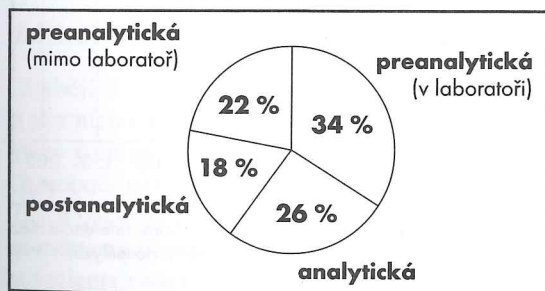


2. Preanalytické vlivy na výsledek laboratorního vyšetření

Čas vlastní analýzy tvoří jen menší část z doby, která musí uběhnout od ordinace laboratorního vyšetření až po okamžik, kdy ošetřující lékař dostane jeho výsledek. Laboratorní vyšetření kromě *analýzy* zahrnuje přípravu pacienta, vlastní odběr, zaslání odebraného materiálu do laboratoře a přípravné práce, event. skladování před provedením analýzy v laboratoři – tedy období *preanalytické*. Konečnou podobu včetně přenosu k ordinujícímu lékaři dostává výsledek v období *postanalytickém* (obr. 2.1.).



Obr. 2.1. Jednotlivé fáze laboratorního vyšetření podle časové náročnosti (průměrné hodnoty)

K ovlivnění výsledku laboratorního vyšetření může dojít ve všech třech fázích. Vlivům a chybám v průběhu vlastní analýzy i postupům minimalizujícím jejich působení je věnována kap. 3. Také v postanalytickém období může být výsledek významně ovlivněn – patří sem zejména chyby při tisku a přenosu dat (přepsání, chyba v tisku výsledku, přeslechnutí v telefonu aj.).

Zdaleka nejdůležitější z hlediska možného ovlivnění výsledku je však období preanalytické. Uvádí se, že *nerespektování preanalytických vlivů způsobuje chybný výsledek nebo jeho nesprávné hodnocení častěji než analytická chyba*. Zatímco při analýze je pracovní postup řízen zásadami správné laboratorní práce (SLP či GLP – good laboratory practice, viz kap. 6.3.) a kontrolován dob-

ře propracovaným systémem kontroly kvality, je působení vlivů předcházejících analýze méně známé a také méně kontrolované.

V preanalytickém období mohou výsledek ovlivnit následující faktory:

- osoba pacienta;
- odběr vzorku;
- transport vzorku;
- uchovávání vzorku před analýzou;
- příprava vzorku ke zpracování.

Cílem této kapitoly je přinést přehled preanalytických vlivů a na příkladech ukázat, jak mohou působit na výsledek laboratorního vyšetření. Přitom je nutné si uvědomit, že někdy vyvolají změnu výsledku a je změřena koncentrace, která u pacienta ve skutečnosti není – výsledek je chybný. Jindy sice změřená hodnota odpovídá skutečné koncentraci analytu v biologickém materiálu, ale liší se od běžně očekávaného výsledku; v případě, že bychom nevzali v úvahu preanalytické ovlivnění výsledku, došlo by i v tomto případě k jeho nesprávné interpretaci.

S faktory uvedenými ve výčtu preanalytických vlivů na prvních třech místech se setká sestra a lékař klinických oborů, poslední dva se týkají spíše laboratoře. Proto budou prvé tři faktory probrány podrobněji, zatímco zbývající budou zmíněny jen orientačně.

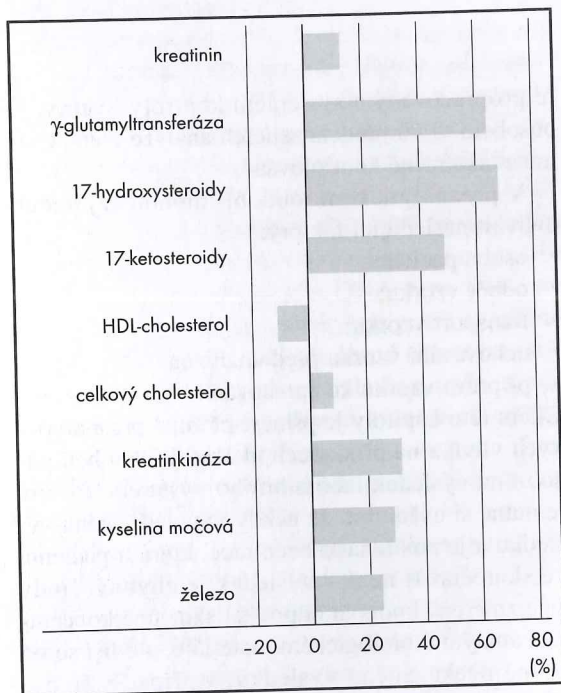
2.1. Osoba pacienta

Pod pojmem osoba pacienta si představíme jednak faktory, které nelze ovlivnit, ale při správném hodnocení výsledku je třeba vzít je v úvahu, jednak faktory, které jsou ve většině případů ovlivnitelné a jejichž účinek na laboratorní vyšetření lze eliminovat.

2.1.1. Faktory neovlivnitelné

2.1.1.1. Pohlaví

Výsledek většiny laboratorních testů na pohlaví nezávisí, přesto však najdeme řadu metod, u nichž se referenční rozmezí u žen a mužů liší; tento rozdíl je zapotřebí znát pro správné hodnocení výsledku. Snad nejznámějším příkladem jsou parametry červeného krevního obrazu. Obr. 2.2. ukazuje procentuální odchylky hodnoty horní referenční meze některých biochemických metod u mužů a žen.



Obr. 2.2. Rozdíly horních referenčních mezí podle pohlaví (sloupce znamenají odchylky u mužů vzhledem k hodnotám u žen)

2.1.1.2. Rasa, etnická či sociální skupina obyvatel

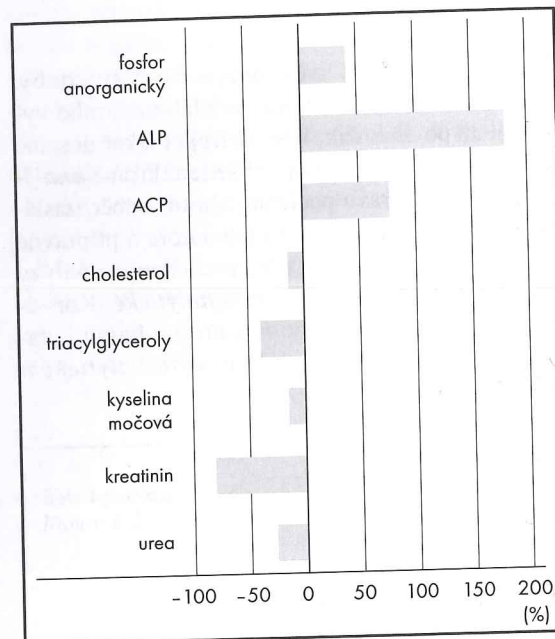
Běžně je známá odlišná frekvence výskytu některých onemocnění či distribuce krevních skupin u příslušníků různých ras, i když žijí ve stejném prostředí. Liší se však někdy i hodnotou referenčních mezí některých laboratorních vyšetření. Tak např. příslušníci negroidní rasy mají významně menší počet granulocytů než běloši; liší se i v referenčních hodnotách dalších testů, jako je amyláza, alkalická fosfatáza a kreatinkináza.

Příslušníci etnických skupin se mohou lišit např. frekvencí určitých genů, a tedy i výskytem dědičných poruch metabolismu. Referenční hodnoty mohou být ovlivněny i stravovacími návyky typickými pro určitou etnickou či dokonce sociální skupinu obyvatel.

2.1.1.3. Věk

Většina testů má v *dětském věku* nižší horní hranici referenčního rozmezí (obr. 2.3.). U dusíkatých katabolitů je příčinou pozitivní dusíková bilance u rostoucího organismu. Vyšší jsou naopak aktivity kyselých a alkalických fosfatáz a koncentrace anorganického fosforu jakožto výraz tvorby kostní tkáně. Výsledky některých laboratorních testů (např. clearance kreatininu) je nutné u dětí korigovat podle hmotnosti nebo lépe povrchu těla.

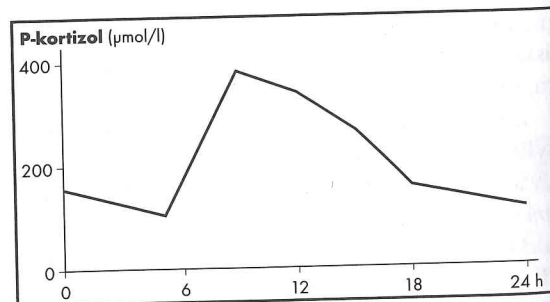
Zcela rozdílné jsou poměry u novorozenců a malých kojenců; to bude obsahem zvláštní kapitoly (viz kap. 33.2.).



Obr. 2.3. Příklady metod majících odlišnou horní referenční mez v dětském věku (za základ zvoleny hodnoty u dospělých)

2.1.1.4. Cyklické změny

Diurnální rytmus je běžně známý např. u kortizolu (obr. 2.4.), v měsíčním rytmu jsou vylučovány ženské pohlavní hormony. Není však již v obecném povědomí, že cirkardiánnímu rytmu podléhají i koncentrace některých jiných analytů (tab. 2.1.).



Obr. 2.4. Diurnální rytmus v sekreci kortizolu - změny jeho koncentrace v plazmě v průběhu dne

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

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

2.1.1.5. Gravidita

Během *gravidity* se v krvi, event. v moči matky objevují bílkoviny i jiné látky produkované trofoblastem nebo orgány plodu (hCG, SP-1, α_1 -feto-protein, placentární alkalická fosfatáza, estrogény a jejich metabolity atd.). Hormonální vlivy se však uplatní i u některých běžných metabolitů. Tak v posledním trimestru stoupá cholesterolemie. Vlivem hemodiluce klesá u těhotných koncentrace hemoglobinu. Dochází k vzestupu glomerulární filtrace, a tím vysvětlíme např. pokles koncentrace kreatininu i močoviny v séru. Podrobnosti a další změny jsou uvedeny v kap. 32.2.

2.1.1.6. Současně probíhající jiná nemoc

Chybějí-li údaje o pacientovi, což bývá zejména u akutních stavů, může se lékař setkat s výsledky, které jsou ovlivněny jinou současně probíhající chorobou, než pro kterou je nemocný vyšetřován. Tak u pacienta s chronickou aktivní hepatopatií je poměr aminotransferáz jako u infarktu myokardu, u pacienta s aktivní revmatoidní artritidou je zvýšená hodnota C-reaktivního proteinu atd. Je-li takový pacient vyšetřován pro bolest na hrudi, resp. s podezřením na infekční komplikaci, může pozitivita uvedených testů při neznalosti základního onemocnění vést k nesprávným závěrům.

2.1.1.7. Biologický poločas stanovované látky

Biologický poločas je nutné brát v úvahu vždy v případech, kdy se jedná o akutní nebo měnící se stav. Tak při hodnocení dlouhotrvající malnutrice lze užít kterýkoli z bílkovinných negativních reaktantů, tedy i např. albumin s relativně dlouhým biologickým poločasem. U krátkou dobu trvajících stavů se musíme orientovat podle bílkovin s krátkým biologickým poločasem, jako je transferin a zejména prealbumin. Dalším typickým příkla-

dem je diagnostika infarktu myokardu podle aktivity enzymů a hladin svalových proteinů v séru – při nevhodné volbě testu můžeme získat falešně negativní výsledek.

Znalost rychlosti vylučování látky z organismu má velký význam při hodnocení hladin léků a toxických látek; zde se hovoří o *poločasu eliminace xenobiotika*.

2.1.1.8. Způsob stanovení referenčních hodnot

Distribuce výsledků každého vyšetření v referenční populaci a způsob stanovení referenčních mezí, který je v podstatě založen na principech pravděpodobnosti, vedou nutně k tomu, že dané množství zdravých jedinců (obvykle 5 %) má hodnoty ležící mimo referenční rozmezí, tedy vlastně falešně pozitivní test. Ošetřující lékař má obvykle tendenci všechny hodnoty ležící mimo uvedené rozmezí považovat za patologické; podrobnější údaje o této problematice jsou v kap. 5.

2.1.2. Faktory ovlivnitelné

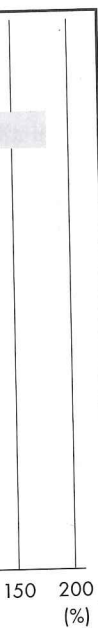
Všechny níže uvedené faktory nejsou samozřejmě ovlivnitelné ve všech případech. Při plánovaném odběru krve se dostaví pacient po patřičném lačnění a období tělesného klidu; to však nemůže být vždy dodrženo u akutních stavů. Stejně tak nelze vždy eliminovat jistý stupeň psychického stresu či u silného kuřáka vliv kouření.

2.1.2.1. Fyzická aktivita

Fyzická aktivita vede k následujícím změnám:

- k přesunu tekutiny z intravazálního do intersticiálního prostoru (dochází proto k *hemokonzentraci* a v séru stoupá koncentrace celkové bílkoviny a látek vázaných na bílkovinu, hemoglobinu a hodnota hematokritu);

í hranici
tých ka-
bilance
k aktivi-
ace anor-
y kostní
ch testů
í korigo-
a.
prozenců
stní kapi-



ferenční mez
ělych)

u kortizolu
ylučovány
iž v obec-
u podléhají
tab. 2.1.).



něny jeho kon-

- uvolnění svalových bílkovin do krevního oběhu (stoupá aktivita CK, AST, LD, koncentrace myoglobinu);
- při anaerobní zátěži klesá pH a stoupá koncentrace laktátu v krvi;
- vlivem centralizace krevního oběhu klesá clearance kreatininu, stoupá močovina, objevuje se proteinurie, erythrocyturie, cylindrurie, klesá poměr $U-Na^+/U-K^+$ jako známka sekundárního hyperaldosteronismu;
- metabolické změny (klesá sérová koncentrace triacylglycerolů, stoupá HDL-cholesterol a volné mastné kyseliny; glykémie zprvu stoupá, později při vyčerpání glykogenových zásob klesá a dochází ke ketonémii a ketonurii);
- mění se koncentrace mnohých hormonů.

Je zapotřebí si uvědomit, že velikost změn závisí na řadě faktorů, jako je *délka zátěže*, *intenzita zátěže* (aerobní, anaerobní) či *trénovanost jedince*.

Po skončení zátěže dochází k normalizaci různých rychlostí (CK za 3–5 dní, laktát za několik desítek minut). Za velkou fyzickou námahu lze považovat např. i zvýšené dechové úsilí ortopedického pacienta, křečové stavy ap.

2.1.2.2. Psychický stres

Psychický stres doprovází závažnější onemocnění, lékařský výkon nebo třeba jen odběr krve – zejména u dětí či anxiózních pacientů. Projevuje se vyplavením hormonů kůry i dřeneš nadledvin a jejich metabolickými účinky, např. hyperglykemií, vzestupem koncentrace volných mastných kyselin ap. Může ovlivňovat funkční zkoušky ledvin, sekreci štáv GIT ap.

2.1.2.3. Vliv potravy, alkoholu a tekutin

Není-li odběr krve proveden nalačno, můžeme pozorovat následující změny:

- hyperglykémii;
- hypertriacylglycerolémii (lipemické neboli chylózní sérum ruší řadu testů i z analytického hlediska);
- vzestup koncentrace volných mastných kyselin a změny ve spektru lipoproteinů; hladina cholesterolu je ovlivněna jen málo;
- vzestup močoviny a kyseliny močové v séru, zejména po nadměrném příjmu bílkovin a nukleových kyselin;
- vzestup aktivity ALP u pacientů s krevní skupinou 0 Lewis pozitivní po tučném jídle;
- pokles anorganického fosforu.

Uvedené změny přetrvávají různě dlouho: glykémie se u zdravého člověka normalizuje do dvou

hodin, u diabetika přetrvává zvýšení déle; chylózní sérum se vyčeří za několik hodin. Strava samozřejmě ovlivňuje i pH moči a její další komponenty. Zelenina a ovoce moč alkalizují, maso a tučná strava acidifikují. Koncentrace sodíku a jiných minerálů v moči je dána mj. velikostí jejich přívodu. Výsledky laboratorních vyšetření mohou ovlivnit rovněž dlouhodobé stravovací návyky. Je např. známo, že přísní vegetariáni mají nízkou koncentraci cholesterolu, triacylglycerolů a železa v séru, vzácná u nich není ani hypoproteinémie, deficit vitamínu B₁₂ u nich vyvolává hyperhomocysteinémii.

Příjem tekutin se projeví u pacientů různou hustotou moči, ale i změnou koncentrace některých látek v séru: tak pacient, který jde na odběr krve a od večera nejí a nepije, může mít známky hemokoncentrace (vzestup koncentrace celkové bílkoviny, hemoglobinu a hematokritu, někdy dokonce i mírný vzestup koncentrace močoviny v séru).

Řada biochemických testů vyžaduje dodržení dietních opatření, aby nebyl test rušen (namátkou lze uvést nutnost vyloučení masa před vyšetřením okulního krvácení či potravin s etylvanilinem před stanovením kyseliny vanilmandlové v moči).

Deficit vitamínů může vést k chybění koenzymu, a tím snížení aktivity příslušného enzymu, není-li do reakční směsi hotový koenzym přidáván. Tak např. deficit vitamínu B₆ může mít za následek snížení aktivity aminotransferáz, chybění stejného vitamínu nebo kyseliny listové má za následek nárůst koncentrace homocysteinu v séru pro poruchu jeho odbourávání (viz kap. 19.4.).

Před biochemickým vyšetřením by neměl pacient 24 h přijímat *alkohol*. V opačném případě můžeme pozorovat:

- hyperlipoproteinémii (zejména vzestup koncentrace triacylglycerolů);
- uvolnění jaterních enzymů do krve (AST, ALT, GMT);
- ovlivnění metabolismu glukózy (sklon k hypoglykémii);
- poruchu renálního vylučování kyseliny močové s následnou hyperurikémií.

2.1.2.4. Kouření

Kouření výrazně zvyšuje podíl karbonylhemoglobinu a koncentraci thiokyanatanů v séru, nikotin stimuluje sekreci žaludeční šťávy. Řada parametrů je ovlivněna méně významně (v rozmezí $\pm 10\%$). Tak mívají kuřáci vyšší hladinu fibrinogenu, hemoglobinu, železa a karcinoembryonálního antigenu. Kouření může ovlivnit i rychlost metabolizace léků (teofylin). Prostřednictvím volných radikálů zvyšuje oxidaci LDL a snižuje koncentraci vitamínu C.

2.1.2.5. Léky

Podávání léků může ovlivňovat biochemická vyšetření dvojím způsobem:

- působí na metabolismus stanovované látky (mění jeho rychlost např. indukci syntézy či naopak inhibicí enzymů, ovlivňují vazbu na transportní bílkovinu ap.);
- ruší (interferují) při vlastní chemické reakci; klasickým příkladem je maskování přítomnosti glukózy či krve v moči kyselinou askorbovou při vyšetření diagnostickým proužkem.

Jako léky se mohou podávat i stanovované látky (infúze roztoku glukózy, aminokyselin, minerálů či tukových emulzí). Při nepřiměřené rychlosti infúze může být jejich koncentrace v krvi ovlivněna, i když byl náběr proveden z jiné žíly; vždyť např. koncentrace glukózy jen v izotonickém (5%) roztoku je 278 mmol/l !

2.1.2.6. Operace

Biochemické testy může ovlivnit:

- podané narkotikum (hepatotoxicita);
- řez svalovou tkání a její zhmoždění (vzestup aktivity CK, AST, LD, koncentrace myoglobinu);
- hormonální odpověď na stres ovlivňuje prostřednictvím hormonů dřeně a kůry nadledvin řadu metabolických dějů včetně vzestupu koncentrace bílkovin akutní fáze.

2.2. Odběr vzorku

Záleží na poloze pacienta při odběru a určité době před ním a druhu odebrané krve. Výsledek mohou ovlivnit i přídavky k odebrané krvi a druh nádobky.

2.2.1. Odběr venózní krve

Obvykle se odebírá krev venózní, a to z loketní žíly. Svou úlohu má i *poloha pacienta* při odběru a určitou dobu před ním. Vstoje dochází k přesunu tekutiny z intravazálního prostoru do intersticia a koncentrace vysokomolekulárních látek (a látek na ně vázaných) v krvi včetně hematokritu může stoupnout až o 10–15 %! Doporučuje se tedy odběr vleže, při opakovaném odběru alespoň neměnit polohu pacienta.

Dezinfekce kůže může rovněž ovlivnit výsledek: použije-li se alkoholický roztok k dezinfekci kůže

před odběrem krve na stanovení koncentrace alkoholu, můžeme dostat falešně pozitivní výsledek. Stéká-li kapka krve po kůži dezinfikované povrchové aktivní látkou (Ajatin), může dojít k hemolýze.

Stažení paže při venózním odběru a tzv. »cvičení« paží by mělo být co nejkratší. V opačném případě dochází jednak k přesunu tekutiny z cévního řečiště do intersticia a k již popsanému zvýšení koncentrace vysokomolekulárních látek v odebrané krvi až o 10 %, jednak k anaerobnímu metabolismu ve stažené paži s následnou lokální acidózou, vzestupem koncentrace laktátu a draslíku až o 20 % a aktivity CK až o 10 %.

Při *nasávání krve* je zapotřebí se vyhnout přílišnému podtlaku, který může vést k mechanické hemolýze.

Odebírá-li se krev ze *zavedené jehly*, kterou kape infúze, nebo z kanyly, ve které je »heparinová zátka«, nastávají největší chyby, když není odpuštěn dostatek krve před jejím shromážděním v odběrové nádobce. Zásadně by se tedy měla užít k odběru jiná žíla. Při *hemodialýze* systémem »single needle« může být nabrána krev v okamžiku, kdy se vrací z dialyzátoru; ve vzorku pak naměříme falešně nízké hodnoty dusíkatých katabolitů a draslíku.

2.2.2. Odběr jiných typů krve než venózní

U odběru *kapilární krve* dáváme pozor na možnost hemolýzy při delším styku krve s dezinfekčním prostředkem a »vymačkávání« krve z prstu, které vede k naředění tkáňovým mokem.

Tepenná krev se odebírá pro vyšetření krevních plynů. Nesmírně důležitý je anaerobní průběh odběru a naplnění skleněné kapiláry bez bublin. Středně velká bublina v kapiláře může po promíchání způsobit vzestup pO_2 až o 5 kPa!

Při odběru *arterializované kapilární krve* na vyšetření acidobazické rovnováhy je nutné rovněž pracovat anaerobně, tj. kapka nesmí stékat po prstu a v kapiláře nesmějí být bubliny. Při nedostatečném periferním prokrvení nemá vyšetření význam. Náběr z ušního lalůčku se blíží svými výsledky arteriálnímu náběru, zatímco i u dobře prokrveného prstu dostaneme výsledek pO_2 až o několik kPa nižší než při odběru krve z tepny.

2.2.3. Odběrová nádobka

Vždy by měla platit zásada nejprve *popsat nádobku* jménem pacienta a ještě *před vlastním odběrem*

jméno znovu zkontrolovat; tím se podstatně omezí možnost záměny. Ideální je identifikace pacienta pomocí *čárového kódu* (bar-kódu) či dokonce pomocí tzv. dot-kódu, což je vlastně dvourozměrný čárový kód umožňující uchování velkého množství údajů o nemocném. Provádění analýz přímo z primární odběrové nádoby je umožněno konstrukcí většiny analyzátorů, vybavených snímačem výšky hladiny séra. Tím je na minimum snížena možnost záměny a také kontaminace, ke které by snáze došlo při přelévání séra před analýzou do jiné nádoby.

Krev vypouštíme ze stříkačky *pomalou*, nikdy ne přes jehlu, aby nedošlo k hemolýze.

Většina vyšetření se provádí ze séra; krev se musí nechat *dostatečnou dobu srážít*. Odstředí-li se příliš brzy, obvykle dojde k hemolýze a navíc se v oddělené plazmě dodatečně sráží fibrin a vzniká gel; hrozí pak ucpávání hadiček v analyzátorech či nasátí menšího objemu a opět chybný výsledek.

Nejvhodnější jsou odběrové nádoby *na jedno použití*. Jsou však většinou z *plastické hmoty*, ve které se krev pomalu a nedostatečně sráží a častěji dochází k hemolýze. Výrobce proto opatřuje stěny odběrových zkumavek vrstvou kaolinu či skelnou vatou, což urychlí srážení. Oddělení séra velmi usnadní speciální inertní gel, jehož hustota je volena tak, aby po odstředění vytvořil rozhraní mezi krvinkami a vrstvou séra. I když výrobce zaručuje dokonalou inertnost gelu, nelze tyto nádoby užít k odběru krve na stanovení hliníku. Při stanovení ionizované frakce hořčíku zvyšuje výsledek látka užívaná k povrchové úpravě všech hromadně vyráběných odběrových nádobek. Kapiláry z plastické hmoty se hodí k odběru krve na vyšetření krevních plynů jen v případě, že analýza je provedena bezprostředně po odběru. Plastická hmota je totiž propustná pro plyny: byl např. popsán vzestup pO_2 o 4,8 kPa v krvi uchovávané 50 min v kapiláře z plastické hmoty.

Skleněné nádoby dovolí lepší srážení krve, mají však dvě nevýhody. První je častější prasknutí při odstředování se znehodnocením odebraného vzorku a kontaminací centrifugy potenciálně infekčním materiálem. Před opakovaným použitím je nutné nádobku dekontaminovat a umýt – *zbytky užitých činidel* ve zkumavce po nedokonalém vymytí představují druhou nevýhodu.

Dezinfekční prostředky s oxidačním účinkem (chloramin, chlornan) ruší stanovení bilirubinu, naopak zvyšují výsledky všech testů, kde zakončením je oxidace chromogenu v reakci katalyzované peroxidázou (jako např. kyselina močová, cholesterol, triacylglyceroly, glukóza v séru, glukóza a krev v moči atd.). Voda obsahující sloučeniny železa (rezavé trubky!) způsobuje výrazné zvýšení

výsledku při stanovení koncentrace tohoto prvku. Mycí prášky často obsahují fosfáty; pozitivní systematická chyba u stanovení anorganického fosforu patřila k nejcitlivějším ukazatelům nedokonalého vymývání zkumavek. Stopy těžkých kovů (např. z chromsírové směsi) mohou inhibovat stanovované enzymy. Neobvykle přísné jsou požadavky na čistotu odběrových nádobek i způsob odběru při stanovování stopových prvků.

2.2.4. Vyšetření z nesrážlivé krve a z plazmy

Pro některá klinicko-biochemická vyšetření je nutné získat *nesrážlivou krev*. Jsou to vyšetření prováděná z celé krve (acidobazická rovnováha, glykémie, laktát, minerály pomocí iontově selektivních elektrod), z erytrocytů (glykovaný hemoglobin, kalium či magnézium v erytrocytech, 2,3-bisfosfoglycerát, superoxididismutáza, glutathion aj.) nebo z plazmy (fibrinogen, kyselá fosfatáza).

První zásadou je dodržet předepsaný poměr mezi objemem roztoku *antikoagulantu* a přidané krve, nebo při užití odparku protisrážlivého činidla přidat předepsaný objem krve do odběrové nádoby. Při užití vakuových odběrových nádobek je poměr objemů antikoagulantu a krve narušen při předčasném vytažení jehly ze žíly, a tím odběru menšího množství krve. Pamatujme si, že vždy přidáváme krev do odběrové nádoby s antikoagulačním přípravkem, nikdy naopak. Je nutné také zjistit, který protisrážlivý prostředek je vhodné použít na požadovaný test.

Při přidání menšího množství krve k odparku dochází k objemovým a tvarovým změnám krvinek, přidáme-li příliš velký objem, krev se sráží. Krev musíme v nádobce dokonale promíchat, aby se odparek rozpustil, a to opakovaným obracením uzavřené nádoby. Vyhýbáme se třepání – dojde k mechanické hemolýze a podle našich zkušeností pak měříme kalémii i přes 10 mmol/l!

Antikoagulační přípravek dále ovlivňuje *složení odebrané krve*. Tak všechny antikoagulanty včetně heparinu vážou ionty Ca^{2+} a tedy snižují jejich koncentraci; totéž platí i o Mg^{2+} . Pro stanovení Ca^{2+} je nutné používat heparin vytitrovaný těmito ionty. Může dojít k inhibici enzymů – různých podle přidaného přípravku. Všechny antikoagulanty jsou anionty, kde doprovodný kation je nejčastěji Na^+ , ale někdy i K^+ , NH_4^+ či Li^+ . Tak např. při stanovení iontů z krve odebrané do nádoby určené pro stanovení glykémie (obsahuje NaF a Na_2EDTA) nebo do kapiláry s obsahem heparinátu sodného dostaneme hodnotu Na^+ zvýšenou

(až 160 mmol/l), přičemž koncentrace K^+ a Cl^- není ovlivněna. Pro stanovení iontů z plné krve tedy musíme přidat heparinát amonný či litný a po odběru krev opatrně míchat, abychom se vyhnuli mechanické hemolýze, kterou v tomto případě okem nepoznáme.

Někdy přidáváme ke krvi protisrážlivý prostředek z jiných příčin. Umožní totiž okamžité odstředění krve bez nutnosti čekat na její dokonalé sražení. Tím ušetříme v průměru 20 minut u akutních stavů. Při užití heparinátu litného je získaná plazma vhodná ke stanovení prakticky všech analytů včetně minerálů (samozřejmě s výjimkou litia).

Na tomto místě je vhodné uvést, že *plazma a sérum* se od sebe liší více než jen nepřítomností koagulačních faktorů, zejména fibrinogenu, v séru. Během koagulace se totiž z rozpadlých trombocytů uvolňují některé jejich složky, které pak jeví v séru vyšší koncentraci. Sérum bývá také častěji hemolytické – v tomto případě se do séra dostávají látky obsažené v cytoplazmě erytrocytů. Tak má sérum vyšší aktivitu kyselých fosfatázy, ale i koncentraci draslíku. Stupeň ovlivnění je úměrný počtu trombocytů: při koncentraci trombocytů $200 \times 10^9/l$ krve byla koncentrace draslíku v séru o 0,2 mmol/l vyšší než v plazmě z téhož odběru, zatímco při počtu trombocytů $1600 \times 10^9/l$ byl rozdíl již +1,4 mmol/l.

I když jsou popisovány rozdíly v sérové a plazmatické koncentraci i u některých jiných analytů, nejsou tak velké, aby měly klinický význam.

2.3. Transport vzorku

Krev je zapotřebí přepravovat v uzavřených odběrových nádobkách. I zátka však může ovlivnit výsledek analýzy, tak např. z gumové zátky se uvolňuje významné množství zinku. Krev při transportu chráníme před extrémní teplotou (v teple dochází k inaktivaci enzymů, rychleji klesá koncentrace glukózy; mráz může zase způsobit hemolýzu). Vystavení krve světlu vede k odbourávání bilirubinu.

Transport musí být *dostatečně rychlý*, aby mohlo být včas odděleno sérum od krvinek – pro stanovení K^+ do jedné hodiny, pro ostatní analyty do 2 h po odběru. Nesmí se užít led bezprostředně po vyndání z mrazicího boxu, aby nedošlo ke zchlazení vzorku pod bod mrazu a k hemolýze.

Krev na některá speciální vyšetření se transportuje na tajícím ledu; z běžnějších k nim patří např. vyšetření acidobazické rovnováhy či stanovení amoniaku.

Na delší vzdálenosti vždy raději posíláme sérum než celou krev; v opačném případě hrozí mechanická hemolýza.

2.4. Uchovávání vzorku

Podmínky uchovávání vzorku mají stejně jako jeho transport vliv na stabilitu analytů.

Při delším stání odebrané krve dochází k vyčerpání energetických zdrojů erytrocytů (glukózy); ty pak nemohou udržet základní metabolické děje, k nimž patří funkce membrány zajišťující transport K^+ do buňky a Na^+ opačným směrem. Dochází k úniku K^+ z erytrocytů a naměříme hyperkalémii, aniž současně dojde k hemolýze. Únik kalia z buněk se urychlí, uskladníme-li odebranou krev v chladničce, neboť udržování K^+ v buňce je enzymový děj, který s poklesem teploty ustává.

Při uchovávání v teple spotřebovávají leukocyty kyslík. Současně dochází k produkci oxidu uhličitého a vlivem anaerobní glykolýzy v erytrocytech klesá pH krve; proto krev na vyšetření acidobazické rovnováhy a krevních plynů je třeba uchovávat na ledu, a to nejdéle dvě hodiny.

Při stanovení glykémie či laktátu má přídavek fluoridu sodného za účel inhibovat glykolýzu a po mírném počátečním poklesu udrží nezměněnou koncentraci těchto analytů až po dobu 24 h. Bez přídavku NaF klesá glykémie činností erytrocytů, přičemž je zajímavé, že rychlost poklesu je menší u diabetiků s hyperglykemií. Stejný způsob odběru by měl být dodržen i při stanovení glykémie a laktátu v jiném biologickém materiálu (mozkomíšním moku, výpotku). Koncentraci glukózy si podrží i krev zchlazená nebo plazma či sérum po oddělení erytrocytů. Jinou možností představuje přídavek manózy k plné krvi: ta působí jako alternativní substrát hexokinázy. Její účinek nastupuje ihned (fluorid začíná působit asi po dvou hodinách nutných pro difúzi do erytrocytů; zastavuje navíc až konečné reakce glykolýzy).

Většina vyšetření se však provádí z krevního séra; o důležitosti jeho včasného oddělení od krevních buněk zejména pro stanovení draslíku hovoří úvodní odstavec této kapitoly.

Není-li provedeno stanovení ihned, obvykle stačí uchovat sérum v chladničce při $+4^\circ C$, a to v dobře uzavřené zkumavce, aby nedošlo k zahuštění vzorku odpařením vody. Většina analytů včetně enzymů je stabilní řadu dní. Při delším skladování se uchovává sérum zmrazené (při $-20^\circ C$, event. $-80^\circ C$), výjimečně se upravuje mrazovou sublimací (lyofilizací).

zací); tento způsob konzervace se však užívá spíše u kontrolních sér. Po rozmrazení je nutné před vlastní analýzou vzorek vždy dobře promíchat.

Chemická konzervační činidla se ke stabilizaci sér užívají vzácně a je nutné si předem ověřit, zda neruší při požadované analýze.

Častější je chemická konzervace moči. Existuje přitom řada konzervačních činidel, která vybíráme podle druhu analýzy. Tak při měření koncentrace močoviny v moči užijeme přírůstek thymolu v izopropanolu, moč na stanovení kyseliny vanilmandlové konzervujeme okyselením koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou, buňky fixujeme přírůstkem formalinu. Někdy nesleduje přírůstek chemického činidla stabilizaci, ale dokonalé rozpuštění stanovované látky obsažené v moči: před stanovením vápníku, hořčíku nebo fosforu je třeba moč okyselit, před stanovením kyseliny močové naopak alkalizovat.

Existují tabulky s udáním procentuální změny látek v biologickém materiálu v čase při různých způsobu skladování; protože tyto údaje jsou důležité spíše pro pracovníky laboratoří, nejsou do této publikace zahrnuty.

2.5. Prvotní zpracování a příprava vzorku k analýze

Patří sem *odstředění* krve a oddělení séra či plazmy, *deproteinace* vzorku před analýzou, *zahuštění vzorku*, vzácněji též další postupy, např. promývání erytrocytů ap. Při odstředování, je-li příliš razantní, hrozí nebezpečí hemolýzy. Při deproteinaci, obvykle chemické, je zapotřebí zvolit vhodné činidlo opět podle charakteru stanovované látky a pracovního postupu. Při zahušťování bílkovin obsažených v moči či mozkomíšním moku před jejich separací elektroforézou je při volbě membrány s větší velikostí pórů sice postup rychlejší, hrozí však ztráty nízkomolekulárních proteinů, a tedy i zkreslení výsledku analýzy.

2.6. Hemolýza

Na několika místech této kapitoly byla zmínka o hemolýze, tj. rozpadu erytrocytů, který vede k vylištění jejich obsahu včetně červeného krevního barviva do plazmy (séra). Kromě vzácné intravas-

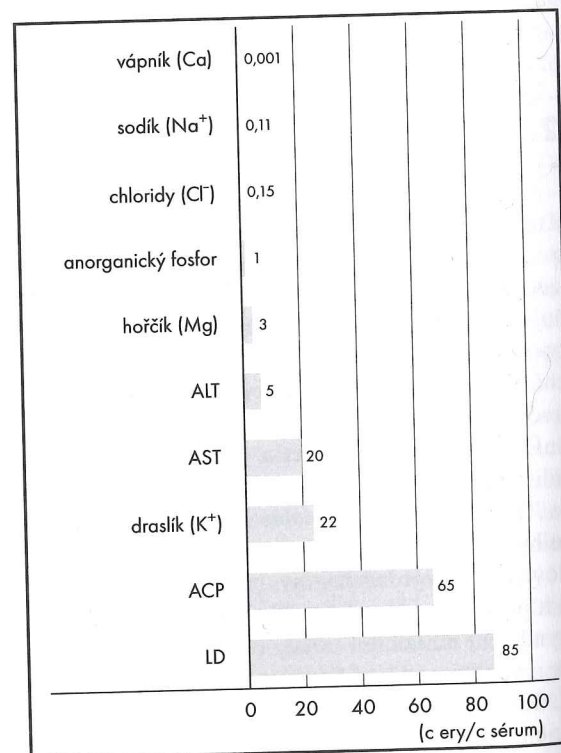
kulární hemolýzy, která pacienta vážně ohrožuje, dochází k hemolýze obvykle *in vitro*, tj. při odběru, transportu a základním zpracování krve.

Podle příčiny dělíme *hemolýzu* na:

- *mechanickou* (příliš silné třepání, nasávání při odběru či vystřikování krve jehlou, centrifugace při vysokých otáčkách, doprava plné krve na delší vzdálenost aj.);
- *osmotickou* (mokrý zkušavka);
- *tepelnou* (krev vystavena mrazu či naopak vysoké teplotě);
- *chemickou* (dezinfekčním prostředkem, který rozruší membránu erytrocytů).

Hemolýza ovlivňuje výsledky ze čtyř různých důvodů:

- z erytrocytů se do plazmy vyplavuje jejich intracelulární obsah a zvyšuje se koncentrace těch komponent, které jsou především intracelulární. Poměr intra- a extraerytrocytární koncentrace některých analytů znázorňuje obr. 2.5. Z grafu je patrné, že hemolýza nejvíce ovlivňuje stanovení LD, ACP, draslíku a AST; u ostatních vyšetření je vliv již zanedbatelný, pokud není hemolýza masivní;
- červená barva hemoglobinu vadí při fotometrickém stanovení většiny analytů. Někdy lze tento vliv odstranit odečtením hodnoty vlastní slepé zkoušky, ne však ve všech případech;



Obr. 2.5. Odlišná koncentrace analytů v erytrocytech a séru, vyjádřená jako podíl těchto koncentrací

- hemoglobin působí jako pufr a mění pH činidla a tím ovlivňuje průběh reakce, např. při stanovení ALP či albuminu; v tomto případě hemolýza vesměs výsledek snižuje.
- hemoglobin reaguje s činidlem, rozkládá ho, a tím snižuje výsledek při měření bilirubinu; velikost ovlivnění roste se stupněm hemolýzy a s koncentrací bilirubinu v séru.

U intravaskulární hemolýzy obvykle nepozorujeme vzestup hladiny kalia – není-li současně anurie, stačí ho ledviny obvykle dostatečně rychle vyloučit.

Při použití bezbuněčné náhrady krve, založené na infúzi polymerovaného hemoglobinu, se může projevit jen interference hemoglobinu daná zabarvením roztoku a působením této bílkoviny jako pufru.

Doporučená literatura

1. EINER, G., ZAWTA, B. *Präanalytikfebel*. 2. Aufl. Leipzig: J. A. Barth, 1991.
2. FRIEDECKÝ, B., BERÁNEK, M. *Preanalytické rozptyly měření elektrolytů*. *Klin Biochem Metab*, 1998, 6, s. 45–49.

3. FRIEDECKÝ, B., KRATOCHVÍLA, J., et al. *Preanalytická fáze*. Pardubice: SEKK, 1997.

4. GUDER, WG., FOUSECA-WOLLHEIM, F., et al. *Stabilität der Messgröße in der Probenmatrix*. *DG Klinische Chemie Mitteilungen*, 1995, 26, S. 205–224.

5. GUDER, WG., EHRET, W., et al. *Serum, plasma or whole blood? Which anticoagulants to use?* *Laboratoriums Medizin*, 1998, 22, p. 297–312.

6. GUDER, WG., NARAYAMA, S., WISSER, H., et al. *Samples from the patient to the laboratory*. Darmstadt: GIT, 1996.

7. IFCC. *Approved IFCC recommendations on whole blood sampling, transport and storage for simultaneous determination of pH, blood gases and electrolytes*. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 1995, 33, p. 247–253.

8. POCOCK, SJ., ASHBY, D., et al. *Diurnal variations in serum biochemical and haematological measurements*. *J Clin Pathol*, 1989, 42, p. 172–179.

9. SENFT, V., RACEK, J., KOHOUT, J. *Stopové prvky v biologických materiálech. Preanalytické zabezpečení*. *Čas Lék čes*, 1998, 137, s. 240–244.

10. YOUNG, DS. *Effects of drugs on clinical laboratory tests*. 4th ed. Washington: AACC Press, 1995.

11. YOUNG, DS. *Effects of preanalytical variables on clinical laboratory tests*. 2nd ed. Washington: AACC Press, 1997.

hrožuje,
při odbě-
e.

ávání při
trifugace
krve na

opak vy-

em, který

zných dů-

jejich in-

ncentrace

n intrace-

stární kon-

e obr. 2.5.

e ovlivňu-

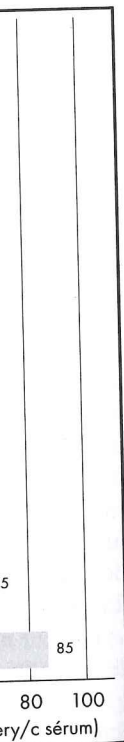
T; u ostat-

ný, pokud

otometric-

y lze tento

astní slepě



tech a séru, vy-