



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

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

## Zavedení spektrofotometrického stanovení citrátů a oxalátů v moči do rutinního provozu klinické laboratoře

# BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ/

ZDRAVOTNÍ LABORANT

**Autor:** Martin Fejt

**Vedoucí práce:** PharmDr. Michal Vostrý

České Budějovice 2020

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „*Zavedení spektrofotometrického stanovení citrátů a oxalátů v moči do rutinního provozu klinické laboratoře*“ jsem vypracoval 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 11. 08. 2020

.....

Martin Fejt

## **Poděkování**

Zde bych rád chtěl poděkovat svému vedoucímu práce PharmDr. Michalu Vostrému za trpělivost, cenné rady a podmínky při psaní této bakalářské práce. Dále bych rád poděkoval vedení a kolektivu Ústavu Klinické biochemie a hematologie Fakultní nemocnice Plzeň za umožnění vypracování této bakalářské práce.

# **Zavedení spektrofotometrického stanovení citrátů a oxalátů v moči do rutinního provozu klinické laboratoře**

## **Abstrakt**

Stanovení hladiny citrátů a oxalátů v moči má velký význam při diagnostice a následném monitorování pacientů s urolitiázou. Údaje o koncentraci těchto látek v moči spolu s dalšími metabolickými vyšetřeními pomáhají určit pravděpodobnost recidivy urolitiázy. Současně pomáhají lékařům k nalezení vhodných režimových opatření pro pacienty s touto chorobou.

Tato bakalářská práce se zabývá zavedením stanovení citrátů a oxalátů do rutinního provozu klinické laboratoře. V teoretické části je nejprve stručně popsána problematika urolitiázy, její rozdělení, etiopatogeneze, léčba a profylaxe. Důraz je kladen na úlohu citrátů a oxalátů. Dále jsou charakterizovány jednotlivé druhy močových konkrémentů a možnosti jejich analýzy. Následuje přiblížení procesu verifikace měřicího postupu a s ní spojených výkonnostních parametrů. Jsou zde též vyjmenovány a popsány související analytické vlastnosti metod. V rámci popisu zaváděcího procesu je stručně vysvětleno nastavení parametrů v laboratorním a nemocničním informačním systému.

V laboratoři ÚKBH FN Plzeň jsme pro stanovení koncentrace citrátů a oxalátů v moči zvolili enzymatické metody a automatický analyzátor Beckman Coulter AU480. Teoretická část bakalářské práce tedy pokračuje popisem spektrofotometrie a fungování použitého přístroje. Vyzkoušeli jsme reagenty od zahraničních výrobců INstruchemie (Holandsko) a LTA (Itálie). Následuje vysvětlení principů metod od výše uvedených výrobců, ve stručnosti jsou uvedeny další možné způsoby stanovení těchto analytů. Pro rutinní použití byly vybrány reagenty od firmy INstruchemie. Jelikož tento výrobce již své metody na spektrofotometrech firmy Beckman Coulter validoval, proběhla na ÚKBH pouze jejich verifikace.

Praktická část této bakalářské práce se zabývá nejprve přípravou reagentů k analýze a pokračuje naprogramováním parametrů jednotlivých metod do analyzátoru. Hlavní náplní této práce je zevrubný popis provedení jednotlivých fází analýz, jež jsou vyžadovány verifikačním procesem. Po úspěšném dokončení všech měření a vyhodnocení jejich výsledků byly vypracovány příslušné verifikační protokoly a metody uvedeny do rutinního provozu laboratoře.

**Klíčová slova**

Citrát; oxalát; urolitiáza; spektrofotometrie; analytické vlastnosti metod; analyzátor Beckman Coulter AU480; enzymatické stanovení; verifikace

# **Introduction of spectrophotometric determination of citrates and oxalates in urine into routine clinical laboratory**

## **Abstract**

Determination of the level of citrates and oxalates in urine is of great importance in the diagnosis and subsequent monitoring of patients with urolithiasis. Data about urine concentrations of these substances, together with other metabolic tests, help to determine the likelihood of recurrence of urolithiasis. At the same time, they help physicians find appropriate regime measures for patients with the disease.

This bachelor thesis deals with the introduction of the determination of citrates and oxalates in the routine operation of a clinical laboratory. The theoretical part first briefly describes the issue of urolithiasis, its distribution, etiopathogenesis, treatment and prophylaxis. Emphasis is placed on the role of citrates and oxalates. Furthermore, individual types of urinary stones and possibilities of their analysis are characterized. The following is an approach to the process of verification of the measuring procedure and associated performance parameters. The related analytical properties of the methods are also listed and described here. Within the description of the implementation process the setting of parameters in the laboratory and hospital information system is briefly explained.

In the laboratory of ÚKBH FN Plzeň we chose enzymatic methods and an automatic analyzer Beckman Coulter AU480 to determine the concentration of citrates and oxalates in urine. The theoretical part of the bachelor thesis continues with a description of the spectrophotometry and operation of the instrument used. We tested reagents from foreign manufacturers INstruchemie (Netherlands) and LTA (Italy). The following is an explanation of the principles of the methods from the above manufacturers and briefly lists other possible methods for the determination of these analytes. Reagents from INstruchemie were selected for routine use. As this manufacturer has already validated its methods on Beckman Coulter spectrophotometers, only their verification has taken place at ÚKBH.

The practical part of this bachelor thesis deals first with the preparation of reagents for analysis and continues with programming the parameters of individual methods into the analyzer. The main content of this work is a detailed description of the implementation of individual phases of analysis, which are required by the verification process. After successful completion of all measurements and evaluation of their results, appropriate verification protocols were prepared and the methods were put into routine operation of the laboratory.

### **Key words**

Citrate; oxalate; urolithiasis; spectrophotometry; analytical properties of methods; analyzer Beckman Coulter AU480; enzymatic determination; verification

## Obsah

Úvod .....	12
1. Teoretická část .....	14
1.1 Kyselina citronová .....	14
1.2 Kyselina šťavelová (oxalová) .....	15
1.3 Urolitiáza .....	16
1.3.1 Rozdělení .....	16
1.3.2 Močové konkrementy a jejich etiologie .....	19
1.3.2.1 Kalciové konkrementy .....	19
1.3.2.2 Struvitové konkrementy (hořečnatoamonné fosfáty) .....	21
1.3.2.3 Konkrementy kyseliny močové a jejich solí (uráty) .....	21
1.3.2.4 Konkrementy cystinové .....	21
1.3.2.5 Konkrementy indukované léky .....	21
1.3.3 Analýza konkrementů .....	22
1.3.4 Chemická analýza .....	22
1.3.4.1 Infračervená spektroskopie .....	22
1.3.4.2 Polarizační mikroskopie .....	22
1.3.4.3 Rentgenová difrakce .....	22
1.3.4.4 Morfologická studie .....	23
1.3.5 Etiopatogeneze .....	23
1.3.5.1 Obecná etiologie .....	23
1.3.5.2 Patogeneze .....	23
1.3.6 Diagnostika .....	25
1.3.6.1 Základní klinické projevy .....	26
1.3.6.2 Základní laboratorní vyšetření .....	26
1.3.6.3 Zobrazovací metody .....	26
1.3.6.4 Metabolické vyšetření .....	28
1.3.7 Terapie .....	29
1.3.7.1 Medikamedikamentózní expulzní terapie (MET) .....	29
1.3.7.2 Perorální chemolýza .....	29
1.3.7.3 Extrakorporální litotrypse (ESWL) .....	29
1.3.7.4 Ureteroskopie .....	30
1.3.7.5 Perkutánní nefrolitomie (PNL) .....	30
1.3.7.6 Laparoskopie a otevřená chirurgie .....	30
1.3.8 Metafylaxe kalciových konkrementů .....	30



1.4	Validace a verifikace metody .....	32
1.4.1	Validace.....	32
1.4.2	Verifikace .....	33
1.5	Analytické vlastnosti metod .....	34
1.5.1	Preciznost.....	34
1.5.2	Pravdivost.....	35
1.5.3	Přesnost.....	36
1.5.4	Analytická citlivost .....	36
1.5.4.1	Mez detekce .....	37
1.5.4.2	Mez stanovitelnosti .....	37
1.5.4.3	Oblast linearity.....	37
1.5.5	Analytická specifčnost .....	38
1.5.6	Nejistota měření .....	38
1.5.7	Metrologická návaznost .....	40
1.5.8	Biologická variabilita .....	40
1.5.9	Kritická diference.....	41
1.6	Výkonnostní parametry validace a verifikace analytické metody .....	42
1.6.1	Opakovatelnost .....	42
1.6.2	Mezilehlá preciznost .....	42
1.6.3	Vychýlení (bias).....	42
1.6.4	Výtěžnost.....	44
1.6.5	Pracovní rozsah.....	45
1.7	Referenční interval a meze .....	46
1.8	Kontrola kvality .....	47
1.8.1	Interní kontrola kvality (IQC).....	47
1.8.2	Externí kontrola kvality (EQC).....	48
1.9	Metodika.....	49
1.9.1	Spektrofotometrie.....	49
1.9.2	Spektrometr a jeho součásti .....	51
1.9.3	Infračervená spektrometrie .....	53
1.9.4	Biochemický analyzátor AU480 od společnosti Beckman Coulter.....	54
1.9.5	Princip stanovení citrátů – metoda od firem INstruchemie a LTA.....	56
1.9.6	Další principy stanovení citrátů .....	57
1.9.6.1	Chemické metody .....	57
1.9.6.2	Separční metody.....	57

1.9.6.3	Ostatní enzymatické metody .....	58
1.9.7	Princip stanovení oxalátů – metoda od firem INstruchemie a LTA .....	58
1.9.8	Další principy stanovení oxalátů.....	60
1.9.8.1	Chemické metody .....	60
1.9.8.2	Separční metody.....	60
1.9.8.3	Ostatní enzymatické metody .....	61
1.10	Zavedení metod do informačních systémů.....	61
1.10.1	Zavedení metod do laboratorního informačního systému (LIS).....	61
1.10.2	Zavedení metod do nemocničního informačního systému (NIS) .....	63
2.	Praktická část .....	64
2.1	Reagencie a chemikálie .....	64
2.1.1	Obsah reagenčních setů .....	64
2.1.2	Příprava reagensů .....	65
2.1.3	Ostatní použité chemikálie .....	66
2.1.4	Příprava referenčních roztoků.....	67
2.2	Interní kontroly kvality.....	68
2.3	Instrumentace.....	68
2.3.1	Použité vybavení .....	68
2.3.2	Použitý software.....	69
2.4	Naprogramování metod do analyzátoru .....	69
2.5	Preanalytická fáze stanovení citrátů a oxalátů v moči .....	72
2.5.1	Mimolaboratorní preanalytická fáze .....	72
2.5.2	Laboratorní preanalytická fáze .....	73
2.5.2.1	Laboratorní preanalytická fáze stanovení citrátů.....	74
2.5.2.2	Laboratorní preanalytická fáze stanovení oxalátů .....	74
2.6	Analytická fáze stanovení citrátů a oxalátů v moči .....	76
2.7	Postanalytická část stanovení citrátů a oxalátů v moči .....	79
3.	Výsledky.....	80
3.1	Vyzkoušení metod výrobců INstruchemie a LTA .....	80
3.2	Verifikace stanovení citrátů a oxalátu metodou INstruchemie.....	82
3.2.1	Opakovatelnost .....	82
3.2.2	Mezilehlá preciznost .....	84
3.2.3	Výtěžnost.....	86
3.2.4	Pracovní rozsah.....	89
3.2.5	Výpočet nejistot měření.....	92

3.2.6	Verifikační protokoly .....	95
4.	Diskuse .....	98
4.1	Vyzkoušení metod výrobců INstruchemie a LTA .....	98
4.1.1	Metody na stanovení citrátu v moči.....	98
4.1.2	Metody na stanovení oxalátu v moči .....	99
4.2	Verifikace metod na stanovení citrátů a oxalátů v moči .....	100
4.2.1	Výběr použitých hladin QC a preciznost měření.....	100
4.2.2	Výtěžnost měření .....	103
4.2.3	Pracovní rozsah.....	104
4.2.4	Nejistota měření .....	104
4.2.5	Verifikační protokoly .....	105
5.	Závěr.....	106
6.	Seznam citované literatury .....	107
7.	Seznam tabulek, obrázků a grafů .....	118
8.	Přílohy .....	121
9.	Seznam zkratk .....	126

## Úvod

Zavádění metod do rutinní praxe klinické laboratoře je proces zahrnující mnoho kroků. Většina metod je zaváděna do provozu buď při zakládání nové laboratoře, nebo postupně během času, kdy medicínský a technologický pokrok přináší nové diagnostické možnosti. K zavádění nových metod dochází, když se otevřou nová oddělení či ambulance, které ke svému provozu vyžadují specifickou laboratorní diagnostiku. V tomto případě byly do působnosti metabolické poradny, která je součástí Ústavu klinické biochemie a hematologie (ÚKBH) v plzeňské fakultní nemocnici (FN), přidána péče o pacienty s diagnózou urolitiázy.

Urolitiáza je onemocnění provázené tvorbou solidních konkrémentů v močových cestách. Tyto konkrémenty kromě poškození tkání způsobují také vyšší riziko infekce či obstrukce močových cest. Navíc v momentě, kdy jsou konkrémenty uvedeny do pohybu, způsobují pacientům silnou kolikovitou bolest. Po odstranění konkrémentů z močových cest, ať už spontánně, nebo pomocí invazivní metody, dochází více než u poloviny pacientů k recidivě onemocnění. Protože urolitiáza je onemocnění převážně multifaktoriální, pro zvrácení tohoto trendu je třeba zjistit jednotlivé příčiny onemocnění a eliminovat rizikové faktory tvorby močových konkrémentů. Tato úloha spadá z hlediska medicínské odbornosti spíše do působnosti internistů či biochemiků než urologů. Součástí vyšetření prováděných v rámci metafylaxe urolitiázy je stanovení biochemických markerů urolitiázy, ke kterým patří mimo jiné i nově zaváděné metody na stanovení citrátů a oxalátů v moči.

Poté, co bylo na ÚKBH rozhodnuto o zavedení nových metod do rutinní praxe, bylo s ohledem na provozní okolnosti v laboratoři určeno, že stanovení citrátů a oxalátů v moči bude prováděno pomocí enzymatických metod na biochemickém analyzátoru AU480 od firmy Beckman Coulter. Protože firma Beckman Coulter ve svém portfoliu metod citráty a oxaláty nemá, byly pro porovnání zvoleny metody od firem INstruchemie a LTA. Vybrané metody byly následně zavedeny do rutinního provozu v souladu s normou ČSN EN ISO 15189.

Kromě samotného analytického procesu stanovení, musí být zaváděné metody také implementovány do nemocničních a laboratorních systémů (NIS a LIS), které umožňují rychlý a efektivní průběh všech jednotlivých kroků od zadání požadavků na vyšetření, až po předání validních výsledků lékaři.

Nakonec jedním z nejdůležitějších kroků v rámci zavádění metod do rutinního provozu laboratoře je zajistit správnou preanalytickou část samotného stanovení, zahrnující informování pacienta, správný odběr či sběr vyšetřovaného materiálu a přípravu na samotnou analýzu.

Cíle této práce jsou shrnuty v následujících bodech:

- 1) Stručné seznámení s problematikou urolitiázy a významu provádění laboratorních metod s ní souvisejících. Důraz bude kladen hlavně na stanovení citrátů a oxalátů v moči.
- 2) Naprogramování a vložení komerčně dodávaných reagenčních souprav na stanovení citrátů a oxalátů od výrobců INstruchemie a LTA do biochemického analyzátoru AU480 firmy Beckman Coulter.
- 3) Provedení kalibrací, změření kontrolních vzorků a porovnání metod od obou výrobců na základě výsledků měření a provozně ekonomických kritérií.
- 4) U obou metod vybraného výrobce provést verifikaci (popřípadě validaci) v souladu s normou ČSN EN ISO 15189.
- 5) Popis zavedení těchto nových metod do laboratorního a nemocničního informačního systému.

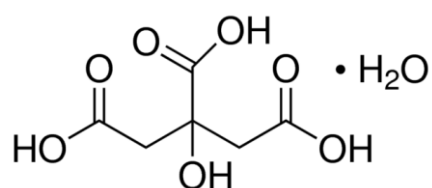
# 1. Teoretická část

## 1.1 Kyselina citronová

Kyselina citronová (*citric acid*) je slabá trikarboxylová kyselina, jejíž systematický název je kyselina 2-hydroxypropan-1,2,3-trikarboxylová nebo kyselina 3-karboxy-3-hydroxypentandiová. Vyskytuje se buď v čistém stavu, nebo jako monohydrát. Je to bezbarvá krystalická, ve vodě rozpustná látka bez zápachu, která má silně kyselou chuť. V přírodě se vyskytuje prakticky ve všech druzích rostlin a živočichů, nejvíce je obsažena v citrusových plodech. Hlavní úloha kyseliny citronové v organismu je účast v citrátovém (Krebsově) cyklu, což je hlavní aerobní dráha energetického metabolismu, která oxiduje acetylové zbytky získané z cukrů, tuků a proteinů.

Kyselina citronová vytváří stabilní komplexy s mnoha kovy, čehož je využíváno při čištění (např. kotle a výměníky tepla). Tato schopnost je klíčová při blokování krystalizace oxalátových solí v moči a bude podrobněji popsána v kapitole [1.3.4.2](#). Kyselina citronová a její sodné nebo draselné soli jsou hojně používané při výrobě potravin. Její estery se přidávají do plastových obalů jako změkčovadla.

Průmyslová výroba je založena na fermentaci sacharózy nebo glukózy pomocí mikroorganismů. Nejčastěji se využívá hub *Aspergillus niger*, méně často kvasinky (Verhoff, 2005). Stanovit koncentraci kyseliny citronové lze mnoha způsoby, přičemž možnosti jejího stanovení v moči jsou podrobněji popsány v kapitolách [1.9.5](#) a [1.9.6](#).



Obrázek 1: Strukturní vzorec monohydrátu kyseliny citronové

Zdroj: Sigma-Aldrich (dostupné z: <https://lurl.cz/OzVCH>)

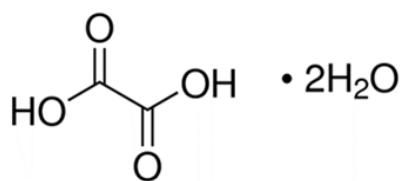
## 1.2 Kyselina šťavelová (oxalová)

Kyselina šťavelová (*oxalic acid*) je silná dikarboxylová kyselina, jejíž systematický název je kyselina ethandiová. Jedná se o nejsilnější organickou kyselinu (disociační konstanta prvního stupně  $pK_{a1}$  má hodnotu 1,27). Vyskytuje se nejčastěji jako dihydrát. Dihydrát kyseliny šťavelové je bezbarvá ve vodě rozpustná látka bez zápachu, která tvoří bezbarvé hranoly či granule. Kromě leptavých účinků je také jedovatá, nejnižší smrtelná dávka pro člověka (LDLo) perorálně je 71 mg/kg.

V přírodě se nachází většinou ve formě solí, které jsou rozšířené u rostlin i živočichů (Riemenschneider, Tanifuji, 2005). U živočichů vzniká hlavně jako odpadní produkt metabolismu. U člověka je to metabolismus kyseliny askorbové a glycinu (Kawaciuk, 2009). Jen zhruba desetina pochází z potravy. Velké množství oxalátů obsahuje špenát, rebarbora a mangold. Zatímco oxaláty alkalických kovů a trojmocného železa jsou dobře rozpustné ve vodě, oxaláty kovů alkalických zemin jsou téměř nerozpustné, což má vliv na tvorbu močových konkrementů (viz kapitola [1.3](#)).

Kyselina šťavelová má mnohé využití. Pro snadnou rozpustnost oxalátu železitého je využívána například pro odstranění rzi. Další využití má při zpracování textilií, při bělení kůže, dřeva a buničiny. Významné místo má i v chemické syntéze, kde jsou využívány její redukční vlastnosti (sama je oxidována na  $CO_2$  a  $H_2O$ ), schopnost tvorby esterů a dehydratační schopnosti. (Riemenschneider, Tanifuji, 2005). V analytické chemii je využívána jako standard při alkalimetrických titracích (Křížek, Šíma, 2015).

Průmyslová výroba kyseliny šťavelové využívá několik metod. Část je založena na oxidaci sacharidů, ethylenglykolu a propenu pomocí kyseliny dusičné. Jiná možnost je dvoukroková reakce, kde reaguje oxid uhelnatý s nižším alkoholem za vzniku diesteru kyseliny šťavelové, který je následně hydrolyzován na kyselinu šťavelovou a původní alkohol (Riemenschneider, Tanifuji, 2005). Možnosti měření koncentrace kyseliny šťavelové jsou široké. Analýza hladiny v moči je popsána v kapitolách [1.9.7](#) a [1.9.8](#).



Obrázek 2: Strukturní vzorec dihydrátu kyseliny šťavelové

Zdroj: Sigma-Aldrich (dostupné z: <https://1url.cz/OzVC2>)

### **1.3 Urolitiáza**

Urolitiáza je poměrně časté závažné onemocnění, při kterém vznikají močové kameny ve vylučovací soustavě. Jedná se o multifaktoriální chorobu s urologickými projevy, která má vysokou tendenci k recidivě (Stejskal, 2009). Ta se projevuje alespoň jednou za život u zhruba 50 % pacientů a asi u 10 % pacientů dochází k častému opakování. Urolitiázu lze považovat za civilizační chorobu, kdy nejvyšší prevalence (> 10 %) je ve státech s vysokou životní úrovní jako USA, Kanada a Švédsko (Türk et al., 2019). Celosvětová prevalence se pohybuje mezi 2–3 % a v České republice je odhadována mezi 0,5–5,8 % (Petřík, 2011). Statistické údaje z USA za období 2013–2014 ukazují, že nejvyšší incidence v tomto regionu je u mužů starších 60 let (17,8 %), následovaných muži ve věku 40–59 let (12,6 %). U žen je prevalence nižší, má však stoupající tendenci (dvojnásobný vzestup za období 2007–2013) a to obzvláště ve věku 20–39 let, kde je vyšší než u stejně starých mužů (Chen et al., 2016).

Odstranění močového konkrementu bez vyřešení příčiny jeho vzniku vede často k recidivě tvorby. Recidivující urolitiázy zatěžují pacienty svými bolestivými projevy a invazivní zákroky, které se používají k odstranění konkrementů, traumatizují renální parenchym a močové cesty. To může časem vést až k poškození funkce ledvin. K renálnímu selhání může vést i kombinace urolitiázy s infekcí v močových cestách. Mimo to jsou invazivní zákroky odstraňující močové kameny poměrně finančně náročné.

Proto je velmi důležité předcházet vzniku recidivy urolitiázy. Lze toho dosáhnout například odstraněním metabolických poruch a úpravou životosprávy (viz kapitola [1.3.7](#)). Z toho důvodu by měla probíhat spolupráce mezi urology a internisty se zaměřením na metabolismus (Stejskal, 2009; Kawaciuk, 2009).

#### **1.3.1 Rozdělení**

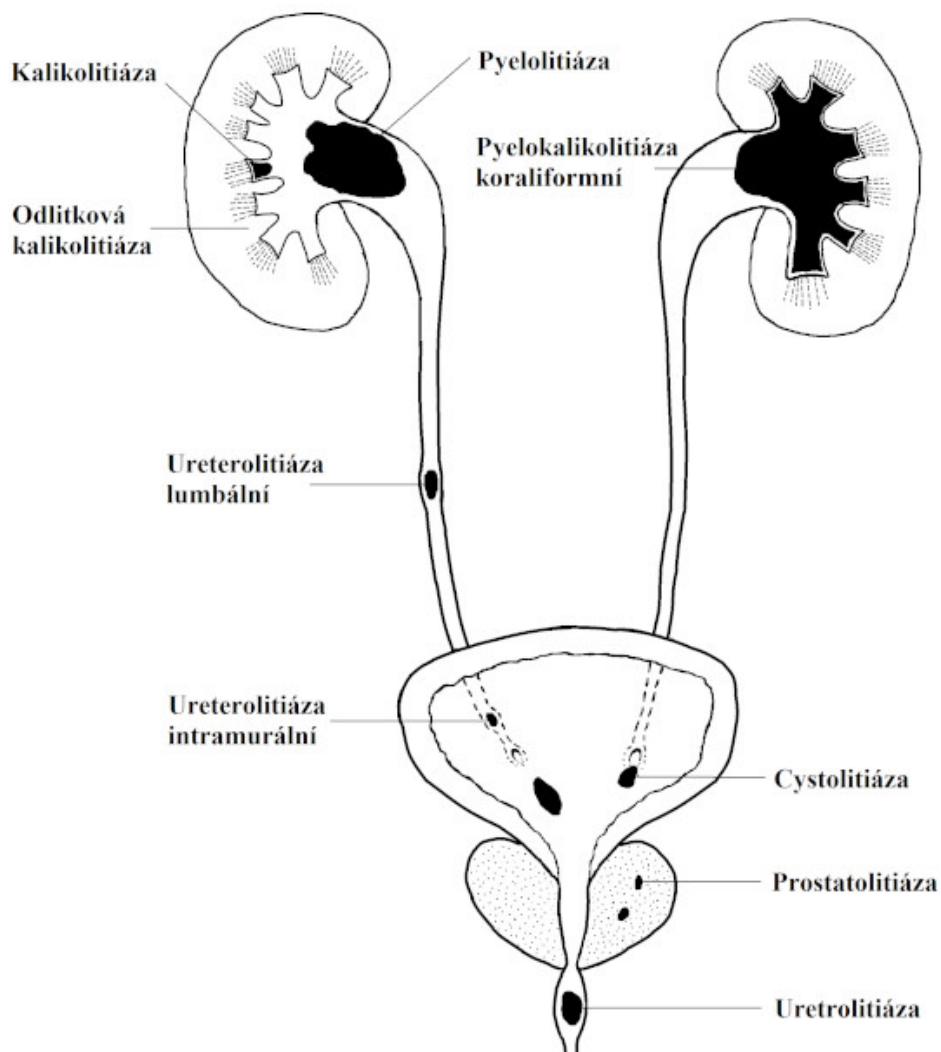
Urolitiázu lze rozdělit dle Stejskala (2009) na základě několika kritérií. Prvním způsobem dělení je dle místa výskytu konkrementu v močových cestách, druhým podle etiologie a třetí možností je dělení na základě složení močového konkrementu. Konkrementy lze také třídit podle jejich viditelnosti RTG spektru (Kim et al., 2007).

Podle výskytu se dělí urolitiáza na nefrolitiázu, ureterolitiázu, cystolitiázu a uretrolitiázu. Toto dělení urolitiázy je zobrazeno na obrázku č. 3, který ukazuje i jednotlivé podtypy



nefrolitiázy. Obrázek zobrazuje i prostatolitiázu, která ale nevzniká z moče, nýbrž z prostatického sekretu (Kawaciuk, 2009).

Způsob dělení podle etiologie rozlišuje konkrementy vzniklé z příčin neinfekčních, infekčních, genetických a lékových. Mezi neinfekční konkrementy patří kalciumoxaláty, kalciumfosfáty a konkrementy z kyseliny močové. K infekčním konkrementům patří karbonátapatitfosfát, urát amonný a karbonátapatit. Z genetických příčin vznikají konkrementy cystinové, xantinové a 2,8-dihydroxyadeninové (Türk et al., 2019).



Obrázek 3: Dělení urolitiázy dle výskytu v močových cestách

Zdroj: Vlastní tvorba dle Kawaciuka (2009)

Rozdělit močové konkrementy na základě typu a složení konkrementu lze následovně. Nejčastější jsou konkrementy kalciové, poté struvitové (hořečnatoamonné fosfáty), dále jsou to konkrementy kyseliny močové a jejích solí (uráty), cystinové konkrementy,

konkrementy indukované léky a ostatní (Alelign, Petros, 2018). Jednotlivé sloučeniny, které mohou být součástí močových konkrementů, jsou zobrazeny v tabulce č. 1. Velice často jsou konkrementy tvořeny směsí více látek (Türk et al., 2019).

Tabulka 1: Látkové složení močových konkrementů – seřazeno dle četnosti výskytu

Chemické jméno	Jméno minerálu	Chemický vzorec
Kalciumoxalát monohydrát	Whewellit	$\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
Kalciumoxalát dihydrát	Weddelit	$\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Kalciumfosfát	Apatit	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
Kalciumhydroxylfosfát	Karbonátapatit	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$
$\beta$ -trikalciumfosfát	Whitlockit	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
Karbonátapatitfosfát	Dahllit	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$
Kalciumhydrogenfosfát dihydrát	Brushit	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Uhličitan vápenatý	Aragonit	$\text{CaCO}_3$
Oktakalciumfosfát		$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
Kyselina močová	Uricit	$\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$
Kyselina močová dihydrát	Uricit	$\text{C}_5\text{H}_4\text{O}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Amoniumurát		$\text{NH}_4\text{C}_5\text{H}_3\text{N}_4\text{O}_3$
Nátriumurát monohydrát		$\text{NaC}_5\text{H}_3\text{N}_4\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$
Magnesiumammoniumfosfát hexahydrát (tripelfosfát)	Struvit	$\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
Magnesiumhydrogenfosfát trihydrát	Newberyit	$\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
Magnesiumammoniumfosfát monohydrát	Dittmarit	$\text{MgNH}_4(\text{PO}_4) \cdot \text{H}_2\text{O}$
Cystin		$[\text{SCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}]_2$
Xantin		
2,8-dihydroxyadenin		
Proteiny		
Cholesterol		
Kalcit		
Urát draselný		
Trimagnesium fosfát		
Melanin		
Matrix		
Lékové konkrementy: Allopurinol, Amoxicillin, Ceftriaxon, Quinolon, Efedrin, Indinavir, Magnesium trisilicát Sulfonamid, Triamteren, Zonisamid		

Zdroj: Uroweb Guidelines – urolithiasis (Türk et al., 2019)

### ***1.3.2 Močové konkrementy a jejich etiologie***

Močové konkrementy se skládají z krystalické a nekrystalické fáze. Základem močového konkrementu bývá organický materiál, zvaný matrix. Ten funguje jako základ, na kterém dochází k agregaci krystalů a růstu konkrementu. Samotná matrix a nekrystalický materiál tvoří 10–65 % objemu konkrementu, i když její hmotnostní podíl činí u neinfekčních konkrementů zhruba jen 3 %. Matrix se skládá nejvíce z proteinů (hlavně albumin), dalšími složkami bývají sacharidy, lipidy, glukosamin, voda a ostatní anorganické součásti. Lipidovou součástí matrix tvoří hlavně fosfolipidy z buněčných membrán. Fosfolipidová součást matrix podporuje tvorbu kalciových konkrementů (Kawaciuk, 2009; Alelign, Petros, 2018).

V následujících podkapitolách budou stručně popsány jednotlivé skupiny konkrementů, které jsou rozdělené podle jejich složení a poruchy vedoucí k jejich vzniku. V příloze jsou jejich fotografie pořízené stereomikroskopem (obrázky č. 16–22).

#### ***1.3.2.1 Kalciové konkrementy***

Konkrementy obsahující vápník se vytváří převážně v ledvinách a představují až 80 % všech močových konkrementů. Nejčastěji se vyskytují jako čistý kalciumoxalát (50 %). Ten může být ve formě monohydrátu, jenž je zvaný jako whewellit anebo dihydrátu, zvaného weddellit. Méně častý je kalciumfosfát (5 %), jenž se označuje jako apatit. Poměrně častá je směs kalciumoxalátu a kalciumfosfátu (45 %). Dalšími minerály obsahující vápník je kalciumhydrogenfosfát (zvaný brushit). Konkrementy složené čistě z těchto dvou minerálů se vyskytují velice vzácně, nejčastěji jsou součástí oxalátových konkrementů (Kawaciuk, 2009; Alelign, Petros, 2018). Faktorem majícím vliv na tvorbu těchto kamenů je pH moče. Při rozmezí 5,0 až 6,5 se tvoří převážně kalciumoxalátové konkrementy. Při pH 6,5–6,8 a současnou hyperkalciurií se tvoří brushit a při pH vyšším než 6,8 se tvoří apatit (Türk et al., 2019).

Na vzniku kalciumoxalátové urolitiázy se může podílet několik příčin, s tím že se často jedná o jejich kombinaci. Jednak nízký objem moče, dále hyperkalciurie, hyperoxalurie, hypocitraturie a hypomagnesiurie způsobená nedostatečným příjmem hořčiku potravou (Hruska, Beck, 2013). Fosforečnanové konkrementy vznikají na základě tří různých příčin. Jsou to hyperparathyreóza, renální tubulární acidóza a infekce močových cest (Türk et al., 2019).

Hyperkalciurie představuje stav, kdy je odpad vápníku do moče větší než 200 mg/24 hodin, nebo poměr vápník/kreatinin v moči je vyšší než 0,18. Tradiční dělení rozlišuje hyperkalciurii na absorpční, renální, resorpční a hyperkalciurii spojenou se ztrátou fosfátů ledvinami. Velice častá je hyperkalciurie bez zjevné příčiny neboli idiopatická. Absorpční hyperkalciurie je způsobená nadměrným vstřebáváním vápníku v gastro-intestinálním traktu. Renální hyperkalciurii způsobuje porucha resorpce vápníku v distálním tubulu. S poruchou ledvin je spojeno i nadměrné vylučování fosfátů, které indukuje vyšší aktivaci vitamínu D, to vede ke zvýšenému vstřebávání nejen fosforu, ale i vápníku, jehož přebytky jsou vylučovány do moče. Resorpční hyperkalciurie je většinou způsobena hyperparathyreózou, kdy vysoké hladiny parathormonu způsobují nadměrné uvolňování vápníku z kostí. Možnou příčinou může být nadměrný příjem sodíku, který vede k jeho zvýšené exkreci do moče a zároveň tak snižuje resorpci vápníku. Další příčiny hyperkalciurie mohou být například zvýšená citlivost k vitamínu D, nadměrný příjem vápníku v potravě, sarkoidóza, mnohočetný myelom a další (Leslie, Hussain, 2020).

Hyperoxalurie je zvýšený odpad oxalátu do moče (> 0,5 mmol za 24 hodin). I mírně zvýšená hladina oxalátů v moči představuje výrazně vyšší riziko urolitiázy než hyperkalciurie. Hyperoxalurie se dělí na primární, enterickou a metabolickou. Primární hyperoxalurii představují tři typy autozomálně recesivních defektů enzymů, podílejících se na metabolismu kyseliny glyoxalové. Enterická hyperoxalurie, při které dochází ke zvýšené absorpci oxalátů, může být způsobena střevními chronickými onemocněními (Crohnova choroba, ulcerózní kolitida). Dále syndromem krátkého střeva jako důsledek rozsáhlejší resekce, nebo nízkým příjmem vápníku potravou. Vápník se ve střevech váže na oxalát za vzniku špatně rozpustného a vstřebatelného kalciumoxalátu. S vápníkem souvisí také sekundární hyperoxalurie. Tu způsobuje tuková malabsorpce, kdy mastné kyseliny vážou vápník a z kyseliny šťavelové vznikají dobře vstřebatelné například sodné či draselné oxaláty. Metabolická hyperoxalurie je způsobena obvykle nárazovým příjmem většího množství oxalátů a tuků. Vliv může mít i nepřítomnost bakterie *Oxalobacter formigenes*, která rozkládá oxaláty ve střevech (Kawaciuk, 2009).

Hypocitraturie je snížený odpad citrátů do moče (< 2,5 mmol/24 hodin). Citráty působí jako inhibitory kalciové urolitiázy (více v kapitole [1.3.4.2](#)). Příčina může být idiopatická, dalším důvodem může být distální renální tubulární acidóza, což je jedna varianta vrozené metabolické poruchy, kdy ledviny nedokážou vytvářet kyselou moč vylučováním

H<sup>+</sup> iontů. Také chronické průjmy včetně Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy způsobují ztráty alkalického střevního obsahu (Kawaciuk, 2009; Hruska, Beck, 2013).

#### 1.3.2.2 *Struvitové konkrementy (hořečnatoamonné fosfáty)*

Struvitové konkrementy tvoří přibližně 10–15 % ze všech případů urolitiáz. Jsou nazývány také jako tripelfosfáty nebo infekční kameny. Vytváří se u pacientů s chronickými infekcemi močových cest, které jsou způsobeny bakteriemi schopnými štěpit močovinu pomocí enzymu ureázy (*Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterobacter*). Vzniklý amoniak způsobuje vzestup pH moče (obvykle > 7) při kterém je v moči přítomný fosfát málo rozpustný a spolu s amoniakem vytváří nerozpustné produkty (Alelign, Petros, 2018).

#### 1.3.2.3 *Konkrementy kyseliny močové a jejich solí (uráty)*

Tyto konkrementy tvoří přibližně 3–10 % ze všech případů urolitiáz (Alelign, Petros, 2018). Na rozvoj urolitiázy z kyseliny močové mají největší vliv tři faktory. Jsou to nízký objem moče, nízké pH a hyperurikosurie. Příčiny hyperurikosurie mohou být vrozené, získané a idiopatické, jež jsou nejčastější. Velký vliv má strava bohatá na puriny (Dursun et al., 2014).

#### 1.3.2.4 *Konkrementy cystinové*

Cystinové konkrementy představují méně než 2 % všech konkrementů. Vyskytují se u jedinců s autozomálně recesivní genetickou poruchou, která obzvlášť u homozygotů způsobuje zhoršenou tubulární resorpci aminokyseliny cystinu v ledvinách. Cystin, který je málo rozpustný se tak vyskytuje v moči v mnohem vyšších koncentracích než u zdravých osob a vytváří konkrementy (Kawaciuk, 2009; Alelign, Petros, 2018).

#### 1.3.2.5 *Konkrementy indukované léky*

Jsou poměrně vzácné, s výskytem menším než 1 % ze všech konkrementů. Některá léčiva (nebo jejich metabolity) mají litogenní vlastnosti a mohou buď zakládat jádra konkrementů anebo sama konkrement vytváří (příklady jsou v tabulce č. 1) Jiná léčiva mohou svým působením v organismu narušit metabolismus oxalátů či purinů. Jsou to například kortikosteroidy, thiazid a furosemid (Kawaciuk, 2009; Alelign, Petros, 2018).

### ***1.3.3 Analýza konkrementů***

Analýza močového konkrementu by měla být provedena u každého prvozáchytu urolitiázy a v některých případech i recidivy (Türk et al., 2019). Močové konkrementy obsahují přibližně 40 litogenních látek (Kawaciuk, 2009). K jejich stanovení se používají různé metody – fyzikální a chemické.

### ***1.3.4 Chemická analýza***

Dříve rozšířená analýza, která umožňovala získat informace o přítomnosti hlavních kationtů a aniontů (Ca, Mg, NH<sub>4</sub>, fosfát, oxalát, karbonát, urát, xantin nebo cystin). Metoda ale často poskytovala nesprávné výsledky (až několik desítek procent v případě hodnocení kalcium oxalátových konkrementů). V současnosti již není doporučována a rutinně se neprovádí (Kawaciuk, 2009).

#### ***1.3.4.1 Infračervená spektroskopie***

Infračervená spektrofotometrie je využívána pro kvalitativní i částečně kvantitativní analýzu močových konkrementů. Metoda je podrobněji popsána v kapitole [1.9.3](#).

#### ***1.3.4.2 Polarizační mikroskopie***

Oproti běžnému mikroskopu, kde světlo kmitá ve všech rovinách, polarizační mikroskop (viz obrázek č. 25 v příloze) využívá světlo kmitající pouze v jedné rovině. Toho se dosahuje pomocí dvou polarizačních filtrů. Vstupní filtr se nazývá polarizátor a výstupní filtr, který je umístěn za pozorovaným objektem se nazývá analyzátor. Polarizátor mění běžné světlo na lineárně polarizované. Je-li analyzátor orientován tak, aby jeho kmitová rovina byla kolmá na polarizátor, tak skrz mikroskop žádné světlo neprochází – zorné pole je temné. Pokud je však do dráhy polarizovaného paprsku umístěn dvojlomný předmět, tak je tento paprsek rozložen na dva paprsky, jejichž kmitové roviny jsou vzájemně kolmé. Analyzátozem projde paprsek, jehož kmitová rovina je rovnoběžná s ním. To způsobí, že se dvojlomný objekt zobrazuje světle či barevně (při použití bílého spojitého paprsku) na tmavém pozadí (Plachý, 2004).

#### ***1.3.4.3 Rentgenová difrakce***

Metoda je založena na interakci RTG záření s krystalickou strukturou vzorku. Na vzorek zkoumaného materiálu dopadá monochromatické rentgenové záření, které se na jednotlivých atomech ve vzorku rozptyluje, anebo při splnění podmínek Braggova zákona

dojde ke konstruktivní interferenci. Při měření je otáčeno jak vzorkem, tak detektorem záření a je průběžně zaznamenávána intenzita záření na detektoru. Při splnění Braggova zákona dojde ke zvýšení intenzity dopadajícího záření. Výsledný difrakční záznam (difraktogram) ukazuje polohu a intenzitu difrakčních maxim, z čehož lze pomocí speciálního softwaru odvodit krystalovou mřížku. Pomocí databáze difrakčních dat tento software dokáže identifikovat složení vzorku (Vávra, Pinkas, 2010).

#### *1.3.4.4 Morfologická studie*

Močový konkrement je prohlížen nejprve prostým okem a následně skrze stereomikroskop. Je zhodnocena jeho povrchová struktura a po nalomení i vnitřní. Pro vyšetření je možno použít též elektronový mikroskop (Kawaciuk, 2009).

### **1.3.5 Etiopatogeneze**

#### *1.3.5.1 Obecná etiologie*

Tvorba urolitiázy je komplexní proces, na kterém se podílí mnoho faktorů, jež lze je rozdělit na vnitřní a vnější. Vnitřní faktory jsou například věk, pohlaví, rasa a dědičnost. V rámci dědičnosti se jedná o vrozené biochemické a anatomické odlišnosti, jež zvyšují riziko urolitiázy (například renální tubulární acidóza a stenóza ureteropelvickeho přechodu). K vnějším faktorům patří geografická poloha, klimatické podmínky, zaměstnání, dieta, příjem tekutin a jejich minerální složení. Některé metabolické poruchy související s urolitiázou jsou zmíněny v kapitole [1.3.2](#). Lze zmínit negativní vliv obezity a vysokého krevního tlaku (Kawaciuk, 2009; Alelign, Petros, 2018).

V současné době dochází k pokroku ve výzkumu soustředěného na vliv různých genů a jejich exprese na vznik hyperkalciurie a hyperoxalurie, které patří k hlavním rizikovým faktorům urolitiázy (Sayer, 2017).

#### *1.3.5.2 Patogeneze*

Vznik močových konkrémentů je složitý fyzikálně-chemický proces, který ještě není zcela objasněn. Podstatou tohoto procesu je vznik přesyceného (hypersaturovaného) roztoku. V tomto roztoku je rozpuštěno více složek, než by odpovídalo jejich běžné rozpustnosti. Z přesyceného roztoku mohou snadno vypadnout méně rozpustné látky, což vede nejdříve ke vzniku volných krystalů a později k jejich nukleaci. Proces pokračuje růstem krystalů, jejich agregací a retencí v renálním epitelu (Alelign, Petros, 2018).

Rozpustnost látek v moči je ovlivněna hodnotou pH a koncentrací ostatních látek v moči, kdy některé z nich působí jako promotory nebo naopak inhibitory krystalizace. Ke vzniku volných krystalů dochází při narušení rovnováhy mezi nimi (Alelign, Petros, 2018). Podle Robertsona (2017) nehrají inhibitory krystalizace takovou inhibiční roli v přesycené moči, jako spíše v méně přesyceném metastabilním prostředí.

Krystalová nukleace může být homogenní nebo heterogenní. Proces začíná tím, že se jednotlivé atomy, ionty nebo molekuly začnou v přesycené moči shlukovat. V těchto shlucích dochází k jejich častějším srážkám, jejichž důsledkem dojde k fázové změně a vzniku krystalů s charakteristickou mřížkou. Například ionty vápníku a oxalátu se spojují a vytváří nerozpustný krystal kalciumoxalátu. Při homogenní nukleaci se volné krystaly začnou shlukovat, až vytvoří jádro (nidus). Jakmile je vytvořeno, tak na jejich povrchu dochází ke krystalizaci i při nižším přesycení moče.

U častější heterogenní nukleace jádro tvoří buď organický základ (matrix), nebo krystaly s jiným složením, než jaké na ně nasedají (například kalciumoxalát nasedá na nidus z kyseliny močové). Tento základ působí jako pojivo pro volné krystaly, a proto při heterogenní nukleaci nemusí být moč tolik přesycená. Matrix mohou tvořit odloupané epitelie, renální válce, erytrocyty a bakterie (Aggarwal et al., 2013; Alelign, Petros, 2018).

Růst krystalů nastává, když nidus dosáhne kritické velikosti a sníží se jeho volná energie. Tento útvar je již stabilní a roste přidáváním dalších komponent k jádru. Rychlost růstu krystalů v moči je malá, kdežto průtok moče ledvinami trvá jen pár minut, a proto jedna samotná částice se nemůže zvětšit do problematické velikosti. K takovému nárůstu je třeba agregace (Aggarwal et al., 2013). Detailní studie řezu močových konkrementů ukazuje na časté opakování rozpuštění, zlomy a rekrystalizace v průběhu jejich růstu (Sivaguru, et al., 2020).

Agregace je spojování menších krystalů za vzniku větších. Všechny modely urolitiázy předpokládají, že na zadržení krystalů v ledvině se s největší pravděpodobností podílí právě agregace (Alelign, Petros, 2018).

Retence je další významný a složitý proces přispívající ke vzniku urolitiázy. Buňky renálního tubulárního epitelu mohou být poškozeny vysokou hladinou oxalátu v moči, jež v nich vytváří oxidační stres. Poškozené buňky mají buněčnou membránu s aniontovým charakterem, na který nasedají vytvořené krystaly. Ty poté pronikají do



buněk a následně se dostávají až k bazální membráně, kde se vytváří jejich depozit. Poškození buněk tubulů může vést až k jejich apoptóze, kdy se z nich poté uvolní vezikuly, které slouží jako jádra krystalizace. Jako základ pro růst oxalátových konkrementů mohou sloužit Randallovy plaky. Ty vznikají, když se krystaly fosforečnanu vápenatého spolu s organickou matricí ukládají do intersticiální části bazální membrány Henleovy kličky a následně prorůstají skrz urothelium (Alelign, Petros, 2018). Urothelium je epitelální výstelka ledvinové pánvičky a uretery (de Groat, Birder, 2011).

Inhibitory urolitiázy jsou látky, které zabraňují nebo brzdí některý z výše popsáných procesů vedoucích ke vzniku urolitiázy. Mohou to být anorganické látky, jako hořčík, pyrofosfáty, citrát jako malá organická látka a velké makromolekuly jako nefrokalcin, Tamm-Horsfallův protein a další (Alelign, Petros, 2018).

Citráty jsou schopny inhibovat nukleaci, růst a agregaci. Nukleaci inhibují tvorbou rozpustných komplexů s ionizovaným vápníkem a tím že snižují přesycenost moče. Růst a agregaci krystalů brzdí svojí silnou adsorpcí na povrchy krystalů. Dochází k inkorporaci citrátových iontů do krystalické mřížky a tím je zvýšena jejich rozpustnost. (Šter et al., 2018). Podobně jako citráty i nefrokalcin je schopen potlačit nukleaci, růst a agregaci kalciumoxalátu. Hořčík (byť je součástí struvitových konkrementů) vytváří rozpustné komplexy s oxaláty (Kawaciuk, 2009). Tamm-Horsfallův glykoprotein působí jako silný inhibitor agregace krystalů, avšak nikoliv jejich růstu. Pyrofosfáty jsou silné inhibitory krystalizace kalciumfosfátu (Sobotka, Hanuš, 2011).

Promotory urolitiázy jsou látky, které napomáhají vzniku konkrementů. Patří k nim vápník, oxalát, kyselina močová a cystin. Dalšími promotory jsou sodík (viz. podkapitola [1.3.2.1](#)), lipidy buněčné membrány a Tamm-Horsfallův protein. Ten působí jako promotor krystalizace, ale zároveň jako inhibitor agregace (Alelign, Petros, 2018).

### **1.3.6 Diagnostika**

Včasná diagnóza urolitiázy umožňuje zahájit vhodnou léčbu a předejít tak vzniku závažných následků. Klinický obraz jednotlivých druhů urolitiázy se může značně lišit (Kawaciuk, 2009). V této kapitole budou stručně popsány základní diagnostické postupy.

### *1.3.6.1 Základní klinické projevy*

Urolitiáza může často mít zcela asymptomatický průběh, nebo může být provázena typickou ledvinovou kolikou. K té dochází, když se menší močový konkrément uvolní a vnikne do močovodu, popřípadě když zablokuje pyeloureterální přechod. Bolest se projevuje hlavně při pohybu a fyzické zátěži. Je nejčastější v bederní oblasti a může se také vyskytovat podél močovodu, kterým sestupuje konkrément (Kawaciuk, 2009). Kromě bolestí se může u pacientů vyskytovat horečka a zvracení (Wimpissinger et al., 2007). Během sestupu konkrémentu močovodem může dojít k jeho zaklínění. V této fázi je konkrément asymptomatický, dokud se neprojeví infekce, nebo obstrukční uropatie v podobě hydronefrózy či obstrukčního megaureteru (Kawaciuk, 2009).

Odlitkové konkrémenty bez přítomnosti infekce též bývají asymptomatické. Pokud tyto konkrémenty způsobí městnání moče, nebo jsou infikovány, tak se tento stav projevuje tupou bolestí ledviny (Kawaciuk, 2009).

Cystolitiáza vzniká většinou přímo v močovém měchýři jako důsledek stázy moče. Například při hyperplazii nebo karcinomu prostaty. Ureterolitiáza je způsobena nejčastěji konkrémentem uvolněným z močového měchýře. Odlitkové konkrémenty v měchýři mohou být dlouho asymptomatické, potíže se projevují často přerušovanou mikcí. Takto se projevuje i konkrément v uretře, k tomu bývá častá pálivá či řezavá bolest při močení. Může se objevit i makroskopická hematurie či infekce v moči (Kawaciuk, 2009).

### *1.3.6.2 Základní laboratorní vyšetření*

Základní laboratorní vyšetření by mělo být provedeno u každého litiaka. Z čerstvé moče se provede chemické vyšetření, kde má význam přibližná hodnota pH, specifické hmotnosti a nitritů. V močovém sedimentu se hodnotí přítomnost hematurie a leukocyturie. Z náběru krve (sérum/plazma) je prováděno stanovení kreatininu, kyseliny močové, vápníku (ionizovaný/celkový), sodíku, draslíku a C-reaktivního proteinu (CRP). Požadován je také základní krevní obraz bez diferenciálu a v případě plánované intervence tromboplastinový čas (Türk et al., 2019).

### *1.3.6.3 Zobrazovací metody*

Ultrasonografie ledvin a močového měchýře je vyšetření, které je založeno na zpracování zvukových signálů, odražených na rozhraní mezi různými tkáněmi (Hrazdira, Mornstein, 2001). Tato neinvazivní, bezpečná a levná metoda je doporučována při diagnostice jako

primární. Dokáže zaznamenat kameny nacházející se v dutém systému ledvin a v horních částech močovodu, které se projevují jako hyperechogenní útvary s akustickým stínem. Vyšetření musí být prováděno při naplněném močovém měchýři (Burešová et al., 2010). Ultrasonografie je primární diagnostická metoda u dětí a těhotných žen, protože nezpůsobuje radiační zátěž a u dětí není nutná sedace či anestezie (Palmer, 2006; Türk et al., 2019).

### Rentgenové (RTG) zobrazovací metody

Vyšetření pomocí RTG paprsků je založeno na jejich rozdílné absorpci a rozptylu v jednotlivých tkáních na základě absorpčního koeficientu, což vede k zeslabení procházejícího paprsku. Absorpční koeficient je daný průměrným protonovým číslem prvků obsažených v jednotlivých tkáních. Mnohé měkké tkáně mají poměrně malé rozdíly mezi svými absorpčními koeficienty a pro jejich vzájemné rozlišení jsou mimo jiné využívány kontrastní látky obsahující těžké kovy. Pro zobrazení močových cest je používáno sloučenin jódu. RTG metody jsou přesné a levné, ale vyšetřené osoby vždy obdrží určitou dávku ionizujícího záření (Hrazdira, Mornstein, 2001).

1. *Nativní nefrogram (Prostý RTG snímek)* dokáže dobře zaznamenat kontrastní konkrementy, ke kterým patří kalciumoxalátové a kalciumfosfátové. Hůře viditelné jsou struvity, apatity a cystinové konkrementy. Konkrementy z kyseliny močové a jejich solí (uráty) jsou pro RTG paprsky lucidní, stejně tak lékové, xanthinové a z 2,8-dihydroxyadeninu (Kawaciuk, 2009; Türk et al., 2019).
2. *Vylučovací urografie (anglicky – Intravenous urography – IVU)* je metoda využívající podání kontrastní látky obsahující jód. Dokáže zaznamenat i RTG lucidní konkrementy z kyseliny močové. Dále umožňuje zviditelnit změny v dutých systémech, jež jsou buď příčinou (např. stenóza pyeloureteriálního přechodu), nebo následkem urolitiázy jako je městnání, hydronefróza a poškození parenchymu ledviny (Kawaciuk, 2009). Vyšetření má některá omezení, například nelze použít při graviditě a alergii na jodovou kontrastní látku (Burešová et al., 2010).
3. *Nativní spirální CT (anglicky – Non-contrast-enhanced computed tomography – NCCT)* je rentgenová zobrazovací metoda, kdy (zjednodušeně řečeno) RTG paprsek díky pohyblivé rentgence prochází postupně tělem a během toho jsou z detektorů (často umístěných v kruhu) získány absorpční profily, které následně vyhodnocuje počítač (Hrazdira, Mornstein, 2001). CT je rychlé a neinvazivní

vyšetření, které dokáže zobrazit konkrementy (mimo indinavirových) bez ohledu na chemické složení. Lze též s její pomocí rozpoznat rozšíření horních částí vývodových cest (Kawaciuk, 2009). Byla prokázána větší přesnost NCCT metody než IVU při identifikaci urolitiázy u pacientů (specifita > 95 %) a stala se proto metodou první volby (Worster et al., 2002).

#### *1.3.6.4 Metabolické vyšetření*

Každý prvně zachycený litiak je po základním biochemickém vyšetření a analýze konkrementu IR spektrometrií či rentgenovou difrakcí zařazen do skupiny s nízkým nebo vysokým rizikem tvorby kamene. Jako riziková pacienta jsou zařazováni například ti, co mají určité konkrementy (např. uráty, brushit a cystin), děti, mladiství, každý pacient s recidivou a ti s odlítkovou nebo mnohočetnou urolitiázou. U těchto pacientů se provádí specifické metabolické doplňující vyšetření. Jeho součástí je stanovení stejných analytů jako při základním laboratorním vyšetření, dále se v séru/plazmě stanovuje hořčík, celková bílkovina, albumin, jaterní testy a lipidový profil. Provádí se také základní stanovení acidobazické rovnováhy (ABR), u čerstvě odebrané moče se změří přesná hodnota pH pomocí pH metru.

Velmi důležité je stanovení parametrů, které mají vliv na tvorbu urolitiázy ze sbírané moči za 24 hodin. Jsou to odpady minerálů (sodík, draslík, chloridy, vápník, fosfor a hořčík), kyseliny močové, oxalátů a citrátů. Toto vyšetření je indikováno minimálně tři týdny po odstranění kamene, s tím že pacient udržuje stejnou životosprávu jako před projevem nemoci (více o preanalytice v kapitole [2.5](#)). V případě, že je sběr za 24 hodin obtížný (například u dětí) je možno parametry stanovit z jednorázové moče a vypočítat jejich exkreci na kreatinin. Vypovídací hodnota takového vyšetření je nižší, jelikož se výsledky mohou lišit v závislosti na době odběru, pohlaví, věku a tělesné váhy.

U pacientů, kteří v rámci prevence urolitiázy začnou brát léky, by se mělo vyšetření opakovat za 8–12 týdnů a podle výsledků případně upravit dávkování. Jakmile se hladiny odpadů vrátí do normy, je doporučeno kontrolní vyšetření 1krát ročně (Kawaciuk, 2009; Türk et al., 2019).

### **1.3.7 Terapie**

Léčba urolitiázy je volena podle velikosti, umístění a typu konkrémentu. Je nutno zhodnotit přítomnost případných komplikací (obstrukce, infekce), celkový stav pacienta a také jeho přání (Petřík, 2011). Obstrukce ureteru či ledvinné pánvičky s případnou infekcí je řešena pomocí stentu, zavedeného ureteroskopicky (viz podkapitola [1.3.6.4](#)), nebo pomocí perkutánní nefrolitotomie (viz podkapitola [1.3.6.5](#)). Při renální kolice je doporučeno podávat nesteroidní protizánětlivé léky (NSAID), jež vykazují vyšší analgetickou účinnost než opiáty (Türk et al., 2019). Následně budou stručně popsány v současnosti nejčastější způsoby odstranění konkrémentů z močových cest.

#### *1.3.7.1 Medikamedikamentózní expulzní terapie (MET)*

MET je také nazývána jako konzervativní terapie a znamená odchod konkrémentu spontánní cestou. Provádí se u menších konkrémentů, kde je vyšší pravděpodobnost takového odchodu a tam kde nejsou přítomny komplikace (obstrukce, infekce). Při MET jsou podávány medikamenty, které zeslabují tonus uretry a současně snižují frekvenci a sílu její peristaltiky. To umožňuje snadnější průchod kamene močovými cestami (Petřík, 2011; Türk et al., 2019).

#### *1.3.7.2 Perorální chemolýza*

V případě konkrémentu složeného z kyseliny močové (nikoliv urátů) lze použít perorální chemolýzu, kdy po podání např. kalium citrátu dojde k alkalizaci moče, která konkrément rozpouští. Je třeba dosáhnout pH moče mezi 7,0 až 7,2 (vyšší pH představuje riziko vzniku kalciumfosfátové urolitiázy). Tato metoda se dnes využívá jen výjimečně (Türk et al., 2019).

#### *1.3.7.3 Extrakorporální litotrypsy (ESWL)*

Zkratka ESWL znamená *Extracorporeal shock wave lithotripsy*. Tato metoda využívá vlastností rázových vln, jež jsou generovány mimo tělo a zaměřeny do místa výskytu konkrémentu. Lze ji tedy provést pouze u přesně lokalizované litiázy. Konkrément je rozbíjen tak, že opakované rázové vlny způsobují tlakový gradient na rozhraní kamene a okolního prostředí. Efekt je závislý na energii vln, ale s rostoucí energií hrozí poškození okolní tkáně. Začíná se tedy s nízkou energií, jež způsobí vazokonstrikci okolních cév a tím i nižší poškození tkání (Hrazdira, Mornstein, 2001; Petřík, 2011).

#### *1.3.7.4 Ureteroskopie*

Tato terapie využívá většinou flexibilní přístroje (ureteroskopy), které umožňují přístup do uretery i ledviny skrz močové cesty. Konkrementy lze vyjmout pomocí endoskopických kleští nebo košů. Objemnější konkrementy jsou před vyjmutím rozrušeny pomocí laseru, nebo pneumaticky. U pacientů s obstrukcí, nebo kde hrozí komplikace lze zavést stent (Türk et al., 2019).

#### *1.3.7.5 Perkutánní nefrolitomie (PNL)*

Při tomto zákroku je litiáza odstraňována pomocí různých ohebných či neohebných nástrojů, které jsou zavedeny punkcí z povrchu těla do dutého systému ledviny. Konkrementy jsou před vyjmutím rozrušeny pomocí ultrazvuku, nebo laseru. Perkutánní nefrolitomie je indikována například u odlitkové a objemnější litiázy, dále u velmi tvrdých konkrémentů, které odolávají ESWL (Petřík, 2011).

#### *1.3.7.6 Laparoskopie a otevřená chirurgie*

Tyto invazivní zákroky jsou v současnosti prováděny pouze výjimečně a jsou považovány za poslední možnost, jak řešit komplikované případy urolitiázy (Türk et al., 2019).

#### **1.3.8 Metafylaxe kalciových konkrémentů**

Metafylaxe (následná péče s prevencí) je zcela zásadní pro omezení pravděpodobnosti recidivy urolitiázy. U pacientů, kteří se neřídí jejími zásadami, je pravděpodobnost recidivy po prvním roce 10–23 %, přibližně 50 % během 5–10 let a zhruba 75 % do 20 let (Moe, 2006).

Všichni pacienti s urolitiázou, bez ohledu na riziko recidivy, by se měli řídit následujícími doporučeními. První se týká příjmu tekutin. Litiaci by měli vypít 2,5 až 3,0 litry tekutin (nejlépe s neutrálním pH) denně a toto množství by mělo být rovnoměrně rozloženo po celý den. Jejich případná nadměrná ztráta by měla být adekvátně kompenzována. Strava by měla být pestrá, vyvážená, bohatá na zeleninu a ovoce. Obsah živočišných bílkovin (v závislosti na věku) a sodíku by měl být omezen. Další obecná doporučení směřují k uchování normálních hodnot Body Mass Indexu (BMI), krevního tlaku a přiměřené fyzické aktivitě (Türk et al., 2019).

U pacientů s vyšším rizikem recidivy urolitiázy je kromě úpravy životosprávy nezbytná farmakologická léčba. Ta je volena podle typu močového konkrementu a poruchy, která jeho tvorbu způsobuje (Türk et al., 2019).

Pacienti s kalciumoxalátovými konkrementy by kromě výše zmíněných obecných doporučení měli konzumovat stravu s nízkým obsahem oxalátu a tuku. Měl by ale být zachován normální příjem vápníku a v případě enterální hyperoxalurie je doporučena jeho dodatečná suplementace. U enterální hyperoxalurie a hypocitraturie je doporučeno podávat alkalické citráty. U pacientů s kalciumfosfátovými konkrementy je doporučeno snižovat hyperkalcemii pomocí farmaka hydrochlorothiazidu. Pokud mají vyšší hodnoty pH moče, lze ji okyselit podáním L-methioninu (Türk et al., 2019).

Samozřejmostí je zaměřit se na léčbu primárních příčin urolitiázy, což mohou být rozmanité vrozené nebo získané poruchy. Popis jejich léčby by byl mimo rozsah této bakalářské práce.

## 1.4 Validace a verifikace metody

Procesy validace a verifikace laboratorních metod jsou naprosto nezbytné pro fungování všech klinických laboratoří, kterým zajišťují potřebnou kvalitu výsledných dat. Dávají jistotu jak lékařům, kteří ordinují požadavky na vyšetření, tak i samotným pacientům, že výsledky dodané laboratoří odpovídají co nejvíce skutečnému stavu vyšetřovaného. To platí za předpokladu dodržení všech postupů mimolaboratorní preanalytické fáze vyšetření. Na přesnosti těchto výsledků tak mnohdy závisí správná diagnostika, terapie a prevence. To ve výsledku ovlivní zdraví, kvalitu života a někdy i přežití pacienta (Friedecký et al., 2011).

Validace a verifikace metod je vyžadována normami řízení kvality (ČSN ISO 15189). Používání řádně validovaných a verifikovaných metod je také vyžadováno při akreditaci laboratoře, což je dle normy ČSN EN ISO 15189 *postup, jímž autoritativní orgán uděluje formální uznání, že organizace je způsobilá k výkonu určitých činností*. V případě naší laboratoře, která je součástí Ústavu klinické biochemie a hematologie (ÚKBH) ve Fakultní nemocnici v Plzni je tímto autoritativním orgánem Národní autorizační středisko pro klinické laboratoře (NASKL). Další akreditační orgán působící v České republice je Český Institut pro akreditaci (ČIA). Osvědčení vydané těmito orgány tak potvrzuje způsobilost laboratoře k provádění analýz a odběru primárních vzorků.

Na úseku klinické biochemie ÚKBH FN Plzeň se řídí proces validace/verifikace při aplikaci nového analytického měřicího systému, nebo nových metod do provozu laboratoře v souladu s dokumentem *Standard systému řízení kvality v KL ÚKBH FN Plzeň* (SLN/UKBH/0/003/00/VERZE07). Tento postup je vypracován manažerem kvality. Samotný postup verifikace je prováděn podle dokumentu *Validace a verifikace Biochemie*, který je vypracován hlavním analytikem.

### 1.4.1 Validace

Validace je dle mezinárodního metrologického slovníku (*International vocabulary of metrology – VIM 3*) definována takto: *Ověřování, že specifikované požadavky jsou přiměřené pro zamýšlené použití*. Ve slovníku managementu kvality je validace charakterizována jako *potvrzení získané prostřednictvím poskytnutí objektivních důkazů, že požadavky na specifické zamýšlené použití nebo specifickou aplikaci byly splněny*. Obecně lze říct, že validace prokazuje vhodnost metody pro daný účel použití. Proces validace dokazuje formou poskytnutí objektivních důkazů o jejich výkonnostních



charakteristikách schopnost splňovat požadavky na kvalitu výsledků v souladu s potřebami zákazníků (Barwick, 2016).

Klinická laboratoř smí používat pouze validované metody. Samotnou validaci v naprosté většině provádějí výrobci in vitro diagnostik (IVD), a to v souladu se směrnicí IVD 98/79 Evropského parlamentu. Validované reagentie jsou výrobcem označeny značkou shody CE (z francouzského *conformité européenne*). Klinické laboratoře provádí validaci pouze ve dvou případech.

V prvním, když pracovníci laboratoře metodu validovanou od výrobce nějak modifikují. V takovém případě je třeba provést takzvanou „křížovou“ validaci. Při ní jsou porovnávány výkonnostní parametry původní a modifikované metody. Tento postup by měl prokázat, že modifikací nebyly porušeny vlastnosti metody pro daný účel použití. Druhý případ je, když pracovníci laboratoře vyvinou vlastní metodu (tzv. in-house metoda). Zde již musí dojít k validaci v plném rozsahu (Friedecký et al, 2011). Jednotlivé výkonnostní parametry, vyžadované pro validaci metody, jsou uvedeny v tabulce č. 2 a popsány v kapitole [1.6](#).

#### **1.4.2 Verifikace**

Verifikace laboratorní metody je proces, jehož cílem je ověřit a poskytnout objektivní důkazy, že měřicí postup má odpovídající výkonnost v konkrétních podmínkách dané laboratoře a je v souladu s příslušnými požadavky na kvalitu, stanovenou výrobcem během validace metody (Ambrožová, Kratochvíla, 2016). Verifikace tedy používá obdobné nástroje jako validace k prokázání způsobilosti laboratorního personálu, zařízení a prostředí k provádění již validovaného měřicího postupu. Verifikace je de facto zkrácená validace.

V klinických laboratořích se verifikují všechny metody a postupy měření před jejich uvedením do provozu. Jak už bylo uvedeno v předchozí podkapitole – použití verifikace, jakožto zkrácené validace je podmíněno dodržením postupu udávaného výrobcem. Verifikace dále musí být prováděna v pravidelných intervalech, jejich četnost si určuje sama laboratoř ve svém verifikačním plánu. Doporučená minimální četnost verifikace metod je 1krát ročně (Friedecký et al., 2011). Stejně jako u validace tak i průběh verifikace musí být řádně zdokumentován. Rozdíl mezi validací a verifikací je znázorněn v následující tabulce.

Tabulka 2: Výkonnostní parametry validace a verifikace analytického postupu

Validace	Verifikace
Opakovatelnost	Opakovatelnost
Mezilehlá preciznost	Mezilehlá preciznost
Vychýlení (bias)	Vychýlení (bias)
Pracovní rozsah	Pracovní rozsah
Mez detekce a mez stanovitelnosti (eventuelně mez blanku)	
Ostatní (matricové interference, srovnání s jinou metodou, srovnání pomocí výsledků EHK, robustnost, výtěžnost ...)	

Zdroj: Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích (Friedecký et al., 2011)

## 1.5 Analytické vlastnosti metod

### 1.5.1 Preciznost

Preciznost (anglicky *Precision*; do roku 2008 označována jako správnost) je ze všech analytických vlastností metody nejdůležitější. Preciznost lze definovat jako těsnost souhlasu mezi jednotlivými výsledky dané metody, které byly získány opakovanou analýzou téhož vzorku za předem stanovených podmínek. Rozdíl výsledků jednotlivých, nezávislých stanovení je dán velikostí náhodných chyb (anglicky *Random error*), které odchylní výsledek náhodně všemi směry a jejichž výskyt nelze nikdy zcela vyloučit. Míra preciznosti neboli nepřeciznost, je udávána formou směrodatné odchylky (anglicky *standard deviation – SD*) opakovaných výsledků analýzy, kdy větší směrodatná odchylka znamená menší preciznost metody.

Pro výpočet směrodatné odchylky je nutné znát hodnotu aritmetického průměru (anglicky *arithmetic mean – AM*) výsledků měření jednotlivých vzorků. Tato hodnota se poté použije ve vzorci pro výpočet směrodatné odchylky. Preciznost je často také vyjadřována termínem variační koeficient (anglicky *coefficient of variation – CV*), což je poměr směrodatné odchylky a hodnoty průměru výsledků opakovaných analýz. Výsledek je po vynásobení číslem 100 vyjádřen v procentech. Vzorce pro jednotlivé výpočty jsou uvedeny na další straně:

$$AM = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - AM)^2}{n-1}}$$

$$CV = 100 \cdot \frac{SD}{AM} [\%]$$

Kde:

$x$  ... jednotlivý nezávislý výsledek měření analytu

$n$  ... počet měření použitých k výpočtu

$AM$  ... aritmetický průměr

$SD$  ... směrodatná odchylka

$CV$  ... variační koeficient

Rozlišují se tři způsoby, jak vyjádřit preciznost metody. Jsou to opakovatelnost (viz. kapitola [1.6.1](#)), mezilehlá preciznost (viz. kapitola [1.6.2](#)) a reprodukovatelnost. Reprodukovatelnost je vyjádření přenositelnosti metody, prováděné stejným měřicím systémem a stejným typem reagentů různými laboratořemi (Senft, 2012).

### 1.5.2 Pravdivost

Pravdivost (anglicky *Trueness*) udává těsnost shody aritmetického průměru opakovaně naměřených koncentrací analytu se skutečnou hodnotou koncentrace tohoto analytu – pravdivost je tedy vlastnost opakovaných měření. Skutečnou hodnotu analytu ale nelze nikdy absolutně přesně stanovit, proto se místo ní používá dohodnutá referenční hodnota, získaná na základě měření referenčními metodami při velkém počtu opakování v referenčních laboratořích. Pravdivost determinují systematické chyby (anglicky *systematic error*), které narozdíl od chyb náhodných odchylojí výsledek vždy na jednu stranu (Senft, 2012; Ambrožová, 2019). Pravdivý výsledek má tedy zanedbatelnou systematickou chybu. Míra pravdivosti je obvykle udávána parametrem vychýlení neboli bias, který je popsán v podkapitole [1.6.3](#) (Kříženecká, Synek, 2014). Alternativně lze použít parametr výtěžnost, který je popsán v podkapitole [1.6.4](#).

### 1.5.3 Přesnost

Přesnost (anglicky *accuracy*; do roku 2008 označována jako správnost) je definována dle mezinárodního metrologického slovníku jako *těsnost shody mezi naměřenou hodnotou veličiny a pravou hodnotou měřené veličiny*. Na rozdíl od pravdivosti je přesnost analytická vlastnost metody platící pro jedno měření. Přesnost v sobě zahrnuje náhodnou i systematickou chybu měření neboli kombinuje preciznost a pravdivost (Senft, 2012; Ambrožová, 2019). Matematickým vyjádření přesnosti je celková chyba měření (anglicky *total error, TE*). Vzorec pro výpočet celkové chyby dle Westgaarda (2017):

$$TE = z \cdot SD + |b| \quad \text{nebo} \quad TE = z \cdot CV + |b| [\%]$$

Kde:

*SD* ... směrodatná odchylka

*CV* ... variační koeficient

*|b|* ... bias

*z* ... statistický násobek, který odpovídá 95 % intervalu spolehlivosti (1,96)

Parametry celková chyba měření a kombinovaná nejistota měření (viz podkapitola [1.5.6](#)) jsou využívány pro hodnocení analytické kvality měření. Aktuální mezinárodní normy pro analytickou kvalitu (ČSN ISO 17025:2018 a 15189 ed.2: 2013) již dávají přednost výpočtu kombinované nejistoty. Porovnávací studie předností a nedostatků obou parametrů pak přišla se závěrem, že stanovení celkové chyby měření je pro laboratoře jednodušší a mělo by být zachováno pro vyhodnocování externího hodnocení kvality (Friedecký, Kratochvíla, 2019).

### 1.5.4 Analytická citlivost

Analytická citlivost (anglicky *Analytical sensitivity*) je vztah mezi vlastnostmi detektoru a specifických vlastností měřeného analytu. Další možností popisu je, že jde o podíl analytického signálu (například absorbance) ku koncentraci analytu, umocněné koeficientem linearity. Lze tedy konstatovat, že citlivost je směrnice kalibrační funkce (Křížek, Šíma, 2015). Analytickou citlivost si lze také představit, jako rozdíl mezi koncentracemi měřeného analytu, který je možné spolehlivě (nejčastěji na 95 %) zachytit pomocí daného měřicího detektoru. Znalost citlivosti jednotlivých metod je důležitá pro zhodnocení jejich vhodnosti pro stanovení konkrétního analytu v konkrétní laboroři. Citlivější metody jsou obecně nákladnější a časově náročnější. V rutinní biochemické

laboratoři je proto vhodné použít takovou metodu, která má citlivost odpovídající předpokládané koncentraci tohoto analytu ve vzorcích pacientů (Racek et al., 2006).

Rozsah měřitelných koncentrací se při validaci metody nejčastěji stanovuje pomocí parametrů analytické citlivosti. Jsou to mez detekce, mez stanovitelnosti a oblast linearity.

#### *1.5.4.1 Mez detekce*

Mez detekce (anglicky *Limit of detection, LoD*) představuje takovou koncentraci stanovovaného analytu, která je již metodou detekovatelná, ale ještě ji nelze dostatečně přesně kvantifikovat. Mez detekce spektrofotometrických metod se obvykle definuje jako trojnásobek hodnoty směrodatné odchylky opakovaně měřeného nulového vzorku (blanku). Počet opakování je minimálně desetkrát v jedné sérii měření. Trojnásobek směrodatné odchylky blanku by měl zhruba na 90 % prokazovat přítomnost analytu ve vzorku. Preciznost měření analytu s koncentrací blízko u meze detekce je velmi nízká. Je-li vyjádřena formou variačního koeficientu, bývá obvykle 40 % (Křížek, Šíma, 2015).

#### *1.5.4.2 Mez stanovitelnosti*

Mez stanovitelnosti (anglicky *Limit of quantification, LoQ*) představuje nejnižší koncentraci analytu, kterou lze daným analytickým postupem změřit s dostatečnou precizností (Křížek, Šíma, 2015). Vyjádřeno v relativní směrodatné odchylce *CV*, činí tato preciznost pro klinické laboratoře obvykle 20 %. Mez stanovitelnosti lze určit výpočtem jako trojnásobek hodnoty meze detekce. Alternativní postup je proměření deseti vzorků s koncentrací analytu kolem očekávané meze stanovitelnosti. Tyto vzorky se proměřují deset dní pro získání jejich mezilehlé preciznosti. Nejnižší hodnota koncentrace analytu, která má ještě dostatečnou preciznost, je následně určena jako mez stanovitelnosti (Friedecký et al., 2011).

#### *1.5.4.3 Oblast linearity*

Oblast linearity je takový rozsah koncentrací analytu, ve kterém má závislost mezi naměřeným signálem a koncentrací tvar přímky. Metody, které mají dostatečně širokou oblast linearity (často spektrofotometrické) mohou využívat dvoubodovou kalibraci (viz kapitola [2.6](#)), což je rychlejší a levnější (Senft, 2012).

### ***1.5.5 Analytická specifická***

Analytická specifická určuje, jak je konkrétní metoda ovlivněna přítomností jiných látek, které se nacházejí spolu s měřenou látkou v analyzovaném biologickém materiálu. Biologické materiály obsahují velké množství chemických látek, které mohou reagovat se stejným činidlem jako stanovovaná látka. Těmto reakcím se říká interference. Mohou způsobit falešný nárůst, nebo pokles naměřených hodnot u kvantitativních metod, nebo způsobit falešnou pozitivitu/ negativitu u metod kvalitativních. Důležitá je též znalost či předpoklad očekávaného množství interferující látky. Protože velmi specifické metody jsou často náročné a zdlouhavé, volí se pro klinické účely takové metody, u kterých je specifická nižší, ale případná interference nemá vliv na správnou interpretaci výsledků (Racek et al., 2006). Některé metody (např. oxaláty v moči) jsou použitelné pro analýzu až po odstranění interferujících látek ze vzorku, popřípadě po separaci analyzované látky ze vzorku.

Interferující látky lze rozdělit na endogenní a exogenní. Mezi endogenní interferenty v séru/plazmě patří nejčastěji bilirubin, hemoglobin a triacylglyceroly. Mezi exogenní interferenty v séru/plazmě a moči patří například vitamíny a mnohé léky (Senft, 2012).

### ***1.5.6 Nejistota měření***

Každý kvantitativní výsledek měření daného analytu, který vydá laboratoř je vlastně pouze odhadem skutečné hodnoty. Absolutně přesného výsledku s nulovou nejistotou nelze dosáhnout. Podle mezinárodního metrologického slovníku VIM3 je nejistota *nezáporný parametr charakterizující rozptýlení hodnot veličiny přiřazených k měřené veličině na základě použité informace*. Nejistota tedy určuje výsledek ne jako bod, ale jako interval, ve kterém se výsledek s určitou pravděpodobností nachází. Tento interval nejistoty navíc ve většině případů není stejný v celém rozsahu měření. Pro rutinní laboratoře je proto doporučováno vypočítat hodnoty nejistot v minimálně třech oblastech. Jedna by měla být uprostřed a dvě poblíž krajních mezí referenčního rozmezí. Z toho důvodu je nejistota přiřazována vždy ke konkrétnímu výsledku, a nikoliv k celé metodě.

Nejistotu lze vyjádřit několika způsoby. Standardní nejistota (označuje se  $u$ ) je vyjadřovaná formou směrodatné odchylky či variačního koeficientu (viz podkapitola [1.5.1](#)) a značí tak příspěvek části měřicího procesu k celkové nejistotě. Kombinovaná

nejistota (označuje se  $u_c$ ) pak zahrnuje jednotlivé dílčí (standardní) nejistoty. Vypočítá se podle vzorce, kde  $u_1$  až  $u_n$  znamenají jednotlivé dílčí nejistoty:

$$u_c = \sqrt{u_1^2 + u_2^2 + \dots + u_n^2}$$

Rozšířená kombinovaná nejistota absolutní ( $U_{c,abs}$ ), nebo relativní ( $U_{c,rel}$ ) je kombinovaná nejistota, která je vynásobena koeficientem rozšíření ( $k$ ). Tento koeficient nabývá nejčastěji hodnoty  $k=2$ . To znamená, že výsledek vydaný jako např. 2,00 mmol/l ( $U_{c,abs} = 0,20$  mmol/l) se s pravděpodobností 95 % nachází v intervalu 1,8–2,2 mmol/l (kolektiv autorů, 2014).

Stejně jako se samotná analýza skládá ze souboru po sobě jdoucích kroků, tak i nejistota takové analýzy se vždy skládá z několika částí. Všechny tyto nejistoty je nutné vyhodnotit a poté shrnout do takzvané bilance nejistoty (anglicky *budget*). Tato bilance udává hodnoty a zdroje nejistoty. Dále také zahrnuje způsoby vyhodnocení nejistot, které jsou dva. Vyhodnocení typu A jsou získávána pomocí statistického vyhodnocení experimentu (například preciznost a bias). Vyhodnocení typu B jsou získávána z jednotlivých certifikátů, například z certifikátů referenčních materiálů, analytických vah a analyzátorů (Suchánek, Milde, 2013).

Výpočet nejistoty je ve srovnání s celkovou chybou měření poměrně složitý. Je to dáno tím, že současná norma ISO 15189 sice výpočet nejistot požaduje – postup, jak toho docílit však nijak nespecifikuje. V případě, že není k dispozici referenční materiál s metrologickou návazností, který je nutný pro určení bias (viz podkapitola [1.6.3](#)), mnozí autoři i GUM (*Guide for the expression of uncertainty in measurement*), doporučují omezit určení nejistoty jen na preciznost (Friedecký, Kratochvíla, 2019). Starší doporučení pro určení odhadů nejistot výsledků (Suchánek et al, 2006; Friedecký et al., 2011) udávají možnost použít pro výpočet kombinované nejistoty místo bias hodnotu výtěžnosti při použití rutinních vzorků (viz podkapitola [1.6.4](#)).

Při výpočtu nejistot lze bias zanedbat, pokud platí nerovnost:

$$|b_{abs}| \leq k \sqrt{u_{ref,abs}^2 + u_{xp,abs}^2}$$

Kde:

$b_{abs}$  ... bias absolutní, vyjádřen v jednotce měření

- $u_{ref,abs}$  ... standardní nejistota hodnoty vzorku o známém obsahu
- $u_{Xp,abs}$  ... standardní nejistota průměru výsledků měření vzorku o známém obsahu
- $k$  ... koeficient rozšíření (jeho hodnota je obvykle 2)

Pokud je nejistota měření vypočtená z mezilehlé preciznosti výrazně větší (3x) než bias, v tom případě bias přispívá ke kombinované nejistotě méně než 5 % a je možné ho též zanedbat (kolektiv autorů, 2014)

### 1.5.7 Metrologická návaznost

Metrologická návaznost (anglicky *traceability*) je podle Mezinárodního metrologického slovníku *vlastnost výsledku měření, pomocí níž může být výsledek vztažen ke stanovené referenci přes dokumentovaný nepřerušovaný řetězec kalibrací, z nichž každá se podílí svým příspěvkem na stanovené nejistotě měření*. Měla by vést k situaci, kdy laboratoře na celém světě při stanovení určitého analytu budou poskytovat výsledky bez významných rozdílů. Toho lze docílit hierarchickou návazností od pracovních kalibrátorů a interních kontrol kvality (IQC – anglicky *internal quality control*) dodávaných výrobcí IVD diagnostik přes referenční materiály až k mezinárodním referenčním materiálům. Je zapotřebí počítat s tím, že každý takový mezistupeň přináší určitou nejistotu (Senft, 2012).

### 1.5.8 Biologická variabilita

Pro určení vhodnosti dané analytické metody k měření určitého analytu je důležitá znalost jeho biologických variabilit. Dále srovnání těchto variabilit s variabilitou analytickou a pravdivostí metody. Biologické variability představují určité rozložení hodnot daného analytu v důsledku působení různých biologických vlivů v čase. Pokud jsou sledovány změny u jednoho biologického jedince, jedná se o intraindividuální variabilitu ( $CV_i$ ). Když jsou sledovány průměrné hodnoty analytu u většího množství jedinců ze stejné populace, jde o interindividuální variabilitu ( $CV_g$ ). Protože tyto variability mají náhodný charakter a lze u nich tedy předpokládat Gaussovské rozložení, lze je matematicky vyjádřit ve formě směrodatné odchylky nebo variačního koeficientu. Variabilita interindividuální se značí jako  $CV_i$  a variabilita analytická, což je mezilehlá preciznost použité metody, se značí jako  $CV_a$ . Pro určení celkové variability  $CV_T$  platí vztah:

$$CV_T = \sqrt{CV_a^2 + CV_i^2}$$



Pro zvažovanou metodu musí platit, že její odchylka (bias) jako vyjádření pravdivosti musí být menší než čtvrtina celkové variability ( $B < 0,25 CV_T$ ). Dále se posuzuje vztah mezi variabilitou analytickou  $CV_a$  (mezilehlá preciznost metody) a intraindividuální  $CV_i$ . V optimálním případě platí vztah:  $CV_a < 0,25 CV_i$ . Poměr  $CV_a < 0,5 CV_i$  je ještě přijatelný, ale vyšší poměr  $CV_a < 0,75 CV_i$  lze akceptovat jen ve výjimečných případech kvůli technologickému omezení (Minář, Stančík, 2008; Senft, 2012).

Získat vlastní hodnoty biologických variabilit je mimo možnosti většiny laboratoří. Dříve bylo možno čerpat tyto hodnoty pouze z Westgardovy databáze biologických variabilit, která je volně přístupná na webu <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>. Od května 2019 je na internetových stránkách Evropské společnosti klinické chemie a laboratorní medicíny EFLM (*European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*) zpřístupněna nová, postupně doplňovaná databáze (<https://biologicalvariation.eu>), jejíž údaje vznikly na základě sjednocených postupů výběru vhodných jedinců a harmonizaci analytických metod (Kratochvíla, 2019).

### 1.5.9 Kritická diference

Kritická diference (anglicky *critical difference, CD*) má stejný význam jako následující termíny – nejmenší významná změna a referenční změna hodnoty (anglické ekvivalenty jsou *least significance change, LSC* a *reference change values, RCV*). Tyto termíny znamenají nejmenší rozdíl mezi dvěma po sobě následujícími výsledky měření jednoho analytu u téhož pacienta, který již představuje klinicky významnou změnu (Senft, 2012). Kritickou diferencí lze vypočítat podle vzorce (Jabor, Friedecký, 2008):

$$CD = b_{rel} + k_1 \cdot \sqrt{CV_a^2 + CV_i^2} \quad \text{nebo} \quad CD = k_2 \cdot \sqrt{CV_a^2 + CV_i^2}$$

Kde:

$CV_a$  ... analytický variační koeficient odpovídající mezilehlé preciznosti

$CV_i$  ... intraindividuální variační koeficient (viz předchozí podkapitola)

$b_{rel}$  ... bias relativní

$k_1$  ... koeficient  $k_1 = 2,33 = 1,645 \cdot \sqrt{2}$  (pro jednostranný interval spolehlivosti a dvě následná měření)

$k_2$  ... koeficient  $k_2 = 2,77 = 1,96 \cdot \sqrt{2}$  (pro oboustranný interval spolehlivosti a dvě následná měření)

## **1.6 Výkonnostní parametry validace a verifikace analytické metody**

### **1.6.1 Opakovatelnost**

Opakovatelnost (anglicky *repeatability*) je taková preciznost metody (viz kapitola [1.5.1](#)), kdy jsou vzorky změřeny během krátkého časového intervalu ve stejné laboratoři, stejnou metodou, na stejném analyzátoru se stejnými reagensy a kalibrátorem. To vše provádí stejný operátor na stejném analyzátoru (Ambrožová, Kratochvíla, 2016). Měří se minimálně dvě hladiny analytu v sérii o 20 opakování. Jedna hladina by se měla nacházet uvnitř referenčního intervalu a druhá nad hodnotou horního referenčního, nebo rozhodovacího intervalu. Případně lze použít hladinu nacházející se pod spodní hranicí referenčního rozmezí. Jako vzorky lze použít referenční materiály, materiály interní kontroly kvality anebo vzorky pacientů (Friedecký et al., 2011).

### **1.6.2 Mezilehlá preciznost**

Mezilehlá preciznost (anglicky *Intermediate precision*) je preciznost metody měřená za podobných podmínek jako opakovatelnost (viz předchozí kapitola) za delší časový úsek. Tedy stejná metoda na stejném měřicím systému, ale může být prováděna různými operátory. Taktéž může dojít ke změně šarže reagensů a jejich kalibrátorů (Senft, 2012). Na materiály ke stanovení mezilehlé preciznosti jsou stejné požadavky jako u opakovatelnosti, mohou tedy být použity stejné materiály.

Existují dva různé způsoby získání mezilehlé preciznosti. První možností je použití výsledků vnitřní kontroly kvality. Použijí se k tomu 2–3 různé kontrolní hladiny analytů po dobu 3–6 měsíců, přičemž odlehlé výsledky se do výpočtu nezahrnují. Druhá varianta pro výpočet mezilehlé preciznosti spočívá v pravidelném proměřování 2–3 materiálů s odlišnými hodnotami daného analytu po dobu optimálně 20 dní. Pokud je během tohoto intervalu, kdy probíhá měření zaznamenán odlehlý výsledek, je vhodné tento interval měření náležitě prodloužit (Friedecký et al., 2011).

### **1.6.3 Vychýlení (*bias*)**

Vychýlení (*bias*) je vyjádřením pravdivosti metody odhadem její systematické chyby pomocí analýzy nejlépe matricového referenčního materiálu. Tím je dokumentován stav návaznosti měření v konkrétní laboratoři. Bias může být také dle Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod (Friedecký et al., 2011) kvantifikován jako

výtěžnost (viz následující podkapitola). Vzorce pro výpočet bias, výtěžnosti a jejich vzájemný vztah jsou následující (Suchánek et al, 2006):

$$b_{abs} = c_{meas} - c_{ref} \quad b_{rel} = \frac{c_{meas} - c_{ref}}{c_{ref}} \quad R = \frac{c_{meas}}{c_{ref}} \cdot 100 \quad b_{rel} = R - 100$$

Kde:

$b_{abs}$  ... bias absolutní, vyjádřen v jednotce měření

$b_{rel}$  ... relativní hodnota bias (%)

$R$  ... výtěžnost (%)

$c_{meas}$  ... naměřená koncentrace referenčního materiálu (obvykle jako AM)

$c_{ref}$  ... deklarovaná koncentrace referenčního materiálu

Příčiny bias mohou být mnohé, jejich výskyt a relativní význam se u každé metody liší. Patří sem například odchylky při přípravě kalibrátoru (chyby při vážení nebo měření objemu), použití kalibrátoru s odlišnou maticí od matrice vzorků pacientů, nekorigovaná ztráta analytu během extrakce, nestabilita analytu při transportu či skladování. Bias mohou často způsobit přítomné interferující látky (Theodorsson, 2012). Interference byly popsány v podkapitole [1.5.5](#).

Pro určení systematické chyby pomocí hodnoty bias je důležité eliminovat náhodné chyby, toho je dosahováno měřením v sériích. Dokument EP15-A3 (*User Verification of Precision and Estimation of Bias, 3rd ed.*) udává minimální rozsah měření jednotlivých referenčních materiálů ve formátu 5x5. Tedy každá kontrola je měřena pět dní v sérii s minimálně pěti opakováními (Ambrožová, Kratochvíla, 2016).

Pro stanovení bias se používají materiály, které mají známou koncentraci daného analytu. Pravdivost udávané koncentrace dokládá atest či certifikát od výrobce, který pro ověření koncentrace daného analytu použil referenční postupy měření. Uživatel následně porovná koncentraci uvedenou v atestu s vlastními zprůměrovanými výsledky. Matrice referenčního materiálu by měla být stejná, nebo se co nejvíce blížit matici reálných vzorků pacientů. Takové podmínky splňují certifikované referenční materiály od uznávaných výrobců, například od firem IRMM Geel, NIST USA a dalších. Dalšími doporučenými materiály pro určení bias jsou vzorky validované v cyklech EHK, avšak matrice těchto vzorků ne vždy odpovídá matici vzorků reálných (Ambrožová, Kratochvíla, 2016). V případě, že ani jeden z těchto materiálů není k dispozici, lze

alternativně provést měření výtěžnosti (viz další kapitola) po přidání nematricového referenčního materiálu do nativních vzorků pacientů (Friedecký et al.,2011).

Hodnota bias jako výraz systematické chyby měření má význam při výpočtu kombinované nejistoty (viz kapitola [1.5.6](#)), celkové chyby měření (viz kapitola [1.5.3](#)) a určení referenčních mezí daného analytu.

#### **1.6.4 Výtěžnost**

Výtěžnost (anglicky *recovery*, *R*) je poměr známého množství analytu přítomného nebo přidaného do měřeného vzorku k množství analytu extrahovaného či naměřeného. Výtěžnost lze získat analýzou referenčních materiálů se stejnou matricí, jako mají patientské vzorky. Velice často však tyto referenční materiály k dispozici nejsou. V takovém případě lze výtěžnost odhadnout tak, že se k běžně měřeným vzorkům pacientů přidá přídavek v podobě nematricového roztoku měřeného analytu (*spike*) o známé koncentraci (Thompson, Ellison, 1999). Výtěžnost lze také použít pro vyhodnocení analytické selektivity měření, kdy se určuje vliv interferujících látek. V tomto případě se jako přídavek používají roztoky obsahující hodnocenou interferující látku (Friedecký et al., 2011). Vzorec pro výpočet výtěžnosti z měření referenčního materiálu je uveden v předchozí podkapitole.

V případě stanovení výtěžnosti za použití přídavku je postup dle *Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích* (Friedecký et al, 2011) následující:

- Vyberou se vzorky od několika pacientů (doporučeno je 5) a zvolí se vhodný nematricový referenční materiál (nejčastěji jako vodný roztok). Koncentrace analytu ve směsích patientských vzorků a referenčního materiálu by se měla pohybovat v intervalu pracovního rozsahu posuzované metody a ideálně by měla být poblíž klinických rozhodovacích mezí.
- Vzorky k měření výtěžnosti se připraví následovně. Nejprve se připraví dílčí vzorek s přídavkem. Smíchá se vzorek pacienta s referenčním roztokem v poměru 9 : 1 (vzorek A). Následně se připraví dílčí vzorek s ředěním, kdy se smíchá ve stejném poměru 9:1 patientský vzorek s fyziologickým roztokem nebo nulovým kalibrátorem (vzorek B).
- Vzorky A, B od každého pacienta se změří v duplikátech. Z těchto duplikátů se vypočte jejich průměr.

- Z průměrné hodnoty měření vzorku A od jednoho pacienta se odečte průměrná hodnota vzorku B od stejného pacienta. Tento rozdíl se označí jako  $D$  (duplikát).
- Vypočítá se koncentrace  $C$  přídatku referenčního roztoku do vzorku pacienta dle vzorce:

$$C = \frac{c_s \cdot V_s}{V_s + V_{vz}}$$

Kde:

$c_s$  ... koncentrace přídatku referenčního roztoku

$V_s$  ... objem přídatku referenčního roztoku

$V_{vz}$  ... objem vzorku

- Vypočítá se výtěžnost  $R$  v procentech:

$$R = \frac{D}{C} \cdot 100$$

### 1.6.5 Pracovní rozsah

Pracovní rozsah analytické metody je takové koncentrační rozpětí analytu ve vzorku, v jehož rámci lze získat dostatečnou přesnost a preciznost měření. Lze tedy měřit i mimo oblast lineárního dynamického rozsahu, což je oblast koncentrací, v níž má závislost signálu na koncentraci analytu lineární průběh (Křížek, Šíma, 2015).

Výrobce diagnostik udává rozsah měření, který se při verifikaci ověřuje v podmínkách konkrétní laboratoře. V ideálním případě se využívají sady referenčních materiálů, připravené přímo pro tuto úlohu. Tam kde tyto materiály k dispozici nejsou, je doporučeno měřit směsi lidského biologického materiálu. Pro metody, které mají lineární závislost signálu na koncentraci, se doporučuje připravit dvě směsi. První směs (pool) s vysokou koncentrací analytu, která je poblíž hranice rozsahu deklarované výrobcem. Druhou směs naopak s nízkou koncentrací analytu (lze použít nulový kalibrátor). Ani jedna z těchto směsí nesmí svojí koncentrací překročit deklarovaný pracovní rozsah. Z těchto dvou směsí se následně připraví vzájemným míšením další tři vzorky. Všech pět vzorků je poté změřeno v tripletu, při náhodném pořadí měření. Pomocí metody lineární regrese se zhodnotí a verifikuje závislost naměřených hodnot na známých hodnotách teoretických (Friedecký et al., 2011).

## 1.7 Referenční interval a meze

Při hodnocení výsledků jednotlivých analytů od konkrétního pacienta má referenční interval zásadní význam pro určení, zda tyto výsledky jsou fyziologické, nebo patologické. Referenční interval je rozmezí výsledků stanovení mezi horní a dolní referenční mezí. U většiny analytů jsou důležité obě tyto meze, u některých analytů je klinicky významná pouze horní (výjimečně dolní) referenční mez (Racek et al., 2006).

Referenční (fyziologické) rozmezí je definováno Ceriottim (2007) jako *interval, který při aplikaci na populaci vyšetřovanou laboratoří korektně obsahuje většinu osob s charakteristikami odpovídajícími referenční skupině a vylučuje ostatní*. Referenční skupinou je myšlen náhodně vybraný soubor lidí z dané populace, kteří splňují určité požadavky. Nejčastěji jde o nepřítomnost nemoci a splnění některých preanalytických podmínek (odběr na lačno, fyzický klid před odběrem atd.). Referenční skupiny bývají často rozděleny na jednotlivé subpopulace dle pohlaví, věku a rasy. Výběrová referenční skupina je otestována na daný analyt a různými matematickými postupy je určeno rozmezí výsledků pro většinu těchto osob. Obvykle většina znamená 95 % z celku (2,5–97,5 % percentil). Pro určení referenčních mezí je tedy zásadní výběr správné referenční skupiny (Racek, 2006).

Každá laboratoř musí referenční intervaly udávané výrobcem anebo doporučené odbornými společnostmi potvrdit na vzorku populace vlastních pacientů. Doporučený postup pro validaci referenčních intervalů v jednotlivých laboratořích na konkrétním měřicím systému je následující. Změří se minimálně 20 vzorků biologického materiálu od zdravých pacientů a 19 těchto výsledků (95 %) by se mělo nacházet uvnitř výrobcem uváděném referenčním intervalu. Stejný postup se provádí, když jedna laboratoř přechází z jednoho měřicího systému na druhý. Jednotlivé metody na stanovení konkrétního analytu poskytují u stejných pacientů stejné výsledky pouze tam, kde jsou tyto metody navázané na referenční kalibrační materiály. Tam, kde tato návaznost není, mohou měřicí systémy IVD jednotlivých výrobců vykazovat pro stejnou referenční populaci odlišné referenční meze. Uvnitř těchto intervalů však musí zůstat stejný počet pacientů. Alternativní postup k validaci referenčních intervalu spočívá ve znalosti postupů, které výrobce IVD použil k jejich stanovení (například demografický popis referenční populace včetně geografických podmínek, způsob vyhodnocení statistických dat, preanalytické a analytické podmínky měření). Validující laboratoř posoudí, zda tato data lze aplikovat na populaci svých pacientů (Friedecký, 2005).

## **1.8 Kontrola kvality**

Aby bylo možné udržet spolehlivost výsledků v laboratoři, je nutno provádět pravidelnou kontrolu kvality. Ta umožňuje včas detekovat chyby v celém procesu analýzy a redukovat je ještě před vydáním výsledků lékařům. Pokud je kontrola kvality prováděna a vyhodnocována vlastními pracovníky laboratoře, jedná se o interní kontrolu kvality (anglicky *Internal quality control, IQC*). Externí kontrola kvality (*External quality control, EQC*) je organizována a vyhodnocována externí pověřenou institucí (Friedecký, 2006; Kratochvíla, 2008).

### **1.8.1 Interní kontrola kvality (IQC)**

Prakticky je IQC prováděna měřením kontrolních vzorků, kdy výsledky jejich analýzy jsou porovnávány s výsledky očekávanými (skutečná hladina nemusí být známa). Kontrolní vzorky jsou měřeny za stejných podmínek jako vzorky patientské. Také matrice kontrolních vzorků by se měla co nejvíce podobat vzorkům pacientů (této vlastnosti se říká komutabilita). Každý analyt by měl být kontrolován alespoň na dvou hladinách kontrol od stejného výrobce. Výrobce kontrol udává tzv. atest, což je rozmezí, ve kterém se naměřené hodnoty mohou pohybovat. Očekávané hladiny jednotlivých kontrol by se měly ideálně nacházet poblíž těm klinicky významným, s tím že jedna hladina by měla být ve fyziologickém a druhá v patologickém rozmezí. Frekvence stanovení se u jednotlivých analytů liší. Obecně ale platí, že s každou analytickou sérií měření by měla být stanovena minimálně jedna hladina QC. Analytická série je ekvivalentem jedné pracovní směny s maximální délkou 24 hodin. Dalším pravidlem je nutnost provádět IQC při jakýchkoliv pochybách o funkčnosti metody či analyzátoru. Dále po výměně reagensů, po kalibraci metody a po servisním zásahu v měřicí části analyzátoru (Racek et al., 2006; Kratochvíla et al., 2008).

Vyhodnocení IQC probíhá jak z krátkodobého hlediska, tak z dlouhodobého. Pro krátkodobé hodnocení výsledků IQC slouží regulační grafy, ze kterých lze odečíst preciznost a pravdivost metody (viz kapitoly [1.5.1](#) a [1.5.2](#)). Nejčastěji je používán Levey-Jenningsův graf (viz obrázky 10 a 11). Jeho prostředkem prochází centrální osa, značící definovanou nebo očekávanou hodnotu. Pod a nad ní jsou vyznačeny regulační meze, které obvykle představují dvě směrodatné odchylky od centrální osy.

Při vyhodnocování IQC jsou nápomocná tzv. Westgardova pravidla. Je to systém pro detekci chyb v analytickém procesu, který umožňuje pracovníkům laboratoře rozlišit

náhodnou a systematickou chybu a současně zabránit zbytečnému opakování měření. Tento systém lze naprogramovat do analyzátoru nebo laboratorního informačního systému (LIS). Používá se šest základních pravidel, a to buď samostatně, nebo ve vhodné kombinaci pro dané stanovení (Bartoš et al., 2008).

Pro dlouhodobé vyhodnocení jsou používány indexy spolehlivosti (způsobilosti). Jsou to charakteristiky, které vyjadřují schopnost analytického procesu vyhovět požadavkům ve formě cílové hodnoty včetně jejích horních i dolních limitů. Pro výpočet indexů spolehlivosti je využíván odhad směrodatné odchylky a aritmetický průměr výsledků QC (Bartoš et al., 2008).

### ***1.8.2 Externí kontrola kvality (EQC)***

Kontrola kvality je prováděna také vnějším nezávislým orgánem. V České republice tuto funkci zastává *System externí kontroly kvality (SEKK)*. Existují také nadnárodní kontrolní systémy, které umožňují testovat méně běžné analyty. Externí hodnocení kvality je důležitou součástí celého procesu udržování a zlepšování kvality laboratorních výsledků. Cílem je porovnávání výsledků měření externích kontrol z jedné laboratoře s výsledky ostatních laboratoří. Lze tak odhalit případné neočekávané zdroje chyb či nejistot měření. Účast na programu (pokud je k dispozici) vyžaduje norma ČSN ISO 15189, s četností alespoň dvakrát ročně. Kontrolní vzorky EQC by měly být (tak jako v případě IQC) stanoveny za stejných podmínek jako vzorky pacientů a jejich matrice by měla být co nejvíce komutabilní. To znamená, že se složením co nejvíce podobají vzorkům pacientů (Zima et al., 2019).



## 1.9 Metodika

### 1.9.1 Spektrofotometrie

Absorpční spektrofotometrie patří mezi spektroskopické metody, které jsou založeny na pozorování produkce elektromagnetického záření, nebo jeho interakce s hmotou. Sledují se především emise (vyzáření), absorpce (pohlcení záření) a rozptyl (elastický a neelastický) elektromagnetického záření (Kubala, Cibiček, 2014).

Je nejčastěji využívána pro stanovení analytu rozpuštěného v roztoku. V případě absorpční spektrofotometrie je sledováno množství elektromagnetického záření ve viditelné a blízké ultrafialové oblasti, které prošlo vzorkem a bylo zeslabené absorpcí či rozptylem. Absorpce je způsobena pohlcením fotonu procházejícího záření, které vede k vybuzení atomu či molekuly do vyššího energetického stavu. Pro měření lze zvolit libovolnou vlnovou délku, ale až na výjimky je zvolena taková, která je blízko absorpčního maxima stanovené látky. Při výběru vhodné vlnové délky je třeba dbát na dosažení co nejvyšší citlivosti. Toho se dosáhne volbou vlnové délky blíže absorpčního maxima. Současně je třeba se vyhnout ostrému absorpčnímu pásu, kde případná nepřesnost v nastavení vlnové délky způsobí velkou změnu v naměřené absorbanci.

Ze známé intenzity světla vstupujícího do kyvety s měřenou absorbující látkou  $I_0$  a intenzity světla kyvetou prošlého  $I$  lze spočítat veličinu zvanou transmitance  $T$ . Hodnota této veličiny je nepřímo úměrná koncentraci absorbující látky. To je z praktického hlediska nevýhodné, proto je místo transmitance používána veličina zvaná absorbance  $A$  (záporný dekadický logaritmus transmitance), která poskytuje přímo úměrnou závislost na koncentraci (Káš et al., 2005). Matematické vztahy mezi absorbancí a transmitancí:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad A = -\log T = -\log \frac{I}{I_0} = \log \frac{I_0}{I}$$

Vztah mezi koncentrací analytu v roztoku vzorku a jeho absorbancí je vyjádřen pomocí Lambert-Beerova zákona. Zde je jeho zjednodušený matematický zápis:

$$A = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot l$$

Kde:

$A$  ... absorbance

$\varepsilon_{\lambda}$  ... molární absorpční koeficient látky při vlnové délce  $\lambda$  (jednotka  $1 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ )

$l$  ... tloušťka kyvety ve směru šíření světla v cm

$c$  ... koncentrace v  $\text{mol.l}^{-1}$

Lambert-Beerův zákon platí pouze při splnění určitých podmínek. První podmínkou je použití monochromatického záření, které bylo odůvodněno výše. Další podmínkou je, aby se výsledná absorbance měřeného analytu pohybovala v rozmezí 0,1 až 1,0. Při menších nebo větších hodnotách absorbance je přesnost měření silně omezena náhodnými fluktuacemi. Příliš koncentrovaný vzorek je tedy vhodné naředit. Naopak u vzorku s nízkou koncentrací lze případně použít kyvetu se širší měřenou vrstvou nebo použít pro stanovení daného analytu citlivější metodu.

Platnost Lambert-Beerova zákona mohou také omezit některé vlastnosti měřeného analytu. Mohou to být například interakce analytu s rozpouštědlem, přítomnost koloidních částic v roztoku, problematická matrice vzorku (lipémie, bilirubin a hemoglobin), fotochromní či fotochemické reakce analytu a změny indexu lomu s koncentrací analytu (Záruba et al., 2016).

Mnohé automatické spektrofotometry, které provádějí kromě spektrofotometrických i turbidimetrické měření, operují s termínem optické hustoty (anglicky *optical density* – *OD*). Ta je definována stejně jako absorbance:

$$OD = \log \frac{I_0}{I}$$

Termín absorbance lze použít v případě, že dochází k absorpci záření. Když je ale intenzita paprsku záření vstupujícího do kyvety snižována rozptylem na velkých částicích (často komplex antigen-protilátka) je vhodnější používat termín optická hustota. Jedná se tedy o nadřazený termín, který zahrnuje jak absorpci, tak rozptyl záření (Káš et al., 2005).

Pomocí absorpční spektrofotometrie lze stanovit velké množství látek. Je-li v roztoku vzorku přítomna pouze čistá analyzovaná látka, lze měřit pomocí jedné vlnové délky poblíž jejího absorpčního maxima. V případě že chceme stanovit hladinu analytu v biologickém vzorku, je nutné potlačit interferenci dalších látek, přispívajících k signálu. Toho lze docílit tím, že je vzorek proměřen na více vlnových délkách a vliv matrice je eliminován pomocí empirických vzorců (Kubala, Cibiček, 2014).

U některých látek lze použít přímé měření absorbance. Příkladem jsou látky barevné (např. porfyriny), přečištěné nebo vystupující ze separačních kolon. Většina látek je analyzována pomocí specifické reakce s přidaným činidlem, která poskytuje barevný produkt, jehož absorbance je měřena (Kubala, Cibiček, 2014). V současnosti k těmto specifickým reakcím často patří reakce enzymatické. V těchto reakcích je analyzovaná látka substrátem specifického enzymu, který katalyzuje její přeměnu na produkt. Tento produkt může být sám barevný, nebo vstupuje do další reakce poskytující měřitelnou odezvu. Obrácením tohoto způsobu lze také stanovit katalytickou aktivitu analyzovaného enzymu. Výhodou použití enzymů ke stanovení je mimo jejich vysoké specifčnosti také to, že umožňují vyhnout se používání agresivních činidel, vysokých teplot či dlouhé inkubační doby (Racek et al., 2006).

Při stanovení analytů pomocí chemické či enzymatické reakce se využívají dva způsoby měření této reakce. Prvním způsobem je metoda end-point. Principem této metody je měření rozdílu mezi absorbancí v čase smíchání vzorku s reagensy ( $A_0$ ) a absorbancí  $A$  v čase, kdy už reakce proběhla (v takzvaném konečném čase). Tento rozdíl je úměrný koncentraci stanovované látky (Vávrová, © 2020). Druhým způsobem je kinetické měření. Měří se zde změna absorbance v určitém časovém intervalu, kdy reakce probíhá lineárně. K ustálení lineární reakce dochází až za nějaký čas po smíchání vzorků s reagensy. (Vávrová, © 2020).

### ***1.9.2 Spektrometr a jeho součásti***

Optické přístroje používané k měření absorpčního spektra látek se nazývají spektrometry. Základní komponenty, ze kterých jsou složeny: zdroj elektromagnetického záření, monochromátor, měřící kyveta, detektor záření a převodník signálu.

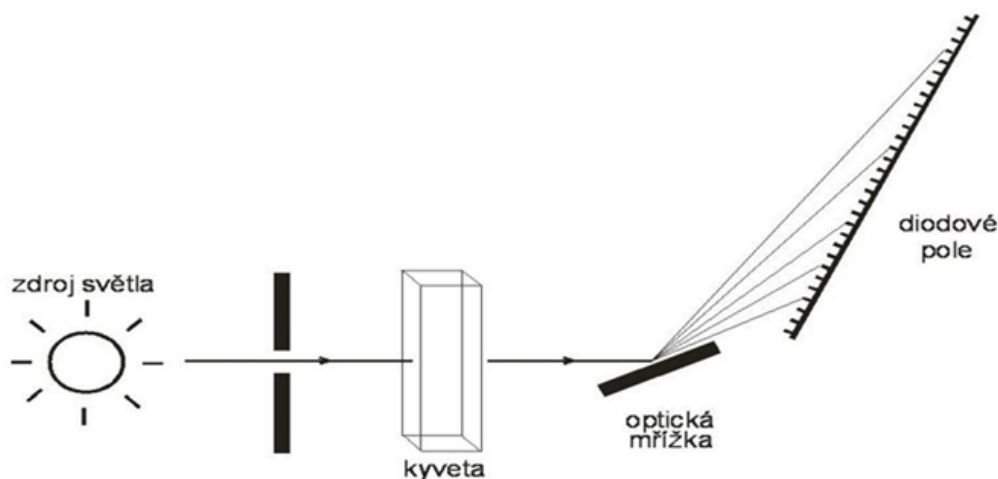
Jako zdroje elektromagnetického záření jsou používány ty, které poskytují spojité spektrum ve VIS a blízké UV oblasti. Nejčastější jsou halogenové lampy a xenonové výbojky. Méně časté jsou wolframové žárovky a LED diody (Záruba et al., 2016).

Monochromátor je zařízení, které vstupující spojité elektromagnetické záření rozděljuje na řadu monochromatických paprsků, ze kterých je vybrána potřebná vlnová délka. Klíčovou součástí monochromátoru je disperzní prvek. Tím může být buď optický hranol (v současnosti se již nepoužívá) nebo mřížka. Optický hranol rozkládá světlo na základě různého indexu lomu paprsků jednotlivých vlnových délek. Optická mřížka je vyrobena z transparentního materiálu, ve kterém jsou vrypy v určitých vzdálenostech od sebe. Rozklad spojitého spektra probíhá na principu ohybu a odrazu záření. Ohyb záření může nastat pouze, je-li vzdálenost mezi jednotlivými vrypy blízká vlnové délce záření. Jednotlivé optické mřížky charakterizuje vzdálenost vrypů (udává se jejich počet na 1 mm) a určuje tak pro kterou oblast spektra je lze použít (Klouda, 2003).

Roztok s měřeným analytem je umístěn v měřicí nádobce – kyvetě. Materiál, z kterého je kyveta vyrobena nesmí absorbovat záření, používané k samotnému měření. Proto se používá nejčastěji křemenné sklo, které neabsorbuje UV záření (Hrazdira, Mornstein, 2004). Často jsou z důvodu nižší ceny používány kyvety plastové (použitelné pro UV i VIS spektrum), byť poskytují menší přesnost při měření.

Optické spektrometry obsahují detektory, jejich základem je čidlo, které dopadající elektromagnetické záření (neelektrický signál) převádí na signál elektrický. Tento signál je následně upraven na potřebný tvar pro vyhodnocení. Pro detekci viditelného a blízkého ultrafialového záření lze využít například fotoelektrické články (například fotonka). Ty pracují na principu vnějšího fotoelektrického jevu. Při něm dopadající fotony vyřazují z fotocitlivého povrchu katody elektrony, které následně směřují k anodě. Tím vzniká proud, jehož intenzita odpovídá množství dopadajících fotonů. Další možnosti detekce VIS a UV záření je využití vnitřního fotoelektrického jevu. Základem je polovodičová součástka (například křemíková fotodioda), na kterou je přivedeno napětí. Dopadající fotony vyřazují elektrony z vnitřního materiálu polovodiče, kterým následně začne protékat měřitelný elektrický proud. Moderní automatické analyzátory, jako například AU480 od firmy Beckman Coulter, využívají tuto technologii v podobě diodových polí. Diodové pole (*Diode Array, DA*) je soustava několika desítek až tisíc fotodiod vedle sebe, které zaznamenávají celé vymezené spektrum vlnových délek (Klouda, 2003).

Spektrometry lze podle konstrukce rozdělit na jednopaprskové, dvoupraprskové a tzv. Diod–array–detectors. Jednopaprskové přístroje mají pouze jednu optickou dráhu a posunovatelné kyvety, naplněné referenčním a měřeným vzorkem. Nejdříve je změřena kyveta s referenčním vzorkem (blankem) a poté je změřena kyveta se vzorkem. Přístroj následně vypočítá absorpenci. U dvoupraprskového přístroje je světelný paprsek ze zdroje rozdělen na dvě dráhy. Jedna dráha prochází kyvetou s blankem a druhá se vzorkem. Toto uspořádání je vhodnější pro měření při více vlnových délkách. Třetí typ uspořádání Diod–array–detectors (obr. 4) se od předešlých dvou liší tím, že kyvetou neprochází monochromatický paprsek, ale spojitě záření ze zdroje. To je po průchodu kyvetou pomocí optické mřížky rozděleno na jednotlivé vlnové délky a ty jsou následně detekovány pomocí diodového pole. Každá dioda z desítek až tisíců je určena pro jednu konkrétní vlnovou délku (Káš et al., 2005).



Obrázek 4: Princip spektrometru typu Diod–array–detectors

Autor: Vejražka, 2008; dostupné z: <https://lurl.cz/FzVke>

### 1.9.3 Infračervená spektrometrie

Infračervená spektrofotometrie patří mezi spektroskopické metody (viz kapitola [1.9.1](#)). Je založena na měření absorpce infračerveného záření (IR) molekulami látek. Vlnová délka IR záření zaujímá rozmezí 0,78–1000  $\mu\text{m}$ . Při práci s touto metodou se ale obvykle místo vlnové délky udává vlnocet. Energie IR záření není dostatečná na přechod elektronů do vyšších energetických hladin, dochází pouze ke změnám vibračně-rotačních stavů molekul. Pro kvalitativní a kvantitativní analýzu mají význam hlavně vibrační stavy (rotační stavy splývají), které absorbují pouze záření odpovídající energii daného přechodu. Obzvláště absorpční pásy v oblasti 1500 až 670  $\text{cm}^{-1}$  jsou určeny celkovou

strukturou molekuly a jsou tedy typické pro danou látku (nazývají se oblastí otisku palce – anglicky *fingerprint region*). Absorpční spektra jsou pomocí počítače srovnána s elektronickou knihovnou a identifikována (Klouda, 2003). Infračervené spektrometry mají podobnou konstrukci jako ty pracující s UV a VIS, jen využívají součásti, které jsou vhodné pro infračervenou oblast spektra (obrázek IR spektrometru v příloze – č. 26).

#### **1.9.4 Biochemický analyzátor AU480 od společnosti Beckman Coulter**

Pro měření citrátů a oxalátů v moči byl vybrán biochemický analyzátor AU480 firmy Beckman Coulter. Tento analyzátor je určen pro in vitro diagnostiku a na úseku klinické biochemie ÚKBH FN Plzeň je využíván pro méně frekventované a výzkumné metody.

Analyzátor měří na principu absorpční spektrofotometrie a turbidimetrie. Může být také vybaven ISE modulem s iontově selektivními elektrodami pro měření iontů sodíku, draslíku a chloridu. Přístroj může mít na palubě maximálně 60 fotometrických testů, umístěných v chladicí jednotce, plus tři ISE testy. Rychlost stanovení je 400 fotometrických testů za hodinu, nebo 800 testů včetně ISE.

Reakční jednotku, ve které probíhá měření, tvoří rotační disk obsahující 88 kyvet z křemenného skla (délka optické dráhy je 5 mm). Rotační disk je uložen v systému suché lázně, která je temperována na 37 °C. Analyzátor je schopen pipetovat vzorek o objemu 1,0–25,0 µl. Pipetovací jehla je opatřena detektorem sraženin a hladiny kapaliny. Vzorkem může být sérum, plazma, moč nebo jiné tekutiny s viskozitou ve stejném rozsahu jako sérum (např. punktát nebo likvor).

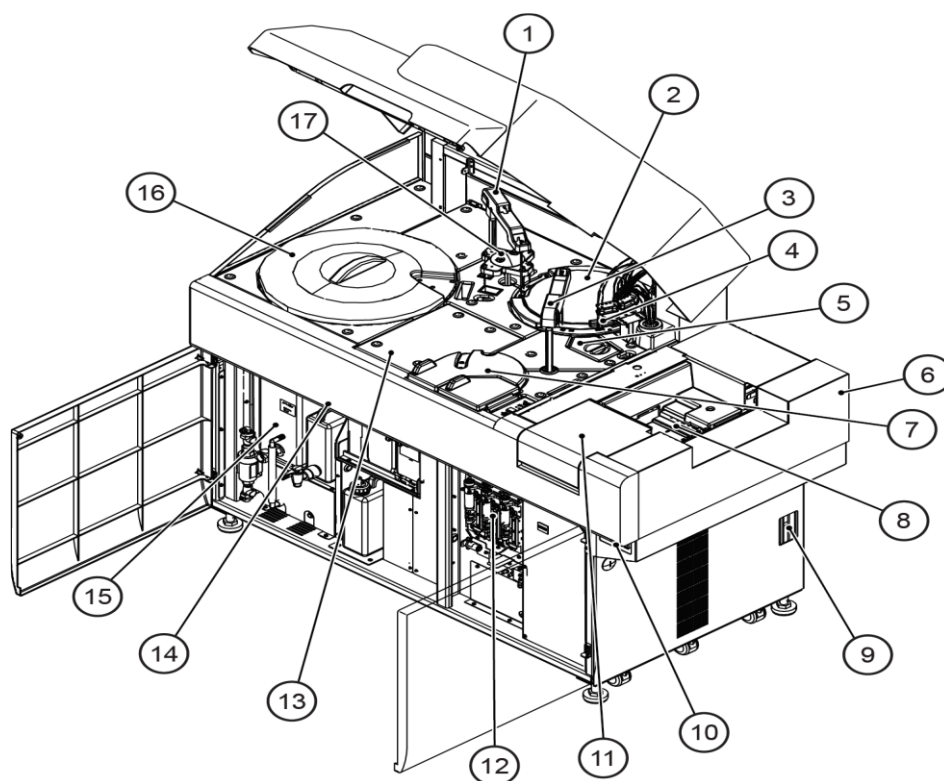
Reagencie mohou být dávkovány v objemech 10–250 µl. Množství reagenční směsi v kyvetě se musí pohybovat v rozmezí 90–350 µl. Zdrojem světla pro měření je halogenová lampa. Jako detektor záření slouží pole křemíkových fotodiod, měřících 13 různých vlnových délek v rozsahu 340–800 nm. Měřitelný rozsah absorbance je 0,0 až 3,0. Systém využívá maximálně 28 (P0 až P27) měřících bodů při maximální reakční době 8 minut a 37,5 sekund, přičemž 1 měřící bod odpovídá přibližně 18,5 sekundám.

Analyzátor využívá tři základní analytické způsoby měření. Jsou to metody analýzy koncového bodu, pevného bodu (end-point) a poměrná (kinetická) metoda. Metody end-point a kinetické lze na tomto analyzátoru měřit v několika variantách. Pro stanovení citrátů i oxalátů bude používána metoda end-point ve dvoukrokové variantě. Detaily metody end-point jsou popsány v kapitole [2.6](#)



Obrázek 5: Biochemický analyzátor AU480 Beckman Coulter

Zdroj: web firmy Beckman Coulter Česká republika s.r.o.



Obrázek 6: Jednotlivé součásti analyzátoru AU480 Beckman Coulter

Zdroj: uživatelská příručka analyzátoru AU480 firmy Beckman Coulter

Legenda k obrázku č. 6

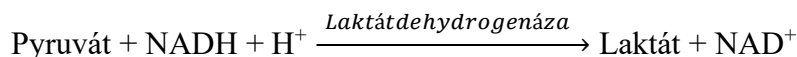
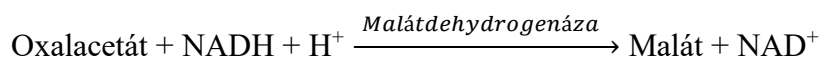
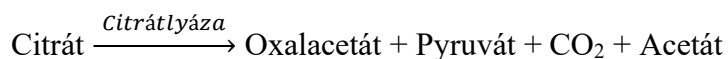
1. Jednotka pro přenos reagensie
2. Jednotka kyvetového kola
3. Jednotka pro přenos vzorků
4. Mycí tryska
5. Jednotka fotometrie
6. Jednotka podavače stojánků
7. Jednotka STAT (statimového) rotoru
8. Jednotka sběru stojánků
9. Jistič a pojistky
10. Provozní tlačítka
11. Jednotka podavače stojánků
12. Stříkačka
13. Jednotka ISE (volitelná)
14. Jednotka peristaltického čerpadla
15. Uložení kanystrů
16. Chladicí jednotka na reagensie
17. Míchací jednotka

Informace v této kapitole byly převzaty z uživatelské příručky k analyzátoru AU480 od firmy Beckman Coulter.

### ***1.9.5 Princip stanovení citrátů – metoda od firem INstruchemie a LTA***

Enzymatické metody pro stanovení citrátů v moči jsou běžně používané v rutinních laboratořích. Jde o spektrofotometrické metody, kdy nejčastější varianta je založená na principu štěpení kyseliny citrónové (citrátu) pomocí enzymu citrátlyázy (CL) na oxalacetát a acetát. Oxalacetát a jeho dekarboxylační produkt pyruvát je následně za přítomnosti enzymů malátdehydrogenázy (MDH) a laktátdehydrogenázy (LDH) transformován na L-malát a L-laktát. Obou těchto reakcí se jako kofaktor malátdehydrogenázy a laktátdehydrogenázy účastní redukovaná forma nikotinamidadeninukleotidu ( $\text{NADH}_2$ ), která je v reakci přeměněna na formu oxidovanou ( $\text{NAD}^+$ ).  $\text{NAD}^+$  narozdíl od  $\text{NADH}_2$  neabsorbuje elektromagnetické záření o vlnové délce 340 nm. To způsobí pokles absorbance této vlnové délky při měření, který je přímo úměrný koncentraci ve vzorku přítomného citrátu. Při měření je používána metoda end-point (princip metody je popsán v kapitole [2.6](#)). Informace jsou převzaty z příbalových dokumentací firem LTA (2008) a INstruchemie (2019) k jejich reagenčním setům. Na další straně jsou uvedeny rovnice výše popsaných reakcí:





### **1.9.6 Další principy stanovení citrátů**

Byly vyvinuty mnohé další metody na stanovení citrátů. V následujících podkapitolách budou uvedeny a velmi stručně popsány jednotlivé skupiny metod na jedné nebo několika jejich variantách. Popis všech variant těchto metod by byl mimo rozsah této bakalářské práce.

#### *1.9.6.1 Chemické metody*

Chemické spektrofotometrické metody patří k nejstarším způsobům stanovení citrátů, jsou velmi pracné a v praxi se již nepoužívají. Bylo popsáno vícero variant nepřímého stanovení, kdy je nejprve kyselina citrónová oxidována manganistanem draselným v kyselém prostředí za přítomnosti brómu za vzniku pentabromacetonu. Ten lze následně stanovit buď gravimetricky (vážková analýza extrahovaného pentabromacetonu) anebo kolorimetricky (Deysher, Holm, 1942).

Jedna z variant kolorimetrického stanovení probíhá následovně. Pentabromaceton, který byl vyextrahován do éteru je protřepáván s vodným roztokem thiomocoviny. Ve vodné fázi vzniká narůžovělé zbarvení, které se po úpravě na pH 11 mění na stabilnější žluté. To je po ustálení změřeno při 460 nm (Natelson et al., 1948).

#### *1.9.6.2 Separační metody*

V rutinní praxi je často využívána kapilární elektroforéza ve variantě s nepřímou detekcí, kde použití elektrolytu absorbujícího v UV oblasti (nejčastěji  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_4$ ) umožňuje měření neabsorbujících aniontů v krvi a moči. Je tedy vhodná pro stanovení jak citrátů, tak i oxalátů. Aby se negativní píky jednotlivých iontů dobře rozdělily, je třeba použít vhodné elektroforetické podmínky (Holmes, 1995).

Další separační metodou stanovení citrátů v moči, nebo jiných biologických tekutinách je izotachoforéza. Jde o elektromigrační separační techniku, která umožňuje separaci a měření kationtů nebo aniontů v roztocích. Vzorek je dávkován mezi dva elektrolyty s

rozdílnou pohyblivostí iontů. Vedoucí elektrolyt obsahuje ionty s vyšší pohyblivostí a koncový elektrolyt naopak s nižší pohyblivostí, než mají stanovované ionty ve vzorku. Ty se po zapnutí konstantního stejnosměrného proudu začnou dělit dle své pohyblivosti, dokud nenarazí na vedoucí a koncový elektrolyt. Poté se všechny ionty pohybují ustálenou rychlostí díky gradientovému potenciálu. Protože ionty jsou v kapiláře rozvrstveny ve stejných koncentracích, šířka zóny určuje jejich množství ve vzorku. Pro měření se často používají vodivostní, teplotní či fotometrické detektory (Klouda, 2003).

Pro stanovení citrátů je využívána také vysokoúčinná iontová chromatografie (HPIC). Metoda, kterou popsali Singh a Nancollas (1985) využívá jako stacionární fázi iontoměnič pro anionty. Jako mobilní fáze slouží roztok uhličitánu sodného o koncentraci 8.0 mmol/l při isokratické eluci, při které se složení mobilní fáze během měření nemění. Pro detekci byl použit vodivostní detektor.

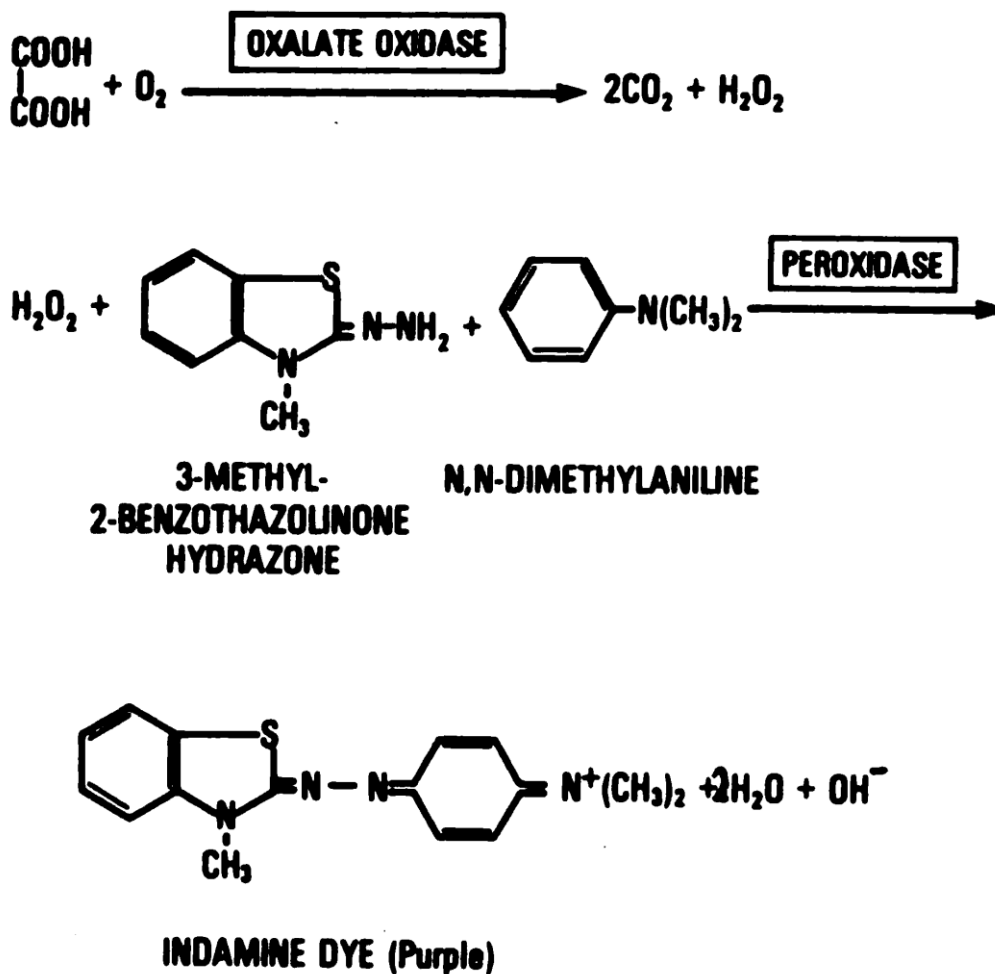
#### *1.9.6.3 Ostatní enzymatické metody*

Enzymatické stanovení citrátu pomocí reakce s citrátlyázou má kromě metody využívající malátdehydrogenázy a laktátdehydrogenázy ještě pár alternativních variant. První z nich je reakce vzniklé  $\alpha$ -ketokyseliny oxalacetátové s fenylyhydrazonem za vzniku oxalacetát fenylyhydrazonu. Ten silně absorbuje v UV oblasti. Pro měření je používána vlnová délka 330 nm (Petrarulo et al., 1995).

Další varianta enzymatického stanovení citrátu je využívána v biosenzorech, které mají uplatnění hlavně v potravinářském průmyslu. Zde je kromě citrátlyázy přítomna oxalacetátdekarboxyláza, která rozkládá vznikající oxalacetát na pyruát a oxid uhličitý. Oba enzymy jsou imobilizovány v enzymovém reaktoru, kudy prochází nasávaný vzorek. Vznikající uhličitánové ionty jsou následně potenciometricky měřeny pomocí ISE elektrody (Kim, 2005).

#### ***1.9.7 Princip stanovení oxalátů – metoda od firem INstruchemie a LTA***

Většina enzymatických metod na stanovení oxalátů je založena na oxidaci katalyzovanou enzymem oxalátoxidázou za vzniku peroxidu vodíku a oxidu uhličitého. Vzniklý peroxid vodíku lze změřit fotometricky poté co zreaguje s chromogenem. Firma INstruchemia ve své metodě využívá reakci peroxidu vodíku s 3-Methyl-2-benzothiazolinon-hydrazonem (MBTH) a N, N-diethylanilinem (DEA), za katalytického působení enzymu peroxidázy, kdy vzniká modré indaminové barvivo. Nejvhodnější vlnová délka pro měření je 595 nm.



Obrázek 7: Reakce probíhající při stanovení oxalátu pomocí oxalát oxidázy

Zdroj: *Spectrophotometric determination of urinary oxalate with oxalate oxidase prepared from moss (Laker et al, 1980)*

Firma LTA uvádí pouze reakci peroxidu vodíku s 3-dimethylamino-benzoovou kyselinou za vzniku modrého zbarvení. Konkrétnější informace v příbalovém letáku nejsou uvedeny. Leták však uvádí v literárních zdrojích studii *Spectrophotometric determination of urinary oxalate with oxalate oxidase prepared from moss* (Laker et al., 1980). Podle této studie se jedná o stejnou reakci, která je použita u firmy INstruchemie. Oba výrobci využívají pro měření oxalátů metodu end-point (princip je popsán v podkapitole [2.6](#)).

Při reakci peroxidu vodíku s chromogenem katalyzované peroxidázou silně interferují dvojmocné kovy a kyselina askorbová (vitamín C). Stejně tak je reakce citlivá na změny v koncentraci chloridu sodného (Laker et al., 1980). Před samotným stanovením je tedy nutno tyto interferenty odstranit. Oba výrobci k jejich eliminaci používají rozdílné postupy.

Firma INstruchemie dle jejího příbalového letáku využívá precipitaci oxalátu se síranem vápenatým a bezvodým ethanolem. Vzniklý precipitát je po separaci rozpuštěn a poté může proběhnout měření výše popsáním způsobem. Tento postup podrobněji ve své studii popisují Berckmans a Boer (1988). Precipitační reagent dihydrátu síranu vápenatého má koncentraci 9,7 mmol/l. Jako precipitační rozpouštědlo slouží sukcinátový pufr o složení: kyselina jantarová (50,0 mmol/l), Na<sub>2</sub>EDTA (5,0 mmol/l) a thimerosal (6,0 μmol/l) jako konzervant. Pomocí roztoku NaOH (1,0 mmol/l) je pH rozpouštědla upraveno na hodnotu 3,8.

Firma LTA ve svém příbalovém letáku podrobnosti o odstranění interferujících látek neuvádí, pouze je uvedeno aktivní uhlí jako obsah purifikačních zkumavek. Ve výše zmíněné studii (Laker et al., 1980) je uveden princip odstranění interferentů skrz výměnu iontů na povrchu aktivního uhlí.

### ***1.9.8 Další principy stanovení oxalátů***

Zde stejně jako v kapitole [1.9.6](#) zde budou velmi stručně popsány další jednotlivé skupiny metod pro stanovení oxalátů, a to na jedné nebo několika jejich variantách.

#### *1.9.8.1 Chemické metody*

Chemické spektrofotometrické metody patří k nejstarším způsobům stanovení a v praxi se již běžně nepoužívají. Zprvu byly popsány metody nepřímé. Například reakce, kdy je kyselina šťavelová nejprve redukována na kyselinu glykolovou pomocí práškového hořčíku a kyseliny sírové. Ta pak reaguje s 2,7-naftalendiolem za vzniku barevného produktu (Calkins, 1943). Následně byly popsány reakce přímého stanovení, například reakce kyseliny oxalové s indolem v kyselém prostředí, kdy vzniká růžové zbarvení (Bergerman, Elliot, 1955). Další varianta stanovení je založena na katalytickém působení dvojmocného železa na reakci bromičnanového aniontu s jodidovým za vzniku aniontu trijodidového, který absorbuje při 352 nm. Oxalát v této reakci působí jako aktivátor katalytického účinku dvojmocného železa (Chamjangali et al., 2005).

#### *1.9.8.2 Separační metody*

Jednou z možných technik je vysokoúčinná kapalinová chromatografie na nepolárních adsorbentech (RP-HPLC). Jako stacionární fáze slouží silikagel a jako mobilní fáze například směs methanolu a roztoku kyseliny octové o koncentraci 0,001 mol/l. Pro měření lze použít UV detektor (Suryavanshi et al., 2016).

Dalším způsobem stanovení je plynová chromatografie. Oxalát v moči je zde separován pomocí precipitace s chloridem vápenatým. Následně je přeměněn na dimethyloxalát, který je stanoven pomocí plynového chromatografu. Jako nosný plyn je použito hélíum a měření je provedeno na plamenovém ionizačním detektoru (Park, Gregory, 1980)

Poměrně častou metodou stanovení oxalátů je kapilární elektroforéza. Princip stanovení je popsán v podkapitole [1.9.6.2](#).

### *1.9.8.3 Ostatní enzymatické metody*

Pro stanovení oxalátu lze použít enzym oxalát dekarboxylázu. Ta z oxalátu odštěpí oxid uhličitý za vzniku kyseliny mravenčí. Oxalát v moči je nejprve separován pomocí precipitace s chloridem vápenatým. Po rozpuštění oxalátu pomocí pufru je do roztoku přidán enzym oxalát dekarboxyláza. Reakce se nechá proběhnout v uzavřené nádobě, ve které se pomocí tlakoměru měří vznikající CO<sub>2</sub> (Mayer et al., 1963).

## **1.10 Zavedení metod do informačních systémů**

### **1.10.1 Zavedení metod do laboratorního informačního systému (LIS)**

Každá metoda, která může být použita v rutinním provozu laboratoře, se nachází v takzvaném národním číselníku laboratorních položek (NČLP). Je to seznam metod, který je seřazen dle mezinárodní nomenklatury IFCC/UIPAC. U všech metod je uvedena komponenta (analyt, entita), systém (druh materiálu), druh veličiny s jednotkou SI (zkratka z francouzštiny – *Le Système International d'Unités*) a měřicí procedura. Na základě těchto pěti znaků má každá metoda vlastní číslo neboli klíč NČLP. Tento klíč slouží jako identifikace pro přenos mezi LIS a NIS. U všech položek v NČLP jsou uvedeny údaje o referenčních rozmezích, preanalytice, interpretaci výsledků a další.

V laboratoři ÚKBH ve FN Plzeň je jako LIS zaveden FONS Openlims od firmy Stapro s.r.o. Zavedení nové metody začíná vybráním dané metody ze seznamu NČLP a ta je následně vložena do tzv. lokálního číselníku metod (každá laboratoř má svůj vlastní). V tomto číselníku lze metodě přiřadit libovolné identifikační číslo. Následuje nastavení jednotlivých parametrů potřebných pro správnou funkci LIS při analýze.

Jeden z prvních parametrů je takzvaný rozpad do bloků. Při něm je metoda zadaná do hlavního bloku *Centrální příjem* přiřazena do bloků pro jednotlivé úseky laboratoře. U metody může každá laboratoř upravovat referenční meze na základě měření vlastní

populace pacientů (viz kapitola [1.7](#)). Dále lze ke každé metodě, pokud je třeba, přiřadit další metody a navázané výpočty. Například k metodě na stanovení odpadu analytu do moče se přiřadí diuréza a čas sběru, nebo kreatinin pro výpočet poměru analyt/kreatinin. Pro metody určené na stanovení ze séra či plazmy se přiřazují metody LIH pro určení úrovně lipémie, ikterity a hemolýzy. Následuje nastavení tisku identifikačních štítků. Obvykle je na štítku uvedeny identifikační údaje (rodné číslo a celé jméno) pacienta, číslo vzorku a označení daného bloku. Ke každé metodě jsou také přiřazeny výkony pro pojišťovnu. K výkonu samotné metody se navíc dodává výkon separace (pokud je zpracována plazma/sérum), popřípadě příprava vzorku. U většiny metod se nastavuje kontrola výsledků, tedy aktuálních hodnot vzhledem k předchozím a vzhledem k referenčnímu rozmezí. Kromě referenčních mezí jsou u kvantitativních metod nastaveny další meze výsledku, jež označují míru patologie daného výsledku (ve výsledkovém listu je představují hvězdičky). To pomáhá pracovníkům laboratoře zachytit extrémní výsledky některých analytů, které ohrožují pacienta na životě.

Ke každé metodě používané v rutinním provozu musí být prováděna kontrola kvality (více v kapitole [1.8.1](#)). Do LIS se proto musí zadat parametry použitých kontrol jako název, deklarovaná hodnota, směrodatná odchylka a maximální rozmezí ( $\pm 2SD$ ). Měla by být také nastavena Westgardova pravidla pro hodnocení kontrol (viz kapitola [1.8.1](#)).

Na závěr zbývá nastavit vzájemná komunikace mezi NIS, LIS a příslušným analyzátořem. U každé metody (plus její QC), pokud požadavky a výsledky mají probíhat online mezi LIS a analyzátořem, je nutno nastavit čísla komunikačních kanálů (vzorky a jednotlivé QC mají vlastní číslo). Přenos požadavků a výsledků mezi LIS a NIS dané metody probíhá na základě čísla NČLP. Informace byly převzaty z uživatelského manuálu k programu FONS Openlims.

### ***1.10.2 Zavedení metod do nemocničního informačního systému (NIS)***

Ve FN Plzeň je používán nemocniční informační systém Medicalc4 od firmy Medicalc software s.r.o. Zavedení nové metody začíná podobným způsobem jako u laboratorního informačního systému FONS Openlims. Ze seznamu NČLP (viz předchozí kapitola) je vybrána konkrétní metoda, které je přiřazeno stejné identifikační číslo jako v lokálním seznamu LIS. Následuje přidání metody do elektronické žádanky, ve které mohou příslušní lékaři a zdravotníci zadávat požadavky na vyšetření z náběru konkrétního pacienta. Stejně tak jako v LISu, lze ke každé metodě, pokud je třeba, přiřadit další metody a navázané výpočty. Nakonec je nastavena online komunikace mezi NIS a LIS. Informace byly převzaty z uživatelského manuálu k programu Medicalc4.

## 2. Praktická část

### 2.1 Reagencie a chemikálie

#### 2.1.1 Obsah reagenčních setů

- Reagenční set pro stanovení citrátů v moči od firmy INstruchemie  
(kromě standardu, výrobce koncentrace látek a aktivity enzymů neuvádí)
  - Reagenční pufr: pufr, glycyglycin, NADH<sub>2</sub>, MDH, LDH, stabilizátory; lyofilizát
  - Startér: CL; lyofilizát
  - Startér – rozpouštěcí roztok: připraven k použití
  - Standard: kyselina citrónová 2,0 mmol/l; připraven k použití
- Reagenční set pro stanovení citrátů v moči od firmy LTA
  - Pufr: Goodův pufr >10 mmol/l; pH = 7,8; LDH 500 U/l; připraven k použití
  - Substrát/Enzym: MDH > 350 U/l; NADH<sub>2</sub> > 0,1 mmol/l; lyofilizát
  - Startér: CL > 300 U/l; lyofilizát
  - Standard: kyselina citrónová 1,30 mmol/l; připraven k použití
- Reagenční set pro stanovení oxalátů v moči od firmy INstruchemie  
(kromě standardu, výrobce koncentrace látek a aktivity enzymů neuvádí)
  - Precipitační reagent: síran vápenatý; připraven k použití
  - Precipitační solvent: pufr; připraveno k použití
  - Reagenční pufr: citrátový pufr; připraven k použití
  - Barevný reagent: MTBH, stabilizátory; připraven k použití
  - Startér: oxalát oxidáza, peroxidáza; lyofilizát
  - Startér – rozpouštěcí roztok: glycerol; připraveno k použití
  - Standard: oxalát 0,312 mmol/l, stabilizátor – 0,05% azid sodný; připraven k použití



- Reagenční set pro stanovení oxalátů v moči od firmy LTA
  - Reagent 1: sukcinátový pufr (pH 3,8), kys. 3-dimethylamino benzoová, konzervanty a stabilizátory; připraven k použití
  - Reagent 2: sukcinátový pufr (pH 3,8), konzervanty a stabilizátory; připraven k použití
  - Reagent 3 (startér): oxalát oxidáza, peroxidáza, konzervanty a stabilizátory; lyofilizát
  - Roztok pro ředění vzorků: pufr (pH 7,0), EDTA, konzervanty a stabilizátory; připraven k použití
  - Standard: kyselina šťavelová 0,5 mmol/l, konzervanty a stabilizátory; připraven k použití
  - Purifikační zkumavky: aktivní uhlí.

#### Metrologické návaznosti kalibrátorů a QC.

Firma INstruChemie používá k ověření metrologické návaznosti koncentrace citrátů v kalibrátoru a kontrolách vyšší referenční materiál Citric Acid from USP USA od firmy US. Pharmacopeia (certifikát viz obrázek č. 37 v příloze). U oxalátů certifikovaný referenční materiál (CRM) v současnosti neexistuje. V obou případech firma postupovala v souladu normou ISO17511: 2003, oddíl 4.3.2 (zejména poznámka 3 a 4) a oddíl 5.1 (zejména poznámky 1 až 3). U firmy LTA jsme metrologické návaznosti nezjišťovali z důvodu, že tyto metody nebyly zavedeny.

#### **2.1.2 Příprava reagensů**

##### Reagenční set pro stanovení citrátů v moči od firmy INstruChemie

- Pracovní roztok (Reagent R<sub>1</sub>): Lyofilizovaný substrát se rozpustí s 10 ml H<sub>2</sub>O; stabilita 1 měsíc při teplotě 2–6 °C, nebo 2 měsíce při teplotě –20 °C
- Startovací roztok (Reagent R<sub>2</sub>): Lyofilizovaný startér se rozpustí s 2,0 ml rozpouštěcího roztoku; stabilita 3 týdny při teplotě 2–6 °C, nebo 2 měsíce při teplotě –20 °C

Poznámka: Reagencie mohou být zmrazeny pouze jednou, je doporučeno frakcionovat.

### Reagenční set pro stanovení citrátů v moči od firmy LTA

- Pracovní roztok (Reagent R<sub>1</sub>): Lyofilizovaný substrát se rozpustí s 20 ml pufru; stabilita 10 dní při teplotě 4 °C, nebo 1 měsíc při teplotě –20 °C
- Startovací roztok (Reagent R<sub>2</sub>): Lyofilizovaný startér se rozpustí s 0,5 ml pufru; stabilita 24 hodin při teplotě 4 °C, nebo 1 měsíc při teplotě –20 °C

Poznámka: Reagencie mohou být zmrazeny pouze jednou, je doporučeno frakcionovat.

### Reagenční set pro stanovení oxalátů v moči od firmy INstruchemie

- Pracovní roztok (Reagent R<sub>1</sub>): V poměru 1:1 se smíchá barevný reagent s reagenčním pufrem; stabilita 24 hodin při teplotě 4 °C
- Startovací roztok (Reagent R<sub>2</sub>): Lyofilizovaný startér se rozpustí s 2,0 ml rozpouštěcího roztoku; stabilita 14 dní při teplotě 4 °C

### Reagenční set pro stanovení oxalátů v moči od firmy LTA

- Pracovní roztok (Reagent R<sub>1</sub>): V poměru 1 : 1 se smíchá reagent 1 s reagentem 2; stabilita 1 měsíc při teplotě 2–8 °C
- Startovací roztok (Reagent R<sub>2</sub>): Lyofilizovaný reagent 3 (startér) se rozpustí s 2,0 ml deionizované H<sub>2</sub>O; stabilita 1 měsíc při teplotě 2–8 °C

#### **2.1.3 Ostatní použité chemikálie**

- Pracovní roztoky pro biochemický analyzátor AU480 Beckman Coulter
  - Mycí roztok – koncentrovaný promývací roztok (Beckman Coulter)
  - Mycí roztok ředěný (2 %) – promývací roztok, určený pro Wash 1 proceduru
  - 1M roztok kyseliny chlorovodíkové (HCl) – promývací roztok, určený pro Wash 2 proceduru
  - 1M roztok NaClO – promývací roztok, určený pro Wash 2 proceduru
- Deionizovaná H<sub>2</sub>O
- Bezvodý ethanol
- Koncentrovaná HCl
- 5M roztok NaOH

- Kyselina citrónová – referenční standard v čistém stavu;  
firma Sigma-Aldrich (certifikát viz obrázek č. 35 v příloze)
- Oxalát sodný – referenční standard v čistém stavu;  
firma Sigma-Aldrich (certifikát viz obrázek č. 36 v příloze)

#### **2.1.4 Příprava referenčních roztoků**

Navážky potřebných množství chemikálií byly vypočteny podle vzorce:

$$m = c \cdot V \cdot M$$

Kde:

$m$  ... hmotnost v g

$c$  ... koncentrace v mol/l

$V$  ... objem v l

$M$  ... molární hmotnost v g/mol

Molární hmotnost kyseliny citrónové je 192,12 g/mol.

Molární hmotnost šťavelanu sodného je 134,00 g/mol.

##### Příprava referenčních roztoků kyseliny citrónové o koncentracích 2,5 a 4,0 mmol/l

Pomocí analytické váhy bylo naváženo do navažovacích misek vypočtené množství referenčního standardu kyseliny citrónové v čistém stavu. Navážka 0,024 g pro roztok o koncentraci 2,5 mmol/l a 0,0384 g pro roztok o koncentraci 4,0 mmol/l. Každá z obou navážek byla spláchnuta z navažovací misky pomocí deionizované H<sub>2</sub>O do vlastní odměrné baňky o objemu 50 ml. Baňky byly následně doplněny po rysku deionizovanou H<sub>2</sub>O. Referenční roztoky byly skladovány v chladničce při 2–6 °C.

##### Příprava referenčního roztoku šťavelanu sodného o koncentraci 1,0 mmol/l

Pomocí analytické váhy bylo naváženo do navažovací misky množství 0,0268 g referenčního standardu šťavelanu sodného v čistém stavu. Tato navážka byla spláchnuta z navažovací misky pomocí deionizované H<sub>2</sub>O do odměrné baňky o objemu 200ml. Baňka byla následně doplněna po rysku deionizovanou H<sub>2</sub>O. Referenční roztok byl skladován v chladničce při 2–6 °C.

## 2.2 Interní kontroly kvality

Pro vyzkoušení všech metod stanovení citrátů a oxalátů v moči a verifikaci metod vybraných byly použity následující materiály. Od firmy INstruchemie byly použity *Citrate/oxalate control normal level* a *Citrate/oxalate control high level* a od firmy LTA byl použit *Control set oxalic acid/citric acid*, který obsahuje obě hladiny kontrol. Koncentrace použitých firemních kontrolních materiálů je uvedena v tabulce č. 3. Dále byl použit roztok připravený z referenčního standardu kyseliny citronové v čistém stavu o koncentraci 2,500 mmol/l. Jeho příprava je popsána v předchozí podkapitole.

Tabulka 3: Koncentrace použitých kontrolních materiálů

Kontrolní materiál	Koncentrace v mmol/l	
	Citrát	Oxalát
INstruchemie – Normal level	0,510	0,174
INstruchemie – High level	5,930	0,415
LTA – Control 1	0,572	0,284
LTA – Control 2	4,217	0,941

## 2.3 Instrumentace

### 2.3.1 Použité vybavení

- Biochemický analyzátor AU480 od firmy Beckman Coulter (viz kapitola [1.9.4](#))
- pH metr Jenway 550 (viz obrázek č. 24 v příloze)
- Centrifuga Hettich – Universal 320 R
- Vortex Heidolph Reax top
- Vodní lázeň Julabo ED (v. 2)
- Termostat HS 61A (BTM Medical Technologi s.r.o.)
- Mrazicí box a chladnička
- Přístroj na výrobu deonizované vody GORO s.r.o MID 150
- Analytická váha Sartorius BP 110 S
- Laboratorní vybavení běžně používané: reakční zkumavky, kalibrované pipety, jednorázové špičky na pipety, jednorázové plastové Pasteurovy pipety, odměrné baňky, nálevky, navažovací sklo (misky a lžičky), stříčky, savý absorpční materiál (buničina), latexové rukavice

### 2.3.2 Použitý software

- FONS Openlims
- Medicalc4
- Ovládací software pro biochemický analyzátor AU480
- SLP
- Microsoft Windows 10
- Microsoft Office 365

### 2.4 Naprogramování metod do analyzátoru

V této kapitole je na základě firemního uživatelského manuálu stručně popsán postup, kterým se programují metody na biochemický analyzátor AU480 firmy Beckman Coulter. Konkrétní hodnoty zadávaných parametrů, týkající se metod na stanovení citrátů a oxalátů budou uvedeny v kapitole [2.6](#).

AU480 má k dispozici 120 programovatelných kanálů pro fotometrické metody. Vybraný kanál je pojmenován krátkým (6 znaků) a dlouhým názvem (20 znaků). Nejdůležitější nastavení metod se nacházejí v oddílu *Specific Test Parameters* pod záložkou *General* (viz obrázek níže), kde se nastavují parametry samotné metody pro jednotlivé typy materiálu (sérum, moč atd.).

The screenshot shows the 'Parameters' window with the 'Specific Test Parameters' sub-window open. The 'General' tab is selected. The interface includes several input fields and dropdown menus for configuring test parameters. At the bottom, there are buttons for 'Edit', 'List Display', and 'Print'.

Parameter	Value
Test Name	95.U_CIT3
Type	Moc
Operation	Yes
Sample Volume	3.4 uL
Pre-Dilution Rate	1
Reagent Volume R1(R1-1)	170 uL
Reagent Volume R2(R2-1)	34 uL
Wave Length Pri.	340 nm
Wave Length Sec.	700 nm
Method	END
Measuring Point-1 First	0
Measuring Point-1 Last	27
Measuring Point-2 First	0
Measuring Point-2 Last	10

Obrázek 8: Snímek obrazovky náležící k analyzátoru AU480 se zobrazenou záložkou "General" v oddílu "Specific Test Parameters"

Hlavními parametry jsou objemy vzorku, reagensů a jejich případné automatické ředění. Pokračuje se nastavením primární a sekundární vlnové délky měření. Následuje určení metody měření (*Method*). Všechny zkoušené a zaváděné metody stanovení citrátů a oxalátů využívají měření koncového bodu (end-point), což značí zkratka *END*. Položka *Reaction Slope* znamená, jestli při reakci dochází k vzestupu absorbance (+ u oxalátů), nebo k poklesu (– u citrátů). Následující položky *Measuring Point-1 a 2* určují jednotlivé měřicí body (viz kapitola [1.9.4](#)). Parametry jako *Linearity Limit*, *Lag Time Check*, *OD Limit* a *Reagent OD Limit* hlídají průběh reakce a po překročení těchto rozmezí je ohlášena chyba. Na ní pak reaguje operátor, popřípadě lze naprogramovat například automatické opakování s ředěním. Parametr *Dynamic range* nastavuje pracovní rozsah metody, ve kterém metoda poskytuje přesné a precizní výsledky (viz kapitola [1.6.5](#)). Pomocí *Correlation Factor* se nastavit opravu hodnot koncentrace výsledků vzorků. Zadané faktory A a B jsou vloženy do interpolačního vzorce kalibrace  $Y=AX+B$ , kde Y je koncentrace vzorku, X je podíl naměřené OD a koncentrace kalibrátoru. Korelační faktory defacto upravují průběh kalibrační přímky (křivky). Hodnota A posunuje křivku nahoru či dolů a hodnota B mění sklon křivky. *Factor for Maker* je to samé, co *Correlation Factor*, akorát je určen přímo výrobcem reagensů, zatímco *Correlation Factor* je upravován analytiky na základě výsledků kontrol kvality. Posledním parametrem *Onboard Stability Period* lze nastavit stabilita reagensů od jejich načtení v analyzátoru.

V záložce *LIH* se provádí nastavení parametrů pro měření lipémie, ikterity a hemolýzy u metod analyzujících vzorky sér či plazem. V záložce *ISE* jsou parametry pro iontově selektivní elektrody. Pod záložkou *Calculated Test* lze naprogramovat vypočítaný test na základě zadaného vzorce po naměření výsledků metod v něm uvedených. Tato možnost byla využita u metody stanovení oxalátu od firmy LTA (viz kapitola [2.6](#)). V záložce *Range* lze nastavit referenční rozmezí (viz kapitola [1.7](#)) a varovné hodnoty (*panic value*).

Po naprogramování hlavních parametrů testu, přichází na řadu parametry kalibrace (oddíl *Calibration Parameters*, záložky *Calibrators* a *Calibration Specific*). Každému kalibrátoru lze přiřadit buď ID čtené pomocí barkódu, nebo mu přiřadit fixní pozici v konkrétním kalibračním stojánku. Každý kalibrátoru je následně pojmenován, jsou mu nastaveny koncentrace analytů (položka *Set Conc Value*) a lze mu nastavit číslo šarže a expirace. Je také možné nastavit (záložka *Calibration Specific*) parametry jednotlivých kalibrátorů pro jednotlivé druhy vzorků (sérum, moč a jiné), nebo na ně použít sérovou

kalibraci (položka *Use Serum Cal*). Analyzátor AU480 umožňuje použít celkem 15 typů kalibračních křivek (položka *Calibration Type*). Enzymatické metody stanovení citrátů a oxalátů používají typ označovaný AB (což je dvoubodová kalibrace), kdy křivka je generovaná pomocí jednoho kalibrátoru a reagenční slepé (blanku). Následně lze vybrat interpolační vzorec pro kalibrační křivku v závislosti na zvolený typ kalibrace. Položka *Counts* nastavuje počet měření blanku a kalibrátorů (1–4), Při třech a čtyřech opakováních jsou vyloučeny odlehle hodnoty a průměr vypočten ze zbylých dvou. Další parametry nejsou u kalibrace citrátů a oxalátů používány.

Podobným způsobem jako kalibrátory se programují kontroly kvality v oddílu *QC Parameters* se záložkami *Controls* a *QC Specific*. Zde se nastavuje název kontrol, jejich šarže, expirace a jejich pozice v kontrolním zeleném stojánku nebo ve statimovém kruhu. Následně se nastaví výrobcem deklarované koncentrace, směrodatné odchylky a maximální přípustný rozsah kontroly. Lze též nastavit Westgardova pravidla, ta ale jsou obvykle součástí evidence kontroly kvality v LIS.

Dále se při programování metod do analyzátoru AU480 provádí nastavení reagencií. Ty mohou být identifikovány buď pomocí ID štítků, nebo je jim určena fixní pozice v reagenčním kruhu. U jednotlivých reagencií lze nastavit velikost použité lahvičky.

Vzorky se do analyzátoru AU480 vkládají buď ve stojáncích šedých rutinních, nebo statimových červených. Třetí možností je vkládání do statimového kruhu na palubě analyzátoru. Identifikace vzorků k měření může probíhat skrze načtení ID štítků vzorků, kdy si je systém spojí s požadavkem na analýzu. Dalším způsobem je sekvenční režim měření, kdy analyzátor provede u prvního vzorku ve stojánku analýzy, které jsou požadované u prvního zatím nezpracovaného vzorku v pořadí. Třetím způsobem je režim analýzy podle čísla stojánku. V tomto režimu jsou vzorky identifikovány podle čísla stojánku a pozice vzorkové nádoby v něm.

Aby analyzátor mohl přijímat požadavky na vyšetření a poté odesílat jejich výsledky, musí být správně nastavená komunikace mezi analyzátozem a LIS. Tu obstarávají komunikační protokoly a další parametry, které se nastavují při zavádění samotného analyzátoru do provozu (oddíl *Online*). Při zavádění nových metod se musí nastavit číslo online testu, které musí odpovídat číslu v hostitelském systému LIS

## 2.5 Preanalytická fáze stanovení citrátů a oxalátů v moči

### 2.5.1 Mimolaboratorní preanalytická fáze

Vyšetření odpadu citrátu a oxalátu v moči by nemělo být provedeno dříve než po 20 dnech od odstranění litiázy a stejně tak od prodělání jiných akutních stavů. Pro stanovení odpadu citrátu a oxalátu do moče je nejvhodnější použít 24hodinový sběr moče. Tam kde to není možné (například u pediatrických pacientů) lze použít moč jednorázovou. Pacient je poučen o režimních opatřeních a o tom, jak provést sběr moče. Je mu zdůrazněna nutnosti dodržení tohoto postupu pro získání správných výsledků, které zaručí volbu vhodného léčebného postupu.

Pacient před započítím a během sběru moče nemusí dodržovat zvláštní dietu. Není však vhodné konzumovat potraviny vyšším obsahem oxalátu (např. špenát, rebarbora, hořká čokoláda). Dále by se měl vyvarovat vysokých dávek vitamínu C (nad 2 g/den) a pití většího množství mléka. Také není vhodné užívání projímadel.

Pro sběr moče slouží speciální sběrná nádoba (viz obrázek č. 32 v příloze). Dle doporučení Mayo Clinic (©2020) je pro sběr moče na stanovení oxalátů a citrátů nejvhodnějším konzervačním činidlem diazolidinyl močovina (*Diazolidinyl Urea*). Mezi další doporučená konzervační činidla do moče pro stanovení oxalátů patří 10 % thymol v isopropanolu a pro citráty je kromě thymolu vhodná ještě kyselina boritá. Evropská asociace urologie (Türk et al., 2019) také doporučuje thymol nebo kyselinu boritou. Na rozdíl od mnohých výrobců reagentů (včetně INstruchemie a LTA), tyto zdroje již nedoporučují používat jako konzervant koncentrovanou kyselinu chlorovodíkovou.

V laboratoři ÚKBH FN Plzeň bylo jako konzervační činidlo zvoleno 10% roztok thymolu v isopropanolu. Sbíraná moč na stanovení odpadu citrátu a oxalátu je dále použita pro stanovení dalších analytů jako součást metabolického vyšetření urolitiázy (viz kapitola [1.3.5.4](#)). Jsou to vápník, hořčík, fosfor, sodík, draslík, chloridy a kyselina močová. Dále je z této moče stanoven kreatinin pro výpočet jeho clearance.



### Postup pro správný sběr moče:

- Pacient obdrží speciální sběrnou nádobu na moč (viz obrázek č. 32 v příloze) a lahvičku s konzervačním činidlem.
- Pacient se ráno vymočí do WC a od té doby veškerou moč sbírá po dobu 24 hodin do sběrné nádoby.
- Pacient močí do jiné nádoby, než je sběrná, z této nádoby je následně přelita do sběrné nádoby, která je hned poté uzavřena.
- Konzervační činidlo je do sběrné nádoby nalito s první porcí moče. Pacient by neměl močit přímo do sběrné nádoby s konzervačním činidlem, protože hrozí v případě potřísnění pokožky činidlem její podráždění.
- Pacient je upozorněn, aby se vymočil před každou stolicí.

Pacient donese veškerou nasbíranou moč ve sběrné nádobě do ambulance, popřípadě přímo do laboratoře. V rámci vyšetření na metafylaxi urolitiázy je taktéž pacientovi odebrána krev na další vyšetření a dva vzorky jednorázové moče na vyšetření hodnoty pH (pomocí pH metru) a na vyšetření moče chemicky plus morfologicky. Následně je veškerý odebraný a nasbíraný biologický materiál odeslán spolu se žádankou do laboratoře, a to včetně sběrné nádoby s jejím obsahem. Tento postup byl sepsán dle pokynů pro pacienty od MUDr. Brože (2019).

#### ***2.5.2 Laboratorní preanalytická fáze***

V laboratoři pověřený pracovník velmi důkladně promíchá sběrnou nádobu s nastřádanou močí pacienta a odlije cca 10 ml moče do tří připravených zkumavek určených pro tento objem. Na příjmu je odebraný a nasbíraný materiál zadán do laboratorního informačního systému a označen identifikačními (ID) štítky s čarovým kódem. Dvě zkumavky se sbíranou močí pro stanovení citrátů a oxalátů jsou následně uskladněny v mrazicím boxu při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ostatní materiál je zpracován běžným způsobem dle pokynů SLP (správná laboratorní praxe).

### 2.5.2.1 *Laboratorní preanalytická fáze stanovení citrátů*

Stanovení citrátů v moči bude prováděno přibližně jednou za 14 dní. Zmražené vzorky se po roztátí promíchají. Oba výrobci (INstruchemie a LTA) v návodu udávají použití nativních vzorků čiré moče. Případný zákal a nečistoty budou odstraněny centrifugací. Z praktického hlediska je také důležité, aby moč nebyla kontaminovaná bakteriemi, které mohou v moči přítomné citráty metabolizovat a způsobit tak falešně snížené výsledky. Tomu je zabráněno použitím konzervačního činidla (Singh, Nancollas, 1985).

### 2.5.2.2 *Laboratorní preanalytická fáze stanovení oxalátů*

Stanovení oxalátů v moči bude prováděno také zhruba jednou za 14 dní. Před vlastním stanovením oxalátů v moči je nutné ze vzorků odstranit interferující látky. Firma INstruchemie k tomu využívá precipitaci se síranem vápenatým a bezvodým alkoholem. Firma LTA využívá výměnu iontů na povrchu aktivního uhlí. Principy jsou podrobně vysvětleny v kapitole [1.9.7](#). Výrobce uvádí možnou interferenci velmi vysokých hladin kyseliny askorbové (> 900  $\mu\text{mol/l}$  u metody INstruchemie). To je ošetřeno informováním pacientů ohledně sběru moče (viz kapitola [2.5.1](#)).

Ve vzorcích moče se mohou vyskytovat krystaly oxalátu, které je nutné rozpustit. Toho se dosahuje přidáním koncentrované HCl o objemu 100  $\mu\text{l}$  na 10 ml moče, což způsobí pokles hladiny pH na < 2. Je doporučeno takto acidifikované moče inkubovat v termostatu při 55 °C po dobu 30 minut (Holmes, 1995).

#### Pracovní postup preanalytické fáze u metody firmy INstruchemie:

- Po okyselení a inkubaci vzorků močí, opět upravit jejich pH tak aby jeho hladina byla v rozmezí 6,5–7,5. Pro měření pH se použije pH metr od firmy Jenway 550 dle příslušného návodu. Optimální postup je přidat ke vzorku moče 100  $\mu\text{l}$  5M roztok NaOH. Změřit hodnotu pH a pokud je třeba, upravit hodnotu přidáním 5M roztoku NaOH nebo 1M roztoku HCl tak, aby bylo dosaženo výsledné hodnoty pH od 6,5 do 7,5.
- Ihned po úpravě hladiny pH napipetovat 100  $\mu\text{l}$  vzorku moče do zkušavky či Eppendorfkvy s kónickým dnem (viz obrázek v příloze č. 33).
- Kalibrátor a QC neprochází úpravou pH, jinak se zpracovávají stejným způsobem jako vzorky.

- Do každé zkumavky se vzorkem napipetovat 700  $\mu$ l precipitačního reagentu a poté 1500  $\mu$ l bezvodého ethanolu (nelze použít 96 % roztok ethanolu).
- Zkumavky uzavřít, pouze jednou promíchat a nechat inkubovat minimálně 3 hodiny nebo přes noc při laboratorní teplotě.
- Zkumavky centrifugovat 10 minut při přetížení 2000 g.
- Slít supernatant a položit zkumavky dnem vzhůru na buničinu po dobu 2–3 minut.
- Opatrně osušit vnitřek každé zkumavky od zbylého supernatantu tak, aby nedošlo ke kontaktu s precipitátem.
- Do zkumavek se precipitátem napipetovat 500  $\mu$ l precipitačního solventu.
- Zkumavky protřepat na vortexu tak, aby nedošlo ke kontaktu roztoku s jejich víčky a inkubovat 10 minut ve vodní lázni při teplotě 37 °C.
- Znovu protřepat na vortexu.
- Vzorky jsou připraveny k měření na AU480 po dobu 24 hodin při laboratorní teplotě.

#### Pracovní postup preanalytické fáze u metody firmy LTA

- Smíchat 1 ml moče s 1 ml roztoku pro ředění vzorku.
- Změřit hodnotu pH a pokud je třeba, upravit hodnotu přidáním 1M HCl nebo 1M NaOH tak, aby bylo dosaženo výsledné hodnoty pH od 5,0 do 7,0.
- Směs přelít do purifikační zkumavky s aktivním uhlím.
- Výrobce udává nutnost důkladně míchat po dobu 5 minut za průběžného převrácení zkumavky nebo použití rotačního míchadla. Byl použit vortex Heidolph Reax top s nástavcem pro vkládání zkumavek, který byl nastaven na 500 otáček za minutu.
- Vzorky zcentrifugovat nebo přefiltrovat a poté jsou připraveny k měření.

## ***2.6 Analytická fáze stanovení citrátů a oxalátů v moči***

Analýza všech použitých metod stanovení citrátů a oxalátů byla provedena na biochemickém analyzátoru AU480 firmy Beckman Coulter. Než lze začít s měřením, je nutno nejprve zkontrolovat množství pracovních roztoků nutných pro chod analyzátoru. Jde o koncentrovaný promývací roztok v kanystru ve spodní části přístroje (viz obrázek v příloze č. 29), kterým jsou po naředení deionizovanou H<sub>2</sub>O promývány reakční kyvety a mycí tyčky. Dále je to ředěný promývací roztok na mytí vzorkové jehly, umístěný ve statimovém kruhu. Každý den před spuštěním analýz je nutné provést denní údržbu, která spočívá v kontrole stavu pipetovacích jehel, míchacích tyček a mycích stanic plus jejich případné otření. Následuje spuštění procedury W1, při které jsou promyty všechny pipetovací jehly, kyvety a míchadla. Jednou týdně je prováděna procedura W2, při které je analyzátor za pomoci 1M roztoků HCl nebo NaOH promyt důkladněji.

Po provedení těchto každodenních úkonů je možné přistoupit k přípravám na samotné měření. Do chladicí jednotky, ve které je udržována teplota v rozmezí 4–12 °C se na určené pozice vloží potřebné reagentie, jejichž příprava je popsána v kapitole [2.1.2](#). Reagentie mohou být nality do plastových lahvíček různých objemů (15; 30; 60 ml) od firmy Beckman Coulter. Lahvičky o objemu 15 a 30 ml se vkládají spolu s vymešovými segmenty. Startovací roztoky (reagenty R<sub>2</sub>) mají velmi malý objem (0,5–2,0 ml), proto jsou nality do zkumavek, které se vkládají do speciálních adaptérů. Po vložení reagentií je nutno provést načtení jejich množství, respektive hladinu reagentu ve zkumavce. Poté je analyzátor připraven k měření. Fotografie v příloze (obrázek č. 29) ukazuje pracovní prostor analyzátoru AU480.

Vzorky, kalibrátory a QC jsou do analyzátoru vkládány pomocí 10místných stojánek do přihrádek pohyblivého pásu jednotky podavače stojánek. Jednotlivé stojánky jsou očíslované a barevně rozlišené (rutinní, statimové, kalibrační a kontrolní).

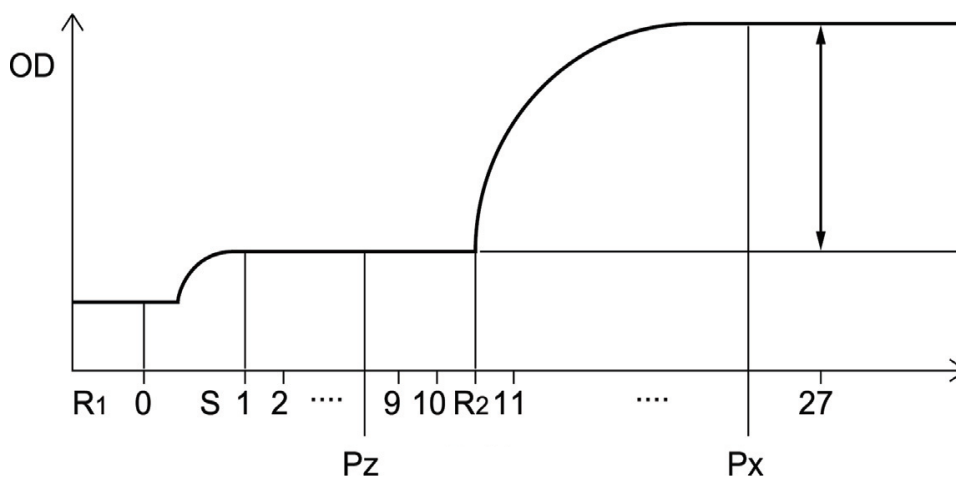
Pokud byly vloženy nově připravené reagentie anebo výsledky měření QC vykazují větší odchylky, je nutno provést kalibraci. V analyzátoru lze zadat buď pouze slepou zkoušku (blank), nebo kompletní kalibraci dle parametrů metody. Po zadání požadavků je do modrého stojánku, určeného pro slepou zkoušku vložena na pozici č. 1 zkumavka s deionizovanou H<sub>2</sub>O. Výjimka je u stanovení oxalátů metodou firmy INstruchemie, kde je místo deionizované H<sub>2</sub>O používán roztok na rozpouštění precipitátu. Do žlutého kalibračního stojánku jsou na příslušnou pozici vloženy zkumavky s kalibrátory.

Následuje zadání požadavků na stanovení QC. Ty jsou vkládány do příslušných pozic v zelených stojáncích. Pokud jsou jejich výsledky akceptovatelné, lze začít s měřením vzorků pacientů. Možnosti vkládání stojánku se vzorky a odesílání výsledků do LIS jsou popsány v kapitole [2.3](#).

Po zadání povelu start, začne analyzátor s naprogramovanými procesy. Nejprve jsou stojánky se vzorky transportovány ke čtečkám čárových kódů a sensorům zkumavek. Dojde k identifikaci čísel stojánků, pozic se zkumavkami a jejich ID štítků (pokud jsou přítomny). Následně je stojánek posunut do místa, kde vzorková jehla provede nasátí naprogramovaného množství vzorku. Rameno s jehlou poté do příslušné měřicí kyvety napipetuje nasátý vzorek a jehla je následně promyta v proplachovacím zásobníku deionizovanou vodou zevnitř i zvenku. Stejným způsobem pracuje reagenční jehla, která pipetuje do této kyvety potřebné reagensie umístěné v chladicím prostoru. Kyveta, ve které probíhá reakce je umístěna v rotačním disku, kde je udržována konstantní teplota 37 °C. Reagenční směs v kyvetě je promíchána pomocí tyček s teflonovým povrchem, které jsou následně promyty. Fotometrické měření probíhá dle schématu znázorněného na obrázku č. 4. Halogenová žárovka vytváří světlo spojitého spektra, které prochází reagenční směsí v kyvetě. Prošlé světlo je poté na difrakční mřížce rozloženo na specifické vlnové délky, jejichž intenzitu záření měří pole křemíkových fotodiód. Měření je prováděno v 18sekundových intervalech po celou dobu reakce (celkem 28 měřících bodů). Pro výpočet koncentrace jsou použity hodnoty v intervalech a vlnových délkách nadefinovaných ve specifických parametrech testů. Po dokončení fotometrických měření je obsah kyvety jednotkou mycích trysek odsán a kyveta je následně promyta a vysušena.

Všechny čtyři použité metody využívají dvoukrokovou analýzu typu end-point. Její průběh je znázorněn na obrázku č. 9, který ukazuje stanovení oxalátů (při stanovení citrátů dochází po přidání startovacího roztoku k poklesu optické denzity). Tabulky č. 4 a 5 ukazují jednotlivé parametry měření všech čtyř metod, které jsou naprogramovány do analyzátoru (viz kapitola [2.4](#)). Nejprve je dávkována reagensie R<sub>1</sub> a poté vzorek. Vzorkem je při měření blanku deionizovaná H<sub>2</sub>O nebo nulový kalibrátor a při kalibraci jím je standard s deklarovanou hodnotou analytu. Po inkubaci v měřícím bodě 10 analyzátor zaznamená optickou denzitu OD<sub>1</sub> této směsi. Následně je nadávkována reagensie R<sub>2</sub>, která odstartuje samotnou reakci. V měřícím bodě 27 analyzátor zaznamená hodnotu OD<sub>2</sub>. Výsledná koncentrace (C) vzorku nebo QC je vypočtena dle vzorce:

$$C \text{ vzorku} = C \text{ standardu} \cdot \frac{(OD1 - OD2)_{\text{vzorku}} - (OD1 - OD2)_{\text{blanku}}}{(OD1 - OD2)_{\text{standardu}} - (OD1 - OD2)_{\text{blanku}}}$$



Obrázek 9: Průběh měření dvoukrokové analýzy metodou end-point

Zdroj: uživatelská příručka k analyzátoru AU480 firmy Beckman Coulter

Legenda k obrázku č. 9:

R<sub>1</sub>: Dávkování reagensie R<sub>1</sub>

R<sub>2</sub>: Dávkování reagensie R<sub>2</sub>

S : Dávkování vzorku

Pz: Hodnota OD před dávkováním reagensie R<sub>2</sub>

Px: Hodnota OD po dávkování reagensie R<sub>2</sub>

Tabulka 4: Základní parametry měření použitých metod

	Citrát INstruchemie	Citrát LTA	Oxalát INstruchemie	Oxalát LTA
Dávkování reagentu 1 (μl)	170 (170)	250 (1000)	170 (170)	100 (1000)
Dávkování vzorku (μl)	3,4 (3,4)	6,3 (25)	34 (34)	5 (50)
Inkubace (min)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (X)
Dávkování reagentu 2 (μl)	34 (34)	10 (25)	34 (34)	10 (100)
Inkubace (min)	5 (5)	5 (10)	5 (5)	5 (10)
Měřicí bod 1	27 (27)	27 (X)	27 (27)	27 (X)
Měřicí bod 2	10 (10)	10 (X)	10 (10)	10 (X)

Tabulka 5: Další parametry měření použitých metod

	Citrát INstruchemie	Citrát LTA	Oxalát INstruchemie	Oxalát LTA
Vlnová délka primární (nm)	340 (340)	340 (340)	600 (600)	600 (580–600)
Vlnová délka sekundární (nm)	700 (700)	700 (X)	700 (700)	700 (X)
Tloušťka kyvety (mm)	5 (5)	5 (10)	5 (5)	5 (10)
Sklon reakce	–	–	+	+
Limit detekce (mmol/l)	0,05	0,10	0,024	X
Rozsah měření (mmol/l)	8,00	2,10	1,50	1,00

Vysvětlení k tabulce:

Údaje před závorkou byly naprogramovány do analyzátoru AU480 s výjimkou tloušťky kyvet, což je daná vlastnost. Údaje v závorce jsou uvedeny ve firemních příbalových listech metody v rámci validovaného postupu. K odklonění od postupu došlo z důvodu konstrukčních omezení analyzátoru AU480 (podrobnosti viz kapitola [4.1](#)). Značka X znamená, že v příbalovém listu metody tento údaj nebyl uveden.

Poznámka k metodě stanovení oxalátů metodou firmy LTA:

Metoda stanovení oxalátů od firmy LTA je dle návodu kalibrována pomocí samotného kalibrátoru bez úpravy a ředění. Kontrolní a patientské vzorky jsou smíchány s roztokem pro ředění vzorků v poměru 1 : 1 a následně přelity do purifikačních zkumavek s aktivním uhlím. Výsledky měření tak musí být vynásobeny dvakrát. Toho lze u analyzátoru AU480 dosáhnout naprogramováním tzv. vypočtené metody, kdy analyzátor naměřené hodnoty vynásobí automaticky.

## 2.7 Postanalytická část stanovení citrátů a oxalátů v moči

Naměřené hodnoty citrátů a oxalátů ve vzorcích moče analyzátor odešle do LIS. Poté laborant v programu FONS Openlims zkontroluje a potvrdí tyto výsledky. Program následně vypočte z těchto naměřených hodnot analytů jejich odpad do moče tak, že je vynásobí diurézou moče za 24 hodin. V případě dodání jednorázové moče provede výpočet indexu analyt/kreatinin (index analyt/kreatinin je vypočítán i u sbírané moče za 24 hodin). Vypočítané hodnoty jsou porovnány s jejich referenčním rozmezím a případnými předchozími výsledky. Nakonec jsou tyto konečné výsledky odeslány do NIS, kde je má k dispozici ošetřující lékař.

### 3. Výsledky

#### 3.1 Vyzkoušení metod výrobců INstruchemie a LTA

Pro vyzkoušení metod od obou výrobců jsme použili kontroly od obou výrobců. Od firmy INstruchemie se jedná o Normal Level (šarže 50260617) a High Level (šarže 51051217) a od firmy LTA jsme použili hladiny Control 1 a Control 2 (šarže G011.194). Každou hladinu jsme změřili 5krát. Následně jsme změřili pět náhodně vybraných vzorků od pacientů použitých na vyšetření chemické (semikvantitativní) a močového sedimentu.

Tabulka 6: Stanovení citrátů v moči – porovnání výsledků QC metodou od INstruchemie

Číslo měření	INstruchemie		LTA	
	Normal level (0,510 mmol/l)	High level (5,930 mmol/l)	Control 1 (0,572 mmol/l)	Control 2 (4,217 mmol/l)
1.	0,502	6,172	0,519	4,193
2.	0,484	5,967	0,539	4,050
3.	0,477	6,171	0,561	4,123
4.	0,523	6,034	0,561	4,101
5.	0,493	5,753	0,571	4,297
<b>AM</b>	<b>0,496</b>	<b>6,019</b>	<b>0,550</b>	<b>4,153</b>
<b>SD</b>	<b>0,016</b>	<b>0,155</b>	<b>0,019</b>	<b>0,085</b>
<b>b</b>	<b>-0,028</b>	<b>0,015</b>	<b>-0,038</b>	<b>-0,015</b>

Tabulka 7: Stanovení citrátů v moči – porovnání výsledků QC metodou od LTA

Číslo měření	LTA		INstruchemie	
	Control 1 (0,572 mmol/l)	Control 2 (4,217 mmol/l)	Normal level (0,510 mmol/l)	High level (5,930 mmol/l)
1.	0,578	4,364	0,540	6,220
2.	0,566	4,273	0,502	6,032
3.	0,521	4,110	0,490	5,915
4.	0,504	4,011	0,524	6,103
5.	0,553	4,173	0,531	6,174
<b>AM</b>	<b>0,544</b>	<b>4,186</b>	<b>0,517</b>	<b>6,089</b>
<b>SD</b>	<b>0,028</b>	<b>0,123</b>	<b>0,019</b>	<b>0,108</b>
<b>b</b>	<b>-0,048</b>	<b>-0,007</b>	<b>0,015</b>	<b>0,027</b>



Tabulka 8: Stanovení oxalátů v moči – porovnání výsledků QC metodou od INstruchemie

Číslo měření	INstruchemie		LTA	
	Normal level (0,174 mmol/l)	High level (0,415 mmol/l)	Control 1 (0,284 mmol/l)	Control 2 (0,941 mmol/l)
1.	0,189	0,424	0,285	0,939
2.	0,163	0,395	0,297	0,929
3.	0,188	0,408	0,306	0,977
4.	0,186	0,391	0,315	1,003
5.	0,171	0,414	0,292	0,944
<b>AM</b>	<b>0,179</b>	<b>0,406</b>	<b>0,299</b>	<b>0,958</b>
<b>SD</b>	<b>0,010</b>	<b>0,012</b>	<b>0,011</b>	<b>0,028</b>
<b>b</b>	<b>0,031</b>	<b>-0,021</b>	<b>0,053</b>	<b>0,018</b>

Tabulka 9: Stanovení oxalátů v moči – porovnání výsledků QC metodou od LTA

Číslo měření	LTA		INstruchemie	
	Control 1 (0,284 mmol/l)	Control 2 (0,941 mmol/l)	Normal level (0,174 mmol/l)	High level (0,415 mmol/l)
1.	0,220	0,807	0,113	0,428
2.	0,284	1,004	0,162	0,324
3.	0,254	0,699	0,152	0,436
4.	0,184	0,716	0,100	0,288
5.	0,212	0,690	0,124	0,310
<b>AM</b>	<b>0,231</b>	<b>0,783</b>	<b>0,130</b>	<b>0,357</b>
<b>SD</b>	<b>0,035</b>	<b>0,118</b>	<b>0,023</b>	<b>0,062</b>
<b>b</b>	<b>-0,187</b>	<b>-0,168</b>	<b>-0,252</b>	<b>-0,139</b>

### ***3.2 Verifikace stanovení citrátů a oxalátu metodou INstruchemie***

Pro stanovení citrátů a oxalátů v moči na pracovišti ÚKBH FN Plzeň byly vybrány metody od firmy INstruchemie. Důvody vedoucí k tomuto rozhodnutí jsou shrnuty v kapitole [4.1](#). Obě metody byly verifikovány dle postupu popsaneho v řízeném dokumentu ÚKBH FN Plzeň – Validace a verifikace biochemie. Tento dokument byl vypracován vrchním analytikem na základě *Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích* (Friedecký et al., 2011) od České společnosti klinické biochemie. Provedli jsme měření opakovatelnosti, mezilehlé preciznosti, pracovního rozsahu a výtěžnosti (jako alternativa bias).

#### ***3.2.1 Opakovatelnost***

Doporučení pro stanovení preciznosti za podmínky opakovatelnosti je uvedeno v kapitole [1.6.1](#). Pro stanovení opakovatelnosti citrátů byly vybrány obě hladiny kontrol od firmy INstruchemie – Normal Level (šarže 50260617), High Level (šarže 51051217) a referenční roztok kyseliny citronové o koncentraci 2,500 mmol/l, který jsme připravili v laboratoři z referenčního standardu v čistém stavu (postup přípravy popsán v kapitole [2.1.4](#)). Pro stanovení opakovatelnosti oxalátů byly vybrány obě hladiny kontrol od firmy INstruchemie – Normal Level (šarže 50260617), High Level (šarže 51051217) a hladina Control 2 (šarže G011.194) od firmy LTA. U všech kontrol obou metod jsem provedl stanovení v sériích po 10 měření (jako jeden operátor). Z výsledků jsme vypočetli průměrnou hodnotu, směrodatná odchylku a variační koeficient.

Tabulka 10: Výsledky preciznosti stanovení citrátů za podmínky opakovatelnosti

Číslo měření	INstruchemie Normal level (0,510 mmol/l)	Referenční roztok kyseliny citronové (2,50 mmol/l)	INstruchemie High level (5,930 mmol/l)
1.	0,482	2,547	5,958
2.	0,541	2,567	5,866
3.	0,504	2,555	5,880
4.	0,546	2,530	5,920
5.	0,532	2,534	5,876
6.	0,520	2,583	5,869
7.	0,507	2,574	5,878
8.	0,490	2,512	5,902
9.	0,467	2,572	5,867
10.	0,527	2,540	5,923
<b>AM</b>	0,512	2,551	5,894
<b>SD</b>	<b>0,026</b>	<b>0,023</b>	<b>0,031</b>
<b>CV %</b>	<b>5,123</b>	<b>0,891</b>	<b>0,524</b>

Tabulka 11: Výsledky preciznosti stanovení oxalátů za podmínky opakovatelnosti

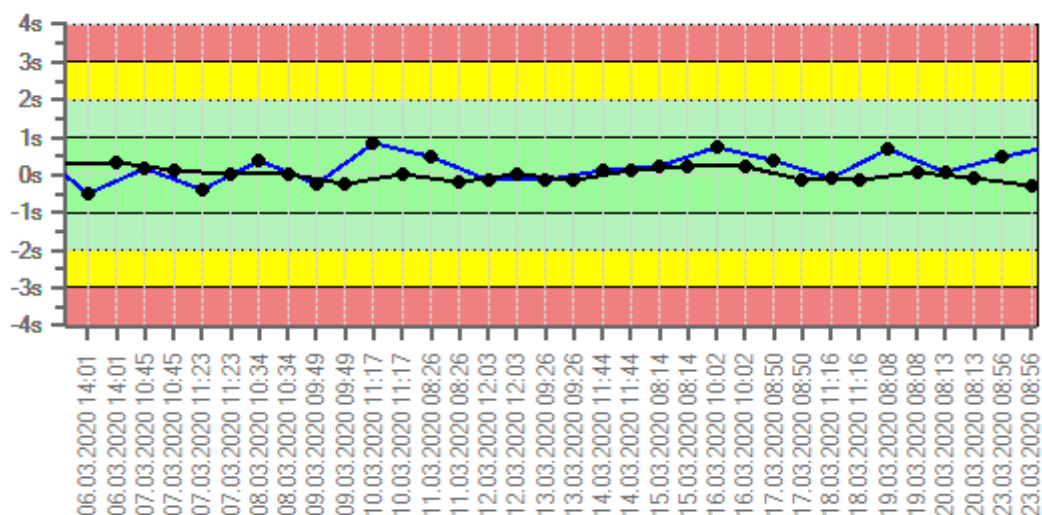
Číslo měření	INstruchemie Normal level (0,174 mmol/l)	INstruchemie High level (0,415 mmol/l)	LTA Control 2 (0,941 mmol/l)
1.	0,168	0,429	0,946
2.	0,175	0,392	0,936
3.	0,160	0,423	0,951
4.	0,159	0,409	0,958
5.	0,179	0,391	0,945
6.	0,171	0,430	0,967
7.	0,185	0,377	0,948
8.	0,172	0,381	0,950
9.	0,166	0,419	0,919
10.	0,169	0,431	0,957
<b>AM</b>	0,170	0,408	0,948
<b>SD</b>	<b>0,008</b>	<b>0,021</b>	<b>0,013</b>
<b>CV %</b>	<b>4,696</b>	<b>5,188</b>	<b>1,386</b>

### 3.2.2 Mezilehlá preciznost

Doporučení pro stanovení mezilehlé preciznosti je uvedeno v kapitole [1.6.2](#). Pro stanovení mezilehlé preciznosti byly použity stejné kontrolní materiály jako u opakovatelnosti. Měřili jsme po dobu zhruba dvou měsíců, vždy maximálně jedno měření denně pro každou hladinu kontroly. V průběhu měření mezilehlé preciznosti byla přibližně každý týden provedena recalibrace u obou metod a každých 14 dní byl připraven nový startovací roztok. Od každé kontroly jsme během této doby postupně získali 20 výsledků, ze kterých jsme vypočetli průměrnou hodnotu, směrodatnou odchylku a variační koeficient.

Tabulka 12: Výsledky měření mezilehlé preciznosti stanovení citrátů

Číslo měření	INstruchemie Normal level (0,510 mmol/l)	Referenční roztok kyseliny citronové (2,50 mmol/l)	INstruchemie High level (5,930 mmol/l)
1.	0,567	2,542	6,156
2.	0,477	2,547	6,171
3.	0,523	2,599	6,034
4.	0,482	2,600	5,935
5.	0,536	2,607	5,963
6.	0,493	2,491	5,753
7.	0,570	2,471	5,946
8.	0,545	2,473	5,811
9.	0,502	2,517	5,945
10.	0,501	2,438	5,841
11.	0,518	2,474	6,037
12.	0,528	2,450	6,098
13.	0,563	2,505	6,089
14.	0,505	2,576	5,850
15.	0,558	2,491	5,822
16.	0,514	2,550	5,976
17.	0,545	2,557	5,876
18.	0,566	2,589	5,739
19.	0,542	2,556	5,462
20.	0,507	2,501	5,672
<b>AM</b>	0,527	2,527	5,909
<b>SD</b>	<b>0,029</b>	<b>0,053</b>	<b>0,174</b>
<b>CV %</b>	<b>5,559</b>	<b>2,083</b>	<b>2,947</b>

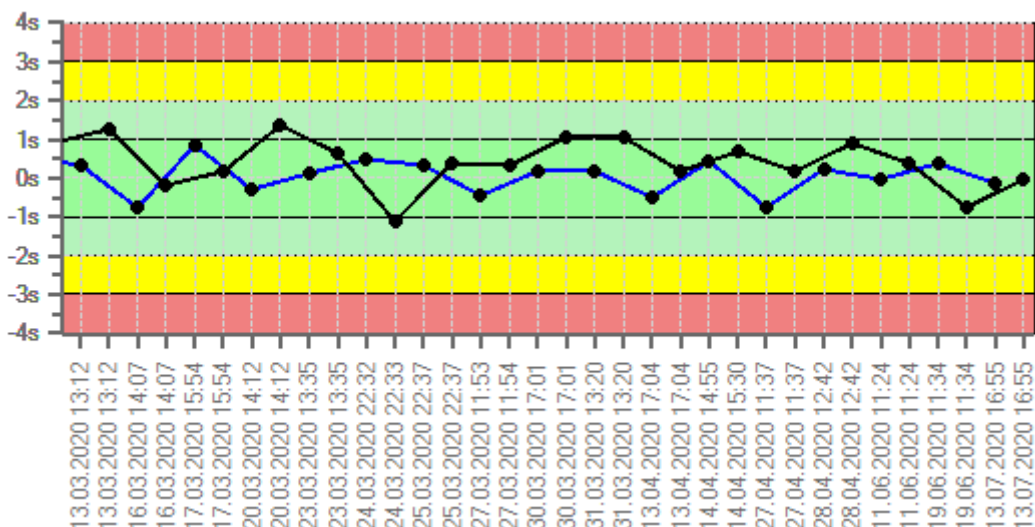


Obrázek 10: Levey-Jenningsův graf měření citrátů QC Normal a High Level

Zdroj: Printscreen z programu FONS Openlims

Tabulka 13: Výsledky měření mezilehlé preciznosti stanovení oxalátů

Číslo měření	INstruchemie Normal level (0,174 mmol/l)	INstruchemie High level (0,415 mmol/l)	LTA Control 2 (0,941 mmol/l)
1.	0,182	0,422	0,952
2.	0,180	0,413	0,874
3.	0,189	0,437	0,876
4.	0,182	0,446	1,037
5.	0,155	0,411	0,897
6.	0,195	0,420	0,939
7.	0,167	0,449	0,978
8.	0,177	0,431	0,985
9.	0,186	0,387	0,937
10.	0,182	0,425	0,944
11.	0,163	0,423	0,872
12.	0,178	0,442	0,991
13.	0,178	0,422	0,968
14.	0,162	0,420	0,926
15.	0,185	0,433	0,940
16.	0,155	0,420	0,952
17.	0,180	0,437	1,013
18.	0,174	0,425	0,919
19.	0,184	0,396	0,929
20.	0,171	0,414	0,922
<b>AM</b>	<b>0,176</b>	<b>0,424</b>	<b>0,943</b>
<b>SD</b>	<b>0,011</b>	<b>0,015</b>	<b>0,045</b>
<b>CV %</b>	<b>6,215</b>	<b>3,633</b>	<b>4,731</b>



Obrázek 11: Levey-Jenningsův graf měření oxalátů QC Normal a High Level

Zdroj: Printscreen z programu FONS Openlims

### 3.2.3 Výtěžnost

Postup k provádění výtěžnosti a jejího výpočtu je popsán v kapitole [1.6.4](#). Pro stanovení výtěžnosti jsme vybrali pět patientských vzorků močí (pro každou metodu vzorky od jiných pacientů). Jako přídavky sloužily vodné roztoky šťavelanu sodného ( $c = 1,000 \text{ mmol/l}$ ) a kyseliny citronové ( $c = 4,000 \text{ mmol/l}$ ). Roztoky jsme připravili z čistých referenčních materiálů od firmy Sigma-Aldrich (příprava obou roztoků je popsána v kapitole [2.1.4](#)). Vzorky a přídavky byly vybrány na základě úvahy popsané v kapitole [4.2.1](#). Koncentrace přídavků kyseliny citronové a šťavelanu sodného v jejich směsích se vzorky jsme vypočetli dle vzorce uvedeného v kapitole [1.6.4](#) – koncentrace přídavku kyseliny citronové byla vypočtena na  $0,400 \text{ mmol/l}$  a koncentrace přídavku šťavelanu sodného na  $0,100 \text{ mmol/l}$ .

Poznámka: Vzorky močí s přídavky určené k měření výtěžnosti oxalátů prošly preanalytickým postupem popsaným v kapitole [2.5.2.2](#). Přičemž k přidání standardního roztoku šťavelanu sodného a destilované  $\text{H}_2\text{O}$  do vzorků močí došlo až po úpravě pH vzorků zpět na neutrální hladinu.

Tabulka 14: Výtěžnosti citrátů u jednotlivých vzorků

<b>Vzorek č. 1</b>	Vzorek 1 A	Vzorek 1 B
Měření č. 1	2,096	1,683
Měření č. 2	2,068	1,650
Ø měření	2,082	1,667
Rozdíl ØA a ØB	<b>0,416</b>	
<b>Vzorek č. 2</b>	Vzorek 2 A	Vzorek 2 B
Měření č. 1	1,032	0,614
Měření č. 2	1,028	0,595
Ø měření	1,030	0,605
Rozdíl ØA a ØB	<b>0,426</b>	
<b>Vzorek č. 3</b>	Vzorek 3 A	Vzorek 3 B
Měření č. 1	0,851	0,417
Měření č. 2	0,846	0,429
Ø měření	0,849	0,423
Rozdíl ØA a ØB	<b>0,426</b>	
<b>Vzorek č. 4</b>	Vzorek 4 A	Vzorek 4 B
Měření č. 1	1,223	0,802
Měření č. 2	1,262	0,809
Ø měření	1,243	0,806
Rozdíl ØA a ØB	<b>0,437</b>	
<b>Vzorek č. 5</b>	Vzorek 5 A	Vzorek 5 B
Měření č. 1	2,833	2,379
Měření č. 2	2,830	2,451
Ø měření	2,832	2,415
Rozdíl ØA a ØB	<b>0,417</b>	

Tabulka 15: Výtěžnost citrátů – souhrn

Číslo vzorku	Rozdíl ØA a ØB D	Konc. přídatku C	Výtěžnost (%) R
1.	0,416	0,400	104,000
2.	0,426	0,400	106,500
3.	0,426	0,400	106,500
4.	0,437	0,400	109,250
5.	0,417	0,400	104,250
<b>Ø</b>	<b>0,424</b>	<b>0,400</b>	<b>106,100</b>

Tabulka 16: Výtěžnosti oxalátů u jednotlivých vzorků

<b>Vzorek č. 1</b>	Vzorek 1 A	Vzorek 1 B
Měření č. 1	0,331	0,240
Měření č. 2	0,335	0,234
Ø měření	0,333	0,237
Rozdíl ØA a ØB	<b>0,096</b>	
<b>Vzorek č. 2</b>	Vzorek 2 A	Vzorek 2 B
Měření č. 1	0,179	0,080
Měření č. 2	0,171	0,082
Ø měření	0,175	0,081
Rozdíl ØA a ØB	<b>0,094</b>	
<b>Vzorek č. 3</b>	Vzorek 3 A	Vzorek 3 B
Měření č. 1	0,204	0,111
Měření č. 2	0,200	0,112
Ø měření	0,202	0,112
Rozdíl ØA a ØB	<b>0,091</b>	
<b>Vzorek č. 4</b>	Vzorek 4 A	Vzorek 4 B
Měření č. 1	0,419	0,323
Měření č. 2	0,413	0,324
Ø měření	0,416	0,324
Rozdíl ØA a ØB	<b>0,093</b>	
<b>Vzorek č. 5</b>	Vzorek 5 A	Vzorek 5 B
Měření č. 1	0,490	0,393
Měření č. 2	0,480	0,398
Ø měření	0,485	0,396
Rozdíl ØA a ØB	<b>0,090</b>	

Tabulka 17: Výtěžnost oxalátů – souhrn

Číslo vzorku	Rozdíl ØA a ØB D	Konc. Přídavku C	Výtěžnost (%) R
1.	0,096	0,100	96,000
2.	0,094	0,100	94,000
3.	0,091	0,100	91,000
4.	0,093	0,100	93,000
5.	0,090	0,100	90,000
<b>Ø</b>	<b>0,0928</b>	<b>0,100</b>	<b>92,800</b>



### 3.2.4 Pracovní rozsah

Postup k provádění pracovního rozsahu byl popsán v kapitole [1.6.5](#) na základě *Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích* (Friedecký et al., 2011). Pro měření pracovního rozsahu metody na stanovení citrátu v moči jsme použili jednotlivé patientské vzorky (důvod je popsán v kapitole [4.2.4](#)) s výjimkou nízké hladiny u oxalátů. Jako vzorek s nízkou hladinou L jsme použili moč od 18letého pacienta o koncentraci 0,20 mmol/l, kterou jsme následně naředili destilovanou H<sub>2</sub>O v poměru 1 : 1. Jako vzorek s vysokou hladinou H jsme použili moč od 80leté pacientky, jejíž výsledná hodnota po naředění 1 : 1 byla 10,75 mmol/l. Tento vzorek, protože se nachází mimo oblast pracovního rozsahu, jsme naředili vzorkem moče s běžnou koncentrací citrátu tak, aby jeho koncentrace byla přibližně 7,90 mmol/l. Pro výpočet byla použita směšovací rovnice, dostupná online na <https://www.labo.cz/mft/koncentraci.php>.

Pro měření pracovního rozsahu metody na stanovení oxalátů v moči byl jako vzorek s nízkou hladinou L použita směs močí, jejíž výslednou koncentraci jsme vypočetli a zaokrouhlili na 0,08 mmol/l. Jako vzorek s vysokou hladinou H jsme použili moč, získanou od autora této bakalářské práce, který během 12hodin zkonsumoval větší množství potravin bohatých na oxaláty. Získaná moč měla koncentraci oxalátů 0,790 mmol/l. Tuto moč jsme dále zahustili odpařováním a následně změřili její koncentraci v tripletu. Průměr těchto hodnot jsme zaokrouhlili na 1,20 mmol/l.

Následný postup byl společný pro citráty i oxaláty. Smícháním vzorků L a H podle tabulky č. 18 vznikly další tři vzorky s vzestupnou koncentrací analytu. V případě oxalátů jsme vzorky připravovali již v acidifikovaném stavu. Užitím směšovací rovnice jsme vypočetli teoretické koncentrace těchto vzorků. Všech pět vzorků jsme následně změřili standardním postupem v tripletu.

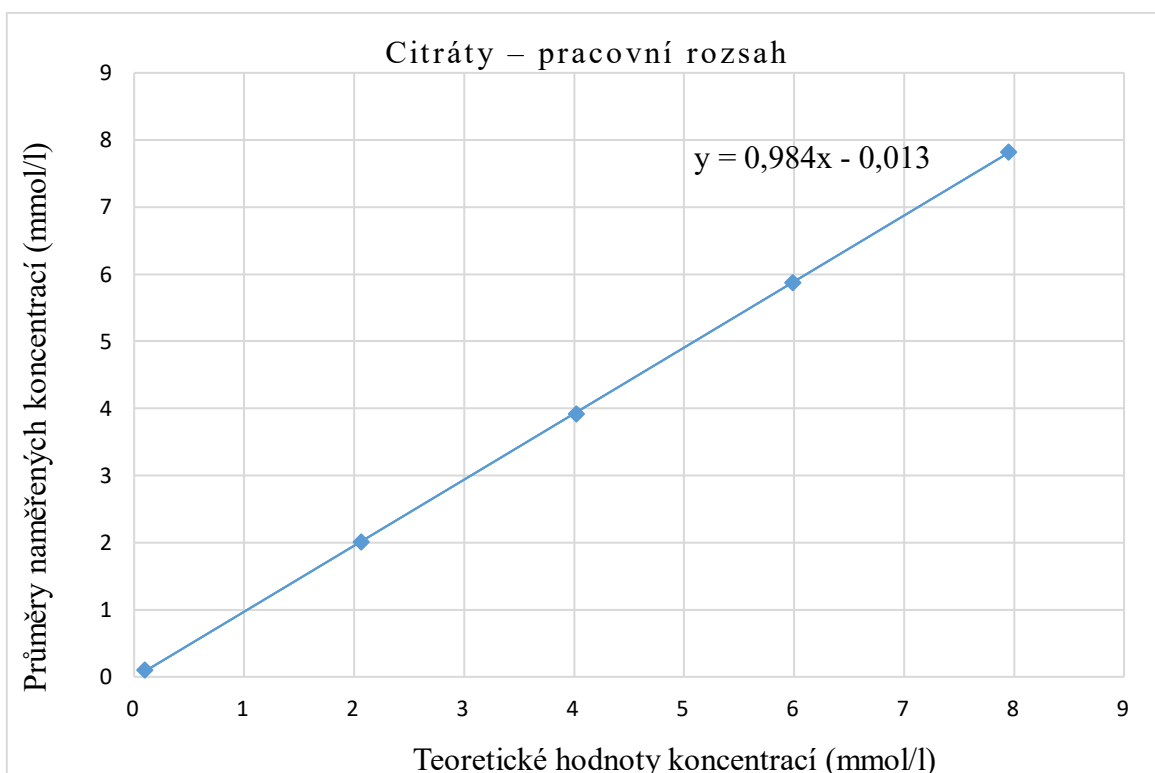
*Tabulka 18: Příprava vzorků pracovního rozsahu*

Vzorek číslo	Složení vzorku
1.	L
2.	3L + 1H
3.	2L + 2H
4.	1L + 3H
5.	H

Na závěr jsem v programu Microsoft Excel vytvořil grafy (metodou lineární regrese) ve kterých lze vyhodnotit závislost průměrů naměřených hodnot (osa y) na teoretických známých (osa x). Z grafů jsem odečetl hodnoty směrnice a úseků přímek. Pomocí excelové tabulky jsem také vypočítal hodnoty korelačních koeficientů.

Tabulka 19: Výsledky měření pracovního rozsahu citrátů a teoretických hodnot

Číslo vzorku	1. měření (mmol/l)	2. měření (mmol/l)	3. měření (mmol/l)	Ø měření (mmol/l)	Teoretická hodnota (mmol/l)
1.	0,077	0,109	0,117	0,101	0,100
2.	2,016	2,027	1,997	2,013	2,065
3.	3,944	3,935	3,898	3,926	4,025
4.	5,866	5,905	5,852	5,874	5,988
5.	7,717	7,856	7,899	7,824	7,950



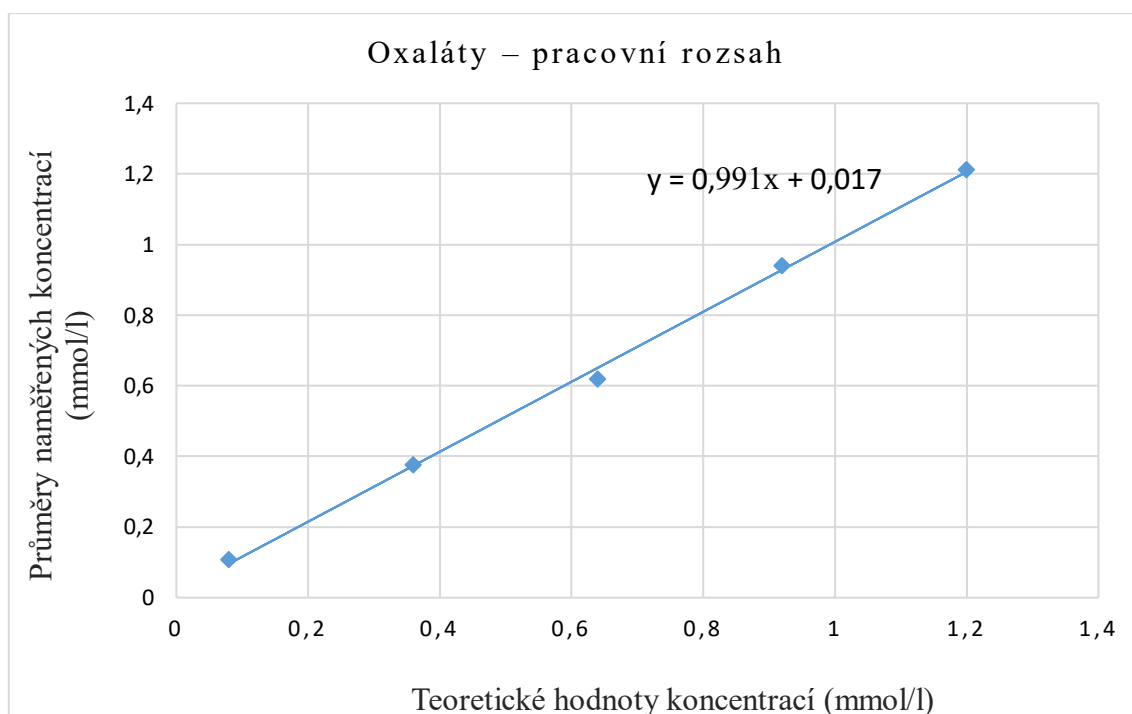
Obrázek 12: Graf závislosti průměrů naměřených hodnot citrátů na teoretických.

Odečtené hodnoty z tabulky a grafu pracovního rozsahu:

Korelační koeficient	1,000
Směrnice přímky	0,984
Úsek přímky	-0,013

Tabulka 20: Výsledky měření pracovního rozsahu oxalátů a teoretických hodnot

Číslo vzorku	1. měření (mmol/l)	2. měření (mmol/l)	3. měření (mmol/l)	Ø měření (mmol/l)	Teoretická hodnota (mmol/l)
1.	0,108	0,111	0,104	0,108	0,080
2.	0,368	0,380	0,379	0,376	0,360
3.	0,619	0,603	0,635	0,619	0,640
4.	0,870	1,016	0,933	0,940	0,920
5.	1,163	1,262	1,214	1,213	1,200



Obrázek 13: Graf závislosti průměrů naměřených hodnot oxalátů na teoretických.

Odečtené hodnoty z tabulky a grafu pracovního rozsahu:

Korelační koeficient	1,000
Směrnice přímky	0,984
Úsek přímky	-0,013

### 3.2.5 Výpočet nejistot měření

Dle dokumentu *Doporučení k výpočtu nejistot kvantitativních výsledků měření v klinických laboratořích* (kolektiv autorů, 2014), pokud nejsou k dispozici výše zmíněné referenční materiály, lze jako hodnotu absolutní nejistoty výsledku ( $u_{c,abs}$ ) použít směrodatnou odchylku ( $SD$ ) mezilehlé preciznosti a jako hodnotu relativní nejistoty výsledku ( $u_{c,rel}$ ) lze použít variační koeficient ( $CV$ ) mezilehlé preciznosti. Při výpočtu kombinované nejistoty  $U_{c,rel}$  byl použit koeficient rozšíření o hodnotě 2. Hodnoty tímto způsobem vypočtených nejistot jsou uvedeny v tabulkách č. 21 a 22.

Tabulka 21: Hodnoty nejistot stanovení citrátů na základě mezilehlé preciznosti

Materiál	Koncentrace (mmol/l)	$u_{c,abs}$ (mmol/l)	$u_{c,rel}$ (%)	$U_{c,abs}$ (mmol/l)	$U_{c,rel}$ (%)
Normal Level INstruchemie	0,510	0,029	5,56	0,058	11,12
High Level INstruchemie	5,930	0,174	2,95	0,348	5,89
Referenční O kys. citronové	2,500	0,053	2,08	0,106	4,17

Tabulka 22: Hodnoty nejistot stanovení oxalátů na základě mezilehlé preciznosti

Materiál	Koncentrace (mmol/l)	$u_{c,abs}$ (mmol/l)	$u_{c,rel}$ (%)	$U_{c,abs}$ (mmol/l)	$U_{c,rel}$ (%)
Normal Level INstruchemie	0,174	0,011	6,22	0,022	12,43
High Level INstruchemie	0,415	0,015	3,63	0,030	7,27
Control 2 LTA	0,941	0,045	4,73	0,090	9,46

My jsme ale pro výpočet nejistot zvolili postup, kde započítáváme výtěžnost měření místo bias. Jako pomůcku jsme zvolili Excelový soubor 2014\_nejistota\_vypocet.xlsx, dostupný z: [https://www.sekk.cz/infoservis/2014\\_nejistota\\_vypocet.xlsx](https://www.sekk.cz/infoservis/2014_nejistota_vypocet.xlsx). Ten obsahuje následující vzorec pro kombinovanou nejistotu  $U_{c,rel}$ :

$$U_{c,rel} = \sqrt{\left(2 \cdot \sqrt{u_{MPM,rel}^2 + u_{ref,rel}^2 + u_{xp,rel}^2}\right)^2 + b_{rel}^2}$$

Kde:

$u_{MPM,rel}$  ... nejistota měření z mezilehlé preciznosti (%)

$u_{ref,rel}$  ... nejistota referenčního materiálu (%)

$u_{xp,rel}$  ... nejistota průměru měření referenčního materiálu (%)

$b_{rel}$  ... bias relativní (%)

Bias byl vypočten z výtěžnosti  $R$  pomocí vzorce:

$$b_{rel} = R - 100$$

Výpočet zahrnuje nejistotu referenčního materiálu  $u_{ref,rel}$  použitého na přípravu standardních přídávků. Výrobce Sigma-Aldrich uvádí relativní rozšířenou nejistotu pro standard citrátu  $U_{crm} = \pm 0,10$  % ( $k = 2$ ) a pro standard oxalátu  $U_{crm} = \pm 0,09$  % ( $k = 2$ ). Čistota těchto referenčních materiálů je 99,94 % u citrátu a 99,83 % u oxalátu, a proto byla při výpočtu zanedbána. Dále je k nejistotě referenčního materiálu přičtena nejistota analytických vah. Výrobce váhy Sartorius uvádí  $SD = 0,1$  mg. Pro navážku referenčního materiálu citrátu o  $m = 38,4$  mg byla spočtena relativní nejistota na 0,26 %. Pro navážku referenčního materiálu oxalátu o  $m = 26,8$  mg byla spočtena relativní nejistota na 0,37 %. Výsledné hodnoty  $u_{ref,rel}$  jsou uvedeny v tabulkách č. 23 a 24.

Tabulka 23: Hodnoty nejistot stanovení citrátů se započtením výtěžnosti a nejistoty referenčního materiálu

Složka $U_{c,rel}$	Velikost (%)		
	Normal Level INstruchemie	High Level INstruchemie	Referenční $\Theta$ kys. citronové
$u_{MPM,rel}$	5,56	2,95	2,08
$u_{ref,rel}$	0,31	0,31	0,31
$u_{xp,rel}$	0,90	0,90	0,90
$b_{rel}$	6,10	6,10	6,10
<b>Výsledný <math>U_{c,rel}</math></b>	<b>12,82</b>	<b>8,69</b>	<b>7,63</b>

Tabulka 24: Hodnoty nejistot stanovení oxalátů se započtením výtěžnosti a nejistoty referenčního materiálu

Složka $U_{c,rel}$	Velikost (%)		
	Normal Level INstruchemie	High Level INstruchemie	Control 2 LTA
$u_{MPM,rel}$	6,21	3,63	4,84
$u_{ref,rel}$	0,42	0,42	0,42
$u_{xp,rel}$	1,15	1,15	1,15
$b_{rel}$	- 7,20	- 7,20	- 7,20
<b>Výsledný <math>U_{c,rel}</math></b>	<b>14,57</b>	<b>10,52</b>	<b>12,32</b>

### 3.2.6 Verifikační protokoly

Verifikační protokoly (viz obrázky č. 14 a 15) jsme vytvořili pomocí programu SLP. Do protokolů jsme zanesli všechny potřebné údaje o použitých reagentech, QC, jaký byl použit analyzátor a jméno operátora. Zadali jsme hodnoty související s mezilehlou precizností (AM, SD a CV) a časový rozsah, ve kterém měření probíhalo. Do kolonek určených pro naměřené hodnoty bias jsme zadali hodnoty rozdílů koncentrací mezi vzorky s přídavkem referenčního roztoku a vzorky s přídavkem dest. H<sub>2</sub>O (tabulky č. 14 a 16). Program sám vypočítal jednotlivé výkonnostní parametry, které jsme zkontrolovali s parametry získanými pomocí programu MS Excel.

Do verifikačních protokolů se též zadávají hodnoty biologických variabilit intraindividuálních ( $CV_i$ ) a interindividuálních ( $CV_g$ ). Údaje o citrátech a oxalátech nová databáze Evropské společnosti klinické chemie a laboratorní medicíny EFLM (dostupná z: <https://biologicalvariation.eu>) zatím neobsahuje. Pro variability oxalátu jsme použili Westgardovu databázi biologických variabilit (dostupná z: <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>.) a článek *Problems in the metabolic evaluation of renal stone disease: audit of intra-individual variation in urine metabolites* (Anandaram et al., 2006) pro variability citrátu. Údaje o senzitivě, specifčnosti a ostatních znacích metody jsme nevyplňovali.





## Verifikační protokol: Verif. prot. ÚKBH\_B Loch Oxalát v moči AU480

Metoda: U Oxalát  
 Analyzátor: AU480  
 Vyhodnotil: Fejř Marřin  
 Datum: 23.07.2020

Název soupravy: Oxalate AUT reagent set enzymatic method  
 Výrobce: INstruchemie B.V  
 Katalogové říslo: 3098

### 1. Mezilehá preciznost

	Datum (od - do)	Použitý materiál	Počet hodnot	Průměr	SD	CV	CV výrobce
Vzorek 1	08.03.2020 - 13.07.2020	Oxalate/Oxalate Normal Level	20	0,176	0,011	6,250	9,580
Vzorek 2	08.03.2020 - 13.07.2020	Oxalate/Oxalate High Level	20	0,424	0,015	3,537	4,020
Vzorek 3	08.03.2020 - 13.07.2020	Control set Oxalic acid/Citric Acid	20	0,943	0,045	4,772	6,000

### 2. Opakovatelnost, bias

Provedl: Fejř Marřin  
 Datum: 15.06.2020  
 Použitý materiál: Vzorek A = Přidavek refoztoku do moře  
 Vzorek B =  
 Vzorek C =

Intraindividuální biologická variabilita ( $CV_i$ ) =	42,5
Interindividuální biologická variabilita ( $CV_g$ ) =	19,9
Celková biologická variabilita =	46,9
Přesnost odvozená z biologických variabilit ( $I_{bias}$ ) =	21,2
Bias odvozený z biologických variabilit ( $B_{bias}$ ) =	11,7
Celková chyba odvozená z biologických variabilit ( $TE_{bias}$ ) =	46,7

Výsledné hodnoty:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vzorek A	0,096	0,094	0,091	0,093	0,090					
hodnoty 11-20										
hodnoty 21-30										
hodnoty 31-40										
hodnoty 41-50										
Vzorek B										
hodnoty 11-20										
hodnoty 21-30										
hodnoty 31-40										
hodnoty 41-50										
Vzorek C										
hodnoty 11-20										
hodnoty 21-30										
hodnoty 31-40										
hodnoty 41-50										

Vyhodnocení:

	Vzorek A	Vzorek B	Vzorek C	Jednotky
Průměr	0,092			
Cilová hodnota	0,100			
Nejistota ref. materiálu	0,420			%
SD	0,002			
CV	2,572			%
CV výrobce	0,000			%
R(x)	92,800			%
b	-7,200			%

Cilová hodnota nejistoty (%):  
 Pramen:  
 Výsledek verifikace:

### 3. Kombinovaná nejistota

	$U_{i, cel}$ (%)	pro cilovou hodn.	Výsledek měření se pohybuje v tomto intervalu (při 95% intervalu spolehlivosti)	Kritická diference dvou následných měření (hodnota CD %)
Vzorek A	14,631	0,100	0,085 - 0,114	Vzorek A 92,9
Vzorek B				Vzorek B 118,1
Vzorek C				Vzorek C 118,5

### 4. Ostatní znaky metody:

### 5. Senzitivita, specifčnost:

### 6. Závěr:

Hodnota Dmax SEKK pro oxalát v moči není k dispozici. Vzhledem k požadavkům Dmax SEKK pro kreatinin v moči (21%) a vápník celkový v moči (18%) je velikost rozšířené relativní kombinované nejistoty vyhovující. Metoda je vhodná pro klinické použití.

Datum schválení: 23.07.2020  
 Platnost do: 23.07.2022  
 Schválil: V O S T R Ý Michal, PharmDr.

Obrázek 15: Verifikační protokol stanovení oxalátů v moči enzymatickou metodou

## 4. Diskuse

### 4.1 Vyzkoušení metod výrobců INstruchemie a LTA

Při porovnávání metod před zavedením do rutinního provozu v laboratoři se berou do úvahy hlediska analytická, provozní a ekonomická. Analytické hledisko znamená porovnání metod podle jejich preciznosti a přesnosti. Dále se porovnává pracovní rozsah metody s rozsahem předpokládaných výsledků u pacientů. Velmi důležité je z tohoto hlediska také to, zda je nutná validace metody, nebo stačí jen verifikace. Z provozního hlediska se hledí na náročnost přípravy reagensů a vzorků před analýzou. Dále se pak soustředí na stabilitu reagensů a logistiku. V logistice je z pohledu laboratoře nejdůležitější čas mezi objednáním a doručením reagensů do laboratoře. To je ovlivněno v případě zahraničních výrobců jejich vzdáleností nebo přítomností obchodního zastoupení či pobočky v České republice. Ekonomické hledisko, jak už z názvu vyplývá, se soustředí na cenu reagensů, pomocných roztoků a dopravy reagensů od výrobce či distributora do laboratoře.

#### 4.1.1 Metody na stanovení citrátů v moči

Metody od obou výrobců poskytují na biochemickém analyzátoru AU480 srovnatelné výsledky jak z pohledu přesnosti, tak preciznosti. Pracovní rozsah obou metod je rozdílný, zatímco metoda INstruchemie udává lineární průběh reakce až do koncentrace 8,00 mmol/l, tak metoda LTA udává pouze do 2,10 mmol/l. Vzhledem k předpokládaným výsledkům u pacientů (viz podkapitola [4.2.1](#)) by bylo nutné u metody LTA provádět častější opakování měření po naředění. Ohledně zavedení metod do provozu a nutnosti provedení verifikace nebo validace je stav následující. V případě INstruchemie stačí provést pouze verifikaci, protože firma uvádí postup pro stanovení na biochemickém analyzátoru AU5800. Tento přístroj patří do stejné rodiny jako AU480, a tedy používá stejné analytické procesy. Rozdíl mezi těmito analyzátory je ve velikosti kapacity stanovení za hodinu. Firma LTA uvádí pouze postup aplikovatelný na ruční či poloautomatické fotometry používající kyvety s délkou optické dráhy 10 mm (analyzátor AU480 má optickou dráhu kyvety 5 mm). Požadovaná délka inkubace reagenční směsi po přidání startovací reagensie (R<sub>2</sub>) je 10 minut, což je přes možné maximum na analyzátoru AU480 (5,4 minut). Z toho vyplývá nutnost validace v případě zavedení této metody na analyzátor AU480.

Metody od obou výrobců vyžadují ke stanovení čistou nativní moč. Příprava reagensů je u obou výrobců jednoduchá a rychlá. Problém představuje pouze objem připravovaného startreagentu ( $R_2$ ). V případě INstruchemie je tento objem 2,0 ml a pouze 0,5 ml u LTA, což je velmi málo s ohledem na takzvaný mrtvý objem (zbytek reagentu na dně lahvičky, který zůstane nezpracován). Udávaná stabilita reagensů při chladničkové teplotě je vyšší u metody firmy INstruchemie ( $R_1$  – 1 měsíc;  $R_2$  – 3 týdny) než u LTA ( $R_1$  – 10 dní;  $R_2$  – 24 hodin). Oba výrobci udávají stabilitu u reagensů zmražených na  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  (pouze jeden cyklus zmražení a rozmražení), ale podle našich zkušeností rozmražené reagensie od obou výrobců již nefungují.

Z pohledu logistiky má výhodu italská firma LTA, která má v České republice distributora (Gali s.r.o.). Reagensie tak mohou být dodány během několika dní a za nižší poštovné. Holandská firma INstruchemie zastoupení v České republice nemá, a tak doprava reagensů poštou trvá zhruba 14 dní. Reagensie na stanovení citrátů od firmy LTA mají nižší cenu než reagensie INstruchemie. Po zohlednění všech výše popsaných kritérií bylo rozhodnuto, že do rutinního provozu na ÚKBH ve FN Plzni bude zavedena metoda stanovení citrátů v moči od firmy INstruchemie. V případě, že by firma LTA zvětšila objem startreagentu na 2 ml v lahvičce a validovala metodu na analyzátor firmy Beckman Coulter, tak by představovala vhodnější volbu pro rutinní provoz naší laboratoře.

#### ***4.1.2 Metody na stanovení oxalátu v moči***

Metoda stanovení oxalátů v moči od firmy INstruchemie poskytuje na biochemickém analyzátoru AU480 dostatečně přesné a precizní výsledky. Metoda od firmy LTA na stejném analyzátoru vykazuje tendenci k vychýlení výsledků měření k nižším hodnotám. To může být způsobeno nutným odchýlením od postupu daného výrobcem při aplikaci na analyzátor AU480. Firma LTA uvádí postup aplikovatelný na ruční či poloautomatické fotometry používající kyvety s délkou optické dráhy 10 mm (analyzátor AU480 má optickou dráhu kyvety 5 mm). Požadovaná délka inkubace reagenční směsi po přidání startovací reagensie ( $R_2$ ) je 10 minut, což je přes možné maximum na analyzátoru AU480 (5,4 minut). Lze též předpokládat vliv preanalytického procesu s aktivním uhlím. Vzhledem k nemožnosti správné funkce metody od firmy LTA na AU480 jsme se rozhodli, že do rutinního provozu na ÚKBH ve FN Plzni bude zavedena metoda stanovení oxalátu v moči od firmy INstruchemie.

## 4.2 Verifikace metod na stanovení citrátů a oxalátů v moči

Verifikace metod na ÚKBH ve FN Plzeň se řídí dokumentem *Validace a verifikace biochemie* vypracovaným dle aktuálních doporučení České společnosti pro klinickou biochemii. To zahrnuje měření preciznosti za podmínek opakovatelnosti a mezilehlé preciznosti. Vzhledem k tomu, že referenční materiály jsou k dispozici pouze v čistém stavu, provedli jsme měření výtěžnosti. Na základě výsledků výtěžnosti a preciznosti jsme vypočítali nejistoty měření a kombinované nejistoty měření dle *Doporučení k výpočtu nejistot kvantitativních výsledků měření v klinických laboratořích* (kolektiv autorů, 2014). Provedli jsme také ověření pracovních rozsahů obou metod udávaných výrobcem. Nakonec jsme u obou metod vypracovali verifikační protokol.

### 4.2.1 Výběr použitých hladin QC a preciznost měření

Pro výběr vhodných hladin QC a referenčních roztoků je třeba přibližně znát očekávané hodnoty citrátů a oxalátů v samotných vzorcích moči u pacientů. Z hlediska metafylaxe urolitiázy má největší význam jejich odpad do moče. Referenční meze odpadu citrátu je  $> 2,50$  mmol/24h a v případě oxalátů  $< 0,50$  mmol/24h. Naměřené hodnoty ve vzorcích pacientů tak závisí na diuréze, kdy pacienti s urolitiázou by měli mít vyšší příjem tekutin. Tabulka č. 25 ukazuje, jak se mění vypočítaná hodnota odpadu do moče se stoupající diurézou při dané naměřené hodnotě analytu.

Tabulka 25: Vztah mezi diurézou a naměřenou hladinou analytů a jeho vliv na výsledný odpad do moče

Diuréza	Vypočtená hodnota odpadu do moče (mmol/24 h)			
	Citrát		Oxalát	
	Naměřeno 1,000 mmol/l	Naměřeno 2,000 mmol/l	Naměřeno 0,100 mmol/l	Naměřeno 0,300 mmol/l
500	0,500	1,000	0,050	0,150
750	0,750	1,500	0,075	0,230
1000	1,000	2,000	0,100	0,300
1250	1,250	2,500	0,125	0,380
1500	1,500	3,000	0,150	0,450
2000	2,000	4,000	0,200	0,600
3000	3,000	6,000	0,300	0,900

Lze ale také použít přepočítání na index analyt/kreatinin u jednorázových vzorků moči. Toho je využíváno zejména u dětí a pacientů, kteří nejsou schopni provést 24hodinový sběr moče. Referenční meze obou indexů ukazuje tabulka č. 27. Tabulka č. 26 ukazuje, jak se mění tento index se stoupající hladinou kreatininu.

Tabulka 26: Vztah mezi naměřenou hodnotou analytů a kreatininu

	Vypočtená hodnota poměru analyt/kreatinin (mmol/mmol)			
	Citrát		Oxalát	
Kreatinin v moči (mmol/l)	Naměřeno 1,500 mmol/l	Naměřeno 3,000 mmol/l	Naměřeno 0,300 mmol/l	Naměřeno 0,500 mmol/l
0,50	3,000	6,000	0,600	1,000
1,00	1,500	3,000	0,300	0,500
2,00	0,750	1,500	0,150	0,250
4,00	0,375	0,750	0,075	0,125
6,00	0,250	0,500	0,050	0,083
10,00	0,150	0,300	0,030	0,050
14,00	0,107	0,214	0,021	0,036
18,00	0,083	0,167	0,017	0,028
22,00	0,068	0,136	0,014	0,023
26,00	0,058	0,115	0,012	0,019

Tabulka 27: Referenční meze indexu citrát/kreatinin a oxalát/kreatinin u dětí

Věk	Referenční rozmezí (mol/mol)	
	Citrát	Oxalát
< 5 let	> 0,25	–
> 5 let	> 0,15	–
< 6 měsíců	–	< 0,36
6 měsíců – 2 roky	–	< 0,17
2–5 let	–	< 0,10
5–14 let	–	< 0,07
> 14 let	–	< 0,04

Zdroj: *Diagnostic examination of the child with urolithiasis or nephrocalcinosis (Hope, Kemper, 2010)*

Na údajích v tabulce č. 25 je vidět, že při vysoké diuréze i menší naměřená hodnota analytu v moči může znamenat patologicky zvýšený odpad do moče. U pacientů, kteří dodržují doporučený zvýšený příjem tekutin, se dá očekávat zvýšená diuréza, a tedy nižší hodnoty citrátů a oxalátů. Naměřené hodnoty ve vzorku sbírané moče za 24 hodin se dají

předpokládat v rozmezí zhruba 0,10–0,25 mmol/l u oxalátů a 0,80–3,0 mmol/l u citrátů. Naopak u jednorázových močí, kde se počítá index analyt/kreatinin se mohou vyskytovat hodnoty jak nízké, tak vysoké (podle momentálního příjmu tekutin u pacienta).

Pro měření preciznosti metody na stanovení citrátů firmy INstruchemie jsme kromě obou kontrol od stejného výrobce (koncentrace viz tabulka č. 28) připravili také roztok kyseliny citronové (z referenčního materiálu) o koncentraci 2,500 mmol/l pro ověření metody při hladině ležící mezi firemními kontrolami. V případě oxalátů jsme také použili kontroly firmy INstruchemie (koncentrace viz tabulka č. 30). K ověření metody při vyšších hladinách oxalátů jsme použili kontrolu Control Level 2 od firmy LTA o koncentraci 0,941 mmol/l.

*Tabulka 28: Hodnoty QC citrátů deklarované výrobcem*

Kontrola	Deklarovaná hodnota (mmol/l)	Rozsah měření $\pm 3$ SD (mmol/l)	1 SD (mmol/l)	CV %
Normal Level INstruchemie	0,510	0,360 – 0,640	0,05	9,15
High Level INstruchemie	5,930	4,450 – 7,410	0,49	8,32
Připravený referenční $\Theta$	2,500	–	–	–

*Tabulka 29: Zjištěné hodnoty QC citrátů*

Kontrola	Opakovatelnost			Mezilehlá preciznost		
	Průměr (mmol/l)	1 SD (mmol/l)	CV %	Průměr (mmol/l)	1 SD (mmol/l)	CV %
Normal Level INstruchemie	0,512	0,025	5,12	0,527	0,029	5,56
High Level INstruchemie	5,894	0,029	0,52	5,909	0,170	2,95
Připravený referenční $\Theta$	2,551	0,022	0,89	2,527	0,051	2,08

Tabulka 30: Hodnoty QC oxalátů deklarované výrobcem

Kontrola	Deklarovaná hodnota (mmol/l)	Rozsah měření $\pm 3$ SD (mmol/l)	1 SD (mmol/l)	CV %
Normal Level INstruchemie	0,174	0,124 – 0,224	0,017	9,58
High Level INstruchemie	0,415	0,365 – 0,465	0,017	4,02
Control Level 2 LTA	0,941	0,772 – 1,111	0,057	6,00

Tabulka 31: Zjištěné hodnoty QC oxalátů

Kontrola	Opakovatelnost			Mezilehlá preciznost		
	Průměr (mmol/l)	1 SD (mmol/l)	CV %	Průměr (mmol/l)	1 SD (mmol/l)	CV %
Normal Level INstruchemie	0,170	0,008	4,46	0,176	0,011	6,22
High Level INstruchemie	0,408	0,020	0,52	0,424	0,015	3,63
Control Level 2 LTA	0,948	0,012	1,32	0,943	0,043	4,73

Na základě hodnot QC od výrobců uvedených v tabulkách č. 28 a 30 a námi zjištěných hodnot za podmínek opakovatelnosti a mezilehlé preciznosti (tabulky č. 29 a 31) lze vyvodit následující závěry. V případě citrátů i oxalátů jsou zjištěné hodnoty směrodatných odchylek a variačních koeficientů nižší než hodnoty od výrobce. To svědčí o tom, že preciznosti za obou podmínek měření jsou dostatečné pro rutinní provoz v laboratoři.

#### 4.2.2 Výtěžnost měření

Pro metody stanovení citrátů a oxalátů nejsou k dispozici komutabilní referenční materiály a ani kontrolní materiály z cyklů EHK. Z toho důvodu nelze provést stanovení hodnoty bias. Zvolili jsme tedy alternativu v podobě výtěžnosti pomocí roztoků připravených z komerčně dostupných referenčních materiálů s deklarovanou čistotou analytu (viz kapitola [3.2.3](#)). Při výběru koncentrace referenčních roztoků pro měření výtěžnosti jsme vycházeli z *Doporučení k provádění validace a verifikace analytických*

*metod v klinických laboratořích* (Friedecký et al., 2011), podrobnosti viz kapitola [1.6.4](#). Vzhledem k tomu, že rozhodovací meze u citrátů a oxalátů jsou závislé na diuréze nebo koncentraci kreatininu v moči, určili jsme koncentrace standardních přídavek na základě nejčastěji naměřených hodnotách u vzorků pacientů.

Výtěžnost standardního přídávku citrátu o koncentraci 0,400 mmol/l do vzorku moče v poměru 1 : 9 byla vypočtena na 106.1 %. Výtěžnost standardního přídávku oxalátu o koncentraci 0,100 mmol/l do vzorku moče v poměru 1 : 9 byla vypočtena na 92.8 %. Firma INstruchemie u metody na stanovení citrátů výtěžnost neuvádí a u metody na stanovení oxalátů v moči uvádí výtěžnost 100,1 %. Této průměrné hodnoty výtěžnosti bylo ale dosaženo při koncentracích standardních přídavek 0,247 mmol/l; 0,344 mmol/l a 0,608 mmol/l. Celkové hodnoty koncentrace oxalátů ve směsích vzorků a přídavek nebyly uvedeny. Lze předpokládat, že hodnoty těchto koncentrací byly vyšší než naše a nesplňovaly tak doporučení, že výsledná koncentrace směsi vzorku a přídávku by měla být v oblasti klinických rozhodovacích mezí. Snižující se preciznost a citlivost metody směrem k nižším hodnotám oxalátů má za následek nižší výtěžnost, která je ale při hodnotě 92,8 % stále dostačující.

#### **4.2.3 Pracovní rozsah**

Pracovní rozsah byl proveden (s výjimkou vzorku L pro oxaláty) s jednotlivými vzorky moči. Důvodem je do současné doby malé množství stanovených patientských vzorků, ve kterých se navíc jen vzácně vyskytují extrémně nízké či vysoké koncentrace. Na základě výsledných grafů závislostí průměrů naměřených hodnot na teoreticky známých, včetně hodnot z nich odečtených (korelační koeficient, směrnice a úsek přímkou) lze konstatovat, že metoda na stanovení citrátu má preciznost a odchylku srovnatelnou v celém měřicím rozsahu. Totéž lze povědět o stanovení oxalátu, kde byly prokázány tytéž vlastnosti do hodnoty 1,30 mmol/l. Případné odchylky v rozmezí hodnot 1,30–1,50 mmol/l nejsou klinicky významné.

#### **4.2.4 Nejistota měření**

Maximální přípustné hodnoty relativní rozšířené nejistoty  $U_{C,rel}$  měření citrátů a oxalátů nejsou nikde uvedeny, ale můžeme provést porovnání s hodnotami  $U_{C,rel}$  pro kreatinin v moči měřený Jaffého metodou v naší laboratoři. Porovnání s metodou stanovení kreatininu v moči je příhodné z důvodu, že u vzorků nesbírané moče budou výsledky



měření citrátů a oxalátů přepočítány na jejich index s močovým kreatininem. Pro hodnotu kreatininu v moči 5,17 mmol/l je  $U_{c,rel} = 16,77 \%$  a pro hodnotu 11,8 mmol/l je  $U_{c,rel} = 19,88 \%$ . Hodnoty  $U_{c,rel}$  citrátů a oxalátů jsou výrazně nižší. Taktéž můžeme porovnat  $U_{c,rel}$  citrátů a oxalátů s hodnotami  $D_{max}$  jiných analytů (viz následující kapitola). Lze tedy konstatovat, že obě zaváděné metody disponují přijatelnou nejistotou.

#### **4.2.5 Verifikační protokoly**

Při kontrole a porovnání hodnot výkonnostních parametrů verifikovaných metod, které vypočítal program SLP při tvorbě verifikačních protokolů a MS Excel, jsme zaznamenali diskrepanci u hodnot variačních koeficientů mezilehlých precizností. Ta je způsobena tím, že zatímco program MS Excel vypočítal hodnoty průměrů a standardních odchylek z jednotlivých měření mezilehlé preciznosti, tak program SLP počítá se zaokrouhlenými hodnotami. Ty jsou do programu zadány ručně na tři desetinná místa. Odchytky však činí  $< 0,1 \%$  a jsou tedy nevýznamné.

V závěru verifikačního protokolu bývá srovnání hodnot  $U_{c,rel}$  s hodnotami  $D_{max}$ , jež poskytuje společnost SEKK. Hodnota  $D_{max}$  (přijatelný rozdíl v procentech) udává maximální přijatelnou hodnotu rozšířené relativní kombinované nejistoty a jde o hodnotící kritérium pro výsledky EHK. Protože hodnota  $D_{max}$  pro citrát/oxalát v moči není k dispozici, provedli jsme porovnání s hodnotami  $D_{max}$  pro kreatinin a celkový vápník v moči. Protože hodnoty  $U_{c,rel}$  pro metody stanovení citrátů a oxalátů jsou nižší, mohli jsme vyvodit závěr, že metody jsou vhodné pro klinické použití.

## 5. Závěr

Hlavním cílem mé bakalářské práce bylo popsat celý proces zavádění metod na stanovení citrátů a oxalátů v moči do rutinního provozu klinické laboratoře. Protože citráty a oxaláty patří k látkám, jež mají zásadní vliv na vznik urolitiázy, zabývala se první část mé práce touto problematikou.

Další část práce byla věnována verifikaci a validaci. To zahrnuje popis jejich výkonnostních parametrů a analytických vlastností metod. Následně jsem popsal analyzátor AU480 firmy Beckman Coulter a princip metody spektrofotometrie, kterou využívá k měření. Na tento přístroj jsme naprogramovali čtyři metody na stanovení citrátů a oxalátů od dvou zahraničních výrobců INstruchemie (Holandsko) a LTA (Itálie). Na závěr teoretické části práce jsem popsal zavedení metod do programů LIS a NIS.

Hlavní část práce obsahuje zevrubný popis celého procesu měření zahrnující jeho preanalytickou, analytickou a postanalytickou část. Nejprve jsme vyzkoušeli metody od obou výrobců opakovaným měřením kontrol kvality a vzorků náhodně vybraných pacientů. Po zvážení různých aspektů, jsme vybrali metody od firmy INstruchemie.

Následovalo provedení verifikací u obou vybraných metod. Obě prokázaly dostatečnou preciznost měření za podmínek opakovatelnosti a mezilehlé preciznosti. Měření výtěžnosti, které bylo provedeno jako náhrada za bias, prokázalo přijatelnou systematickou odchylku. Na základě těchto měření byly vypočteny rozšířené nejistoty měření. Nakonec jsme ověřili, že obě metody mají srovnatelnou preciznost a odchylku v celém (v případě oxalátů téměř celém) pracovním rozsahu měření.

Obě metody na stanovení citrátů a oxalátů v moči prokázaly při verifikaci vhodnost pro použití v podmínkách naší laboratoře a byly tedy zavedeny do rutinního provozu ÚKBH FN Plzeň. Dosažené výsledky obou verifikací byly zaznamenány do verifikačních protokolů. Tato bakalářská práce ukazuje na celkovou náročnost procesu zavádění metod, na jehož základě ale lze poskytovat lékařům spolehlivé výsledky, jež potřebují ke své práci.

## 6. Seznam citované literatury

1. AARSAND, AK. et al., 2020. EFLM Biological Variation Database. *European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* [online]. [cit. 2020-05-24]. Dostupné z: <https://biologicalvariation.eu>
2. AGGARWAL, K., 2013. Nephrolithiasis: Molecular Mechanism of Renal Stone Formation and the Critical Role Played by Modulators. *BioMed Research International* [online]. 2013, p. 1-21 [cit. 2020-06-19]. DOI: 10.1155/2013/292953. ISSN 2314-6133. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/292953/>
3. ALELIGN, T., PETROS, B., 2018. Kidney Stone Disease: An Update on Current Concepts. *Advances in Urology* [online]. 2018, p. 1-12 [cit. 2020-06-20]. DOI: 10.1155/2018/3068365. ISSN 1687-6369. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/au/2018/3068365/>
4. AMBROŽOVÁ, J., 2019. Stručná historie QC a současnost SQC. *Labor aktuell* [online]. 2/2019 s. 17-24 [cit. 2020-04-10]. Dostupné z: <https://www.labor-aktuell.cz/strucna-historie-qc-a-soucasnost-sqc>
5. AMBROŽOVÁ, J., KRATOCHVÍLA, J., 2016. Preciznost a bias metod měření dle EP15-A3 [online]. *Klin. Biochem. Metab.*, 24 (45), No. 4, p. 183–190. [cit. 7-3-2020-03-07]. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2016/2016-4/KBM-4-2016-Ambrozova-183.pdf>
6. ANANDARAM, P., et al., 2006. Problems in the metabolic evaluation of renal stone disease: audit of intra-individual variation in urine metabolites. *Urological Research* [online]. 34(4), p. 249-254 [cit. 2020-07-23]. DOI: 10.1007/s00240-006-0053-5. ISSN 0300-5623. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00240-006-0053-5>
7. BARTOŠ, V., BUDINA, M., FRIEDECKÝ, B., KRATOCHVÍLA, P., SPRINGER, D., ŠAFARČÍK, K., 2014. Doporučení k výpočtu nejistot kvantitativních výsledků měření v klinických laboratořích [online]. Doporučení SEKK [cit. 2020-04-18]. Dostupné z: [https://www.sekk.cz/infoservis/2014\\_nejistoty\\_doporuceni.pdf](https://www.sekk.cz/infoservis/2014_nejistoty_doporuceni.pdf)

8. BARWICK, V. et al., 2016. *Pokyn Eurachem / CITAC: Průvodce kvalitou v analytické chemii; Pomůcka k akreditaci*. 3. vydání [online]. Praha: Eurachem – ČR, s. 60. ISBN 978-80-86322-10-0. [cit. 2020-03-05]. Dostupné z: <http://www.eurachem.cz/publikace-detail.php?clanek=16>
9. BERCKMANS, R., BOER, P., 1988. An inexpensive method for sensitive enzymatic determination of oxalate in urine and plasma. *Clinical Chemistry* [online]. 34(7), p. 1451-1455 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1093/clinchem/34.7.1451. ISSN 0009-9147. Dostupné z: <https://academic.oup.com/clinchem/article/34/7/1451/5661985>
10. BERGERMAN, J., ELLIOT, J., 1955. Method for Direct Colorimetric Determination of Oxalic Acid. *Analytical Chemistry* [online]. 27(6), p.1014-1015 [cit. 2020-03-15]. DOI: 10.1021/ac60102a045. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60102a045>
11. BIRDER, L., DE GROAT, W., 2007. Mechanisms of Disease: involvement of the urothelium in bladder dysfunction. *Nature Clinical Practice Urology* [online]. 4(1), p. 46-54 [cit. 2020-06-26]. DOI: 10.1038/ncpuro0672. ISSN 1743-4270. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/ncpuro0672>
12. BROŽ, P., 2019. Sběr moči u pacientů s urolitiázou – informace pro pacienty FN Plzeň. [online]. *Řízená dokumentace FN Plzeň INL/UKBH/0397/01* [cit. 2020-06-11]. Dostupné z: [https://ukbh.fnplzen.cz/sites/users/ukbh/dokumenty/INL\\_0397\\_01.pdf](https://ukbh.fnplzen.cz/sites/users/ukbh/dokumenty/INL_0397_01.pdf)
13. BUDINA, M., 2014. Excelový soubor: 2014\_nejistota\_vypocet.xlsx. Dostupné z: [https://www.sekk.cz/infoservis/2014\\_nejistota\\_vypocet.xlsx](https://www.sekk.cz/infoservis/2014_nejistota_vypocet.xlsx).
14. BUREŠOVÁ, E. et al., 2010. Urolitiáza – diagnostika a léčba. *Urologie pro praxi*. 11(4) s.211-215 [online]. [cit. 2020-06-21]. Dostupné z: <https://www.urologiepropraxi.cz/pdfs/uro/2010/04/09.pdf>
15. CALKINS, V., 1943. Microdetermination of Glycolic and Oxalic Acids. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition* [online]. 15(12), p. 762-763 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1021/i560124a020. ISSN 0096-4484. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/i560124a020>
16. CAREY, N. et al., 2014. User verification of precision and estimation of bias; approved guideline. 4th ed. *Wayne: Clinical Laboratory Standards Institute*. p. 106 Print. ISBN 1-56238-965-3.

17. CERIOTTI, F., 2007. Prerequisites for use of common reference intervals. *Clin Biochem Rev.* [online]. 28(3), p. 115-121 [cit. 2020-04-11]. PMID: 17909616; PMCID: PMC1994109. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1994109/>
18. ČSN EN ISO 15189 ed.2, 2013. *Zdravotnické laboratoře – požadavky na kvalitu a způsobilost*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 40 s. Třídící znak 85 5101.
19. Determination of citrate in serum, plasma, urine, seminal fluid and foodstuffs. 2018. Příbalová dokumentace k použitým reagensům od firmy INstruchemie BV.
20. Determination of oxalate in urine (semi)automatic method. 2019. Příbalová dokumentace k použitým reagensům od firmy INstruchemie BV.
21. DEYSHER, E., HOLM, G., 1942. Determination of Citric Acid in Pure Solutions and in Milk by Pentabromoacetone Method [online]. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*. No. 14(1), p.4-7 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1021/i560101a002. ISSN 0096-4484. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/i560101a002>
22. DURSUN, M., OTUNCTEMUR, A., OZBEK, E., 2014. Kidney stones and ceftriaxone. *European Medical Journal Urol.* [online]. 2015;3[1] p.68-74 [cit. 2020-06-19]. Dostupné z: <https://www.emjreviews.com/urology/article/kidney-stones-and-ceftriaxone/>
23. Enzymatic colorimetric determination of citric acid in urine. 2008. Příbalová dokumentace k použitým reagensům od firmy LTA s.r.l.
24. Enzymatic colorimetric determination of oxalic acid in urine. 2005. Příbalová dokumentace k použitým reagensům od firmy LTA s.r.l.
25. FRIEDECKÝ, B., 2005. Referenční intervaly, Směrnice IVD 98/79 ES a metrologie chemických měření [online]. *Klin. Biochem. Metab.*, 13 (34), No. 3, p. 145–150. [cit. 2020-03-07]. Dostupné z: <http://nts.prolekare.cz/cls/odkazy/kbm0503-145.pdf>
26. FRIEDECKÝ, B., 2006. Kontrola kvality laboratorního vyšetření. In: RACEK, J. et al., *Klinická biochemie*, Galén, Praha, s. 49–51. ISBN 80-7262-324-9.
27. FRIEDECKÝ, B., KRATOCHVÍLA, J., 2019. Nejistota a chyba měření ve zdravotnických laboratořích [online]. *Klin. Biochem. Metab.*, 27 (48), No. 1, p. 25–31. [cit. 2020-03-03]. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/wp-content/uploads/2019/10/KBM-1-2019-Friedecky-Uc-25.pdf>

28. FRIEDECKÝ, B., ŠPRONGL, L., KRATOCHVÍLA, J., PLZÁK, Z., 2011. *Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích* [online]. Doporučení ČSKB [cit. 3-3-2020-03-03], dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2011/2011-1/dop-validace.pdf>
29. GUM. Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement. 2008. [online]. *Joint Committee for Guides in Metrology* [cit. 2020-04-20]. Dostupné z: [https://www.bipm.org/utils/common/documents/jcgm/JCGM\\_100\\_2008\\_E.pdf](https://www.bipm.org/utils/common/documents/jcgm/JCGM_100_2008_E.pdf)
30. HOLMES, R., 1995. Measurement of urinary oxalate and citrate by capillary electrophoresis and indirect ultraviolet absorbance [online]. *Clinical Chemistry*. 41(9), p. 1297-1301 [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1093/clinchem/41.9.1297. ISSN 0009-9147. Dostupné z: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.582.1534&rep=rep1&type=pdf>
31. HOPPE, B., KEMPER, M., 2010. Diagnostic examination of the child with urolithiasis or nephrocalcinosis. [online]. *Pediatric Nephrology* 25(3), 403-413 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1007/s00467-008-1073-x. ISSN 0931-041X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00467-008-1073-x>
32. HRAZDIRA, I., MORNSTEIN, V., 2001. *Lékařská biofyzika a přístrojová technika*. Brno: Neptun, s. 395. ISBN 80-902896-1-4.
33. HRUSKA, K., BECK, A., 2013. Nephrolithiasis In: COFFMAN, T., ed. *Schrier's diseases of the kidney*. 9th ed. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer Health. p. 642-672 ISBN 978-1-4511-1075-3.
34. CHAMJANGALI, M., KELEY, V., BAGHERIAN, G., 2006. Kinetic Spectrophotometric Method for the Determination of Trace Amounts of Oxalate by an Activation Effect. *Analytical Sciences* [online]. 22(2), p. 333-336 [cit. 2020-03-15]. DOI: 10.2116/analsci.22.333. ISSN 0910-6340. Dostupné z: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/analsci/22.333?from=CrossRef>
35. Chemický analyzátor AU480 – Uživatelská příručka firmy Beckman Coulter Česká republika s.r.o., 2013. Původní vydání, B40281AA, 12/13

36. CHEN, Z., PROSPERI, M., BIRD, V., 2018. Prevalence of kidney stones in the USA: The National Health and Nutrition Evaluation Survey. *Journal of Clinical Urology* [online]. 12(4), p. 296-302 [cit. 2020-06-15]. DOI: 10.1177/2051415818813820. ISSN 2051-4158. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2051415818813820>
37. JABOR, A., FRIEDECKÝ, B., 2008. Kritická diference dvou následných měření (hodnota CD %). *NASKL – Národní autorizační středisko pro klinické laboratoře* [online]. [cit. 2020-05-26]. Dostupné z: <http://www.naskl.cz/kriticka-diference-dvou-naslednych-mereni/>
38. KÁŠ, J., KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O., 2005. *Laboratorní techniky biochemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, ISBN 80-7080-586-2.
39. KAWACIUK, I., 2009. *Urologie*. Praha: Galén. s.530 ISBN 978-80-7262-626-7.
40. KIM, M., 2006. Determining citrate in fruit juices using a biosensor with citrate lyase and oxaloacetate decarboxylase in a flow injection analysis system. *Food Chemistry* [online]. 99(4), p. 851-857 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.08.036. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814605007314>
41. KIM, S. et al., 2007. Cystine calculi: correlation of CT-visible structure, CT number, and stone morphology with fragmentation by shock wave lithotripsy. *Urological Research* [online]. 35(6), 319-324 [cit. 2020-04-15]. DOI: 10.1007/s00240-007-0117-1. ISSN 0300-5623. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00240-007-0117-1>
42. KLOUDA, P., 2003. *Moderní analytické metody*, 2. vydání, Ostrava, s. 132. ISBN 80-86369-07-2.
43. KRATOCHVÍLA, J. et al., 2008. Doporučení České společnosti klinické biochemie o vnitřní kontrole kvality [online]. Doporučení ČSKB [cit. 2020-04-18]. Dostupné z: [https://www.cskb.cz/res/file/doporuceni/VKK\\_dopor.pdf](https://www.cskb.cz/res/file/doporuceni/VKK_dopor.pdf)
44. KRATOCHVÍLA, J., 2019. Biologická variabilita a pracovní skupina EuBIVAS [online]. *FONS Informační bulletin* 29, No. 1, p. 15–19. [cit. 2020-03-06]. Dostupné z: <http://www.bulletinfons.cz/12019/kvalita3.pdf>
45. KŘÍŽEK, M., ŠÍMA, J., 2015. *Analytická chemie*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, s. 214. ISBN 978-80-7394-486-5.

46. KRÍŽENECKÁ, S., SYNEK, V., 2014. *Základy analytické chemie*. Ústí nad Labem: Univerzita J.E. Purkyně v Ústí nad Labem, Fakulta životního prostředí, s. 143. ISBN 978-80-7414-804-0.
47. KUBALA, M., CIBIČEK, N., 2014. Metody optické detekce. In: CIBIČEK, N., VACEK, J. et al., *Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, s. 20–26. ISBN 978-80-244-3951-8.
48. LAKER, M., HOFMANN, A., MEEUSE, B., 1980. Spectrophotometric determination of urinary oxalate with oxalate oxidase prepared from moss. *Clinical Chemistry* [online]. 26(7), p.827-830 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1093/clinchem/26.7.827. ISSN 0009-9147. Dostupné z: <https://academic.oup.com/clinchem/article/26/7/827/5727328>
49. LESLIE, S., HUSSAIN, S., 2020. Hypercalciuria. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [cit. 2020-06-19]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448183/>
50. MAYER, G., MARKOW, D., KARP, F., 1963. Enzymatic Oxalate Determination in Urine. *Clinical Chemistry* [online]. 9(3), p. 334-339 [cit. 2020-03-16]. DOI: 10.1093/clinchem/9.3.334. ISSN 0009-9147. Dostupné z: <https://academic.oup.com/clinchem/article/9/3/334/5672541>
51. MINÁŘ, J., STANČÍK, L., 2008. Kontrola kvality v klinické laboratoři. In: BARTOŠ, V. et. al. *Příručka k vnitřní kontrole kvality* [online]. Praha: Česká společnost klinické biochemie, Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, s. 26-31. ISBN 978-80-254-1130-8. [cit. 2020-03-05]. Dostupné z: [http://www.cskb.cz/res/file/doporuceni/VKK\\_pub\\_08.pdf](http://www.cskb.cz/res/file/doporuceni/VKK_pub_08.pdf)
52. MOE, O., 2006. W. Kidney stones: pathophysiology and medical management. *The Lancet* [online]. 367(9507), p. 333-344 [cit. 2020-05-18]. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)68071-9. ISSN 01406736. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673606680719>
53. NATELSON, S., PINCUS, J., LUGOVOY, J., 1948. Microestimation of citric acid; A new colorimetric reaction for pentabromoacetone [online]. *J. Biol. Chem.* No.175 p.745-750. [cit. 2020-03-08]. Dostupné z: <https://www.jbc.org/content/175/2/745.citation>



54. PALMER, L., 2006. Pediatric Urologic Imaging. *Urologic Clinics of North America* [online]. 33(3), p. 409-423 [cit. 2020-05-18]. DOI: 10.1016/j.ucl.2006.03.009. ISSN 00940143. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0094014306000413>
55. PARK, K. Y., GREGORY, J., 1980. Gas-chromatographic determination of urinary oxalate. *Clinical Chemistry* [online]. 26(8), p. 1170-1172 [cit. 2020-03-15]. DOI: 10.1093/clinchem/26.8.1170. ISSN 0009-9147. Dostupné z: <https://academic.oup.com/clinchem/article/26/8/1170/5664405>
56. PETRARULO, M. et al., 1995. Citrate in urine determined with a new citrate lyase method. *Clinical Chemistry* [online]. 41(10), p. 1518-1521 [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1093/clinchem/41.10.1518. ISSN 0009-9147. Dostupné z: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.512.6717&rep=rep1&type=pdf>
57. PETŘÍK, A., 2011. Diagnostika a terapie urolitiázy [online]. *Urologie pro Praxi*. 12(3): s. 173–179 [cit. 2020-06-18]. Dostupné z: <https://www.urologiepropraxi.cz/pdfs/uro/2011/03/07.pdf>
58. PLACHÝ, R., 2004. Polarizační mikroskopie [online]. *LF Univerzity Palackého v Olomouci*. [cit. 2020-05-10]. Dostupné z: <https://biologie.upol.cz/mikroskopie/polarizacni%20mikroskopie.htm>
59. Program FONS Openlims – uživatelská příručka firmy Stapro s.r.o.
60. Program Medicalc4 – uživatelská příručka firmy Medicalc s.r.o.
61. RACEK, J. et al., 2006. *Klinická biochemie*, 2. vydání, Galén, Praha, s. 329. ISBN 80-7262-324-9.
62. RICÓS, C. et al., 2014. Desirable Biological Variation Database specifications [online]. [cit. 2020-05-24]. Dostupné z: <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>
63. RIEMENSCHNEIDER, W., TANIFUJI, 2005. M., Oxalic acid. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. [cit. 2020-05-11]. ISBN 3527306730.

64. ROBERTSON, W., 2017. Do “inhibitors of crystallisation” play any role in the prevention of kidney stones? A critique. *Urolithiasis* [online]. 45(1), p. 43-56 [cit. 2020-06-18]. DOI: 10.1007/s00240-016-0953-y. ISSN 2194-7228. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00240-016-0953-y>
65. SAYER, J., 2017. Progress in Understanding the Genetics of Calcium-Containing Nephrolithiasis. *Journal of the American Society of Nephrology* [online]. 28(3), p. 748-759 [cit. 2020-06-16]. DOI: 10.1681/ASN.2016050576. ISSN 1046-6673. Dostupné z: <http://www.jasn.org/lookup/doi/10.1681/ASN.2016050576>
66. SENFT, V., 2012. *Analytické vlastnosti metod* [online]. [cit. 201912-02-122019]. Dostupné z: <https://docs.google.com/document/d/1x61ezRARPZ9P5nUeIYjdlqDVdWZUROSzOZMU7kIrA1o/edit>
67. SENFT, V., ŠOLCOVÁ, M., KORELUSOVÁ, I., HAJŠMANOVÁ, Z., 2020. Standard systému řízení kvality v KL ÚKBH FN Plzeň. *Řízená dokumentace FN Plzeň SLN/UKBH/0/003/00/VERZE09*.
68. SINGH, R., NANCOLLAS, G., 1985. Determination of urinary citrate by high performance ion chromatography. *Kidney International* [online]. 28(6), p. 985-987 [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1038/ki.1985.228. ISSN 00852538. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815335766>
69. SIVAGURU, M. et al., 2020. GeoBioMed sheds new light on human kidney stone crystallization and dissolution. *Nature Reviews Urology* [online]. 17(1), p. 1-2 [cit. 2020-06-26]. DOI: 10.1038/s41585-019-0256-5. ISSN 1759-4812. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41585-019-0256-5>
70. Směrnice 98/79/ES o diagnostických zdravotnických prostředcích in vitro. 1998 *Směrnice Evropského parlamentu*. [online]. [cit. 2020-03-26]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:31998L0079&from=CS>
71. SOBOTKA, R., HANUŠ, T., 2012. Příčiny a rizikové faktory vzniku urolitiázy. *Urologie pro praxi*, 13(1): s. 11-15 [online]. [cit. 2020-06-19]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/uro/2012/01/03.pdf>
72. STEJSKAL, D., 2009. Metabolická problematika v léčbě urolitiázy [online]. *Urologie pro Praxi*. 10(2): s. 72–78 [cit. 2020-04-18]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/uro/2009/02/05.pdf>

73. SUCHÁNEK, M. et al., 2006. Doporučení pro určení odhadů nejistot výsledků měření/klinických testů v klinických laboratořích [online]. *Klin. Biochem. Metab.*, 14 (35), No. 1, p. 43-53. [cit. 2020-03-04]. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/kbm/kbm-2006-14-1-43-53.pdf>
74. SUCHÁNEK, M., MILDE, D., 2013. *Názvosloví analytického měření: úvod do 3. vydání Mezinárodního metrologického slovníku; Jak vyhovět požadavkům ISO 17025 na verifikaci metod* [online]. Praha: Eurachem – ČR, Kvalimetrie, s. 62. ISBN 80-86322-06-8. [cit. 2020-03-04]. Dostupné z: <http://www.eurachem.cz/publikace-detail.php?clanek=12>
75. SURYAVANSHI, M., et al., 2016. HPLC Analysis of human urine for oxalate content. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* [online]. 8(12), p. 54-59 [cit. 2020-03-15]. DOI: 10.22159/ijpps.2016v8i12.13168. ISSN 0975-1491. Dostupné z: <http://innovareacademics.in/journals/index.php/ijpps/article/view/13168>
76. ŠTER, A. et al., 2018. The effect of hydrodynamic and thermodynamic factors and the addition of citric acid on the precipitation of calcium oxalate dihydrate. *Urolithiasis* [online]. 46(3), p. 243-256 [cit. 2020-06-27]. DOI: 10.1007/s00240-017-0991-0. ISSN 2194-7228. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00240-017-0991-0>
77. THEODORSSON, E., 2012. Validation and verification of measurement methods in clinical chemistry [online]. *Bioanalysis* 4(3), 305-320 [cit. 2020-03-06]. DOI: 10.4155/bio.11.311. ISSN 1757-6180. Dostupné z: <http://www.future-science.com/doi/10.4155/bio.11.311>
78. THOMPSON, M. et al., 1999. Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement. [online]. *Pure and Applied Chemistry*. 71(2), p. 337-348 [cit. 2020-03-08]. DOI: 10.1351/pac199971020337. ISSN 1365-3075. Dostupné z: <https://www.degruyter.com/view/journals/pac/71/2/article-p337.xml>
79. TÜRK, C. et al., 2019. EAU Guidelines on Urolithiasis 2019 [online]. *European Association of Urology* [cit. 2020-06-20]. Dostupné z: <https://uroweb.org/guideline/urolithiasis/>

80. Urine Preservatives—Collection and Transportation for 24–Hour Urine Specimens. ©2020. *Mayo Clinic*. [online]. MC1235-87rev. 0220. p. 5. Dostupné z: [https://www.mayocliniclabs.com/it-mmfiles/Urine\\_Preservatives-Collection\\_and\\_Transportation\\_for\\_24-Hour\\_Urine\\_Specimens.pdf](https://www.mayocliniclabs.com/it-mmfiles/Urine_Preservatives-Collection_and_Transportation_for_24-Hour_Urine_Specimens.pdf)
81. VÁVRA, V., PINKAS, J., 2010. Identifikace materiálů pomocí metod rentgenové práškové difrakce [online]. *PF Masarykovy univerzity v Brně*. [cit. 2020-05-20]. Dostupné z: [http://sci.muni.cz/chemsekce/c8870/pdf/Uloha10\\_RTG.pdf](http://sci.muni.cz/chemsekce/c8870/pdf/Uloha10_RTG.pdf)
82. VÁVROVÁ, J., © 2020. Absorpční spektrofotometrie end point. *Datový standard MZ ČR – verze 4*. [online]. [cit. 2020-03-26]. Dostupné z: <http://www.ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd/hypertext/JVABO.htm>
83. VÁVROVÁ, J., © 2020. Absorpční spektrofotometrie kineticky. *Datový standard MZ ČR – verze 4*. [online]. [cit. 2020-03-26]. Dostupné z: <http://www.ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd/hypertext/JVABP.htm>
84. VERHOFF, F., 2005. Citric acid. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. [cit. 2020-06-15]. ISBN 3527306730.
85. VIM 3. International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms 3rd ed. 2008 [online]. *Joint Committee for Guides in Metrology* [cit. 2020-04-19]. Dostupné z: [https://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM\\_200\\_2012.pdf](https://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM_200_2012.pdf)
86. WESTGARD, J., WESTGARD, S., 2017. Measuring Analytical Quality. *Clinics in Laboratory Medicine* [online]. 37(1), p. 1-13 [cit. 2020-04-02]. DOI: 10.1016/j.cll.2016.09.001. ISSN 02722712. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272271216300786>
87. WIMPISSINGER, F. et al., 2007. The Silence of the Stones: Asymptomatic Ureteral Calculi. *Journal of Urology* [online]. 178(4), p. 1341-1344 [cit. 2020-05-17]. DOI: 10.1016/j.juro.2007.05.128. ISSN 0022-5347. Dostupné z: <http://www.jurology.com/doi/10.1016/j.juro.2007.05.128>
88. WORSTER, A. et al., 2002. The accuracy of noncontrast helical computed tomography versus intravenous pyelography in the diagnosis of suspected acute urolithiasis: A meta-analysis. *Annals of Emergency Medicine* [online]. 40(3), p.280-286 [cit. 2020-06-17]. DOI: 10.1067/mem.2002.126170. ISSN 01960644. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196064402000409>

89. ZÁRUBA, K. et al., 2016. *Analytická chemie* (2. díl). Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, s. 221. ISBN 978-80-7080-951-8.
90. ZERWEKH, J., et al., 1983. Assay of urinary oxalate: six methodologies compared. *Clinical Chemistry* [online]. 29(11), p. 1977-1980 [cit. 2020-03-16]. DOI: 10.1093/clinchem/29.11.1977. ISSN 0009-9147. Dostupné z: <https://academic.oup.com/clinchem/article/29/11/1977/5668010>
91. ZIMA, T., KRATOCHVÍLA, J., BUDINA, M., 2019. Doporučení: Systém externího hodnocení kvality (EHK). *Klin. Biochem. Metab.* [online]. 28 (49), 2020, No. 1, p. 35–36. [cit. 2020-04-15]. Dostupné z: <https://www.cskb.cz/wp-content/uploads/2020/04/dop-EHK.pdf>

## 7. Seznam tabulek, obrázků a grafů

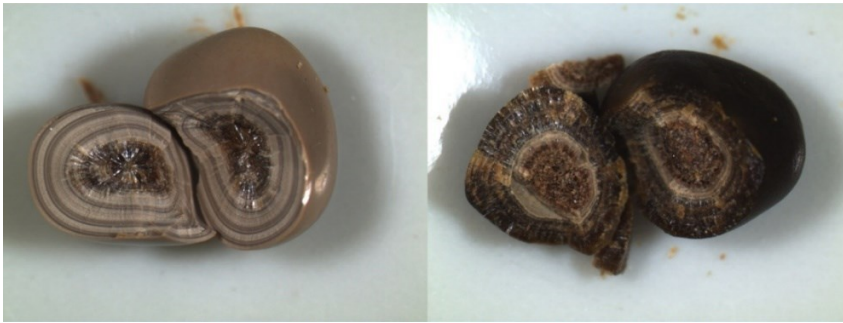
Tabulka 1: Látkové složení močových konkrementů – seřazeno dle četnosti výskytu ..	18
Tabulka 2: Výkonnostní parametry validace a verifikace analytického postupu .....	34
Tabulka 3: Koncentrace použitých kontrolních materiálů .....	68
Tabulka 4: Základní parametry měření použitých metod.....	78
Tabulka 5: Další parametry měření použitých metod .....	79
Tabulka 6: Stanovení citrátů v moči – porovnání výsledků QC metodou od INstruchemie.....	80
Tabulka 7: Stanovení citrátů v moči – porovnání výsledků QC metodou od LTA .....	80
Tabulka 8: Stanovení oxalátů v moči – porovnání výsledků QC metodou od INstruchemie.....	81
Tabulka 9: Stanovení oxalátů v moči – porovnání výsledků QC metodou od LTA.....	81
Tabulka 10: Výsledky preciznosti stanovení citrátů za podmínky opakovatelnosti .....	83
Tabulka 11: Výsledky preciznosti stanovení oxalátů za podmínky opakovatelnosti .....	83
Tabulka 12: Výsledky měření mezilehlé preciznosti stanovení citrátů.....	84
Tabulka 13: Výsledky měření mezilehlé preciznosti stanovení oxalátů .....	85
Tabulka 14: Výtěžnosti citrátů u jednotlivých vzorků .....	87
Tabulka 15: Výtěžnost citrátů – souhrn.....	87
Tabulka 16: Výtěžnosti oxalátů u jednotlivých vzorků.....	88
Tabulka 17: Výtěžnost oxalátů – souhrn .....	88
Tabulka 18: Příprava vzorků pracovního rozsahu .....	89
Tabulka 19: Výsledky měření pracovního rozsahu citrátů a teoretických hodnot.....	90
Tabulka 20: Výsledky měření pracovního rozsahu oxalátů a teoretických hodnot .....	91
Tabulka 21: Hodnoty nejistot stanovení citrátů na základě mezilehlé preciznosti .....	92
Tabulka 22: Hodnoty nejistot stanovení oxalátů na základě mezilehlé preciznosti.....	92
Tabulka 23: Hodnoty nejistot stanovení citrátů se započtením výtěžnosti a nejistoty referenčního materiálu.....	94
Tabulka 24: Hodnoty nejistot stanovení oxalátů se započtením výtěžnosti a nejistoty referenčního materiálu.....	94
Tabulka 25: Vztah mezi diurézou a naměřenou hladinou analytů a jeho vliv na výsledný odpad do moče .....	100
Tabulka 26: Vztah mezi naměřenou hodnotou analytů a kreatininu.....	101

Tabulka 27: Referenční meze indexu citrát/kreatinin a oxalát/kreatinin u dětí .....	101
Tabulka 28: Hodnoty QC citrátů deklarované výrobcem.....	102
Tabulka 29: Zjištěné hodnoty QC citrátů .....	102
Tabulka 30: Hodnoty QC oxalátů deklarované výrobcem .....	103
Tabulka 31: Zjištěné hodnoty QC oxalátů.....	103
Obrázek 1: Strukturní vzorec monohydrátu kyseliny citronové.....	14
Obrázek 2: Strukturní vzorec dihydrátu kyseliny šťavelové .....	15
Obrázek 3: Dělení urolitiázy dle výskytu v močových cestách.....	17
Obrázek 4: Princip spektrometru typu Diod–array–detectors .....	53
Obrázek 5: Biochemický analyzátor AU480 Beckman Coulter .....	55
Obrázek 6: Jednotlivé součásti analyzátoru AU480 Beckman Coulter .....	55
Obrázek 7: Reakce probíhající při stanovení oxalátu pomocí oxalát oxidázy.....	59
Obrázek 8: Snímek obrazovky náležící k analyzátoru AU480 se zobrazenou záložkou "General" v oddílu "Specific Test Parameters" .....	69
Obrázek 9: Průběh měření dvoukrokové analýzy metodou end-point .....	78
Obrázek 10: Levey-Jenningsův graf měření citrátů QC Normal a High Level .....	85
Obrázek 11: Levey-Jenningsův graf měření oxalátů QC Normal a High Level .....	86
Obrázek 12: Graf závislosti průměrů naměřených hodnot citrátů na teoretických.....	90
Obrázek 13: Graf závislosti průměrů naměřených hodnot oxalátů na teoretických. ....	91
Obrázek 14: Verifikační protokol stanovení citrátů v moči enzymatickou metodou .....	96
Obrázek 15: Verifikační protokol stanovení oxalátů v moči enzymatickou metodou .....	97
Obrázek 16: Kalciumoxalátové konkrementy nalomené (Whewellit).....	121
Obrázek 17: Kalciumoxalátové konkrementy (Weddelit).....	121
Obrázek 18: Kalciumfosfátové konkrementy (dahlit).....	121
Obrázek 19: Kalciumfosfátové konkrementy (směsi s převahou apatitu).....	121
Obrázek 20: Kalciumfosfátové konkrementy (brushit).....	122
Obrázek 20: Struvitové konkrementy.....	122
Obrázek 21: Konkrement kyseliny močové (vlevo) a urátu amonného (vpravo).....	122
Obrázek 22: Cystinové konkrementy .....	122
Obrázek 24: pH metr Jenway 550.....	123
Obrázek 25: polarizační mikroskop .....	123

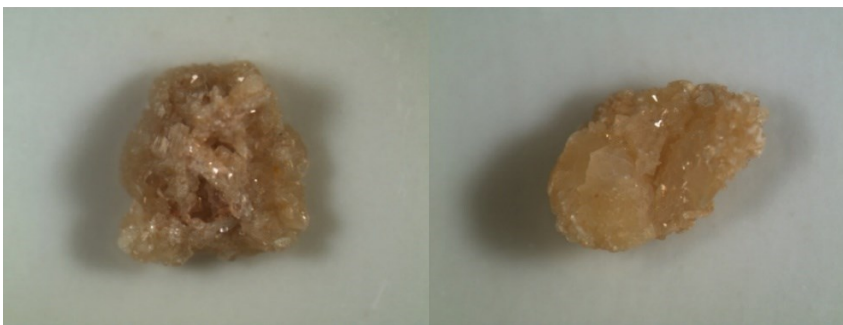
Obrázek 26: IR spektrometr Nicolet iS5 .....	123
Obrázek 27: IR spektrum whewelitu (screenshot obrazovky programu Omnic) .....	123
Obrázek 28: IR spektrum weddelitu (screenshot obrazovky programu Omnic) .....	123
Obrázek 29: Analyzátor AU480 – pracovní část (vlevo) a spodní část (vpravo) .....	124
Obrázek 31: Reagenční sety citrátu (vlevo) a oxalátu (vpravo) firmy INstruchemie ...	124
Obrázek 32: Reagenční sety citrátu (vlevo) a oxalátu (vpravo) firmy LTA .....	124
Obrázek 32: Sběrná nádoba na moč.....	124
Obrázek 33: Eppendorfka (5ml) pro stanovení oxalátů metodou firmy INstruchemie.	124
Obrázek 34: Zkumavka s aktivním uhlím (stanovení oxalátů metodou firmy LTA) ...	124
Obrázek 35: Certifikát referenčního materiálu kyseliny citronové, použitého k přípravě referenčních roztoků.....	125
Obrázek 36: Certifikát referenčního materiálu oxalátu sodného, použitého k přípravě referenčních roztoků.....	125
Obrázek 37: Certifikát referenčního materiálu kyseliny citronové, použitý firmou INstruchemie pro metrologickou návaznost stanovení .....	125



## 8. Přílohy



Obrázek 16: Kalciumoxalátové konkrementy nalomené (Whewelit)  
Zdroj: ÚKBH FN Plzeň



Obrázek 17: Kalciumoxalátové konkrementy (Weddelit)  
Zdroj: ÚKBH FN Plzeň



Obrázek 18: Kalciumfosfátové konkrementy (dahlit)  
Zdroj: ÚKBH FN Plzeň



Obrázek 19: Kalciumfosfátové konkrementy (směsi s převahou apatitu)  
Zdroj: ÚKBH FN Plzeň



Obrázek 20: Kalciumfosfátové konkrementy (brushit)  
Zdroj: ÚKBH FN Plzeň



Obrázek 21: Struvitové konkrementy  
Zdroj: ÚKBH FN Plzeň



Obrázek 22: Konkrement kyseliny močové (vlevo) a urátu amonného (vpravo)  
Zdroj: ÚKBH FN Plzeň



Obrázek 23: Cystinové konkrementy  
Zdroj: ÚKBH FN Plzeň



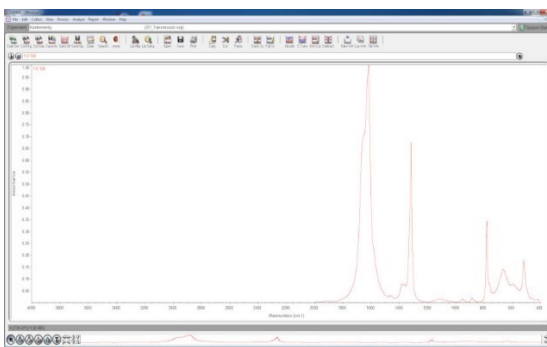
Obrázek 24: pH metr Jenway 550  
Zdroj: vlastní foto



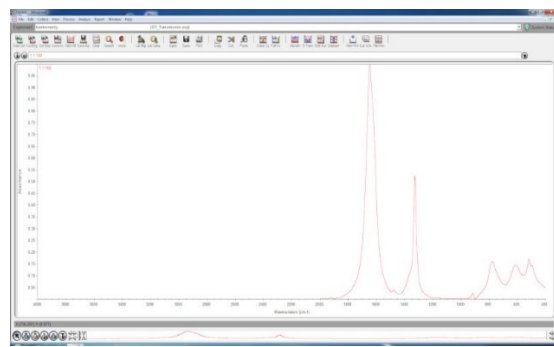
Obrázek 25: polarizační mikroskop  
Olympus BX45  
Zdroj: vlastní foto



Obrázek 26: IR spektrometr Nicolet iS5  
Zdroj: vlastní foto



Obrázek 27: IR spektrum whewelitu  
(screenshot obrazovky programu Omnic)



Obrázek 28: IR spektrum weddelitu  
(screenshot obrazovky programu Omnic)





Obrázek 29: Analyzátor AU480 – pracovní část (vlevo) a spodní část (vpravo)  
Zdroj: vlastní foto



Obrázek 30: Reagenční sety citrátu (vlevo) a oxalátu (vpravo) firmy INstruChemie  
Zdroj: vlastní foto



Obrázek 31: Reagenční sety citrátu (vlevo) a oxalátu (vpravo) firmy LTA  
Zdroj: vlastní foto



Obrázek 32: Sběrná nádoba na moč  
Zdroj: [www.omniprax.cz](http://www.omniprax.cz)



Obrázek 33: Eppendorfka (5ml) pro stanovení oxalátů metodou firmy INstruChemie  
Zdroj: vlastní foto



Obrázek 34: Zkumavka s aktivním uhlím (stanovení oxalátů metodou firmy LTA)  
Zdroj: vlastní foto

## Certificate of Analysis

**ISO GUIDE 34**  
ANAB Cert# A1-1470

**ISO/IEC 17025**  
ANAB Cert# AT-1467

**CITRIC ACID, ANHYDROUS**  
CERTIFIED REFERENCE MATERIAL

OC(=O)C(O)C(=O)O

**CERTIFIED PURITY: 99.94%**,  $U_{\text{rel}} = \pm 0.1\% \text{ k} = 2$   
(Mass Balance/as is basis)

NOMINAL PACKAGE SIZE: 1g

CATALOG #: PHR1071      LOT #: LRAB7603

CERTIFICATE VERSION: LRAB7603.1      ISSUE DATE: 14 March 2018  
*Note: Certificates may be updated due to Pharmaceutical Lot changes or the availability of new data. Check our website at: [www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com) for the most current version.*

CRM EXPIRATION: 31 December 2022 (Proper Storage and Handling Required).

RECEIPT DATE: \_\_\_\_\_  
Note: this space is provided for convenience only and its use is not required.

STORAGE: Store at Room Temperature, keep container tightly closed. Attachment of a 20 mm aluminum crimp seal recommended for unused portions.

CHEMICAL FORMULA:  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$       MW: 192.12

PHYSICAL DESCRIPTION: White powder in amber vial      CAS #: 77-92-9

HAZARDS: Read Safety Data Sheet before using. All chemical reference materials should be considered potentially hazardous and should be used only by qualified laboratory personnel.

**SIGMA-ALDRICH**

Page 1 of 6

Obrázek 35: Certifikát referenčního materiálu kyseliny citronové, použitého k přípravě referenčních roztoků



Federal Institute for Materials Research and Testing  
Analytical Chemistry, Reference Materials  
Richard-Wilmsstrasse 11, D-10669 Berlin, Germany  
Tel. +49 30 8104 1100, Fax +49 30 8104 1117

### Certificate no. U9-0918 for reference material

Supplier of the reference material:	Sigma-Aldrich Production GmbH, Industriestrasse 25, CH-9471 Buchs, Switzerland
Object of certification:	Product no. 71804, Sodium oxalate: $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ , redoxometric standard in 50 mL glass bottles, screw caps; batch no. BCBX0200
Intended use:	Certification report no. 1170/XV2, BAM Berlin This reference material is intended for use as redoxometric standard and cannot be employed as purity standard.
Storing and handling:	Ensure that the reference material is stored in the dark (i.e. within the packaging of the bottle) at temperatures in the range of 5°C to 30°C. Before any use as a reference material, it has to be dried for 3 hours at 105°C. After the flask is opened the reference material should be used according to established rules in analytical chemistry (i.e. to guarantee that no contamination can take place). The use of samples less than 120 mg is prohibited in order to avoid possible inhomogeneities with smaller sample sizes (see part. 2 of certification report).
Number of pages of this certificate:	1
Annex:	Certification report no. 1170/XV2 (2 pages), BAM Berlin, as part of this certificate
Expiry date:	23. August 2023 <sup>5</sup>

Certified value and its measurement uncertainty according to ISO Guide 35:			
Constituent (formula) and relative molar mass for reporting	Certified value	Expanded uncertainty <sup>1</sup> Coverage factor = 2	Methods of analysis
Sodium oxalate $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ $M_r = 133.9985$	$w = 99.83\% \pm 4$ $0.9983 \text{ mol/mol}^3$	$\pm 0.09\% \pm 4$ $\pm 0.0009 \text{ mol/mol}^3$	redox titration

- 1 See Eurachem / CITAC Guide „Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement“, Second Edition, 2000 ISBN 048528155. Internet: <http://www.measurementuncertainty.org>
- 2 Mass content of redoxometric standard, considered as sodium oxalate
- 3 Fraction of measured mole amount in relation to the theoretical value referring to 100% sodium oxalate
- 4 Relative molar mass. Pure Appl. Chem., Vol. 78, No. 11, pp. 2651-2656, 2006
- 5 Expiry date is based on stability tests carried out at Empa, Swiss Federal Laboratories for Materials Testing and Research, CH, Gaienhofstrasse
- 6 The certified value and the corresponding uncertainty are rounded according to DIN 1333, 1992.

The responsibility for this certificate in case of any inquiry lies only with BAM Berlin.

Berlin, 23. August 2018

BAM Berlin/Germany  
Head of Department Analytical Chemistry, Reference Materials



*F. Emmerting*

Dr. F. Emmerting

This certificate is valid for the mentioned batch of the originally sealed containers only, under the condition that the storing and handling instructions are adhered to. The use of certificates for purposes of advertising, including a mere reference as well as a partial publication, require the approval of BAM. Certificates together with the respective documents will be kept in the archive for ten years. For sale or other distribution of the certified product the relevant laws and regulations apply.

Obrázek 36: Certifikát referenčního materiálu oxalátu sodného, použitého k přípravě referenčních roztoků

## USP Certificate

**Citric Acid**  
LOT H0K310

OC(=O)C(O)C(=O)O

Molecular Formula  
 **$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$**

Molecular Weight  
**192.13**

CAS Number  
**77-92-9**

**USP REFERENCE STANDARD**

CITRIC ACID 200 mg  
CAUTION: Irritant

This material is the anhydrous form of citric acid. Do not dry before using. For quantitative applications, use a value of 0.999 mg of citric acid per mg of material on the as is basis. Handle the material in an environment with relative humidity below 70% RH. Keep container tightly closed.

CAT. NO. 1134358 USP ROCKVILLE, MD LOT H0K310

*Alice Tan*  
Quality Assurance

Page 1 of 2

ONTVANGST GOED / AF-GEKEURD

ONTVANGSTNUMMER: 249 3205-1

DATE: 5 JULI 2013

Commercieel: *BT*      Fiscaal: *MPS*

6-Jan-12

ANALYTICS B.V.

**GOEDGEKEURD**

Omz. nr. 2013.02.055

Opslag: *C Paas RT*

Obrázek 37: Certifikát referenčního materiálu kyseliny citronové, použitý firmou INStruchemie pro metrologickou návaznost stanovení

## 9. Seznam zkratek

ABR	acidobazická rovnováha
AM	aritmetický průměr (angl. <i>arithmetic mean</i> )
BMI	Body Mass Index
CD	kritická diference (angl. <i>critical difference</i> )
CE	Evropská shoda – značka shody (franc. <i>conformité européenne</i> )
CL	citrátliáza
CRM	certifikovaný referenční materiál
CRP	C-reaktivní protein
CT	počítačová tomografie (angl. <i>computed tomography</i> )
CV	variační koeficient (angl. <i>coefficient of variation</i> )
CV <sub>a</sub>	analytický variační koeficient odpovídající mezilehlé preciznosti
CV <sub>g</sub>	interindividuální variabilita (= interindividuální variační koeficient)
CV <sub>i</sub>	intraindividuální variabilita (= intraindividuální variační koeficient)
CV <sub>T</sub>	celková variabilita
ČIA	Český Institut pro akreditaci
ČSN	Česká státní norma
ČSN EN	Česká verze evropské normy
ČSN EN ISO	Česká verze mezinárodní normy (převzaté evropskou komisí pro normalizaci)
DA	diodové pole (angl. <i>Diode Array</i> )
DEA	N, N-diethylanilinem
D <sub>max</sub>	přijatelný rozdíl v procentech (angl. <i>acceptable percent difference</i> )
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EFML	<i>European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine</i>
EHK	externí hodnocení kvality
EP15-A3	<i>User Verification of Precision and Estimation of Bias, 3rd ed.</i>
EQC	externí kontrola kvality (angl. <i>external quality control</i> )
ESWL	extrakorporální litotrypse (angl. <i>extracorporeal shock wave lithotripsy</i> )
FN	Fakultní nemocnice
GUM	Průvodce vyjádřením nejistoty při měření (angl. <i>Guide to the expression of uncertainty in measurement</i> )
HPIC	vysokoúčinná iontová chromatografie (angl. <i>High Pressure Ion Chromatography</i> )

ID	identifikace
IFCC	<i>the International Federation of Clinical Chemists</i>
IQC	interní kontrola kvality (angl. <i>internal quality control</i> )
IR	infračervené záření (angl. <i>InfraRed</i> nebo <i>infrared radiation</i> )
ISE	iontově-selektivní elektroda (angl. <i>Ion-Selective Electrode</i> )
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci (angl. <i>International Organization for Standardization</i> )
IUPAC	<i>the International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
IVD	in vitro diagnostikum
IVU	vyučovací urografie (angl. <i>intravenous urography</i> )
KL	klinická laboratoř
LDH	laktátdehydrogenáza
LDLo	nejmenší pozorovaná smrtná dávka (angl. <i>lethal dose low</i> )
LED	elektroluminiscenční dioda (angl. <i>Light-Emitting Diode</i> )
LIH	lipémie, ikterita, hemolýza
LIS	laboratorní informační systém
LoD	mez detekce (angl. <i>limit of detection</i> )
LoQ	mez stanovitelnosti (angl. <i>limit of quantification</i> )
LSC	nejmenší významná změna (angl. <i>least significance change</i> )
MBTH	3-Methyl-2-benzothiazolinon-hydrazon
MDH	malátdehydrogenáza
MET	medikamentózní expulzní terapie (angl. <i>medical expulsive therapy</i> )
NAD <sup>+</sup>	nikotinamidadenindinukleotid – oxidovaná forma
NADH <sub>2</sub>	nikotinamidadenindinukleotid – redukovaná forma
NASKL	Národní autorizační středisko pro klinické laboratoře
NCCT	bezkontrastní počítačová tomografie (angl. <i>non-contrast-enhanced computed tomography</i> )
NČLP	národní číselník laboratorních položek
NIS	nemocniční informační systém
NSAID	nesteroidní protizánětlivé léky (angl. <i>non-steroidal anti-inflammatory drugs</i> )
OD	optická hustota (angl. <i>optical density</i> )
PNL	perkutánní nefrolitotomie (angl. <i>percutaneous nephrolithotomy</i> )
QC	kontrola kvality (angl. <i>quality control</i> )

RCV	referenční změna hodnoty (angl. <i>reference change values</i> )
RP–HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na nepolárních absorbentech (angl. <i>revers phase–high–performance liquid chromatography</i> )
RTG	rentgen
SD	směrodatná odchylka (angl. <i>standard deviation</i> )
SEKK	Systém externí kontroly kvality
SI	systém mezinárodních jednotek (franc. <i>Le Système International d'Unités</i> )
SLN	standardní postupy společné pro lékaře a sestry
SLP	Správná laboratorní praxe
TE	celková chyba (angl. <i>total error</i> )
ÚKBH	Ústav klinické biochemie a hematologie
USA	Spojené státy americké (angl. <i>United states of America</i> )
UV	ultrafialové záření (angl. <i>Ultraviolet</i> )
VIM	mezinárodní metrologický slovník (angl. <i>International vocabulary of metrology</i> )
VIS	viditelné světlo