

# Klinická biochemie

**Petr Breinek**

(2013 - Petra Sýkorová)



# Témata

- 1. Základní informace o oboru klinická biochemie**
- 2. Analyzovaný biologický materiál**
- 3. Odběr a zacházení s biologickým materiálem**
- 4. Vývoj klinické biochemie**
- 5. Automatizace a používané analytické techniky**
- 6. Řízení kvality a akreditace laboratoří**
- 7. Kazuistiky**

# Laboratorní testy

- **Vliv na 70 - 80 % zdravotnických rozhodnutí v nemocniční péči při relativně nízkých nákladech, které činí 3 - 5 % nákladů na zdravotní péči**

***Obor klinické biochemie a laboratorní diagnostiky se rozvíjí především s rozvojem:***

- ✓ ***Analytických technik***
- ✓ ***Informačních technologií***

# 1. Obor klinická biochemie



Česká společnost  
klinické biochemie

Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně

[www.cskb.cz](http://www.cskb.cz)

# Definice

Klinická biochemie je  
**klinicko-laboratorní obor** poskytující  
významné informace pro:  
**preventivní,  
diagnostickou  
a léčebnou péči  
napříč všemi lékařskými obory**

# Definice (IFCC)

Klinická chemie je aplikací chemických, molekulárních a buněčných principů a technologií s účelem porozumět lidskému zdraví a nemoci a umožnit jejich hodnocení

*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC)*

# Laboratorní obory ve zdravotnictví

Klinická:

**Biochemie**

**Hematologie**

**Mikrobiologie**

**Imunologie**



Genetika

Toxikologie

Soudní lékařství

Alergologie

Histologie

Patologie

Nukleární medicína

# Laboratorní medicína?

Klinická patologie (USA)

Laboratorní medicína (D)

Klinická chemie

Klinická biochemie

Laboratorní diagnostika (SR)

.....



# Laboratorní medicína nebo separované obory?

Moderní technologie budou vyžadovat s velkou pravděpodobností **integraci laboratorních služeb** spojením centralizovaných laboratoří se systémy **POCT** (point of care testing) nejenom u lůžka nemocného, ale i v domácí péči



*Laboratorní obory musí spolupracovat nejen mezi sebou, ale především s klinickými lékaři*

# Základní trendy v laboratořích

## ❖ Laboratorní automatizace a robotika



- Japonsko:  
plně automatizované  
laboratoře
- ostatní:  
modulární automatizace

# Základní trendy v laboratořích

- ❖ Laboratorní automatizace a robotika
- ❖ **Informační systémy**



LIS (laboratorní informační systém)

NIS (nemocniční laboratorní systém)

# Personální zajištění

- **VŠ vzdělaní pracovníci**
  - lékaři
  - analytici, biochemici, farmaceuti, ...
  - další
- **Středoškolsky vzdělaní pracovníci**
  - zdravotní laboranti
- **Ostatní pracovníci**
  - nižší zdravotničtí pracovníci
  - pomocní zdravotničtí pracovníci

# **Charakteristické pro zdravotnické laboratorní obory je:**

- **Analýza biologického materiálu**
- **Včasná dostupnost výsledků**
- **Požadovaná kvalita vyšetření**  
(aplikace ISO 15189:2007)
- **Interpretace výsledků**

## **2. Analyzovaný biologický materiál**

# ANALYZOVANÝ MATERIÁL

- B-KREV
  - VENÓZNÍ / ŽILNÍ
  - ARTERIÁLNÍ
  - KAPILÁRNÍ

- S-krevní SÉRUM

- SRÁŽLIVÁ krev

- doba srážení 30min a více

- centrifugace 10 min, 1500x g





- P-krevní PLAZMA

NESRÁŽLIVÁ krev

HEPARIN-Li,Na,NH<sub>4</sub>,

EDTA

CITRÁT

OXALÁT



- U- MOČ

JEDNORÁZOVÁ  
SBÍRANÁ

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

# 3. Odběr a zacházení s biologickým materiálem

# Příprava pacienta před odběrem biologického materiálu

- Informovanost pacienta
- Režim před odběrem

# Odběr biologického materiálu

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

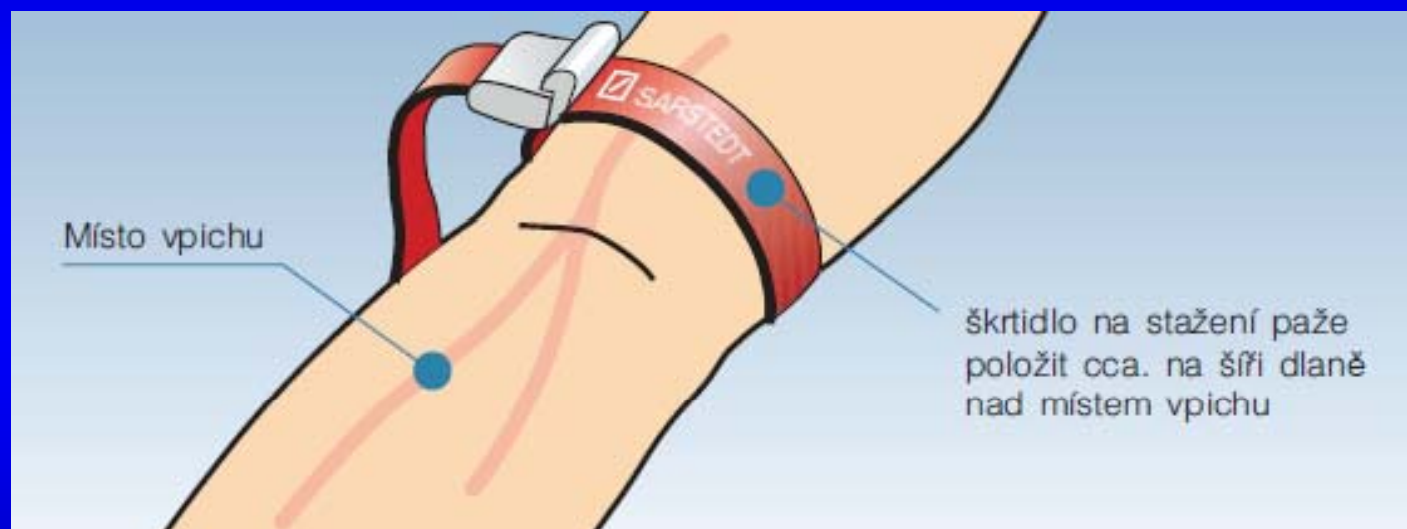
# ODBĚROVÉ SOUPRAVY

- JEDNORÁZOVÉ
- SÉRUM                      gel x aktivátor srážení
- PLAZMA  
    heparinNH<sub>4</sub>,Li,EDTA,NaF,



<b>Serum</b> Aktivátor srážení
<b>Serum-Gel</b> Aktivátor srážení
<b>Plasma</b> NH <sub>4</sub> - Heparin
<b>Plasma</b> Lithium- Heparin
<b>Plasma</b> Lithium-Heparin Gel
<b>Hematologie</b> Kalium- EDTA
<b>Glukóza</b> Fluorid
<b>Srážlivost</b> Citrat
<b>Sedimentace</b> <b>FW</b> Citrat
<b>Krevní plyny</b> <b>ASTRUP</b> Lithium- Heparin
<b>Neutral</b> bez plnění

# Odběr žilní krve





# Kapilární odběr – místa odběru



Odběr vždy po hyperemizaci

# Preanalytická fáze – odběr nesrážlivé krve



**Kapilární krev**



**Arteriální krev**



**Smíšená žilní krev**

**Odběr musí být**

- anaerobní
- bez bublin
- s dokonalým promícháním krve s protisrážlivým činidlem

# Označení vzorku a žádanky

- Laboratorní příručka



C. Manuál pro odběry primárních vzorků .....	
C-1 Základní informace .....	
C-2 Požadavkové listy (žádanky) .....	
C-3 Ústní požadavky na vyšetření (dodatečná a opakovaná vyšetření) .....	
C-4 Používaný odběrový systém .....	
C-5 Příprava pacienta před vyšetřením, odběr vzorku .....	
C-6 Identifikace pacienta na žádance a označení vzorku .....	
C-7 Množství vzorku .....	
C-8 Nezbytné operace se vzorkem, stabilita .....	
C-9 Základní informace k bezpečnosti při práci se vzorky .....	
C-10 Informace k dopravě vzorků a k zajištění svozu vzorků .....	
D. Preanalytické procesy v laboratoři .....	
D-1 Příjem žádanek a vzorků .....	
D-2 Kritéria pro přijetí nebo odmítnutí vadných (kolizních) primárních vzorků .....	
D-3 Postupy při nesprávné identifikaci vzorku nebo žádanky .....	
D-4 Vyšetřování smluvními laboratořemi .....	

# Povinné údaje na laboratorní žádance

Rodné číslo

Příjmení

Jméno

Plátce (kód pojišťovny):

Diagnóza

Nákl. středisko

Oddělení

ETIKETA

IČZ

Odbornost

Razítko zařízení:

Jmenovka lékaře

Datum odběru

Čas odběru

Den Měsíc Rok

Hodina Minuta

1 9 9

# Transport biologického materiálu

- Donáška
- Automobilová a jiná přeprava
- Potrubní pošta

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

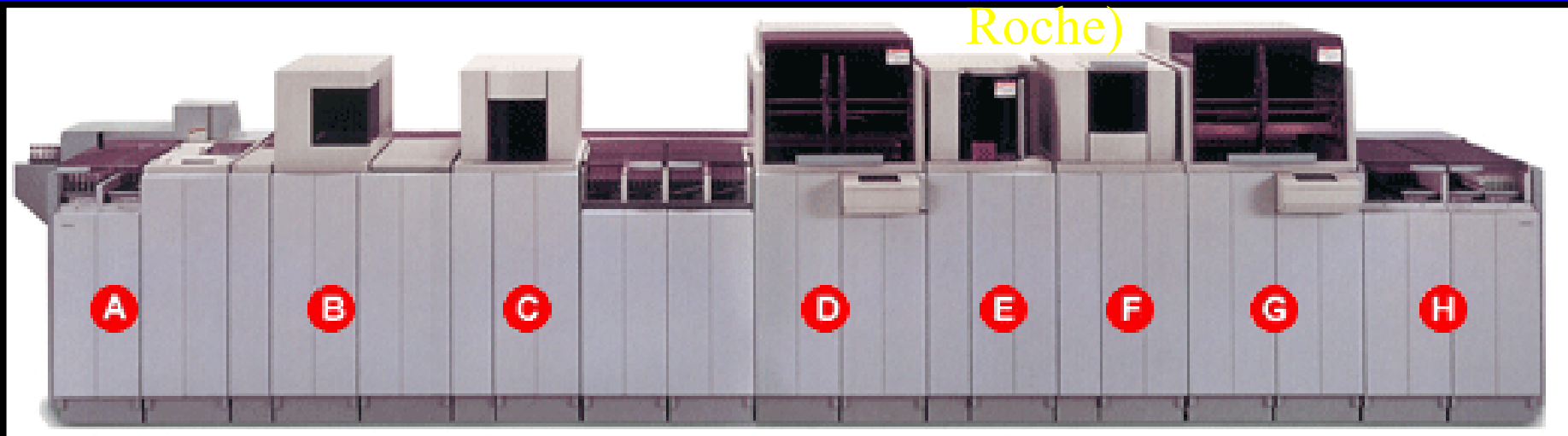
- TAT laboratorní
- TAT celkový

# Automatizace laboratorní preanalytická fáze

- A vstup vzorků a jejich identifikace
- B centrifugace
- C odzátkování
- D alikvotace
- E označování čárovými kódy
- F zazátkování
- G roztrídění alikvotů
- H třídění vzorků (rerun)

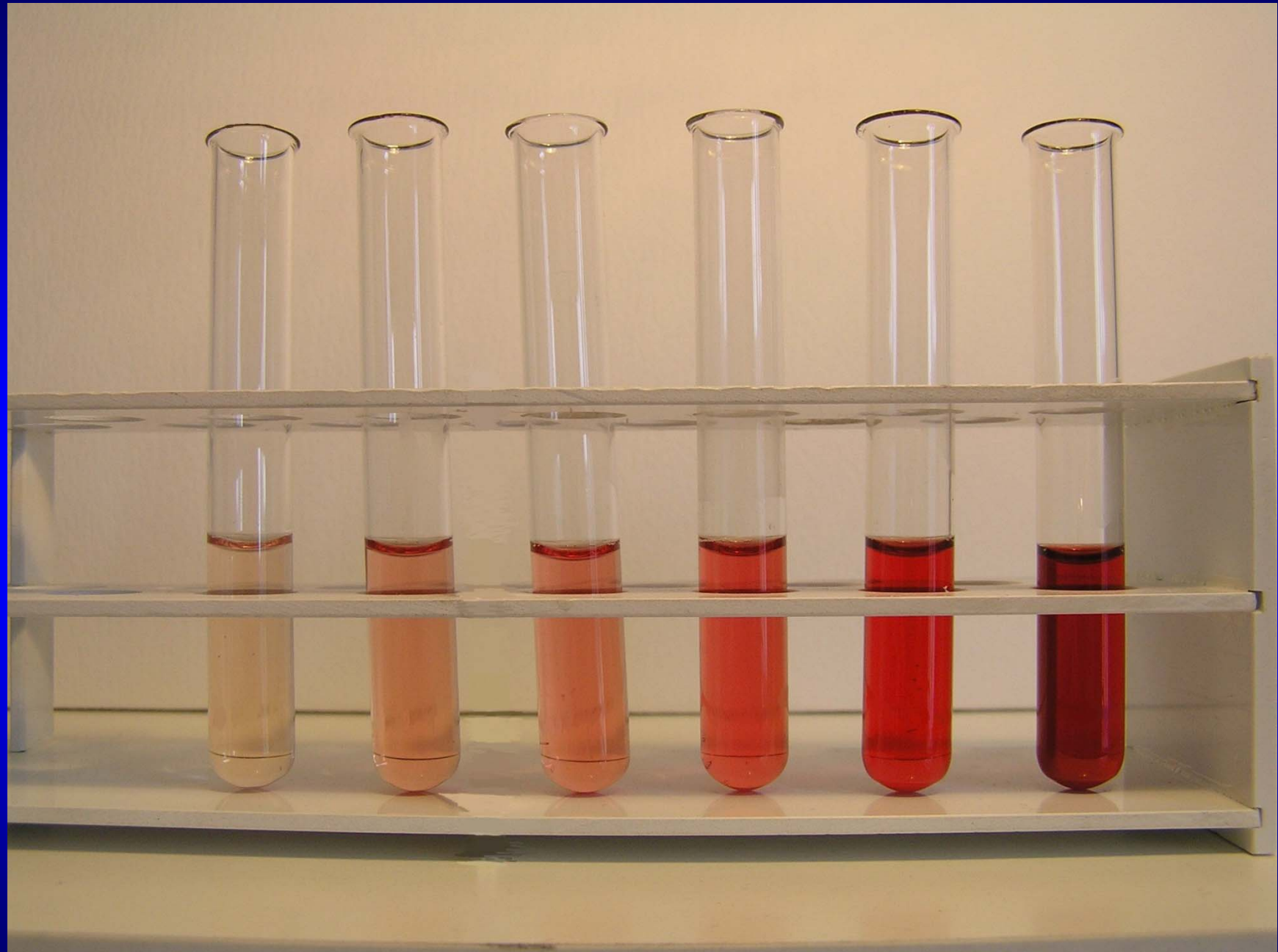
Modular Preanalytics,

Roche)



# Četnost preanalytických chyb

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





# Hemolýza

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

ovlivňuje minimálně 40 analytů

# Vznik hemolýzy (in vitro)

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

# Mechanismy působení hemolýzy

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

# 4. Vývoj klinické biochemie

# Pokrok v laboratorních technologiích

Od manuálních metod



a POCT

k automatizované analýze



## 1930 – 1950

- Metabolismus glukózy (Meyerhof)
- pH metry
- Citrátový cyklus (Krebs, Szent-Gyorgyi)
- Koenzymy NAD, FMN, FAD (Warburg)
- Ultracentrifugy (Svedberg)
- UV-VIS spektrofotometry
- Rozdělovací chromatografie
- Mikroskopy

1950-60:

laboratoře jako součást interní medicíny,  
neurologie, patologie,...

- Titrační metody
- Vážková analýza
- Plamenové emisní fotometry
- Elektroforéza
- Alfa-šroubovice proteinů (Pauling)
- Struktura glykogenu

## 1960-70

- 3D struktura proteinů (Phillips)
- Genetický kód
- Polarografie
- Atomová absorpční spektrofotometrie (AAS)
- První automatické analyzátoři (Technicon)
- Rozvoj enzymové diagnostiky
- Vyšetřování vnitřního prostředí
- Zavádění mikrometod a mechanizace

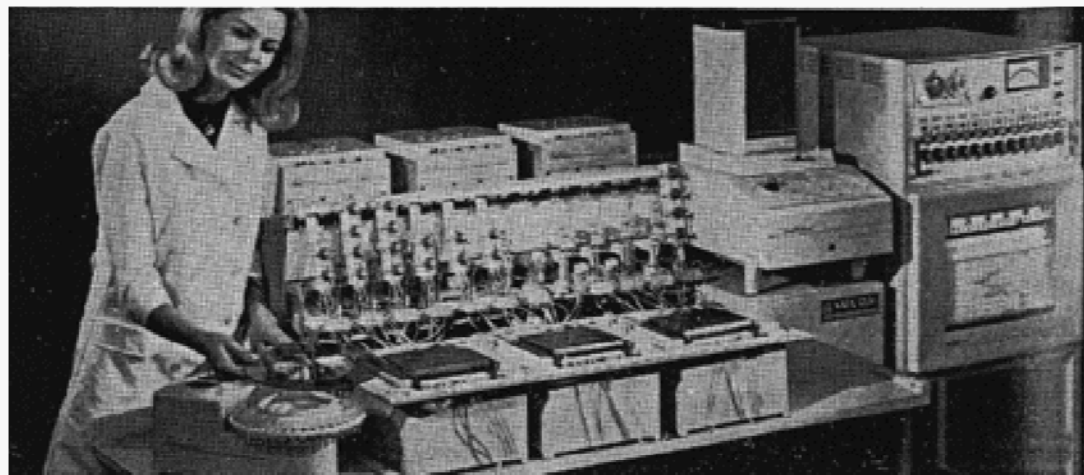
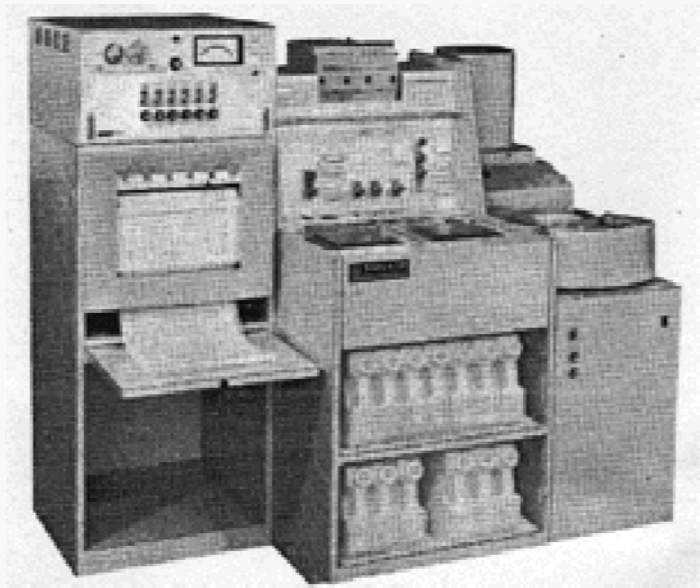


# AutoAnalyzer (Technicon)

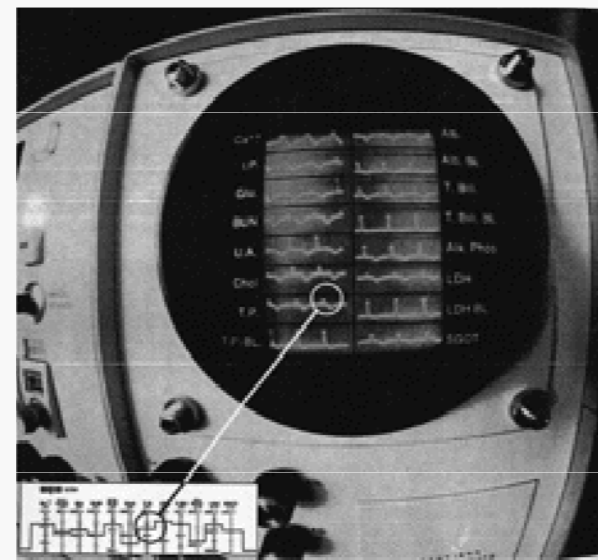


Průtokový systém, nejprve 1 kanál = 1 metoda

# SMA 6/60 a 12/60 (Technicon)



6 kanálů (6 metod)  
12 kanálů (12 metod)



## 1970-90

- Metabolické cesty a jejich regulace
- Sekvenování NK (Sanger)
- Nové enzymy
- Imunoanalytické metody (RIA, IEF, ELISA,...)
- Rozvoj enzymologie
- Rozvoj automatických analyzátorů
- ISE elektrody
- Laboratorní informační systémy (LIS)
- Rozvoj HPLC



1990 - dnešek

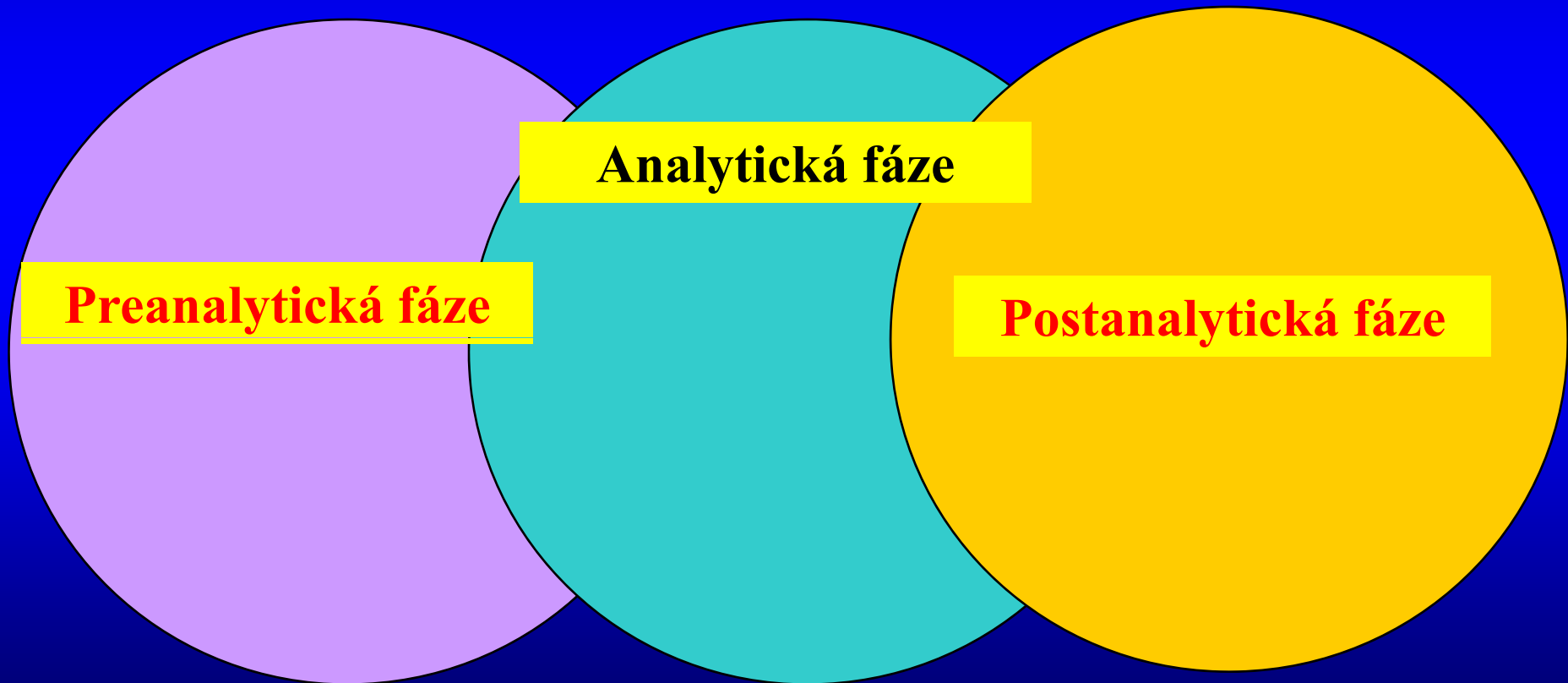
- Průtoková cytometrie
- Kapilární elektroforéza →
- Modulární systémy
- LIS, NIS, čárové kódy
- Mikročipy
- Automatizace preanalytické fáze
- Automatizace imunoanalytických metod
- **Luminiscenční metody**
- Akreditace a certifikace laboratoří
- objev PCR a dalších technik DNA a RNA analýzy



# 5. Automatizace a používané analytické techniky

# Specifické rysy (procesy) klinicko - biochemické analytiky

Požadavek → Výsledek (informace)



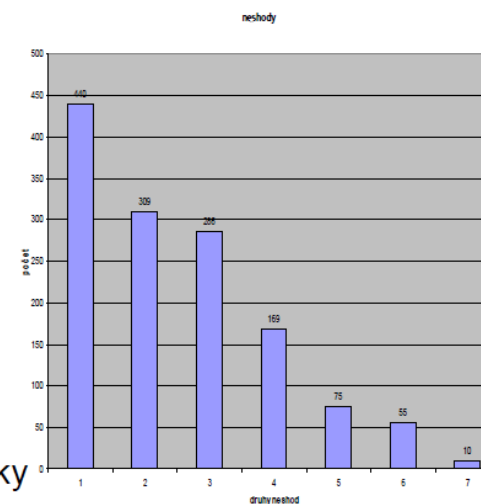
Analytická fáze nemůže korigovat chyby fáze preanalytické (G.von

## Preanalytické chyby (50-80% všech lab. chyb)

- Chybná identifikace žádánek a vzorků
- Chybný odběr vzorků  
(hemolýza, vysrážení, objem...)
- Transport vzorků

- Bez poškození 75,6%
  - zachyceno laboratoří nebo lékařem
- Nevhodná léčba 0,6%
  - možnost fatálních následků
- Zdržení terapie 5,6%
  - důsledky pro zdraví i ekonomiku
- Opakování vyšetření 16,9%
  - v dnešní ekonomické situaci velmi nepříjemné

- 284.270 přijatých žádánek  
(≠ 35.530 měsíčně)
- 1.344 odmítnutých žádánek:
  - 33 % chybí zkumavka
  - 23 % chybí žádanka
  - 21 % neoznačená zkumavka
  - 12 % neoznačená žádanka
  - 5 % nesouhlasí identifikace  
žádanka/zkumavka
  - 4 % odběr do špatné zkumavky
  - 0,7 % dodaná prázdná zkumavka



12

**Laboratorní automatizaci můžeme rozdělit  
do dvou hlavních směrů:**



**Úplná  
laboratorní  
automatizace**



**Modulární  
laboratorní  
automatizace**



# Rozdělení automatických analyzátorů

- **CHEMICKÉ** (homogenní analýza)  
Průtokové (historie) – Centrifugační (historie) – **Diskretní** –  
Suchá chemie

- **IMUNOCHEMICKÉ** (heterogenní analýza)

- Jiné:

CHROMATOGRAFICKÉ

MOČOVÉ

POCT



# Automatické analyzátory

**Selektivní** = provádějí jen požadované analýzy

**Programovatelné** (řízené PC, tj. postup analýzy, údržba, výpočty, QC,...)

identifikace reagensů i vzorků čárovými kódy

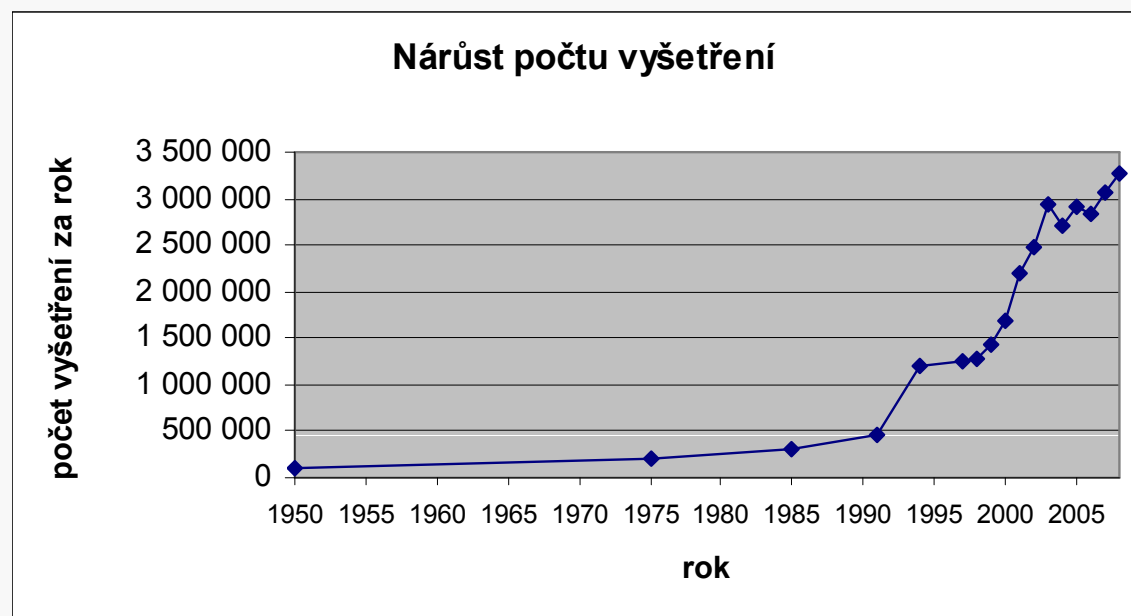
**Komunikace analyzátoru on-line s LIS**

**Možnost spojení s preanalytickými procesy**

- rychlost: ( nejčastěji 100 - 2 000 analýz/ h
- objemy: analyzovaných vzorků 1 - 30 ul  
reakční směsi 80 - 300 ul
- mycí stanice (kyvety, dávkovače, míchadla)
- řídicí jednotka (PC)
- speciální software
- odvíčkování, centrifugace, alikvotace, identifikace, uskladnění vzorků

## OKBH FN Brno

- Více než 2000 vzorků denně, cca 4 milióny testů ročně, provoz 24 hod. denně
- Automatizace analytické části od r.1989
- Automatizace perianalytické části od r.2008



# H 911 (Hitachi)



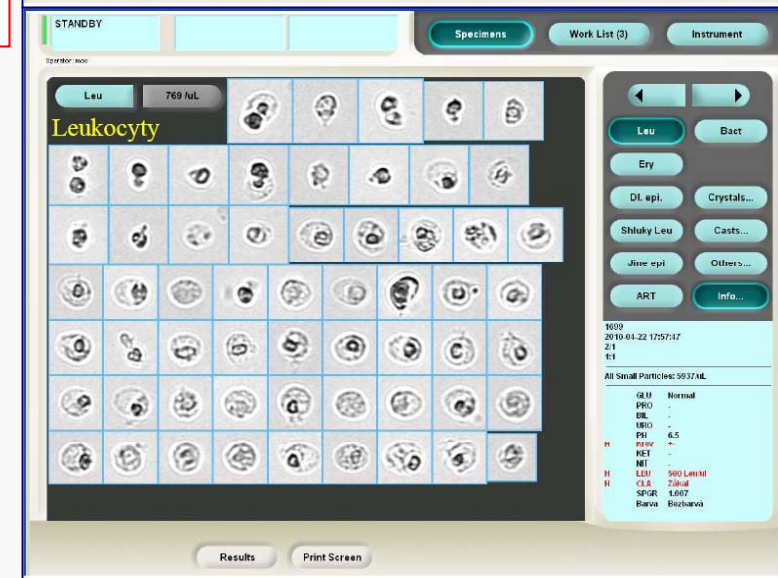
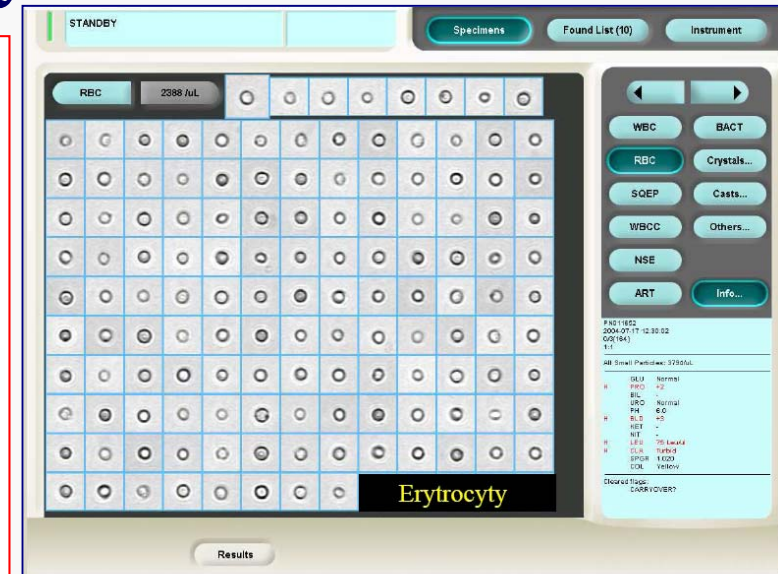
# Cobas 8000 (Roche)

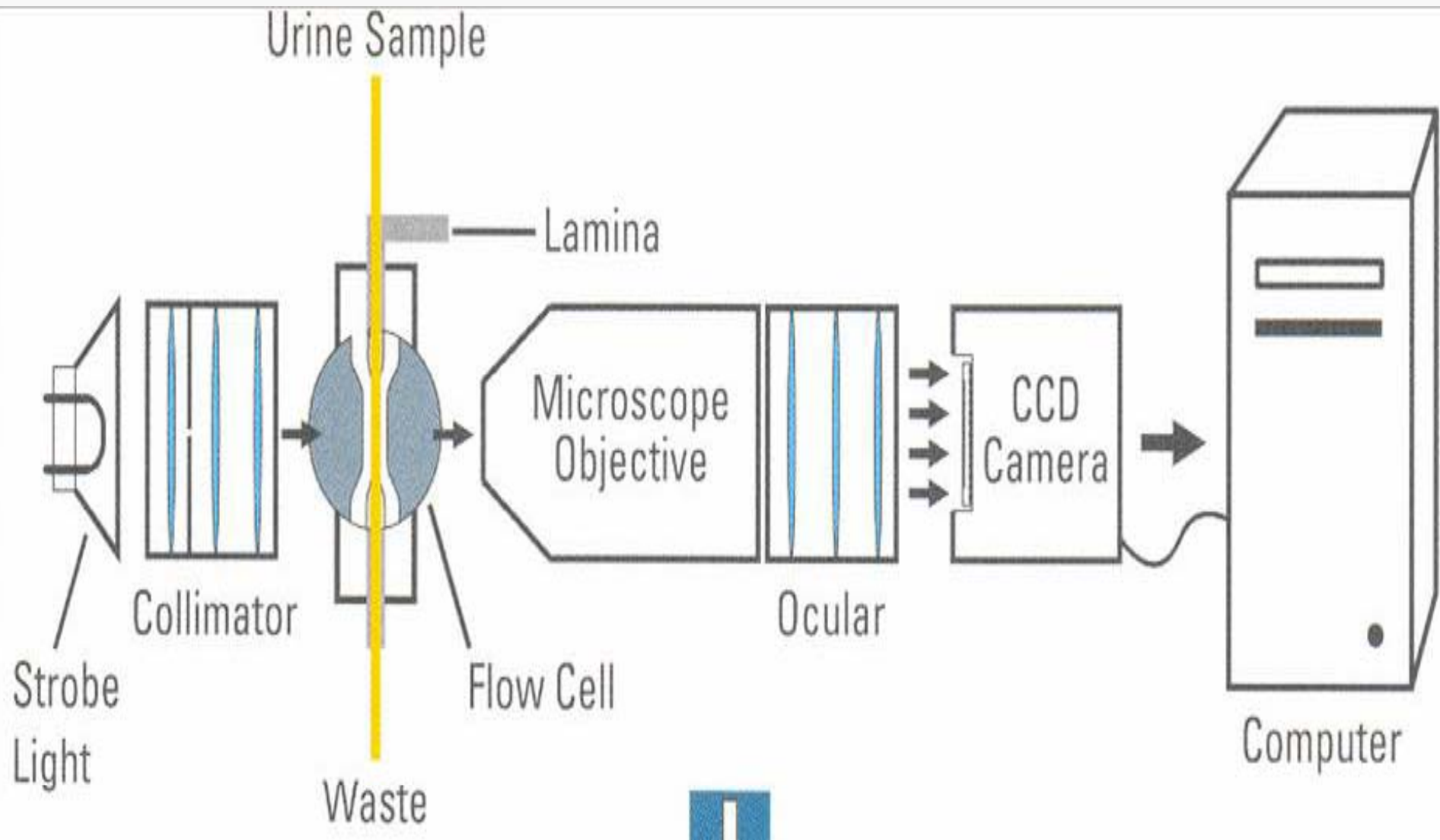


[https://edis.upol.cz/plain-1/av\\_object-48382](https://edis.upol.cz/plain-1/av_object-48382)

# IriCell (Iris)

## močový analyzátor



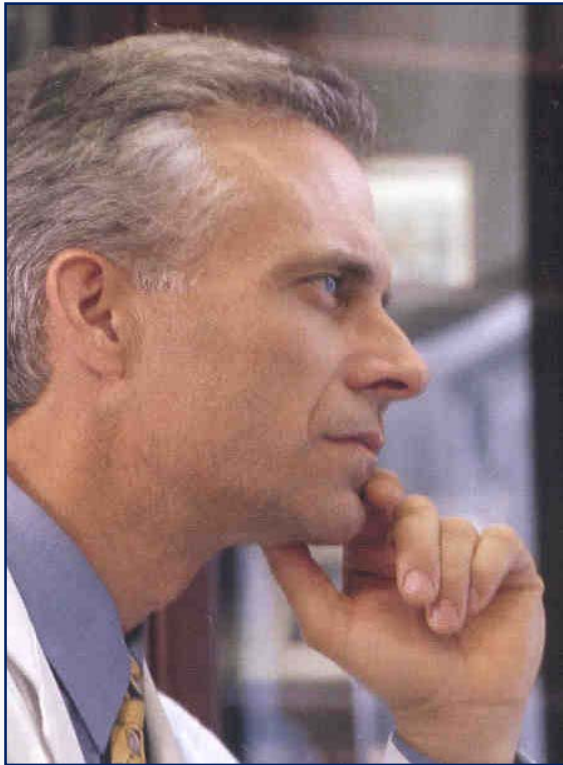




# 6. Řízení kvality a akreditace laboratoří

# Kvalita

Definice kvality je orientována na splnění požadavků  
zákazníka (ordinujícího lékaře)



- Často vnímáme kvalitu subjektivně
- **Kvalitu musíme prokázat**  
(požadavek plátců zdravotní péče =ZP)
- Požadavky na kvalitu se mění
- **Chyby nevznikají jen v laboratoři !**

# Garance kvality ve zdravotnictví uznávané VZP

- 1. Akreditace podle ČSN EN ISO 15189:2007**
2. Certifikace podle ČSN EN ISO 9001:2009
3. Národní akreditační systém dle SAK (Spojená akreditační komise MZ ČR)
4. Mezinárodní akreditační systém JCI (Joint Commission International)
5. e-ISO (Česká společnost pro akreditaci ve zdravotnictví)

# Akreditace

**Akreditace** = oficiální uznání, že laboratoř je způsobilá provádět zkoušky

➤ norma ČSN EN ISO 15189:2007) je základní normou pro posouzení způsobilosti klinických laboratoří

Podstata akreditace spočívá ve:

- Standardizaci (= přesný popis procesů, nastavení přesných pravidel, kontrolních mechanismů,.....)
- Vybudování funkčního systému managementu
- Posouzení kompetence pracovníků
- Neustálém zlepšování služeb

# Akreditace, certifikace, audit

- Akreditační orgán v ČR: **ČIA**, Český institut pro akreditaci
- **NASKL**, Národní autorizační středisko klinických laboratoří ČLS JEP) **Audit I a II**
- ❖ **Certifikace** = ověření fungování vybudovaného systému řízení (ČSN EN ISO 9001:2009)
- ❖ Interní a externí audit

# Jaké vyšetřovací metody můžeme používat?



- Laboratoř smí používat pouze produkty se značkou CE (Evropská unie; Od 7.12.2005 )
- Výrobce zaručuje, že výrobek splňuje direktivu IVD 98/79 EC, tj. požadavky na zdravotnické prostředky in vitro
- Výrobek je **validovaný** a má mít metrologickou **návaznost** hodnot kalibrátorů a kontrolních přípravků

# Validace a verifikace

## ✓ Validace

- splnění požadavků na měřící postup s ohledem na jeho zamýšlené použití
- důkaz ve formě dokumentace, že metoda bude poskytovat výsledky odpovídající předem určené specifikaci
- validuje výrobce diagnostik (direktiva IVD 98/79 EC), případně i laboratoř ( je to obtížné)

## ✓ Verifikace

- potvrzení, že laboratoř je schopná validovaný měřící postup správně provádět
- verifikuje laboratoř

# Co se validuje a verifikuje

## Analytické znaky metody

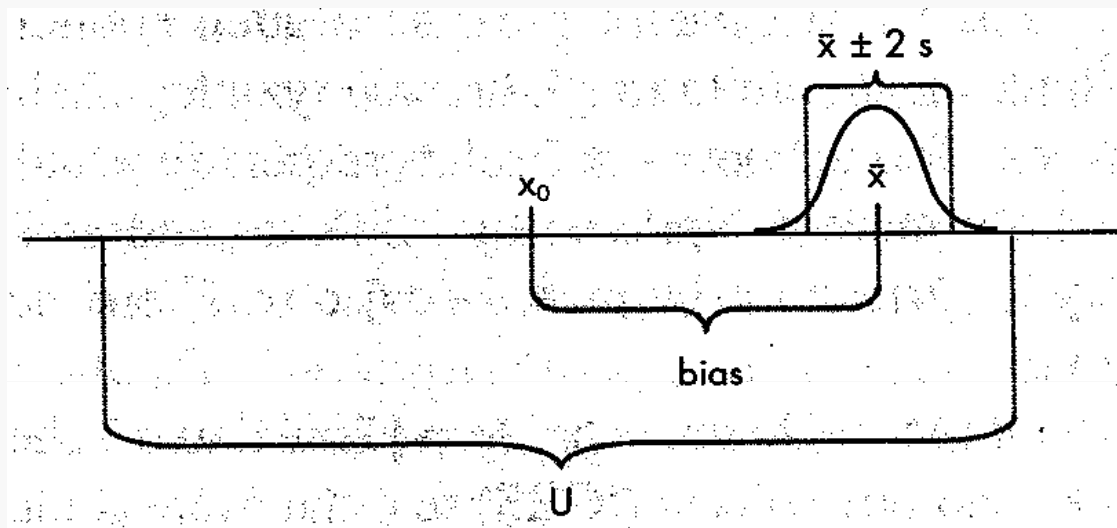
- **Preciznost a vychýlení** (náhodné a systematické chyby)
- Pracovní rozsah/ linearita
- Citlivost (mez detekce/ stanovitelnosti)
- Interference
- Robustnost
- Porovnání s jinou metodou

Při verifikaci ověřujeme, že jsme v laboratoři schopni dodržovat uvedené analytické znaky metody



# Nejistota (Uncertainty)

- Nejistota = kombinace náhodné a systematické chyby
- *Normy řízení kvality ukládají každé laboratoři vyhodnotit nejistoty svých měření*



# Návaznost

provázání rutinních měření s referenčními metodami a referenčními materiály

- Realizace návaznosti v klinické laboratoři je velmi obtížná (u biologických analytů je k dispozici referenční materiál/metoda pouze u 10 - 20% analytů)

Jak ji můžeme zjistit? → rozborem dokumentace výrobce

# Detekce laboratorních chyb

- **Vnitřní kontrola kvality (VKK, IKK)**

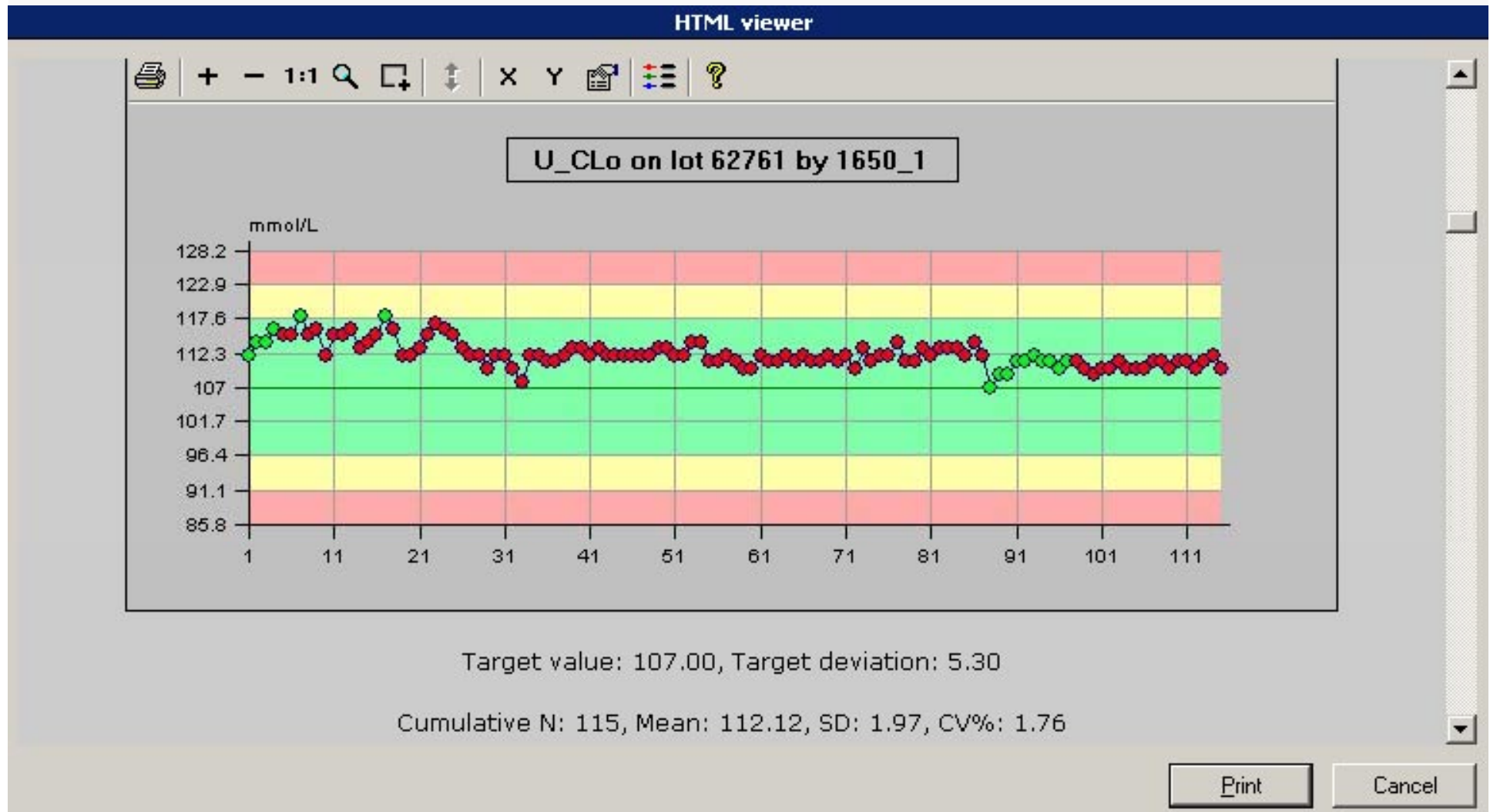
Postupy uplatňované pracovníky laboratoře s cílem získat co největší míru pravděpodobnosti, že vydávané výsledky jsou maximálně věrohodné

Software:     - v řídicí jednotce analyzátorů  
                  - v LIS  
                  - externí programy

- **Externí hodnocení kvality (EHK)**

- Detekce systematické chyby (vychýlení, bias)
- Srovnání preciznosti (přesnosti) s jinými
- Přispívá k odhadu nejistoty výsledků měření

# Regulační diagramy



# Stanovení požadavků na kvalitu

- Empiricky (state of art)
- Biologické variability,  $TE_{\text{biol}}$
- Klinické požadavky
- Doporučení odborných společností
- Data výrobců IVD (z validace)
- Systém six sigma ( $6\sigma$ )
- Celková analytická chyba,  $TE_a$

## Příklad: Výpočet TMU (cílové nejistoty měření) z biologické variability pro stanovení S-kreatininu

Intraindividuální biologická variabilita	<b>5,3</b>	Přesnost odvozená z biologických variabilit	<b>2,7</b>
Interindividuální biologická variabilita	<b>14,2</b>	Bias odvozený z biologických variabilit	<b>3,8</b>
celková biologická variabilita	<b>15,2</b>	Celková chyba odvozená z biologických variabilit	<b>8,2</b>
<a href="http://www.westgard.com">www.westgard.com</a>		Teoretická TMU(%)	<b>8,2</b>

# 7. Kazuistiky

# Kazuistika I

## DIABETES MELLITUS

mellitus

„sladký“

diabetes

„propouštět“



# Příčina

- Organismus nevytváří dostatek inzulínu nebo není schopen inzulín patřičně využít
- Charakteristická je chronická hyperglykémie (= zvýšená koncentrace glukózy v krvi)
- Je to onemocnění s několika zcela odlišnými mechanismy vzniku

# Gestační diabetes mellitus

(těhotenská cukrovka)

- Každá porucha metabolismu glukózy, která se projevuje nedostatečným působením inzulínu v těle, diagnostikovaná u těhotné ženy, při které dochází ke zvýšení koncentrace glukózy v krvi
- Gestační diabetes je laboratorně diagnostikován, je-li dosaženo aspoň jednoho ze dvou uvedených kritérií:
  - FPG (Fasting Plasma Glucose)  $\geq 5,6$  mmol/l
  - P-glukóza po 2 hodinách  $\geq 7,7$  mmol/l

# Gestační diabetes mellitus

- Nebezpečí pro plod, který na zvýšenou koncentraci glukózy v matčině krvi reaguje zvýšenou produkcí vlastního inzulínu (patří k růstovým faktorům) a začne přibývat rychleji na váze (defekty nervové trubice, fetální obezita, hypoglykémie po porodu, nebezpečí vzniku diabetu v dospělosti)

## Vyšetření oGTT:

- ❖ mezi 24.-28.týdnem gravidity
- ❖ při vysokém riziku v prvním trimestru gravidity
- Většině žen s těhotenskou cukrovkou stačí dieta (do konce těhotenství i v šestinedělí), výjimečně nasazení inzulínu.

Po ukončení gravidity je nutné provést rekvalifikaci gestačního diabetu

## oGTT u těhotných - kazuistiky

### Kazuistika - A

P-glykémie nalačno 5,8 mmol/l

Závěr: Glykémie nalačno u těhotné svědčí pro gestační diabetes mellitus. Opakujte odběr žilní nesrážlivé krve nalačno.

oGTT neproveden.

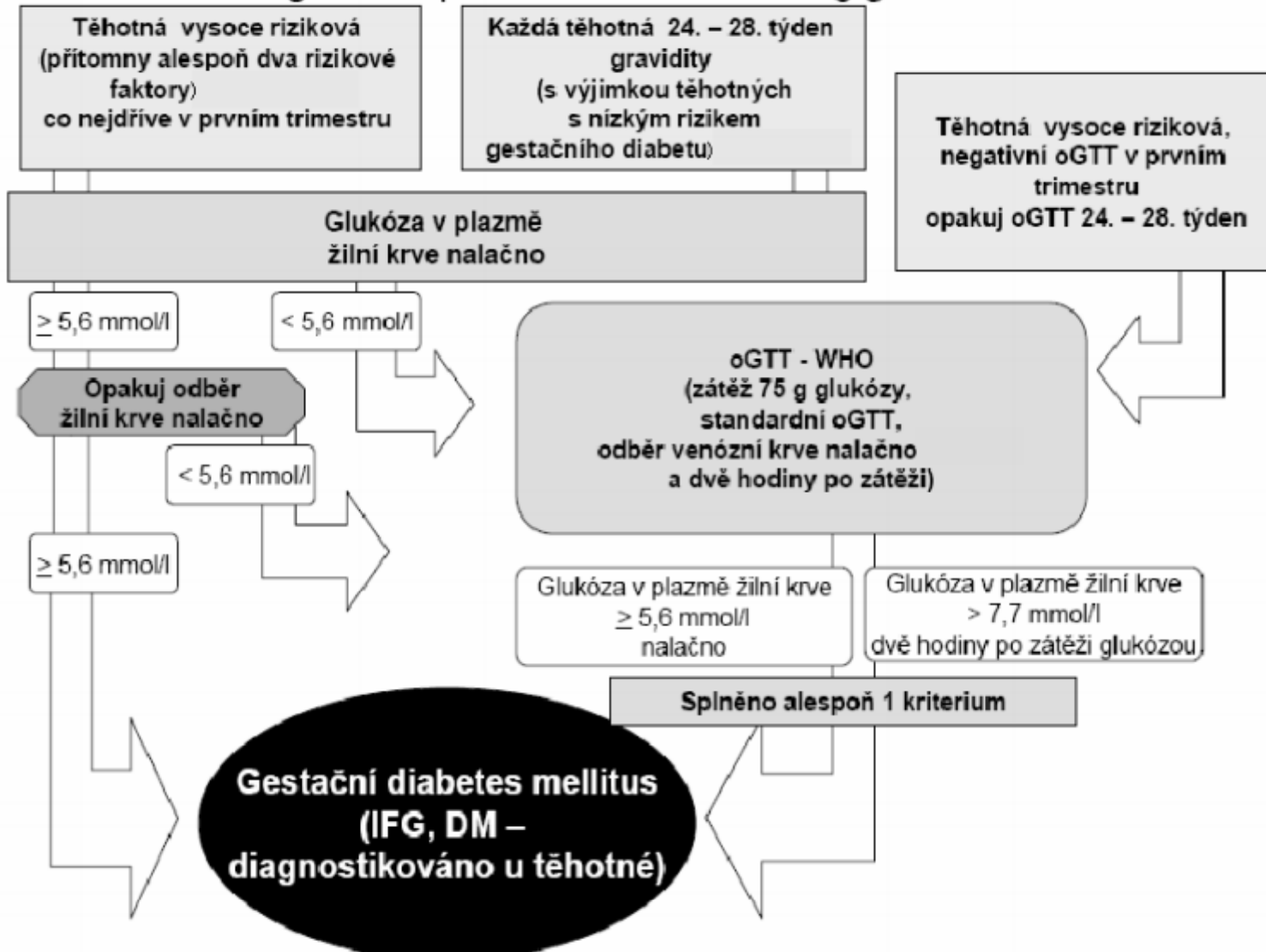
### Kazuistika - B

P-glykémie nalačno 4,8 mmol/l, za 2 h 7,9 mmol/l

Závěr: Glykémie 2 h po zátěži u těhotné svědčí pro gestační diabetes mellitus

doporučení ČDS a ČSKB

# Algoritmus pro laboratorní screening gestačního DM



# Kazuistika II

## **TDM**

Terapeutické monitorování lékových hladin

# Proč se u některých léků stanovuje jejich koncentrace?

- Hrozí jejich toxický účinek při předávkování např. nefrotoxicita, ototoxicita
- Některé mají úzké terapeutické rozmezí (Rozmezí mezi nejnižší koncentrací léku, při které se objevuje jeho účinek a nejvyšší koncentrací, při které se ještě neobjevuje toxický účinek léku)
- Lékař pozoruje nedostatečný účinek
- Je potřeba kontrolovat terapii
- Je podezření, že pacient léky neužívá  
(compliance = spolupráce pacienta)

# Léky jsou metabolizovány

- U stanovovaných léků je jejich metabolismus znám
- Přibližně u 20% osob probíhá odbourávání léčiv jinou rychlostí, než u většiny osob  
→ vzniká problém při stanovení dávky léku



# Co to způsobuje?

Dlouhou dobu se to nevědělo: lék se vysadil nebo změnil

- U pomalých metabolizátorů je to často zapříčiněno geneticky:  
vrozené „chybění“ nebo změněná funkce některého enzymu (např. cytochrom P450 se podílí na metabolismu asi 30% používaných léků)

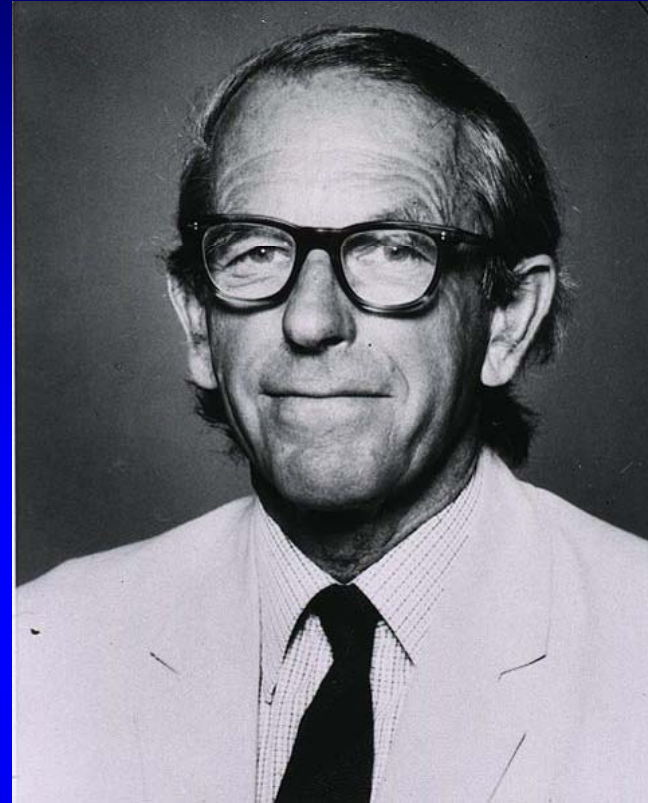
# Lithium - antidepresiva



- Profylaxe dalších fází maniodepresivního onemocnění
- Malá terapeutická šíře
- Zvýšená konc. lithia → hyponatremie, snížená glomerulární filtrace
- Kontrola v týdenních intervalech, později jednou za měsíc
- Bez pravidelné kontroly hladiny léčiva je terapie nepřijatelná



Děkuji za pozornost



## **Frederick Sanger**

(\* 13. srpna 1918, † 19. listopadu 2013)

- britský biochemik
- dvojnásobný nositel Nobelovy ceny :