

# Uživatel:Taborska/Pískoviště

## Biochemická analýza krve

Pro správné posouzení zdravotního stavu je potřeba získat co nejvíce informací. Zdrojem validních informací, které v sobě odrážejí změnu metabolismu organismu a mohou být použity při posuzování zdravotního stavu pacienta, jsou výsledky laboratorních vyšetření. Dle údajů prezentovaných Světovou zdravotnickou organizací WHO poskytuje laboratorní vyšetření kolem 80 % informací vedoucích ke stanovení správné diagnózy. Nejrozsáhlejší a nejvýznamnější část laboratorních vyšetření tvoří analýzy krve, krevního séra nebo plazmy. Krev je poměrně snadno dostupným materiálem a v jejím složení se odráží řada biochemických pochodů probíhajících v různých tkáních. Dalším poměrně často analyzovaným materiálem je moč. Analýzy ostatních tělesných tekutin (žaludeční sekret, duodenální obsah, plodová voda, mozkomíšní mok, sliny, pot aj.) jsou požadovány cíleně pouze u omezeného počtu vyšetřovaných, jejich četnost je podstatně nižší, často se provádějí jen na specializovaných pracovištích. Lékař v různých fázích diagnostického a terapeutického procesu může využívat širokou škálu laboratorních metod. Je však nezbytné je racionálně indikovat, efektivně využívat, poté vyhodnocovat a správně interpretovat získané výsledky. Laboratorní vyšetření prováděná v klinicko-biochemických laboratořích jsou dle dostupnosti základní, specializovaná a vysoce specializovaná, z hlediska rychlosti provedení rozeznáváme vyšetření rutinní, statimová a z vitální indikace. Přímo v ordinaci lékaře nebo u lůžka pacienta se s výhodou mohou provádět některá vyšetření, poskytující okamžitou informaci bez nutnosti analýzy v laboratoři (tzv. bed-side diagnostics, point-of-care testing (POCT), near-patient testing).

## Odběr krve

Krev pro odběr se může získávat z žil, tepen nebo kapilár. Nejčastěji se odebírá žilní krev (většinou z kubitální žíly), méně často kapilární (např. z prstu, ušního lalůčku nebo z prohráté patičky u novorozence). Arteriální krev se odebírá pouze výjimečně, hlavně pro analýzy krevních plynů.

### Odběr žilní krve

Z hlediska postupu a vybavení při odběru žilní krve rozlišujeme dva způsoby odběru:

- otevřený odběrový systém – pracovník provádějící odběr je v přímém styku s biologickým materiálem

Odběr se provádí buď jehlou přímo do zkumavky nebo do stříkačky velmi jemným tahem pomocí pístu

- uzavřený odběrový systém – manipulace se vzorkem po odběru se provádí přímo v odběrové stříkačce/zkumavce.

Pracovník je tak při odběru chráněn před kontaminací krví pacienta, samotný biologický materiál je chráněn před možnou kontaminací zvenčí a proti případnému rozbití během transportu a centrifugace. Jednotlivé uzavřené stříkačky/vakuované zkumavky jsou barevně označeny podle druhu uvnitř přítomné preparační látky (akcelerátory hemokoagulace, separační gel, heparin, EDTA, ...). Separační gel umožňuje po centrifugaci (vytvořením mezivrstvy) dokonalé oddělení séra od krevního koagula. Odběrovou stříkačku/zkumavku je tak možné přímo nasadit do analyzátoru. Použitý materiál se snadno likviduje spálením.

Při použití **uzavřeného systému** se odběr provádí do uzavřené stříkačky nebo do vakuované zkumavky.

**Odběr do uzavřené stříkačky.** Odběrová souprava obsahuje stříkačku na kterou se nasadí jehla. Při odběru do stříkačky krev je natažena pomocí pístu. Pokud má pacient dostatečně silné žíly, lze bezprostředně před odběrem vytáhnout a zaaretovat píst na stříkačce a tak vytvořit ve zkumavce vakuum, kterým je krev nasávána. Po odběru se píst ulomí a ze stříkačky se tak stává uzavřená zkumavka. Způsob odběru je zvolen podle stavu žil pacienta.

**Odběr do vakuované zkumavky.** Odběrová souprava obsahuje držák jehly s hemiostatickým ventilem, jehlu a příslušnou vakuovanou zkumavku. Před odběrem se vloží vhodná jehla do držáku, palcem ve vzdálenosti 2 až 5 cm pod místem odběru se stabilizuje poloha žíly, provede se venepunkce a teprve potom se postupně nasazují vhodné zkumavky. Vakuová zkumavka se nesmí nasadit na vnitřní jehlu držáku před venepunkcí, protože by se vakuum ve zkumavce zrušilo. Vakuum ve zkumavce zajistí jak přiměřené naplnění zkumavky, tak dostatečný poměr krve a protisrážlivého činidla.

## Zásady pro odběr žilní krve

- zjistit alergii na dezinfekční prostředky nebo určitý typ náplasti
- před odběrem paží pacient rukou necvičí (zkreslení řady vyšetření), tlak lze zvýšit otevřením a zavíráním dlaně
- místo vpichu dezinfikovat (Jodonal B, Persteril, Jodisol, Ajatin)
- jsou-li žíly dobře viditelné, odběr provádět z nezatažené paže
- použije-li se turniket (ne déle než 1 min), po nabodnutí žíly má být ihned uvolněn
- pokud je turniket použit delší dobu nebo pacient rukou intenzivně cvičil, je třeba to vyznačit do žádanky
- po odběru přiložit na místo vpichu vatou smočenou dezinfekčním prostředkem
- při odběru nesrážlivé krve, krev bezprostředně po naplnění promíchat opakovaným otáčením odběrové zkumavky minimálně 5x (netřepat!)

## Odběr kapilární krve

Kapilární krev se používá v případech, kdy je třeba jen malé množství vzorku. Hlavní zásady při odběru:

- prohrátím místa vpichu (bříško prstu, ušní boltec, u kojenců pata) zabezpečit dobré prokrvení (přiložit teplý vlhký obklad 3 min před vlastním odběrem)
- místo vpichu dezinfikovat
- vpich směřovat ze strany do bříška prstu (paty), kde je lepší prokrvení než ve středu
- po nabití lancetou první kapku otřít (příměs tkáňového moku), další tvorbu kapek podpořit lehkým tlakem (při silném vymačkávání je v krvi příměs tkáňového moku)
- krev se obvykle odebírá do speciálních kapilárních krevních zkumavek nebo do malých plastových či skleněných zkumavek. U proužkových testů se kapka krve aplikuje přímo
- po odběru přiložit na místo vpichu vatou smočenou dezinfekčním prostředkem

## Zpracování krve

Krev odebraná bez použití protisrážlivých prostředků se po kratší době sráží, v důsledku přeměny rozpustného fibrinogenu na vláknitou síť fibrinu. Odstředěním sražené krve se získá **sérum**. Doba srážení musí být dostatečná (při pokojové teplotě po 15–30 min). Předčasné oddělení séra od krevních elementů však může vést k dodatečné tvorbě fibrinu a koagulaci séra. Pro některá klinicko-biochemická vyšetření je třeba získat nesrážlivou krev. Krev je odebírána do nádobek s přidavkem antikoagulačních (protisrážlivých) činidel. Odstředěním nesrážlivé krve se získá **plazma**. Krev je možno odstředit ihned po odběru, čímž lze ušetřit čas u akutních stavů. Plazma nebo sérum mají být odděleny co možná nejdříve, nejpozději však do 2 hodin od odběru (pro stanovení draselných iontů do 1 hodiny od odběru). K oddělení krevních elementů od plazmy, resp. krevní sraženiny od séra, se používají centrifugy (odstředivky). Uzavřené odběrové stříkačky/zkumavky s krví se umísťují do tzv. rotoru, kde pomocí odstředivé síly dochází k urychlení sedimentace látek s vyšší hustotou. K dokonalému odstředění plné či sražené krve se používá přetížení přibližně 1000krát větší než je zemská gravitace. Centrifugace krve se vždy provádí v uzavřených zkumavkách (zamezení vzniku aerosolu, příp. kontaminace vzorku) po dobu asi 10–15 minut při pokojové teplotě nebo při teplotě 4 °C. Delší doba centrifugace nebo zvýšení centrifugačního přetížení vede často k částečné či úplné hemolýze.

## Příprava krevní plazmy

Při odběru se odebíraná krev ve zkumavce opatrným kroužením dobře smíchá s protisrážlivou látkou (antikoagulačním činidlem), která se v krvi rozpustí a udrží ji po určitý čas nesrážlivou (objem krve se přitom nemění). Protisrážlivý prostředek se dává do zkumavky ve formě roztoku, který se nechá odpařit. Nesrážlivou krev s heparinem lze získat také tak, že z ampulky nasajeme roztok heparinu do stříkačky a opakovanými pohyby pístu vytvoříme na povrchu jemný heparinový film. Do takto připravené stříkačky pak odebereme krev. Uzavřené odběrové systémy jsou plněny antikoagulačními činidly již při výrobě. Přibližné dávky antikoagulačního činidla zabraňující srážení 1 ml krve:

Přibližné dávky antikoagulačního činidla zabraňující srážení  
1 ml krve:

Antikoagulant	Dávka mg/ml
Oxalát sodný (lithný, draselný)	1-2
Citrát trisodný	3
EDTA.Na <sub>2</sub>	1-2
Heparin	4-6 IU (roztok), 40-60 IU (suchý)

Principem účinku prvních tří koagulačních činidel v tabulce je vazba vápenatých iontů a tím snížení jejich koncentrace v krvi. Vápenaté ionty jsou nezbytné pro aktivaci několika faktorů krevního srážení (faktory II,VII,IX a X. Heparin se váže na plazmatický antithrombin III a zvyšuje jeho afinitu k trombinu. Účinkem trombinu jsou inaktivovány některé faktory srážení. Při použití antikoagulačních činidel je nutno počítat s tím, že může dojít ke změně složení odebrané krve. Např. všechna antikoagulační činidla na sebe váží Ca<sup>2+</sup> a Mg<sup>2+</sup>, proto je nutné v případě stanovení Ca<sup>2+</sup> používat speciálně upravený heparin. Rovněž je nutno počítat s tím, že během koagulace se nejen aktivují koagulační faktory, ale dochází též k uvolňování některých složek z rozpadlých trombocytů.

Úkol: příprava krevní plazmy (odkaz na pdf)

## Faktory ovlivňující výsledek laboratorního vyšetření

Výsledky laboratorních vyšetření jsou ovlivněny celou řadou faktorů. Jejich neznalost či podcenění může vést k nesprávné interpretaci výsledku. Laboratorní vyšetření v sobě zahrnuje tři fáze:

- preanalytickou část – příprava nemocného, odběr biologického materiálu a jeho transport do laboratoře, uchovávání vzorku před analýzou, příprava vzorku ke zpracování;
- analytickou část – vlastní analýza a výpočet výsledku;
- postanalytickou část – validace dat a jejich přenos a interpretace.

### a) Faktory preanalytické fáze

Nejvýznamnější fáze vyšetření z pohledu možného ovlivnění výsledku je preanalytická část, během níž může být výsledek ovlivněn jednak biologickými vlivy (ovlivnitelnými a neovlivnitelnými), způsobem odběru materiálu, jeho transportem a skladováním. Pokud je to možné, je snaha tyto faktory eliminovat, příp. minimalizovat, jinak je nutno vzít je v úvahu při interpretaci výsledku.

### **Biologické vlivy neovlivnitelné**

**Rasa, etnická skupina obyvatel** – různé rasy/etnické skupiny mají odlišné některé metabolické cesty, ale i množství svalové hmoty, odlišné fyziologické hodnoty některých analytů, příp. odlišnou frekvenci výskytu onemocnění danou odlišnou frekvencí určitých genů.

**Pohlaví** – většinou neovlivňuje fyziologické hodnoty analytů, pokud ano, tak u žen jsou hodnoty o něco nižší než mužů. Rozdíly jsou dány především zastoupením hormonů a habitem. Před pubertou jsou rozdíly hodnot mezi dívkami a chlapci minimální.

**Věk** – většina parametrů v dětském věku má nižší hodnotu horní referenční meze v porovnání s dospělou populací. Řada biochemických systémů nebo dějů je spojena s určitou fází vývoje organismu. Vysoké fyziologické hodnoty během dospívání jsou dány především vývojem skeletu.

**Gravidita** – uplatňuje se několik mechanismů, které vedou ke změnám koncentrací analytů, aktivit enzymů a počtu komponent během gravidity. Může se jednat o změny v tvorbě hormonů a jejich účinku na organismus, vliv placenty, přestup látek z plodové vody, apod.

**Biorytmy** – jedná se o pravidelné lineární (věk) nebo cyklické změny v metabolismu pod vlivem hormonů hypotalamu a hypofýzy (denní, měsíční, ...) nebo změny způsobené klimatickými či sezónními podmínkami, které lze s určitou pravděpodobností předpovídat. U každého jedince se však vyskytují též necyklické, nepredikovatelné biorytmy.

### **Biologické vlivy ovlivnitelné**

**Hmotnost organismu** – může ovlivnit koncentrace analytů změnou distribučních objemů. S obezitou pozitivně koreluje koncentrace např. LDL-cholesterolu, triacylglycerolů, močové kyseliny, inzulinu. Fyzická aktivita – ovlivňuje změnu složení tělních tekutin a závisí na délce a intenzitě fyzické zátěže. Akutní silová a vyčerpávající zátěž zvyšuje podíl anaerobního metabolismu, vytrvalostní zátěž aerobního metabolismu. Během fyzické aktivity dochází k zvýšené utilizaci substrátů (glykémie zpočátku nepatrně stoupá, po delší zátěži klesá, klesá triacylglycerolemie, zvyšuje se koncentrace volných mastných kyselin), ke změně metabolismu ve tkáních (zvýšená tvorba laktátu, pokles pH), k přesunu tekutiny z intravazálního prostoru do intersticiálního (zvýšení hematokritu, celkové bílkoviny a látek na ni vázaných), ke změně koncentrace mnohých hormonů.

**Dieta/hladovění** – ovlivňují různými mechanismy vyšetřované analyty – závisí na složení a množství přijaté potravy a tekutin. Před příjmem stravy a během jídla se vyplavují hormony a enzymy. Při dehydrataci organismu se zvyšuje hematokrit, ale i koncentrace řady látek. Strava bohatá na proteiny zvyšuje fosfáty, močovinu a močovou kyselinu. Strava bohatá na tuky snižuje podíl dusíkatých látek např. močové kyseliny. Strava bohatá na sacharidy zvyšuje např. laktátdehydrogenázu a snižuje koncentraci triacylglycerolů. Vegetariánská strava snižuje celkový i LDL-cholesterol a triacylglyceroly, zvyšuje celkový bilirubin a pH moče. Některé potraviny a nápoje mohou ovlivnit některé metabolické cesty, např. obsahují-li kofein, dochází ke zvýšení koncentrace katecholaminů, glukosy a volných mastných kyselin.

**Kouření** – ovlivňuje hladinu řady analytů především vlivem nikotinu. Kouření působí na metabolismus glukosy, zvyšuje koncentraci cholesterolu a triacylglycerolů.

**Alkohol** – konzumace alkoholu mění biochemické analyty odlišně podle toho, zda se jedná o akutní nebo chronický abúzus. Obecně ovlivňuje především metabolismus glukosy, triacylglycerolů a zvyšuje jaterní enzymy v krvi. Jednorázové požití alkoholu v mírné a střední dávce minimálně ovlivňuje vyšetření. Dlouhodobý abúzus vede k hypoglykemii a keto- a laktacidóze, zvyšuje se koncentrace močové kyseliny.

**Léky** – mohou ovlivnit biochemická vyšetření více mechanismy, např. indukují/inhibují jaterní enzymy, ovlivňují vazbu na transportní bílkoviny, působí cytotoxicky nebo ruší vlastní stanovení. Stres – ovlivňuje produkci hormonů, které následně mění metabolismus řady látek. Stres často doprovází závažnější onemocnění, ale u některých osob třeba i samotný odběr krve. Zevní prostředí – může mít nezanedbatelný vliv na metabolismus a následně i na koncentraci řady analytů. Jedná se o nadmořskou výšku (od výšek nad 3000 m), teplotu prostředí, ale také geografickou lokalizaci – venkov, město. Cestování přes časová pásma se projevuje změnou některých analytů, nejčastěji se jedná o retenci sodných iontů a tekutin s normalizací za 2 dny po návratu. Mechanické vlivy – např. svalové trauma, intramuskulární injekce zvyšují aktivitu ALT, AST, CK a koncentraci myoglobinu, tlak dělohy ve vysokém stupni gravidity zvyšuje aktivitu ALT, digitální vyšetření prostaty zvyšuje aktivitu prostatického specifického antigenu (PSA).

### **Odběr materiálu**

Hlavní roli v celém procesu správného laboratorního vyšetření hraje poučení pacienta.

**Odběr nalačno** – doporučuje se, aby pacient cca 10–12 hodin nejedl a byl v relativním klidu. Doporučuje se též vypít ráno cca 2–3 dl vody. Nedodržením lačnění vznikají zkreslené nálezy v parametrech sacharidového a lipidového metabolismu. Pro některá speciální vyšetření nebo funkční testy jsou předepsaná opatření dietní nebo režimová (PSA může být pozitivní po jízdě na kole).

**Doba odběru** – koncentrace některých látek značně kolísá během dne (např. glukosa, triacylglyceroly, hormony), jiných během měsíce či roku. Plánované odběry se provádí většinou v ranních hodinách. Poloha při odběru ovlivňuje koncentraci proteinů resp. látek, které se na proteiny vážou (např. celkové proteiny, albumin, enzymy, lipidy, ionty  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ). Ve stoje dochází k úniku vody z intravaskulárního prostředí a tedy koncentrace zmíněných látek se zvyšuje o 5–15 %. Standardní poloha pacienta při odběru je poloha vsedě.

**Použití turniketu** – jeho přiložení nemá být delší než 1 minuta, pacient nemá paži „pumpovat“. Při delším zaškrcení končetiny (cca 5 min) a výraznějším cvičení dochází až k 10% změně aktivity nebo koncentrace řady analytů. Tato změna je dána nejčastěji přestupem nízkomolekulárních látek z intravaskulárního prostoru do intersticia v důsledku zvýšení filtračního tlaku přes kapilární stěnu a metabolickými změnami v místě zaškrcení (anaerobní metabolismus).

**Kompresce žíly/prstu** ovlivňuje koncentraci krevních plynů, laktátu a pH.

**Hemolýza** (viditelná při koncentraci hemoglobinu  $> 0,2 \text{ g/l}$ ) – v hemolytickém vzorku je zvýšená koncentrace analytů, jejichž koncentrace uvnitř erytrocytů je vysoká (např. celkové proteiny, laktátdehydrogenáza, kyselá fosfatáza, aspartátaminotransferáza, z iontů především  $\text{K}^+$ , fosfáty,  $\text{Mg}^{2+}$ ). Příčiny hemolýzy: použití příliš velké nebo malé jehly, rychlé vyprázdnění stříkačky, prudké třepání krve ve zkumavce, vlhkost v odběrové soupravě nebo ve zkumavce, přítomnost detergentů ve zkumavce, nesprávný poměr antikoagulantu a krve, uskladnění krve v lednici, ponechání v prostředí se zvýšenou teplotou (na slunci, nad radiátorem), centrifugace při vysokých otáčkách.

**Transport** Pro transport je vhodnější sérum/plazma než plná krev. Při transportu plné krve hrozí hemolýza. Při transportu se plná krev uchovává při teplotě  $0^\circ\text{C}$  (tající led).

### Stabilizace vzorku/skladování

Při delším stání odebrané krve dochází k vyčerpání energetických zdrojů erytrocytů, které pak nemohou udržet základní metabolické děje (dochází k úniku  $\text{K}^+$  z erytrocytů do krve transportu  $\text{Na}^+$  opačným směrem). V závislosti na stanovovaném analytu se ke stabilizaci volí nízká teplota ( $4^\circ\text{C}$ ,  $0^\circ\text{C}$  (tající led),  $-20^\circ\text{C}$ ,  $-80^\circ\text{C}$ ), ochrana před světlem, úprava pH vzorku, přidavek stabilizátoru.

### b) Faktory analytické fáze

Výsledek každého laboratorního vyšetření je charakterizován několikaletými znaky, které určují do jaké míry odráží reálnou situaci a do jaké míry je ovlivněn chybami. Mezi základní analytické vlastnosti každé metody patří přesnost a pravdivost. **Přesnost** (*precision*) vyjadřuje míru shody výsledků, získanými opakovanou analýzou téhož vzorku za předem daných podmínek. Přesnost je obecný pojem. Míru rozptylu výsledků ( $x_i$ ), tedy číselnou hodnotu přesnosti, vyjadřuje pojem **nepřesnost**. Nepřesnost bývá uváděna jako výběrová *směrodatná odchylka s* (je uvedena v jednotkách měřeného analytu) nebo jako relativní směrodatná odchylka (variační koeficient) CV:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} (\cdot 100\%)$$

Podle podmínek, za kterých stanovení přesnosti probíhá rozlišujeme opakovatelnost a reprodukovatelnost metody. **Opakovatelnost** (*repeatability*) označuje přesnost metody, kdy se všechny analýzy provádějí v jedné sérii měření, v témže dni a na témže přístroji. Pojem opakovatelnost je shodný s označením „přesnost v sérii“. **Reprodukovatelnost** (*reproducibility*) vyjadřuje přesnost v čase. Získá se výpočtem ze stanovení, která se provádějí postupně po dobu několika dní na jednom zařízení. Reprodukovatelnost bývá označována jako „přesnost mezi dny“.

Přesnost závisí pouze na rozdělení náhodných chyb, nemá vztah ke skutečné hodnotě výsledku.

**Náhodné chyby** vznikají zcela nepravidelně působením náhodných vlivů, lze je statisticky vyhodnotit. Způsobují rozptyl výsledků měření, který lze charakterizovat přesností měření číselně vyjádřenou jako směrodatná odchylka s nebo variační koeficient CV. Jejich vliv na výsledek měření lze snížit zvýšením počtu měření.

**Pravdivost** (*trueness*, dříve správnost) vyjadřuje těsnost souhlasu mezi průměrnou hodnotou získanou z velkého počtu výsledků měření ( $\bar{x}$ ) a dohodnutou referenční hodnotou ( $x_0$ ). Mírou pravdivosti je odchylka (bias), která vyjadřuje rozdíl mezi střední hodnotou výsledků a dohodnutou referenční hodnotou:

bias = bias =

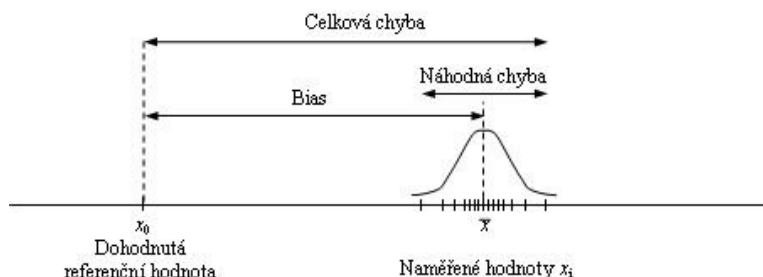
Pravdivost metody je dána velikostí systematické chyby (bias), která odchyluje výsledek vždy jedním směrem. Systematické chyby lze předvídat a vypočítat a provést korekci výsledků. **Dohodnutá referenční hodnota** ( $x_0$ ) zastupuje skutečnou hodnotu, která ve skutečnosti je vždy neznámá. Získává se pomocí referenční metody ve velkém počtu laboratoří.



**Správnost** (*accuracy*) vyjadřuje těsnost souhlasu mezi individuálním (jediným) výsledkem měření a dohodnutou referenční hodnotou. Správnost kombinuje přesnost (charakterizovaná směrodatnou odchylkou  $s$ ) a pravdivost (charakterizovaná biasem), tj. vlivy náhodných a systematických faktorů. Mírou správnosti je celková chyba (*total error, TE*):

$$TE = 1,96 \cdot s + \text{bias}$$

**Spolehlivost** (*reliability*) je dána přesností a pravdivostí měření. Představuje rozsah, který při opakovaném měření dosahují jednotlivé hodnoty.



Každý výsledek vyšetření je vždy v různé míře ovlivněn náhodnými a systematickými chybami. Důsledkem existence chyb je nejistota výsledku měření. **Nejistota** (*uncertainty, u*) představuje interval hodnot, v němž se výsledek analýzy ( $x$ ) s určitou pravděpodobností nachází. Nejistota zahrnuje mnoho složek, přičemž nevýznamné se zanedbávají, významné se vyjadřují formou směrodatných odchylek (nebo variačních koeficientů) jako tzv. **standardní nejistoty  $u$**  (tj. číselně  $u = s$ ). Nejvýznamnější náhodnou složkou nejistoty bývá standardní nejistota reprodukovatelnosti a nejvýznamnější systematickou složkou nejistoty standardní nejistota kalibrátoru. Proto celkovou (kombinovanou) standardní nejistotu ( $u_c$ ) lze zjistit ze vztahu:

Skutečná hodnota se nalézá s určitou pravděpodobností v intervalu (v tzv. **rozšířené nejistotě**), který se získá vynásobením standardní kombinované nejistoty ( $u_c$ ) koeficientem rozšíření ( $k$ ), který má pro 95% hladinu spolehlivosti hodnotu 1,96 (přibližně 2):

Při dodržování zásad správné laboratorní praxe by výsledek laboratorního vyšetření měl vždy obsahovat i údaj o rozšířené nejistotě stanovení daného analytu. Rovněž hodnoty referenčních mezí nebo hraniční hodnoty by měly obsahovat údaj o nejistotě stanovení.

## Systémy kontroly kvality

Správnost prováděných analýz je v klinicko-biochemických laboratořích kontrolována v pravidelných intervalech pomocí kontrolních vzorků s deklarovanou hodnotou stanovovaných analytů (*interní kontrola kvality*). Používají se zpravidla kontroly na dvou hladinách; jedna hladina je v oblasti referenčních hodnot, druhá v patologické oblasti. Za vyhovující se považují výsledky kontrolních analýz v rozmezí  $\pm 2 s$ . Výsledky kontrol se kromě číselné hodnoty zobrazují graficky.

Laboratoř je povinně zapojena do systému externího hodnocení kvality. *Externí hodnocení kvality* je systém objektivního hodnocení laboratorních výsledků nezávislou organizací, které se provádí pravidelným porovnáváním výsledků měření hodnocených laboratoří navzájem a porovnáváním k referenčním hodnotám měření.

*Validace výsledků (nálezů)*. Vzhledem k velkému množství provedených analýz (tisíce) a velkému procentu výsledků v referenčních mezích se průběžně provádí nejprve tzv. elektronická validace. Výsledky, které jsou v určeném rozmezí, nemají chybové hlášení a neliší se v určeném rozsahu od předchozího vyšetření (nálezu), jsou uvolněny k vydání na klinická pracoviště automaticky. Ostatní nálezy jsou pozdrženy a předloženy k validaci supervizorovi. Ten zohledňuje soulad ostatních provedených testů, předchozí vyšetření, diagnózu, případně další klinické údaje pacienta. Při jakýchkoli pochybnostech o správnosti provedených analýz se provede opakované stanovení k vyloučení náhodné chyby.

## Interpretace výsledků

Laboratorní vyšetření poskytuje řadu důležitých informací pro určení/upřesnění diagnózy, volbu správného postupu léčby i sledování jejího průběhu, zjištění prognostických nebo rizikových faktorů. Výsledky laboratorních vyšetření se hodnotí ve vztahu s fyziologickými hodnotami, s výsledky dalších vyšetření, s anamnézou pacienta příp. se sleduje jejich změna v čase. Interpretace laboratorních vyšetření často vyžaduje spolupráci řady odborníků (klinického biochemika, hematologa, imunologa, genetika, mikrobiologa, toxikologa, farmakologa, aj.) s indikujícím lékařem. V případě opakování laboratorního vyšetření hraje podstatnou roli znalost charakteristiky vyšetřovaného analytu, především jeho biologický poločas, rychlost stimulace syntézy nebo degradace při patologickém procesu.

## Porovnávání výsledků s referenčním intervalem

Při interpretaci výsledků biochemických vyšetření se nejčastěji provádí porovnávání s tzv. referenčním intervalem hodnot. Referenční interval zahrnuje 95 % referenčních hodnot, tzn. 5 % hodnot není započítáno (2,5 % nejvyšších a 2,5 % nejnižších). Referenční hodnoty jsou hodnoty získané od vybrané skupiny jedinců (věk, pohlaví, rasa) s definovaným stavem zdraví (minimálně 120 referenčních jedinců); závisí mj. na způsobu odběru, transportu a uchovávání vzorků (viz úkol 1.5), metodě stanovení a způsobu statistického vyhodnocení. Do této vybrané referenční populace nepatří např. těhotné a kojící ženy nebo apriori „zdraví“ dárce krve, jedinci nemocní, s genetickými predispozicemi, obézní, konzumenti alkoholu, drog apod.

Při statistickém hodnocení referenčních intervalů je třeba vyloučit odlehle hodnoty, otestovat hodnoty z hlediska normálního rozdělení, případně zvolit vhodné postupy pro transformaci dat na normální rozdělení, určit referenční intervaly neparametrickými i parametrickými metodami, testovat vliv věku/pohlaví.

V závislosti na rozložení četnosti referenčních hodnot lze pro odhad referenčního intervalu použít parametrickou nebo neparametrickou statistickou metodu. Pokud referenční hodnoty mají *normální* rozložení četnosti (graficky vyjádřené Gaussovou křivkou) lze pro výpočet referenčních mezí použít tzv. *parametrickou metodu* s využitím matematických parametrů. Nejdříve se z referenčních hodnot se vypočte aritmetický průměr a směrodatná odchylka s:

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

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

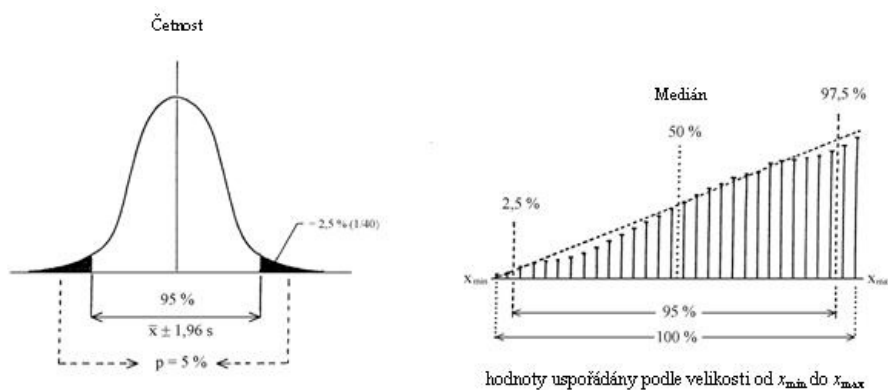
Z těchto parametrů se pak vypočtou odhady referenčních mezí:

$$\bar{x} \pm a \cdot s$$

Pokud má referenční interval obsahovat 95 % referenčních hodnot, dosadí se za koeficient a hodnota 1,96 (přibližně hodnota 2) – viz následující schéma.

Pokud referenční hodnoty nesplňují normální rozložení četnosti, lze je mnohdy pomocí vhodné matematické funkce (např. logaritmu, převrácené hodnoty) transformovat do normálního rozložení četnosti. Z transformovaných hodnot se zjistí aritmetický průměr a směrodatná odchylka, vypočtou odhady referenčních mezí, které se pak retransformují zpět.

Při určování referenčního intervalu lze použít též metodu neparametrickou. V tomto případě nezáleží na typu rozložení hodnot. Jen však nutno vyšetřit větší výběrovou referenční skupinu, než v předchozím případě, získané hodnoty seřadit vzestupně podle velikosti a na obou koncích oddělit příslušné procento hodnot (obvykle 2,5 %) – viz následující schéma.



Interpretace laboratorních výsledků pomocí 95% intervalu referenčních hodnot je zároveň vyjádřením pravděpodobnosti: u zdravého jedince existuje 95% pravděpodobnost, že jeho stanovená hodnota bude spadat do daného referenčního intervalu. Zbývajících 5 % představuje pravděpodobnost, že výsledek bude nižší (2,5% pravděpodobnost), resp. vyšší (2,5% pravděpodobnost) než dolní, resp. horní referenční mez.

Platnost referenčních mezí převzatých z literatury je nutné pro používanou metodu v

laboratoři a pro danou populaci vždy ověřit. Se zvyšujícím se počtem různých stanovení se snižuje pravděpodobnost, že všechny stanovené parametry budou ležet uvnitř svých referenčních intervalů. Vyrůstá tedy pravděpodobnost, že (u „zdravého“ jedince) dostaneme některý z výsledků mimo referenční rozpětí.

**Se zvyšujícím se počtem různých stanovení se snižuje pravděpodobnost, že všechny stanovené parametry budou ležet uvnitř svých referenčních intervalů.** Vyrůstá tedy pravděpodobnost, že (u „zdravého“ jedince) dostaneme některý z výsledků mimo referenční rozpětí.

## Rozhodovací analýza

Jiná interpretace výsledků je tzv. *rozhodovací analýza*. Při tomto hodnocení nepracujeme s intervalem referenčních hodnot („od – do“), ale s jedinou **hraniční (kritickou) hodnotou (rozhodovacím limitem)**, která nám stanovený výsledek dovoluje označit jako *pozitivní test* (jsou to zpravidla vyšší hodnoty, než hodnota hraniční) nebo jako *negativní test* (zpravidla hraniční hodnota a hodnoty nižší). Pozitivita testu je spojována s určitým rizikem existujícího nebo budoucího onemocnění. Riziko může být vyjádřeno slovně (riziko zvýšené, vysoké, ...) anebo

číselně (pravděpodobnost v % apod.). Hraniční hodnota je zpravidla vypočítána tak, aby bylo dosaženo maxima tzv. vydatnosti testu, tj. nejvyšší pravděpodobnosti shody testu s diagnózou. Pojmy a jejich praktická aplikace budou blíže vysvětleny v klinické biochemii. Při sledování pacientů během progresu nemoci nebo léčebné terapie se laboratorní nálezy porovnávají s předchozími výsledky. Při tomto postupu není možné bezmyšlenkovitě porovnávání údajů, ale je nutné počítat s analytickou a biologickou intraindividuální variabilitou daného parametru.

## Kritický rozdíl

Výsledek laboratorního vyšetření ovlivňuje nejen chyba při analýze, ale i intraindividuální variabilita měřeného parametru. Pro posouzení dvou po sobě následujících výsledků měření v určitém časovém intervalu (závislém na sledovaném parametru) u téhož pacienta je nutné znát tzv. **kritický rozdíl**. Jedná se o minimální procentuelní rozdíl výsledků, způsobený změnou metabolismu, nikoliv analytickou chybou nebo variabilitou daného parametru v čase u daného jedince. Výpočet kritického rozdílu (*critical difference*, CD):

$$CD = 2,77 \cdot \sqrt{CV_a^2 + CV_i^2}$$

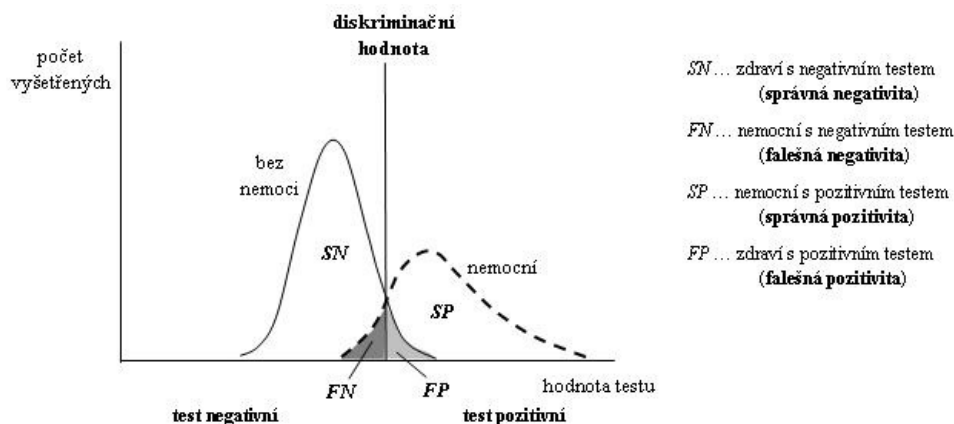
kde 2,77 je koeficient vztahující se k 95% intervalu pravděpodobnosti pro 2 následná měření; CV<sub>a</sub> analytický variační koeficient (mezilehlá přesnost měření); CV<sub>i</sub> intraindividuální biologická variace popisující rozptyl hodnot sledovaného parametru v čase u jednotlivce (viz databáze: <http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>, hodnoty CV<sub>i</sub> jsou zde uvedeny jako CV<sub>w</sub> v procentech).

Kalkulátor CD je možné nalézt např. na webových stránkách České společnosti klinické biochemie <http://www.cskb.cz>).

Je-li rozdíl dvou následných měření větší, než je hodnota CD, tak se tyto výsledky od sebe s určitou pravděpodobností (většinou 95%) liší, tj. nejsou způsobené analytickou ani intraindividuální biologickou variabilitou, ale odrážejí změnu klinického stavu pacienta. Pokud je rozdíl dvou následných měření menší než přípustná hodnota CD, vypočte se aritmetický průměr pro daný parametr. V případě překročení kritického rozdílu se provede po určitém čase třetí vyšetření.

## Diagnostická správnost laboratorního vyšetření

Úkolem každého laboratorní vyšetření/testu by mělo být odlišit jedince s přítomností nebo absencí určitého onemocnění. U většiny laboratorních vyšetření však dochází k částečnému překrytí zdravých a nemocných, čímž vzniká navíc skupina zdravých s pozitivním testem (falešně pozitivních) a skupina nemocných s negativním testem (falešně negativních). Vyšetřované osoby můžeme tedy rozdělit do čtyř skupin (viz obr. 1-4 a pravdivostní tabulka níže).



Pravdivostní tabulka: Klasifikace vyšetřovaných osob

Počet vyšetřených osob	S nemocí	Bez nemoci	Celkem
S pozitivním testem	SP	FP	FP+SP
S negativním testem	FN	SN	SN+FN
Celkem	SP+FN	SN+FP	SN+FP+SP+FN

Diagnostická citlivost (senzitivita) testu vyjadřuje pravděpodobnost, že pozitivní test vyjadřuje skutečně pozitivní diagnózu (jinak řečeno, že u nemocné osoby bude výsledek testu pozitivní neboli tzv. procento správně pozitivních nálezů):

$$\text{diagnostická senzitivita} = \frac{SP}{SP + FN} (\times 100\%)$$

Diagnostická specifičnost (specificita) testu vyjadřuje pravděpodobnost, že negativní test vyjadřuje skutečně negativní diagnózu (jinak řečeno, že u zdravé osoby bude výsledek testu negativní neboli tzv. procento správně negativních nálezů):

$$\textit{diagnostická specifičita} = \frac{SN}{SN + FP} (\times 100\%)$$

Hodnota obou veličin se pohybuje v rozmezí 0–1 (0–100 %), čím vyšší hodnota, tím diagnosticky cennější test. V praxi se používají metody se specifičností aspoň 0,7.

Diagnostická citlivost vyjadřuje výsledky testu ve vztahu k nemocným jedincům, diagnostická specifičnost ve vztahu ke zdravým jedincům. V ideálním případě umožňuje laboratorní test zcela jednoznačně od sebe oddělit jedince zdravé od nemocných (citlivost i specifičnost se rovnají 1). Pro rozhodování má zásadní význam hranice (**diskriminační hodnota**, *cut-off value*), od které můžeme považovat změnu koncentrace analytu za pozitivní nález. Mezi diagnostickou citlivostí a specifičností existuje nepřímá závislost, tzn. čím má laboratorní metoda vyšší diagnostickou citlivost (nižší falešnou negativitu), tím má nižší diagnostickou specifičnost (vyšší falešnou pozitivitu) a naopak.

## Sdělování výsledků biochemického vyšetřování

Ve většině případů je vzorek krve nebo jiného biologického materiálu odeslán k vyšetření do centrální klinicko-biochemické laboratoře. Požadovaná vyšetření se pro zjednodušení značí do průvodních formulářů (žádanek). Žádanka by měla obsahovat příslušné informace o odběru materiálu, podmínkách skladování a o způsobu jeho transportu. Výsledky stanovení spolu s jejich interpretacemi (numerickými, grafickými, slovními) se pak vracejí zpět na výsledkovém listě (nálezkové zprávě). Různá pracoviště používají různé typy formulářů a výsledkových listů.

- Seznamte se s typy formulářů z některých brněnských nemocnic a způsobem jejich vyplňování.
- Které rubriky musí být uvedeny na všech typech žádanek?