

Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicině

Norbert Cibiček, Jan Vacek a kol.



Univerzita Palackého
v Olomouci

Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně

Norbert Cibiček, Jan Vacek a kol.

Olomouc 2020, korigovaný dotisk

PRINCIPY A VYUŽITÍ VYBRANÝCH ANALYTICKÝCH METOD V LABORATORNÍ MEDICÍNĚ

Hlavní autoři a pořadatelé:

MUDr. Norbert Cibiček, Ph.D., Ústav lékařské chemie a biochemie, LF UP Olomouc

prof. Ing. Jan Vacek, Ph.D., Ústav lékařské chemie a biochemie, LF UP Olomouc

Autoři:

prof. PharmDr. Martin Beránek, Ph.D., Ústav klinické biochemie a diagnostiky, LF a FN Hradec Králové

MUDr. Petr Džubák, Ph.D., Ústav molekulární a translační medicíny, LF UP Olomouc

MUDr. Zuzana Heřmanová, Ph.D., Ústav imunologie, FN Olomouc

Mgr. Pavel Kosina, Ph.D., Ústav lékařské chemie a biochemie, LF UP Olomouc

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D., Katedra biofyziky, PřF UP Olomouc

RNDr. Martin Novák, Hematoonkologická klinika, FN Olomouc

RNDr. Barbora Papoušková, Ph.D., Katedra analytické chemie, PřF UP Olomouc

MUDr. Josef Srovnal, Ph.D., Ústav molekulární a translační medicíny, LF UP Olomouc

Ing. Jaroslava Vávrová, Ph.D., Ústav klinické biochemie a diagnostiky, LF a FN Hradec Králové

doc. RNDr. Jitka Vostálová, Ph.D., Ústav lékařské chemie a biochemie, LF UP Olomouc

Mgr. Martina Zatloukalová, Ph.D., Ústav lékařské chemie a biochemie, LF UP Olomouc

doc. MUDr. Helena Živná, CSc., Radioizotopové laboratoře a vivárium, LF UK Hradec Králové

Recenzenti:

prof. MUDr. David Stejskal, Ph.D., MBA, EurChem, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita

prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc., Ústav experimentální biologie, PřF MU Brno

1. vydání, korigovaný dotisk

© Norbert Cibiček, Jan Vacek a kol., 2020

© Univerzita Palackého v Olomouci, 2020

Obrázková dokumentace: Jan Hubert

Sazba: Michal Muzikant, Milan Matoušek

ISBN 978-80-244-3951-8

ISBN 978-80-244-5795-6 (iPDF)

Neoprávněné užití tohoto díla je porušením
autorských práv a může zakládat
občanskoprávní, správněprávní
popř. trestněprávní odpovědnost.

Obsah

| | |
|---|-----------|
| Slovo úvodem | 5 |
| Preanalytická fáze laboratorního vyšetření (N. Cibiček) | 7 |
| 1.1 Prepreanalytické vlivy na výsledek | 8 |
| 1.2 Typy vzorků, jejich příprava a význam. | 10 |
| 1.2.1 Plná krev, plazma a sérum | 10 |
| 1.2.2 Moč | 15 |
| 1.2.3 Další materiály. | 16 |
| Metody detekční | 20 |
| 2.1 Metody optické detekce (M. Kubala, N. Cibiček) | 20 |
| 2.1.1 Světlo | 20 |
| 2.1.2 Experimentální technika pro optické spektroskopie v UV/VIS/NIR oblasti spektra | 21 |
| 2.1.3 Optické spektroskopie | 24 |
| 2.1.4 Refraktometrie a interferometrie. | 31 |
| 2.2 Hmotnostní spektrometrie (B. Papoušková, P. Džubák) | 34 |
| 2.2.1 Princip fungování a součásti hmotnostního spektrometru | 34 |
| 2.2.2 Využití hmotnostní spektrometrie v klinické praxi a biomedicinském výzkumu. | 40 |
| 2.3 Elektrochemické metody, (bio)senzory a čipové platformy (J. Vacek, M. Zatloukalová, J. Srovnal). | 43 |
| 2.3.1 Elektrochemické metody | 44 |
| 2.3.2 Elektrochemické senzory a biosenzory | 45 |
| 2.3.3 Čipy a jejich aplikace v analýze nukleových kyselin a proteinů | 47 |
| 2.3.4 Využití DNA čipových platform v experimentální a klinické medicíně | 50 |
| 2.4 Imunoanalýza (N. Cibiček, Z. Heřmanová) | 52 |
| 2.4.1 Diagnostické protilátky | 53 |
| 2.4.2 Dělení imunoanalytických metod. | 53 |
| 2.4.3 Limitace imunoanalytických metod | 56 |
| 2.4.4 Imunoanalytické metody a jejich aplikace. | 57 |
| 2.5 Radioaktivita a detekce ionizujícího záření (N. Cibiček, H. Živná) | 67 |
| 2.5.1 Radioaktivita | 68 |
| 2.5.2 Ionizující záření (IZ) | 71 |
| Metody izolační, separační a amplifikační | 81 |
| 3.1 Centrifugační techniky (J. Vostálová, N. Cibiček). | 81 |
| 3.1.1 Sedimentace a centrifugace | 81 |
| 3.1.2 Centrifugy (odstředivky) | 83 |
| 3.1.3 Metody centrifugace | 86 |
| 3.1.4 Využití centrifugace | 89 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 3.2 | Polymerázová řetězová reakce (M. Beránek) | 92 |
| 3.2.1 | Příprava vzorku k analýze nukleových kyselin | 93 |
| 3.2.2 | Amplifikace vybraných úseků NA | 96 |
| 3.2.3 | Identifikace hledané sekvence a kvantifikace NA | 101 |
| 3.3 | Membránové separace (J. Vacek, N. Cibiček) | 106 |
| 3.3.1 | Membrány | 107 |
| 3.3.2 | Dialýza, elektrodialýza a mikrodialýza | 107 |
| 3.3.3 | Reverzní osmóza a membránové separace za zvýšeného tlaku | 109 |
| 3.4 | Elektroforéza (J. Vávrová, N. Cibiček) | 112 |
| 3.4.1 | Elektroforéza – teoretické základy | 112 |
| 3.4.2 | Zónová elektroforéza | 114 |
| 3.4.3 | Kapilární elektroforéza (CE) | 115 |
| 3.4.4 | Diagnostické aplikace elektroforetických technik | 117 |
| 3.5 | Kolonové separace – chromatografie (P. Kosina) | 122 |
| 3.5.1 | Princip chromatografie | 122 |
| 3.5.2 | Dělení chromatografických technik | 123 |
| 3.5.3 | Chromatografické metody a jejich aplikace | 124 |
| 3.6 | Průtoková cytometrie (M. Novák) | 131 |
| 3.6.1 | Technické principy průtokové cytometrie | 131 |
| 3.6.2 | Biomedicínské aplikace průtokové cytometrie | 137 |

| | |
|--------------------------------|------------|
| Seznam zkratk | 140 |
|--------------------------------|------------|

| | |
|---|------------|
| Terminologický slovník | 144 |
|---|------------|

| | |
|---------------------------|------------|
| Rejstřík | 149 |
|---------------------------|------------|

Slovo úvodem

Moderní medicína klade na lékaře velké nároky – musí být schopen zpracovat velké množství informací, a to nejenom klinických. Kromě zobrazovacích metod se dnes klinické uvažování z velké části opírá o laboratorní metody, jejichž správná indikace a interpretace jsou klíčovými požadavky nejenom ke stanovení správné diagnózy a sledování léčby, ale rovněž z hlediska etického, ekonomického i forenzního. S otázkami využívání laboratorních vyšetření se student medicíny setká téměř ve všech oborech, včetně teoretických a preklinických. Ke správné indikaci laboratorních vyšetření a interpretaci výsledků je však kromě literárních údajů a klinické zkušenosti zapotřebí alespoň základní orientace v problematice odběru biologického materiálu, jeho preanalytického zpracování a také **pochopení principů** použitých analytických metod. Tyto často podceňované informace jsou pro lékaře nezbytné nejenom k uvědomění si obrovských možností, ale také limitací laboratorních vyšetření, na základě kterých může být pacient i významně biologicky, psychicky i ekonomicky poškozen. Význam uvedených znalostí při vlastní vědecko-výzkumné činnosti je zřejmý. Každý klinik by měl být schopen cíleně komunikovat se všemi laboratorními pracovníky, a to i za předpokladu nepřítomnosti lékaře (např. klinického biochemika).

Předkládaná skripta „Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně“ si kladou za cíl poskytnout studentům medicíny souhrnné informace o nejdůležitějších moderních instrumentálních metodách, jejich principech a současném využití především v klinické praxi. Vzhledem k rychlosti přesunu primárně vědecko-výzkumné laboratorní technologie do oblasti klinické praxe jsme se však nebránili ani extrapolaci skript do biomedicínského a farmaceutického výzkumu. Obsah skript byl z edukačních důvodů rozdělen na tři hlavní části – na **preanalytickou fázi, metody detekční a metody izolační, separační a amplifikační**, a upraven tak, aby zahrnoval zejména instrumentaci, se kterou z ekonomických důvodů není možné studenty seznámit v rámci praktické výuky na teoretických ústavech lékařských fakult. Na klinických pracovištích, kde je tato technika dostupná, z provozních důvodů zpravidla nezbyvá dostatek času na bližší seznámení se s jejími principy, spektrem možností jejího využití a pochopení praktických limitací. Při přípravě publikace bylo naší snahou, aby svým rozsahem a zaměřením vhodně doplnila, a přitom nevybočovala z kontextu vzdělávání lékaře. Text byl metodicky zaměřen na analýzu v kapalinách. Nejsou zde detailně popsány metody pro analýzy plynů (až na několik výjimek týkajících se např. krevních plynů nebo dechových testů), techniky barvení tkání ani vizualizační techniky.

Vzhledem k současnému trendu spojovat různé laboratorní obory působící na poli medicíny do jednoho celku (tzv. **laboratorní medicína**) jsme při tvorbě skript oslovili řadu autorů s bohatými zkušenostmi jak z rutinního vyšetřování, tak z vědecko-výzkumné a pedagogické činnosti. Spolupráce odborníků z oblastí klinické biochemie, molekulární biologie, imunologie, analytické chemie a dalších umožnila vznik týmu, který mohl text přiblížit konceptu laboratorní medicíny, dát mu přiměřenou hloubku a terminologickou preciznost, obohatit ho o cenné poznatky z praxe a poskytnout čtenářům vzhled do budoucího vývoje. Společně jsme usilovali o atraktivní, čtivou

publikaci s bohatou obrazovou dokumentací včetně schémat, tabulek, aplikačních poznámek a otázek k zopakování nabytých poznatků. Jako důležitou součást skript považujeme i Appendix s přehledem a jednoduchým vysvětlením odborné terminologie a také Rejstřík. K prohloubení svých znalostí může student využít i četných odkazů na literární zdroje.

Je naší milou povinností poděkovat na tomto místě paní prof. Jitce Ulrichové (ÚLCHB, LF UP Olomouc), paní dr. Cibičkové (III. Interní klinika FN Olomouc), paní doc. Walterové (ÚLCHB, LF UP Olomouc), paní dr. Metelkové (ONM, FN Olomouc), panu dr. Malinovi (OKB, Nemocnice Písek, a.s.), panu dr. Lochmanovi (OKB, FN Olomouc) a bývalé studentce LF UP v Olomouci Lence Janouškové. Uvedené kolegyně a kolegové text, resp. jeho části pečlivě přečetli a pomohli tak rukopis posunout směrem k lepší srozumitelnosti a využitelnosti pro cílovou skupinu čtenářů. Poděkování patří také dvěma nezávislým recenzentům – panu prof. Šmardovi (PřF MU, Brno) a panu prof. Stejskalovi (Lékařská fakulta, Ostravská univerzita), jejichž připomínky významně přispěly k celkové kvalitě a hodnotě díla. Za finanční podporu děkujeme Evropskému sociálnímu fondu a MŠMT ČR.

Bude pro nás velkým uspokojením, pokud studenti v předkládaném učebním textu najdou nejenom užitečné informace, ale který si také oblíbí a k němuž se v průběhu pregraduálního studia i následné klinické praxe budou rádi vracet. Snad i s motivací dále směřovat svůj profesní profil do tak významné, dynamicky se rozvíjející oblasti, jakou je laboratorní medicína.

Za kolektiv autorů
Norbert Cibiček a Jan Vacek

1 Preanalytická fáze laboratorního vyšetření

N. Cibiček

Moderní medicína se stále více opírá o výsledky laboratorních a pomocných vyšetření. Paralelně s tímto trendem rostou požadavky na profesionalitu zdravotnických pracovníků a jejich činnost v souladu s pravidly etiky. Správná indikace vyšetření, odběr, identifikace, zpracování, uchovávání a transport vzorků do laboratoře, kde je vzorek přijat a připraven k analýze (tj. **prepreanalytická a preanalytická fáze**), hrají významnou roli v poskytování kvalitní lékařské péče. Lékař odesílající materiál předpokládá, že vyšetření bude spolehlivé, tj. analýzy a výpočty budou v laboratoři provedeny kvalitně (**analytická fáze**). Naopak laboratoř po potvrzení (verifikaci) dat a jejich přenosu klinikovi předpokládá, že výsledky budou správně interpretovány a povedou k volbě adekvátní diagnosticko-léčebné strategie (tzv. **postanalytická a postpostanalytická fáze**). Při důrazu, který se klade na kvalitu analytické části (chyby „za desetinnou čárkou“), nabývá na významu jak preanalytická složka (chyby „před desetinnou čárkou“), tak procesy následující po analýze (tab. 1). Důvodem je skutečnost, že k převážné většině chyb dochází mimo laboratoř, zhruba dvě ze tří chyb jsou předvídatelné a jedna ze čtyř má přímý vliv na diagnostiku a léčbu. Velká množství požadavků na nepotřebné diagnostické testy vedou ke zbytečným nákladům, k množství chybně interpretovaných výsledků spojených s riziky pro pacienty a představují jeden z hlavních zdrojů neefektivity ve zdravotnictví².

Tab. 1 Některé zdroje chyb v průběhu procesu laboratorního vyšetření.

| (pre-)preanalytická fáze (~ 60 % chyb) | analytická fáze (~ 15 % chyb) | (post-)postanalytická fáze (~ 25 % chyb) |
|---|----------------------------------|--|
| nesprávně indikovaný test | špatná kalibrace | sdělení chybných dat |
| nepochopená žádanka | skrytá interference | odeslání dat na jiné místo |
| pacient není náležitě připraven | měření mimo rozsah | pozdní odeslání dat |
| odběr u jiného pacienta | nehomogenita vzorku | data jsou nekompletní |
| odběr do nevhodného systému | | špatná interpretace dat |
| nesprávně označený vzorek | | chybná reakce na data |
| neadekvátní kvantita vzorku | | pozdní reakce na data |
| nevhodný transport vzorku | | |
| nesprávná doba centrifugace | | |

- 1 Součástí postanalytické fáze je zápis dat do laboratorního informačního systému (LIS) a jejich přenos do nemocničního informačního systému (NIS), a tím k lékaři. Koncept může být doplněn o tzv. perianalytickou fázi, která zahrnuje konzultaci ošetřujícího lékaře specialistou v laboratorní medicíně při znalosti dílčích výsledků.
- 2 Příkladem je stanovení všech dostupných nádorových biomarkerů při screeningu malignity na lůžkovém oddělení nebo bezmyšlenkovitě vyšetřování u klinicky zcela jasného či léčebně dále neovlivnitelného stavu.

Moderní trendy ve vyšetřování v místě péče o pacienta (**POCT**, Point Of Care Testing) mohou vést k usnadnění diagnostiky z hlediska místa a času. Za kvalitu laboratorního testování však nese odpovědnost provozovatel POCT přístroje, kterým může být nejenom laboratoř, ale i terénní ambulantní lékař. Vzhledem k této skutečnosti (POCT analyzátor je považován za malou laboratoř) je nutné, aby měli všichni zainteresovaní lékaři alespoň základní povědomí o řízení kvality v laboratorním provozu.

Přestože se objekty zkoumání a metodiky používané v oborech **laboratorního komplementu** (klinická biochemie, mikrobiologie, hematologie, imunologie, farmakologie a další) v minulosti dramaticky lišily, jsou dnes v některých aspektech velmi podobné³, což umožňuje vznik efektivnějších oddělení nebo ústavů „**laboratorní medicíny**“. Ke stanovovaným látkám (**analytům**) a testům, které již na samostatných odděleních tvořily heterogenní skupiny (tab. 2), může ve spojených (konsolidovaných) laboratořích přibýt široké spektrum vyšetření – od radioizotopů, přes nukleové kyseliny, antigeny, viry, jednotlivé buňky až ke tkáním resp. mikroorganismům.

Tab. 2 Příklady některých analytů běžně vyšetřovaných v klinicko-biochemických laboratořích.

| anorganické látky | malé organické molekuly | makromolekuly |
|-------------------|-------------------------|------------------------|
| sodné ionty | glukóza | albumin |
| draselné ionty | močovina | transferin |
| vápník | kreatinin | alaninaminotransferáza |
| hořčík | bilirubin | lipáza |
| chloridy | cholesterol | imunoglobuliny |
| fosforečnany | volný trijodtyronin | α-1-fetoprotein |
| železo | digoxin | C-reaktivní protein |
| oxid uhličitý | etanol | srdeční troponin |

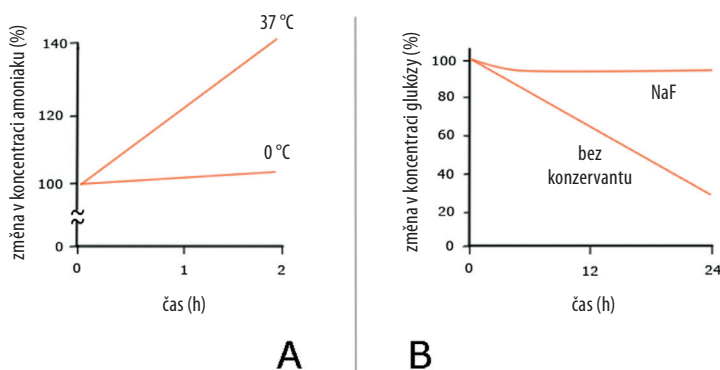
1.1 Prepreanalytické vlivy na výsledek

Výsledek vyšetření může z hlediska prepreanalytické fáze ovlivnit řada faktorů (tab. 1). Některé z nich mohou být pro laboratoř důvodem k odmítnutí vzorku. Vliv správného uchování vzorku před analýzou a výběru vhodného odběrového systému demonstruje obr. 1.

U konkrétního pacienta lze rozlišovat faktory „neovlivnitelné“ (věk, gravidita, intra-individuální variabilita⁴) a faktory „ovlivnitelné“ (stres, příjem potravy, užívání léků). **Pohlaví** má vliv zejména na pohlavní hormony, červený krevní obraz a molekuly závislé

3 Jde o molekulární přístupy, sdílení příjmu a zpracování materiálu, přístrojové techniky, řízení kvality a využívání komunikačních a archivačních systémů.

4 Intraindividuellní variabilita (neboli biologická proměnlivost) je rozptýl hodnoty vyšetřovaného analytu v důsledku přítomnosti biologických faktorů a jejich působení u daného pacienta v čase.



Obr. 1 Při stanovení amoniaku je nutné okamžité chlazení a časná analýza (A). Uchování vzorku pro stanovení glukózy (při standardní laboratorní teplotě) vyžaduje odběrový systém s inhibitory glykolytických enzymů – fluoridem sodným (B).

na svalové hmotě. **Věk** hraje roli u analytů souvisejících s množstvím svalové hmoty, pohlavím (hormony vč. hypotalamo-hypofyzární osy), růstem a remodelací pojiva. Zvláštní kapitolu tvoří novorozenci. **Cyklické variace** jsou pravidelné jevy s predikovatelnou periodou. Rozeznáváme variace ultradiánní (s periodou < 24 h), cirkadiánní nebo diurnální (~ 24 h), infradiánní (> 24 h) a sezónní nebo cirkanuální (~ 1 r). Látky, jejichž koncentrace se mění ultradiánně, se vyplavují nárazově (některé hormony). Analyty kolísající s cirkadiánní periodou mají maximum v různé denní nebo noční době. Kromě řady hormonů sem řadíme celkovou bílkovinu, draslík (obojí max. ráno), kreatinin (max. večer) a interleukin-1α (max. v noci). Třetí kategorie je typická pro analyty závislé na menstruačním cyklu. Sezónní změny se týkají látek s vazbou na výživu a/nebo klima (vitamin D). Pro zhodnocení dynamiky musíme zachovat dobu odběru, resp. počítat s vlivem rytmu. V **graviditě** nemůže překvapit nárůst koncentrací látek produkovaných trofoblastem nebo orgány plodu⁵. Dochází také k hemodiluci, zvýšení glomerulární filtrace a změnám v rovnováze srážecích a zánětlivých faktorů (ve smyslu +). U méně specifických testů uvažujeme i o vlivu jiných onemocnění – **komorbidit**. Z ovlivnitelných faktorů jmenujeme **tělesnou zátěž**, která při vysoké intenzitě vede k laktátové acidóze, hemokoncentraci, poklesu glomerulární filtrace, uvolnění látek ze svalů (např. myoglobin nebo AST) a proteinurii. **Stres** má za následek sympatikotonii a mimo jiné i vyplavení hormonů kůry i dřeně nadledvin se všemi metabolickými a funkčními důsledky. **Příjem potravy a tekutin** bývá krátkodobě spojen se změnami metabolických ukazatelů (postprandiální vzestup glykémie a triacylglycerolémie, nárůst koncentrace kyseliny močové po konzumaci masa, pokles koncentrace draslíku a fosforu spojený se zahájením výživy po delším hladovění), může modifikovat pH moči nebo zkomplikovat analytickou fázi interferencí lipidů. Přijaté tekutiny mohou obsahovat např. sacharidy a ovlivnit tak vyšetření glukózy nebo alkohol, který vede ke zvýšení koncentrace

5 Např. zvýšený onkomarker α-fetoprotein musí u fertálních žen vždy vést k podezření na těhotenství.

triacylglycerolů a osmolality; nedostatek tekutin vede k hemokonztraci (projevující se např. zvýšením albuminémie, koncentrace hemoglobinu, hematokritu a počtu erytrocytů v litru krve). Z dlouhodobého hlediska ovlivňuje výživa zastoupení lipidů, proteinů, minerálů, vitamínů i metabolitů (např. striktní veganství vede ke snížení sérové koncentrace cholesterolu a triacylglycerolů, ale i proteinů, železa a vitamínu B₁₂, u alkoholiků pozorujeme snížení koncentrace kyseliny listové a zvýšení homocysteinu).

Kouření, užívání léků a pravidelný příjem návykových látek se projevuje pestrými metabolickými změnami, změnami v koncentraci antioxidantů (např. poklesem vitamínu C, A a selenu u kuřáků), onkomarkerů (např. nárůst CEA u kuřáků), modulací krevního obrazu (makrocytóza u alkoholiků, granulocytóza u kuřáků), orgánovým poškozením a četnými analytickými interferencemi. **Otravy, úrazy a operace** mají za následek velmi komplexní poruchy vnitřního prostředí provázené řadou kompenzačních mechanismů. Z výše uvedených důvodů lze k přípravě před odběrem biologického vzorku obecně doporučit následující pravidla:

- zdržení se intenzivní fyzické aktivity⁶ (po dobu 1–2 dnů),
- vynechání postradatelných léků a návykových látek⁷ (včetně alkoholu, kofeinu a nikotinu), a to po dobu 1 až 3 dnů (důvodem jsou potenciální interference v analýze moči a vliv těchto látek na některé funkční testy),
- 10–12 hod lačnění (je povoleno pouze pití čisté vody).

Odběr má být proveden po 15-minutovém zklidnění vsedě nebo vpolosedě (u imobilních pacientů vleže), ideálně mezi 6–8 h ranní. Pokud se protokol odběru významně liší (např. při funkčních testech nebo vyžaduje-li to charakter analytu a stabilita vzorku), musí na tuto skutečnost indikující lékař upozornit nejenom pacienta, ale také odebírající zdravotnický personál a laboratoř.

1.2 Typy vzorků, jejich příprava a význam

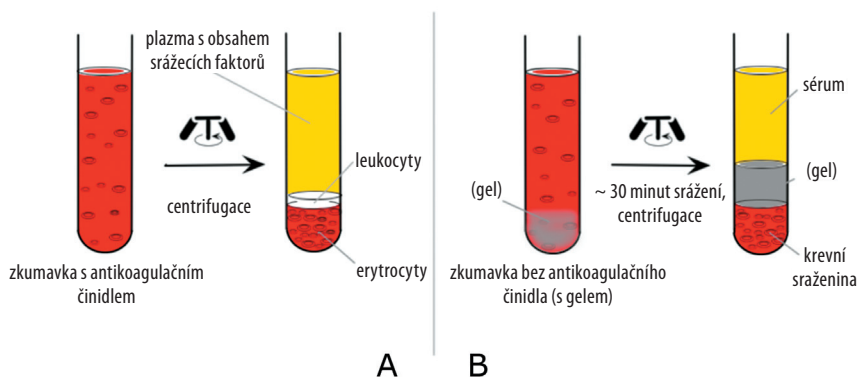
1.2.1 Plná krev, plazma a sérum

Plná krev je využívána nejenom v hematologii (vyšetření hemoglobinu, hematokritu, diferenciálního rozpočtu krvinek, koagulačních parametrů), ale i v jiných oborech. Sražení krve zabráníme výběrem zkumavky s přidaným **aditivem** – zde antikoagulačním činidlem. Může jít buď o soli heparinu (litná, sodná, draselná nebo amonná), anebo o chelatační činidlo, které váže volné ionty kalcia – sodná, draselná nebo amonná sůl kyseliny citronové (citrát), etylendiamintetraoctové (EDTA), nebo šťavelové (oxalát).

Centrifugací (viz kap. 3.1) nesražené plné krve se nad formovanými krevními elementy (v supernatantu) vytvoří plazma (obr. 2A). Hlavní výhodou vyšetření plazmy

6 Vyšetření prostatického specifického antigenu (PSA) vyžaduje i vyloučení jízdy na kole (falešné zvýšení).

7 Na možnost užívání těchto látek a jejich vlivy musí lékař myslet a od pacienta důkladně odebrat anamnézu.



Obr. 2 Příprava plazmy (A) a séra (B). Hlavní rozdíl je v možnosti sražení krve před centrifugací (podmínky závisí na zkumavce a testu – 1500 až 3000 g, 10 – 15 min, 4 nebo 20 °C).

je zkrácení času od odběru materiálu k jeho analýze. Plazma se proto doporučuje jako materiál volby v naléhavých situacích (**statimová vyšetření**). Odběr plazmy je nutný při stanovení glukózy z diagnostických důvodů, dále při stanovení laktátu a amoniaku. Nevýhodou aditiv je jejich interference s některými testy (stanovení minerálů a různých enzymů vč. DNA-polymerázy využívané v polymerázové řetězové reakci, viz kap. 3.2).

Pokud plnou krev necháme nejdříve (cca 30 min) srazit⁸, následnou centrifugací od sraženiny oddělíme krevní sérum (obr. 2B). Koncentrace většiny látek se mezi plazmou a sérem významně neliší. Výjimkou je např. koncentrace celkové bílkoviny⁹ (v plazmě o 4 % vyšší) a koncentrace draslíku, fosforu a glukózy (v plazmě o 5–8 % nižší). Odebíráme žilní, arteriální a (arterializovanou¹⁰) kapilární krev, přičemž centrifugace se využívá zejména u krve žilní.

Odběr žilní krve (**venepunkci**) provádí zaškolený zdravotnický personál (v naší zemi nejčastěji zdravotní sestra). Kvalitní odběr má několik předpokladů – jedním z prvních je správné načasování odběru (cyklické variace, eliminace látky z organismu, funkční testy). Před samotným odběrem je potřeba dbát na:

- **identifikaci** pacienta (zejména u dětí a seniorů),
- poskytnutí jeho informovaného **souhlasu** (např. u genetických testů nebo testů na HIV),
- získání **anamnestických dat** (medikace, dodržení režimu),
- správnou **polohu** pacienta (nejenom při odběru ale také před ním z důvodu ovlivnění např. glomerulární filtrace),

8 K urychlení koagulace slouží aktivátor srážení (pokračování srážení v analyzátoru by vedlo k interferencím).

9 Jde zejména o fibrinogen a faktory krevního srážení, které nebyly koagulací spotřebovány.

10 Tzv. „arterializace“ se dosáhne postupy (např. lokálním zahřátím), které mají za cíl maximalizovat krevní průtok v kapilárách („hyperemizaci“) a přiblížit tak hodnoty vyšetřovaných parametrů situaci v tepenném řečišti.

- zamezení přenosu **infekčních agens** (ochranné pomůcky a dezinfekce),
- prevenci **alergické reakce** pacienta (latex, dezinfekce, náplasti),
- správný výběr **jehly a místa vpichu** (zejména při nitrožilních infuzích, operacích, jizvách a krevních podlitinách),
- a na počet, typ a pořadí použití **odběrových stříkaček** (viz dále).

Standardní volbou při vpichu je kubitální žíla. V indikovaných případech, např. pro vyšetření krevních plynů (více viz dále), lze k odběru využít i zavedený centrální žilní katetr¹¹. Místo vpichu musí být po dezinfekci suché kvůli prevenci rozpadu krvinek a analytickým interferencím. Průběh žíly můžeme ozřejmit krátkým (~ 1 min) a mírným stažením proximální části paže turniketem. Nejvalidnější výsledky jsou z prvního vzorku. Další vzorky mohou vykazovat vlivy venostázy, lokální hemokoncentrace a aktivace hemostázy. „Pumpování“ rukou/paží vede k lokálnímu anaerobnímu metabolismu a vyplavení buněčného obsahu. V současnosti jsou pro odběr krve využívány téměř výhradně tzv. **uzavřené systémy**, které neumožňují přímý kontakt pracovníka se vzorkem. Chrání tak nejenom před kontaminací biologického materiálu, ale i před kontaktem osob s (potenciálně) infekční krví. Krev má být odebírána (resp. vypouštěna do zkumavek) pomalu, aby se předešlo rozpadu krvinek. Obsahuje-li odběrový systém aditiva, je nutné odebrat přesný objem krve uvedený na odběrové nádobce¹². Po odběru se nádobka několikrát otočí víčkem dolů a zpátky, aby se krev s aditivem promíchala. Charakter aditiva lze rozeznat z barvy víčka (tab. 3)¹³.

Krev odebranou do odběrové nádoby s aditivem nikdy nepřeléváme do nádoby jiné. Z důvodu možné kontaminace existuje doporučené pořadí odběrů:

- odběrový systém pro **hemokulturu** (nativní krev – mikrobiologie),
- zkumavka s akcelerátorem srážení (sérum – biochemie, sérologie, léčiva),
- zkumavka s **citrátem** (plná krev – hemokoagulace, sedimentace erytrocytů),
- zkumavka s **heparinem** (plazma nebo plná krev – vyšetření krevních plynů),
- zkumavka s **EDTA** (plná krev nebo plazma – krevní obraz, molekulární biologie),
- zkumavka s **NaF** (plná krev nebo plazma – glykovaný hemoglobin, glukóza).

Separční zkumavky obsahují gel, který díky své hustotě vytvoří při centrifugaci vrstvu oddělující supernatant od krevních elementů, čímž po dobu několika dní zamezí jeho kontaminaci obsahem buněk. Nevýhodou gelu je možnost způsobit interference v imunoanalýze (viz kap. 2.4). Granule krastenu (inertní plast) mají podobnou funkci jako gel, urychlují srážení a brání hemolýze. Molekulárně-biologické metody mohou vyžadovat odběr do zvláštních zkumavek (např. pro izolaci RNA).

11 Před odběrem se musí (na půl minuty) zastavit všechny infúze. Odběr se provádí až po odsátí 5–10 ml krve mimo odběrovou nádobu. U dvou- a vícecestných katetrů odebíráme pouze z lumen, které ústí nejbližší k pacientovi. Při interpretaci výsledků testů je potřeba znát rozdíly ve složení centrální a periferní žilní krve.

12 Pokud poměr mezi činidlem a krví není dodržen, vzniká riziko osmotických přesunů vody a hemolýzy.

13 Značení víček odběrových nádobek není mezi výrobci jednotné – závisí na harmonizaci výrobce se zvoleným standardem nebo platnou normou. Odebírající personál se proto musí vždy řídit pokyny své laboratoře.

Tab. 3 Příklad značení víček, obsahu aditiv a využití odběrových nádobek¹³.

| barva víčka | aditivum | požadovaný materiál a využití |
|---|--|---|
| červená (případně bílá) v kombinaci s černou (bílou) | žádné nebo akcelerátor srážení | sérum – klinická biochemie (speciální metody), mikrobiologická sérologie, imunologie, léčiva |
| červená v kombinaci se žlutou (gel) nebo červenou (granule) | akcelerátor srážení (separační gel / granule) | sérum – klinická biochemie (rutinní metody), sérologie, léčiva |
| zelená v kombinaci s černou nebo žlutou (gel) | heparinát litný, sodný atd. (separační gel) | plazma nebo plná krev – klinická biochemie (statim), krevní plyny |
| levandulová nebo růžová v kombinaci s černou nebo žlutou (gel) | EDTA draselný, příp. aprotinin k inhibici trypsinu (separační gel) | plná krev – krevní obraz, plazma – imunohematologie, molekulární biologie a genetika, polypeptidy |
| bledě modrá | citrát sodný (1:10) | plná krev – hemokoagulace |
| černá | citrát sodný (1:5) | plná krev – sedimentace (FW) |
| šedá v kombinaci s černou | antikoagulans (EDTA...) a inhibitor glykolýzy (NaF) | plná krev (plazma) – stanovení glykovaného Hb, glukózy a laktátu |
| tmavě modrá v kombinaci s černou | aktivátor srážení nebo naopak heparinát sodný | sérum nebo plazma – stanovení stopových prvků |
| žlutá v kombinaci s černou | roztoky s obsahem citrátu | plná krev – určení krevní skupiny |

Punkce tepny se nejčastěji provádí pro stanovení krevních plynů (vyšetření dle Astrupa¹⁴) a laktátu. Primárně se volí radiální tepna na nedominantní končetině¹⁵. Odběr provádí zkušený zdravotnický personál (většinou lékař). Sérii odběrů lze u novorozence udělat po kanylaci umbilikální tepny. Stříkačka obsahuje heparinát litný, v případě stanovení iontů musí jít o tzv. titrovany, čili iontově vyvážený heparin. Odběr pro vyšetření krevních plynů je přísně anaerobní, tj. bez bublin a vyžaduje dokonalé promíchání vzorku s protisrážlivým činidlem. Pokud není k dispozici POCT analyzátor umožňující vyšetření u lůžka pacienta, pak je zpravidla nutné zajistit neprodlený (do 15 minut) transport do laboratoře. Pokud je nádobka vložena do prostředí tajícího ledu, lze stabilitu vzorku prodloužit až na dvě hodiny¹⁶.

Důvody k **odběru kapilární krve** zahrnují snížení rizika spojeného s punkcí tepny při vyšetření krevních plynů, možnost odběru omezeného objemu krve např. u malých dětí, nepřístupnost cév v důsledku popálenin nebo bandáží, případně sníženou kvalitu žil či komfort pacienta. Kromě stanovení krevních plynů a glukózy se tento typ odbě-

14 Změřené parametry jsou pH a $p_a\text{CO}_2$ (parciální tlak CO_2 v arteriální krvi), vypočítané jsou koncentrace HCO_3^- a tzv. base excess; $p_a\text{O}_2$ a saturace hemoglobinu kyslíkem se uvádějí pro pochopení acidobazických změn.

15 Lze využít i femorální (výjimečně brachiální) tepnu. Tzv. Allenův test slouží k posouzení průchodnosti tepen dlaňových tepenných oblouků. Při špatné funkci tepen není odběr doporučen (riziko trombotizace tepny).

16 Při nedodržení uvedených podmínek dojde k falešnému poklesu pH a $p_a\text{O}_2$ provázanému zvýšením $p_a\text{CO}_2$.

ru nejčastěji provádí u malých dětí, pro POCT nebo pro vyšetření ze suché kapky krve v rámci screeningu dědičných metabolických poruch. Standardním místem odběru je laterální strana špičky prstu ruky, která se po dezinfekci propíchně jehlou (lancetou). U novorozenců volíme laterální stranu patičky, u starších dětí ušní lalůček. Tento typ odběru naopak nevolíme v případech sníženého prokrvení periferie. Před odběrem dbáme na vysušení antiseptika, event. na nutnost předchozího zahřátí¹⁷. Jde o **otevřenou formu** odběru – krev má po propíchnutí kůže volně vytékat. Bříško prstu se nestlačuje, aby se krev nemíchala s tkáňovým mokem. První kapka se neodebírání. Další kapka je nasáta do (heparinizované) kapiláry, sbírána do zvláštní zkumavky, anebo je nasáta filtračním papírkem, který je poté vysušen. Kapiláry jsou vybaveny kovovou tyčinkou k usnadnění promíchání krve (pomocí magnetu). Krev odebraná do kapiláry již zpravidla nesmí být přenesena na filtrační papír. Rozdíly oproti standardnímu žilnímu odběru jsou v jednotkách % – koncentrace glukózy a draslíku je v kapilární krvi vyšší, naopak sodík a vápník jsou zde mírně nižší.

Na průběh analýzy vzorku a také na procesy následující po analýze má významný vliv **matrice**. Matrice je nosič zkoumaného analytu neboli všechny složky analyzovaného vzorku kromě stanovované látky. Mezi složky systému, které mají v případě nepřiměřeně vysokých koncentrací rušivý vliv, patří hemoglobin, bilirubin a lipoproteiny. Vzhledem k charakteristickému zbarvení, které uvedené látky matrici propůjčují, pak mluvíme o **hemolytickém** (hemoglobin, červené zbarvení), **ikterickém** (bilirubin, žlutý kolorit) a **lipemickém** (lipoproteiny, „mléčné“ neboli chylózní zbarvení) vzhledu séra, plazmy, mozkomíšního moku, výpotku apod. Vysoká koncentrace hemoglobinu vzniká v důsledku hemolýzy. **Hemolýza** je definovaná jako porušení membrány erytrocytů, které vyústí v uvolnění koncentrovaných intracelulárních komponent (nejenom hemoglobinu, ale i draslíku, hořčíku, fosfátu a enzymů) do okolního média. Hemolýzu plné krve, ale ani mírné hemolytické změny séra/plazmy (do zhruba 0,1–0,5 g Hb/l) laboratorní personál nepozná. K hemolýze může dojít jak *in vivo* (intravaskulárně při různých onemocněních), tak *in vitro* (při odběru, transportu, přípravě nebo skladování vzorku). Ve druhém případě se na jevu podílejí činitele mechanické (třepání, rychlé nasávání podtlakem nebo vypouštění do zkumavky přes jehlu, nevhodná centrifugace nebo transport), osmotické (voda ve zkumavce), tepelné (jak zmrznutí tak přehřátí vzorku) nebo chemické (dezinfekce). Hemoglobin a další látky vedou k řadě analytických interferencí jak u biochemických¹⁸, tak molekulárně-biologických¹⁹ metod. Moderní automatické biochemické analyzátoři dokáží tyto parametry poměrně přesně sledovat a zabránit tak vydání potenciálně chybného výsledku. Míra interference matrice vzorku se běžně vyjadřuje pomocí tří indexů – hemolytického, ikterického a lipemického. Výsledky některých metod (např. kalémie) lze do jisté míry korigovat; správná interpretace dat však zpravidla vyžaduje nový odběr (pokud je ovšem předpoklad, že se při dalším odběru kvalita vzorku upraví).

17 Arterializovaná kapilární krev může mít nižší hodnoty pO₂ než krev arteriální.

18 Týká se např. vyšetření bilirubinu, cholesterolu, glukózy, kyseliny močové nebo amylázy.

19 Hemoglobin může interferovat s analýzou RNA pomocí PCR s reverzní transkriptázou (RT-PCR).

1.2.2 Moč

Moč se odebírá neinvazivními (při močení, čili mikci), miniinvazivními (aseptickým cévkováním) a invazivními (aseptickou suprapubickou punkcí) způsoby²⁰. Při potížích s udržení moči (inkontinenci) nebo naopak při neschopnosti se vymočit do sběrné nádoby (v důsledku těžkého stavu, bezvědomí nebo prosté obstrukce močových cest) lze odběr realizovat pomocí **cévkování**. Zákrok vzhledem k rizikovosti (zejména u mužů) provádí zkušený zdravotnický pracovník. U kojenců může být sběr proveden do plastového vaku fixovaného kolem ústí močové trubice. Jestliže se moč sbírá v čase, může sběr probíhat buď v průběhu noci, kdy je pacient v horizontální poloze²¹, anebo přes den po definovanou dobu, např. 4, 12 nebo (nejčastěji) 24 hodin. Výhodou delší doby sběru je minimalizace vlivu cirkadiálních změn – lze ho využít např. pro stanovení vylučování bílkovin (proteinurie), kortizolu, minerálů nebo pro odhad glomerulární filtrace pomocí clearance kreatininu. Před zahájením odběru musí být močový měchýř vyprázdněn. Odběrová nádoba má být po celou dobu sběru chlazená a musí obsahovat veškerou vyloučenou moč. Před odběrem vzorku se moč promíchá. Celkový objem lze určit ze změny hmotnosti odběrové nádoby. Vzhledem k obtížím provést sběr moči kvalitně a úplně se od něho v indikovaných případech ustupuje a doporučuje se první ranní vzorek po celonočním lačnění. Odběru má předcházet očištění ústí močové trubice (riziko bakteriální kontaminace) a také instruktáž pacienta týkající se režimových opatření (dieta, vysazení interferujících léků). První ranní moč je koncentrovaná a je proto vhodná jak pro mikroskopické vyšetření, tak pro stanovení látek vylučovaných v minimálním množství, např. albuminu²². Náhodný vzorek moči se využívá pro rutinní screeningové testy a testy mikrobiologické (kultivace mikrobiálních agens na živných půdách). Naopak odběry pro toxikologii vyžadují načasování. Detekce patogenů v prvních několika ml moči může svědčit pro zánět močové trubice; tzv. střední proud může informovat o mikrobiálním osídlení močového měchýře. Moč lze při sběru stabilizovat kyselinou chlorovodíkovou, dusičnou, nebo uhličitánem sodným. Vzhledem k interferencím se však dává přednost neprodlené analýze jednorázového čerstvého vzorku nativní moči, která ještě může obsahovat neporušené válce (odlitky ledvinných tubulů), event. se volí vzorky chlazené.

Moč lze v ambulantních podmínkách orientačně vyšetřit pomocí testovacích papírků obsahujících cca 10 testů²³. V klinicko-biochemické laboratoři se moč rutinně vyšetřuje jednak chemicky a jednak mikroskopicky (sediment). Zvláštní význam v diferenciální diagnostice hematurie (přítomnosti krve v moči) má vyšetření erytrocytů

20 Invazivní odběr se typicky provádí např. u kojenců.

21 Např. albuminurie stoupá již po 15–30 min ve vertikální pozici kvůli nárůstu hydrostatického tlaku v glomerulech způsobenému změnou výšky vodního sloupce (zhruba o jeden metr).

22 Vyšetření vylučování malého množství albuminu do moči (původně a nesprávně „mikroalbuminurie“) má zásadní význam jak u hypertoniků, tak u diabetiků, u kterých může prokázat časnou fázi poškození funkce ledvin.

23 Patří sem např. vyšetření glukózy, celkové bílkoviny, bilirubinu, ketolátek, pH, hustoty (specifické hmotnosti), krve a leukocytů. Papírky lze hodnotit i pomocí automatických analyzátorů (reflexní spektroskopie, viz kap. 2.1).