

Praktické cvičení č.4

datum:..... jméno:.....

Téma: Carryover (zavlečená chyba měření) - příklad stanovení**Přístroje a pomůcky:**

Automatický analyzátor cobas 6000 (Roche)

Diagnostická souprava GLUC2 (stanovení s hexokinázou, Roche)

Standardní roztok glukózy

Stojánky, zkumavky, mikropipety, dávkovače, špičky, odměrné baňky,

Úkoly:

- 1) Vypočítejte navážku glukózy na přípravu 500 ml standardního roztoku glukózy s koncentrací glukózy 200 mmol/l.
Mr (glukóza.H₂O) = 198,18

Navážka glukózy je:	g
----------------------------------	----------

- 2) Vypočítejte kolik ml standardního roztoku glukózy s koncentrací glukózy 200 mmol/l a kolik ml destilované vody je potřeba na přípravu dvou roztoků s koncentrací glukózy 5,00 mmol/l a 22,00 mmol/l (označené N a V), aby výsledný objem byl 100 ml.

5,00 mmol/l roztok N		22,00 mmmol/l roztok V	
Objem standardního roztoku ml	Objem standardního roztoku ml
Objem destilované vody ml	Objem destilované vody ml

- 3) Pokud by měření probíhalo, 43 vzorků glukózy by se v pořadí dle následující tabulky změřilo v nepřetržité řadě na analyzátoru.

Vzorek č.	Vzorek glukózy	Vzorek č.	Vzorek glukózy	Vzorek č.	Vzorek glukózy	Vzorek č.	Vzorek glukózy
1	V	13	V	25	V	37	V
2	V	14	V	26	V	38	V
3	V	15	V	27	V	39	V
4	N	16	N	28	N	40	N
5	N	17	N	29	N	41	N
6	N	18	N	30	N	42	N
7	V	19	V	31	V	43	V
8	V	20	V	32	V		
9	V	21	V	33	V		
10	N	22	N	34	N		
11	N	23	N	35	N		
12	N	24	N	36	N		

- 4) Uvažujme, že výsledky byly následující:

Vzorek č.	Glukóza (mmol/l)	Vzorek č.	Glukóza (mmol/l)	Vzorek č.	Glukóza (mmol/l)	Vzorek č.	Glukóza (mmol/l)
1	21,8	13	22,0	25	21,8	37	21,9
2	21,9	14	21,9	26	21,9	38	22,0
3	21,8	15	21,9	27	21,9	39	21,8
4	5,0	16	5,0	28	5,0	40	4,8
5	4,9	17	4,8	29	4,9	41	4,9
6	5,0	18	4,9	30	4,9	42	4,9
7	21,8	19	21,8	31	22,0	43	22,0
8	21,9	20	21,9	32	21,9		
9	21,9	21	21,9	33	22,0		
10	4,9	22	4,9	34	5,0		
11	4,9	23	4,9	35	4,9		
12	5,0	24	4,9	36	5,0		

5) Výsledky nyní uspořádejte do čtyř skupin označených A - B - C - D

A		B		C		D	
Vzorek č.	Glukóza (mmol/l)	Vzorek č.	Glukóza (mmol/l)	Vzorek č.	Glukóza (mmol/l)	Vzorek č.	Glukóza (mmol/l)
3		7		6		4	
9		13		12		10	
15		19		18		16	
21		25		24		22	
27		31		30		28	
33		37		36		34	
39		43		42		40	

6) Data uspořádejte pomocí počítačového programu Excel a statisticky vyhodnoťte a rozhodněte, zda se hodnoty ve sloupcích A a B liší. Stejným způsobem vyhodnoťte hodnoty ve sloupcích C a D.

Postup:

- *Otevřete Excel*
- *Nástroje - Analýza dat* (v případě, že tato položka není v nástrojích vidět vybrat Doplnky, zatrhnout Analytické nástroje, OK – pak se již Analýza dat v nástrojích objeví)
- *Vybereme: Dvouvýběrový t-test s rovností rozptylů - OK*
- *Vstup 1.soubor: označíme hodnoty v prvním souboru (např. soubor A) - OK*
- *Vstup 2.soubor: označíme hodnoty v druhém souboru (např. soubor B) - OK*
- *Možnosti výstupu: Nový list nebo Výstupní oblast*
- *Hodnoty vytisknout, vyhodnotit data*

Dvouvýběrový t-test s rovností rozptylů		
	Soubor 1	Soubor 2
Střední hodnota (průměr)		
Rozptyl (s^2)		
Pozorování		
t stat		
t krit(2)		
Je vypočítaná hodnota (t stat) větší než hodnota tabelovaná (t krit(2))?		
	ANO	NE
Pokud ANO: můžeme zamítnout nulovou hypotézu, máme 95% jistotu, že mezi souborem 1 a souborem 2 je významný rozdíl		
	Rozdíl mezi soubory A a B: mmol/l
	Rozdíl mezi soubory C a D: mmol/l

Závěr:

Téma: Ověření některých vlastností analytické metody

Úkol:

1. sledování průběhu reakce metody pro stanovení celkového bilirubinu
2. určení vhodných měřicích bodů
3. vymezení horní hranice pracovního rozsahu metody

4. analýza vzorků s koncentrací analytu nad pracovní rozsah metody – rerun funkce analyzátoru

Přístroje a pomůcky:

Automatický analyzátor Cobas 6000 (Roche),
zásobní standard bilirubinu o koncentraci 1566 $\mu\text{mol/l}$, reagentie pro stanovení celkového bilirubinu T Bili (Roche Diagnostic), zkumavky, pipety, destilovaná voda

Provedení:

1. sledování průběhu reakce metody použité pro stanovení bilirubinu

- na analyzátoru prohlédněte průběh reakce stanovení bilirubinu o koncentraci cca 200 $\mu\text{mol/l}$
- z průběhu reakční závislosti určete o jaký typ reakce se jedná

Závěr: _____

2. určení vhodných měřících bodů

- na základě znalosti průběhu reakce určete body (čas) vhodné pro měření absorbance vzorku

Závěr: _____

3. vymezení horní hranice pracovního rozsahu metody

- ze zásobního standardu bilirubinu koncentrace 1380 $\mu\text{mol/l}$ připravte ředěním destilovanou vodou řadu vzorků o koncentracích uvedených v tabulce 1 tak, aby výsledný objem naředěných vzorků byl kolem 200 μl .
- vzorky dobře promíchejte a analyzujte za podmínek určených v bodě 2
- naměřené hodnoty koncentrací a jejich průměr запиšte do tabulky 1
- sestrojte v Excelu graf závislosti koncentrací bilirubinu nalezených ve vzorcích neředěných i ředěných na teoretických koncentracích z tabulky 1
- ze znázorněné závislosti odhadněte horní hranici pracovního rozsahu analytické metody

Tabulka 1

Číslo vzorku	Koncentrace bilirubinu ($\mu\text{mol/l}$) (teoretická)	Objem zásobního standardu (μl)	Objem destilované vody (μl)	Konc. bilirubinu naměřené ($\mu\text{mol/l}$)	Konc. bilirubinu naměřené ($\mu\text{mol/l}$) - Rerun
1	0	0	200		
2		10	190		
3		20	180		
4		50	150		
5		80	120		
6		100	100		
7		150	50		
8	1380	200	0		

Závěr: _____

Téma praktika: Interference (hemolýza, chylozita, bilirubin)

Přístroje a pomůcky:

Automatický biochemický analyzátor
Sérové vzorky (hemolytické, chylózní, ikterické)

Úkoly:

- 1) Na větším počtu vzorků se seznamte s vizuální klasifikací hemolytických, chylózních a ikterických vzorků –
např. slabá hemolýza
hemolýza
silná hemolýza

- 2) Seznámení s jinými typy interference:

Léky – např. diuretika a kortikosteroidy zvyšují kreatinin, marihuana a vankomycin kreatinin naopak snižují
estrogeny – zvyšují Cu v séru

Gamapatie - ve vzácných případech při této diagnóze může být KM snížena, bilirubin zvýšen.
Monoklonální imunoglobuliny jsou u turbidimetrických metod pravidelně zvýšeny – nelze je správně stanovit jinak než elektroforeticky.

Interference vzniklá nedodržením preanalytických podmínek – zvýšené parametry po podávání Fe, T4, infuzi, intenzivní fyzické aktivitě (CK).

- 3) V biochemickém analyzátoru vypište sérové indexy a zapište je (po krátkém seznámení s významem sérových indexů):

L: H: I:

- 4) Interference mohou být jak pozitivní, tak negativní. Uveďte, zda budou výsledky zvýšené nebo snižené u následujících parametrů: K, LD, Bil přímý, AST.

Závěr:

- 5) Seznamte se s komentováním interference u vzorků pacientů v LIS, vložení komentáře si prakticky vyzkoušejte
- 6) Teoreticky se seznamte s možností vyřešení lipemického séra (mléčně zkaleného) s využitím zkumavky Lipoclear:

Pracovní postup:

1. Zkumavku Lipoclear po vyjmutí z lednice necháme stát 5 min. při pokojové teplotě
2. Do zkumavky napipetujeme 1,5 ml séra, dobře promícháme
3. Necháme stát dalších 5 min. při pokojové teplotě
4. Zcentrifugujeme na centrifuze 2 min. při 10 000 ot.
5. Opatrně odstraníme tukovou vrstvu, která se vytvořila na povrchu
6. Všechny výsledky vynásobíme faktorem 1,2 (jako kompenzace ředění originálního vzorku)

Vyčeřování se používá, obsahuje-li mléčně zkalené sérum některou z následujících metod:

Mg, Ca, IgG, CB, Krea

Vyčeřování se nepoužívá, je-li požadováno vyšetření Chol, TG, HDL-Chol, LDL-Chol, APO A1, APO B, IgM, CRP, amoniak, alkohol, ionty a osmolalita.

V případě, kdy se jedná o kombinaci vyšetření z obou skupin, stanovuje se část vzorku z vyčeřeného a část z nevyčeřeného séra.

Závěr: