



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

**Možnosti eliminace interferencí u biochemických
vyšetření se zaměřením na lipemické vzorky**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Monika Česánková

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Nix, Ph.D.

České Budějovice 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Možnosti eliminace interferencí u biochemických vyšetření se zaměřením na lipemické vzorky jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne 2. 5. 2018

.....
Monika Česánková

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala svému školiteli Ing. Tomáši Nixovi, Ph.D. za trpělivost, ochotu a rady při psaní bakalářské práce. Chtěla bych poděkovat i Ing. Kláře Jandové, vedoucí biochemické laboratoře ve Strakonické nemocnici, za odbornou pomoc při zvládnutí praktických metod a též při psaní rešerše. Dále bych ráda poděkovala především svému manželovi a celé své rodině za podporu po celou dobu mých studií.

Možnosti eliminace interferencí u biochemických vyšetření se zaměřením na lipemické vzorky

Abstrakt

Předkládaná bakalářská práce se zabývá charakteristikou celkové biochemické laboratorní analýzy při stanovování vyšetření a možnými laboratorními chybami, které mohou nastat. V teoretické části jsem popsala nejčastější interference v lidském séru při biochemickém stanovení. Je zde kladen důraz na lipemické vzorky, u nichž se zaměřuji na eliminaci sérových interferencí.

V současné době se při této problematice využívá proces vyčeřování. Nejpřístupnější a technicky nejjednodušší je využití vyčeřovacího systému LipoClear. Tento systém by měl umožnit vyčeření a následné měření i silně chylózních vzorků a poskytnout spolehlivé výsledky u řady analytů. V příbalovém letáku systému LipoClear je známo 19 analytů, při jejichž stanovení se nijak výrazně neliší výsledky získané analýzou čirých sér a po použití LipoClearu. V klinických laboratořích se rutinně stanovuje řada analytů, která v příbalové dokumentaci výrobce není uvedena a díky tomu laboratoři nezbyvá, než si účinnost v těchto případech ověřit vlastním experimentem.

V praktické části je zjišťováno, zda tento systém je použitelný při stanovení lipázy a C-reaktivního proteinu. Na analyzátoru Advia 1800 od společnosti Siemens byly změřeny koncentrace vybraných analytů. Dále jsem vypočetla a srovnala výtěžnosti a míru účinnosti z vyměřených hodnot koncentrací analytů před a po vyčeření lipoproteinů systémem LipoClear.

Cíle práce byly dle očekávání naplněny a bylo potvrzeno, že lipáza lze stanovovat, ale CRP nikoliv.

Klíčová slova

Chylózní (lipemické) sérum; preanalytická část analýzy; vyčeřování; lipáza; C-reaktivní protein

Possibilities of elimination of interferences in biochemical examination with a focus on lipemic samples

Abstract

This bachelor thesis deals with the characteristic of the overall biochemical laboratory analysis in determining the examination and possible laboratory errors that may occur. In the theoretical part, I described the most frequent interferences in human serum at biochemical determination. There is emphasis on lipemic samples, where I focus on the elimination of serum interferences.

At this time, the process of cleansing is being used in this issue. The most accessible and technically simplest is to use the LipoClear Cleansing System. This system should allow clearing and subsequent measurement of highly chylous specimens and provide reliable results for a range of analytes. There are 19 analytes known in the LipoClear package insert, which do not differ significantly in the results obtained with clear serum analysis and LipoClear. Clinical laboratories are routinely determined by a number of analytes, which are not listed in the manufacturer's package leaflet, leaving the laboratory free to check their efficacy in these cases by their own experiment.

In the practical part, it is determined whether this system is applicable to the determination of lipase and C-reactive protein. On the analyser Advia 1800 from Siemens the concentrations of selected analytes were measured. I further calculated and compared the yields and efficacy rates from the measured values of analyte concentrations before and after lipoprotein cleansing by the LipoClear system.

The goals of the work were as expected, and it was confirmed that lipase can be determined, but CRP does not.

Key words

Chylose (lipemic) serum; the pre-analytical part of the analysis; cleansing; lipase; C-reactive protein

Obsah

ÚVOD	8
TEORETICKÁ ČÁST	9
1 Biologický materiál.....	9
1.1 Krevní sérum	9
1.2 Krevní plasma.....	9
2 Vyšetření biologického materiálu	10
2.1 Preanalytická fáze – mimolaboratorní	10
2.1.1 Vliv přípravy pacienta na odběr	13
2.1.2 Vlastní odběr vzorku	14
2.1.3 Transport materiálu do laboratoře	15
2.2 Preanalytická fáze – laboratorní	16
2.3 Analytická fáze	17
2.4 Postanalytická fáze	19
3 Stav biologického materiálu	21
3.1 Hemolýza ve vzorku.....	21
3.1.1 Rozdělení hemolýzy	21
3.1.2 Vliv hemolýzy na biochemické analýzy	22
3.2 Ikterita ve vzorku.....	23
3.2.1 Vliv hyperbilirubinémie na biochemické analýzy	24
3.2.2 Rozdělení hyperbilirubinémie.....	24
3.3 Chylozita ve vzorku.....	26
3.3.1 Vliv chylozity na biochemické analýzy	28
4 Vybrané analyty pro experiment.....	29
4.1 Lipáza	29
4.2 C-reaktivní protein.....	30
PRAKTICKÁ ČÁST	31
5 Cíl práce a hypotézy	31
6 Metodika	32
6.1 Princip stanovení vybraných analytů.....	32
6.2 Instrumentace	34
6.3 Biologický materiál pro použití k experimentu.....	37
6.4 Chemický materiál pro použití k experimentu	37

6.5 Pomůcky	38
6.6 Postup při experimentálním stanovení LipoClearem	39
7 VÝSLEDKY	41
7.1 Výtěžnost.....	41
7.2 Korelační koeficient	41
7.3 Výsledky z vyšetření lipázy.....	42
7.4 Výsledky z vyšetření C-reaktivního proteinu.....	44
8 DISKUSE.....	46
9 ZÁVĚR.....	48
SEZNAM LITERATURY	49
Seznam zkratk.....	53

ÚVOD

Výběrem tohoto tématu bych ráda v teoretické části poukázala na problematiku týkající se preanalytických chyb u biochemických vyšetření a jejich možného odstranění.

V odborných textech je uváděno, že množství preanalytických chyb představuje celkově 50 – 70 % všech chyb při laboratorním vyšetření. Právě v této části laboratorního vyšetření se vyskytují důvody, proč k interferencím a zejména k chylozitě (lipémii) dochází.

Dále se bakalářská práce bude zabývat především endogenními interferencemi v lidském séru, jakými jsou hemolýza, ikterita a lipémie (chylozita). Blíže se budeme zajímat o lipémii u konkrétních biochemických vyšetření, kde bude proveden vyčerovací experiment systémem LipoClear, v němž budou hrát roli analyty – lipáza a C-reaktivní protein. Výrobce této metody uvádí v příbalovém letáku výtěžnost C-reaktivního proteinu pouhých 9 %, naopak lipáza uvedena není, takže je zde možnost pokusit se ověřit si pravdivost a použitelnost těchto měření.

Důvod výběru těchto analytů je ten, že jsou požadovány lékaři jako jedny z prvotních důležitých vyšetření z hlediska klinického významu.

Cílem teoretické části bude popis nejčastějších interferencí při biochemickém stanovení s důrazem na lipémii. Bude popsán princip stanovení a klinický význam vybraných analytů, u kterých bude sledována použitelnost systému LipoClear.

V praktické části bakalářské práce bude proveden experiment vyčerovací metody při použití systému LipoClear. Účelem bude zjištění použitelnosti této metody na vzorcích sér pacientů pro konkrétní biochemické vyšetření.

TEORETICKÁ ČÁST

1 Biologický materiál

V klinických laboratořích je převážně vyšetřována krev, hlavně plná, nesrážlivá krev, krevní sérum a krevní plazma. Dále jsou to vzorky moče, nativní nebo sbírané za určité časové období, méně často punktáty, mozkomíšni mok, zřídka sliny, žaludeční obsah a stolice. Bakalářská práce bude zaměřena na interference v lidském séru.

1.1 Krevní sérum

Krevní sérum je čirá, nažloutlá tekutina, bez buněčných elementů, získaná centrifugací z plné srážlivé žilní krve. Zkumavka srážlivé krve se nejprve nechá po dobu 30 – 45 minut odstát, aby došlo ke koagulaci krve. Za běžných podmínek je sérum nažloutlá tekutina, vzhledem podobná krevní plazmě, ale s rozdílným složením. Neobsahuje fibrinogen, což je protein, účastní se koagulačního srážecího procesu, dále některé koagulační faktory (I, II, VIII a XIII), které jsou spotřebovávány v průběhu srážení (Trojan, 2003).

1.2 Krevní plazma

Krevní plazma je tekutá, mírně opaleskující koloidní složka krve, sestávající se z vody, organických a anorganických látek, zejména živin, proteinů, hormonů, elektrolytů (minerálů), a dalších. Na rozdíl od krevního séra, plazma obsahuje fibrinogen. Nedílnou součástí krevní plasmy je příměs rozpuštěných krevních plynů (CO_2 , O_2). Rozpad erytrocytů v krevní plazmě má za následek samotné zabarvení krevní plasmy do bledě žluta, a to díky přítomnosti vzniklých barviv (Trojan, 2003).

V lidském těle se vyskytuje přibližně 2,8 - 3,5 l (40 - 45 ml/kg hmotnosti) krevní plasmy. Z celkové extracelulární tekutiny představuje podíl plasmy 25 % spolu s lymfou. Obsah vody v plazmě činí 91 - 92 %, zbytek jsou rozpuštěné látky. Za fyziologických podmínek je složení krevní plasmy neměnné, více než 70 % plasmy se vymění intersticiální tekutinou za 1 minutu. Její pH je $7,4 \pm 0,04$, neboli $[\text{H}^+]$ 40 nmol/l. Osmolarita se pohybuje v rozmezí 280 – 300 mOsm/l. Funkce plasmy nespočívá pouze v transportu látek mezi různými orgány a v nosičství krevních elementů. Další významnou funkcí je regulace acidobazické a osmotické rovnováhy (Trojan, 2003).

2 Vyšetření biologického materiálu

Když pacienta postihne určitá nemoc, či má nějaké zdravotní potíže, tak navštíví příslušného lékaře. Lékař stanoví diagnózu a navrhne, aby pacient podstoupil mimo jiné i laboratorní vyšetření k průkazu jednotlivých analytů. Lékař vypíše požadavky na žádanku, zdravotní sestra dle požadavků vybere vhodné odběrové zkumavky a jehly, odebere pacientovi materiál a tento materiál se žádankou zašle do sjednané laboratoře.

2.1 Preanalytická fáze – mimolaboratorní

V celkové diagnostice hraje klíčovou roli právě preanalytická část vyšetření. Jestliže vznikají chyby v preanalytické části, má laboratoř určitý podíl zodpovědnosti na jejich odstranění. Tyto chyby mají výraznou incidenci, jak publikoval Bonini et al. z r. 2002 ve svém článku. Uvedl v nich seznam dostupných prací, které hodnotily laboratorní chyby. Píše, že v preanalytické části bylo v šesti studiích odhaleno 31,6 – 75 % chyb. Carraro (2007) se zabýval chybami ve statimovém režimu, kde detekoval 61,9 % chyb.

Nejčastějšími chybami v mimolaboratorní preanalytice byly nesprávné zvolení odběrové zkumavky, malé množství materiálu ve zkumavce, prázdné odběrové zkumavky, špatné identifikace pacientů a chyby u požadavků na jednotlivá vyšetření (Carraro, 2007).

Hlavními body při chybování podle Hawkinse (2012) zahrnovaly nesprávná zvolení vyšetření, špatné identifikace pacienta, chyby při odběru materiálu, nevhodná zacházení se vzorkem a transport. Procentuálně to vycházelo na 46 – 68 % chyb z celkového procesu.

Na pacienta působí řada nepříznivých vlivů vůči laboratornímu vyšetření. Když pohlédneme na osobu pacienta jako takovou, uvidíme činitele, kterým se dá nebo nedá nějak předcházet. Podle toho se rozdělují na faktory neovlivnitelné a ovlivnitelné (Racek, 1999).

Neovlivnitelné faktory

- Pohlaví – čili rozdíly mezi mužem a ženou jsou vykazující u složení krevního obrazu, kde každý má jiné fyziologické koncentrace hemoglobinu nebo odlišné množství červených krvinek (Racek, 1999).

- Věk – zde jsou patrné rozdíly v referenčních mezích mezi dětmi a dospělými. Děti mají nižší horní referenční meze a například nacházíme u nich pozitivní dusíkatou bilanci kvůli přítomnosti dusíkatých katabolitů. Naopak vyšší aktivitu mají kyselé a alkalické fosfatázy a také kvůli rychlejší tvorbě kostí vyšší koncentrace fosforu, než jako tomu je u dospělých. Clearance kreatininu je vypovídající pouze když se bude brát v úvahu i tělesná hmotnost dítěte, v lepším případě povrch těla (Racek, 1999).
- Rasa – u negroidní rasy bylo prokázáno výrazně nižší množství granulocytů, než u rasy bílé. Rasy se mezi sebou liší i v koncentracích AMS nebo CK (Racek, 1999).
- Cyklické změny – mohou být zřejmé v průběhu dne i měsíce. Například koncentrace kortizolu přes den či hormony v menstruačním cyklu (Racek, 1999).
- Gravidita – při těhotenství se v moči a krvi objevuje vyšší množství bílkovin. To zapříčiňuje trofoblast, který iniciuje produkci i jiných látek. Také orgány vyvíjejícího se plodu vytváří řadu látek, jako například hormonů hCG, transkripční faktor SP-1, glykoprotein AFP, placentární ALP, estrogény a další. Ve třetím trimestru se zvyšuje cholesterolemie. Koncentrace hemoglobinu se snižuje díky hemodiluci, což má za následek zvýšení glomerulární filtrace, která dále ovlivní koncentraci urey a kreatininu jejich snížením (Racek, 1999).
- Další nemoc – pokud zároveň u pacienta jsou i další onemocnění, o jejichž existenci ošetřující lékař zatím neví a pacient se léčí i u jiného lékaře, ve výsledcích laboratorního vyšetření se vyskytují i další odchylky od normálních hodnot. Příkladem může být u chronické aktivní hepatopatie výskyt vyšších koncentrací ALT a AST jako u infarktu myokardu. Dalším důkazem je u pacienta s revmatoidní artritidou přírůstek koncentrace CRP. Pokud jsou takto postižení pacienti léčeni s bolestí na hrudi při podezření na infekci, je zde riziko špatných závěrů (Racek, 1999).
- Biologický poločas stanovované látky – je nezbytné za akutních stavů pacienta zvážit i biologický poločas. Když pacient trpí dlouhotrvající deficiencí a nevyvážeností potravy, je mu umožněno užít jakýkoli bílkovinný negativní reaktant, např. albumin, který má poměrně dlouhý biologický poločas. Oproti tomu transferin nebo prealbumin mají krátký biologický poločas a je vhodné je použít při krátkodobých stavech. Při infarktu myokardu se hodnotí aktivity enzymů a hladiny svalových proteinů v séru. Pokud se zvolí nesprávný test, je možné získat falešně negativní výsledek. Povědomí o látkách a jejich

schopnostech se určitou rychlostí vylučovat z těla pacienta je příležitostí ke správnému vyhodnocování hladin léku a toxických látek. Říká se tomu poločas eliminace xenobiotik (Racek, 1999).

- Způsob stanovení referenčních hodnot – vyskytují se pacienti, kteří mají hodnoty kolem referenčních rozmezí a přitom jsou zdraví. Uvádí se, že jejich výskyt je přibližně 5 %. Lékař, když vidí jakýkoli výsledek mimo stanovená fyziologická rozmezí, považuje jej za patologický (Racek, 1999).

Ovlivnitelné faktory

- Fyzická námaha – díky nadměrnému pohybu se přesunuje tekutina z cévního řečiště do mezitkáňového prostoru, přitom dochází ke zkoncentrování krve a v séru se zvyšuje koncentrace celkové bílkoviny, látky s bílkovinou spojenými, hemoglobin a hematokrit. Při pohybové aktivitě se relaxují svalové bílkoviny do krve - CK, AST, LD a myoglobin. Jestliže pacient vykoná krátkodobou fyzickou zátěž, anaerobní, klesá hodnota pH krve a narůstá koncentrace laktátu. Dalším příklad nastává při tzv. „centralizaci“ cirkulující krve, kde klesá clearance kreatininu a naopak stoupá močovina a do moči se vyplavují proteiny, erytrocyty a cylindrické válce. Zároveň se indikuje výskyt sekundárního hyperaldosteronismu, který vykazuje snížený poměr $U\text{-Na}^+ / U\text{-K}^+$. Je ovlivněn i metabolismus lipidů, kde se snižuje koncentrace TAG v séru, zvyšuje se HDL cholesterol a volné mastné kyseliny. Též koncentrace glykémie roste, ale po spotřebování glykogenových zdrojů klesá až do doby, kdy se místo cukrů začnou spotřebovávat lipidy (tělesný tuk) a vzniká ketonémie a ketonurie. Ještě se při vyšší fyzické aktivitě mění hladiny hormonů (Racek, 1999).

- Psychika a stres – hodně lidí se obává odběru krve, operativních výkonů nebo i jen návštěvy lékaře. Při stresu se vyplavují hormony nadledvin (z kůry i dřene) a ovlivňují metabolismus, zejména se zvýší hladina glykémie či koncentrace volných mastných kyselin. Také ledviny a GIT jsou vůči stresu citlivější, co se týče jejich fyziologických funkcí (Racek, 1999).

- Potrava, tekutiny a alkohol – jednak se po požití potravy zvyšují hladiny lipoproteinů (viz podkap. 2.1.1 Vliv přípravy pacienta na odběr), dále se v séru zvyšuje močovina a kyselina močová, zvýší se aktivita ALP při sněžení tučné potravy u osob s krevní skupinou 0 Lewis pozitivní. Po jídle také klesá koncentrace fosforu. Co se týká moče,

pokud pacient požije zeleninu či ovoce, moč se stává zásaditější, naopak když sní maso a tučná jídla – moč se okyseluje. U pacienta, který nedodrží pitný režim, se krev zkoncentruje a bude bohatá na celkovou bílkovinu, zvýší se hemoglobin a hematokrit. Alkohol má za následek zvýšení TAG (to je popsáno v podkap. 2.1.1), indikuje vyplavení jaterních enzymů (ALT, AST, GMT), způsobí hypoglykémii a také poruší vylučování kyseliny močové z ledvin (Racek, 1999).

- Kouření – má za následek zvyšování karbonylhemoglobinu a hladin thiokyanatanů v krevním séru. Kouřícím pacientům je bezúčelné vyšetřovat žaludeční sekreci. Dopad kuřáctví na řadu laboratorních vyšetření je málo význačný, procentuálně se tento vliv pohybuje v rozmezí $\pm 10\%$. Příkladem může být zvýšení fibrinogenu, hemoglobinu a karcinoembryonálního antigenu. Ještě je popsán vliv na hladiny teofilinu a jeho rychlost přeměny v krvi. Dále kouření pomocí volných radikálů zvyšuje oxidaci LDL a naopak snižuje koncentraci vitamín C v krvi (Racek, 1999).

- Léky – vliv léčiv se dělí na dva způsoby – prvním je, že ovlivňuje přeměnu stanovované látky (rychlost; spojování na transportní bílkovinu), druhým způsobem je, že interferuje vlastní reakce (Racek, 1999)

- Operace – Při operačních výkonech je podáváno narkotikum, jehož účinkem mimo jiné také ovlivňuje biochemické testování. Porušením svalové tkáně při řezu a zároveň při zhmoždění se uvolňují svalové bílkoviny (CK, AST, LD a myoglobin) jako tomu je u pohybové zátěže. Současně před a při zákroku má pacient stres a jeho hormonální odpověď zvýší hladinu koncentrací bílkovin akutní fáze (Racek, 1999).

Preanalytická mimolaboratorní část analýzy nezasahuje do vlastní analýzy biologického materiálu. Jedná se o přípravu pacienta k odběru vzorku, samotný odběr vzorku, zápis identity pacienta na vzorek, fáze pokračuje transportem do laboratoře, kde končí předáním materiálu se žádankou odpovědnému laboratornímu pracovníkovi (Dastyh et al., 2015).

2.1.1 Vliv přípravy pacienta na odběr

Existuje mnoho faktorů, které mají v preanalýze vliv na výsledek laboratorního vyšetření. Proto musí být zajištěna prevence těchto preanalytických chyb, jejich monitorování a postupné opravování (Dastyh et al., 2015).

Pacient by měl být poučen, jak se chovat před odběrem vzorku. Standardně se uvádí provádět odběr ráno po probuzení a nalačno. Dále:

- Je nutné, aby byl před odběrem lačný. Pokud by nedodržel hladovění, v krvi se objevují zvýšené hodnoty glykemie a triacylglycerolů.
- Neměl by vykonávat vyšší fyzickou zátěž, tzn. vyhnout se posilování, cyklistice, běhu, atd. Tito pacienti mohou mít zvýšené hodnoty myoglobinu, AST, CK.
- Měl by se vyvarovat požití alkoholových nápojů. Následkem je opět zvýšení triacylglycerolů a možnost docílení k chyloznímu séru, což bude rozebráno později (Dastyh et al., 2015).

2.1.2 Vlastní odběr vzorku

Každý pacient by měl před odběrem biologického materiálu podepsat **informovaný souhlas**. Pouhé poskytnutí zdravotnické pomoci lékařem nebo zdravotním pracovníkem nestačí. Aby se zabránilo protiprávnímu jednání, byl vytvořen informovaný souhlas. Informovaný souhlas je svobodný a zahrnuje souhlas pacienta k poskytnutí lékařské péče, což je podmínkou k poskytnutí pomoci lékařem a zároveň je ve shodě *lege artis* (Zákon č. 372/2011 Sb. o zdravotních službách...).

Odběr venózní krve

Nejčastěji je prováděn odběr z místa loketní žíly. Při odběru záleží na poloze pacienta. Pokud je pacient ve vertikální poloze, v těle se přesouvá tekutina z intravazálního prostoru do intersticiálního. V této situaci dochází ke zvyšování koncentrací hematokritu a vysokomolekulárních látek (a látek na ně vázaných) v krvi až o 10 – 15 %. Vhodnější variantou je odběr v horizontální poloze – vleže, avšak nejpočetněji je odebírána krev vsedě (Racek, 1999).

Další součástí odběru je i nutná dezinfekce kůže před odběrem. Alkoholový dezinfekční prostředek zkreslí výsledek vyšetření koncentrace alkoholu v krvi, takže koncová hodnota může vykazovat falešnou pozitivitu. Jestliže se potká i malé množství krve s dezinfekční látkou, která bude povrchově aktivní, dojde k hemolýze krve (Racek, 1999).

Stažení a tzv. cvičení paží by nemělo být dlouhé, jelikož při tomto aktu se přemísťuje tekutina z cévního řečiště do intersticia, kde, jak už bylo popsáno, se zvyšuje koncentrace vysokomolekulárních látek v odebrané krvi. Udává se, že až o 10 %. Ve stažené paži

dochází i k anaerobnímu metabolismu a jako reakce se projeví acidóza. Zvýší se hladiny laktátu a kalia až o 20 %, aktivita CK až o 10 % (Racek, 1999).

Pokud zdravotní sestra vyvine přílišný podtlak při nasávání krve do odběrové zkumavky, směřuje tím k mechanické hemolýze (Racek, 1999).

Odebírání krve pacienta ze zavedené jehly v době, kdy mu kape infuze, či z kanyly, ve které je tzv. heparinová zátka, je považováno za největší chyby, pokud není odpuštěno dostatečné množství krve před jejím naplněním do zkumavky. Jestliže se tomu tak stane, je nutnost použití jiné žíly (Racek, 1999).

Odběr arteriální krve

Arteriální krev se získává punkcí arterie a pomocí kanyly. Slouží k analýze krevních plynů (O_2 , CO_2) a acidobazické rovnováhy (ABR). Je velice důležité provádět odběr za anaerobních podmínek. Arteriální krev se odebírá do stříkačky s antikoagulans heparinátém lithným a také do kapiláry, ve které by se neměly pro správnost výsledků vyskytnout bubliny. Ty by mohly zvýšit výsledky pO_2 až o 5 kPa (Racek, 1999; Dastych et al., 2015).

Arterializovaná kapilární krev má největší význam při odběru dobře prokrvené periferní krve. Výsledky odběru krve z ušního lalůčku a arteriální krve jsou téměř stejné ve srovnání s náběrem z prstu, který byl dobře prokrvený - zde nalézáme pO_2 nižší až o několik kPa, než při odběru z tepny (Racek, 1999).

Odběr kapilární krve

Kapilární krev se využívá ke stanovení glykémie, přičemž se přidává NaF, aby se zabránilo enzymové glykolýze (Dastych et al., 2015).

Kapilární krev je odebírána z prstu. Zde se může vyskytnout problém hemolýzy. Ta vzniká při delším styku krve s dezinfekčním činidlem, anebo pokud zdravotní sestra příliš vytlačuje krev z místa vpichu, a díky tomu dochází s naředění krve tkáňovým mokem (Racek, 1999).

2.1.3 Transport materiálu do laboratoře

Dalším krokem je nutnost odebraný materiál s požadavky dopravit do příslušné laboratoře. Uzavřený materiál je odnesen či odvezen sjednanou osobou, nebo poslán

potrubní poštou. Potrubní pošta má následující nevýhody – rychlost patron, dobrzd'ování, narážení do stěn potrubí, vibrace, atd. Následkem může být mechanické poškození biologického materiálu, výskyt hemolýzy. Pokud se materiál musí transportovat z větších vzdáleností, je potřeba dbát na teplotu přepravy a čas přepravy (Dastyh et al., 2015).

Jak píše Friedecký (2010) ve svém článku, je nutno používat k transportu termoboxy, připravené vytemperováním na požadované teploty a také by v nich přepravované vzorky měly být upevněny tak, aby se předcházelo neprospěšným nárazům.

V zimním období je nutno předcházet znehodnocení materiálu zmrznutím a v letních měsících přehřátím vzorků. Dalším parametrem je monitorování času přepravy a jeho účast na času odezvy laboratorního vyšetření. Doba odezvy (zkr. TAT = turne around time) je čas, za který musí být zhotoven výsledek laboratorního vyšetření. Doba odezvy se dále rozlišuje na laboratorní a celkový. Laboratorním časem odezvy rozumíme dobu od příjmu vzorku po vydání výsledku laboratoři; celkovým časem rozumíme dobu od odběru biologického materiálu po vydání výsledku ošetřujícímu lékaři. Existuje ještě tzv. rozšířený čas odezvy, který udává dobu od odběru vzorku po reakci ošetřujícího lékaře na laboratorní výsledek, který k němu dorazil. Podle druhu vyšetření se stanovuje vlastní TAT. Pro statimová vyšetření je TAT = 60 minut, glykemie a ABR mají TAT = 30 minut. U případů, kde nelze dodržet časová omezení pro transport vzorků, je možnost plné indikace analyzátorů přímo u lůžka pacienta – tzv. POCT (z angl. Point of care testing) (Dastyh et al., 2015).

2.2 Preanalytická fáze – laboratorní

Začátek preanalytického procesu laboratorního se odehrává v laboratoři, kde je biologický materiál s žádankou přijat. Laboratorní pracovník je povinen zkontrolovat identifikační údaje na žádance a na odběrové nádobce (zkumavce), a jestli souhlasí zkumavka s požadovaným vyšetřením. Na žádance v papírové formě jsou údaje pacienta, jeho rodné číslo, diagnóza, kód pojišťovny, pracoviště klinického lékaře, denní pořadové číslo a dohromady s požadovanými metodami vneseny do laboratorního informačního systému (LIS) počítače (Dastyh et al., 2015).

Pokud je požadováno vyšetření ze séra nebo plazmy, je nutno provést centrifugaci zkumavek s plnou srážlivou nebo nesrážlivou krví (Dastyh et al., 2015).

Takto zcentrifugovaný vzorek je označen štítkem s čárovým kódem, rodným číslem, jménem pacienta, datem příjmu, denním pořadovým číslem, typem biologického materiálu a místem či přístrojem, kde bude vzorek analyzován. V případě, kdy má pacient více druhů zkumavek na další vyšetření, jsou opatřeny stejnými štítky s případnými alikvoty (Dastych et al., 2015).

Chyby, které vznikají v laboratorní preanalytické části, činí 3 – 5 %. Jsou to omyly při třídění vzorků, alikvotování, pipetování, označování štítky a chyby v centrifugaci (Hawkins, 2012).

Preanalytická část laboratorní analýzy končí vložením analytických vzorků do přístroje, eventuálně zahájením manuální analýzy (Dastych et al., 2015).

2.3 Analytická fáze

Analytickým procesem rozumíme zpracování vzorku v analyzátoru nebo manuálně. Pro správnost a přesnost výsledků je potřeba se držet předepsaných zásad a pokynů při vykonávání laboratorní práce. Jde o oblasti logistické, analytické a technické. Oblast logistickou zahrnuje zacházení a uchovávání vzorku před analýzou, skladování a dohlížení na správné používání reagenčních setů. Analytická oblast se skládá z korektního průběhu reakce, interní kontroly kvality, vyhodnocování, kalibrace a kontrolování analýz reakčních systémů. Poslední oblastí je technická, která sestává z bezchybného technického stavu přístrojů, pravidelných údržeb a z monitorování správného chodu analytické přístrojové techniky (Dastych et al., 2015).

Laboratoř je odborné pracoviště a k vykonávání vyšetření musí být způsobilá. Aby takto mohla fungovat, musí laboratorní metody za určitý časový úsek procházet validací, jak od IKK, tak i od EKK. Český institut pro akreditaci se řídí podle **evropské normy ISO** (z angl. International Organization for Standardization = mezinárodní organizace pro normalizaci) číslo **15189** z roku **2013** v části **3.26: Zdravotnické laboratoře – požadavky na kvalitu a způsobilost**, dle níž pod pojmem validace je potvrzení prostřednictvím experimentů objektivních důkazů, že požadavky na zamýšlené použití jsou splněny (Jabor et al., 2013; Dastych et al., 2015).

Validita neboli analytická spolehlivost provedení některého testu ještě nic neurčuje o jeho výpovědi. Pro stanovení diagnózy je doporučeno využití dalších charakteristik, a to

specifitu testu (ST), citlivost testu (CT), prediktivní hodnotu pozitivního výsledku (PH^+) a negativního výsledku (PH^-), a ($ÚT$) účinnost testu (Masopust, 1998).

Analytická fáze laboratorního vyšetření zodpovídá za nejmenší četnost chyb. Bonini (2002) uvádí 13,3 až 31,6 % analytických chyb, při statimovém režimu je jich 15 % (Carraro, 2007). Carraro (2007) též přišel na to, že náhodné chyby měření byly 7x méně časté než systematické chyby, které nebyly determinovány. Studie, kterou sestavil Hawkins (2012), ukazuje 7 - 13 % chyb souvisejících s poruchami analyzátorů a s lidskými omyly.

Analytické znaky laboratorních metod udávají výkonnostní parametry v postupu měření. Mezi tyto znaky patří – opakovatelnost, přesnost, vychýlení (bias), pracovní rozsah, mez detekce a mez stanovitelnosti (Dastyh et al., 2015).

Dalšími důležitými znaky jsou **analytická specifičnost** a **analytická interference**.

Analytická specifičnost je definována jako schopnost metody nebo postupu stanovovat výhradně měřenou veličinu. Hodnotí se jako stupeň vlivu jiných interferencí, než měřených komponent (složek) a stupeň matricových vlivů na výsledky měření, neboli na výstupní signál. Jako problém při vyhodnocování signálu je uvedeno eliminování vlivu šumu. Intenzitou výstupního signálu je obecně funkcí množství složky či analytu. Závislost signálu na obsahu interferujících, doprovodných složek vzorku c_{zi} je nezbytné eliminovat nebo alespoň v co nejvyšší míře redukovat (Carraro, 2000; SEKK.cz; Dastyh et al., 2015).

Analytická interference je systematická chyba měření způsobená analytickým interferentem. Analytický interferent ovlivňuje měřenou veličinu, která zapříčiňuje přírůstek či pokles odezvy (signálu), tzn., že mohou zvýšit či snížit naměřenou hodnotu analytů, indikovaných měřicím přístrojem. Interferent sám o sobě nemusí být zdrojem měřicího systému. Tyto systematické chyby se laboratoře snaží eliminovat nebo korigovat. Interference se vyjadřuje hodnotou vychýlení – bias. Bias obecně znázorňuje odchylku střední hodnoty od přijaté referenční hodnoty. Výsledek se udává především v procentech (Carraro, 2000; SEKK.cz; Dastyh et al., 2015).

Interferenty pocházejí z exogenních a endogenních zdrojů. Exogenními interferenty jsou drogy, léky; endogenními jsou hemoglobin, lipidy, bilirubin, antikoagulancia a křížové imunochemické reakce (Carraro, 2000; SEKK.cz; Dastyh et al., 2015).

Zřízením tzv. **sérových indexů** umožnilo laboratořím vyjádřit stupeň interferencí – hemolýzy, ikterity a chylózy (lipémie) za pomoci nařazení vzorků od pacientů fyziologickým roztokem a následné stanovení absorbance při měření dvou vlnových délek. Pro hemolýzu se měří při 583 a 629 nm, ikteritu 480 a 512 nm a chylózu 659 a 800 nm. Výsledné hodnoty sérových indexů se stanoví konvertováním uvedených hodnot odpovídajícími faktory a víceméně souhlasí koncentraci v mg/dl. Rozpětí stanovení u hemolytického indexu je pak 5 - 1200, ikterického 0 - 60 a chylózního indexu je 11 - 2000. Přesnější informace sérových indexů pro určité metody, jejichž analýzy mohou být ovlivňovány, nalezneme v příbalových letácích výrobců reagensů (Trenčanská, 2009).

2.4 Postanalytická fáze

Tato konečná, postanalytická fáze je složena činnostmi zajišťujícími přeměny analytického výsledku na informaci podloženou důkazy. Získané výsledky analýzy se přenesou na médium, a to na papírové či prostřednictvím online přenosu do laboratorního informačního systému (LIS), kde jsou uvolněny vtištěním pro žadatele. Než se výsledky vydají, podléhají validaci díky interní kontrole kvality, proces pokračuje kontrolou správnosti provedení analýzy, s jejichž výsledky by měla uvedená diagnóza pacienta korespondovat. Dále se kontrolují výsledky podle historie a posledního výsledku laboratorního vyšetření, tzv. delta-check. Naměřené výsledky se porovnávají s ostatními parametry, případně se konzultují s ošetřujícím lékařem pacienta (Dastyh et al., 2015).

Riziko chyb v této fázi podle Boniniho (2002) studie se vyskytuje mezi 9 - 30,8 % ze všech chyb, což není malé množství. Carraro (2007) upozoroval ze své studie ve statimovém režimu vyšetřování 23,1 % chyb. Nejčtenější se v postanalytické fázi ukazovaly chyby při interpretaci výsledků. Méně často tomu bylo u překročení doby odezvy – TAT (Carraro, 2007). Hawkins (2012) se zabýval studii interpretace, kde docházelo k chybné nebo nedostatečné validaci analytických dat, odesílání výsledků špatnému adresátovi, chybování při ručním přepisování výsledků a ke špatnému postupu při hlášení výsledků v kritických intervalech. Tyto chyby se vyskytovaly ve 13 – 20 %. Další chyby v následných krocích postanalýzy dle Hawkinse (2012) vystupují v překvapivých 25 – 46 %. Patří mezi ně zmeškaná či zpožděná reakce na hlášení laboratoře, opět chybná interpretace, nepatřičný nebo necelý následný plán a nerespektování objednávky.

Zanalyzovaný biologický materiál se po vyšetření uchovává po dobu stability příslušných analytů, které je možno doordinovat. V našem případě sérum pro lipázu a CRP se uchovává v ledničce při +2 až +8 °C po dobu 48 hod nebo při -20 °C v mrazáku po dobu několika týdnů (Laboratorní příručka CL Nemocnice Strakonice, a.s., 2017).

3 Stav biologického materiálu

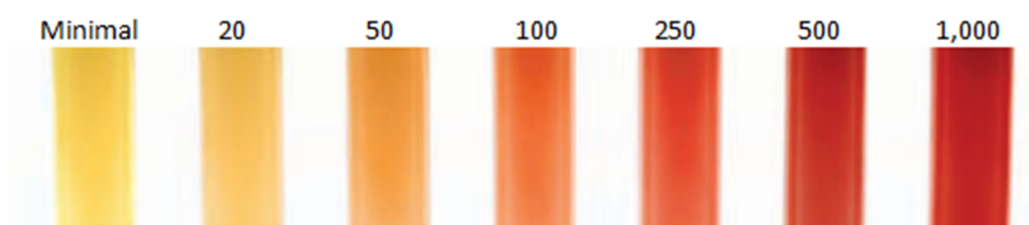
Za fyziologických podmínek by mělo být sérum (plazma) čiré, nažloutlé barvy. Vlivem řady analytických chyb a interferencí se sérum (plazma) mění a pro následnou analýzu je nevhodné nebo pro různá vyšetření obtížněji stanovitelné (Racek, 1999).

3.1 Hemolýza ve vzorku

Vzorky hemolytické krve se po centrifugaci očividně dají rozeznat od normální fyziologické, a to díky změně barvy séra (plazmy) dočervena. Příčinou je rozpad erytrocytů s následným vylitím hemoglobinu a celkového obsahu do séra nebo plazmy. Většinou k ní dochází při nesprávně provedeném odběru, transportu nebo při zpracování krve (Racek, 1999; Procházka et al., 2013).

Viditelnou hemolýzu lze pozorovat od koncentrace hemoglobinu 300 mg/l, kde je sérum (plazma) narůžovělé a se zvyšující se koncentrací hemoglobinu barva tmavne do ruda, přičemž se zvyšuje i stupeň hemolýzy. Tudíž lze říci, že čím je stupeň hemolýzy vyšší, tím je barva intenzivnější (Guder et al., 2003).

Následující obrázek č. 1 zobrazuje zvyšující se sled koncentrací hemolýzy v séru.



Obr. 1: Hemolytické vzorky sér a jejich vizuální a koncentrační rozdíly (Zdroj: Ally, 2015)

Obrázek č. 1 ukazuje škálu barev séra při hemolýze, při které se koncentrace hemoglobinu zvyšuje. Koncentrace je zde udávána v mg/dl.

3.1.2 Rozdělení hemolýzy

Hemolýzu lze rozdělit podle míst vzniku – *in vivo* a *in vitro*.

- 1) *In vivo* hemolýza vzniká v organismu při hemolytické anemii anebo při inkompatibilních transfuzích.

2) Častější formou je *in vitro* hemolýza, ta naopak vzniká mimo organismus. Rozlišuje se podle příčin vzniku – mechanická, tepelná, osmotická a chemická hemolýza.

- Mechanická hemolýza: vzniká při odběru nasáváním nebo vystřikováním krve jehlou, silným třepáním zkumavky, nadměrně silnými otáčkami při centrifugaci či předčasným stáčením a dlouhotrvajícím transportem nebo potrubní poštou.
- Tepelná hemolýza: při níž je krev vystavena příliš nízké či příliš vysoké teplotě.
- Osmotická hemolýza: je způsobena i velmi malým množstvím vody ve zkumavce, kde dojde k osmotické nerovnováze mezi prostředím a erytrocytem - v prostředí s nižším osmotickým tlakem voda vstupuje do erytrocytu, ten nabývá v kulovitý tvar a praská.
- Chemická hemolýza: je následkem účinku chemikálie na erytrocyt, zejména se může jednat o dezinfekční prostředek (Racek, 1999; Dylevský, 2000; Guder et al., 2003).

3.1.2 Vliv hemolýzy na biochemické analýzy

Hemolýza ovlivňuje výsledky řady stanovení, mezi které patří např. vyšetření ACP, ALB, ALP, ALT, amoniaku, AMS, AST, BIL (konjugovaného i nekonjugovaného), K^+ , kreatininu, CK, Fe, GGT, LD, TnT a dalších (Masopust, 1998; Racek, 1999; Procházka et al., 2013).

Vyvázaný hemoglobin má schopnost přímo zabraňovat vývoji chemických reakcí. Mechanismů těchto interferencí existuje několik:

- Prasknutím membrány erytrocytů se uvolní jejich obsah do extracelulárního prostoru (séra, plazmy), přičemž se zvýší koncentrace analytů, jejichž koncentrace v erytrocytech je vyšší, než v séru či plazmě. Při tomto procesu dochází především ke zvýšení koncentrací ALT, AST, LD, Mg, P a K^+ . Hemoglobin má také schopnost ředit, při níž se koncentrace naopak snižují. Zde jde např. o glukózu, bilirubin, ALP, Na^+ a Cl^- (Racek, 2006; Beňovská et al., 2010).
- Dalším mechanismem může být chemická a fyzikálně-chemická interference analytické reakce volného hemoglobinu nebo jiných látek, vyplavených z obsahu prasklého erytrocytu. Hemoglobin se může chovat jako pufr a měnit pH činidla. To se stává při analýze ALB a ALP. Hb může také působit jako rozkladné činidlo a tím snižovat

výsledky analýzy BIL. Při analytických reakcích má vliv také na koncentraci CK. (Guder et al., 2003; Schneiderka et al., 2004; Racek, 2006; Beňovská et al., 2010).

- Při spektrofotometrické analýze červené zbarvení Hb není žádoucí. Interference mají za následek vyšší schopnost Hb absorbovat v oblasti vlnových délek již od 340 nm. V tu chvíli Hb začíná absorbovat záření a s tím souvisí ovlivňování fotometrických metod. Ku příkladu se uvádí koncentrace LD je 160x vyšší než její koncentrace v plazmě, u Mg 3x vyšší než v plazmě a u K⁺ je jeho koncentrace 22x vyšší než v plazmě (Carraro et al., 2000; Lippi et al., 2006; Beňovská et al., 2010).

Při nálezu hemolytického vzorku *in vitro* je nejlepším řešením zažádání o nový odběr. Při *in vivo* hemolýze nový odběr nepomůže, jelikož jde o život ohrožující poruchy (Jindrová et al., 2012).

3.2 Ikterita ve vzorku

Ikterita séra nebo plazmy znamená, že se v krevním řečišti vyskytuje vyšší koncentrace bilirubinu – konjugovaného či nekonjugovaného (Masopust, 1998).

Po centrifugaci se ikterické sérum (plazma) prezentuje svou intenzivní žlutou, žluto oranžovou až žlutohnědou barvou, způsobenou různě silnou koncentrací žlučového barviva bilirubinu, jinak nazývanou jako hyperbilirubinemií. Barva ikterického séra či plazmy je viditelná od minimální koncentrace BIL ≥ 20 $\mu\text{mol/l}$, která je zároveň horní referenční mezí u dospělého člověka (Masopust, 1998; Dastych et al., 2015).

Hlavní vznik bilirubinu je z hemoglobinu uhynulých erytrocytů v retikuloendotelovém systému (RES) sleziny, jater a kostní dřeně, dále z Hb prekurzorů erytrocytů, rozložených při své syntéze. Barvivo při vyšších koncentracích způsobuje žluté zbarvení kůže a sliznic a následně žloutenku. Fyziologicky má bilirubin krystalickou formu, je nestálý a váže se na albumin. Ve vodě se méně rozpouští a naopak v tucích snáz. Volný BIL se chová pro buňky toxicky, ta se snižuje právě vazbou na ALB (Masopust, 1998; Dastych et al., 2015).

Volný (celkový; nekonjugovaný) bilirubin se v játrech enzymaticky spojuje (konjuguje), přičemž vznikají estery bilirubinu a kyseliny glukuronové – takto sloučený se označuje jako konjugovaný (vázaný; přímý) bilirubin, který je ve vodě rozpustný a méně toxický (Masopust, 1998; Dastych et al., 2015).

Obrázek č. 2 ukazuje různé koncentrace bilirubinu v lidském séru a jejich barevnou odlišnost.



Obr. 2: Stupně bilirubinémie v lidském séru (Zdroj: Trenčanská, 2009)

3.2.1 Vliv hyperbilirubinémie na biochemické analýzy

Pokud koncentrace volného bilirubinu překročí 20 $\mu\text{mol/l}$, začne BIL prostupovat do tkání, sliznic a kůže a měnit jejich barvu. Část bilirubinu se vyloučí žlučí, druhá část pokračuje do enterohepatální cirkulace. Pouze nekonjugovaný BIL je schopný pronikat hematoencefalickou membránou, což má za následek rozvoj toxické encefalopatie = novorozenecké žloutenky (Masopust, 1998; Dastyh et al., 2015).

Zbarvení do intenzivních žlutých odstínů má vliv na zvyšování absorbance v místech vlnových délek 400 – 500 nm (Dastyh et al., 2015).

V séru bilirubinové interference o mírně zvýšených koncentracích působí na stanovení kreatininu, ACP, TAG, cholesterolu, amoniaku a dalších. Při vysokých koncentracích BIL jsou ovlivňovány stanovení CK, CK-MB, laktátu, amikacinu a DHEA. Jako tomu bylo u hemolýzy, je potřeba se řídit návody na jednotlivá stanovení od výrobců reagensů (Masopust, 1998; Racek, 1999).

3.2.2 Rozdělení hyperbilirubinémie

K tomuto defektu v krvi dochází ve všech fázích transportu:

- Při zvýšené lýze Hb – zvýšené i množství poskytovaného BIL játrům, ty nestačí zpracovávat a přenášet BIL
- Při snížené funkci odstraňování BIL hepatocyty

- Při nízké schopnosti vyrábět konjugovaný BIL = snížená funkce enzymu UDP-glukoronábilirubinglukosiduronáttransferázy
- Při poruše eliminování BIL do kapilár žluči
- Při následném prostupování BIL z kapilár do jaterních sinusoidů (Masopust, 1998)

Hyperbilirubinémie se dělí podle toho, o jaký bilirubin se jedná – konjugovaný nebo nekonjugovaný:

1) Převaha nekonjugovaného BIL

Zde spadá přemíra geneze bilirubinu a játra poté nestíhají vysoké koncentrace BIL zpracovávat. Současně lze nalézt i urobilinogen v moči. Jako příklad sem patří novorozenecká žloutenka, Gilbertův syndrom, Criglerův-Najjarův syndrom a Luceyův-Driscollův syndrom (Masopust, 1998).

2) Převaha konjugovaného bilirubinu

Konjugovaný BIL se vrací zpátky do krve z důvodu uzavření žlučových cest, také putuje i skrz filtraci glomeruly do moče. V případě, že uzávěr je zcela absolutní, BIL neprostupuje do střev a tím pádem se neprodukuje vůbec UBG, který barví stolici do hnědých odstínů, takže výsledná stolice bude mít světlé zabarvení. Neprůchodnost žlučovodu může být způsobena kamenem či nádorem. Uvedenými příklady mohou být primární biliární cirhóza, Rotorův syndrom, Dubin-Johnsonův syndrom a hyperbilirubinémie bez uzavření žlučových cest, způsobené léky – cholestáza (Masopust, 1998; Schneiderka et al., 2004; Racek, 2006).

3) Hyperbilirubinémie smíšené

Hyperbilirubinémie smíšené vznikly v kombinaci volného i vázaného BIL z vícera příčin. Jsou zde poškozené hepatocyty, u nichž došlo k chybě při vychytávání BIL a jeho spojování, dále i k poruchám exkrece konjugovaného BIL do žluče. Následkem toho jsou v krvi k nalezení vyšší koncentrace obou BIL a také konjugovaný BIL s UBG v moči. Tyto poruchy se vyskytují u pacientů z užívání drog, alkoholu, léků či jiných jedů, dále u nemocných, postižených virovými hepatitidami (Schneiderka et al., 2004; Racek, 2006).

3.3 Chylozita ve vzorku

Chylózní (lipemické) sérum či plazma souvisí s obsahem lipidů (Racek, 1999).

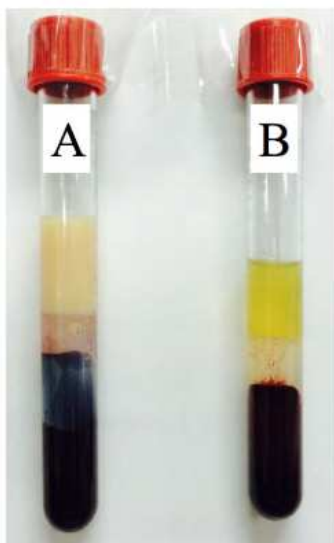
Obecně lipidy jsou nerozpustné ve vodě, takže aby se mohly s vodou mísit, je nutné, aby byly navázány na jiné částice – na bílkoviny apoproteiny, jejich spojením vznikají komplexy lipoproteiny. Existuje několik možností rozdělování lipidů. Jedním z nich je rozdělení na jednoduché a složené lipidy (Zima et al., 2007).

A) Jednoduché lipidy – jsou estery vyšších MK a alkoholu (glycerolu), patří sem cholesterol, estery cholesterolu, TAG, monoacylglyceroly a diacylglyceroly (Mašek et al., 1973; Racek, 1999; Zima et al., 2007).

B) Složené lipidy – mají navíc ještě jednu funkční skupinu (př. zbytek kyseliny fosforečné); patří sem fosfolipidy, glykolipidy a lipoproteiny (LDL, VLDL, IDL, HDL, chylomikrony) (Mašek et al., 1973; Racek, 1999; Zima et al., 2007).

Důvody výskytu chylozity

Hlavní interferencí, kterou se v této bakalářské práci budeme zabírat, je lipémie (chylozita) séra nebo plazmy. Na obrázku č. 3. vidíme po centrifugaci krve zakalené, mléčné sérum (plazmu), ve kterém se vyskytují velké částice lipoproteinů, TAG, z nichž hlavně chylomikrony a VLDL. Díky jejich přítomnosti se paprsky světla rozptylují za vzniku zákalu od koncentrace TAG cca $> 4,5$ mmol/l (Dastyh et al., 2015).



Obr. 3: Srovnání chylózního (A) a čirého (B) séra (Zdroj: Sasaki et al., 2015)

Důležitou roli zde hrají chylomikrony a VLDL. Chylomikrony se rodí v mukose tenkého střeva. Jejich funkcí je především transport TAG z potravy. Chylomikrony jsou největší z lipoproteinů a jsou v séru okem viditelné jako zákal, kde odrážejí světelné paprsky dokonce při $\leq 3,4$ mmol/l. Jejich meziprodukty a lipoproteiny s velmi nízkou hustotou (VLDL) mohou být neviditelné i při koncentraci TAG cca 9,07 mmol/l. Je vyzpozorováno, že zákal má různé stupně hustoty VLDL a to díky jeho velikostí a složení (Karlson et al., 1987; Guder et al., 2003; Dastyh et al., 2015).

Když člověk má poruchu lipidového metabolismu nebo požije velmi tučné jídlo a nedodrží 12 hodinové lačnění anebo vypije před odběrem alkohol, chylomikrony při trávicím procesu prostupují do lymfy střev. Zde se lymfa transformuje v zakalenou mléčnou tukovou emulzi. Tato emulze se dále sloučí s krví. V cirkulaci krve se hydrolyzuje prostřednictvím lipoproteinové lipázy v mastné kyseliny, které jsou následně uplatněny jako zdroj energie či jsou uschovány v tukové tkáni v podobě TAG. TAG jsou tuky přirozeného charakteru. Jejich název nám napovídá, že na všech třech hydroxyskupinách glycerolu mají připojené esterifikací tři mastné kyseliny. (Červinka et al, 1982; Racek, 1999).

VLDL mají hojné množství cholesterolu a jeho esterů. Jsou produkovány játry. Jejich funkcí je transport nízkého počtu esterů cholesterolu a TAG. Tyto látky jsou eliminovány jako mikrony v krevní cirkulaci. Částice VLDL jsou metabolizovány přes IDL na LDL (Zima et al., 2007).

LDL jsou důležitými nosiči cholesterolu z jater do tkání (Karlson et al., 1987).

HDL, lipoproteiny o vysoké hustotě, obsahují největší množství proteinů. Jsou produkovány z krve z apolipoproteinů A-1. Sestávají se z apoproteinů a fosfolipidů. Od chylomikronů, VLDL a buněčných membrán v krevní cirkulaci přijímají a vážou cholesterol, který pak přenášejí z tkání do jater (Mašek et al., 1973; Racek, 1999; Zima et al., 2007).

LDL cholesterol má vliv na vznik kardiovaskulárních chorob. U pacientů se vyskytuje zvýšená hladina LDL. Naopak zvýšená hodnota HDL se pokládá za faktor ochrany před KVO. Funkce HDL je ta, že s sebou odnáší cholesterol, čímž pozitivně snižují jeho hladinu (Mašek et al., 1973; Karlson et al., 1987; Racek, 1999; Zima et al., 2007; Dastyh et al., 2015).

3.3.1 Vliv chylozity na biochemické analýzy

Chylózní vzorky díky výskytu TAG, lipoproteinů o nízké hustotě (VLDL) a chylomiker jsou schopny ovlivňovat chemické reakce jednotlivých stanovení. Tyto vzorky mohou interferovat při stanovení ALT, AST, ethanolu, konjugovaného BIL, glukózy, IgA, IgG, IgM, kreatininu, Mg, myoglobinu, Fe, TRF, ceruloplasminu, prealbuminu a dalších. Přítomnost TAG o vyšších koncentracích zabraňuje vyšetření řady analytů, zejména stanovení katalytických enzymů (Brady et al., 1994; Beňovská et al., 2010).

Chylóza vyvolává ve vzorku zákal, čímž ovlivňuje měření metod založených právě na měření zákalu - jde o turbidimetrii, nefelometrii a fotometrii (Kroll et al., 1994).

Všechny tři popsané interference se neobjevují pouze samostatně, ale mohou se také i vzájemně kombinovat. Například hemolýza s chylozitou nebo chylozita s iktericky zabarveným sérem či plazmou (Jindrová et al., 2012).

4 Vybrané analyty pro experiment

4.1 Lipáza

Též názvem pankreatická lipáza, triacylglycerolacylhydrolasa, je hydrolytický enzym katalyzující triacylglyceroly, které obsahují dlouhé řetězce mastných kyselin. Lipáza štěpí postranní řetězce na 1. a 3. uhlíku za vzniku dvou mastných kyselin a 2-monoglyceridu (Novák, 2002).

Sérová lipáza je produkována z buněk lalůček slinivky břišní (pankreatu). Většinové množství je vyměšováno do pankreatického vývodu a zbylé množství (asi 1 %) je vyměšováno bazálním pólem, kterým je vedeno rovnou do lymfy a krve. V moči se LPS fyziologicky nevyskytuje, protože se v ledvinách glomerulární filtrací vstřebá zpět renálními tubuly (Masopust, 1998).

Lipázu je možno nalézt jednak v pankreatu, dále i ve střevní sliznici, žaludku, bílých krvinkách a v tukové tkáni. Nejdůležitější klinický význam má pankreatická LPS. Stanovení AMS se využívá více, ale LPS má oproti ní relativně vyšší specifčnost (Novák, 2002).

Vyšetření LPS je používáno při diagnostice akutní pankreatitidy, kdy laboratorní hodnoty dosahují mnohem vyšších koncentrací, než tomu je u AMS a také mnohem déle zůstávají v séru. Průměrně je koncentrace LPS u akutní pankreatitidy vyšší nejméně 6 – 8x a maximálně až 46x, než je norma. U chronické pankreatitidy a mukoviscidózy jsou hodnoty LPS mírně snížené (Masopust, 1998).

Laboratorní výsledky mohou být také zvýšeny při akutních otravách alkoholem, či břišních zraněních způsobených nehodami a také po operačních výkonech (Novák, 2002).

Koncentrace LPS je možno stanovovat pomocí turbidimetrie a nefelometrie (Novák, 2002).

Co se týče stanovení lipázy v analyzátoru Advia 1800 v laboratoři, kde byl proveden experiment, je měření založené na kolorimetrické metodě (Siemens, 2017).

4.2 C-reaktivní protein

C-reaktivní protein dostal pojmenování díky tomu, že reaguje velmi citlivě na projevy akutního zánětu. Stanovovaná koncentrace se rapidně zvyšuje při bakteriální infekci, především při reakcích na C-polysacharid buněčných stěn pneumokoků. Je vyplavován játry. Jeho výskyt je znakem nespecifické zánětlivé reakce v séru pacientů. Jeho koncentrace se zvyšuje při imunitní odpovědi na infekce (virové a bakteriální), imunopatologické reakce (revmatická horečka, revmatoidní artritida a další), dále při narušení tkání, odumírání buněk, při traumatu, po operačních stavech, během infarktu myokardu či zhoubných nádorových onemocnění. Pomocí CRP lékaři monitorují průběh nemocí, terapií a nekroz. V imunitním systému se účastní jako jeden z aktivátorů komplementu, dále má svou roli při fagocytóze a při vypouštění lymfokinů (Kleiner et al., 1999; Novák, 2002).

Koncentrace CRP se vyhodnocuje aglutinací latexových částic, enzymoimunologickou analýzou (EIA) či nefelometrií (Novák, 2002).

Při experimentu v přístroji Advia 1800 se CRP stanovuje latexem obohacenou imunoturbidimetrickou metodou (Siemens, 2016).

PRAKTICKÁ ČÁST

5 Cíl práce a hypotézy

Cílem práce je vyzkoušet si pravdivost a použitelnost měření biochemických stanovení lipázy a C-reaktivního proteinu pomocí vyčerovací metody LipoClear na základě výpočtů výtěžnosti a korelačního koeficientu.

Hypotéza č. 1: Systém LipoClear je použitelný pro stanovení koncentrace lipázy v lidském séru.

Hypotéza č. 2: Systém LipoClear je dle Bunešové et al. (2009) nepoužitelný pro stanovení koncentrace C-reaktivního proteinu v lidském séru.

6 Metodika

Všechny vzorky byly zpracovány v Centrálních laboratořích Nemocnice Strakonice a.s. v oddělení klinické biochemie pomocí analytického analyzátoru Advia 1800 od výrobce Siemens.

6.1 Princip stanovení vybraných analytů

Spektroskopie a kolorimetrie

UV/VIS absorpční spektroskopie je optickou metodou, vycházející z průchodu světelného paprsku vzorkem, v němž exponenciálně klesá intenzita světla. Ve spektrometrii se uplatňuje Lambert-Beerův zákon, popsáný v následující rovnici,

$$I_{\lambda} = I_0 (\lambda) 10^{-\varepsilon (\lambda) c l}$$

kde: I_0 – je intenzita paprsku dopadu,

I – intenzita prošlého paprsku,

l – je optická dráha (tloušťka vzorku),

c – koncentrace vzorku,

ε - značí extinkční koeficient [$\text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$], jinými slovy – molární absorpční koeficient, který je závislý na vlnové délce (λ), což je příznačné pro jakoukoli molekulu a jeho měřením jsme schopni dostat informace o chemické stavbě vzorků. Spektrometry obvykle při měření ukazují i absorbanci A , která je ke koncentraci vzorku přímo úměrná (Cibíček, 2014).

Výpočet absorbance (A) je uveden níže,

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon (\lambda) c l$$

Pokud se měří v kyvetě s tloušťkou 1 cm, tak výpočtem podílu, kde dělenec je absorbance a dělitel molární absorpční koeficient, dostaneme výsledek koncentrace vzorku v jednotkách mol/l (Cibíček, 2014).

Spektrometrie je nejčastěji používanou metodou při měření koncentrací jednotlivých komponent v roztocích (Cibíček, 2014).

Kolorimetrie, stejně jako spektrometrie, je optická metoda. Je založená na porovnávání intenzity barevného roztoku, kde neznáme a chceme zjistit jeho koncentraci, s roztokem stejné látky o známé koncentraci – tedy se standardy. Intenzita barev je závislá na její koncentraci v roztoku. Kolorimetry měří množství světla, jež prochází vzorkem (Rosina, 2006).

V analyzátoru při **zjišťování koncentrací lipázy** je vyšetření stanovováno pomocí enzymatické reakce, která je katalyzována lipázou. Výsledným produktem je metylresorufin, jenž se stanovuje spektrofotometricky – kolorimetricky. Chromogenní substrát lipázy je štěpen katalytickou aktivitou lipázy na další produkty, které se v alkalickém prostředí samovolně rozkládají na glutagovou kyselinu a metylresorufin. Aktivita lipázy ve vzorku při této chemické reakci je úměrná produkci metylresorufinu.

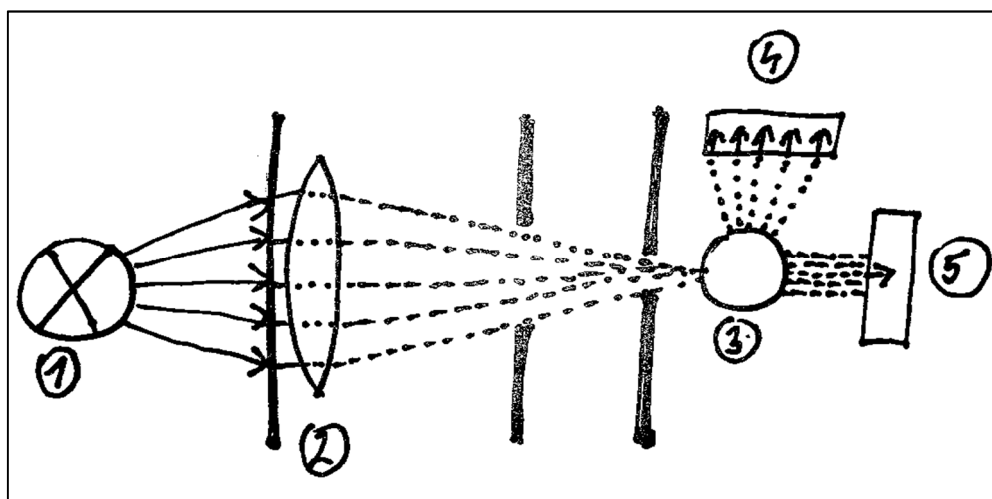
Tato analýza probíhá při vlnové délce 571/694 nm. Referenční rozmezí lipázy se pohybuje mezi 12 - 53 U/l, což v přepočtu na hodnoty vycházející z analyzátoru Advia 1800 činí 0,2 - 0,88 $\mu\text{kat/l}$. (Siemens, 2017).

Turbidimetrie a nefelometrie

Turbidimetrie spolu s nefelometrií jsou analytické metody, používané v klinických laboratořích ke stanovování specifických bílkovin.

Turbidimetrie je optická metoda, při níž se měří procházející světlo, zeslabené rozptylem na částicích. Měří se stupně zákalu – turbidity. Aby se suspenze zákalu nerozplynula a zůstala stálá pro potřebné kroky k analýze, používá se ochranných polymerů, z nichž nejčastěji polyetylen glykol.

Na obrázku č. 4 je zobrazeno schéma turbidimetrie a nefelometrie.



Obr. 4: Turbidimetrie a nefelometrie (Zdroj: vlastní)

Součástí turbidimetrické soustavy je zdroj světla (1), absorpční spektrofotometr (2), měřící zařízení (3) a detektory (4 a 5). Ty snímají odražené (rozptýlené) světlo při nefelometrii (4) a detekují procházející oslabené paprsky světla při turbidimetrii (5) (Štern, 2006).

Pro stanovení koncentrace CRP v analyzátoru je využíváno metody imunoturbidimetrie s obohacením o latex. Koncentrace analytu je zde funkcí intenzity rozptýleného světla, což je zapříčiněno seskupením latexových částic. Částice latexu na sebe vážou protilátky anti-CRP. Díky tomuto spojení a zároveň přítomnosti proteinu CRP, kdy se v analyzátoru smíchá latexová reagentie se sérem pacienta, dojde k rychlé aglutinaci (shlukování částic), a tím k zvýšení zákalu. Zákal se měří při vlnové délce 571 nm turbidimetricky. Konečným krokem analýzy je zjišťování koncentrace CRP z kalibrační křivky, jež se sestrojí z řady kalibrátorů.

Očekávané hodnoty C-reaktivního proteinu jsou v rozmezí 0 – 10 mg/l (Siemens, 2016).

6.2 Instrumentace

Centrifuga

Pro získání séra z plné krve bylo nutné použití nechlazené centrifugy Eppendorf 5702. Tento typ zařízení se v obchodech prodává ještě jako model chlazený (typ 5702 R) a temperovaný (typ 5702 RH).

Centrifuga umí pracovat za maximálních otáček 4400 RPM a při zatížení RCF 3000x g. Hlavní součástí je rotor, který je možno vyměnit za jiný typ (Cibíček et al, 2014).

Principem centrifugační metody je sedimentace rozptýlených částic, navozená působením silového pole. Rychlost usazování částic je určována nejen působením silového pole, ale i velikostí, tvarem, hmotností, hustotou částic, viskozitou roztoku a faktorem tření. Jestliže na usazované složky působí jen gravitační síla, proces sedimentování je pomalý či žádný. Pokud chceme proces urychlit a využijeme rotaci vzorku i kolem osy rotace, dojde k ještě o několik řádů vyššímu účinku nazývanému setrvačná odstředivá síla. Zde se uplatňuje pojem centrifugace, neboli odstředění. Při sedimentaci dochází k oddělení složek roztoku na dvě frakce – frakce na dně zkumavky (sediment; pelet), nad ní je supernatant, obsahující rozptýlené částice, které se neusadily (Cibíček et al., 2014).

Centrifuga Eppendorf 5702 byla využita dvakrát - k odstředění séra od plné krve a při sedimentování lipoproteinů ve zkumavkách LipoClear. Na obrázku č. 5 je pořízena fotografie této centrifugy i s nastavenými otáčkami pro stočení zkumavky LipoClearu.



Obr. 5: Centrifuga Eppendorf 5702 (Zdroj: vlastní) Obr. 6: Vortex Classic (Zdroj: vlastní)

Vortex

Míchací zařízení Vortex typ Classic od výrobce VELP Scientifica (viz obr. č. 6, vyfocený autorkou) se používá k dokonalejšímu promíchání roztoků a je zde umožněno nepřetržité nebo automatické míchání při vložení zkumavky do pryžového držáku a následným lehkým zatlačením. Vortex míchá bezpečně, vířivě (krouživě), rychlost lze nastavit otáčením knoflíku. Rychlost míchání je od 0 – 3000 ot./min. Tyto a další informace lze nalézt v uživatelské příručce přístroje.

Advia 1800

K vyšetření obou analytů bylo využito automatického přístroje Advia 1800 od firmy Siemens. Advia 1800 pracuje na principu turbidimetrie, absorpční spektrofotometrie a potenciometrického měření selektivními ISE elektrodami. Na analyzátoru lze zpracovávat krevní sérum, plazma, moč, punktát, mozkomíšní mok a další. Najednou lze analyzovat velké množství materiálu o malých objemech. Analyzátor se skládá z počítačové jednotky s monitorem LCD, klávesnice, myši a tiskárny. Počítač pracuje v operačním systému Windows XP, kde je umožněné propojení s laboratorním informačním systémem (Siemens, Uživatelská příručka Advia 1800, 2008).

Na obrázku č. 7 je možno vidět popisovaný analyzátor Advia 1800 spolu s dalšími analyzátoři a pomocnými přístroji.



Obr. 7: Advia 1800 s přidruženými přístroji (Zdroj: vlastní)

Každý den před denní směnou je nutné všechny metody nechat projít příslušnými kontrolami. Pokud se tyto kontroly nevešly do předem nastavených mezí dle návodu výrobce reagensů a kontrol, je nezbytnou součástí je nakalibrovat. Poté je umožněno na přístroji zpracovávat vzorky pacientů (Siemens, laboratorní příručka Advia 1800).

6.3 Biologický materiál pro použití k experimentu

Při experimentu byla použita lidská srážlivá krev - její složka - krevní sérum. V období únor - duben 2018 jsem si nasbírala vzorky sér pacientů, u kterých jsem viděla v laboratorním informačním systému změřené požadavky na LPS a CRP. Hodnoty těchto analytů byly variabilní – od fyziologických hodnot po patologické. Zvolila jsem pro experiment 40 vzorků lipázy a 40 vzorků C-reaktivního proteinu. Když jsem měla takto dostatečně velký počet materiálu, začala jsem s vlastním experimentem.

Pro výběr vzorků k analýze bylo potřeba volit ty pacienty, kterým po prvotní analýze zbývalo dostatečné množství séra, minimálně 2 ml a aby bylo ještě potenciálně možné nějaká vyšetření přidělat. Vybraní pacienti měli mimo LPS a CRP i jiné požadavky na vyšetření, ty ovšem byly pro můj experiment irelevantní.

Sérum jsem rozplnila do dvou eppendorfových zkumavek s víčkem (1ml) po 1 ml, tyto zkumavky jsem popsala lihovým fixem příslušnou identifikací dle fiktivních žádank a dala zamrazit do mrazáku při teplotě -20 °C, kde setrvaly do analýzy.

6.4 Chemický materiál pro použití k experimentu

- REAGENCIE: Při běžném provozu analyzátorů Advia 1800 se používají pro stanovení jednotlivých analytů reagensy. Reagensy pro lipázu i CRP se skládají z dvou činidel. Každé z nich se umísťuje do reagenčního kruhu 1 (R1) a reagenčního kruhu 2 (R2).

Lipáza: Činidlo 1 v R1 sestává z těchto komponent: TAPS (koncentrace 100 mmol/l), deoxycholát sodný (koncentrace 34 mmol/l) a azid sodný (koncentrace 0,05 % w/v). Druhé činidlo v R2 má komponenty: kyselinu vinnou (+; koncentrace 9,5 mmol/l), kolipázu (koncentrace 460 U/ml), 2-propanol (koncentrace 0,65 mol/l) a DGGMR (koncentrace 0,4 mmol/l). Při použití reagensů je nutné dávat pozor na případné bubliny. Je potřeba je odstranit a zajistit homogenitu činidla (Siemens, 2017).

Stabilita lipázových reagensů je v Advii 1800 10 dní. Uchovávají se při 2 – 8 °C (Siemens, 2017).

CRP: Činidlo 1 v R1 obsahuje glycin (koncentrace 170 mmol/l), chlorid sodný (koncentrace 100 mmol/l), EDTA disodná sůl hydrát (koncentrace 50 mmol/l) a azid sodný (koncentrace 0,09 % w/v). Činidlo 2 v R2 se skládá z anti-CRP králičí protilátky (koncentrace dle jednotlivých šarží výrobce), synteticky vyrobený latex a azid sodný (koncentrace 0,09 % w/v) (Siemens, 2016).

Stabilita reagensů CRP_2 v analyzátoru je 60 dní. Uchovávají se při 2 – 8 °C (Siemens, 2016).

- **KALIBRÁTORY:** Kalibrace je proces, při kterém se hledá vztah mezi měřeným signálem a měřenou jednotkou. Pro každý test, kde je vyhodnocována koncentrace či aktivita, je zapotřebí sestavit kalibrační křivku. Při kalibraci se používají analytické standardy (etalony) o známé koncentraci (SEKK.cz).

Lipáza - ADVIA Chemistry Enzyme 1 Calibrator (REF 10916057)

C-reaktivní protein – ADVIA Chemistry C-Reactive protein Calibrators_2 (REF 06487741)

- **KONTROLY:** Kontrolní materiály jsou využívány k operativnímu řízení kvality ve vnitřním i v externím hodnocení kvality (SEKK.cz).

Lipáza – Liquid Assayed Multiquant 1, 2, 3 od výrobce BIO-RAD

C-Reaktivní protein – Liquichek Immunology Control 1, 2, 3, také od výrobce BIO-RAD

- **LIPOCLEAR:** Zkumavky LipoClear® LC15 od výrobce StatSpin®, společnosti IRIS. Zkumavky obsahují předplněné neiontové polymery ve vodném roztoku (0,3 ml). Jsou netoxické (LipoClear – návod k použití).

6.5 Pomůcky

Pro experiment bylo využito následujícího běžného laboratorního vybavení:

Reakční zkumavky, eppendorfovy zkumavky o obj. 1 ml s víčkem a bez víčka, automatická pipeta FinnpiPETTE™ F2 o maximálním obj. 1000 µl od výrobce Thermo Scientific, příslušné špičky o max. obj. 1000 µl, stojánky, lihový fix, ochranné rukavice.

6.6 Postup při experimentálním stanovení LipoClearem

Preanalytika

Do laboratoře byly postupně přijaty zkumavky srážlivé krve pacientů k vyšetření. Pro analýzu séra bylo potřeba jej oddělit od ostatních složek krve pomocí centrifugace po dobu 10 minut při 4000 otáčkách za minutu. Příslušná pracovnice laboratoře řádně zkontrolovala identity pacientů, zkumavky polepila štítky a předala je dál k prvotní analýze.

Zkumavky je možno vkládat do analyzátoru Advia 1800 buď prostřednictvím VersaCell X3 systému nebo kruhem přímo v analyzátoru.

Analytika

Vlastní experiment začal přípravou fiktivních žádanek v systému LIS, kde jsem vytvořila fiktivní žádanky, začínající číslem 830, do nich jsem zadala požadavky na lipázu a C-reaktivní protein pod příslušnými kódy. Společně se automaticky zadaly tzv. „popisy“, neboli sérové indexy, které charakterizují analyzovaný materiál pro přítomnost interferencí – hemolýzy, ikterity a chylozity. Z tiskárny mi vyjely štítky s bar cody, kterými jsem polepila čisté zkumavky, potřebné pro analýzu v Advii 1800.

Postupně jsem vzorky v eppendorfových zkumavkách vyndávala po pěti kusech z mrazáku, nechala je rozmrazit a vytemperovat na pokojovou teplotu po dobu 30 minut. Prázdné čisté reakční zkumavky jsem polepila štítky s bar cody číselné řady začínající číslem 830. Do nich jsem vložila jednu z dvojice eppendorfových zkumavek se sérem od jednoho pacienta. Poté jsem odstříhla víčko. Následně jsem těchto 5 vzorků vložila přímo do analyzátoru Advia 1800 kruhem. Přes program v Advii jsem zadala zpracování pro vzorky v eppendorfových zkumavkách dle návodu výrobce analyzátoru a odstartovala analýzu. Po několika minutách se mi výsledky přenesly do informačního systému v počítači.

Z ledničky jsem vyndala zkumavky LipoClear (LC15) a nechala je vytemperovat po dobu 10 minut. Popsala jsem si je pro identifikaci pro jednotlivé pacienty opět čísly 830 a dál. Za použití obou eppendorfových zkumavek se vzorky sér jsem rozplnila LipoClear zkumavky o objemu 0,3 ml, kam jsem napipetovala 1,5 ml séra. Pomocí Vortexu jsem naplněné LipoClear zkumavky promíchala a pak jsem je nechala působit 5 minut. Po

uplynulé době jsem je dala stočit do centrifugy po dobu 20 minut při zatížení 2000x g (3600 ot/min).

Po vyčeření na následujícím obrázku č. 8 je vidět stočená LipoClear zkumavka s usazenými lipidy na dně.



Obr. 8: LipoClear zkumavka s vyčeřenými a usazenými lipidy (Zdroj: vlastní)

Aby pokračující kroky v analýze byly maximálně přesné, bylo nutné odpipetovat pouze vyčištěné sérum, tzn. odebrat sérum přibližně ze středu LipoClear zkumavky a nedotknout se usazeného sedimentu. Sérum jsem přepipetovala do čistých eppendorfových zkumavek bez víčka a opět vložila do odpovídajících plastových zkumavek s bar cody, které mi posloužily už předtím při měření prvotních, nevyčeřených sér. V LISu jsem změřené nevyčeřené hodnoty sér spolu s „popisy“ zastopovala a tím jsem mohla pod stejnými čísly fiktivních žádanek měřit znovu v analyzátoru. Tyto vyčeřená séra jsem opět vložila do Advie 1800 stejným způsobem jako minule a opětovně stanovila hodnoty LPS a CRP s „popisy“. Výsledky z obou měření jsem si vytiskla.

Nakonec bylo nezbytné výsledky z měření po vyčeření vynásobit 1,2 x, kvůli vykompenzování ztrát objemů původních vzorků.

7 VÝSLEDKY

Výsledky jsem zpracovala v programu Microsoft Excel 2013. V tomto programu jsem vytvořila tabulky s naměřenými hodnotami lipázy a C-reaktivního proteinu a pomocí vzorců zjistila jednotlivé výtěžnosti, průměrnou výtěžnost a korelační koeficient měření.

7.1 Výtěžnost

Výtěžnost, angl. recovery, je charakteristikou metody, která vyjadřuje míru schopnosti měřicí metody detekovat veškerý analyt v analyzovaném vzorku. Je mírou účinnosti dané metody.

Pro výpočet byl použit vzorec pro relativní vyjádření výtěžnosti v %, viz níže,

$$R(a) = \frac{Q(a)}{Q} \times 100 [\%]$$

kde: $R(a)$ - je výtěžnost v matrici, udávaná v %

$Q(a)$ - je výsledná hodnota analytu, násobená koeficientem 1,2 z měření po vyčeření

Q - je hodnota analytu z měření před vyčeřením.

7.2 Korelační koeficient

Korelační koeficient udává lineární vztah dvou měření - před a po vyčeření jednotlivých analytů. Zjišťuje se míra závislosti - zda existuje optimální vztah mezi dvěma měřeními. Korelační koeficient nabývá hodnot od -1 do +1.

Vyhodnocení korelačního koeficientu lze vyjádřit následujícím vztahem,

$$Q_{x,y} = \frac{Cov(X, Y)}{Q_x \times Q_y}$$

kde: $Q_{x,y}$ - je korelační koeficient

x a y - jsou střední hodnoty z průměrů hodnot před vyčeření a po vyčeření.

7.3 Výsledky z vyšetření lipázy

Do následující tabulky č. 1 jsem zanesla 40 vzorků sér se stanovenými analyty LPS před eliminací a po eliminaci lipoproteinů. V tabulce lze nalézt hodnoty koncentrací jednotlivých vzorků, jejich výtěžnosti, průměrnou výtěžnost a korelační koeficient.

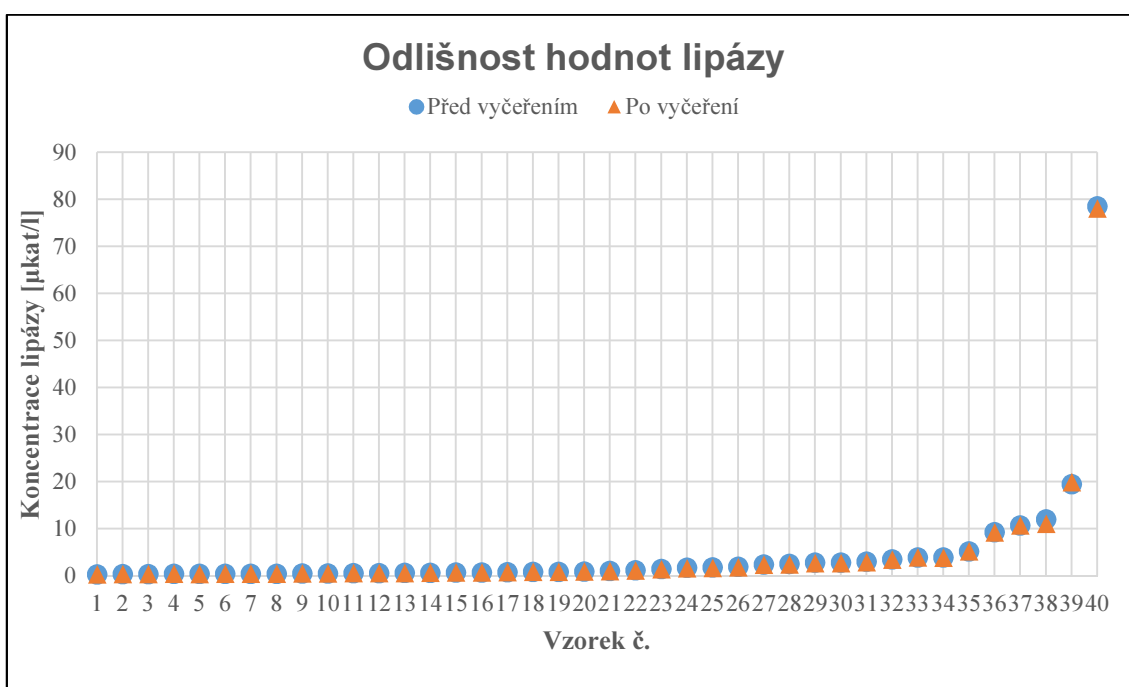
Tab. 1: Přehled hodnot analytu lipáza

Lipáza	Koncentrace [μ kat/l] před vyčerením	Koncentrace [μ kat/l] po vyčerení	Výtěžnost [%]
Vzorek č. 1	0,24	0,23	95,83
Vzorek č. 2	0,31	0,29	93,55
Vzorek č. 3	0,33	0,32	96,97
Vzorek č. 4	0,38	0,36	94,74
Vzorek č. 5	0,38	0,31	81,58
Vzorek č. 6	0,4	0,37	92,50
Vzorek č. 7	0,41	0,4	97,56
Vzorek č. 8	0,41	0,41	100,00
Vzorek č. 9	0,47	0,42	89,36
Vzorek č. 10	0,48	0,44	91,67
Vzorek č. 11	0,52	0,49	94,23
Vzorek č. 12	0,53	0,53	100,00
Vzorek č. 13	0,58	0,54	93,10
Vzorek č. 14	0,58	0,56	96,55
Vzorek č. 15	0,62	0,62	100,00
Vzorek č. 16	0,63	0,63	100,00
Vzorek č. 17	0,73	0,7	95,89
Vzorek č. 18	0,79	0,76	96,20
Vzorek č. 19	0,82	0,82	100,00
Vzorek č. 20	0,89	0,84	94,38
Vzorek č. 21	0,96	0,92	95,83
Vzorek č. 22	1,14	1,09	95,61
Vzorek č. 23	1,42	1,33	93,66
Vzorek č. 24	1,65	1,54	93,33
Vzorek č. 25	1,75	1,64	93,71
Vzorek č. 26	1,88	1,73	92,02
Vzorek č. 27	2,35	2,28	97,02
Vzorek č. 28	2,49	2,35	94,38
Vzorek č. 29	2,73	2,64	96,70
Vzorek č. 30	2,73	2,65	97,07
Vzorek č. 31	2,94	2,84	96,60
Vzorek č. 32	3,41	3,396	99,59
Vzorek č. 33	3,87	3,87	100,00
Vzorek č. 34	3,87	3,77	97,42

Vzorek č. 35	5,16	5,17	100,19
Vzorek č. 36	9,21	9,144	99,28
Vzorek č. 37	10,65	10,64	99,91
Vzorek č. 38	11,98	10,98	91,65
Vzorek č. 39	19,43	19,836	102,09
Vzorek č. 40	78,5	78,02	99,39
Průměrná výtěžnost [%]			95,99
Korel. koef. EXCEL			1,000

Z tabulky č. 1 je zřejmé, že hodnoty koncentrací lipázy před a po vyčeření vzorků se moc nezměnily. Jednotlivé výtěžnosti byly téměř stoprocentní, taktéž průměrná výtěžnost byla vysoká a činila 95,99 %. Korelační koeficient pro LPS nabył hodnoty 1,000, která vykazuje silnou a přímou závislost mezi měřeními.

Dále jsem hodnoty z tab. č. 1 vynesla do obrázku č. 9, kde jsou barevně znázorněny odlišnosti koncentrací lipázy před použitím LipoClearu a poté.



Obrázek 9: Graf s hodnotami koncentrací z vyšetření lipázy

Jak je vidno z obrázku č. 9, hodnoty lipázových koncentrací se lišily jen minimálně.

7.4 Výsledky z vyšetření C-reaktivního proteinu

Pro analyt C-reaktivní protein byla vytvořena tabulka č. 2, kde je opět 40 vzorků sér s jejich vyhodnocenými charakteristikami, jako tomu bylo u předešlé tabulky (tab. 1).

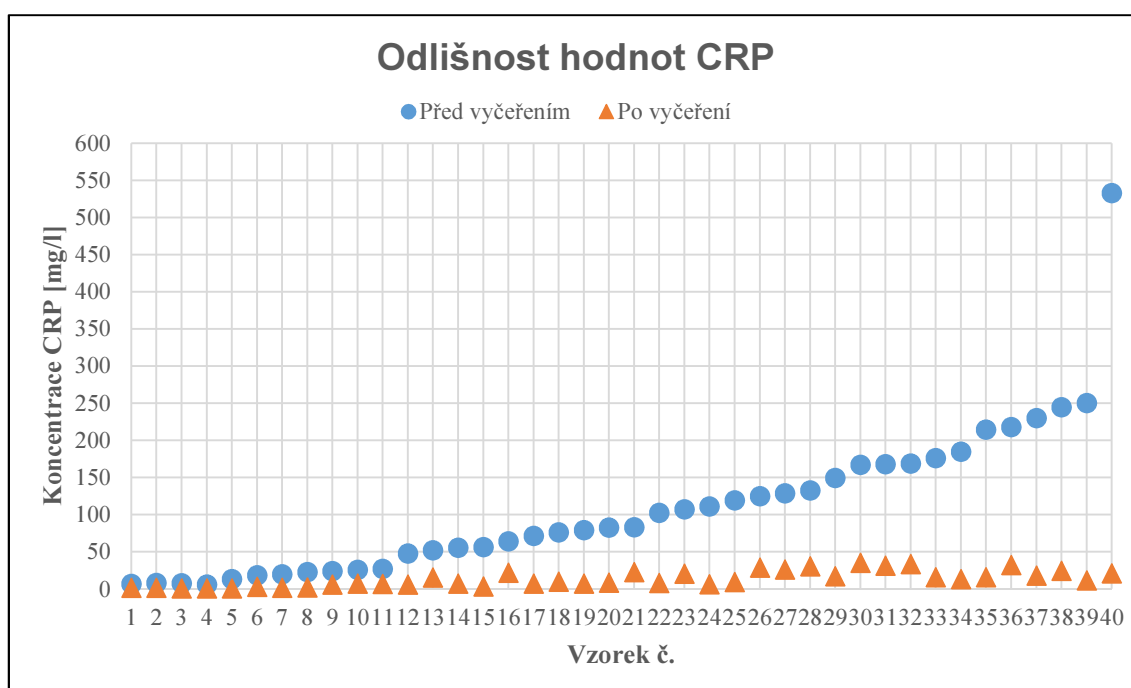
Tab. 2: Přehled hodnot analytu C-reaktivní proteinu

CRP	Koncentrace [mg/l] před vyčerením	Koncentrace [mg/l] po vyčerení	Výtěžnost [%]
Vzorek č. 1	6,9	1,9	27,54
Vzorek č. 2	8,2	2	24,39
Vzorek č. 3	8	1	12,50
Vzorek č. 4	6,4	1,1	17,19
Vzorek č. 5	13,5	1,2	8,89
Vzorek č. 6	18,5	3	16,22
Vzorek č. 7	20	2	10,00
Vzorek č. 8	22,9	2,3	10,04
Vzorek č. 9	24,1	6,1	25,31
Vzorek č. 10	25,9	7,44	28,73
Vzorek č. 11	27,2	7	25,74
Vzorek č. 12	48,1	6,36	13,22
Vzorek č. 13	52,5	15,5	29,52
Vzorek č. 14	55,8	7,4	13,26
Vzorek č. 15	56,7	3,6	6,35
Vzorek č. 16	64,5	22,1	34,26
Vzorek č. 17	71,8	7,6	10,58
Vzorek č. 18	76,6	10,2	13,32
Vzorek č. 19	79,4	7,4	9,32
Vzorek č. 20	82,7	8,9	10,76
Vzorek č. 21	83,4	22,8	27,34
Vzorek č. 22	102,5	8,5	8,29
Vzorek č. 23	107,6	20,64	19,18
Vzorek č. 24	111,3	6,5	5,84
Vzorek č. 25	119,3	9,5	7,96
Vzorek č. 26	124,9	28,9	23,14
Vzorek č. 27	128,8	26,6	20,65
Vzorek č. 28	132,9	30,7	23,10
Vzorek č. 29	149,7	17,3	11,56
Vzorek č. 30	167,3	35,4	21,16
Vzorek č. 31	168,2	31,4	18,67
Vzorek č. 32	169,1	33,6	19,87
Vzorek č. 33	176,2	16,1	9,14
Vzorek č. 34	184,8	13,56	7,34
Vzorek č. 35	214,9	15,96	7,43

Vzorek č. 36	218,2	32,6	14,94
Vzorek č. 37	230,1	18,3	7,95
Vzorek č. 38	245	24,7	10,08
Vzorek č. 39	250,4	12	4,79
Vzorek č. 40	532,9	21,36	4,01
Průměrná výtěžnost [%]			15,49
Korel. koef. EXCEL			0,585

Z tabulky č. 2 vidíme znatelné odlišnosti u koncentrací mezi měřeními a jejich výtěžnosti jsou procentuálně nízké. Průměrná výtěžnost činila pouhých 15,49 %. Korelační koeficient nabył hodnoty 0,585, což značí velmi malou závislost mezi měřeními.

Hodnoty z tab. 2 byly promítnuty do obrázku č. 10.



Obrázek 10: Graf s hodnotami koncentrací z vyšetření C-reaktivního proteinu

Obrázek č. 10 zobrazuje jasné odchylky v měření CRP. Modré body znázorňují analýzu před eliminací lipoproteinů, červené naopak po eliminaci pomocí systému LipoClear.

8 DISKUSE

Praktická část bakalářské práce probíhala v Centrálních laboratořích Nemocnice Strakonice, a. s. v úseku klinické biochemie. Pracovala jsem pod dohledem vedoucího odborného pracovníka laboratoře. Cílem experimentální práce bylo ověřit si použitelnost měření vyčerovací metody LipoClear pro vybrané analyty. K analýze jsem použila celkem 80 vzorků biologického materiálu, z toho 40 vzorků pro vyšetření lipázy a 40 pro vyšetření C-reaktivního proteinu. Vybrané analyty jsem měřila pomocí analyzátoru Advia 1800 od výrobce Siemens. Nejprve jsem provedla měření analytů ze séra bez použití systému LipoClear, poté s použitím tohoto vyčerovacího systému.

Výsledky při analýze lipázy jsou zapsané v tab. č. 1. Ta ukazuje, že hodnoty koncentrací před a po použití LipoClearu jsou si velmi blízké. Také jednotlivé výtěžnosti, jejichž charakteristika určuje míru účinnosti při využití systému vyčerování, jsou bezmála stoprocentní. Na obrázku č. 9 je zobrazen graf, kde modré a červené body značí jednotlivé koncentrace před a po vyčerení séra a ty jasně vykazují shodu. Průměrná výtěžnost s hodnotou 95,99 % a korelační koeficient s výsledkem 1,000 jsou důkazem, že lipáza jako biochemický analyt vyhovuje pro možnost použití LipoClearu.

Hypotéza č. 1 je experimentem vyhodnocena, že použitelnost lipázy pro biochemická stanovení vyhovuje.

Časopis FONS Bulletin z roku 2009 vydal článek od Bunešové et al., názvem *Limity použití LipoClearu při analýze chylosních sér*, kde bylo sepsáno několik analytů s vyměřenými výtěžnostmi. Podle jejich analýzy bylo zjištěno, že C-reaktivní protein měl výtěžnost pouhých 9 %. A právě to jsme si chtěli v *hypotéze č. 2* ověřit.

Podle tabulky č. 2 můžeme říci, že C-reaktivní protein s průměrnou výtěžností 15,49 % není možné použít k vyčerování LipoClearem. Jeho jednotlivé výtěžnosti se pohybovaly od 4,01 % do 34,26 %. Korelační koeficient byl vypočten s výsledkem 0,585. Tato hodnota vyjadřuje slabou až žádnou závislost mezi měřeními. Jako příklad lze vyzdvihnout vzorek č. 40 z tabulky č. 2, ten měl hodnotu koncentrace před vyčerením 532,9 mg/l a po vyčerení jen 21,36 mg/l, což odpovídalo nejnižší výtěžnosti ze všech měření – 4,01 %. Obrázek č. 10 zobrazuje zřetelné odlišnosti mezi provedenými měřeními.

Důvodem tak nízkých výtěžností a slabé závislosti mezi měřeními je, že C-reaktivní protein je protein a ten vlivem vysrážení lipoproteinů ze séra na dno LipoClearových zkumavek ztrácí přibližně 0,4 – 0,8 g/dl těchto proteinů právě vlivem ztráty lipoproteinů, jak uvádí manuál k LipoClearu.

Lipidy jsou hydrofobního charakteru, a aby mohly v lidském organismu ve vodném prostředí správně fungovat, jsou transportovány krví ve spojení s albuminem nebo apoproteiny (= proteiny), navázaných na částicích lipoproteinů, kde tato forma umožňuje lipidům působit ve dvou fázových rozhraních (Novák, 2002).

Protein CRP interaguje ochotně s mnoha membránami nebo intracelulárními ligandy a mimo jiné zejména i s oxidovaným LDL cholesterolem. Tento lipoprotein se vysráží na dno zkumavek LipoClearu a to má za následek, že koncentrace vyšetřovaného analytu CRP v séru rapidně ubyde (Grenier, 2011).

Hypotézu č. 2 tímto potvrzují, že není možné ke stanovení koncentrace C-reaktivního proteinu u chylózních sér použít systém LipoClear. Dle výsledků z vlastního experimentu a z výsledků experimentu Bunešové et al. (2009) je CRP jedním z několika vyšetření nevyhovujících při vyčeřování LipoClearem.

9 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo v teoretické části zohlednit a popsat možné interference, které mohou nastat vlivem preanalytických vlivů a chyb, jak už přímo osobou pacienta, tak i při odběru vzorku, při nakládání s biologickým materiálem, jeho dopravě do laboratoře, atd.

Pro výběr experimentu pro praktickou část jsem se nechala inspirovat časopisem FONS Bulletin, kde v jednom článku bylo téma zaměřené také na použitelnost pro jednotlivé analyty a jejich rozdíly ve výtěžnostech před a po vyšetření vzorků systémem LipoClear.

Zaujalo mě vyšetření C-reaktivního proteinu, který provedla Bunešová et al. v roce 2009. CRP měl výtěžnost pouhých 9 %, oproti tomu například myoglobin měl výtěžnost 132 %, přímý bilirubin 125 %, celkový bilirubin 99 %, IgG a IgA téměř 100 %, kdežto IgM jen 31 %.

CRP jsem si tímto vybrala pro vlastní pokus o pravdivost a použitelnost měření. Lipáza v příbalovém letáku výrobce nebyla popsána, takže jsem mohla pokusit se ověřit si její použitelnost.

Ve výsledcích jsem prokázala, že C-reaktivní protein, stejně jako tomu bylo u experimentu Bunešové et al. (2009), není možný vyšetřovat u chylózních sér po použití systému LipoClear. Naopak lipáza se ukázala jako schopná měření a nevykazovala téměř žádné odlišnosti před a po vyšetření.

SEZNAM LITERATURY

1. Ally, A., 2015. Zdroj obrázku č. 1, [staženo 2018.04.17] Dostupné z: <http://blog.fisherbioservices.com/avoiding-hemolysis-in-blood-sample-collection-and-processing>
2. Beňovská, M., Dastych, M., Čermáková, Z., Tůmová, J. 2010. Preanalytické interference a praktické využití sérových indexů. *Klinická Biochemie a Metabolismus*, 18(39), č. 3, s. 144-148. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2010/2010-3/Benovska-144.pdf>
3. Bonini, P., Plebani, M., Ceriotti F., Rubboli F., 2002. Errors in Laboratory Medicine. *Clinical Chemistry*, 48(5), 691-698, Dostupné z: <http://clinchem.aaccjnls.org/content/48/5/691>
4. Brady, J., O'Leary, N. 1994. Interference due to lipaemia in routine photometric analysis – survey of an underrated problém. *Annals of Clinical Biochemistry*. 31(3), s. 281-288, Dostupné z: DOI: 10.1177/000456329403100312
5. Bunešová, M., Jedličková, B., Janatová, J., Průša, R., 2009. Limity použití LipoClearu při analýze chylosních sér. *FONS Bulletin*, 19(3), s. 20-21, Dostupné z: <http://www.bulletinfons.cz/32009/kvalita2.pdf>
6. Carraro, P., Plebani, M., 2007. Errors in a Stat Laboratory: Types and Frequencies 10 Years Later. *Clinical Chemistry*, 53(7), 1338-1342, Dostupné z: DOI: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.088344>
7. Carraro, P., Servidio, G., Plebani, M., 2000. Hemolysed Specimens: A Reason for Rejection or a Clinical Challenge? *Clinical Chemistry*, 46(2), 306-307, Dostupné z: <http://clinchem.aaccjnls.org/content/clinchem/46/2/306.full.pdf>
8. Cibíček, N., Vacek, J. et al. 2014. *Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně*. 1. vyd. Olomouc: UPOL, ISBN 978-80-244-3951-8
9. Červinka, O., Dědek, V., Ferles, M. 1982. *Organická chemie*. 3. vyd., Praha: SNTL/ALFA, 791 s., ISBN 04-608-82
10. Dastych, M., Breinek, P. et al., 2015. *Klinická biochemie*. 3. vyd., Brno: Masarykova univerzita, ISBN 978-80-210-7788-1
11. Dylevský, I. 2000. *Somatologie*. 2. přeprac. a dopl. vyd., Olomouc: EPAVA, 480 s. ISBN 80-86297-05-5

12. Friedecký, B. 2010. Kvalita v klinické laboratoři a bezpečnost pacientů. *Klinická Biochemie a Metabolismus.*, 18(39), č. 2, s. 136-143, Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2010/2010-3/Friedecky-136.pdf>
13. Grenier, A., 2011. Effet inattendu du Lipoclear® sur le dosage de protéine C réactive. *Ann Biol Clin*, 69(5), s. 620. Dostupné z: DOI: 10.1684/abc.2011.0628
14. Guder, W., G., Narayanan, S., Wisser, H., Zawata, B., 2003. Samples: From the Patient to the Laboratory: The Impact of Preanalytical Variables on the Quality of Laboratory Results. 3.vyd., © 2003 Wiley - VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, ISBN 978-3-527-30981-8, Dostupné z: <http://eqas.ir/pdf/lib/Samples-From%20the%20Patient%20to%20the%20laboratory.pdf>
15. Hawkins, R., 2012. Managing the Pre- and Post-analytical Phases of the Total Testing proces. *Ann Lab Med*, 32(1), 5-16, Dostupné z: DOI: <https://doi.org/10.3343/alm.2012.32.1.5>
16. Jabor, A., Franeková J., Kubiček Z., 2013. *Principy interpretace laboratorních testů*. Praha: Roche, 386 s., ISBN 978-80-260-5094-0
17. Jindrová, H., Kajabová, M., Calábková, R., 2012. Vliv preanalytické fáze na biochemické laboratorní výsledky. *Medicína pro praxi*, 9(3), str. 137-140, Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2012/03/11.pdf>
18. Karlson, P., Gerok, W., Gross, W., 1987. *Pathobiochemie*. 2. přelož. vyd, Praha: Academia, 480 s., ISBN 21-041-87
19. Kleiner, P. et al., 1999. *Vnitřní lékařství*. 1. vyd., Praha: Galén, 949 s., ISBN 80-7262-007-X
20. Kroll, M., Elin, R.J. 1994. Interference with Clinical Laboratory analyses. *Clinical Chemistry*. 40(11), s. 1996-2005, Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/44ee/0ab3cb66af066fd60cce1d3022b82747c0d7.pdf>
21. Laboratorní příručka pro Centrální laboratoře Nemocnice Strakonice, a.s., 9. vyd., 204 s., platná od 2017.10.1, [online], [cit. 2018-04-21], Dostupná z: <http://nemocnice-st.cz/document/cl/lp/labprirucka.pdf>
22. LipoClear, Návod k použití, [online], [cit. 2018-04-25]. Dostupný také z: <https://www.labmark.cz/data/system/attachments/iris-statspin-navod-lc10.pdf> a <http://host.web-print-design.com/statspin/assets/pdfs/54-002860-001.pdf>

23. Lippi, G., Salvagno, G.L., Montagnana, M., Brocco, G., Ruidi, G.C., 2006. Influence of Hemolysis on Routine Clinical Chemistry Testing. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 44(3), 311-316, Dostupné z: DOI: 10.1515/CCLM.2006.054
24. Masopust, J., 1998. *Klinická biochemie: Požadování a hodnocení biochemických vyšetření*. sv. 1, Praha: Karolinum, ISBN 80-7184-648-1
25. Masopust, J., 1998. *Klinická biochemie: Požadování a hodnocení biochemických vyšetření*. sv. 2, Praha: Karolinum, ISBN 80-7184-649-X
26. Mašek, K., Cicvárek, Z. 1973. *Biochemie*. 2. vyd. Praha: Avicentrum, 228 s., ISBN 08-010-73
27. Novák, F. 2002. *Úvod do klinické biochemie*. 1. vyd., Praha: Karolinum, 341 s., ISBN 80-246-0366-7
28. Procházka, J., Bořecká, K., Lánská, V., 2013. Vliv hemolýzy na stanovení celkového a přímého bilirubinu. *Klinická Biochemie a Metabolismus*, 21(42), č. 4, s. 215-219, Dostupné z: http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2013/2013-4/KBM_4_2013_Prochazka-215.pdf
29. Racek, J. et al., 2006. *Klinická biochemie*. 2. vyd. Praha: Galén, 329 s., ISBN 80-7262-324-9.
30. Racek, J., et al., 1999. *Klinická biochemie*. 1. vyd. Praha: Galén, 316 s., ISBN 80-7262-023-1.
31. Rosina, J., Kolářová, H., Stanek, J. 2006. *Biofyzika pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd., Praha: Grada, 230 s., ISBN 80-247-1383-7
32. Sasaki, Y., Tanabe, M., Koga, K. 2015. Chyle Improved with Plasma Exchange in Hypertriglyceridemic Pancreatitis. *Family Medicine & Medical Science Research*. 4(2), zdroj obr. č. 3, Dostupné z: DOI: <http://dx.doi.org/10.4172/2327-4972.1000166>
33. SEKK spol. s r.o., EURACHEM-ČR, 2009. Metrologická terminologie v klinické a analytické laboratoři. [online], 2. přepr. a dopl. vyd., [cit. 2018-04-01], © SEKK spol. s r. o. a EURACHEM-ČR, Dostupné z: https://www.sekk.cz/terminologie/Text/Terminologie.htm#Analyticka_interference
34. Schneiderka, P. et al, 2004. *Kapitoly z klinické biochemie*. 2. vyd., Praha: Karolinum, 365 s., ISBN 80-246-0678-X
35. Siemens. 04.2017. Lipáza, návod k použití v Advia Chemistry Systems, platnost externího dokumentu v Centrálních laboratořích Nemocnice Strakonice, a. s. od 07.06.2017

36. Siemens. 06.2016. C-reaktivní protein, návod k použití v Advia Chemistry Systems, platnost externího dokumentu v Centrálních laboratořích Nemocnice Strakonice, a. s. od 07.06.2017
37. Siemens. 08.2008. Uživatelská příručka Advia 1800. Příručka Centrálních laboratoří Nemocnice Strakonice, a.s., platnost dokumentu od 2010.03.01 beze změn
38. Štern, P. 2006. Současné možnosti turbidimetrie a nefelometrie. *Klinická Biochemie a Metabolismus*. 14(35), č. 3, s. 146-151, Dostupné z: <http://nts.prolekare.cz/cls/odkazy/kbm0603-146.pdf>
39. Trenčanská, Š., 2009. *Ovlivnění biochemických analýz stavem biologického materiálu (hemolýza, ikterita, chylozita)*. Brno. Bakalářská práce. LF MUNI
40. Trojan, S., a kol., 2003. *Lékařská fyziologie*. 4. vyd., Praha: Grada, 772 s., ISBN 80-247-0512-5.
41. Vortex Classic. Uživatelská příručka Centrálních laboratoří Nemocnice Strakonice, a. s., výrobce VELP Scientifica, platnost externího dokumentu od 2018.02.01
42. Zákon č. 372/2011 Sb., o zdravotních službách a podmínkách k jejich poskytování (o zdravotních službách), 2011. [online], [cit. 2018-04-20]. In: *Sbírka zákonů České republiky*, částka 58, s. 2634-41. ISSN 1211-1244. Dostupné z: <http://aplikace.mvcr.cz/sbirka-zakonu/ViewFile.aspx?type=z&id=49785>
43. Zima T. et al., 2007. *Laboratorní diagnostika*. 2. dopl. a přeprac. vyd., Praha: Galén, 906 s., ISBN 978-80-7262-372-3

Seznam zkratek

- ABR – acidobazická rovnováha
ACP – kyselá fosfatáza
AFP – alfa-fetoprotein
ALB - albumin
ALP – alkalická fosfatáza
ALT – alaninaminotransferáza
AMS - amyláza
BIL - bilirubin
CK – kreatinkináza
CK-MB – kreatinkináza v srdečním svalu
Cl⁻ - chloridový aniont
CO₂ – oxid uhličitý
CRP – C-reaktivní protein
DGGMR - 1,2-dilauryl-rac-glycero-3-glutaric acid(6'-methylresorufin)ester
DHEA - dehydroepiandrosteron
EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová
EKK – externí kontrola kvality
Fe - železo
GIT – gastrointestinální trakt
GMT / GGT – gamma – glutamyltransferáza
Hb - hemoglobin
hCG – human chorionic gonadotropin – lidský choriový gonadotropin
HDL – lipoproteiny s vysokou hustotou
IDL – lipoproteiny se střední hustotou
IgA – imunoglobulin A
IgG – imunoglobulin G
IgM – imunoglobulin M
IKK – interní kontrola kvality
ISE – iontově selektivní elektroda
ISO - International Organization for Standardization – mezinárodní organizace pro normalizaci

K⁺ - draslíkový kationt
KVO – kardiovaskulární onemocnění
LD – laktát dehydrogenáza
LDL – lipoproteiny s nízkou hustotou
LIS – laboratorní informační systém
LPS - lipáza
Mg - hořčík
MK – mastná kyselina
Na⁺ - sodíkový kationt
NaF – fluorid sodný
O₂ - kyslík
P - fosfor
pO₂ – parciální tlak kyslíku
POCT – point of care testing – testování v místě péče o pacienta
RES – retikuloendotelový systém
SP-1 – specifický protein 1 – transkripční faktor SP1
TAG - triacylglycerol
TAPS - N-tris(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropansírová kyselina
TAT – turn around time – doba odezvy
TnT - troponin
TRF - transferin
UBG - urobilinogen
U-K⁺ - močový kationt draslíku
U-Na⁺ - močový kationt sodíku
VLDL – lipoprotein s velmi nízkou hustotou