

Specifické rysy klinicko - biochemické analytiky

- PREANALYTICKÁ fáze
- ANALYTICKÁ fáze
- POSTANALYTICKÁ fáze

Analytická fáze nemůže korigovat chyby fáze preanalytické

(G.von Borovitzeny)

Faktory neovlivnitelné

- Pohlaví
- Rasa, etnická a sociální skupina
- Věk
- Cyklické změny
- Gravidita
- Biologický poločas
- Současně probíhající jiná nemoc
- **Způsob stanovení referenčních hodnot**

Faktory ovlivnitelné

- Fyzická aktivita před odběrem
- Psychický stres
- Dieta
- Kouření
- Léky
- Nadmořská výška
- Operace

3

PREANALYTICKÁ fáze

- Před odběrem biologického materiálu
- Při odběru biologického materiálu
- Mezi odběrem a analýzou biologického materiálu (transport)

ANALYTICKÁ fáze

- ✓ Standardní operační postupy (SOP)
 - analytické
 - technické
 - logistické
 - statistické

POSTANALYTICKÁ fáze

- ✓ Validace výsledků
- ✓ Výdej výsledků
- ✓ Uskladnění vzorků
- ✓ další postanalytické činnosti

ANALYZOVANÝ MATERIÁL

■ B-KREV

- VENÓZNÍ / ŽILNÍ (v)
- ARTERIÁLNÍ (a)
- KAPILÁRNÍ (c)

Příklad označení: aB-pO₂ , VB-Glukosa

■ S-krevní SÉRUM

- SRÁŽLIVÁ krev
doba srážení 30min a více
(→ aktivátor srážení, gel +/-)
centrifugace 10 min, 1500x g



■ P-krevní PLAZMA

- NESRÁŽLIVÁ krev
→ protisrážlivá činidla, gel +/-

HEPARIN-Li,Na,NH₄,
EDTA
CITRÁT
OXALÁT

- → po centrifugaci – **B (plná krev)**
P (plazma)

Poměr krve a
antikoagulačního činidla!
Ihned po odběru: 5–10 x šetrně
převrátit, netřepat!

Vzhled séra / plasmy

- HEMOLYTICKÝ
- IKTERICKÝ
- CHYLÓZNÍ

■ U- MOČ

JEDNORÁZOVÁ
SBÍRANÁ

- B- KREV
- S- SÉRUM
- P-PLAZMA
- U- MOČ
- MOZKOMÍŠNÍ MOK (likvor)
- STOLICE
- MOČOVÝ KÁMEN
- VÝPOTEK
- SLINY
- POT

Odběr a zacházení s biologickým materiálem

13

Příprava pacienta před odběrem biologického materiálu

- Informovanost pacienta
- Režim před odběrem

Odběr biologického materiálu

- Načasování odběru
- Místo odběru
- Poloha při odběru
- Způsob odběru a odběrové systémy
- Turniket
- Odběr: Krev
Moč
Mozkomišní mok
Stolice
Sliny, Pot, ...

Odběr krve – obecné podmínky

- 1 - 2 dny vynechat léky?, vitamíny, fyzickou zátěž, vynechat tučná jídla, alkohol, omezit maso; ne po noční směně
- Ráno v 6 - 8 h , nalačno (10 – 12 h)
- Před odběrem nekouřit, nepít kávu, ráno vypít 300 ml neslazeného čaje (vody)
- 30 minut před venepunkcí tělesný klid v čekárně, odběr vsedě/vleže
- Turniket jen na 15 s, „nepumpovat“
- Místo bez jizev, hematomů, ne strana po mastektomii (lymfostáza) nebo s otokem

Odběr krve – obecné podmínky

Odběr musí být

- anaerobní
- bez bublin
- s dokonalým promícháním krve s přidanými činidly


Poloha pacienta při odběru

Rozdíly při změně polohy
vleže - vstoje/vsedě (Guder et al.,1996)

5 -10%	Ca, AST, ALP, albumin, cholesterol, bílkoviny,...
11 – 15%	Ery, hematokrit,...
16 – 50%	Epinefrin,...
>50%	Renin, norepinefrin,...

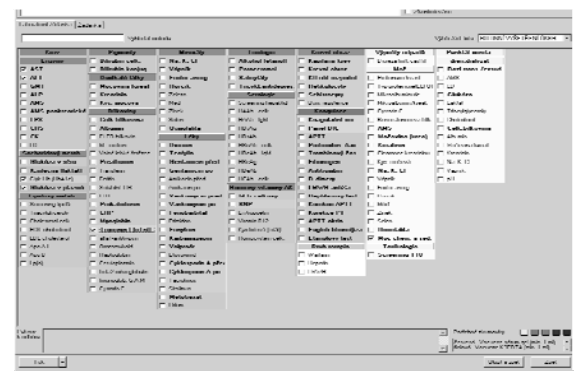
ODBĚROVÉ SOUPRAVY

- **JEDNORÁZOVÉ**
- **SÉRUM** gel x aktivátor srážení
- **PLASMA** heparin NH₄, Li, EDTA, NaF,

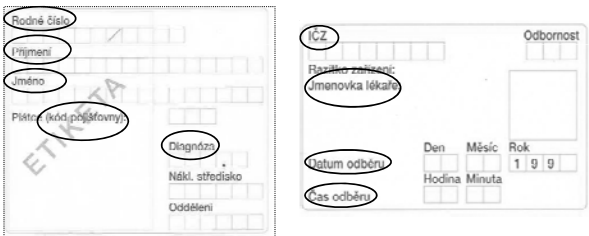


Serum-Gel Aktivátor srážení
Plasma NH ₄ - Heparin
Plasma Lithium-Heparin
Plasma Lithium-Heparin Gel
Hematologie Kaliurn- EDTA

Vyplnění žádanky



Povinné údaje na laboratorní žádance



Required fields on the form include:

- Rodné číslo
- Výjmení
- Jméno
- Příjmení (kód, příjmení)
- Diagnóza
- Nákl. středisko
- Oddělení
- ICZ
- Roční číslo: Jmenovka lékaře
- Datum odběru
- Čas odběru
- Den, Měsíc, Rok (1 9 9)
- Hodina, Minuta
- Odbornost

Transport biologického materiálu

- Donáška
- Automobilová a jiná přeprava
- Potrubiň pošta

Časová odezva (TAT, turnaround time) je doba, za kterou je k dispozici výsledek

- TAT laboratorní
- TAT celkový

Četnost preanalytických chyb

- Hemolýza 40 - 70%
- Nevhodný vzorek 19 - 46%
- Chybná identifikace 1 - 2%
(značení odběrových nádobek/zkumavek 50%,
zadávaní dat do LIS 22%)

Hemolýza

- in vitro > 98%
- in vivo < 2%

ovlivňuje minimálně 40 analytů

Vznik hemolýzy (in vitro)

- Odběr
- Transport
- Zacházení
- Skladování (mimo i v laboratoři)

Mechanismy působení hemolýzy

- Uvolnění hemoglobinu a dalších intracelulárních látek do séra nebo plazmy
 - zvýšení koncentrace (K, LD, ...)
 - snížení koncentrace (Glukosa, Na, ...)
- Chemická interference (ovlivnění CK adenylátkinasou, ...)
- Spektrofotometrická interference

Klinicko-biochemická diagnostika

1. Kvalitativní analýza
2. Semikvantitativní analýza – diagnostické proužky
3. Kvantitativní analýza

■ Spektroskopické metody

- Absorpční

- Fotometrie – UV/VIS (kolorimetrie) – bar. Látky, NAD(P)H
- Atomová absorpční spektroskopie (AAS) – Ca, Mg, Fe, Cu, Mg, Mn, Zn, ...

- Emisní

- Plamenová emisní fotometrie (PES) – Na, K, (Ca, Mg, Li), ...

■ Potenciometrické metody

- pH
- Krevní plyny – pCO₂, pO₂
- Ionově selektivní elektrody – Na, K, Ca

■ Elektroforetické metody – bílkoviny, isoenzymy, lipoproteiny

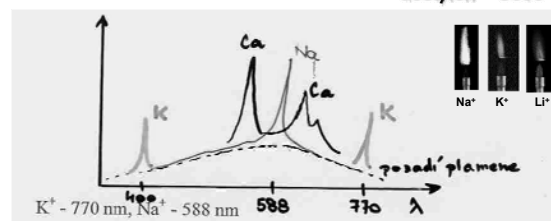
■ Imunochemické metody – bílkoviny, peptidy, hormony, TDM

■ Chromatografické metody – glykovaný Hb (HbA1c), léčiva, metabolity, ...

Analýza anorganických látek

KATIONTY: Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Fe, Zn, ...

PES – vzorek se rozprašuje do plamene (propan ~ 1925 °C, acetylen ~ 3000 °C)



AAS – řádově citlivější; Ca, Mg, Zn, Cu, Al, Fe

ISE – měří aktivitu iontů (závisí na iontové síle, vazbě na bílkoviny a anionty)

Aktivita a vyjadřuje reálné (s termodynamickými rovnicemi konzistentní) působení rozpuštěné složky i (iontu) odpovídající její koncentraci korigované zahrnutím „stínících“ coulombických interakcí vyjádřených **aktivitním koeficientem γ**

$$a_i = C_i \gamma_i$$

Při nekonečném zředění roztoku elektrolytu je $\gamma \rightarrow 1$

4

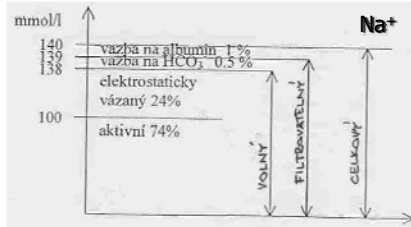
ISE – měří aktivitu iontů (závisí na iontové síle, vazbě na bílkoviny a anionty)

$$a_{Me} = C_{Me} \cdot \gamma_{Me} \dots \text{molární}$$

$$a_{mMe} = m_{Me} \cdot \gamma_{Me} \dots \text{molální}$$

$$\gamma_{Me}(P) = \gamma_{Me}(P) \cdot \rho(H_2O) / \rho_{H_2O}(P)$$

$$\rho_{H_2O}(P) = 0.93 \text{ kg/kg}$$



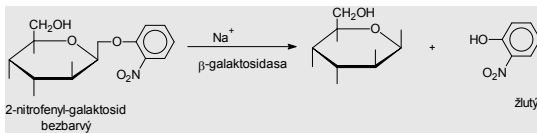
$$\gamma_{Na^+}(P) = 0.74$$

Na⁺ (128-145 mmol/l), K⁺ (3.0-5.2 mmol/l)

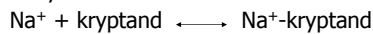
většinou kvantifikovány souběžně

1. PES
2. ISE – Na (speciální sklo), K (valinomycinová eloda)
3. fotometrické metody

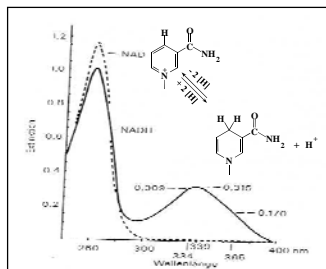
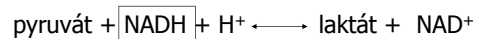
a) Na⁺ enzymaticky



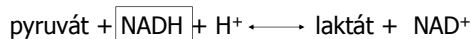
Vyvázení nadbytku Na⁺:



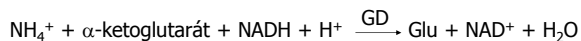
b) K⁺ enzymaticky



b) K⁺ enzymaticky



interference Na⁺ (Na-kryptand),
NH₄⁺ (preinkubace s glutamátdehydrogenasou)



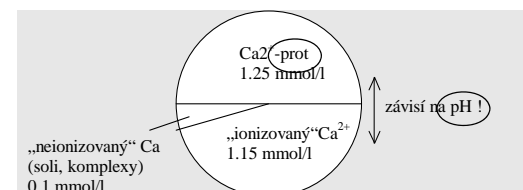
c) vazba do chromogenních crown-etherů (18-crown-6)

Ca²⁺ (2.5 mmol/l)

volný

Vázaný s bílkovinami

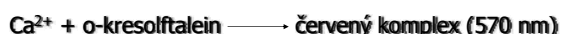
transport plasmou na albuminu (nespecifická vazba, 12-30 Ca na molekulu Alb, kompetice mezi H⁺ a Ca²⁺),
vazba na globuliny (Alb/globuliny ~ 7/2),
vazba i s HCO₃⁻, laktát, citrát ..



Stanovení Ca²⁺

Celkový Ca

- PES, AAS
- Fotometrie – tvorba barevných komplexů (alizarin, methylthymolová modř, o-kresolftaleinkomplexon)

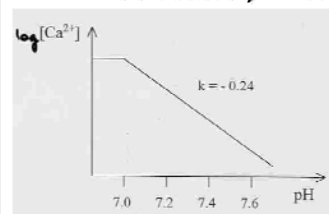


Ionizovaný Ca - ISE

Iontově selektivní membrána:

Iontoměnič – na bázi organofosfátů (dioktylfenylfosfát)

Neutrální nosiče s vhodnými stérickými a elektrostatickými vlastnostmi



$$Y_{\text{Ca}^{2+}} = 0.29$$

Komplikace – koncentrace Ca²⁺ závisí na pH

⇒ **standardizace na pH 7.4**

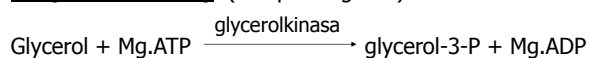
Mg²⁺ (0.65 – 1.05 mmol/l), 71% volný, 22% Alb, 7% globuliny

Poskytuje **barevné komplexy** s řadou látek

Methylthymolová modř ⇒ komplex 510 a 600 nm

kalmagit ⇒ fialový komplex 532 nm

Enzymové metody (komplex Mg.ATP)



Fe (7.16 – 28.6 μmol/l), 500 - 1600 μg/L

AAS

kolorimetrie

Fe²⁺ - **barevné komplexy** s řadou látek bathofenantrolin, trispyridyltriazin (TPTZ), ferrozin (3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-fenylsulfonát)-1,2,4-triazin)

1. Disociace Fe z transferinu (kyselé prostředí)
2. Redukce Fe³⁺ na Fe²⁺ (hydrazin, hydroxylamin, kys. thioglykolová, askorbová, siřičitan, ...)
3. Tvorba komplexů a fotometrie

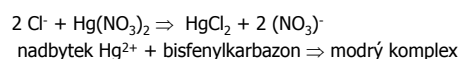
Stanovení ferritinu 15 - 200 μg/L

TIBC – celková vazebná kapacita 2500 - 4000 μg/L nepřímé stanovení transferinu

Saturace transferinu nadbytkem Fe, odstranění nadbytku adsorbentem (ionexy, MgCO₃), stanovení koncentrace Fe v původním vzorku a po nasycení

ANIONTY: Cl⁻ (101 – 111 mmol/l)

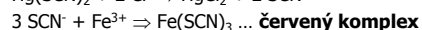
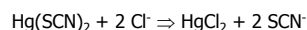
1. Merkurimetrická titrace



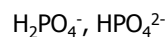
2. Coulometrická titrace (referenční metoda)

titrace Ag⁺ vznikajících elektrolýzou Ag elektrody, měří se doba rozpouštění elektrody do ekvivalentního bodu)

3. Fotometrické stanovení - thiokyanátová metoda



Anorganický fosfor (0.81 – 1.55 mmol/l)



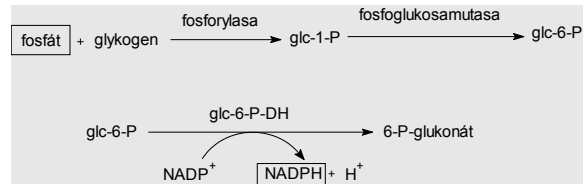
(1:1 acidosa, 1:9 alkalosa, 1:4 pH 7.4, 100:1 pH 4.5 v moči)

1. tvorba fosfomolybdenových komplexů v kyselém prostředí

- měřeny přímo : (NH₄)₃[P(Mo₃O₁₀)₄] ... 340 nm
- po redukci na fosfomolybdenovou modř ... 600 nm (kys. askorbová, kys. aminonaftolsulfonová, SnCl₂, ..)

2. Enzymové metody

Schulz:



Scopes:

