

### Specifické rysy klinicko - biochemické analytiky

- PREANALYTICKÁ fáze
- ANALYTICKÁ fáze
- POSTANALYTICKÁ fáze

Analytická fáze nemůže korigovat chyby fáze preanalytické

(G.von Borovíczeny)

---

---

---

---

---

---

---

---

### 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

---

---

---

---

---

---

---

---

### **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-pO<sub>2</sub> , 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,NH<sub>4</sub>,  
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  
Mozkomíšni mok  
Stolice  
Sliny, Pot, ...

---



---



---



---



---



---



---

## Odběr krve – obecné podmínky

- 1 - 2 dny vynechat léky?, vitaminy, 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 žizev, 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 heparinNH<sub>4</sub>,Li,EDTA,NaF,




Serum-Gel  
Aktivátor srážení

Plasma  
NH<sub>4</sub> - Heparin

Plasma  
Lithium-  
Heparin

Plasma  
Lithium-Heparin  
Gel

Hematologie  
Kaliurn-  
EDTA

 SARSTEDT

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Vyplnění žádanky




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Povinné údaje na laboratorní žádance

**Rodné číslo**

**Příjmení**

**Jméno**

**Pláze ( kód pojistovny)**

**Diagnóza**

**Nákl. středisko**

**Oddělení**

**ICZ**

**Rozložení žadatele**

**Jmenovka lékaře**

**Datum odběru**

**Čas odběru**

Den Měsíc Rok  
1 9 9

Hodina Minuta

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Transport biologického materiálu

- Donáška
- Automobilová a jiná přeprava
- Potrubní 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%,  
zadáání 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 – pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>
  - Iontové 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

---

---

---

---

---

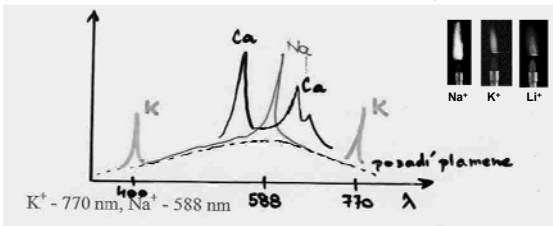
---

---

---

**KATIONTY: Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, 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  $\gamma$**

$$a_i = c_i \gamma_i$$

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

4

---

---

---

---

---

---

---

---

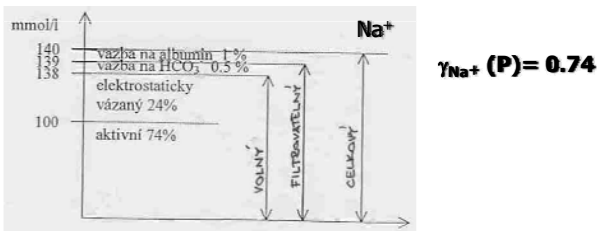
**ISE – měří aktivitu iontů (závisí na iontové síle, vazbě na bílkoviny a anionty)**

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

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

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

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




---

---

---

---

---

---

---

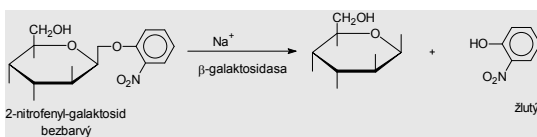
---

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

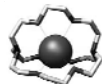
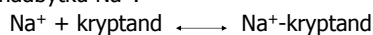
většinou kvantifikovány souběžně

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

a)  $Na^+$  enzymaticky



Vyvázení nadbytku  $Na^+$ :




---

---

---

---

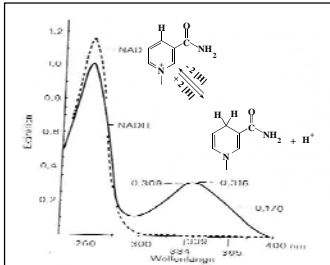
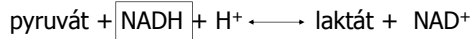
---

---

---

---

b) K<sup>+</sup> enzymaticky




---

---

---

---

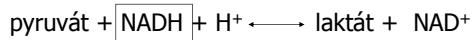
---

---

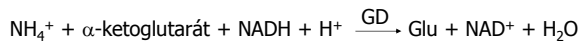
---

---

b) K<sup>+</sup> enzymaticky



*interference Na<sup>+</sup> (Na-kryptand),  
NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (preinkubace s glutamátdehydrogenasou)*



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

---

---

---

---

---

---

---

---

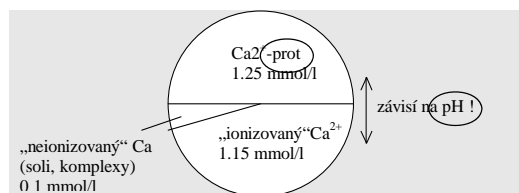
Ca<sup>2+</sup> (2.5 mmol/l)

volný

Vázaný s bílkovinami

transport plasmou na albuminu (nespecifická vazba,  
12-30 Ca na molekulu Alb, kompetice mezi H<sup>+</sup> a Ca<sup>2+</sup>),  
vazba na globuliny (Alb/globuliny ~ 7/2),

vazba i s HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, laktát, citrát ..




---

---

---

---

---

---

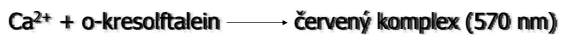
---

---

## Stanovení $\text{Ca}^{2+}$

### Celkový Ca

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




---

---

---

---

---

---

---

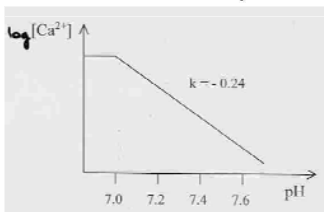
---

## Ionizovaný Ca - ISE

Iontově selektivní membrána:

Iontoměnič – na bázi organofosfátů (dioktylfenylfosfát)

Neutrální nosiče s vhodnými stericými a elektrostatickými vlastnostmi



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

**Komplikace** – koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  závisí na pH

⇒ **standardizace na pH 7.4**

---

---

---

---

---

---

---

---

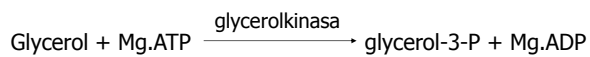
$\text{Mg}^{2+}$  (0.65 – 1.05 mmol/l), 71% volný, 22% Alb, 7% globuliny

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  $\mu\text{mol/l}$ ), 500 - 1600  $\mu\text{g/L}$

### **AAS**

#### **kolorimetrie**

**Fe<sup>2+</sup> - 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 Fe<sup>3+</sup> na Fe<sup>2+</sup> (hydrazin, hydroxylamin, kys. thioglykolová, askorbová, siřičitan, ...)
3. Tvorba komplexů a fotometrie

**Stanovení ferritinu** 15 - 200  $\mu\text{g/L}$

**TIBC** – celková vazebná kapacita 2500 - 4000  $\mu\text{g/L}$   
nepřímé stanovení transferinu

Saturace transferinu nadbytkem Fe, odstranění nadbytku adsorbentem (ionexy, MgCO<sub>3</sub>), stanovení koncentrace Fe v původním vzorku a po nasycení

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### **ANIONTY: Cl<sup>-</sup> (101 – 111 mmol/l)**

1. Merkurimetrická titrace

$2 \text{Cl}^- + \text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \Rightarrow \text{HgCl}_2 + 2 (\text{NO}_3)^-$   
nadbytek Hg<sup>2+</sup> + bisfenylkarbazon  $\Rightarrow$  modrý komplex

2. Coulometrická titrace (referenční metoda)  
titrace Ag<sup>+</sup> vznikajících elektrolýzou Ag elektrody, měří se doba rozpouštění elektrody do ekvivalentního bodu)

3. Fotometrické stanovení - thiokyanátová metoda

$\text{Hg}(\text{SCN})_2 + 2 \text{Cl}^- \Rightarrow \text{HgCl}_2 + 2 \text{SCN}^-$   
 $3 \text{SCN}^- + \text{Fe}^{3+} \Rightarrow \text{Fe}(\text{SCN})_3$  ... **červený komplex**

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### **Anorganický fosfor (0.81 –1.55 mmol/l)**

H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>  
(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 : (NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>[P(Mo<sub>3</sub>O<sub>10</sub>)<sub>4</sub>] ... 340 nm
  - po redukci na fosfomolybdenovou modř ... 600 nm (kys. askorbová, kys. aminonaftolsulfonová, SnCl<sub>2</sub>, ..)

---

---

---

---

---

---

---

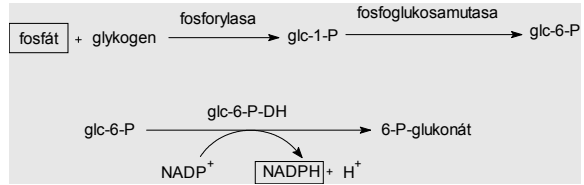
---

---

---

2. Enzymové metody

Schulz:




---

---

---

---

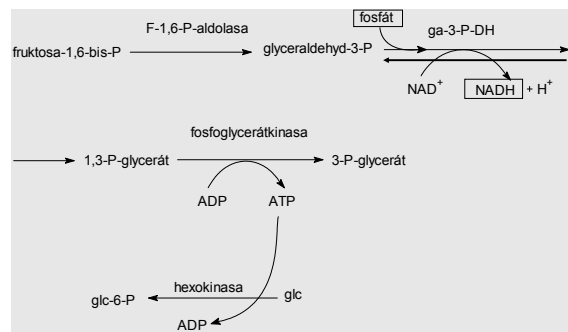
---

---

---

---

Scopes:




---

---

---

---

---

---

---

---