

## Klinická biochemie

**Petr Breinek**  
(2013 - Petra Sýkorová)



PF\_klinická biochemie\_N 2012

1

## 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

2

## 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

3

## 1. Obor klinická biochemie



Česká společnost  
klinické biochemie

Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně

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

4

## Definice

Klinická biochemie je klinicko-laboratorní obor poskytující významné informace pro:

preventivní,  
diagnostickou  
a léčebnou péči  
napříč všemi lékařskými obory

5

## 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)*

6

## Laboratorní obory ve zdravotnictví

Klinická:

**Biochemie**

**Hematologie**

**Mikrobiologie**

**Imunologie**



Genetika

Toxikologie

Soudní lékařství

Alergologie

Histologie

Patologie

Nukleární medicína

7

## Laboratorní medicína?

Klinická patologie (USA)

Laboratorní medicína (D)

Klinická chemie

Klinická biochemie

Laboratorní diagnostika (SR)

.....

8

## 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*

9

## Základní trendy v laboratořích

❖ Laboratorní automatizace a robotika



- Japonsko: plně automatizované laboratoře
- ostatní: modulární automatizace

10

## Základní trendy v laboratořích

❖ Laboratorní automatizace a robotika

❖ Informační systémy



LIS (laboratorní informační systém)

NIS (nemocniční laboratorní systém)

11

## Personální zajištění

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

12

## Charakteristické pro zdravotnické laboratorní obory je:

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

13

## 2. Analyzovaný biologický materiál

14

## ANALYZOVANÝ MATERIÁL

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

- S-krevní SÉRUM
  - SRAŽLIVÁ krev  
doba srážení 30min a více  
centrifugace 10 min, 1500x g



- P-krevní PLAZMA

NESRAŽLIVÁ 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

20

#### 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  
Mozkomíšní mok  
Stolice  
Sliny, Pot, ...

#### ODBĚROVÉ SOUPRAVY

- JEDNORÁZOVÉ
- SÉRUM gel x aktivátor srážení
- PLAZMA heparin,  $\text{NH}_4$ , Li, EDTA, NaF,



SARSTEDT



#### Odběr žilní krve



## Kapilární odběr – místa odběru



Odběr vždy po hyperemizaci

## Preanalytická fáze – odběr nesrážlivé krve



Kapilární krev

Arteriální krev

Směšaná žilní krev

Odběr musí být

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

## Označení vzorku a žádanky

- Laboratorní příručka



C. Manual pro odběr primárních vzorků
C-1 Základní informace
C-2 Požadavky lity (žádanky)
C-3 Ústní požadavky na vylétní (dodatečná a opakovaná vylétní)
C-4 Použitý odběrový systém
C-5 Příprava pacienta před vylétním, odběr vzorku
C-6 Identifikace pacienta na žádance a označení vzorku
C-7 Množství vzorku
C-8 Nežby (ne operace se vzorkem, stabiliza)
C-9 Základní informace k bezpečnosti při práci se vzorky
C-10 Informace k dopravě vzorků a k zajištění vzorků
D. Preanalytické procesy v laboratorní
D-1 Příjem žádank a vzorků
D-2 Kritéria pro přijetí nebo odmítnutí vadných (kolizních) primárních vzorků
D-3 Postup při nepřesné identifikaci vzorku nebo žádanky
D-4 Vylétní a opakovaná vylétní

## Povinné údaje na laboratorní žádance

Rodné číslo  
 Příjmení  
 Jméno  
 Páteč (kód pojistovny)  
 Diagnóza  
 Nákl. středisko  
 Oddělení

IČZ  
 Razítko zařízení  
 Jmenovka lékaře  
 Datum odběru  
 Čas odběru  
 Den Měsíc Rok  
 1 9 9  
 Hodina Minuta

## Transport biologického materiálu

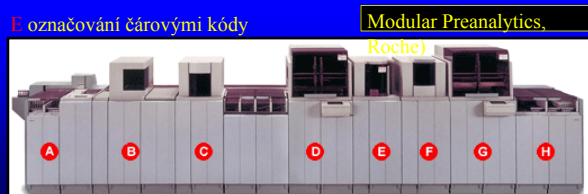
- Donáška
- Automobilová a jiná přeprava
- Potrubní pošta

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

- TAT laboratorní
- TAT celkový

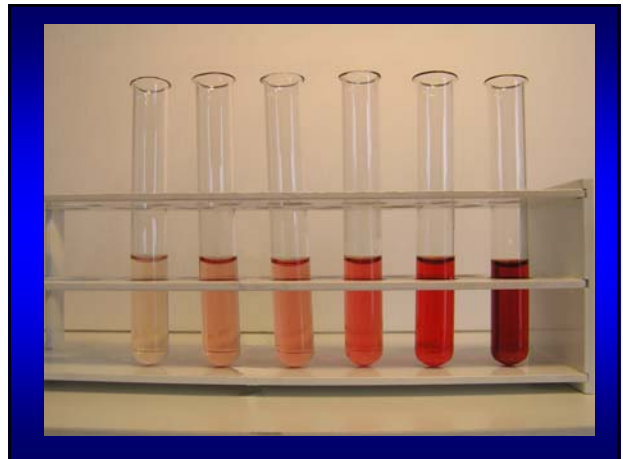
## Automatizace laboratorní preanalytické fáze

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



## Četnost preanalytických chyb

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



## Hemolýza

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

ovlivňuje minimálně 40 analytů

## Vznik hemolýzy (in vitro)

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

## Mechanismy působení hemolýzy

- Uvolnění hemoglobinu a dalších intracelulárních látek do séra nebo plazmy
  - zvýšení koncentrace (K, LD,...)
  - snížení koncentrace (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

38

1950-60:

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

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

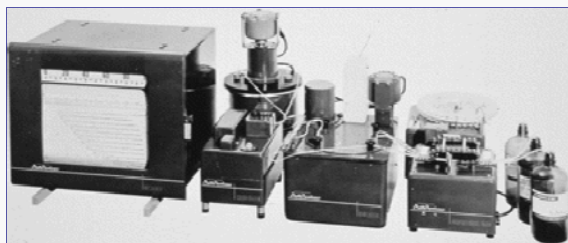
39

1960-70

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

40

### AutoAnalyzer (Technicon)



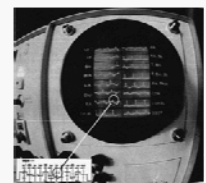
Průtokový systém, nejprve 1 kanál = 1 metoda

41

### 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



43

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

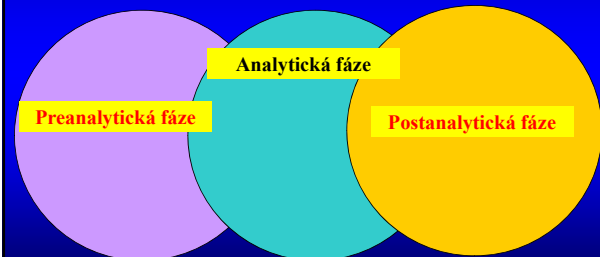


44

## 5. Automatizace a používané analytické techniky

Specifické rysy (procesy) klinicko - biochemické analytiky

Požadavek → Výsledek (informace)



Analytická fáze nemůže korigovat chyby fáze preanalytické (G.von)

45

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

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

- 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



47

Laboratorní automatizaci můžeme rozdělit do dvou hlavních směrů:

Úplná laboratorní automatizace

Modulární laboratorní automatizace

48



## Rozdělení automatických analyzátorů

- **CHEMICKÉ** (homogenní analýza)  
Průtokové (historie) – Centrifugační (historie) – Diskretní –  
Suchá chemie
- **IMUNOCHEMICKÉ** (heterogenní analýza)
- Jiné:

CHROMATOGRAFICKÉ

MOČOVÉ

POCT



## Automatické analyzáto

**Selektivní** = provádějí jen požadované analýzy

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

identifikace reagensií i vzorků čárovými kódy

**Komunikace analyzátoru on-line s LIS**

**Možnost spojení s preanalytickými procesy**

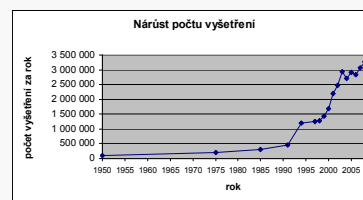
50

- **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

51

## 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)



53

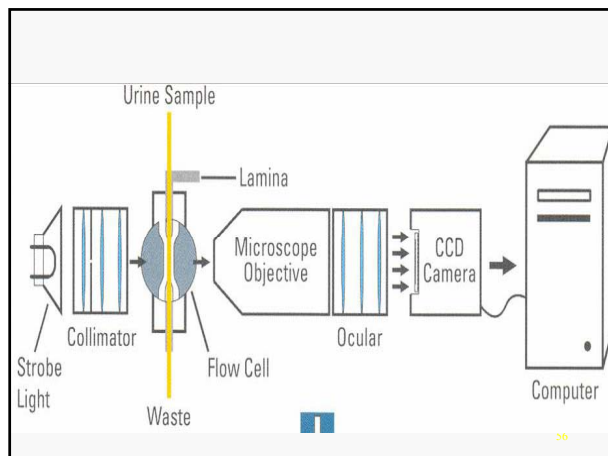
## Cobas 8000 (Roche)



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

54

### IriCell (Iris) močový analyzátor



## 6. Řízení kvality a akreditace laboratoří

57

### Kvalita

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



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

58

### 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)

59

### 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

60

## Akreditace, certifikace, audit

- Akreditační orgán v ČR: ČIA, Český institut pro akreditaci
- NASKL, Národní autorizační středisko klinických laboratorí ČLS JEP) Audit I a II

❖ **Certifikace** = ověření fungování vybudovaného systému řízení (ČSN EN ISO 9001:2009)

❖ Interní a externí audit

61

## 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 měřicí 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 měřicí postup správně provádět
- verifikuje laboratoř

63

## Co se validuje a verifikuje

### Analytické znaky metody

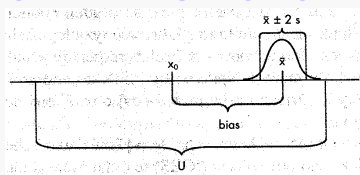
- Preciznost a vychýlení (náhodné a systematické chyby)
- Pracovní rozsah/ linearita
- Citlivost (mez detekce/ stanovitelnosti)
- Interference
- Robustnost
- Porovnání s jinou metodou

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

64

## Nejistota (Uncertainty)

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



65

## 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? → rozбором dokumentace výrobce

66

## 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

67

## 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,  $TE_a$

69

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

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

70

## 7. Kazuistiky

71

## Kazuistika I

### DIABETES MELLITUS

mellitus „sladký“  
diabetes „propouštět“

72

## Příčina

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

73

## 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

74

## 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
- Většinou žen s těhotenskou cukrovkou stačí dieta (do konce těhotenství i v šestinedělí), výjimečně nasazení inzulínu.

Po ukončení gravidity je nutné provést rekvalifikaci gestačního diabetu

75

## 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.

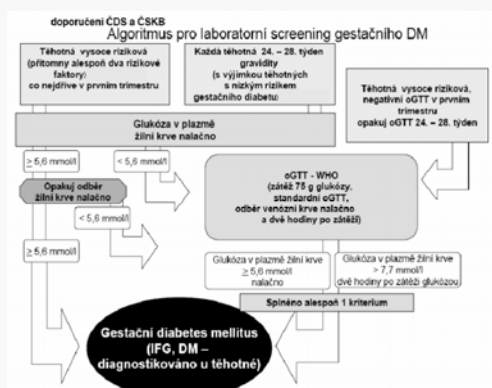
oGTT neproveden.

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

76



77

## Kazuistika II

### TDM

Terapeutické monitorování lékových hladin

78

## 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

80

## 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)

81

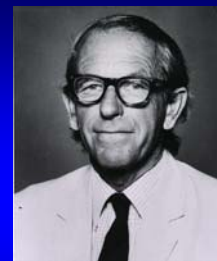
## Lithium - antidepresiva



- 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 :

84