



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Studies

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

Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích  
Zdravotně sociální fakulta  
Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

Návrh systému pro průběžné hodnocení kvality  
analytických vzorků v laboratoři klinické  
biochemie

Vypracoval: Kristýna Svatošová

Vedoucí práce: MUDr. Daniel Břešťan

České Budějovice 2014

## Abstrakt

Práce má za cíl podat přehled o v současnosti doporučovaném postupu při sledování analytické kvality vzorků v laboratoři klinické biochemie. Sérové indexy jsou měřeny automaticky při požadavku na jakékoliv vyšetření, jehož výsledek může být kvalitou vzorku ovlivněn. Na základě přímého fotometrického stanovení je vyhodnocována míra hemolýzy, ikterity a lipémie ve vzorcích pacientů. Protože hemolýza vzorku je ve většině případů způsobená nesprávnou technikou odběru krve, případně nešetrným transportem, lze v závěru tohoto procesu v pravidelných intervalech průběžně posuzovat míru ovlivnění výsledků preanalytickými vlivy v přímé souvislosti s konkrétními uživateli služeb laboratoře. V teoretické části práce jsou popsány možnosti snížení kvality séra in vivo, tedy faktory neovlivnitelné, které vznikají již v těle pacienta a in vitro, ke kterým dochází následkem nešetrného zacházení s materiálem. V teoretické části jsou také uvedeny principy nejčastěji používaných fotometrických metod a jejich ovlivnění kvalitou vzorku. Praktická část obsahuje modelový příklad ovlivnění jednotlivých analytů umělým přídatkem interferujících látek. Po vyhodnocení výsledků je patrné zvýšení koncentrací draslíku o 24%, železa o 10%, celkového bilirubinu o 13% a enzymatické aktivity ALT o 23%, AST o 179%, GMT 26% a aktivita ALP se snížila o 25% v hemolytickém séru. V ikterickém a lipemickém séru není interference početná v takové míře. Ikterita snižuje koncentrace urey o 17%, kreatininu o 27%, enzymatickou aktivitu ALT o 10% a zvyšuje aktivitu GMT o 11%. Chylozita snižuje koncentraci kreatininu o 8%, enzymatickou aktivitu ALT o 6% a o 21% zvyšuje koncentraci bilirubinu. V závěru práce je představen statistický výstup z laboratorního informačního systému, který umožňuje managementu laboratoře v případě potřeby vyhodnotit procentuální zastoupení vzorků s nevyhovující kvalitou celkově i u jednotlivých žadatelů a tím napomoci v plánování případných nápravných opatření.

## Abstract

The aim of my work is to provide information about the process of evaluating analytic quality of samples. This kind of process is recommended in clinic biochemistry laboratory at present. Serum indexes are measured always, in any required sample test whose result can be influenced by sample quality. It is possible to evaluate the degree of haemolysis, icterus and lipemia in patients' blood samples by the photometric method. The sample haemolysis is mostly caused by bad technic of blood samples taking or their inappropriate transport so that in the end of this process, in regular intervals there is a possibility to find out the level of results changes in connection with concrete laboratory services users. In theoretical part of my work I describe reasons of sample quality decreasing in vivo that's something people can't influence because they originate in a patient's body and in vitro that are caused by wasteful manipulation. In this part there are also principles of the photometrical methods mostly used. The practical part contains the model example that shows how the analyts can be influenced by artificial adding of interfering substances. I could see increasing of some element concentration after making evaluation: Concentration of K increased by 24%, Fe by 10%, bilirubin by 13% and enzymatic activity ALT by 23%, AST by 179%, GMT by 26% and ALP was reduced by 25% in haemolytic serum. In icteric and lipemic serum there isn't interference on such high level. Icterus causes decreasing of urea by 17%, creatinine by 27%, enzymatic activity ALT by 10% and activity GMT is increased by 11%. Lipemia decreases concentration of creatinine by 8%, enzymatic activity ALT by 6% and bilirubin is higher by 21%. In the end of my work I introduce statistic conclusion laboratory informatics system that gives laboratory management possibility to find out samples of bad quality in connection with concrete applicants and help to make some reparation.

## **Prohlášení**

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí 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 2.5.2014

.....

(jméno a příjmení)

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala především MUDr. Danielu Břešťanovi nejen za odborné vedení, ale také za vstřícnost a milé jednání. Dále velké díky patří celému kolektivu OKB v Rakovníku za trpělivost a ochotu po celou dobu mého studia a také Ing. Tomáši Morovjanovi za psychickou podporu především v posledních dnech před odevzdáním práce.

# Obsah

1	Seznam použitých zkratk	9
2	Úvod	11
3	Teoretická část	12
3.1	Preanalytické vlivy na laboratorní vyšetření	12
3.1.1	Mimolaboratorní část	12
3.1.1.1	Neovlivnitelné faktory preanalytických vlivů	12
3.1.1.2	Ovlivnitelné faktory preanalytických vlivů	14
3.1.1.3	Odběr materiálu	15
3.1.1.4	Transport materiálu	17
3.1.2	Laboratorní část	17
3.2	Zpracování krve	17
3.2.1	Plazma	17
3.2.2	Sérum	18
3.3	Uchovávání a skladování materiálu	18
3.4	Hemolýza	18
3.5	Ikterita	20
3.6	Chylozita	21
3.7	Vybrané analytické metody	23
3.7.1	Spektrofotometrie	23
3.7.2	Turbidimetrie	24
3.7.3	ISE	24
3.8	Principy měření jednotlivých analytů	25
3.8.1	Urea	25

3.8.2	Kreatinin.....	26
3.8.3	Kyselina močová.....	27
3.8.4	Na, K, Cl.....	28
3.8.5	Vápník.....	29
3.8.6	Železo.....	29
3.8.7	Bilirubin.....	30
3.8.8	ALT.....	31
3.8.9	AST.....	31
3.8.10	GMT.....	32
3.8.11	ALP.....	33
3.8.12	AMS.....	34
3.8.13	Cholesterol.....	35
3.8.14	Triglyceridy.....	35
3.8.15	Bílkoviny.....	36
3.8.16	Albumin.....	37
3.8.17	Sérové indexy.....	37
4	Praktická část.....	39
4.1	Měření interference způsobené hemolýzou.....	39
4.2	Měření interference způsobené ikteritou.....	41
4.3	Měření interference způsobené chylozitou.....	44
4.4	Statistické vyhodnocení počtu hemolytických vzorků.....	47
4.5	Diskuze.....	49
5	Závěr.....	51
6	Použitá literatura.....	52

7	Přílohy.....	56
---	--------------	----



# 1 Seznam použitých zkratk

ABR – acidobazická rovnováha

ALB - Albumin

ALP – alkalická fosfatáza

ALT - alaninaminotransferáza

AMS –  $\alpha$ -amyláza

AST - aspartátaminotransferáza

ECT – extracelulární tekutina

GMT – gama-glutamyltransferáza

hCG – lidský choriogonadotropin

HDL – high density lipoproteins

CHOL – cholesterol

ICT – intracelulární tekutina

IFCC - International Federation of Clinical Chemistry

ISE – iontově selektivní elektroda

KM – kyselina močová

LD – laktátdehydrogenáza

LDL – low-density lipoproteins

LIS – laboratorní informační systém OpenLIMS stapro

NADH – nikotinamidadeninukleotid (redukovaný)

NČLP – Národní číselník laboratorních položek

OKL – Oddělení klinických laboratoří Nemocnice v Rakovníku

PED – podmínkový export dat

PROT – celková bílkovina

SI – sérové indexy (hemoláza, ikterity, chylozita)

TG – triacylglyceroly (triglyceridy)

VLDL – very low-density lipoproteins

## 2 Úvod

Vybrané téma je aktuální především pro využití v managementu laboratoře pro nastavení nápravných opatření, vedoucích ke zkvalitnění analýzy biochemických vzorků. Řešení tohoto tématu je potřebné nejen pro získání akreditace laboratoře, ale také pro snížení počtu vzorků, ovlivněných především hemolýzou. Cílem práce je podat přehled o v současnosti doporučovaném postupu při sledování analytické kvality vzorků v laboratoři klinické biochemie. V teoretické části jsou uvedeny principy nejčastěji používaných fotometrických metod a jejich ovlivnění kvalitou vzorku. Praktická část obsahuje modelový příklad ovlivnění jednotlivých analytů umělým přídavkem interferujících látek. V závěru práce je představen statistický výstup z laboratorního informačního systému, který umožňuje managementu laboratoře v případě potřeby vyhodnotit procentuální zastoupení vzorků s nevyhovující kvalitou celkově i u jednotlivých žadatelů a tím napomoci v plánování případných nápravných opatření.

## 3 Teoretická část

### 3.1 Preanalytické vlivy na laboratorní vyšetření

Celý proces od vzniku požadavku na laboratorní vyšetření až po vydání výsledku se dělí na několik částí. První je část preanalytická, která má stejně důležitou roli jako vlastní analýza vzorku (analytická část) a postanalytická část. Preanalytická část se dále rozděluje na mimolaboratorní a laboratorní. (Dastych, Breinek et al., 2008, s19)

K ovlivnění výsledku může dojít ve všech třech fázích vyšetření. Ve fázi preanalytické je nejvyšší pravděpodobnost ovlivnění výsledku. Menší riziko představuje fáze analytická, protože je pracovní postup analýzy řízen zásadami správné laboratorní práce (SLP) a systémem kontroly kvality. Rizika v postanalytické fázi představuje zejména chyba při přenosu či prepisu dat, tisku nebo přeslechnutí při telefonickém hlášení. (Racek et al., 1999, s23)

#### 3.1.1 Mimolaboratorní část

Do této části řadíme vlivy při přípravě pacienta před odběrem, odběr vzorku a transport materiálu do laboratoře. (Racek et al., 1999, s23)

##### 3.1.1.1 Neovlivnitelné faktory preanalytických vlivů

Při analýze požadovaného vyšetření je důležité počítat s faktory, které mohou zapříčinit chybu měření, ale pacient je neovlivní, tzv. neovlivnitelné chyby. Mezi takové faktory patří pohlaví, rasa, věk, cyklické změny a gravidita. (Pruša, Čepová, Petrtýlová, 2002, s16-17)

##### 3.1.1.1.1 Pohlaví

Některé z mála metod mají jiné referenční rozmezí u mužů a u žen. To může být např. v závislosti na množství svalové hmoty. Tyto odchylky je nutné znát pro správné hodnocení výsledku. (Racek et al., 1999, s24)

### 3.1.1.1.2 *Rasa*

U rasové rozdílnosti je známá odlišná frekvence výskytu některých onemocnění nebo dědičných poruch metabolismu. Nemusí jít však vždy o rasovou odlišnost, ale postačí jen různorodost sociálních skupin, liší se především stravovacími návyky. (Racek et al., 1999, s24)

Většina rozdílů je mezi bílou a černou rasou. U Černochoů je nižší hladina sérového albuminu a vyšší např. celková bílkovina, aktivita kreatinkinázy a laktátdehydrogenázy. Oproti bělochům mají vyšší glukózovou toleranci polynézané, eskymáci a černoši. (Schneiderka et al. 2000, s12)

### 3.1.1.1.3 *Věk*

Největší rozdíly referenčních hodnot jsou u novorozenců, především se jedná o bilirubin a hemoglobin. U dětí jsou zcela jiné referenční rozmezí hodnot alkalické fosfatázy, kreatininu, který je nižší s porovnáním u dospělých a s rostoucím věkem se zvyšuje hladina cholesterolu. Rozdílné hodnoty také mohou být u žen před a po menopauze, např. kyselina močová. (Schneiderka et al., 2000, s 12)

### 3.1.1.1.4 *Cyklické změny*

Je známo, že v lidském těle probíhají určité cyklické rytmy. Co se týče laboratorního vyšetření, je nejvíce prozkoumaný rytmus cirkadiánní (denní). Příčinou rozdílu některých hodnot během dne je spánek v noci, aktivita ve dne, stres, světlo, tma, poloha organismu, atd. Nejvýznamnější je cirkadiánní rytmus kortizolu, který dosahuje maximální hodnoty v ranních hodinách a večer klesá, odchylka může být až 250%. Dalšími analyty s cirkadiánními změnami jsou železo, celkové lipidy, močovina, AST, ALT.

Neznáme jen cykly cirkadiánní, ale také měsíční. Například u žen má vliv měsíční menstruační cyklus především na vyšetření hormonů, cholesterolu a železa. (Schneiderka et al., 2000, s12; Zima et al., 2008, s4)

#### *3.1.1.1.5 Gravidita*

Během těhotenství probíhá řada změn. Mohou se v krvi i v moči objevit bílkoviny i jiné látky produkované trofoblastem nebo orgány plodu. Mezi tyto látky patří např. placentární ALP,  $\alpha_1$ -fetoprotein, hCG a estrogeny. U těhotných je patrné zvýšení glomerulární filtrace, které způsobuje pokles koncentrace kreatininu a urey v séru. (Racek et al., 1999, s25)

#### *3.1.1.2 Ovlivnitelné faktory preanalytických vlivů*

Předchozí odstavce byly věnovány neovlivnitelným faktorům preanalytické fáze, které pacient nemá možnost nikterak ovlivnit a musí se s nimi počítat během samotné analýzy. Další faktory jsou ovlivnitelné a mohou být eliminovány poučením pacienta. Na odběr krve se pacient dostaví po patřičném lačnění a tělesném klidu. (Racek et al. 1999, s25)

##### *3.1.1.2.1 Fyzická aktivita*

Nadměrná fyzická aktivita vede k hemokoncentraci v důsledku přesunu tekutiny, v séru stoupá hladina celkové bílkoviny a látek vázaných na bílkovinu. Dochází také k metabolickým změnám, kdy klesá koncentrace TG, stoupá HDL-cholesterol a volné mastné kyseliny. Hladina cukru nejprve stoupne a po vyčerpání glykogenových zásob dochází ke ketonurii. V neposlední řadě dochází při fyzické zátěži k uvolňování svalových bílkovin (CK, AST, LD, myoglobin) do krevního oběhu, kde jeho koncentrace stoupá. (Racek et al., 1999, s25-26)

##### *3.1.1.2.2 Potrava a tekutiny*

Velký vliv má také potrava a přijaté tekutiny. Není-li pacient nalačno, může ovlivnit celou řadu měření, např. koncentraci glykémie, urey, kyseliny močové, triacylglycerolů. Zvýšená hladina triacylglycerolů v séru způsobuje chylozitu séra, která ovlivňuje i řadu dalších měřených hodnot v analytické fázi. Pokud pacient před odběrem žízí, vykazují hodnoty známky hemokoncentrace (vzestup hemoglobinu, celkové bílkoviny). (Racek et al., 1999, s26)

#### *3.1.1.2.3 Léky a drogy*

Podávané léky mohou mít vliv na biologické procesy již v těle. Některé léky zvyšují aktivitu hormonů nebo ji naopak inhibují. Jiné léky zase mohou působit cytotoxicky. Interferenci mohou léky způsobit i in vitro, proto je dobré psát do průvodního listu poznámku o podaných lécích pacientovi před odběrem. Pomohou způsobit zkříženou reaktivitu při imunochemických reakcích. (Zima et al., 2008, s5)

#### *3.1.1.2.4 Stres*

Při stresu se zvyšuje koncentrace celé řady hormonů, např. aldosteron, kortizol nebo glukagon. Stresovou situací je i probuzení, proto se vyšetření koncentrace prolaktinu provádí až po třech hodinách po probuzení. Při mírném stresu může dojít i ke zvýšení cholesterolu. (Jabor, Zámečník, 2005, s11)

#### *3.1.1.3 Odběr materiálu*

Při odběru krve musíme dbát na správnou identifikaci pacienta. Ověření totožnosti by mělo probíhat alespoň dvěma způsoby. Dalším krokem je důkladné značení odběrových zkumavek s průvodním listem. Způsob odběru musí být přizpůsobený druhu požadovaného vyšetření (poloha pacienta při odběru, čas odběru, zkumavky s vyhovujícími činidly, atd.). (Zima et al., 2008, s5)

Provádíme tři druhy odběru krve. Arteriální je méně častá, využívaná především pro měření acidobazické rovnováhy. Nejčastěji se odebírá krev venózní a kapilární se odebírá hlavně u novorozenců, kojenců a malých dětí. (Zima et al., 2008, s5)

##### *3.1.1.3.1 Odběr venózní krve*

Důležitá je poloha pacienta během odběru a nějaký čas před ním. Jsou prokazatelné rozdíly některých analytů v-leže a ve vzpřímené poloze v důsledku přesunu tekutiny do intersticia. Standardní poloha pacienta při odběru je v sedě. (Zima, 2002, s3). Krev se odebírá z loketní jamky, paže by měla být natažená a bez zjevných hematomů nebo jizev. U žen po mastektomii by se neměla odebírat krev ze strany, na které byl proveden zákrok. (Zima et al., 2008, s5; Jabor, Zámečník, 2005, s11)

Při použití turniketu, ke stažení paže, dochází ke změnám již po jedné minutě, kdy dochází k přesunu tekutiny, iontů a proteinů do intersticia. Po třech minutách stoupne koncentrace proteinů o 5 až 8%. Pokud je použití turniketu nevyhnutelné, neměla by doba stažení přesáhnout 15 sekund. (Jabor, Zámečník, 2005, s12)

#### *3.1.1.3.2 Odběr kapilární krve*

Při odběru kapilární krve by měla být ruka dostatečně prohřátá. Při prochlazení končetiny dochází v důsledku hypoxie ke zvýšení koncentrace laktátu a snížení pH. (Jabor, Zámečník, 2005, s27). K významnému ovlivnění při odběru kapilární krve dochází při kontaktu s dezinfekčním prostředkem. Pokud dezinfekce úplně neuschne před odběrem, způsobí hemolýzu krvinek. Dále pak může dojít k naředění vzorku tkáňovým mokem při „vymačkávání“ krve z prstu. (Racek at al., 1999, s 27; Guder et al., 2003, s23)

#### *3.1.1.3.3 Odběr z katétru*

Všeobecně se odběry z katétru nedoporučují. Nesmí se odběr provést ani ze stejné strany, kde je zavedená infuze. Vzorek se může zkontaminovat naředěním podanou infuzí. (Jabor, Zámečník, 2005, s12)

#### *3.1.1.3.4 Odběrové zkumavky*

Každé laboratorní vyšetření má určité požadavky na typ zkumavky. V dnešní době je mnoho druhů zkumavek (s gelem, bez gelu, s protisrážlivými činidly, se stabilizátory, atd.) a proto je důležitá správná volba zkumavky. Pokud se vyšetřuje plazma, je nutné dodržet správný poměr krve a protisrážlivého činidla. Volba nesprávného činidla může způsobit řadu interferencí, např. při stanovení glukózy musí být při odběru použito konzervační činidlo, jinak koncentrace glukózy prudce klesá. (Schneiderka et al., 2000, s10-11). Jako konzervační činidlo pro glukózu se používá fluorid sodný, který inhibuje glykolýzu a hladina cukru v krvi zůstane stabilní až 24 hodin. (Racek et al., 1999, s29). U draslíku dojde k falešnému vzestupu koncentrace při odběru do zkumavky s K<sub>2</sub>EDTA, toto protisrážlivé činidlo se používá běžně pro stanovení hodnot krevního obrazu. (Schneiderka et al., 2000, s10-11; Guder et al., 2003, s 32-34). Každý analyt je zapsaný v Národním číselníku laboratorních položek (NČLP), kde jsou veškeré



informace o preanalytických požadavcích při odběru, transportu a skladování. (Jabor, Zámečník, 2005, s8)

#### *3.1.1.4 Transport materiálu*

Při transportu materiálu se musí monitorovat teplota a doba přepravy. Musí se zamezit nepříznivému vlivu vysoké teploty (inaktivace enzymů) nebo zmrznutí, kdy dochází k hemolýze vzorku krve. Důležitá je i doba transportu nejen pro včasnou odezvu laboratoře, ale také proto, že každý analyt má stanovenou stabilitu. U vzorků označených jako statim, se musí dodržet lhůta 60 minut, touto dobou se rozumí čas, kdy je k dispozici výsledek laboratorního vyšetření. (Dastych, Breinek et al., 2008, s20; Racek et al., 1999, s29; Zima, 2002, s7).

#### **3.1.2 Laboratorní část**

První částí laboratorní procesu je příjem a identifikace materiálu. Na krvi musí být vyznačeno jméno pacienta a rodné číslo, které se musí shodovat s údaji na žádance. Na průvodním listu jsou dále zapsány informace o pojišťovně, diagnóze, ošetřujícím lékařem s podpisem a razítkem oddělení, které požaduje vyšetření, seznam požadovaných vyšetření a v poslední řadě datum, čas odběru a jméno odběrového pracovníka. Musí také souhlasit druh odběrové zkumavky s požadavkem na vyšetření. Dále se všechny informace ze žádanky zapisují do LIS a vzorek krve se zpracovává podle požadovaného vyšetření. (Dastych, Breinek et al., 2008, s21)

### **3.2 Zpracování krve**

V laboratořích se používají tři typy zpracování krve. Pro většinu hematologických metod se používá plná krev nesrážlivá s přidaným antikoagulačním činidlem.

V biochemii se zase nejčastěji používá plazma nebo sérum. (Trenčanská, 2009, s9)

#### **3.2.1 Plazma**

Plazma se získává z nesrážlivé krve pomocí centrifugace. Vhodná centrifugace je při 1000 – 1500g (násobek gravitačního zrychlení) po dobu 10 minut při 20 – 25°C.

Plazma obsahuje fibrinogen a koagulační faktory, protože se zabránilo srážení krve. (Jabor, Zámečník, 2005, s13; Ledvina, Stoklasová, Cerman, b2004, s 243)

### **3.2.2 Sérum**

Sérum se zpracovává z krve srážlivé, proto také neobsahuje fibrinogen a koagulační faktory. Do krve se přidává aktivátor srážení, aby nedošlo k tvorbě pozdního fibrinu v separovaném séru. Je důležité dbát na správný poměr činidla a krve. Při srážení krve se do séra uvolňuje z trombocytů draselný kationt, takže je hodnota v séru o 0,2 až 0,3 mmol/l vyšší než v plazmě. Centrifugace se provádí při 1000 – 1500g po dobu 10 minut. Přesto se sérum v biochemii využívá častěji než plazma. (Jabor, Zámečník, 2005, s12-13; Ledvina, Stoklasová, Cerman, b2004, s 243)

### **3.3 Uchovávání a skladování materiálu**

Uchovávání materiálu před samotným měřením ovlivňuje stabilitu analytu ve vzorku. Včasné oddělení séra nebo plazmy od krvinek je velmi důležité hlavně při stanovení glukózy a draselných iontů. (Racek at al., 1999, s29). Po stočení séra má většina analytů stabilitu při 4°C 24 hodin až týden. Pro delší skladování vzorku se udržuje teplota na -20°C, popř. až -80°C. Při skladování vzorku je nutné zamezit přístupu světla, mikrobiální kontaminaci a hlavně musí být vzorek pevně uzavřen, aby nedošlo k zahuštění vzorku odpařením. (Zima et al., 2008, s7)

### **3.4 Hemolýza**

Hemolýza je nejčastější příčinou ovlivnění analytické části vyšetření. Pojem hemolýza představuje narušení membrány erytrocytu s následným uvolněním hemoglobinu a dalších extracelulárních látek do plazmy. Hemolýza může nastat in vivo nebo in vitro. Míra ovlivnění závisí na stupni hemolýzy. (Kroll, Elin, 1994, s1996)

### **3.4.1 Hemolýza in vivo**

Tento druh hemolýzy nastává již v těle pacienta, proto je nemožné ji odstranit opakovaným odběrem. Příčinou je snížení odolnosti membrány erytrocytů. To způsobují život ohrožující stavy. Mezi takové onemocnění patří např. hemolytické anémie, metabolické poruchy (onemocnění jater) nebo rozsáhlé popáleniny. (Jindrová, Kajabová, Calábková, 2012, s137)

### **3.4.2 Hemolýza in vitro**

K extravaskulární hemolýze dochází při odběru, nešetrném transportu, při manipulaci se vzorkem v laboratoři nebo nesprávným uchováváním vzorku. Hemolýzu in vitro rodělujeme podle příčin vzniku. (Jindrová, Kajabová, Calábková, 2012, s137)

#### *3.4.2.1 Mechanická*

Během odběru dochází k hemolýze při rychlém nasávání krve úzkou jehlou a násilným vstřikováním krve jehlou do zkumavky. Dále může dojít k hemolýze při silném třepání krví, centrifugací při vysokých otáčkách nebo dlouhém stání krve před oddělením séra. (Jindrová, Kajabová, Calábková, 2012, s138; Hrušková, 2010, s18)

#### *3.4.2.2 Osmotická*

K osmotické lýze může dojít při použití mokré zkumavky nebo nesprávného poměru protisrážlivého činidla a krve. (Trenčanská, 2009, s13)

#### *3.4.2.3 Tepelná*

Vzniká, pokud je krev vystavena příliš vysokým teplotám nebo mrazu. (Racek et al., 1999, s30)

#### *3.4.2.4 Chemická*

K rozrušení erytrocytu dochází především při odběru, kdy nedojde k úplnému zaschnutí dezinfekce na kůži. Další možnou kontaminací může být sekundární zkumavka, kde zůstaly zbytky saponátu nebo dezinfekce na skle. K tomu ale již téměř nedochází, protože se používají k přelévání krve jednorázové sterilní zkumavky. (Jindrová, Kajabová, Calábková, 2012, s138)

### 3.4.3 Příčiny interference

Při ovlivnění kvality séra hemolýzou se uplatňují tři druhy mechanismů.

První je uvolnění intracelulárních látek do séra. Koncentrace některých látek je daleko vyšší v intracelulární tekutině než v extracelulární, v důsledku prasknutí erytrocytu dojde ke zvýšení koncentrace těchto analytů. Jedná se především o LD, AST, ALT, hořčíku, fosforu a draslíku. Nebo naopak může dojít k naředění séra intracelulární tekutinou a koncentrace analytů klesne (glukóza, bilirubin, ALP, sodík, chloridy). (Beňovská, Dastych, Čermáková, Tůmová, 2010, s144; Lippi, Salvagno, Montagnana, Brocco, Guidi, 2006, s311-316)

Druhým způsobem je ovlivnění chemické reakce při stanovení analytu. Například hemoglobin působí jako pufr, změní pH činidla a ovlivní tak průběh reakce. V tomto případě ovlivní především ALP a albumin, kdy se hodnoty sníží. (Racek et al., 1999, s30)

Třetím mechanismem je vliv hemoglobinu na spektrofotometrická měření. Červená barva hemoglobinu zvyšuje naměřenou absorbanci a tím dojde ke změně koncentrace. (Beňovská, Dastych, Čermáková, Tůmová, 2010, s144)

### 3.5 Ikterita

Ikterickým sérem nazýváme sérum s hyperbilirubinémií, tzn. sérum s hodnotou bilirubinu nad referenčním rozmezím. Ikterické sérum může ovlivňovat analytické metody svým žlutým zbarvením. (Dastych, Breinek et al., 2008, s49; Čermáková, Štěpánová, 2003, s20)

Hyperbilirubinémie může být způsobena zvýšenou produkcí bilirubinu nebo selháním poškozených jater, kdy je produkce v normálu, ale játra nejsou schopna bilirubin vyloučit. (Roche Diagnostics, 2010, BILTS, s1; Murray, 1998, s363)

### **3.5.1 Nekonjugovaný bilirubin**

Nekonjugovaný bilirubin se nachází v plazmě vázaný na protein, albumin. Přebytek bilirubinu, který se nenaváže na albumin, zůstává volně v plazmě a snadno difunduje do tkání. Nekonjugovaný bilirubin je málo rozpustný ve vodě. Zvýšení nekonjugovaného bilirubinu může vzniknout při rozsáhlých hemolytických procesech, kdy je poškozena přeměna bilirubinu, získaná defektem nebo vrozenou vadou. (Murray, 1998, s 362-366)

### **3.5.2 Konjugovaný bilirubin**

V játrech se přeměňuje nekonjugovaný bilirubin na konjugovaný přidáním polární skupiny. Konjugovaný bilirubin je dobře rozpustný ve vodě. Nejčastější příčinou konjugované hyperbilirubinémie je defekt jaterní sekrece do žluče nebo obstrukce žlučových cest. (Murray, 1998, s362-367)

### **3.5.3 Smíšené hyperbilirubinémie**

Vznikají poškozením hepatocytů (jaterních buněk). V důsledku toho dochází k poruše vychytávání nekonjugovaného bilirubinu a konjugace. Zároveň dochází k poruše vylučování konjugovaného bilirubinu do žluče. V séru dochází k vzestupu konjugovaného i nekonjugovaného bilirubinu. (Racek et al., 1999, s 208-209)

### **3.5.4 Příčiny interference**

Bilirubin způsobuje žluté zbarvení séra, které ovlivňuje fotometrické metody. Je příčinou zvýšení absorpance v oblasti vlnových délek 400-500 nm. Ovlivňuje například výsledek kreatininu v séru, který je měřený Jaffého metodou bez deproteinizace nebo enzymatickými metodami, kde vzniká chinon iminový chromogen, který se měří spektrofotometricky. Díky této enzymatické reakci může bilirubin ovlivnit také stanovení cholesterolu a triacylglycerolů. (Dastyh, Breinek et al., 2008, s 49; Trenčanská, 2009, s 19-20)

## **3.6 Chylozita**

Chylozita je mléčné zakalení séra, které je způsobeno vysokou hodnotou triacylglycerolů v lipoproteinových částicích, především v chylomikronech a VLDL.

Viditelný zákal vzniká zhruba při koncentraci triacylglycerolů 4,5 mmol/l. (Dastych, Breinek et al., 2008, s 49-50; Guder et al., 2003, s76-77)

### **3.6.1 Lipidy**

Lipidy mají jednu společnou vlastnost – nerozpustnost ve vodě. Proto se váží na bílkoviny a společně tvoří s vodou mísitelné lipoproteiny. Mají kulovitý vzhled a skládají se z triacylglycerolů a esterů cholesterolu. Úkolem lipoproteinů je transport těchto látek. (Klouda, 2000, s57)

Triacylglyceroly jsou syntetizované nebo uvolněné z tukových zásob. Jejich syntéza probíhá nejvíce v tukové tkáni a v játrech. V těle jsou ukládány pro jejich vysoký energetický obsah.

Cholesterol patří do skupiny steroidních látek. Je základním steroidem, ze kterého pocházejí všechny další látky této povahy. Pokud je v těle v nadbytečném množství, může způsobit srdeční onemocnění. Syntéza cholesterolu probíhá nejvíce v játrech. (Ledvina, Stoklasová, Cerman, a2004, s155, 172, 182; Klouda, 2000, s56 )

#### *3.6.1.1 Chylomikrony*

Chylomikrony jsou největší z lipoproteinů. Jejich úkolem je transport triacylglycerolů a esterů cholesterolu z trávicího traktu do tkání. Mají nejnižší hustotu a vzhledem k obsahu bílkovin se v běžné elektroforéze téměř nepohybují. Jejich obsahem jsou z velké části triacylglyceroly a malé procento cholesterolu (Ledvina, Stoklasová, Cerman, a2004, s197; Klouda, 2000, s56)

#### *3.6.1.2 VLDL*

VLDL (lipoproteiny s velmi nízkou hustotou) transportují triacylglyceroly a cholesterol z jater do tkání. Mají větší hustotu než chylomikrony a v elektroforéze odpovídají frakci prebeta-lipoproteinů. (Ledvina, Stoklasová, Cerman, a2004, s 197; Schneiderka et al., 2000, s136-137)

### 3.6.1.3 LDL

LDL, neboli lipoproteiny o nízké hustotě odpovídají v elektroforéze frakci beta-lipoproteinů. Obsahuje především cholesterol. Transportují triacylglyceroly a cholesterol z jater do tkání. (Schneiderka et al., 2000, s136-137, Klouda, 2000, s56)

### 3.6.1.4 HDL

Lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL) se pohybují nejrychleji, odpovídají frakci alfa-lipoproteinů. Jejich úkolem je přenos cholesterolu z tkání do jater. (Klouda, 2000, s56)

## 3.6.2 Příčiny interference

Zásadní vliv má chylozita na měření absorbance. Tukové částice odrážejí světlo a tím se zvýší absorbance blanku. S mírou chylozity se snižuje citlivost metody. Další metodou, která je velmi ovlivněna chylozitou je turbidimetrie a nefelometrie, kde se měří průchod nebo rozptýlení světla. (Tobiášková, 2013, s29-31; Kroll, Ronald, 1994, s1998)

## 3.7 Vybrané analytické metody

V následující kapitole popisují jen vybrané principy metod, pomocí kterých se měří jednotlivé analyty v praktické části bakalářské práce.

### 3.7.1 Spektrofotometrie

V klinické biochemii se absorpční spektrofotometrie využívá velmi často pro měření mnoha látek. Existuje totiž vztah mezi množstvím světla, které prochází květou, koncentrací absorbující látky a délkou absorpčního prostředí. Tento vztah popisuje Lambert-Beerův zákon (L-B zákon).

Podle L-B zákona klesá intenzita světelného záření, které prochází absorbujícím prostředím exponenciálně v závislosti na délce vrstvy a koncentraci absorbující látky.

Základem pro využití L-B zákona v praxi je sestavení kalibrační křivky. K vytvoření kalibrační křivky využijeme obvykle pěti standardů se vzrůstající

koncentrací měřené látky, změříme u každého absorbanci při určité vlnové délce a hodnoty vyneseme do grafu. Na osu x se značí koncentrace standardů a osu y hodnoty absorbance. Proložení bodů v grafu, pokud je metoda lineární, získáme přímkou. Z té lze následně zjistit koncentrace vzorku podle naměřené absorbance. Při opakovaném měření vzorků je možné použít jen jednoho standardu a koncentraci vzorku vypočítat podle vztahu:

$$c_{vz} = \frac{A_{vz}}{A_{st}} \times c_{st}$$

$c_{vz}$  = koncentrace vzorku,  $c_{st}$  = koncentrace standardu,  $A_{vz}$  = absorbance vzorku,  $A_{st}$  = absorbance standardu (Dastych, 2007, s21-23)

Pro měření změn Absorbance se využívají tři metody. První je metoda End-point jednobodová, kdy se měří absorbance až na konci reakce, po přidání všech činidel a pufrů. Druhá metoda je End-point dvoubodová, kdy se měří absorbance v ustáleném stavu po přidání první reagentie a na konci reakce po přidání druhé reagentie. Třetí metodou je stanovení kinetické, kde se měří změna absorbance za časovou jednotku. Během reakce dochází poklesu nebo nárůstu absorbance. (Dastych, Breinek et al., 2008, s29-30)

### 3.7.2 Turbidimetrie

Pokud zdroj světla prochází prostředím s velkými částicemi (bílkoviny) je na nich světlo rozptýleno. Světlo dopadající má stejné vlastnosti jako světlo rozptýlené. Směr rozptylu světla je závislé na velikosti částic ve vzorku. U velkých molekul převažuje rozptyl ve směru dopadajícího záření. U turbidimetrie se měří rozptýlené světlo ve směru dopadajícího. (Dastych, 2007, s33)

### 3.7.3 ISE

Metoda iontově selektivní elektrody (ISE) využívá měření rozdílu elektrického potenciálu mezi dvěma elektrodami při nulovém elektrickém proudu. Jedna elektroda je referenční (nejčastěji kalomelová) a druhá je měrná, která má na měřící membráně málo rozpustnou sůl sledovaného prvku. Při ponoření elektrod do měřeného vzorku dojde



k selektivnímu přechodu měřených iontů do membrány ISE, což způsobí změnu elektrického potenciálu. Změna potenciálu se měří na milivoltmetru a pomocí Nernstovy rovnice se vypočítá aktivita iontu. (Čermáková, Štěpánová, 2003, s93; Roche, 2004, sI-5)

### **3.8 Principy měření jednotlivých analytů**

#### **3.8.1 Urea**

Urea (močovina) je hlavní koncový produkt metabolismu bílkovinného dusíku. Je syntetizována z amoniaku v játrech. Z velké části se močovina vylučuje močí a z malé části i potem. Z části může pronikat i do střev, kde je degradována střevními bakteriemi. Vyšetření urey se běžně provádí pro zjištění funkce ledvin.

Zvýšená hladina močoviny nastává při normálním příjmu bílkovin se souběžným snížením glomerulární filtrace o 50%, při nedostatečném prokrvení ledvin (šok, srdeční nedostatečnost, dehydratace), pokud brání odtoku moče např. močové kameny, nádor nebo při zvýšení příjmu bílkovin. (Doležalová et al., 1995, s102-103)

##### *3.8.1.1 Referenční meze*

Referenční hodnoty v séru a plazmě:

Dospělí: 2,76 – 8,07 mmol/l (Roche, 2010, UREAL s2-3)

##### *3.8.1.2 Princip testu*

Ke stanovení koncentrace se využívá kinetická fotometrie. Močovina je hydrolyzována za katalytického působení ureázy na dvě molekuly amoniaku a uhličitán. V další reakci amoniak reaguje s 2-oxoglutarátem za přítomnosti glutamátdehydrogenázy a koenzymu NADH za vzniku L-glutamátu, NAD<sup>+</sup> a vody. Rychlost poklesu koncentrace NADH je přímo úměrná koncentraci urey ve vzorku. Měření absorbance probíhá při 340 nm. (Tiffany, Jansen, Burtis, Overton, Scott, 1972, s835-838)

### 3.8.1.3 *Interference*

U metody nejsou prokázány žádné významné interference sérovými indexy. Hemolýza a chylozita mohou způsobit mírné kolísání absorbance. (Roche, 2010, UREAL, s3)

## 3.8.2 **Kreatinin**

Kreatinin vzniká z kreatinu, který je syntetizován z argininu a glycinu v játrech. Transportuje se do kosterních svalů, kde slouží ve formě kreatinfosfátu jako rychlá zásoba energie a do svalů myokardu. Převážně se kreatinin vyskytuje ve svalech, a proto jsou jeho hodnoty závislé na množství svalové hmoty (muži mají vyšší hodnoty než ženy). Kreatinin je bezprahově vylučován močí, využívá se proto k vyšetřování funkce ledvin. (Čermáková, Štěpánová, 2003, s70)

### 3.8.2.1 *Referenční meze*

0-6 týdnů: 12 – 48  $\mu\text{mol/l}$

6 týdnů – 1 rok: 21 – 55  $\mu\text{mol/l}$

1-15 let: 27 – 88  $\mu\text{mol/l}$

15-60 let: muži: 44 – 115  $\mu\text{mol/l}$ , ženy: 44 – 97  $\mu\text{mol/l}$

60-90 let: muži: 71-115  $\mu\text{mol/l}$ , ženy: 53 – 106  $\mu\text{mol/l}$

nad 90 let: muži: 88 – 150  $\mu\text{mol/l}$ , ženy: 53 – 115  $\mu\text{mol/l}$  (Průša, Čepová, Petrtýlová, 2002, s31)

### 3.8.2.2 *Princip testu*

Stanovení sérové kreatininu se vyšetřuje Jaffého metodou. Kreatinin reaguje s kyselinou pikrovou v alkalickém pH za vzniku žlutočerveného zabarvení. Rychlost tvorby zabarvení je přímo úměrná koncentraci kreatininu ve vzorku. Pro stanovení se využívá kinetická kolorimetrická metoda. Pro opravu nespecifické reakce, způsobené sérovými chromogeny jsou výsledky pro sérum nebo plazmu korigovány -18 $\mu\text{mol/l}$ . (Roche, 2010, CREJ2, s1-2)

### 3.8.2.3 *Interference*

U hemolytických vzorků nedochází k významné interferenci do hodnoty hemolytického indexu 400 (přibližně odpovídá koncentraci hemoglobinu 248  $\mu\text{mol/l}$ ). U ikterických vzorků se nevyskytují interference do hodnoty indexu 5, který odpovídá přibližně koncentraci bilirubinu 85  $\mu\text{mol/l}$ . Chylózní vzorky nemají na interferenci významný vliv. (Roche, 2010, CREJ2, s3)

### 3.8.3 **Kyselina močová**

Kyselina močová může být endogenního nebo exogenního původu. Endogenní KM je konečným produktem odbourávání purinových bází, které se uvolňují při metabolismu nukleových kyselin. Exogenní KM je přiváděna potravou. Tvoří se v játrech a střevní sliznici. Velká část KM se vyskytuje ve formě urátového iontu, která se vylučuje močí. (Čermáková, Štěpánová, 2003, s75)

#### 3.8.3.1 *Referenční meze*

0-6 týdnů: 143 – 340  $\mu\text{mol/l}$

6 týdnů – 1 rok: 120 – 340  $\mu\text{mol/l}$

1-15 let: 140 – 340  $\mu\text{mol/l}$

15-60 let: muži: 200 – 420  $\mu\text{mol/l}$ , ženy: 140 – 340  $\mu\text{mol/l}$

60-90 let: muži: 250 – 476  $\mu\text{mol/l}$ , ženy: 208 – 434  $\mu\text{mol/l}$

nad 90 let: muži: 208 – 494  $\mu\text{mol/l}$ , ženy: 131 – 458  $\mu\text{mol/l}$  (Pruša, Čepová, Petrtýlová, 2002, s31)

#### 3.8.3.2 *Princip testu*

Enzymatický kolorimetrický test, ve kterém se kyselina močová štěpí urikázou za vzniku alantoinu a peroxidu vodíku, který dále reaguje s TOOS a 4-amino fenazonem za vzniku chinondiiminové barvy a vody. Intenzita vzniklého červeného zabarvení je přímo úměrná koncentraci kyseliny močové při 552nm. (Roche, 2010, UA2, s1)

### 3.8.3.3 *Interference*

Zvýšené sérové indexy nemají na použitou metodu významný vliv. Pouze u ikterického indexu se může vyskytnout interference s nekonjugovaným bilirubinem, pokud je jeho koncentrace přesáhne 599  $\mu\text{mol/l}$ . (Roche, 2010, UA2, s3)

### 3.8.4 **Na, K, Cl**

Sodík (Na) je hlavní extracelulární kationt. Jeho funkcí je udržení normální distribuce vody, osmolality, osmotického tlaku plazmy a udržování ABR. Příjem sodíku je potravou ve formě NaCl, vstřebává se v trávicím ústrojí a přebytek je vylučován močí. (Čermáková, Štěpánová, 2003, s83)

Draslík (K) je hlavní intracelulární kationt. Jeho funkcí je udržování osmotického tlaku, ABR a distribuce vody. Je nejmenší z alkalických kovů a proto má schopnost procházet membránou proti koncentračnímu spádu. (Doležalová et al., 1995, s 164-165)

Chloridy (Cl) jsou hlavní extracelulární anionty. Hlavními funkcemi jsou udržování osmolality a ABR. Při udržování ABR dochází ke vzájemné kompenzaci s hydrogenuhličitanovými anionty. Osmolalitu séra udržují společně se sodíkem. (Dastyh, Breinek et al., s 77-78)

#### 3.8.4.1 *Referenční meze*

Sodík: v séru, plazmě 135 – 145 mmol/l

Draslík: v séru a plazmě 3,8 – 5,1 mmol/l

Chloridy: v séru a plazmě 97 – 105 mmol/l (Dastyh, Breinek et al., 2008, s76-78)

#### 3.8.4.2 *Princip testu*

Měření pomocí ISE. (viz kapitola 3.1.7.3)

#### 3.8.4.3 *Interference*

Sérové indexy u sodíku a chloridů nemají významný vliv. Draslík je významně interferován hemolýzou, protože koncentrace draslíku v ICT je asi 40krát větší než v ECT. (Doležalová, 1995, s164-166)

### 3.8.5 Vápník

Vápník (Ca) je nejhojnější minerální prvek v organismu. 99% celkového vápníku se nachází v kostech ve formě hydroxyapatitu, zbylé 1% se nachází vázané na bílkoviny, v komplexu s kyselinami a volné ve formě ionizovaného vápníku. Hlavními funkcemi je nervosvalová dráždivost, vedení nervového vzruchu, krevní srážení, laktace a tvorba kostní hmoty. Hladina vápníku v organismu se reguluje pomocí kalcitoninu, parathormonu a vitamínu D. (Dastych, Breinek et al., 2008, s78; Dostál, Paulová, Slanina, Táborská, 2003, s38)

#### 3.8.5.1 Referenční meze

celkový vápník: 2,05 – 2,54 mmol/l

ionizovaný vápník: 1,13 – 1,32 mmol/l (Průša, Čepová, Petrtýlová, 2002, s29)

#### 3.8.5.2 Princip testu

Vápník reaguje v alkalickém prostředí s NM-BAPTA (5-nitro-5-methyl BAPTA) za vzniku komplexu vápník-NM-BAPTA, který dále reaguje s EDTA. Vzniká NM-BAPTA a komplex vápník-EDTA. Měří se změna absorbance, která je přímo úměrná koncentraci vápníku. (Roche, 2010, CA2, s1)

#### 3.8.5.3 Interference

U hemolytických, chylózních a ikterických vzorků není prokázána interference. (Roche, 2010, CA2, s3)

### 3.8.6 Železo

Železo (Fe) je stopový prvek, jehož hlavní funkcí je transport kyslíku. V těle je vázaný na bílkoviny (transferin, feritin) proto, že by mohli volné atomy železa způsobit poškození buněk a tkání. Většina železa se nachází v hemoglobinu, ale také v myoglobinu a ferritinu. (Dastych, Breinek, 2008, s102; Dostál, Paulová, Slanina, Táborská, 2003, s54)

### 3.8.6.1 Referenční meze

Sérum, plazma: muži: 14,5 – 25  $\mu\text{mol/l}$ , ženy: 12,5 – 23  $\mu\text{mol/l}$ , novorozenci: 10 – 12  $\mu\text{mol/l}$  (Čermáková, Štěpánová, 2003, s89)

### 3.8.6.2 Princip testu

Při stanovení metodou Ferro-Zine se v první reakci uvolňuje v kyselém prostředí železo z vazby na transferin. Uvolněné trojmocné železo reaguje s askorbátem, kdy vzniká dvojmocné železo, které dále reaguje s FerroZinem za vzniku barevného komplexu. Intenzita zabarvení je přímo úměrná koncentraci železa, která se měří při 552 nm. (Roche, 2010, Iron2, s1)

### 3.8.6.3 Interference

Je nutné zabránit v preanalytické části vzniku hemolýzy, která výsledek ovlivňuje. Dojde k uvolnění železa z hemoglobinu. Ikterita a chylozita nemá na výsledky významný vliv. (Čermáková, Štěpánová, 2003, s89)

## 3.8.7 Bilirubin

Vzniká v retikuloendotelovém systému sleziny a jater, kde je produktem metabolismu hemu z rozpadlých erytrocytů. Bilirubin se váže na albumin, aby mohl být transportován krví. (Čermáková, Štěpánová, 2003, s107; Masopust, 1991, s124)

### 3.8.7.1 Referenční meze

Sérum, plazma: 2 - 17  $\mu\text{mol/l}$  (Pruša, Čepová, Petrtýlová, 2002, s42)

### 3.8.7.2 Princip testu

Diazo metoda je založená na reakci bilirubinu s diazoniovými ionty v silně kyselém prostředí za vzniku azobilirubinu. Intenzita zabarvení vzniklého azobilirubinu je přímo úměrná koncentraci bilirubinu. (Roche, 2010, Bilts, s1)

### 3.8.7.3 Interference

Vliv chylozity a hemolýzy není významný. U hemolýzy může dojít k ovlivnění při překročení hranice 621  $\mu\text{mol/l}$  hemoglobinu v séru nebo plazmě. Bilirubin je

fotosenzibilní, proto by se vzorky před stanovením měly uchovávat za nepřístupu světla. (Glick, Ryder, Jackson, 1986, s470-474)

### **3.8.8 ALT**

ALT je cytoplazmatický enzym, který katalyzuje reakci alaninu s 2-oxoglutarátem na pyruvát a glutamát. Nejvíce aktivní je v hepatocytech. Hodnota ALT se stanovuje při diagnostice jaterních onemocnění. (Racek et al., 1999, s79)

#### *3.8.8.1 Referenční meze*

sérum, plazma: 0,17 – 0,78  $\mu$ kat/l (Průša, Čepová, Petrtýlová, 2002, s33)

#### *3.8.8.2 Princip testu*

Stanovení metodou dle IFCC (International Federation of Clinical Chemistry). První částí je reakce L-alaninu s 2-oxoglutarátem, katalyzovaná ALT, za vzniku pyruvátu a L-glutamátu. Pyruvát dále reaguje s NADH za přítomnosti laktátdehydrogenázy a vzniká L-laktát a  $\text{NAD}^+$ . Rychlost oxidace NADH na  $\text{NAD}^+$  je přímo úměrná katalytické aktivitě ALT. Měří se pokles absorbance při 340 nm. (Roche, 2010, ALTPL, s1; Schumann et al., 2010, s615-621)

#### *3.8.8.3 Interference*

Ikterické sérum nemá významný vliv na stanovení. Hemolýza ovlivňuje výsledek, pokud je sérový index vyšší než 130, to odpovídá koncentraci hemoglobinu přibližně 81  $\mu$ mol/l. U chylózních vzorků dochází k interferenci při hodnotě sérového indexu vyšší než 150. (Roche, 2010, ALTPL, s2-3)

### **3.8.9 AST**

AST je enzym, který katalyzuje reakci aspartátu s 2-oxoglutarátem za vzniku oxalacetátu a glutamátu. Vyskytuje se v játrech, ale i srdečním a kosterním svalu a v erythrocytech. Menší část se nachází v cytoplazmě a zbytek v mitochondriích, proto hodnota stoupá až při nekróze buňky. Používá ke stanovení vážnosti poškození hepatocytů. (Race et al., 1999, s79)

### 3.8.9.1 Referenční meze

sérum, plazma: muži: 0,17 – 0,85  $\mu\text{kat/l}$ , ženy: 0,17 – 0,60  $\mu\text{kat/l}$  (Dastych, Breinek et al., 2008, s 189)

### 3.8.9.2 Princip testu

Stanovení metodou dle IFCC. První částí je reakce L-aspartátu s 2-oxoglutarátem, katalyzovaná AST, za vzniku oxalacetátu a L-glutamátu. Oxalacetát dále reaguje s NADH za přítomnosti malátdehydrogenázy a vzniká malát a  $\text{NAD}^+$ . Rychlost oxidace NADH na  $\text{NAD}^+$  je přímo úměrná katalytické aktivitě AST. Měří se pokles absorbance při 340 nm. (Dastych, Breinek et al., 2008, s189)

### 3.8.9.3 Interference

Ikterické vzorky nemají významný vliv na stanovení. Hemolýza silně ovlivňuje analýzu (AST má poměrně vysokou aktivitu v erythrocytech), od sérového indexu 25, který odpovídá koncentraci hemoglobinu 16  $\mu\text{mol/l}$ . U chylózních vzorků je nevýznamná interference do hodnoty SI 150. (Roche, 2010, ASTL, s3)

## 3.8.10 GMT

GMT se nachází v buněčných membránách a katalyzuje přenos gama-glutamylových zbytků z gama-glutamylových peptidů na jiné peptidy nebo aminokyseliny. Aktivitu vykazují játra, žlučové cesty, tubulární buňky ledvin, pankreas a střevo. (Dastych, Breinek et al., 2008, s193)

### 3.8.10.1 Referenční meze

sérum, plazma: muži: 0,17 – 1,19  $\mu\text{kat/l}$ , ženy: 0,10 – 0,70  $\mu\text{kat/l}$  (Dastych, Breinek et al., 2008, s193)

### 3.8.10.2 Princip testu

Metoda podle IFCC. GMT přenáší gama-glutamylovou skupinu L-gama-glutamyl-3-karboxy-4-nitroanilidu na glycyglycin. Měří se množství uvolněného 5-amino-2-nitrobenzoátu, který je přímo úměrný aktivitě GMT. Stanovuje se kinetický nárůst absorbance při 409 nm. (Roche, 2010, GGTI2, s1; Schumann et al., 2010, s615-621)



### 3.8.10.3 Interference

Chylozita séra neovlivňuje analýzu. Hemolýza interferuje při hodnotě SI vyšší než 550 a ikterita ovlivňuje analýzu při hodnotě SI vyšší než 48, to odpovídá koncentraci bilirubinu 821 μmol/l. (Roche, 2010, GGT12, s2)

### 3.8.11 ALP

ALP je enzym, který katalyzuje hydrolyzu monoesterů kyseliny fosforečné v alkalickém prostředí. Známe tři různé izoenzymy ALP – typ nacházející se v játrech, kostech a ledvinách, typ placentární a typ střevní. Zvýšení hodnot ALP může mít několik příčin. Např. onemocnění jater a žlučových cest, rachitis, osteomalacie, zlomeniny kostí, nebo také při fyziologických stavech u dětí při růstu kostí nebo v těhotenství, kdy je aktivní placentární izoenzym. (Racek et al., 1999, s81)

#### 3.8.11.1 Referenční meze

0-6 týdnů: 1,2 – 6,3 μkat/l

6 týdnů – 1 rok: 1,44 – 8,0 μkat/l

2-10 let: 1,12 – 6,2 μkat/l

11-15 let: 1,35 – 7,5 μkat/l

15-60 let: 0,66 – 2,20 μkat/l

60-90 let: 0,88 – 2,35 μkat/l

nad 90 let: 0,72 – 2,67 μkat/l (Průša, Čepová, Petrtýlová, 2002, s33)

#### 3.8.11.2 Princip testu

P-nitrofenyl fosfát je štěpen ALP za přítomnosti hořečnatých a zinečnatých iontů na fosfát a p-nitrofenol. Množství p-nitrofenolu je přímo úměrné katalytické aktivitě ALP. Měří se nárůst absorbance při 409 nm. (Roche, 2010, ALP2, s1)

### 3.8.11.3 Interference

Hemolýza ovlivňuje analýzu při hodnotě SI vyšší než 250. Ikterita do hodnoty SI 42, která odpovídá koncentraci bilirubinu 718  $\mu\text{mol/l}$ . U chylózních vzorků bez významných interferencí. (Roche, 2010, ALP2, s2)

### 3.8.12 AMS

Alfa-amyláza je sekreční enzym, který je vytvářen slinnými žlázami, pankreatem a v játrech. Štěpí glykosidické vazby uvnitř polysacharidového řetězce. AMS je schopna přecházet glomerulární filtrací do moče. Při onemocnění jater dochází k vytváření komplexů s imunoglobuliny nebo jinými krevními bílkovinami, které nemohou být pro svoji velikost filtrovány glomerulární membránou a dochází ke zvýšené aktivitě AMS v séru. (Dastych, Breinek et al., 2008, s194)

#### 3.8.12.1 Referenční meze

plazma, sérum: 0,47 – 1,67  $\mu\text{kat/l}$  (Průša, Čepová, Petrtýlová, 2002, s34)

#### 3.8.12.2 Princip testu

Stanovení se provádí enzymatickou metodou dle IFCC. Oligosacharidy 4,6-etyliden-(G7)-p-nitrofenyl-(G1)- $\alpha$ ,D-maltoheptaosid (etyliden-G<sub>7</sub>PNP) jsou štěpeny  $\alpha$ -amylázou. Vytvořené G<sub>2</sub>PNP, G<sub>3</sub>PNP a G<sub>4</sub>PNP jsou úplně hydrolyzovány na p-nitrofenol a glukózu pomocí  $\alpha$ -glykosidázy. Intenzita zabarvení p-nitrofenolu je přímo úměrná katalytické aktivitě AMS. Měří se nárůst absorbance při 409 nm. (PNP = p-nitrofenol). (Roche, 2010, Amyl2, s1)

#### 3.8.12.3 Interference

Hemolýza má ovlivňuje výsledek při hodnotě SI nad 260, která odpovídá koncentraci hemoglobinu přibližně 161  $\mu\text{mol/l}$ . Ikterita bez významných interferencí do hodnoty SI 52 (odpovídá koncentraci bilirubinu 889  $\mu\text{mol/l}$ . U chylózních vzorků není prokázána významná interference. (Roche, 2010, Amyl2, s3)

### **3.8.13 Cholesterol**

Cholesterol je syntetizován především v játrech a je součástí buněčných membrán. Je zdrojem energie pro syntézu žlučových kyselin, krevních lipoproteinů, steroidních a pohlavních hormonů. (Dastych, Breinek et al., 2008, s120)

#### *3.8.13.1 Referenční meze*

Doporučená cílová terapeutická hodnota: < 5,2 mmol/l (Průša, Čepová, Petrtýlová, 2002, s31)

#### *3.8.13.2 Princip testu*

Stanovení probíhá ve třech reakcích. První je štěpení esterů cholesterolu za pomoci cholesterolesterázy, kdy vzniká cholesterol a mastné kyseliny. Cholesterol dále reaguje s cholesteroxidázou a tím vzniká cholest-4-en-3-on a peroxid vodíku. Peroxidáza pak katalyzuje reakci peroxidu vodíku, fenolu a 4-aminoantipyrinu za vzniku chinoniminového zbarvení a 4 molekul vody. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci cholesterolu, která se měří při 512 nm. (Roche, 2010, CHOL2, s1; Siedel, Hägele, Ziegenhorn, Wahlefeld, 1983, s1075-1076)

#### *3.8.13.3 Interference*

Ikterita ovlivňuje výsledek při koncentraci bilirubinu nad 274  $\mu\text{mol/l}$  (hodnota SI nad 16. Hemolýza způsobuje interferenci při hodnotě SI vyšší než 810, která přibližně odpovídá koncentraci hemoglobinu 503  $\mu\text{mol/l}$ . Chylozita bez významných interferencí. (Roche, 2010, CHOL2, s3)

### **3.8.14 Triglyceridy**

Syntéza triacylglycerolů probíhá v játrech, střevní sliznici a tukové tkáni, energie potřebná pro syntézu je ve formě glukózy, bílkovin, glycerolu a mastné kyseliny a alkohol. Zdrojem TG je i potrava. Hlavní funkcí je energetická zásoba, ale mají i funkci regulace tělesné teploty. (Dastych, Breinek et al., 2008, s121)

#### *3.8.14.1 Referenční meze*

serum, plazma: 0,7 – 1,7 mmol/l (Průša, Čepová, Petrtýlová, 2002, s32)

#### *3.8.14.2 Princip testu*

Skládá se z několika reakcí. V první fázi dochází k úplné hydrolyze triglyceridů na glycerol pomocí lipoproteinové lipázy z mikroorganismů. V další fázi je glycerol oxidován na dihydroxyaceton fosfát a peroxid vodíku. Peroxid dále reaguje s 4-aminofenazonem a 4-chlorofenolem za katalytického působení peroxidázy a vzniká červené barvivo, jehož intenzita je přímo úměrná koncentraci triglyceridů. (Roche, 2010, Trig1, s1)

#### *3.8.14.3 Interference*

Ikterita ovlivňuje analýzu již při hodnotě SI 5 (odpovídá přibližné koncentraci bilirubinu 86  $\mu\text{mol/l}$ ). Hemolýza nemá významný vliv až do hodnoty SI 600, tj. přibližná koncentrace hemoglobinu 373  $\mu\text{mol/l}$ . (Roche, 2010, Trig1, s2)

### **3.8.15 Bílkoviny**

V krevním séru se nachází mnoho bílkovin, které se liší svojí funkcí, velikostí a koncentrací. Mezi jejich základní funkce patří transport látek nerozpustných ve vodě, obrana proti infekci, udržení onkotického tlaku, hemokoagulace a fibrinolýza. Mohou ale také působit jako enzymy, inhibitory enzymů nebo mohou mít zcela specifické funkce (ochrana před volnými radikály). (Racek et al., 1999, s59)

#### *3.8.15.1 Referenční meze*

sérum, plazma: 65 – 85 g/l (Pruša, Čepová, Petrtýlová, 2002, s36)

#### *3.8.15.2 Princip testu*

Stanovení bílkovin se provádí s biuretovým činidlem v alkalickém prostředí, kde reagují peptidové vazby bílkovin s roztokem měďnaté soli za vzniku komplexu, který je fialově zbarvený. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci bílkovin v séru nebo plazmě. Biuretové činidlo obsahuje ještě jodid draselný, který zabraňuje autoredukci mědi a tartarát sodno-draselný, který zabraňuje precipitaci hydroxidu měďnatého. (Dastych, Breinek et al., 2008, s157)

### 3.8.15.3 Interference

Hemolýza může způsobit interferenci, pokud je hodnota SI vyšší než 500, tzn. přibližná koncentrace hemoglobinu 310  $\mu\text{mol/l}$ . Ikterita a chylozita nemá významný vliv na analýzu. (Roche, 2010, TP2, s3)

### 3.8.16 Albumin

Albumin je bílkovina, která tvoří více než polovinu celkového množství proteinů v krevním séru. Je tvořen převážně v játrech a podílí se z velké části na udržení onkotického tlaku plazmy. Je také velmi důležitý pro přenos látek nerozpustných ve vodě, váže na sebe např. vápník, hořčík, zinek, nekonjugovaný bilirubin, neesterifikované mastné kyseliny, tyreoidální hormony, některé léky a další. (Racek et al., 1999, s62-63)

#### 3.8.16.1 Referenční meze

sérum, plazma: 35-53 g/l (Průša, Čepová, Petrtýlová, 2002, s36)

#### 3.8.16.2 Princip testu

Albumin se stanovuje kolorimetrickou metodou. Při pH 4,2 na sebe váže albumin roztok bromkrezolové zeleně a vzniká zelenomodrý komplex. Intenzita zabarvení je přímo úměrná koncentraci albuminu v séru nebo plazmě, provádí se při 630 nm. (Dastyh, Breinek et al., 2008, s159)

#### 3.8.16.3 Interference

Hemolýza ovlivňuje výsledek, pokud je hodnota SI vyšší než 420, to odpovídá přibližně koncentraci hemoglobinu 261  $\mu\text{mol/l}$ . Bez významných interferencí je ikterita a chylozita. (Roche, 2010, ALB2, s2)

### 3.8.17 Sérové indexy

Měření sérových indexů je založeno na výpočtech z měření absorbance, které je prováděno z naředěného séra pacienta, při různých párech bichromatických vlnových délek. Sérum si analyzátor sám naředí fyziologickým roztokem. Pro stanovení chylozity analyzátor změří absorbanci při 660 a 700 nm, pro stanovení hemolýzy při 570 a 600 nm a pro ikteritu při 480 a 505 nm. Pomocí výpočtových vztahů pak analyzátor Cobas

Integra 800 vypočítá hodnoty sérových indexů. Pro výpočet hemolytického sérového indexu se používá vzorec  $(u \cdot A) + (v \cdot B)$ , kde  $u = -5332,3$  (konstantní faktor),  $v = 9124,2$  (konstantní faktor),  $A$  je absorbance změřená pro lipemii a  $B$  je absorbance změřená pro hemolýzu. Pro výpočet lipemického sérového indexu je vzorec  $(u \cdot A)$ , kde  $u = 7867,8$  (konstantní faktor) a  $A$  = absorbance změřená pro lipemii. Pro výpočet ikterity se používá vzorec  $(u \cdot A) + (v \cdot B) + (y \cdot C)$ , kde  $u = -67,2$  (konstantní faktor),  $A$  = absorbance změřená pro lipemii,  $v = -26,1$  (konstantní faktor),  $B$  = absorbance změřená pro hemolýzu,  $y = 101,9$  (konstantní faktor) a  $C$  = absorbance změřená pro ikteritu. Výsledky se udávají v celých číslech a bez jednotek. V LIS je nastavené hodnocení pomocí skriptu, kde se vypočítané hodnoty SI převádí na semikvantitativní výsledek v podobě křížů, pokud je v séru změřena hemolýza, ikterita nebo lipemie větší než nastavená hodnota. Pokud je sérum bez SI, použije se hodnocení „0“ (viz. tabulka č.1). (Roche, 2010, SI, s1; Roche, 2007, s7-19)

Tabulka č.1: Hodnocení sérových indexů na analyzátoru Cobas Integra 800.

SI	"0"	+	++	+++	++++
hemolýza	< 50	< 150	< 250	< 350	> 350
ikterita	< 2	< 6	< 10	< 15	> 15
chylozita	< 20	< 60	< 100	< 200	> 200

## 4 Praktická část

### 4.1 Měření interference způsobené hemolýzou

#### 4.1.1 Přístroje, pomůcky, reagentie

Měření bylo prováděno na plně automatickém analyzátoru COBAS INTEGRA 800.

Centrifuga, mrazák.

Odběrový materiál, zkumavky BD Vacutainer bez gelu s přidavkem aktivátoru srážení (červený uzávěr), orientační jednorázové pipety.

Reagenční sady pro analyzátor COBAS INTEGRA 800: UREL (ID 0-003), CREJ2 (ID 0-245), UA2 (ID 0-615), reagentie pro stanovení ISE (Solution 1, 2, 3, Calibrator Direct, Reference Electrolyte, Etcher, Deproteinizer, Activator), CA2 (ID 0-042), IRON2 (ID 0-596), BILTS (ID 0-985), ALTL (ID 0-495), ASTL (ID 0-494), GGTI2 (ID 0-498), ALP2L (ID 0-553), AMYL2 (ID 0-609), CHOL2 (ID 0-586), TRIGL (ID 0-010), TP2 (ID 0-027), ALB2 (ID 0-592), SI2 (ID 07 6870 7).

#### 4.1.2 Postup měření

Pro měření interference jsem odebrala několik zkumavek krve. Jednu část jsem centrifugovala při 2500 ot./min. po dobu 10 minut. Druhou část jsem dala zmrazit po dobu 1 hodiny, abych docílila hemolýzy erytrocytů a následně centrifugovala stejným způsobem jako první část zkumavek. Nejprve jsem měřila sérum neovlivněné hemolýzou. Pro potvrzení kvality séra jsem změřila hodnoty sérových indexů. Každý analyt byl změřen v sérii po deseti a hodnoty jsem následně zprůměrovala. To samé jsem provedla s hemolytickým sérem. Jednotlivé výsledky měření jsou uvedené v příloze č.1 a č.2.

#### 4.1.3 Výsledky

Z průměrných hodnot jednotlivých analytů jsem vypočítala chybu měření způsobenou hemolýzou (bias) podle vzorce  $\frac{x-x_0}{x_0} (\cdot 100\%)$ , kde  $x$  je průměrná hodnota

analytu v hemolytickém séru a  $x_0$  průměrná hodnota analytu v séru bez hemolýzy.

Významné hodnoty interference jsem vyznačila modrou barvou v tabulce č.3.

Tabulka č.2: Změřené hodnoty SI v séru bez hemolýzy a s hemolýzou.

SI	sérum bez hemolýzy	sérum s hemolýzou
hemolýza	7	387
ikterita	1	0
chylozita	14	15

Tabulka č.3: Míra ovlivnění jednotlivých analytů hemolýzou.

Analyt	Jednotky	Koncentrace analytu bez vlivu hemolýzy	Koncentrace analytu s vlivem hemolýzy	Bais	Hodnocení
<b>Urea</b>	mmol/l	3,020	2,96	-2%	↔
<b>Kreat</b>	μmol/l	60,300	64,70	7%	↔
<b>KM</b>	μmol/l	236,570	233,76	-1%	↔
<b>Na</b>	mmol/l	134,970	134,50	0%	↔
<b>K</b>	mmol/l	4,505	5,57	24%	↑
<b>Cl</b>	mmol/l	104,270	103,20	-1%	↔
<b>Ca</b>	mmol/l	2,439	2,44	0%	↔
<b>Fe</b>	μmol/l	16,570	18,22	10%	↑
<b>BIL</b>	μmol/l	3,510	3,95	13%	↑
<b>ALT</b>	μkat/l	0,249	0,31	23%	↑
<b>AST</b>	μkat/l	0,388	1,08	179%	↑
<b>GMT</b>	μkat/l	0,204	0,26	26%	↑
<b>ALP</b>	μkat/l	0,929	0,69	-25%	↓
<b>AMS</b>	μkat/l	0,875	0,90	2%	↔
<b>CHOL</b>	mmol/l	4,021	4,23	5%	↔
<b>TG</b>	mmol/l	1,598	1,73	8%	↔
<b>PROT</b>	g/l	67,310	72,45	8%	↔
<b>ALB</b>	g/l	41,900	41,89	0%	↔



## **4.2 Měření interference způsobené ikteritou**

### **4.2.1 Přístroje, pomůcky, reagensie**

Měření bylo prováděno na plně automatickém analyzátoru COBAS INTEGRA 800.

Centrifuga, kalibrované pipety.

Odběrový materiál, zkumavky BD Vacutainer s gelem s přidavkem aktivátoru srážení (žlutý uzávěr), orientační jednorázové pipety, plastové špičky na kalibrované pipety, sterilní plastové zkumavky.

Reagenční sety pro analyzátor COBAS INTEGRA 800: UREL (ID 0-003), CREJ2 (ID 0-245), UA2 (ID 0-615), reagensie pro stanovení ISE (Solution 1, 2, 3, Calibrator Direct, Reference Electrolyte, Etcher, Deproteinizer, Activator), CA2 (ID 0-042), IRON2 (ID 0-596), BILTS (ID 0-985), ALTL (ID 0-495), ASTL (ID 0-494), GGTI2 (ID 0-498), ALP2L (ID 0-553), AMYL2 (ID 0-609), CHOL2 (ID 0-586), TRIGL (ID 0-010), TP2 (ID 0-027), ALB2 (ID 0-592), SI2 (ID 07 6870 7).

Jako bilirubinový standard byl použit materiál pro externí kontrolu kvality SEKK z cyklu EHK: BIL2/13 vzorek A, který odpovídal koncentraci bilirubinu 297,95  $\mu\text{mol/l}$ .

### **4.2.2 Postup měření**

Pro měření interference jsem odebrala několik zkumavek BD Vacutainer krve od jednoho pacienta. Dále jsem je zcentrifugovala při 2500ot./min. po dobu 10 minut. Z jedné poloviny séra jsem změřila všechny analyty, včetně sérových indexů, v sérii po deseti a hodnoty zprůměrovala. Dále jsem změřila hodnoty samotného bilirubinového standardu v tripletu a hodnoty zprůměrovala. V dalším kroku jsem druhou polovinu odebraného séra naředila bilirubinovým standardem v poměru 2:1 (2ml séra a 1ml bilirubinového standardu), tím jsem docílila vzniku ikterického séra. U ovlivněného séra ikteritou jsem změřila všechny analyty (včetně SI) v sérii po 10-ti a hodnoty zprůměrovala. Jednotlivé naměřené koncentrace analytů v séru bez ikterity a s ikteritou jsou uvedeny v příloze č.3 a č.4.

### 4.2.3 Výsledky

Hodnoty změřené z ikterického séra jsou naředěné bilirubinovým standardem, proto je zapotřebí hodnoty přepočítat tak, aby výsledky odpovídali séru nenaředěnému.

V následující tabulce jsou pod názvem Bil. Standard hodnoty, které byly změřeny ze samotného bilirubinového standardu. Pod názvem změřené hodnoty jsou průměrné koncentrace ikterického séra a pod názvem vypočtené hodnoty jsou hodnoty získané pomocí výpočtu ze směšovací rovnice podle vzorce  $c_1 \cdot V_1 + c_2 \cdot V_2 = c_3 \cdot V_3$  pro každý analyt zvlášť, kde  $c_1$  je hodnota kterou potřebujeme vypočítat,  $V_1$  je objem přidaného séra (2ml),  $c_2$  je koncentrace bil. standardu,  $V_2$  je objem přidaného bil. stand. (1ml),  $c_3$  je koncentrace změřeného ikterického séra a  $V_3$  je objem celkového množství ikterického séra (3ml).

Tabulka č.4: Přepočet hodnot naředěného séra

Analyt		Bil. Standard	změřené hodnoty	vypočtené hodnoty
<b>Urea</b>	mmol/l	1,150	2,250	2,800
<b>Kreat</b>	μmol/l	0,000	27,300	40,950
<b>KM</b>	μmol/l	1,900	126,450	188,725
<b>Na</b>	mmol/l	103,850	126,570	137,930
<b>K</b>	mmol/l	0,000	2,900	4,350
<b>Cl</b>	mmol/l	87,350	99,100	104,975
<b>Ca</b>	mmol/l	0,460	1,794	2,461
<b>Fe</b>	μmol/l	15,600	16,040	16,260
<b>BIL</b>	μmol/l	297,950	x	x
<b>ALT</b>	μkat/l	0,115	0,174	0,204
<b>AST</b>	μkat/l	0,280	0,315	0,333
<b>GMT</b>	μkat/l	0,265	0,234	0,219
<b>ALP</b>	μkat/l	0,505	0,748	0,870
<b>AMS</b>	μkat/l	0,705	0,906	1,007
<b>CHOL</b>	mmol/l	2,480	3,939	4,669
<b>TG</b>	mmol/l	0,800	1,241	1,462
<b>PROT</b>	g/l	49,950	63,340	70,035
<b>ALB</b>	g/l	36,900	41,680	44,070

Tabulka č.5: Změřené hodnoty SI v séru bez ikterity a s ikteritou.

SI	sérum bez ikterity	sérum s ikteritou
hemolýza	6	4
ikterita	1	7
chylozita	15	19

V posledním kroku jsem z naměřených hodnot v séru bez ikterity a vypočítaných hodnot v tabulce č.4 vypočítala chybu měření způsobenou ikteritou (bias) podle vzorce  $\frac{x-x_0}{x_0} (\cdot 100\%)$ , kde x jsou vypočítané hodnoty ikterického séra a  $x_0$  průměrná koncentrace analytu v séru bez ikterity. Významné hodnoty interference jsem vyznačila modrou barvou v tabulce č.6.

Tabulka č.6: Míra ovlivnění jednotlivých analytů ikteritou.

Analyt	Jednotky	Koncentrace analytu bez vlivu ikterity	Koncentrace analytu s vlivem ikterity	Bias	Hodnocení
<b>Urea</b>	mmol/l	3,370	2,800	-17%	↓
<b>Kreat</b>	μmol/l	56,300	40,950	-27%	↓
<b>KM</b>	μmol/l	191,610	188,725	-2%	↔
<b>Na</b>	mmol/l	136,860	137,930	1%	↔
<b>K</b>	mmol/l	4,348	4,350	0%	↔
<b>Cl</b>	mmol/l	104,760	104,975	0%	↔
<b>Ca</b>	mmol/l	2,428	2,461	1%	↔
<b>Fe</b>	μmol/l	16,500	16,260	-1%	↔
<b>BIL</b>	μmol/l	4,530	x	x	x
<b>ALT</b>	μkat/l	0,227	0,204	-10%	↓
<b>AST</b>	μkat/l	0,338	0,333	-2%	↔
<b>GMT</b>	μkat/l	0,197	0,219	11%	↑
<b>ALP</b>	μkat/l	0,867	0,870	0%	↔
<b>AMS</b>	μkat/l	0,982	1,007	2%	↔
<b>CHOL</b>	mmol/l	4,550	4,669	3%	↔
<b>TG</b>	mmol/l	1,489	1,462	-2%	↔
<b>PROT</b>	g/l	69,870	70,035	0%	↔
<b>ALB</b>	g/l	43,350	44,070	2%	↔

### 4.3 Měření interference způsobené chylozitou

#### 4.3.1 Přístroje, pomůcky, reagentie

Měření bylo prováděno na plně automatickém analyzátoru COBAS INTEGRA 800.

Centrifuga, kalibrované pipety.

Odběrový materiál, zkumavky BD Vacutainer s gelem s přidavkem aktivátoru srážení (žlutý uzávěr), orientační jednorázové pipety, plastové špičky na kalibrované pipety, sterilní plastové zkumavky.

Reagenční sety pro analyzátor COBAS INTEGRA 800: UREL (ID 0-003), CREJ2 (ID 0-245), UA2 (ID 0-615), reagentie pro stanovení ISE (Solution 1, 2, 3, Calibrator

Direct, Reference Electrolyte, Etcher, Deproteinizer, Activator), CA2 (ID 0-042), IRON2 (ID 0-596), BILTS (ID 0-985), ALTL (ID 0-495), ASTL (ID 0-494), GGTI2 (ID 0-498), ALP2L (ID 0-553), AMYL2 (ID 0-609), CHOL2 (ID 0-586), TRIGL (ID 0-010), TP2 (ID 0-027), ALB2 (ID 0-592), SI2 (ID 07 6870 7).

Pro získání chylózního séra jsem přidala k séru bez SI infuzní emulzi Intralipid 20%.

#### 4.3.2 Postup měření

Pro měření vlivu chylozity jsem odebrala několik zkumavek BD Vacutainer s gelem. Zkumavky jsem centrifugovala při 2500 ot./min. po dobu 10-ti minut. Z poloviny stočeného séra jsem změřila jednotlivé analyty (včetně sérových indexů) v sérii po deseti a hodnoty následně zprůměrovala. Do druhé poloviny séra jsem přidala Intralipid v poměru 30:1 (30 dílů séra a 1 díl Intralipidu) pro získání chylózního séra. Toto sérum jsem následně změřila stejným způsobem jako sérum neovlivněné chylozitou. Naměřené hodnoty jsou v příloze č.5 a č.6.

#### 4.3.3 Výsledky

Změřené hodnoty chylózního séra jsou naředěné v poměru 30:1, proto jsem musela koncentrace přepočítat podle vzorce  $x_0 = (x \cdot 31)/30$ , kde  $x_0$  je výsledná hodnota (nenaředěné sérum) a  $x$  je průměrná hodnota změřená s přidavkem Intralipidu. Přepočítané hodnoty jsou patrné v příloze č.6.

V posledním kroku jsem z naměřených hodnot v séru bez chylozity a vypočítaných hodnot chylózního séra vypočítala chybu měření způsobenou chylozitou (bias) podle vzorce  $\frac{x-x_0}{x_0} (\cdot 100\%)$ , kde  $x$  jsou vypočítané hodnoty chylózního séra a  $x_0$  průměrná koncentrace analytu v séru bez chylozity. Významné hodnoty interference jsem vyznačila modrou barvou v tabulce č.8.

Tabulka č.7: Změřené hodnoty SI v séru bez chylozity a s chylozitou.

SI	sérum bez chylozity	sérum s chylozitou
hemolýza	9	12
ikterita	1	1
chylozita	15	172

Tabulka č.8: Míra ovlivnění jednotlivých analytů chylozitou.

Analyt	Jednotky	Koncentrace analytu bez vlivu chylozity	Koncentrace analytu s vlivem chylozity	Bias	Hodnocení
<b>Urea</b>	mmol/l	3,970	3,999	1%	↔
<b>Kreat</b>	μmol/l	58,000	53,113	-8%	↓
<b>KM</b>	μmol/l	217,730	217,579	0%	↔
<b>Na</b>	mmol/l	138,840	140,554	1%	↔
<b>K</b>	mmol/l	4,685	4,686	0%	↔
<b>Cl</b>	mmol/l	106,370	107,446	1%	↔
<b>Ca</b>	mmol/l	2,466	2,505	2%	↔
<b>Fe</b>	μmol/l	17,810	18,114	2%	↔
<b>BIL</b>	μmol/l	3,810	4,609	21%	↑
<b>ALT</b>	μkat/l	0,309	0,291	-6%	↓
<b>AST</b>	μkat/l	0,356	0,359	1%	↔
<b>GMT</b>	μkat/l	0,214	0,212	-1%	↔
<b>ALP</b>	μkat/l	0,842	0,843	0%	↔
<b>AMS</b>	μkat/l	0,993	1,014	2%	↔
<b>CHOL</b>	mmol/l	5,012	5,057	1%	↔
<b>TG</b>	mmol/l	1,339	x	x	x
<b>PROT</b>	g/l	70,680	69,884	-1%	↔
<b>ALB</b>	g/l	42,790	42,708	0%	↔

## 4.4 Statistické vyhodnocení počtu hemolytických vzorků

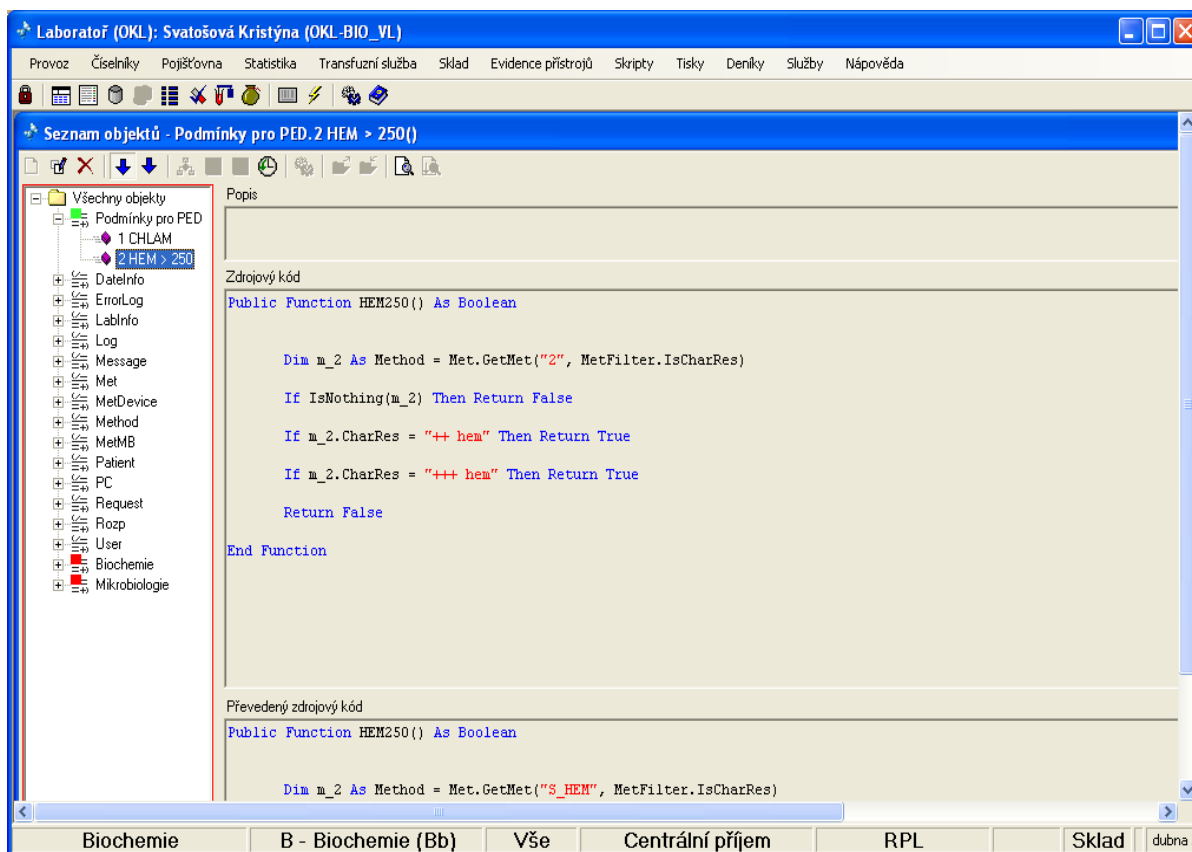
Pro získání statistických dat o četnosti výskytu hemolýzy pro jednotlivá oddělení jsem nastavila v systému LIS kritéria pro PED. V dalším kroku jsem získaná data převedla do programu Excel a zpracovala přehledné tabulky. Pracovala jsem s laboratorním informačním systémem OpenLIMS Stapro.

### 4.4.1 Nastavení parametrů pro výběr a export dat z LIS

Nejprve jsem vytvořila vzorec pro PED v sektoru Skripty/ Podmínky pro PED/ Vytvořit novou podmínku. Zadala jsem název podmínky (HEM 250). Na obrázku č.1 je napsaný vzorec podmínky. V prvním řádku jsem zadala podmínku, že chci získat data uložená pod metodou „2“ a že se jedná o výsledek v podobě textu (IsCharRes). V dalším řádku jsem zadala, že jiné metody než metoda „2“ nebudou zahrnuty do výběru (Then Return False). Ve třetím a čtvrtém řádku jsem zadala jaké textové výsledky („++ hem“ a „+++ hem“) budou splňovat podmínku, tedy budou zahrnuty do výběru. (Then return True). Pod číslem metody „2“ je v tomto LIS zadaná metoda pro vyšetření hemolytického indexu. Výsledky ++ hem a +++ hem jsou nastaveny v tomto LISu jako výsledky odpovídající hodnotám naměřených na Integře 800 znázorněné v tabulce č.1.

Po vytvoření vzorce jsem nastavila PED v sektoru Statistika/ Podmínkový export dat/ Nový záznam. Zadala jsem název PED (HEM 250) a typ podmínkového exportu (Microsoft Excel). Na první straně nového záznamu jsem doplnila kritéria, podle kterých se budou filtrovat pacienti. Nastavila jsem datum odběru materiálu od 1.1.2013 do 31.12.2013. Na druhé straně jsou možnosti zadání dalších filtrů jako je diagnóza, bloky, oddělení, metody. Tam jsem nastavila pouze metodu „2“, která byla použita ve vzorci. Po zadání těchto parametrů jsem dala sestavit data a tyto data jsem převedla do Microsoft Excel.

Obrázek č.1: Sestavený vzorec pro PED

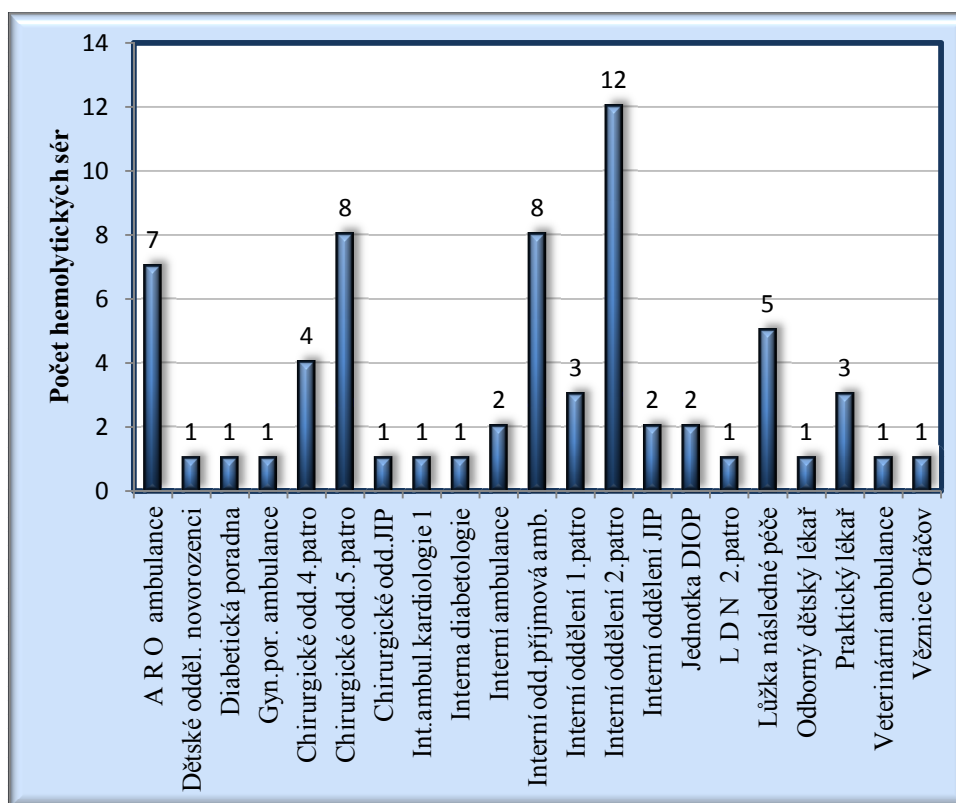


#### 4.4.2 Vyhodnocení počtu silně hemolytických vzorků podle oddělení

Pomocí PED jsem zjistila počet pacientů, u kterých byl změřen hemolytický index na dva a tři kříže za rok 2013, řazených podle oddělení (ordinace), které pacienta nabíralo. Tyto převedené záznamy do Microsoft Excelu jsou znázorněné v grafu č.1.



Graf č.1: Počet hemolytických sér odebraných na jednotlivých odděleních za rok 2013



## 4.5 Diskuze

U měření interference hemolýzou, kdy byla hodnota SI 387, došlo ke zvýšení koncentrace draslíku o 24%, železa o 10%, BIL o 13% a enzymatické aktivity ALT o 23%, AST 179%, GMT 26%. Enzymatická aktivita ALP klesla o 25%. V porovnání s hodnotami interference uvedených v Laboratorní příručce se výsledky shodují. (OKL, 2013)

Při měření interference ikteritou, kde byla hodnota SI 7, došlo ke snížení koncentrace urey o 17%, kreatininu o 27% a enzymatické aktivity ALT o 10% a naopak ke zvýšení enzymatické aktivity došlo u GMT o 11%. Podle Roche by na vyšetření urey a ALT ikterita neměla mít vliv a naopak by měla mít vliv na stanovení triacylglycerolů, které mé výsledky neovlivnily. (Roche, 2007, s26-28)

Interference lipemií mi ovlivnila kreatinin o 8%, kde se koncentrace snížila. Snížila také enzymatickou aktivitu ALT o 6% a naopak zvýšila koncentraci bilirubinu o 21%.

Měření bylo prováděno při hodnotě lipemického indexu 173. Podle Roche by koncentraci kreatininu měla lipemie ovlivnit až při hodnotě SI vyšší než 250 a bilirubin až při hodnotě SI vyšší než 1400. Ostatní vyšetření odpovídají hodnotám Roche.

Při vyhodnocování statistických dat jsem na ukázkou zvolila hemolýzu, protože je nejčastějším problémem zpracovávaných vzorků a také je z velké části způsobena chybou v preanalytické fázi vyšetření. Do statistiky byly zahrnuty pro lepší přehlednost pouze hemolýzy na dva a tři kříže, tedy silně hemolytické séra. Vzorky, které by byly na více jak tři kříže, tedy více jak 350, nejsou vyšetřovány a v provozu laboratoře je požádáno o nový odběr. Do tohoto navrženého systému lze samozřejmě zahrnout i hemolýzu na jeden kříž, záleží pouze na potřebách laboratoře, která data zpracovává. Z grafu č.1 je patrné, že k nevyššímu počtu hemolýz dochází na oddělení Interny 2.p s počtem 12-ti odběrů, následuje s počtem 8 odběrů Interna příjmová ambulance a chirurgie 5p., 7 odběrů měla ARO ambulance, 5 lůžka následné péče, 4 chirurgie 4.p a ostatní oddělení měli po 1, 2 nebo třech odběrech. Malé procento případů na interních odděleních může být způsobeno již in vivo u pacientů s těžkými hemolytickými anémiemi. Převážná většina však ukazuje na chyby v preanalytické fázi.

## **5 Závěr**

Tímto návrhem systému, kterým jsem získala statistiku počtu hemolýz pro jednotlivá oddělení je možné po upravení vzorce a filtrů zjistit počet lipémií i ikterity. Tyto údaje mohou být laboratoří sestavovány např. čtvrtletně a dále zpracovávány pro zpětnou vazbu laboratoře s oddělením. Společně s podáním informací o četnosti hemolytických vzorků lze upozornit na možné příčiny vzniku hemolýzy nebo opětovně edukovat sanitáře o správném zacházení se vzorky během transportu.

## 6 Použitá literatura

- Beňovská, M., M. Dastych, Z. Čermáková, J. Tůmová. 2010. *Preanalytické interference a praktické využití sérových indexů*. Klinická biochemie a metabolismus. 18(39). 144-148
- Čermáková, Marta, Irena Štěpánová. 2003. *Klinická biochemie 1.díl*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně. ISBN 80-7013-372-4
- Dastych, Milan, Petr Breinek et al.. 2008. *Klinická biochemie bakalářský obor Zdravotní laborant*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-4572-9
- Dastych, Milan. 2007. *Instrumentální technika obor zdravotní laborant*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-4226-1
- Doležalová, Věra et al.. 1995. *Principy biochemických vyšetřovacích metod I. část*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. ISBN 80-7013-206-X
- Dostál, Jiří, Hana Paulová, Jiří Slanina, Eva Tábořská. 2003. *Biochemie pro bakaláře*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-3232-4
- Glick, Melvin R., Kenneth W. Ryder, Shella A. Jackson. 1986. *Graphical Comparisons of Interferences in Clinical Chemistry Instrumentation*. Clinical chemistry. 32 (3)/1986 (dostupné v plné verzi v databázi PubMed)
- Guder, W.G., S. Narayanan, H. Wisser, B. Zawta. 2003. *Samples: From the Patient to the Laboratory*. Weinheim: Wiley VCH. ISBN 3-52730981-0
- Hrušková, Martina. 2010. *Ovlivnění imunochemických analýz v oboru klinická biochemie stavem biologického materiálu (hemolýza, ikterita, chylozita)*. Brno. Bakalářská práce. Lékařská fakulta Masarykova univerzita v Brně. Vedoucí bakalářské práce Jana Doležalová
- Jabor, Antonín, Miroslav Zámečník. 2005. *Preanalytická fáze 2005*. Praha: Česká společnost klinické biochemie ČLS JEP a SEKK spol. s.r.o.. ISBN 80-239-5198-X

Jindrová, Hana, Markéta Kajabová, Romana Calábková. 2012. *Vliv preanalytické fáze na biochemické laboratorní výsledky*. *Medicína pro praxi*. 9(3). 137-140.

Klouda, Pavel. 2000. *Základy biochemie*. Ostrava: Pavel Klouda. ISBN 80-86369-00-5

Kroll, Martin H., Ronald J. Elin. 1994. *Interference with Clinical Laboratory Analyses*. *Clinical chemistry*. 40 (11)/1994. (dostupné v plné verzi v databázi PubMed)

Ledvina, Miroslav, Alena Stoklasová, Jaroslav Cerman. a2004. *Biochemie pro studující medicíny I. díl*. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-0849-9

Ledvina, Miroslav, Alena Stoklasová, Jaroslav Cerman. b2004. *Biochemie pro studující medicíny II. díl*. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-0850-2

Lippi, G., G.L. Salvagno, M. Montagnana, G. Brocco, G.C. Guidi. 2006. *Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing*. *Clin Chem Lab Med*. 44 (3)/2006

Masopust, Jaroslav. 1991. *Požadování a hodnocení biochemických vyšetření – I*. Praha: Avicenum. ISBN 80-85047-04-7

Murray, Robert K. at al.. 1998. *Harperova biochemie*. Jinočany: H&H, 2. vydání v ČR

OKL. 2013. *Laboratorní příručka*. Rakovník: Masarykova nemocnice. 19.12.2013, verze 3. Dostupné také z:

[http://new.nemorako.cz/data/userfiles/file/okl/html/PDF/Vliv\\_serovych\\_indexu-\(RA2012\).pdf](http://new.nemorako.cz/data/userfiles/file/okl/html/PDF/Vliv_serovych_indexu-(RA2012).pdf)

Průša, Richard, Jana Čepová, Květoslava Petrtýlová. 2002. *Příručka laboratorních vyšetření*. Praha: Triton. ISBN 80-7254-273-7

Racek, Jaroslav et al.. 1999. *Klinická biochemie*. Praha: Galén. ISBN 80-7262-023-1

Roche Diagnostics. 2010. Příbalové informace jednotlivých metod pro analyzátor Cobas Integra 800. Roche Diagnostics, © 2010

Roche Diagnostics. 2004. *Cobas Integra 800 uživatelská příručka*. Roche diagnostics GmgH, © 2004

Roche. 2007. *Serum Indices: Reduction of clinical errors in laboratory medicine*. Germany, Mannheim: Roche Diagnostics GmbH. © 2007. Dostupné také z: [https://www.rochediagnostics.fr/Htdocs/media/pdf/actualites/2b\\_SI\\_Brochure\\_2007.pdf](https://www.rochediagnostics.fr/Htdocs/media/pdf/actualites/2b_SI_Brochure_2007.pdf)

Schneiderka et al.. 2000. *Kapitoly z klinické biochemie*. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-0140-0

Schumann G. et al.. 2010. IFCC reference procedures for measurement of the catalytic concentrations of enzymes: corrigendum, notes and useful advice. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine – IFCC Scientific Division. *Clin Chem Lab Med*. 48 (5)/2010

Siedel, Joachim, Edgar O. Hägele, Joachim Ziegenhorn, August W. Wahlefeld. 1983. *Reagent for the Enzymatic Determination of Serum Total Cholesterol with Improved Lipolytic Efficiency*. *Clinical Chemistry*. 29 (6)/1983

Tiffany, T.O., J.M. Jansen, C.A. Burtis, J.B. Overton, C.D. Scott. 1972. *Enzymatic kinetic rate and end-point analyses of substrate, by use of a GeMSAEC fast analyzer*. *Clinical chemistry*. 18 (8)/1972 (dostupné v plné verzi v databázi PubMed)

Tobiášková, Markéta. 2012. *Vliv chylozity a hemolýzy biologického materiálu na výsledky biochemických analýz*. Pardubice. Bakalářská práce. Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice. Vedoucí bakalářské práce Štěpánková Šárka

Trenčanská, Šárka. 2009. *Ovlivnění biochemických analýz stavem biologického materiálu*. Brno. Bakalářská práce. Lékařská fakulta Masarykovi univerzity v Brně. Vedoucí bakalářské práce Margita Cheníčková

Zima, Tomáš et al.. 2002. *Laboratorní diagnostika*. Praha: Galén. ISBN 80-7262201-3

Zima, Tomáš et al.. 2008. *Laboratorní metody*. Praha: ČLS JEP. ISBN 978-80-86998-28-2

## 7 Přílohy

Příloha č.1: Měření jednotlivých analytů v sérii po 10-ti bez vlivu hemolýzy.

Měření	Analyt								
	Urea	Kreat	KM	Na	K	Cl	Ca	Fe	BIL
	mmol/l	μmol/l	μmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	μmol/l	μmol/l
1.	2,90	63,00	238,40	135,30	4,51	104,30	2,44	17,10	3,80
2.	3,00	56,00	237,90	133,80	4,50	104,20	2,42	16,70	3,50
3.	3,00	62,00	236,50	135,00	4,51	104,00	2,44	16,40	3,60
4.	3,20	62,00	235,50	134,00	4,49	104,20	2,45	16,60	3,60
5.	3,00	60,00	236,70	134,80	4,51	104,50	2,45	16,70	3,20
6.	3,00	61,00	235,60	135,40	4,50	104,50	2,43	16,30	3,70
7.	2,90	60,00	236,70	135,10	4,51	104,10	2,45	16,60	3,70
8.	3,10	57,00	235,50	135,90	4,51	104,20	2,45	16,30	3,40
9.	3,00	62,00	236,20	135,20	4,50	103,90	2,43	16,50	3,30
10.	3,10	60,00	236,70	135,20	4,51	104,80	2,43	16,50	3,30
<b>Průměr</b>	3,020	60,300	236,570	134,970	4,505	104,270	2,439	16,570	3,510

Měření	Analyt								
	ALT	AST	GMT	ALP	AMS	CHOL	TG	PROT	ALB
	μkat/l	μkat/l	μkat/l	μkat/l	μkat/l	mmol/l	mmol/l	g/l	g/l
1.	0,25	0,38	0,19	0,93	0,88	4,13	1,63	67,80	41,50
2.	0,25	0,39	0,20	0,93	0,88	4,00	1,61	67,50	42,20
3.	0,25	0,40	0,22	0,93	0,88	4,07	1,61	67,80	41,80
4.	0,25	0,41	0,24	0,92	0,88	4,00	1,58	67,10	41,80
5.	0,25	0,38	0,22	0,92	0,87	4,04	1,60	67,20	41,50
6.	0,24	0,39	0,19	0,92	0,87	4,00	1,59	67,20	42,20
7.	0,26	0,38	0,21	0,94	0,87	4,01	1,60	67,60	41,90
8.	0,25	0,39	0,19	0,92	0,87	3,96	1,60	66,80	42,20
9.	0,25	0,38	0,19	0,95	0,88	4,04	1,59	67,50	41,80
10.	0,24	0,38	0,19	0,93	0,87	3,96	1,57	66,60	42,10
<b>Průměr</b>	0,249	0,388	0,204	0,929	0,875	4,021	1,598	67,310	41,900



**Příloha č.2: Měření jednotlivých analytů v sérii po 10-ti s vlivem hemolýzy**

Měření	Analyt								
	Urea	Kreat	KM	Na	K	Cl	Ca	Fe	BIL
	mmol/l	μmol/l	μmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	μmol/l	μmol/l
1.	3,00	66,00	234,60	135,10	5,58	103,00	2,45	18,90	3,70
2.	3,00	66,00	236,60	134,70	5,59	103,00	2,46	18,50	3,60
3.	3,10	66,00	234,90	134,50	5,55	103,00	2,44	18,40	3,90
4.	2,90	67,00	232,80	134,30	5,56	104,00	2,47	18,20	4,30
5.	2,90	65,00	232,80	134,50	5,55	103,00	2,43	18,00	3,70
6.	3,10	62,00	233,30	134,50	5,58	103,00	2,46	17,90	5,40
7.	2,90	64,00	233,30	134,50	5,59	103,00	2,44	17,90	3,30
8.	2,80	64,00	232,10	134,30	5,60	103,00	2,39	18,40	4,10
9.	2,90	62,00	234,50	134,30	5,56	103,00	2,45	18,00	4,20
10.	3,00	65,00	232,70	134,30	5,58	104,00	2,43	18,00	3,30
<b>Průměr</b>	2,960	64,700	233,760	134,500	5,574	103,200	2,442	18,220	3,950

Měření	Analyt								
	ALT	AST	GMT	ALP	AMS	CHOL	TG	PROT	ALB
	μkat/l	μkat/l	μkat/l	μkat/l	μkat/l	mmol/l	mmol/l	g/l	g/l
1.	0,31	1,10	0,26	0,70	0,89	4,33	1,74	72,50	42,00
2.	0,31	1,08	0,25	0,71	0,90	4,18	1,75	73,30	42,20
3.	0,31	1,08	0,27	0,69	0,89	4,26	1,74	71,90	41,90
4.	0,31	1,08	0,27	0,69	0,90	4,15	1,73	73,20	41,80
5.	0,31	1,08	0,24	0,68	0,90	4,28	1,72	72,10	41,60
6.	0,30	1,07	0,25	0,68	0,90	4,13	1,72	73,20	42,00
7.	0,31	1,10	0,27	0,68	0,91	4,26	1,74	71,60	41,50
8.	0,31	1,08	0,28	0,71	0,89	4,23	1,71	72,10	42,30
9.	0,30	1,08	0,25	0,69	0,88	4,25	1,72	72,20	41,80
10.	0,30	1,08	0,24	0,70	0,89	4,19	1,72	72,40	41,80
<b>Průměr</b>	0,307	1,083	0,258	0,693	0,895	4,226	1,729	72,450	41,890

**Příloha č.3: Měření jednotlivých analytů v sérii po 10-ti bez vlivu ikterity**

Měření	Analyt								
	Urea	Kreat	KM	Na	K	Cl	Ca	Fe	BIL
	mmol/l	μmol/l	μmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	μmol/l	μmol/l
1.	3,20	56,00	188,90	136,70	4,33	104,50	2,43	16,90	4,10
2.	3,50	57,00	194,60	136,90	4,34	104,70	2,43	17,10	5,00
3.	3,30	58,00	190,60	137,60	4,34	104,80	2,43	16,80	4,20
4.	3,50	56,00	192,80	137,50	4,35	104,50	2,43	16,90	5,40
5.	3,40	56,00	189,90	136,40	4,36	104,70	2,45	16,90	3,50
6.	3,40	57,00	192,30	137,10	4,35	104,90	2,43	16,60	5,00
7.	3,40	57,00	190,00	137,00	4,35	105,00	2,43	17,00	4,80
8.	3,40	55,00	193,90	136,80	4,35	105,10	2,40	15,60	4,60
9.	3,30	55,00	190,30	136,30	4,36	104,60	2,43	15,60	4,20
10.	3,30	56,00	192,80	136,30	4,35	104,80	2,42	15,60	4,50
<b>Průměr</b>	3,370	56,300	191,610	136,860	4,348	104,760	2,428	16,500	4,530

Měření	Analyt								
	ALT	AST	GMT	ALP	AMS	CHOL	TG	PROT	ALB
	μkat/l	μkat/l	μkat/l	μkat/l	μkat/l	mmol/l	mmol/l	g/l	g/l
1.	0,23	0,35	0,19	0,87	1,00	4,62	1,49	70,40	44,00
2.	0,23	0,34	0,18	0,87	0,98	4,58	1,49	69,70	43,00
3.	0,23	0,34	0,20	0,87	1,00	4,51	1,50	70,10	43,90
4.	0,22	0,33	0,19	0,86	0,98	4,59	1,49	69,80	43,80
5.	0,23	0,34	0,20	0,86	0,98	4,53	1,48	69,70	43,00
6.	0,23	0,33	0,22	0,86	0,99	4,59	1,49	69,30	43,70
7.	0,22	0,33	0,20	0,87	0,97	4,49	1,49	70,10	42,80
8.	0,22	0,34	0,19	0,87	0,98	4,54	1,49	69,90	43,40
9.	0,22	0,34	0,18	0,86	0,97	4,50	1,49	69,80	42,90
10.	0,24	0,34	0,22	0,88	0,97	4,55	1,48	69,90	43,00
<b>Průměr</b>	0,227	0,338	0,197	0,867	0,982	4,550	1,489	69,870	43,350

**Příloha č.4:** Měření jednotlivých analytů v sérii po 10-ti s vlivem ikterity

Měření	Analyt								
	Urea	Kreat	KM	Na	K	Cl	Ca	Fe	BIL
	mmol/l	μmol/l	μmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	μmol/l	μmol/l
<b>1.</b>	2,30	30,00	127,70	126,00	2,93	99,60	1,78	16,60	99,70
<b>2.</b>	2,10	28,00	126,40	126,00	2,90	98,90	1,78	16,50	100,60
<b>3.</b>	2,20	28,00	126,40	126,30	2,90	99,10	1,80	16,00	102,00
<b>4.</b>	2,30	28,00	127,10	126,50	2,90	98,90	1,79	16,00	99,20
<b>5.</b>	2,20	28,00	126,60	126,80	2,89	99,10	1,81	15,80	102,20
<b>6.</b>	2,20	28,00	127,20	126,90	2,88	99,00	1,78	15,90	100,30
<b>7.</b>	2,20	26,00	126,40	126,30	2,89	99,00	1,81	16,00	101,80
<b>8.</b>	2,40	25,00	125,40	126,70	2,89	99,20	1,79	16,00	101,10
<b>9.</b>	2,30	27,00	126,50	126,90	2,91	98,90	1,82	15,70	100,00
<b>10.</b>	2,30	25,00	124,80	127,30	2,91	99,30	1,78	15,90	99,30
<b>Průměr</b>	2,250	27,300	126,450	126,570	2,900	99,100	1,794	16,040	100,620

Měření	Analyt								
	ALT	AST	GMT	ALP	AMS	CHOL	TG	PROT	ALB
	μkat/l	μkat/l	μkat/l	μkat/l	μkat/l	mmol/l	mmol/l	g/l	g/l
<b>1.</b>	0,18	0,31	0,24	0,76	0,91	3,98	1,25	63,60	41,70
<b>2.</b>	0,17	0,31	0,22	0,75	0,91	3,99	1,24	63,00	41,50
<b>3.</b>	0,18	0,33	0,21	0,76	0,91	3,94	1,24	63,70	41,90
<b>4.</b>	0,17	0,32	0,23	0,75	0,91	3,96	1,26	63,40	42,00
<b>5.</b>	0,17	0,31	0,22	0,74	0,90	3,92	1,24	63,30	41,80
<b>6.</b>	0,17	0,31	0,28	0,74	0,91	3,94	1,24	63,40	41,60
<b>7.</b>	0,17	0,32	0,22	0,74	0,90	3,89	1,24	62,70	41,70
<b>8.</b>	0,18	0,32	0,23	0,74	0,90	3,94	1,24	63,20	41,50
<b>9.</b>	0,17	0,31	0,24	0,74	0,90	3,94	1,23	63,70	41,50
<b>10.</b>	0,18	0,31	0,25	0,76	0,91	3,89	1,23	63,40	41,60
<b>Průměr</b>	0,174	0,315	0,234	0,748	0,906	3,939	1,241	63,340	41,680

**Příloha č.5: Měření jednotlivých analytů v sérii po 10-ti bez vlivu chylozity**

Měření	Analyt								
	Urea	Kreat	KM	Na	K	Cl	Ca	Fe	BIL
	mmol/l	μmol/l	μmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	μmol/l	μmol/l
1.	3,90	56,00	220,00	138,70	4,69	106,00	2,50	17,60	3,30
2.	3,90	58,00	220,30	138,90	4,69	106,40	2,42	17,90	3,90
3.	4,00	58,00	217,50	138,90	4,68	106,10	2,49	17,90	4,00
4.	3,90	57,00	218,10	139,10	4,70	106,10	2,45	18,00	4,30
5.	4,00	58,00	216,30	138,70	4,67	106,40	2,49	17,60	3,90
6.	3,90	60,00	217,50	139,10	4,70	106,60	2,46	17,90	4,00
7.	4,00	57,00	215,10	138,30	4,69	106,50	2,48	17,70	3,30
8.	3,90	60,00	218,60	139,00	4,69	106,60	2,45	17,90	4,00
9.	4,20	55,00	216,40	139,00	4,66	106,40	2,49	17,70	3,90
10.	4,00	61,00	217,50	138,70	4,68	106,60	2,43	17,90	3,50
<b>Průměr</b>	3,970	58,000	217,730	138,840	4,685	106,370	2,466	17,810	3,810

Měření	Analyt								
	ALT	AST	GMT	ALP	AMS	CHOL	TG	PROT	ALB
	μkat/l	μkat/l	μkat/l	μkat/l	μkat/l	mmol/l	mmol/l	g/l	g/l
1.	0,30	0,35	0,21	0,84	1,00	5,01	1,35	70,70	42,60
2.	0,31	0,35	0,21	0,84	0,99	5,03	1,34	70,50	42,70
3.	0,30	0,36	0,22	0,84	1,00	5,01	1,34	70,40	42,80
4.	0,31	0,36	0,23	0,84	0,99	5,04	1,34	70,70	43,00
5.	0,32	0,35	0,20	0,85	0,99	5,02	1,34	70,40	42,80
6.	0,31	0,36	0,22	0,84	0,99	4,97	1,34	70,80	43,00
7.	0,30	0,36	0,23	0,84	0,99	5,01	1,34	70,70	43,10
8.	0,32	0,36	0,22	0,84	0,99	4,96	1,34	70,90	42,60
9.	0,31	0,36	0,21	0,84	1,00	5,03	1,32	71,10	42,80
10.	0,31	0,35	0,19	0,85	0,99	5,04	1,34	70,60	42,50
<b>Průměr</b>	0,309	0,356	0,214	0,842	0,993	5,012	1,339	70,680	42,790

**Příloha č.6: Měření jednotlivých analytů v sérii po 10-ti s vlivem chylozity**

Měření	Analyt								
	Urea	Kreat	KM	Na	K	Cl	Ca	Fe	BIL
	mmol/l	μmol/l	μmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	μmol/l	μmol/l
1.	3,80	51,00	213,40	133,20	4,52	104,20	2,43	17,90	4,10
2.	3,70	49,00	211,10	136,20	4,53	103,90	2,43	17,60	5,30
3.	3,90	52,00	211,70	136,20	4,53	103,90	2,40	17,80	4,50
4.	3,80	50,00	209,40	136,00	4,53	103,90	2,42	17,60	4,10
5.	4,00	55,00	210,10	136,30	4,54	104,00	2,42	17,50	4,70
6.	4,00	49,00	210,50	136,40	4,53	103,80	2,43	17,60	4,70
7.	3,80	50,00	210,70	135,60	4,53	104,00	2,41	17,20	3,80
8.	3,90	53,00	209,20	136,70	4,56	104,20	2,45	17,50	4,40
9.	3,90	51,00	209,60	136,50	4,54	104,00	2,42	17,30	4,40
10.	3,90	54,00	209,90	137,10	4,54	103,90	2,43	17,30	4,60
<b>Průměr</b>	3,870	51,400	210,560	136,020	4,535	103,980	2,424	17,530	4,460
<b>Po odečtení naředění</b>	3,999	53,113	217,58	140,55	4,6862	107,45	2,5048	18,114	4,6087

Měření	Analyty								
	ALT	AST	GMT	ALP	AMS	CHOL	TG	PROT	ALB
	μkat/l	μkat/l	μkat/l	μkat/l	μkat/l	mmol/l	mmol/l	g/l	g/l
1.	0,30	0,35	0,21	0,82	0,97	4,99	5,34	68,10	41,90
2.	0,28	0,36	0,22	0,81	0,99	4,93	5,39	67,80	41,40
3.	0,28	0,34	0,20	0,81	0,98	4,83	5,33	67,50	41,20
4.	0,28	0,33	0,21	0,81	0,99	4,91	5,27	67,90	41,30
5.	0,28	0,35	0,19	0,82	0,97	4,93	5,29	67,30	41,60
6.	0,28	0,34	0,19	0,80	0,99	4,86	5,28	67,60	41,30
7.	0,28	0,36	0,21	0,84	0,98	4,92	5,29	67,80	41,30
8.	0,28	0,35	0,18	0,80	0,99	4,94	5,25	67,40	41,20
9.	0,28	0,35	0,23	0,84	0,97	4,80	5,28	66,90	40,80
10.	0,28	0,34	0,21	0,81	0,98	4,83	5,28	68,00	41,30
<b>Průměr</b>	0,282	0,347	0,205	0,816	0,981	4,894	5,300	67,630	41,330
<b>Po odečtení naředění</b>	0,2914	0,3586	0,2118	0,8432	1,0137	5,0571	5,4767	69,884	42,708

