

Vztah patobiochemie a klinické biochemie.  
Klinicko-biochemická analytika a její specifické  
rysy. Terminologie klinické biochemie.  
Analyzovaný materiál. Odběr materiálu.

# Vztah patobiochemie a klinické biochemie

- **Patobiochemie** = obor zabývající se biochemickými procesy za patologických stavů/biochemickými mechanismy, které vedou ke vzniku určité nemoci.
- **Klinická biochemie** = interdisciplinární obor zaměřený na zkoumání základních biochemických procesů v lidském organismu z hlediska lidského zdraví resp. z hlediska léčení nemocí, popřípadě z důvodu prevence vzniku nemoci.

# Klinicko-biochemická analytika

- **Biochemický analyt** = vyšetřovaná biochemická látka.
- Analyty mohou být **endogenního** nebo **exogenního** původu.
  - **Analyty endogenního původu: substráty a produkty buněčného metabolismu:** ionty, minerály, enzymy, vitamíny, stopové prvky a další látky, které se fyziologicky nachází v lidském organismu.
  - **Analyty exogenního původu: látky přírodního původu** (toxiny živočichů, hub, rostlin, plísní, bakterií, alergenů), **léky** a jejich metabolity, **alkoholy, drogy, látky zneužívané k doping, průmyslové produkty, průmyslové odpady.**
- **Laboratorní vyšetření** analytu se provádí přesně definovanou vyšetřovací metodou a skládá se ze **3 částí: preanalytické, analytické a postanalytické fáze.**

# Preanalytická fáze

- **Příprava pacienta** k odběru biologického vzorku.
- Odběr biologického vzorku.
- Preanalytická **úprava vzorku** po odběru (přidání antikoagulační přísady – získání nesrážlivé krve, NaF pro vyšetření koncentrace glukózy v plazmě, konzervačních látek ...).
- **Vyplnění žádanky**.
- **Transport vzorku** do klinické laboratoře.
- **Příjem vzorku**.
- **Separace séra/plazmy** od buněčné složky krve.
- **Uložení vzorků/jeho alikvotů** (pokud není vzorek bezprostředně vyšetřen).
- Dočasná archivace vzorku pro případné opakování analýzy.
- **Příprava vzorků analytických** fyzikální a chemickou úpravou **vzorků biologických** (úprava pH, zahušťování, ředění, dialýza, sedimentace, filtrace, extrakce do organické fáze, denaturace bílkovin, mineralizace, amplifikace – molekulárně biologická vyšetření, sušení, homogenizace, lyofilizace...).
- **Nestandardní podmínky preanalytické fáze** (nesprávně provedený odběr, nepřijatelná doba transportu, nejednoznačná identifikace vzorků, nedostatečně vyplněná žádanka, vylitý obsah zkumavek...) → **klinické laboratoře mají povinnost odmítnout materiál**.

# Analytická fáze

- **Příprava analytického systému:** spuštění laboratorních přístrojů, temperování vodních lázní, provedení optických testů a kalibrace, vnitřní kontrola kvality).
- Analýza biologického vzorku **příslušnou vyšetřovací metodou.**
- **Přepočet měrných fyzikálně-chemických veličin** (absorbance, fluorescence, chemiluminiscence atd.) na **koncentrace analytu vyjádřené v obvyklých jednotkách.**

# Postanalytická fáze

- Vyjádření získaného výsledku zaokrouhleného na příslušný počet desetinných míst a dosazení získaných hodnot do vzorců (např. pro výpočet ledvinové clearance).
- **Interpretace výsledku** vzhledem k fyziologickému rozmezí hodnot, diagnóze, stádiu choroby, fázi její léčby a též k hodnotám analytu naměřeným při přechozím odběru.
- **Potvrzení výsledku zdravotní laborantkou a klinickým biochemikem.**
- **Odeslání výsledku** (tištěná podoba/elektronická podoba) ošetřujícímu lékaři.
- V některých případech může být výsledek vydán přímo pacientovi nebo osobám právně zmocněným k jeho převzetí.

# Preanalytické vlivy na výsledek laboratorního vyšetření

- K ovlivnění výsledku laboratorního vyšetření může dojít ve všech třech fázích.
- **Nejdůležitější** z hlediska možného **ovlivnění výsledků** je **období preanalytické**.
- V **preanalytické fázi** může být výsledek ovlivněn:
  - *Osobou pacienta*
  - *Odběrem vzorku*
  - *Transportem vzorku*
  - *Uchováváním vzorku před analýzou*
  - *Přípravou vzorku ke zpracování*

# Osoba pacienta-faktory ovlivnitelné

- **Pohlaví** (většina laboratorních testů na pohlaví nezávisí, ale najdeme i metody, u kterých se referenční rozmezí u žen a mužů liší, např. parametry červeného krevního obrazu).
- **Rasa, etnická či sociální skupina obyvatel** (např. negroidní rasy mají výrazně menší počet granulocytů než běloši, liší se i v referenčních hodnotách dalších testů, jako je amyláza, alkalická fosfatáza, kreatinínáza). Příslušníci etnických skupin se mohou lišit např. frekvencí určitých genů a tedy i výskytem dědičných poruch metabolismu. Referenční hodnoty mohou být ovlivněny i stravovacími návyky typickými pro určitou etnickou či sociální skupinu obyvatel.
- **Věk:** většina testů má v dětském věku nižší horní hranici referenčního rozmezí. Např. vyšší aktivita kyselé alkalické fosfatázy a koncentrace anorganického fosforu v důsledku tvorby kostní tkáně. Výsledky některých laboratorních testů (např. clearance kreatininu) je nutné u dětí korigovat podle hmotnosti nebo povrchu těla.
- **Současně probíhající jiná nemoc** (např. u pacienta s revmatoidní artritidou nalezneme zvýšenou hodnotu c-reaktivního proteinu).
- **Biologický poločas analytu** (např. diagnostika infarktu myokardu dle aktivity enzymů a hladin svalových proteinů v séru). Znalost rychlosti vylučování látky z organismu má velký význam při hodnocení hladin léků a toxických látek = **poločas eliminace xenobiotika**.
- **Způsob stanovení referenčních hodnot.**



# Osoba pacienta-faktory ovlivnitelné

- **Gravidita:** v krvi a moči matky se objevují bílkoviny a jiné látky produkované trofoblastem nebo orgány plodu (hCG, SP-1,  $\alpha$ 1-fetoprotein, placentární alkalická fosfatáza, estrogeny...). Hormonální vlivy se uplatní i u některých běžných metabolitů: v posledním trimestru stoupá cholesterolemie, vlivem hemodiluce klesá koncentrace hemoglobinu, stoupá glomerulární filtrace → pokles kreatininu i močoviny v séru...
- **Cyklické změny** (např. diurnální rytmus kortizolu, měsíční rytmus vylučování ženských pohlavních hormonů. Cirkadiánnímu rytmu podléhají také koncentrace některých jiných analytů.

Tab. 2.1. Příklady některých laboratorních metod, jejichž výsledky podléhají diurnálnímu rytmu

Analyt	Maximum	Minimum	Rozdíl v %	Příčina
kreatinin	večer	ráno	až 50	fyzická aktivita
glomerulární filtrace	ráno	večer	až 80	oběhové změny
železo	6-9 h	22-24 h	25 (až 100)	neznámá; někdy inverzní rytmus
celková bílkovina	ráno	večer	až 30	hemokoncentrace ráno
hemoglobin	ráno	večer	15-30	hemokoncentrace ráno
draslík	6-9 h	18-24 h	10	neznámá
anorganický fosfor	6-9 h	20-24 h	15	neznámá

# Osoba pacienta-faktory neovlivnitelné

- **Fyzická aktivita** (např. stoupá koncentrace celkové bílkoviny a látek na ni vázaných, mění se pH (při anaerobní zátěži), zvyšuje se koncentrace laktátu, uvolňují se svalové bílkoviny do krevního oběhu (stoupá aktivita CK, AST, LD, koncentrace myoglobinu)...Velikost změn závisí na řadě faktorů, jako je délka zátěže, intenzita zátěže (aerobní, anaerobní), trénovanost jedince.
- **Psychický stres** vede k vyplavení hormonů kůry a dřeně nadledvin a jejich metabolickými účinky, např. hyperglykemií, vzestupem koncentrace volných mastných kyselin...
- **Potrava, alkohol, příjem tekutin.**
- **Kouření** (např. může ovlivnit rychlost metabolizace léku teofylinu).
- **Léky:** lék může působit na metabolismus analytu (mění jeho rychlost např. indukci syntézy či naopak inhibicí enzymů, ovlivňují vazbu na transportní bílkoviny...) nebo může rušit (interferovat) při vlastní chemické reakci (např. maskování přítomnosti glukózy/krve v moči kyselinou askorbovou při vyšetření diagnostickým proužkem).
- **Operace:** narkotikum (hepatotoxicita), zhmožděná tkáň a řez tkání (vzestup aktivity CK, AST, LD, koncentrace myoglobinu), hormonální odpověď na stres.

# Základní vzorky biologického materiálu

- Krev srážlivá
- Krev nesrážlivá
- Krevní sérum
- Krevní plazma
- Moč (jednorázová, sbíraná)
- Pot
- Žaludeční obsah
- Likvor (mozkomíšní mok)
- Výpotek a jiné tělesné tekutiny
- Stolice
- Kostní dřeň

# Odběr vzorku

- Záleží na **poloze pacienta** určitou dobu před odběrem a během odběru vzorku a **druhu odebrané krve**. Výsledek také mohou ovlivnit **přídavky** k odebrané krvi a **druh nádobky**.
- **Odběr venózní krve:** z loketní žíly.
  - **Poloha pacienta:** doporučuje se odběr v **leže**. Vstojí dochází k přesunu tekutiny z intravazálního prostoru do intersticia a koncentrace vysokomolekulárních látek (a látek na ně vázaných) v krvi včetně hematokritu může stoupnout o 10 – 15 %.
  - **Dezinfekce kůže:** použití alkoholického roztoku dezinfekce před odběrem krve na stanovení koncentrace alkoholu → falešně pozitivní výsledek. Dezinfekce kůže povrchově aktivní látkou (Ajatin) → hemolýza.
  - **Stažení paže + cvičení** by mělo být **co nejkratší**, jinak může dojít k výše uvedenému přesunu tekutiny, anaerobnímu metabolismu (lokální acidóza).
  - **Pozor na podtlak při nasávání krve.** Příliš **velký podtlak** → mechanická **hemodialýza**.
- **Odběr jiných typů krve než venózní:** kapilární krev (např. z bříška prstu pro stanovení glykémie), tepenná krev (vyšetření krevních plynů), arterializovaná kapilární krev (vyšetření acidobazické rovnováhy).

# Odběrová nádobka

- **Popsat nádobku jménem pacienta před vlastním odběrem vzorku!** Je možné také identifikovat pacienta **pomocí kódu**, např. čárového.
- **Krev vypouštět** ze stříkačky **pomalou**, nikdy **ne přes jehlu** (aby nedošlo k hemolýze).
- Většina vyšetření se provádí ze séra → krev se musí nechat srazit.
- **Nejvhodnější** jsou odběrové nádobky **na jedno použití**. Většinou jsou z **plastové hmoty** (krev se v nich pomalu a nedostatečně sráží, častěji dochází k hemolýze) → výrobce opatřuje stěny odběrových zkumavek **vrstvou kaolinu či skelnou vatou** → **urychlení srážení**. **Oddělení séra** umožňuje speciální **interní gel** (tvoří rozhraní mezi krvinkami a vrstvou séra).
- **Skleněné nádobky** → **lepší srážlivost krve**, **ALE**: častější prasknutí při odstředování (znehodnocení vzorku, kontaminace centrifugy). Před **opakovaným použitím** je nutné nádobku **dekontaminovat a umýt** → **zbytky činidel** ve zkumavce → **znehodnocení výsledků analýzy**.

# Vyšetření z nesrážlivé krve a plazmy

- Pro některá vyšetření je nutné získat nesrážlivou krev, jde o vyšetření prováděná z **celé krve** (acidobazická rovnováha, laktát, glykémie, minerály pomocí iontově selektivních elektrod) z **erytorcytů** (glykovaný hemoglobin, kalium/magnezium v erythrocytech, 2,3-bisfosfoglycerát, superoxiddismutáza, glutathion...) nebo **plazmy** (fibrinogen, kyselá fosfatáza).
- Důležité je dodržet předepsaný **poměr mezi objemem roztoku antikoagulantu a přidané krve**.
- **Krev se vždy přidává do odběrové nádoby s antikoagulačním přípravkem**, nikdy naopak.
- **Antikoagulační přípravek ovlivňuje složení odebrané krve**. Např. všechny antikoagulanty včetně heparinu vážou  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$  a snižují tak jejich koncentraci. Pro stanovení koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  musíme používat heparin vytitrovaný těmito ionty. Může dojít k inhibici různých enzymů. Všechny antikoagulanty jsou anionty, kde doprovodný kation je  $\text{Na}^+$  ( $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Li}^+$ ). Např. pro stanovení iontů z krve odebrané do nádoby určené pro stanovení glykémie (obsahuje  $\text{NaF}$  a  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) dostaneme hodnotu  $\text{Na}^+$  zvýšenou.

# Transport vzorku

- Transport krve probíhá v **uzavřených odběrových nádobkách**.
- **Krev** při transportu **chráníme před extrémní teplotou** (v teple dochází k inaktivaci enzymů, rychleji klesá koncentrace glukózy, mráz může způsobit hemolýzu).
- Vystavení krve světlu může způsobit odbourávání bilirubinu.
- Transport musí být **dostatečně rychlý**, aby mohlo být odděleno sérum od krvinek (1-2 h od odběru v závislosti na analytu).
- Na **delší vzdálenost** vždy **raději posíláme sérum** než celou krev (hrozí mechanická hemolýza).

# Uchovávání vzorku

- **Podmínky uchovávání** mají vliv na **stabilitu analytů**.
- Při **delším stání** odebrané krve dochází k vyčerpání energetických zdrojů erytrocytů (glukózy) → porucha funkce membrány (zajišťuje transport  $\text{Na}^+$  ven a  $\text{K}^+$  do buňky) → únik  $\text{K}^+$  z erytrocytů → hyperkalémie.
- **Uchovávání v teple** → leukocyty spotřebovávají kyslík + produkce  $\text{CO}_2$  + anaerobní glykolýza v erytrocytech → **pokles pH krve**. Proto se krev na vyšetření acidobazické rovnováhy a krevních plynů uchovává na ledu.
- **Při stanovení glykémie/laktátu se přidává NaF** → **inhibice glykolýzy**. Bez přídavku NaF klesá glykémie činností erytrocytů.
- **Většina vyšetření** se provádí z krevního **séra**. Uchovává se **v chladničce při +4°C** v dobře zavřené zkumavce, aby nedošlo k zahuštění vzorku odpařením vody (analyty a enzymy jsou stabilní několik dní). **Delší skladování** → uchovávání **zmraženého séra** (při **-20°C/-80°C**).
- **Chemická konverzační činidla** se pro stabilizaci séra užívají vzácně (nesmí interferovat při analýze). Používají se pouze pro konverzaci vzorků moči → vždy vybíráme podle druhu analýzy. Příklady chemických konzervačních činidel: thymol v izopropanolu, HCl, formalin (fixace buněk).



# Prvotní zpracování a příprava vzorku k analýze

- **Odstředění krve.** Příliš razantní → hemolýza krve !
- **Oddělení séra/plazmy.**
- **Deproteinace** vzorku před analýzou (obvykle pomocí chemického činidla → volit dle následné analýzy).
- **Zahuštění vzorku** (např. zahušťování bílkovin obsažených v moči/mozkomíšním moku před jejich separací elektroforézou, volit správnou velikost pórů).
- Vzácněji další postupy (např. promývání erytrocytů).

# Hemolýza

- = rozpad erytrocytů + vylití jejich obsahu včetně červeného krevního braviva do plazmy (séra).
- K hemolýze obvykle dochází *in vitro*, tj. při odběru, transportu a zpracování krve.
- **Ovlivnění výsledků hemolýzou:**
  - Z erytrocytů se do plazmy uvolňuje intracelulární obsah erytrocytů → **zvýšení koncentrace intracelulárních komponent** (např. LD, AST, ACP, draslíku).
  - **Červená barva hemoglobinu** vadí při fotometrickém stanovení analytů.
  - **Hemoglobin působí jako pufr a mění pH činidla** → ovlivňuje průběh reakce (např. stanovení albuminu, hemolýza výsledek snižuje).
- **Podle příčiny dělíme hemolýzu na:**
  - **Mechanickou** (příliš silné třepání, nasávání krve při odběru jehlou/vystřikování krve jehlou, centrifugace při vysokých otáčkách, transport plné krve na delší vzdálenost aj.)
  - **Osmotickou** (mokrý zkuševník)
  - **Teplou** (krev vystavena mrazu/vysoké teplotě).
  - **Chemickou** (dezinfekční prostředek, který rozrušuje membránu erytrocytů).

# Vyšetřovací metody v klinické biochemii

- **Laboratorní pozorování:**

- analyt vyšetřován **lidskými smysly** (zrak, čich).
- Často se používá **mikroskop**, např. mikroskopické určení močového kamene (konkrementu).
- Laboratorní **pozorování = kvalitativní analýza** → hodnotíme, co je přítomno ve vzorku, nevyjadřujeme se k množství, obsahu nebo koncentraci analytu.
- Kvalitativní biochemické metody patří mezi Identifikační metody → provádíme **průkaz (důkazu) analytu** = určíme **přítomnost/nepřítomnost** analytu ve vzorku.

# Vyšetřovací metody v klinické biochemii

- **Laboratorní měření:**

- Analýza se provádí v **biochemických analyzátoch**.
- Vyšetření založeno na **snímání fyzikálních nebo chemických veličin pomocí detektorů** → laboratorní měření.
- **Instrumentální vyšetřovací metody:** metody **optické** (spektrofotometrie v UV-VIS, reflexní fotometrie, atomová absorpční spektrometrie, luminiscenční spektrometrie, turbidimetrie, nefelometrie), **separační** (chromatografie, elektroforéza, hmotnostní spektrometrie, ultracentrifugace), **elektrochemické** (potenciometrie, amperometrie, coulometrie, konduktometrie), **fyzikální** (osmometrie, průtoková cytometrie) a **mikroskopické** (diaskopická a episkopická mikroskopie).
- **Laboratorní měření kvalitativního charakteru:** výsledek měření při hodnocení daného vzorku odpovídá **pozitivní/negativní** odezvě detektoru. Např. průkaz mutace genu pomocí metody real-time PCR, v laboratorním nálezu hodnotíme přítomnost/nepřítomnost mutace.
- **Laboratorní měření kvantitativního charakteru:** odezva detektoru je v určitém měřicím intervalu úměrná intenzitě měřené fyzikálně-chemické veličiny (Lambert-Beerův zákon). Máme-li dostatečně velký počet kalibračních standardů, můžeme jejich analýzou určit závislost měřené veličiny na koncentraci analytu → získáme **rovnice kalibrační přímky** → určení koncentrace analytu. **Výsledek se vyjadřuje numericky a je opatřen jednotkou** (mmol/l, μmol/l, g/l, mg/l, μkat/l). určujeme **koncentraci/množství** sledovaného analytu ve vzorku, stanovujeme daný analyt ve vzorku.
- **Laboratorní měření semikvantitativního charakteru:** pro hodnocení analytu nemáme referenční vzorek (kalibrátor) → **nejsme schopni definovat rovnici kalibrační křivky**. Koncentraci **můžeme pouze odhadnout**, můžeme říci, jestli je patologická, fyziologická nebo nízká, střední, vysoká (na základě, zkušeností, spolehlivosti přístrojů a referenčních vzorků obsahujících známé množství látky o podobných fyzikálně-chemických a biologických vlastnostech jako je sledovaný analyt). Např. imunochemická analýza benzodiazepinů (přístroj je nakalibrovaný na jedno léčivo ze skupiny benzodiazepinů a ostatní léčiva této skupiny se vyšetřují s nižší spolehlivostí).

# Zdroje:

- BERÁNEK, Martin a Miloš TICHÝ. *Vybrané kapitoly z klinické biochemie: pro studijní program Zdravotnická bioanalytika*. Praha: Karolinum, 2013. ISBN 978-80-246-2186-9.
- RACEK, Jaroslav. *Klinická biochemie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Galén, c2006. ISBN 80-726-2324-9.
- <http://lekarske.slovniky.cz/pojem/patobiochemie>
- [https://cs.wikipedia.org/wiki/Klinická\\_biochemie](https://cs.wikipedia.org/wiki/Klinická_biochemie)