COMBITROL3	368	2,79	0,76	PRECIBIL	240,57	4,75	1,97

Tabulka 2. Variační koeficienty mezilehlé preciznosti udávané výrobcí

METODA PŘÍMÉ FOTOMETRIE		CHEMICKÁ METODA	
KONCENTRACE BILIRUBINU ($\mu\text{mol/l}$) V KONTROLNÍM MATERIÁLU AUTOTROL PLUS Roche	CV%	KONCENTRACE BILIRUBINU ($\mu\text{mol/l}$) V KONTROLNÍM MATERIÁLU PRECIPATH Roche	CV%
103,7	0,78	80,7	2,00
210,8	0,96		
367,2	0,78		

Zdroj: Návod k obsluze Cobas b221 systém - Technické parametry, s.A64-A65
 Aplikace Cobas Roche diagnostics – příbalové info - kontroly
 Legenda k tabulkám: SD směrodatná odchylka, CV variační koeficient

Do tabulky 2 jsem shrnula hodnoty mezilehlé preciznosti (CV%) obou laboratorních metod tak, jak je uvádí výrobce IVD firma Roche.

Rozhodujícím parametrem při pravidelně prováděné verifikaci laboratorní metody je hodnota variačního koeficientu, která by měla odpovídat údajům výrobce IVD diagnostika.

Kontrolní materiál pro spektrofotometrickou metodu pokrývá rozmezí očekávaných hodnot od 101 $\mu\text{mol/l}$ do 368 $\mu\text{mol/l}$. Očekávané hodnoty kontrol pro chemickou metodu spadají do rozmezí od 82,97 $\mu\text{mol/l}$ do 240,57 $\mu\text{mol/l}$. Zvolený rozsah kontrolního systému obou metod je dostatečný pro diagnostiku fyziologické i patologické žloutenky novorozence.

6.2 Hodnocení EHK chemické metody stanovení bilirubinu novorozenců v séru

Výsledky EHK obou kontrolních cyklů jsem zpracovala do tabulky 3. Účastníkům byly zaslány dva kontrolní materiály A,B.

Tabulka 3. Hodnocení EHK stanovení novorozeneckého bilirubinu v séru

ČÍSLO KONTR. CYKLU	KONTR. MATERIÁL	MĚŘENÁ KONC. BILIRUBINU [$\mu\text{mol/l}$]	AV	D%	D_{max}
BIL 1/12	A	288,0	290	-0,69	21
BIL 1/12	B	156,0	162	-3,70	21
BIL 2/12	A	155,6	161	-3,35	21
BIL 2/12	B	277,6	290	-4,17	21

Zdroj: Legenda výsledkového listu SEKK, kontrolní cykly BIL 1/12, BIL 2/12
 Legenda k tabulce: AV vztázná hodnota, D% procentuální rozdíl (bias), D_{max} přijatelný rozdíl(%)

6.3 Tabulka koncentrací bilirubinu novorozenců měřené v laboratoři i POCT

Tabulka 4. Koncentrace bilirubinu u novorozenců [$\mu\text{mol/l}$]

č.vz.	JM	COBAS	INT	č.vz.	JM	COBAS	INT	č.vz.	JM	COBAS	INT
1.	164	209	215	21.	164	187	192	41.	151	172	178
2.	199	204	209	22.	179	242	247	42.	148	174	177
3.	126	193	210	23.	166	189	211	43.	181	204	215
4.	156	209	206	24.	166	224	221	44.	67	176	173
5.	244	237	247	25.	134	187	192	45.	64	139	136
6.	146	196	197	26.	162	188	188	46.	137	190	190
7.	181	190	200	27.	158	209	214	47.	125	196	194
8.	174	179	181	28.	101	166	168	48.	83	151	159
9.	199	233	235	29.	240	230	232	49.	231	249	227
10.	162	201	204	30.	115	161	180	50.	245	283	251
11.	164	260	254	31.	222	286	272	51.	171	275	266
12.	241	239	219	32.	222	226	214	52.	168	215	232
13.	150	196	199	33.	215	217	211	53.	163	229	240
14.	182	208	222	34.	60	98	90	54.	184	252	260
15.	216	245	244	35.	136	198	195	55.	168	180	189
16.	240	234	237	36.	153	192	203	56.	41	141	150
17.	118	157	165	37.	123	210	214	57.	50	151	152
18.	208	244	251	38.	115	177	172	58.	203	235	248
19.	246	261	273	39.	80	173	184	59.	96	192	221
20.	190	224	218	40.	169	161	162	60.	216	226	234

Legenda: JM- měření bilirubinu POCT, COBAS- stanovení bilirubinu v plné krvi, INT- stanovení bilirubinu v plazmě, výsledky měření bilirubinu při fototerapii

Zdroj: Vlastní výzkum

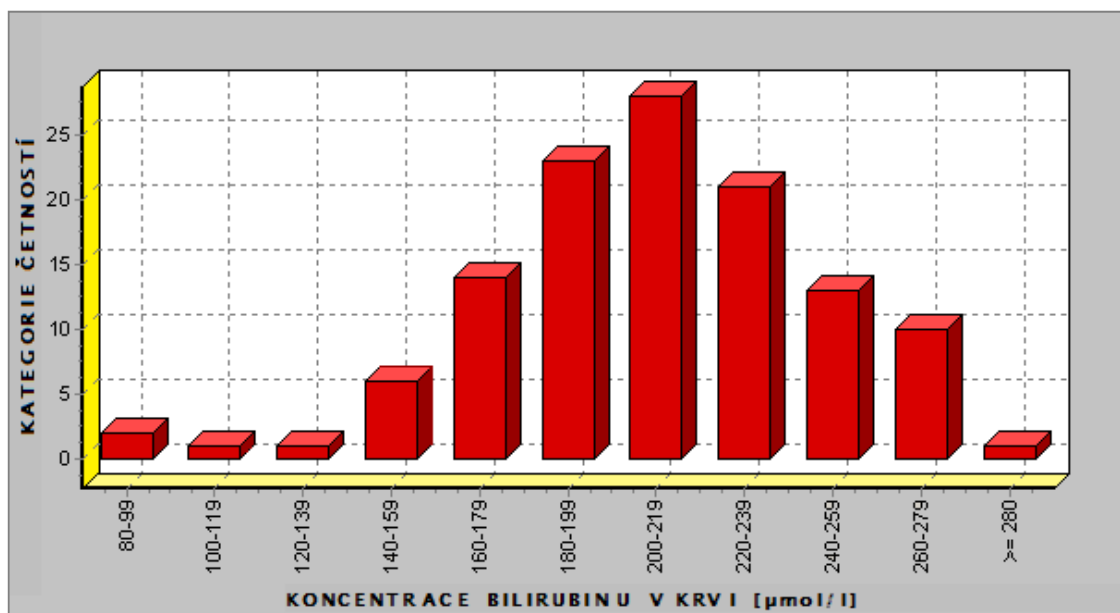
Tabulka 4. Koncentrace bilirubinu u novorozenců [$\mu\text{mol/l}$]- pokračování

č.vz.	JM	COBAS	INT	č.vz.	JM	COBAS	INT	č.vz.	JM	COBAS	INT
61.	183	209	212	81.	106	192	185	101.	62	87	81
62.	220	254	250	82.	58	133	144	102.	238	280	272
63.	194	245	239	83.	125	162	173	103.	146	216	236
64.	168	229	237	84.	146	168	167	104.	124	180	181
65.	179	242	274	85.	230	289	237	105.	99	175	174
66.	86	195	195	86.	168	195	185	106.	55	109	108
67.	192	239	230	87.	134	209	230	107.	173	204	216
68.	112	184	208	88.	151	226	214	108.	220	267	262
69.	112	194	191	89.	101	191	183	109.	139	243	241
70.	167	205	208	90.	212	219	203	110.	148	214	201
71.	154	166	163	91.	181	245	223	111.	161	205	205
72.	204	211	222	92.	115	148	149	112.	217	216	241
73.	102	159	167	93.	227	242	228	113.	266	283	291
74.	144	153	165	94.	225	211	206	114.	186	246	261
75.	250	274	279	95.	236	234	226	115.	147	146	147
76.	165	221	241	96.	94	177	169	116.	161	196	202
77.	146	205	215	97.	182	229	208	117.	182	194	199
78.	264	264	259	98.	163	230	207	118.	144	229	236
79.	138	250	235	99.	136	201	197	119.	134	184	191
80.	111	171	189	100.	146	222	198	120.	224	261	271

Legenda: JM- měření bilirubinu POCT, COBAS- stanovení bilirubinu v plné krvi, INT- stanovení bilirubinu v plazmě, výsledky měření bilirubinu při fototerapii

Zdroj: Vlastní výzkum

Zastoupení četností novorozenců v jednotlivých kategoriích podle koncentrace bilirubinu v krvi



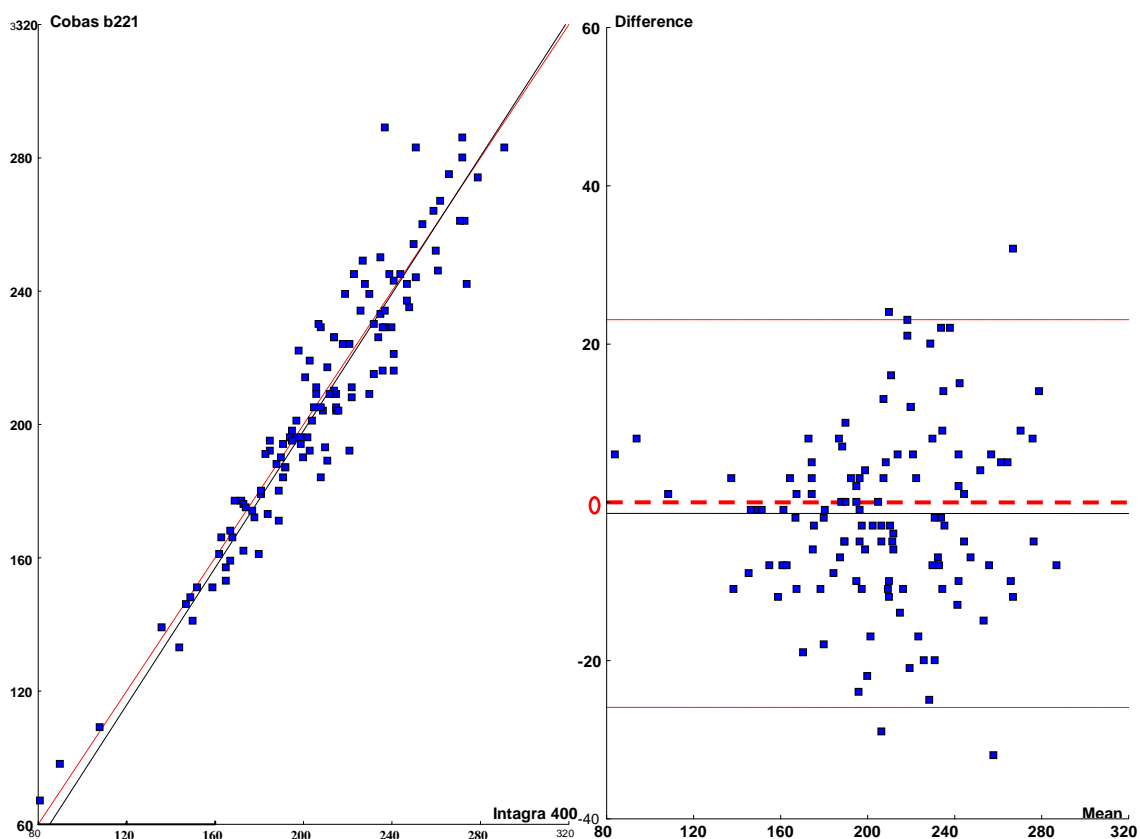
Obrázek 5. Histogram četností novorozenců podle koncentrace bilirubinu v krvi, $N=120$
Zdroj: Vlastní data

Pro názorný přehled výsledků z tabulky 4 jsem zpracovala histogram, který vypovídá o početním zastoupení novorozenců v jednotlivých kategoriích podle koncentrací bilirubinu v krvi v průběhu mého experimentu.

Rozsah koncentrací bilirubinu novorozenců stanovených v laboratoři se pohyboval v rozmezí 81-289 $\mu\text{mol/l}$. Z obrázku 5 vyplývá, že nejpočetnější zastoupení bylo v kategorii četnosti 25-30, které odpovídalo rozmezí koncentrací bilirubinu v krvi 200-219 $\mu\text{mol/l}$. Konkrétně se jedná o 28 vzorků.

Autoři odborné literatury uvádějí téměř shodné rozmezí pro diferenciaci fyziologické a patologické žloutenky. Dalo by se říci, že uvedené rozmezí také zasahuje do oblasti diskriminačních hodnot, v kterých se rozhoduje o léčbě patologické žloutenky novorozence.

6.4 Korelace metody přímé fotometrie a chemické metody



Obrázek 6. Lineární korelace
(Passing-Bablok)

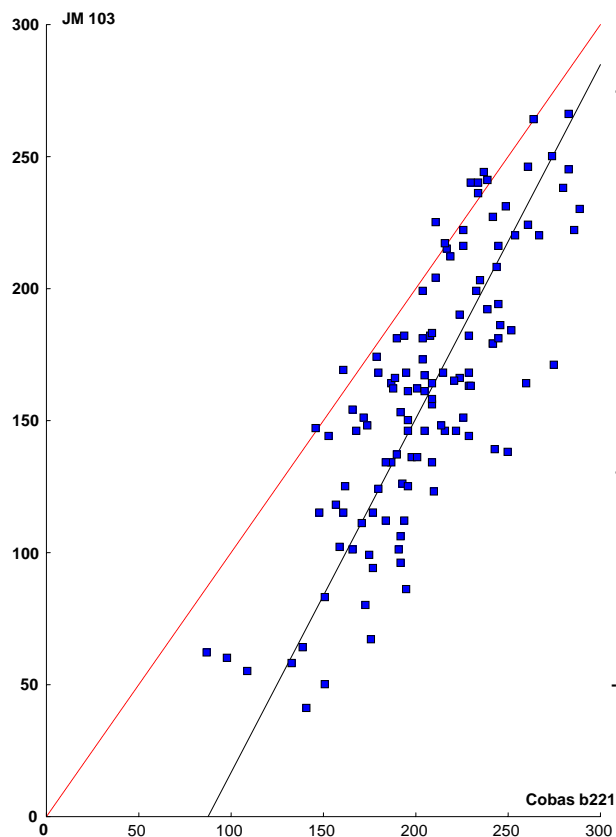
Obrázek 7. Diferenční graf
(Bland – Altman)

Tabulka 5. Výsledky porovnání metody přímé fotometrie v plné krvi (analyzátor Cobas b221) s chemickou metodou stanovení bilirubinu v krevní plazmě (analyzátor INTEGRA 400 plus), $N=120$

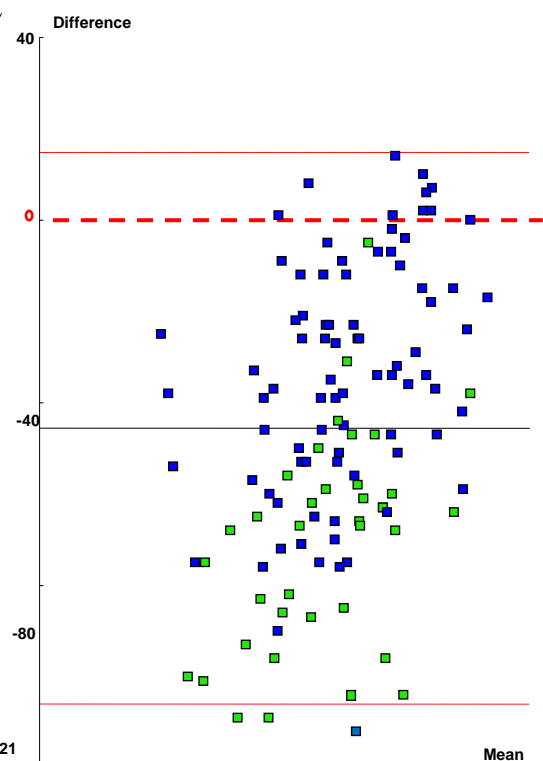
STATISTICKÉ PARAMETRY	PASSING - BABLOK		BLAND - ALTMAN	
	Výsledek	95% interval spolehlivosti	Výsledek	95% interval spolehlivosti
MEAN DIFFERENCE	---	---	-1,41	-3,64 až -0,828
SLOPE	1,025	0,970 až 1,091	---	---
INTERCEPT	-7	-20,5 až -3,5	---	---
KORELAČNÍ KOEFICIENT [r]	0,950	---	---	---

Zdroj: Software Method Validator – Version 1.1.10.0 (freeware), © Philippe Marquis 1999, Metz FRANCE

6.5 Korelace metody přímé fotometrie a POCT



Obrázek 8. Lineární korelace
(Passing-Bablok)



Obrázek 9. Diferenční graf
(Bland – Altman)

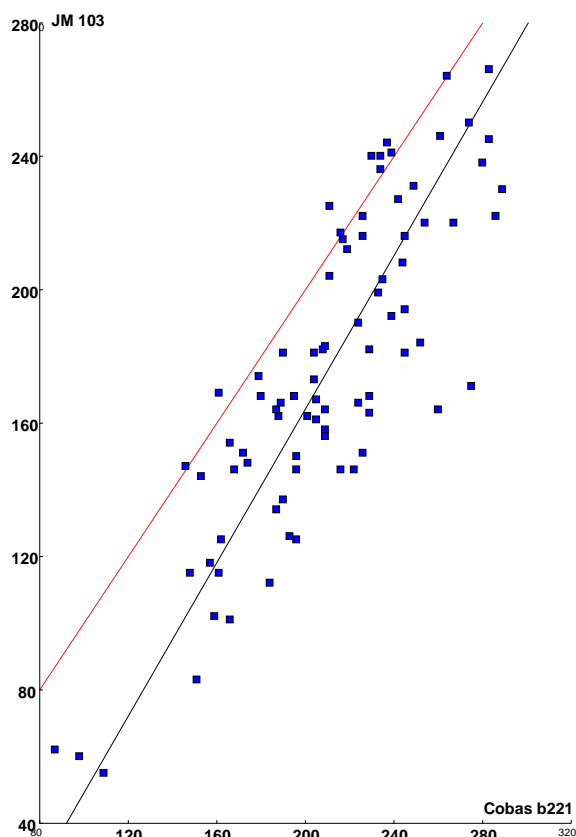
■ novorozenci na fototerapii

Tabulka 6. Výsledky porovnání metody přímé fotometrie stanovení bilirubinu v plné krvi (analyzátor Cobas b221) s metodou transkutánního měření v režimu POCT (přístroj JM-103), N=120

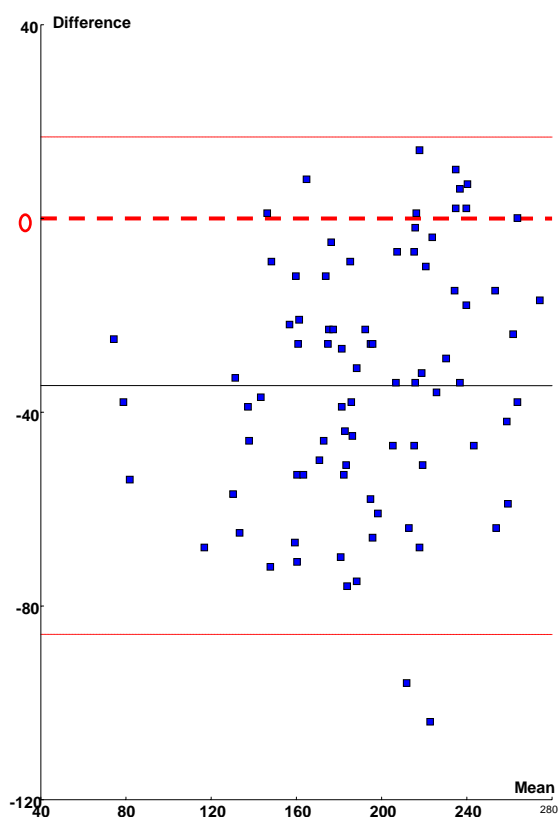
STATISTICKÉ PARAMETRY	PASSING - BABLOK		BLAND - ALTMAN	
	Výsledek	95% interval spolehlivosti	Výsledek	95% interval spolehlivosti
MEAN DIFFERENCE	---	---	-45,6	-51,1 až -40
SLOPE	1,340	1,174 až 1,518	---	---
INTERCEPT	-117,3	-151,4 až -83,2	---	---
KORELAČNÍ KOEFICIENT [r]	0,803	---	---	---

Zdroj: Software Method Validator – Version 1.1.10.0 (freeware), © Philippe Marquis 1999, Metz FRANCE

6.5.1 Korelace přímé fotometrie a POCT bez novorozenců na fototerapii



Obrázek 10. Lineární korelace
(Passing-Bablok)



Obrázek 11. Diferenční graf
(Bland – Altman)

Tabulka 7. Výsledky porovnání metody přímé fotometrie stanovení bilirubinu v plné krvi (analyzátor Cobas b221) s metodou transkutánního měření v režimu POCT (přístroj JM-103), nezahrnuti novorozenci na fototerapii, N=83

STATISTICKÉ PARAMETRY	PASSING - BABLOK		BLAND - ALTMAN	
	Výsledek	95% interval spolehlivosti	Výsledek	95% interval spolehlivosti
MEAN DIFFERENCE	---	---	-34,5	-40,2 až -28,9
SLOPE	1,151	1,000 až 1,324	---	---
INTERCEPT	-65,9	-104,2 až -34,0	---	---
KORELAČNÍ KOEFICIENT [r]	0,841	---	---	---

Zdroj: Software Method Validator – Version 1.1.10.0 (freeware), © Philippe Marquis 1999, Metz FRANCE

7 Diskuse

Veškerou laboratorní činnost jsem prováděla samostatně. Řídila jsem se příslušnými SOP, které jsou v platnosti na oddělení klinické biochemie Nemocnice Jindřichův Hradec, a.s.

Výsledné hodnoty variačních koeficientů mezilehlé preciznosti (CV%) IKK obou laboratorních metod nepřekračují limity deklarované výrobcem. Stejně tak výsledky analýzy kontrolních vzorků EHK obou dvou cyklů splňovaly toleranční limit, kdy největší rozdíl od vztažné hodnoty (bias) nepřekročil 4,2 %.

Koncentrační rozmezí obou laboratorních metod bylo 81-289 $\mu\text{mol/l}$. Z lineární korelace (Passing-Bablok) vyplývá, že koncentrace bilirubinu stanovené laboratorními metodami, vykazují velmi dobrou lineární závislost $r = 0,950$. Diferenční graf (Bland-Altman) uvádí nízkou hodnotu průměrné difference – 1,41 $\mu\text{mol/l}$. Na základě obou údajů statistického vyhodnocení lze konstatovat, že laboratorní metody spolu velmi dobře korelují a jsou tudíž vzájemně zastupitelné (viz tabulka 5). Výsledek potvrzuje i práce německých autorů, kde Grohmann et al. (6) uvádí $r = 0,980$ a $0,987$ pro korelaci dvou chemických metod na azokopulačním principu měřených na dvou různých analyzátorech a dvou metod na principu přímé fotometrie na analyzátorech krevních plynů.

Stanovení koncentrace bilirubinu novorozenců přímou fotometrií má řadu výhod: malé množství materiálu (111 μl) při odběru krve do kapiláry s přidavkem aditiva Lithia heparinu, odpadá zpracování vzorku před vlastní analýzou odstředováním, pipetováním atd., rychlost dostupnosti výsledku (110 s), snadná obsluha a údržba analyzátoru. Metoda má dostatečný měřicí rozsah pro včasnou diagnostiku i dostatečnou spolehlivost při sledování hyperbilirubinémie novorozenců v průběhu terapie. Pro statistické vyhodnocení POCT metody a laboratorní metody jsem použila výsledky stanovené přímou fotometrií z výše uvedených důvodů.

Koncentrační rozmezí metody přímé fotometrie a měření transkutánním bilirubinometrem v režimu POCT bylo 41-289 $\mu\text{mol/l}$. Lineární korelace byla sice

uspokojivá $r = 0,803$, ale diferenční graf (Bland Altman) vykazoval velmi výraznou průměrnou diferencí $-45,6 \mu\text{mol/l}$. Z uvedených faktů vyplývá, že transkutánní měření poskytuje podhodnocené výsledky vůči laboratornímu stanovení (viz tabulka 6).

Pro posouzení těchto dvou měření jsem použila statistické postupy jako v případě metod laboratorních. Výsledné hodnocení bylo však ovlivněno celou řadou faktorů. Největší podíl na této diferencii má účast 37 novorozenců, které jsem zahrnula do zkoumaného souboru a byly léčeny fototerapií. Nejvýznamnější rozdíl v koncentracích bilirubinu jsem zaznamenala u vzorku č. 79, který dosahoval $112 \mu\text{mol/l}$. Významný vliv fototerapie jsem demonstrovala na obrázcích 9 a 10, kde hodnocený soubor obsahoval pouze novorozence bez fototerapie. Z tabulky 7 vyplývá, že průměrná diference se snížila na hodnotu $-34,5 \mu\text{mol/l}$ a korelační koeficient potom na $0,841$. Zecca et al. (37) publikoval výsledky svojí studie o používání transkutánního měření při současně probíhající léčbě fototerapií. Potvrdil dobrou korelaci mezi laboratorními výsledky a transkutánním měřením za podmínky přelepování místa měření náplastí dodávanou výrobcem přístroje.

Již samotné transkutánní měření bilirubinu novorozenců je zatíženo řadou negativních faktorů. V první řadě je to fakt, že se měří intenzita žlutého zbarvení kůže a podkoží, která se skutečnou koncentrací bilirubinu v krvi pouze koreluje. Štillová et al. (31) ve své studii prokazuje diferencii mezi místem měření na těle novorozence porovnáním s laboratorně stanovenou koncentrací bilirubinu v krvi. Pro sternum uvádí diferencii $0,9 \mu\text{mol/l}$, pro čelo dokonce $-21,9 \mu\text{mol/l}$. Této hodnotě přisuzuje vliv působení přímého denního světla. V jiných studiích autoři poukazují na mateřská znaménka na kůži, pohmožděnou kůži (4), rasu novorozence, jako na další negativní faktory.

Výsledky transkutánního měření u lůžka pacienta mnohdy poskytují podhodnocené výsledky, které mají omezené použití zejména v oblasti koncentrací v rozmezí $200-250 \mu\text{mol/l}$ bilirubinu, což jsou hladiny klinicky významné z hlediska rozhodování o terapeutickém zásahu pro novorozence (6).

Dle tohoto souhrnného vyhodnocení výsledků, obou laboratorních metod i metody POCT, považují první i druhou hypotézu za potvrzenou.

8 Závěr

Koncentrace bilirubinu novorozenců stanovená metodou přímé fotometrie v plné krvi velmi dobře koreluje s koncentrací bilirubinu stanovenou chemickou metodou v krevní plazmě. Obě laboratorní metody jsou pro diagnostiku novorozenecké žloutenky zcela zaměnitelné.

POCT měření s použitím transkutánního bilirubinometru je neinvazivní metoda. Uplatňuje se především ve screeningu novorozenců u lůžka pacienta, kdy je možné takto snížit počet krevních odběrů na vyšetření koncentrace bilirubinu. Používání transkutánního měření má svoje omezení především proto, že mnohdy poskytuje podhodnocené výsledky vůči laboratornímu stanovení. To má největší význam v oblasti diskriminačních hodnot, kdy se rozhoduje o léčbě hyperbilirubinémie. Transkutánní měření se obecně vůbec nedoporučuje při současně probíhající léčbě fototerapií. V obou případech je nutné výsledky ověřit stanovením koncentrace bilirubinu v laboratoři. Výsledky mojí porovnávací studie potvrdily určité rozdíly mezi laboratorní metodou a POCT transkutánním měřením, které se mohou v praxi vyskytnout a které by měly být minimalizovány náležitým používáním POCT, případně nastavením korelace s používanou laboratorní metodou.

Jako rutinní laboratorní metodu pro stanovení koncentrace bilirubinu v krvi novorozenců bych doporučovala metodu přímé fotometrie z důvodů zkvalitnění péče o novorozence s hyperbilirubinemií (dostatečné koncentrační rozmezí, malý objem vzorku, rychlost dostupnosti výsledku), ale i z pohledu laboratorního provozu (vzorek nevyžaduje separaci, jednoduchá obsluha i údržba analyzátoru, správně nastavený systém kontroly kvality). Důkazem spolehlivosti je instalace analyzátorů krevních plynů opatřených COOX modulem na lůžková dětská oddělení, kde se používají v režimu POCT.

Domnívám se, že výsledky této bakalářské práce mohou nalézt praktické využití, jak pro laboratorní profesionály zabývající se možnostmi stanovení bilirubinu novorozenců, tak i pro lékaře v klinické praxi pečující o novorozence s hyperbilirubinemií.

9 Seznam informačních zdrojů

1. BERÁNEK, M., B. FRIEDECKÝ a A. JABOR. et al. Správné zavádění a používání POCT. ČESKÁ LÉKAŘSKÁ SPOLEČNOST JANA EVANGELISTY PURKYNĚ. *Česká společnost klinické biochemie* [online]. 2006 [cit. 2013-04-20]. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporuceni--poct-spravne-zavadeni-a-pouzivani#06>
2. BUNEŠOVÁ, M., J. BLAŽKOVÁ, P. COUFAL, B. FRIEDECKÝ, M. KAPUSTOVÁ, J. KOTRBATÝ a P. MALINA. Doporučení k převzetí biologického materiálu klinickou laboratoří. *Klinická biochemie a metabolismus: časopis České společnosti klinické biochemie*. 2011, roč. 19, č. 2, s. 128-130. ISSN 1210-7921. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2011/2011-2/KBM-2-11-128-pranal.pdf>
3. DORT, J., H. TOBRMANOVÁ. Hyperbilirubinemie novorozence: Doporučené postupy v neonatologii. *Česká neonatologická společnost ČLS JEP* [online]. 1.10.2006 [cit. 2013-04-20]. Dostupné z: <http://www.neonatology.cz/doporuceni-a-postupy>
4. EL-BESHBISHI, S. N., K. E. SHATTUCK, A. A. MOHAMMAD a J. R. PETERSEN. Hyperbilirubinemia and transcutaneous bilirubinometry. *Clinical Chemistry* [online]. 2009, roč. 55, č. 7, s. 1280-1287 [cit. 2013-04-20]. ISSN 0009-9147. Dostupné z: <http://www.clinchem.org/cgi/doi/10.1373/clinchem.2008.121889>
5. EHRMANN, J., P. HŮLEK et al. *Hepatologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-802-4731-186.
6. GROHMANN, K., M. ROSER, B. ROLINSKI, I. KADOW, C. MÜLLER, A. GOERLACH-GRAW, M. NAUCK a H. KÜSTER. Bilirubin measurement for neonates: comparison of 9 frequently used methods. *Pediatrics*. 2006, roč. 117, č. 4, s. 1174-1183. ISSN: 1098-4275. Dostupné z: <http://pediatrics.aappublications.org/content/117/4/1174.full.html>
7. JABOR, A. Preanalytická fáze. ZÁMEČNÍK, M. *Encyklopedie laboratorní medicíny I* [online]. Pardubice: SEKK, 2002, březen 2012 [cit. 2013-02-11].

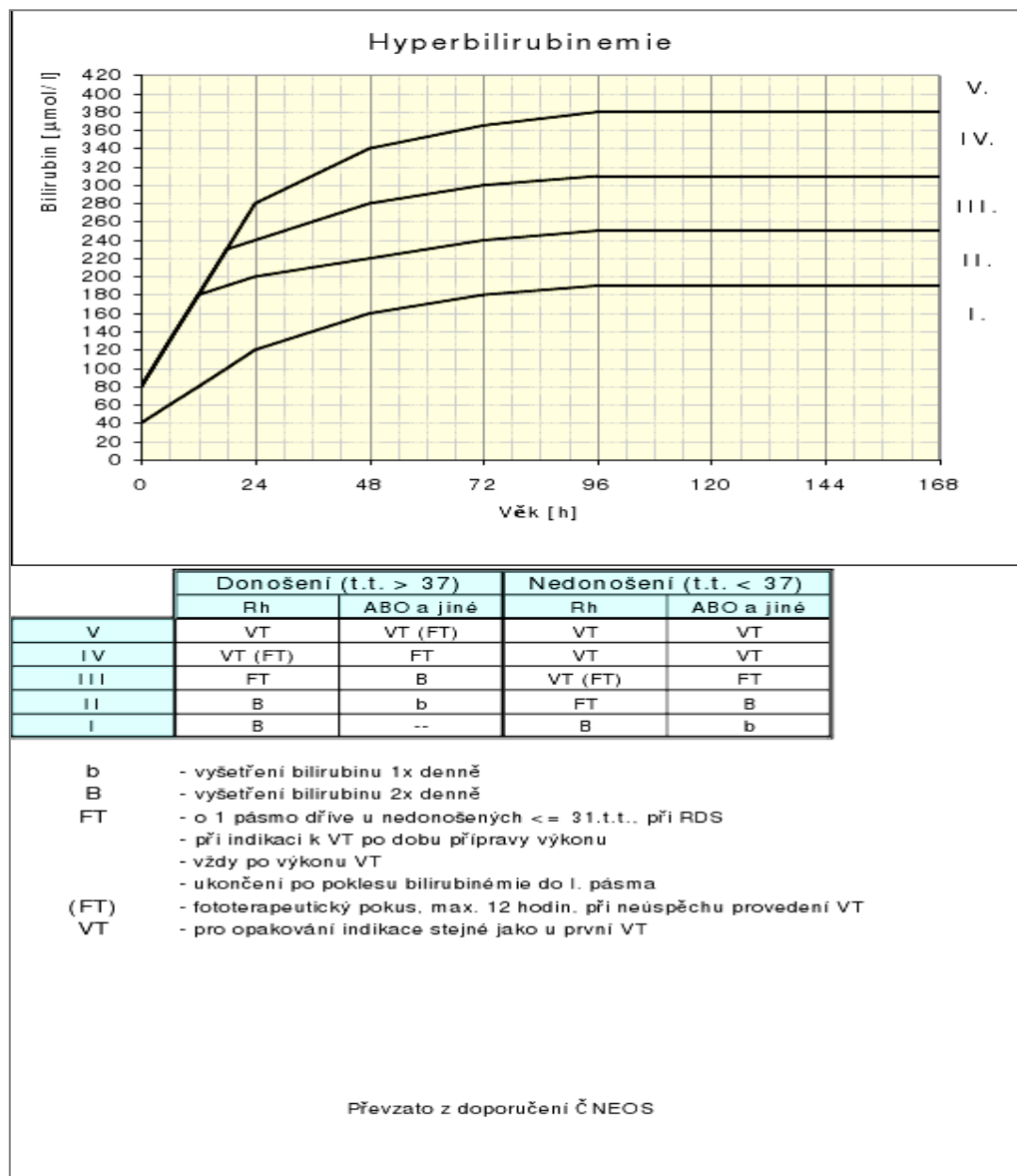
ISBN 80- 238 – 9775 – 6.

8. JIRSA, M. Biochemické vyšetřovací metody v hepatologii. SCHNEIDERKA, P. et al. *Vybrané kapitoly z klinické biochemie*. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 8071845051.
9. KAJABOVÁ, M. Stanovení novorozeneckého bilirubinu POCT technikami. *FONS*. 2011, roč. 21, č. 1, s. 19-21. ISSN: 1211-7137.
10. KIRK, J.M. Neonatal jaundice: a critical review of the role and practice of bilirubin analysis. *Annals of Clinical Biochemistry*. 2008, roč. 45, č. 5, s. 452-462. ISSN: 1758-1001. Dostupné z: <http://acb.rsmjournals.com/content/45/5.toc>
11. KODÍČEK, M. *Barviva žlučová. Biochemické pojmy : výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2013-04-20]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=barviva_zlucova
12. KONICA MINOLTA SENSING, Inc. *Instruction Manual Jaundice Meter JM-103*. Osaka, 2002. Dostupné z: http://www5.konicaminolta.eu/fileadmin/CONTENT/Measurement_Instruments/Products/Instruction_Manuals/JM-103.pdf
13. KVASNICOVÁ, V. Bilirubin celkový. ZÁMEČNÍK, M. *Encyklopedie laboratorní medicíny I* [online]. Pardubice: SEKK, 2002, březen 2012 [cit. 2013-04-20]. ISBN 80 – 238 – 9775 – 6. Dostupné z: <http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/B/MZAGR.htm>
14. KVASNICOVÁ, V. S-Bilirubin celkový. ZÁMEČNÍK, M. *Encyklopedie laboratorní medicíny I* [online]. Pardubice: SEKK, 2002, březen 2012 [cit. 2013-04-20]. ISBN 80 – 238 – 9775 – 6. Dostupné z: <http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/B/KVACJ.htm>
15. LEIFER, G. Novorozenec s vrozenými malformacemi. LEIFER, G. *Úvod do porodnického a pediatrického ošetřovatelství*. Praha: Grada, 2004, s. 369-397. ISBN 80-247-0668-7.
16. LO, S. Bilirubin: The lab's role in diagnosis of neonatal hyperbilirubinemia *Clinical laboratory news*. 2010, roč. 36, č. 6, s. 10-13. ISSN: 0161-9640. Dostupné z: <http://www.aacc.org/publications/cln/2010/june/Pages/SeriesArticle.aspx>

17. MASOPUST, J. *Požadování a hodnocení biochemických vyšetření I.část*. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-7184-648-1.
18. MASOPUST, J., R. PRŮŠA, *Patobiochemie metabolických drah*. Praha: Univerzita Karlova, 1999. ISBN 80-238-4589-6.
19. MOUREK, J. *Fyziologie*. Praha: Grada, 2005, ISBN 80-247-1190-7.
20. MUKHERJEE, S. Impaired bilirubin conjugation. *Medscape reference* [online]. ©1994-2013, updated : Sept 27, 2012 [cit. 2013-04-20]. Dostupné z: <http://emedicine.medscape.com/article/171585-overview>
21. MUNTAU, A.C. *Pediatric*. 4. vyd. Praha: Grada, 2009, ISBN 978-80-247-2525-3.
22. PLZÁK, Z., B. FRIEDECKÝ a J. KRATOCHVÍLA. Metrologická terminologie v klinické a analytické laboratoři. In: *SEKK spol. s r.o.* [online]. Pardubice, 1995, 6.3.2013[cit. 2013-04-20]. Dostupné z: <http://www.sekk.cz/terminologie/index.htm>
23. RACEK, J. *Klinická biochemie*. Praha: Galén, 1999. ISBN 80-7184-971-5, ISBN 80-7261-023-1.
24. RASOCHOVÁ, J. *Fyziologie novorozenecké žloutenky*. Brno, 2010. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Fakulta lékařská, Katedra porodní asistence. Ved. pr. MUDr. Zuzana Nováková, Ph.D. Oponent doc. MUDr. Igor Crha, CSc.
25. ROCHE DIAGNOSTICS GmbH. *Návod k obsluze Cobas b 221 verze 8.0*. Mannheim, prosinec 2006. REF/No. 03261395001.
26. ROCHE DIAGNOSTICS. *Total Bilirubin Special: Speciální celkový bilirubin (BILTS)*. Mannheim, 2009. Dostupné z: <http://www.roche-diagnostics.cz/objednavky/info/03261638pi.pdf>
27. ROCHE DIAGNOSTICS GmbH. *Uživatelská příručka Integra 400 plus verze 2.4*. Mannheim, červenec 2006.
28. ROZTOČIL, A. et al. *Moderní porodnictví* . Praha: Grada, 2008, ISBN 978-80-247-1941-2.
29. STRAŇÁK, Z. Novorozenecký ikterus. *Postgraduální medicína-příloha: Vybrané kapitoly pro praktické lékaře pro děti a dorost*. Praha: Mladá fronta, 2007, roč. 13, č.2, s. 40-45. ISSN 1214-7664. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/novorozenecky-ikterus-308641>

30. SUCHÁNEK, M., B. FRIEDECKÝ, J. KRATOCHVÍLA, M. BUDINA a V. BARTOŠ. Doporučení pro určení odhadů nejistot výsledků měření/klinických testů v klinických laboratořích. In: *Česká společnost pro alergologii a klinickou imunologii* [online]. 1994, 13.7.2012 [cit. 2013-04-20]. Dostupné z: http://slicsaki.wz.cz/data/Doporuceni_odhadu_nejistot.pdf
31. ŠTILLOVÁ, L., K. MAŤAŠOVÁ, T. MIKITOVÁ, J. ŠTILLA, H. KOLAROVSKÁ a M. ZIBOLEN. Transkutánná bilirubinometria u nedonosených novorodencov. *Čes.-slov. Pediat.* 2008, roč. 63, č. 1, s. 3-8. ISSN 0069-2328.
32. THOMAS, L. *Clinical Laboratory Diagnostics: Use and Assessment of Clinical Laboratory Results*. 1st ed. Editor Lothar Thomas. Frankfurt am Main: TH-Books, c1998, s.192-201. ISBN 39-805-2154-0.
33. TRÁVNÍČKOVÁ, E. Fyziologie krve. TROJAN, S. et al. *Lékařská fyziologie*. 4. vyd. Praha: Grada, 2003, s. 111-156. ISBN 80-247-0512-5.
34. VÍTEK, L. *Bilirubin a interní nemoci: význam pro kliniku a praxi*. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2351-8.
35. VÍTEK, L., L. SEDLÁČKOVÁ, P. BRANNY a T. RUML. *Chemické listy* [online]. 2003, roč. 97, č. 1 [cit. 2013-04-20]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2003_01_03.pdf
36. VOKURKA, M. Poruchy metabolismu bilirubinu - ikterus. NEČAS, E. et al. *Patologická fyziologie orgánových systémů*. 2. vydání. Praha: Karolinum, 2009, s. 499-502. ISBN 978- 80-246-1712-1.
37. ZECCA, E., G. BARONE, D. DE LUCA, R. MARRA, E. TIBERI a C. ROMAGNOLI. Skin bilirubin measurement during phototherapy in preterm and term newborn infants. *Early Human Development* [online]. 2009, roč. 85, č. 8, s. 537-540 [cit. 2013-04-20]. ISSN 03783782. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378378209000899>
38. ZIMA ,T. *Laboratorní diagnostika*. Praha: Galén, 2002. ISBN 80-726-2201-3.

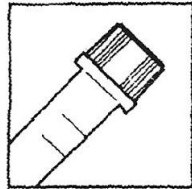
10 Přílohy



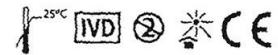
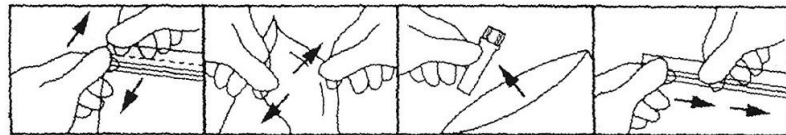
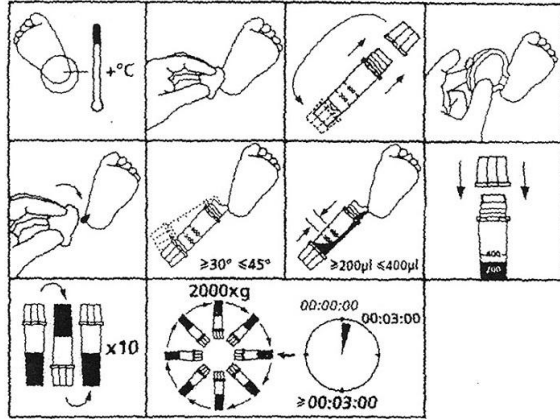
Příloha 1. Hodrův-Poláčkův graf

Zdroj: <http://www.medove.cz/DOWNLOAD/hyperbilirubinemie.pdf>

BD Microtainer®
LH Tubes

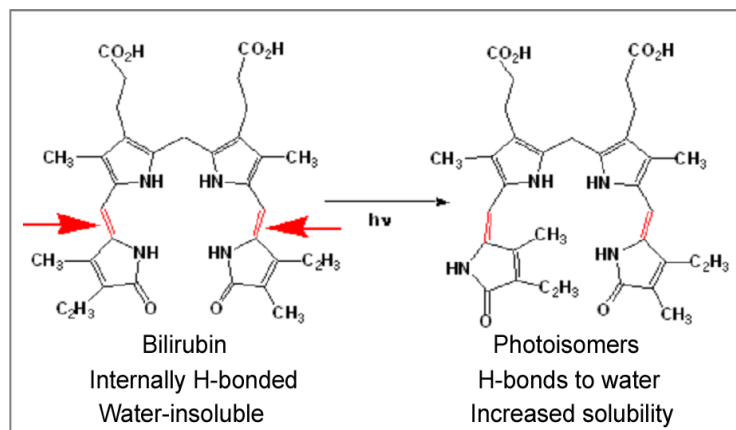


REF 365966



Příloha 2. Pokyny výrobce odběrového systému pro odběr krve u novorozence

Zdroj: <http://www.bd.com/vacutainer/>



Příloha 3. Izomery bilirubinu

Zdroj: <http://criglernajjar.altervista.org/Photopics.htm>



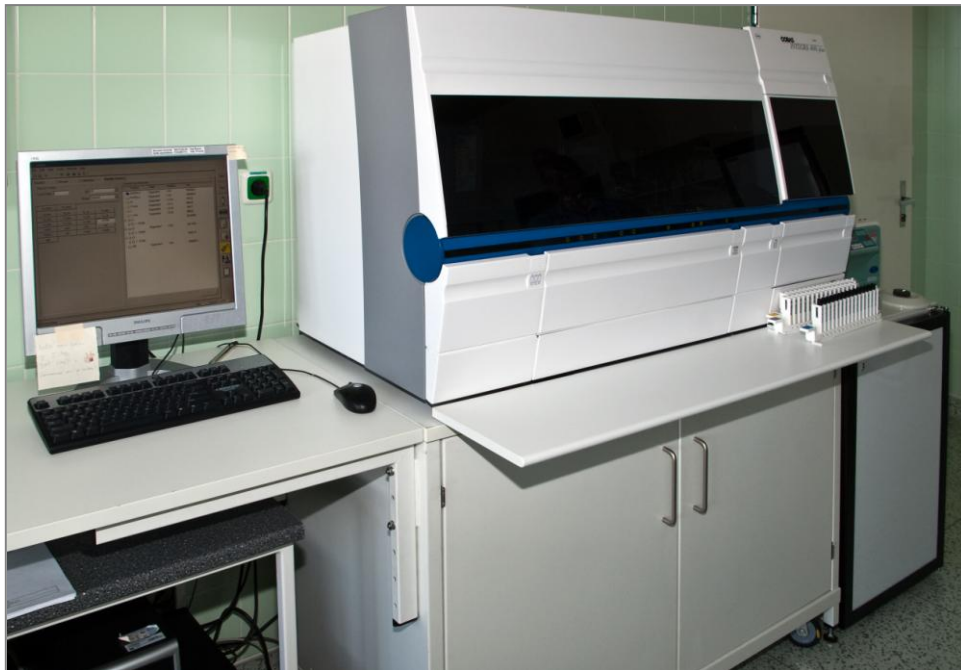
Příloha 4. Analyzátor krevních plynů Cobas b221

Zdroj: Vlastní foto



Příloha 5. Nasávání vzorku do analyzátoru Cobas b221

Zdroj: Vlastní foto



Příloha 6. Biochemický analyzátor INTEGRA 400 plus

Zdroj: Vlastní foto



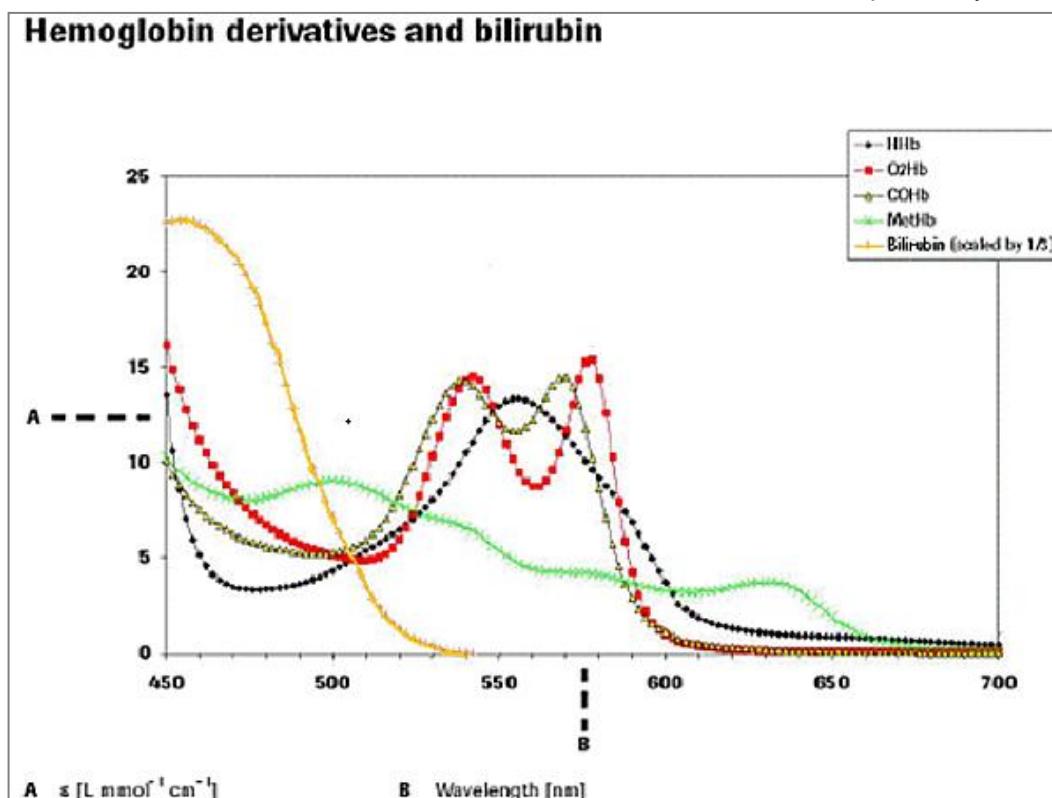
Příloha 7. Umístění reagenční kazety do analyzátoru

Zdroj: Vlastní foto



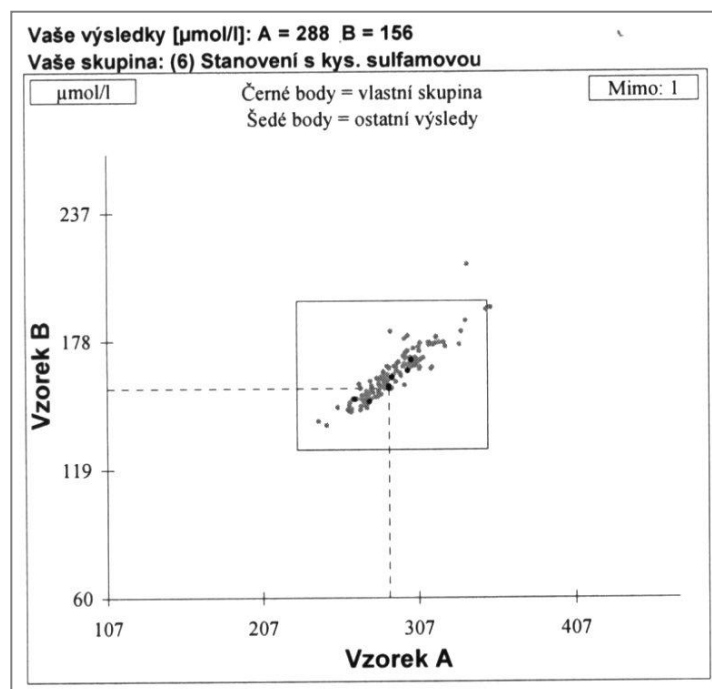
Příloha 8. Příprava vzorku před vložením do analyzátoru

Zdroj: Vlastní foto



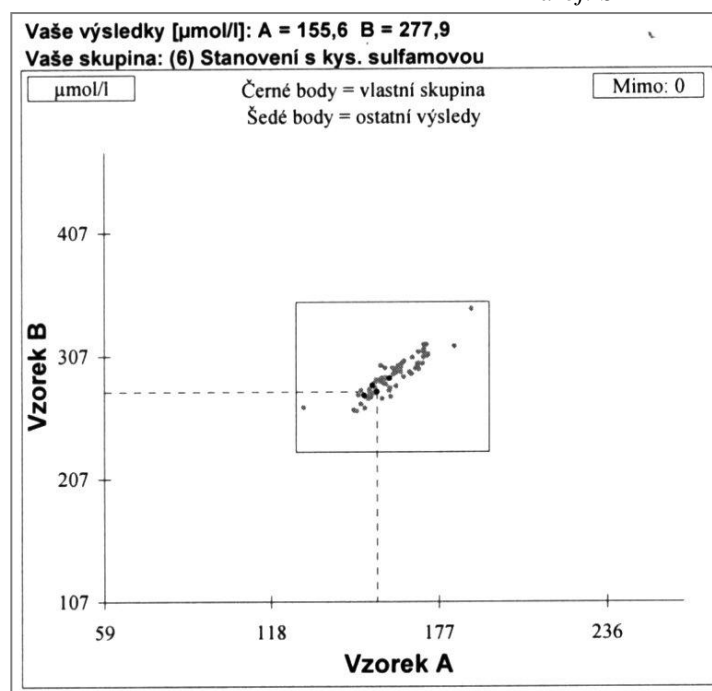
Příloha 9. Absorpční spektrum derivátů Hb a bilirubinu

Zdroj: Návod k obsluze Cobas b221 systém, s.A122



Příloha 10. EHK stanovení koncentrace bilirubinu novorozenců v séru - kontrolní cyklus BIL1/12

Zdroj: SEKK EHK



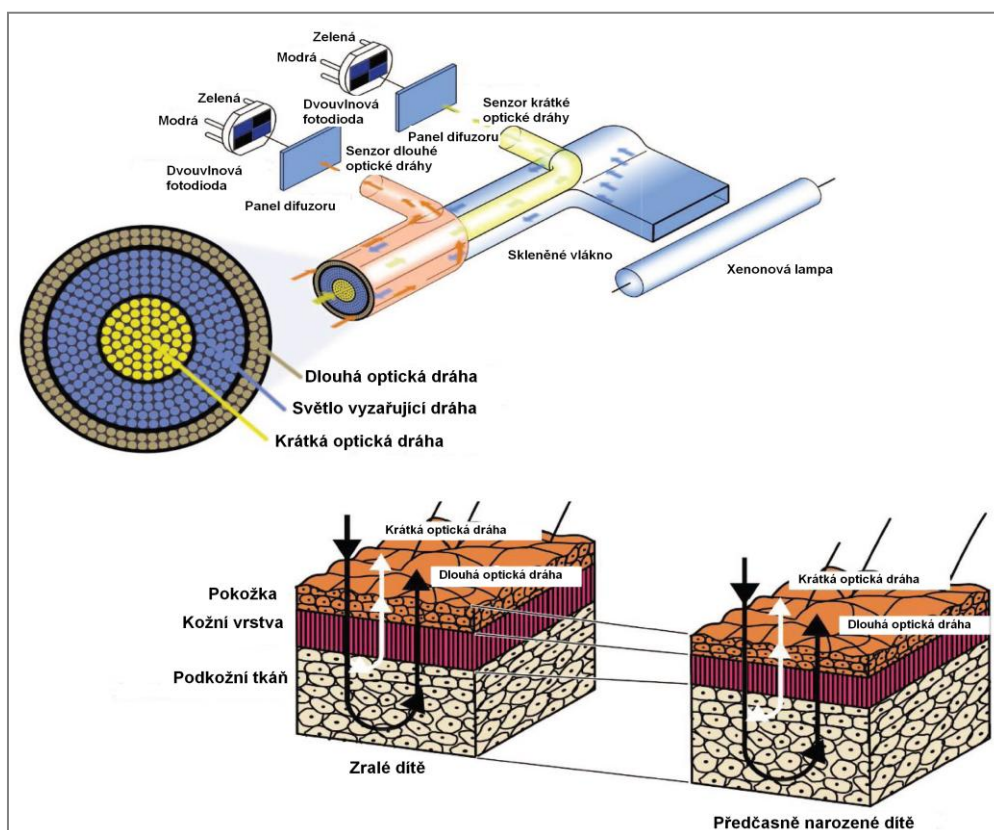
Příloha 11. EHK stanovení koncentrace bilirubinu novorozenců v séru - kontrolní cyklus BIL2/12

Zdroj: SEKK EHK



Příloha 12. Transkutánní bilirubinometr JM -103

Zdroj: Vlastní foto



Příloha 13. Princip měření JM-103

Zdroj:(EL-BESHBISHI et al. 2009, 4) s.1285, po úpravě

