



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Fyziologie-patofyziologie-diagnostika

# LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA

Lenka Dubská, Jaroslav Doubek, Eva Matalová,  
Kateřina Pilátová, Tereza Plesková, Kristína Greplová

Projekt „Od fyziologie k medicíně“ CZ.1.07/2.3.00/09.0219 je spolufinancován  
Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# Od fyziologie k medicíně

## LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA

**RNDr. Lenka Dubská, Ph.D.**

(dubska@mou.cz)

**Prof. MVDr. Jaroslav Doubek, CSc.**

(doubekj@vfu.cz)

**Doc. RNDr. Eva Matalová, Ph.D.**

(matalova@iach.cz)

**Mgr. Kateřina Pilátová**

(katerina.pilatova@mou.cz)

**MUDr. Tereza Plesková**

(tereza.pleskova@mou.cz)

**Mgr. Kristína Greplová**

(greplova@mou.cz)

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

ISBN 978-80-7305-116-7



## OD FYZIOLOGIE K MEDICÍNĚ - INTEGRACE VĚDY, VÝZKUMU, ODBORNÉHO VZDĚLÁVÁNÍ A PRAXE

CZ.1.07/2.3.00/09.0219

Projekt je určen pro:

- 1) **Akademické pracovníky VŠ** (školitele VŠ studentů na úrovni bakalářské, magisterské a doktorské)
- 2) **Studenty VŠ** (zpracovávající odbornou práci na úrovni bakalářské, magisterské nebo doktorské)
- 3) **Studenty a pedagogy SŠ** (s aktivním zapojením v SOČ)

Projekt nabízí:

- 1) Odborné vzdělávání formou **diskusních seminářů** se zaměřením na témata oceněná Nobelovými cenami za Fyziologii a medicínu
- 2) **Exkurze** na pracoviště vědy a výzkumu, aktivní **zapojení do experimentů**
- 3) Získání zkušeností s **atraktivní prezentací vlastních výsledků na odborných akcích** (konferencích)
- 4) Seznámení s možnostmi **mezinárodních kontaktů a uplatnění na světovém vědecko-výzkumném fóru**
- 5) Tištěné a interaktivní **publikace**

<http://cit.vfu.cz/fyziolmed>

Projekt je financován Evropským strukturálním fondem a státním rozpočtem České republiky.



## PANEL 1: VĚDA - VÝZKUM - VZDĚLÁVÁNÍ - MEZINÁRODNÍ UPLATNĚNÍ



Aktuální  
vědecké  
poznatky  
na úrovni  
Nobelových cen  
(věda)

Prezentace  
vlastního  
výzkumu  
(vzdělávání)

Mezinárodní  
možnosti  
(mezinárodní  
uplatnění)

Aktuální  
výzkum  
v oblasti  
fyziologie  
(výzkum)

## PANEL 2: VĚDA - VÝZKUM - PRAXE

Fyziologie-  
patofyziologie-  
medicína  
(humánní  
medicína)

Fyziologie-  
patofyziologie-  
medicína  
(diagnostika)

Studentská  
odborná  
konference

Fyziologie-  
patofyziologie-  
medicína  
(veterinární  
medicína)

## PANEL 2: VĚDA-VÝZKUM-PRAXE

### TÉMA 5: LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA

REGION: BRNO

TERMÍNY: 8. října 2010

9. října 2010

21. října 2010

22. října 2010

Místo konání: Masarykův onkologický ústav ([www.mou.cz](http://www.mou.cz))



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# ÚVOD

*Jaroslav Doubek, Eva Matalová*

Účinné řešení poruch zdravotního stavu vyžaduje zvládnout jejich diagnostiku. **Diagnostika** je proces, jehož cílem je stanovení diagnózy (tj. rozpoznání nemoci a její pojmenování) a prostředkem k dosažení cíle jsou různé vyšetřovací postupy. Jejich souhrn tvoří **vyšetření**.

Vyšetření lze členit podle oborů – vyšetření dýchacího systému, trávicího systému, nervového systému, vyšetření gynekologická apod. Jiné hledisko je: (1) vyšetření fyzikální (pohledem, pohmatem, poklepem, poslechem), (2) vyšetření přístrojové (zobrazovací metody – rentgen, ultrazvuk, počítačová tomografie, magnetická rezonance, pozitronová emisní tomografie aj., elektrofyziologické metody – např. elektrokardiografie).

Mezi vyšetření s vysokou mírou objektivity patří laboratorní vyšetření (výsledek je vyjádřen obvykle číselně). Uvádí se, že laboratorní vyšetření rozhoduje o správnosti diagnózy z více jak 70 %. Postihnutí souvislosti mezi výsledky laboratorního vyšetření a fyziologickými a patofyziologickými procesy je podstatou správné interpretace výsledků laboratorních testů.

**Laboratorní vyšetření (test)** se realizuje v klinické laboratoři, což je zařízení vyšetřující biologické materiály za účelem poskytnutí informací pro diagnostiku, terapii, prevenci nebo posouzení zdravotního stavu zdravých jedinců. Předmětem laboratorního vyšetření je stanovení hodnot veličin biochemických, hematologických, imunologických, cytologických a dalších. Biologickým materiálem je např. krev, moč, stolice, mozkomíšní mok, vzorky tkání.

Laboratoře jsou privátní (ambulantní, nemocniční, komerční) či veřejně právní (fakultní, univerzitní). Hranice členění je velice vágní, např. fakultní mohou být privátní.

Laboratorní diagnostika je víceodvětvový obor. Má řadu průníků do klinické medicíny (oborů interních, chirurgických, porodnictví). Člení se na **základní** laboratorní vyšetření (rychle dostupné) a **speciální** laboratorní vyšetření (nákladné, prováděné specializovanými laboratořemi). Mezi

základní patří vyšetření periferní krve (biochemické, hematologické, imunologické, mikrobiologické, sérologické), moči (fyzikální, chemické, mikrobiologické), u přežvýkavců vyšetření bachorové tekutiny (fyzikální, chemické, mikrobiologické) aj. Speciální laboratorní vyšetření můžeme vymezit z hlediska použitých metod (např. uplatnění metod molekulárně biologických), analytů (ukazatele poškození tkáně - různé markery, vybrané hormony, cytokiny apod.) a také hodnoceného biologického materiálu apod. Je zřejmé, že s rozvojem laboratorní medicíny se spektrum speciálních laboratorních vyšetření mění.

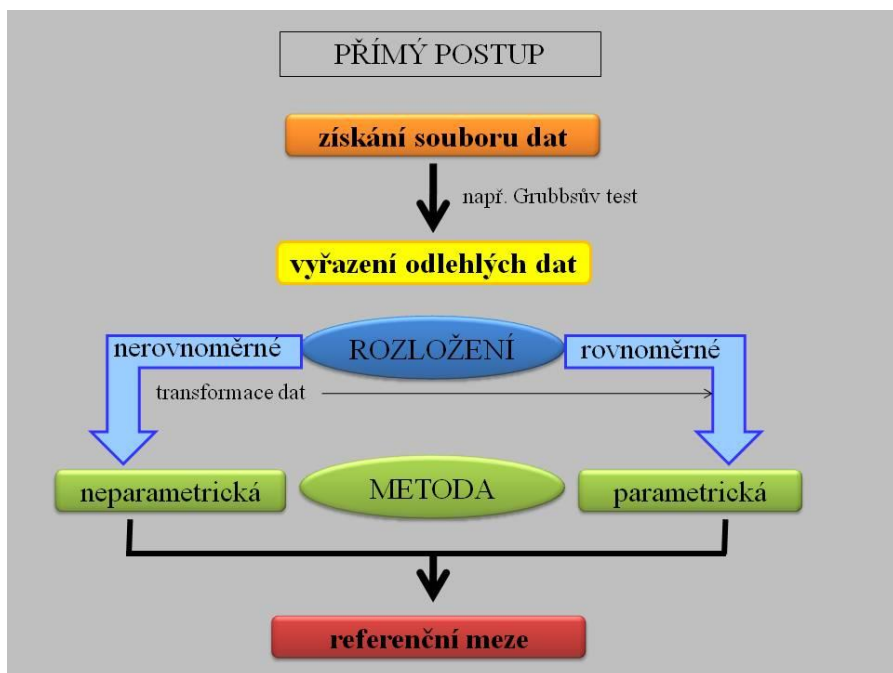
Laboratorní vyšetření se dále člení podle rychlosti provedení na rutinní (základní), statimová (přednostní), a z vitální indikace (okamžitá).

**Účelem** laboratorního vyšetření v klinické praxi je:

- **objektivizace** výsledků klinického a paraklinického (elektrokardiografického, rentgenologického, počítačovou tomografií apod.) vyšetření s cílem
  - stanovení **diagnózy**,
  - kontroly **účinnosti terapie**,
  - stanovení **aktivity onemocnění** a jeho **komplikací** (tzn. prognózy),
- stanovení určitého **znaku** nebo **vlastnosti** vyšetřovaného materiálu (např. krevní skupiny, typu zánětu, nádoru apod.),
- kontrola **výživy** a **dietních opatření** (preventivní metabolické testy ve veterinární medicíně),
- stanovení/zpřesnění **referenčních hodnot**.

*Referenční hodnoty jsou hodnoty laboratorního vyšetření, mezi nimiž leží většina (95 %) naměřených hodnot daného souboru zdravých jedinců. Jsou ohraničeny referenčními mezemi (dolní a horní) a mezi nimi je referenční interval (referenční rozmezí). Statisticky je referenční interval vymezen jako  $x \pm 2 SD$  (směrodatné odchylky). Jeho role je stále diskutována, hodnoty mimo něj se nemají automaticky označovat jako patologické (lépe jako velmi nízké nebo velmi vysoké). Za zdravého jedince se považuje jedinec s absencí anamnézy závažného onemocnění a absencí aktuálního onemocnění. To znamená, že nejsou zjištěny odchylky zdravotního stavu*

hodnoceného na základě klinického, paraklinického (viz výše) a laboratorního vyšetření za uplatnění standardních postupů vyšetřování. Diskutovanou otázkou je trvání absence anamnézy závažného onemocnění. S rozvojem standardních operačních postupů (přístrojů, analytických postupů apod.) jsou referenční hodnoty upravovány. V klinicko-laboratorní praxi se u některých parametrů „pracuje“ jen s horní mezí (aktivity enzymů, bilirubin atd.). U některých parametrů výrobci souprav neuvádějí referenční hodnoty, ale doporučené rozhodovací hodnoty (cut-off limity). **Kritická hodnota** je hranice, za níž je ohroženo zdraví pacienta.



Při interpretaci laboratorních nálezů je důležité hodnotit dynamiku změn, nikoliv jen izolovaný jednotlivý laboratorní výsledek a důležitá je konfrontace s klinickým nálezem.



Účel laboratorního vyšetření je splněn, má-li toto vyšetření požadovanou kvalitu. **Kvalita (jakost)** laboratorního vyšetření je určována zejména těmito kritérii:

- **správnost**, tj. maximální míra přiblížení skutečné hodnotě (bias měření),
- **přesnost**, tj. maximální vzájemné přiblížení opakovaných měření stejného vzorku, týká se krátkého období (počet stanovení min. 20),
  - přesnost v sérii = **opakovatelnost**,
  - přesnost mezi sériemi (v čase) = **reprodukovatelnost**,
- **srovnatelnost**, tj. minimální kolísání hodnot kolem střední hodnoty v v různých laboratořích,
- **dostupnost**, tj. časová, ekonomická přijatelnost,
- **včasnost a srozumitelnost** poskytovaných výsledků.

Z hlediska analytického musí mít metoda dvě základní vlastnosti:

- **citlivost**, tj. schopnost stanovit určitý parametr a postihnout nejmenší změnu výsledku,
- **specifičnost**, tj. schopnost metody stanovit jen určitý analyt („nevšímat“ si ostatních).

Obě tyto vlastnosti vypovídají o **užitečnosti** laboratorních testů.

Z hlediska klinického (diagnostické výpovědi) se hodnotí:

- **diagnostická citlivost** – vyjadřuje pravděpodobnost, že výsledek vyšetření bude pozitivní, bude-li vyšetřovaný jedinec nemocný,
- **diagnostická specifičnost** - vyjadřuje pravděpodobnost, že výsledek vyšetření bude negativní, bude-li vyšetřovaný jedinec zdravý.

Je žádoucí, aby diagnostická citlivost a diagnostická specifičnost byly co nejvyšší (oba ukazatele se vyjadřují v % nebo podílem z 1).

Pro výpočet diagnostické senzitivity a diagnostické specifičnosti je třeba mít údaje:

- o počtu zdravých jedinců s negativním laboratorním testem (tj. správná negativita),
- o počtu zdravých jedinců s pozitivním laboratorním testem (tj. falešná pozitivita),

- o počtu nemocných jedinců s pozitivním laboratorním testem (tj. správná pozitivita),
- o počtu nemocných jedinců s negativním laboratorním testem (tj. falešná negativita).

Z výsledků diagnostické citlivosti a specifčnosti lze vypočítat **prediktivní hodnotu**. Negativní prediktivní hodnota znamená, že pacient s negativním testem nemá pravděpodobně určitou nemoc. Pozitivní prediktivní hodnota znamená, že pacient s pozitivním testem má pravděpodobně určitou nemoc. Negativní prediktivní hodnota je poměr negativních testů při neexistenci nemoci ke všem negativním testům, pozitivní prediktivní hodnota je poměr pozitivních testů při existenci nemoci ke všem pozitivním testům.

Podíl správně diagnostikovaných jedinců ke všem vyšetřeným jedincům vyjadřuje **efektivitu** laboratorního testu (udává se v % nebo podílem z 1).

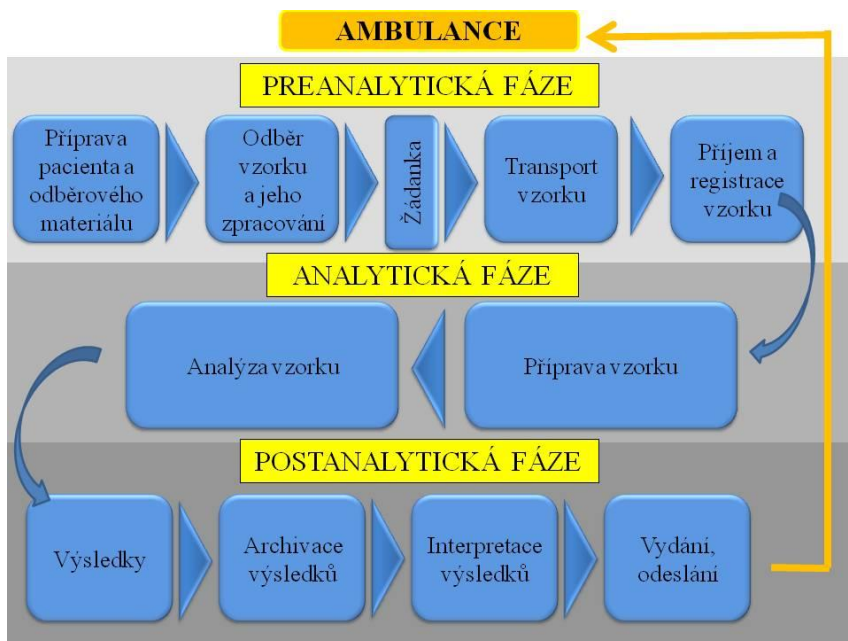
Základem kvality laboratorního vyšetření je dodržování zásad **správné laboratorní praxe** (GLP), tzn. podmínek činnosti laboratoře a dále principů **systemu managementu jakosti** (QMS), což je promyšlené vedení laboratoře a zapojení personálu s cílem systematického účelného ovlivňování procesů v laboratoři atd.). Výstupem musí být uspokojení požadavků klienta.

V některých zemích, zejména ze strany privátních laboratoří, jsou snahy o přímou formu služby, kdy mezi klientem a poskytovatelem služby (laboratoří) by byl přímý vztah (DTC). Vyšetření se má týkat snadno získatelných biologických materiálů, důležitou podmínkou je správná interpretace výsledků ze strany laboratoře nebo objedávajícího lékaře.

Ambicí laboratoře by mělo být dosažení akreditace. **Akreditace** je postup vyúsťující v dosažení způsobilosti provádět určitou laboratorní činnost v normě kvality. Zjednodušeně lze říci, že akreditace je zaměřena dominantně na kompetenci personálu. Druhým postupem je certifikace. **Certifikace** je vnímána jako dosažení shody mezi laboratoří a klientem (lékařem), že analýzy vyhovují požadavkům klienta. Koncentrovaně lze konstatovat, že certifikace je zaměřena hlavně na přístroje, reagentie,

metody. Základem pro akreditaci klinických laboratoří je mezinárodní norma ISO 15 189 (Zdravotnické laboratoře - Zvláštní požadavky na kvalitu a způsobilost) a je řízena inspektory Českého institutu pro akreditaci, o. p. s. (ČIA).

Vlastnímu laboratornímu vyšetření předchází **fáze preanalytická**, následuje **fáze analytická** (vlastní laboratorní test) a nakonec **fáze postanalytická**.



Tato publikace je vydávána pro vzdělávací cyklus na téma **fyziologie – patofyziologie – medicína: LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA**, který je realizován v rámci projektu Od fyziologie k medicíně (CZ.1.07/2.3.00/09.0219), jehož cílem je integrace vědy, výzkumu, odborného vzdělávání a praxe. Slouží jako podklady pro semináře a praktické části vzdělávacího cyklu, které představí laboratorní diagnostikou z integrujícího pohledu laboratorní medicíny, tedy komplexního laboratorního nálezu a jeho vztahu k patofyziologickým aspektům onemocnění.

# MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV

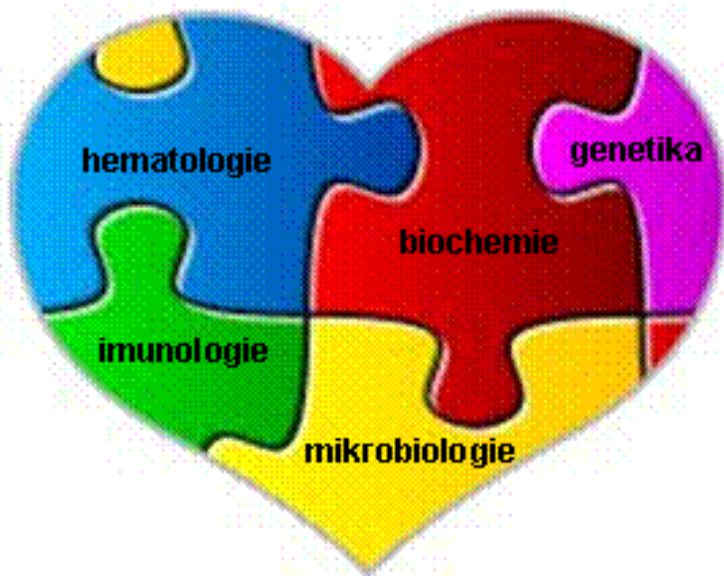
*Lenka Dubská*

Prezentovaným pracovištěm bude Oddělení laboratorní medicíny (OLM) Masarykova onkologického ústavu (MOÚ) [www.mou.cz](http://www.mou.cz), které poskytuje komplexní služby diagnostické a klinické laboratoře a laboratoře krevního skladu. OLM integruje diagnostiku v centrálních laboratořích (klinická biochemie a hematologie) s imunohepatologickými vyšetřeními, s běžnými i specializovanými testy pro stanovení nádorových markerů, s infekční sérologií, s analýzou průtokovou cytometrií pro imunologické a hematologické aplikace, ale také s molekulárními metodami prediktivní onkologie a molekulární mikrobiologie. Soubor nabízených vyšetření je vytvořen a inovován podle požadavků zadavatelů (klinických lékařů a zdravotnických zařízení) a v souladu s kapacitními, přístrojovými a odbornými možnostmi laboratoře. Pracovníci OLM se významným způsobem zapojují do vědecko-výzkumných aktivit a podílí se na pre- a postgraduální výuce na brněnských vysokých školách. <http://www.mou.cz/cz/oddeleni-laboratorni-mediciny/department.html?id=115>.

V teoretické části se odborné vzdělávání zaměří na vysvětlení pojmu laboratorní medicína a typů biologického materiálu, který je v diagnostických laboratořích vyšetřován. Dále budou probrány vybrané kapitoly z laboratorní diagnostiky týkající se (1) krevního obrazu, (2) bílých krvinek, (3) krevních skupin – transfuzní medicíny (4) nádorových markerů – onkofetálních proteinů, (5) kardiomarkerů, (6) vyšetření moči – chemie a močového sedimentu. V teoretické části budou posluchači také seznámeni s principem externího hodnocení kvality v klinické laboratoři. Bude navazovat praktická část, kde budou interaktivním způsobem probrány: (1) vybrané laboratorní kazuistiky, (2) na hodnocení morfologie bílých krvinek si účastníci vyzkouší princip externího hodnocení kvality, (3) na základě stanovení krevní skupiny vyberou přípravek pro krevní transfuzi, (4) vyzkouší si založení elektronického požadavku o laboratorní

vyšetření a vyšetření základní močové chemie a močového sedimentu. Porovnáním vědomostí na začátku a na konci vzdělávacího cyklu si účastníci ověří získané znalosti.

Laboratorní nález je součástí skládky, která umožní lékaři správně diagnostikovat onemocnění a úspěšně pacienta léčit. Lékař se rozhoduje na základě zhodnocení informací, které mu poskytují jednotlivé složky laboratorních provozů. Integrace laboratorní diagnostiky do oboru laboratorní medicíny je směr, kterým jde v dnešní době většina laboratoří.



## **Projekt RECAMO – budoucnost vědy a aplikovaného výzkumu v MOÚ**

V roce 2009 vznikl v MOÚ projekt RECAMO, který byl navržen k financování z Evropského fondu pro regionální rozvoj cestou operačního programu Výzkum a Vývoj pro Inovace, který je v České republice v gesci MŠMT. Projekt RECAMO – Regionální centrum aplikované molekulární onkologie – byl kladně hodnocený jak českým, tak mezinárodním panelem odborných hodnotitelů. Projekt integruje výzkumné činnosti MOÚ do dvou výzkumných částí – Výzkum rakoviny a Aplikovaná molekulární onkologie. Smyslem projektu je přispět kvalitními vědeckými výstupy do znalostní oblasti onkogeneze, metastazování, nádorové imunologie a angiogeneze a tyto poznatky dále testovat v klinické praxi. Proces klinického testování bude probíhat v aplikační části projektu – aplikovaná molekulární onkologie. Zde se budou testovat nová radiofarmaka určená k zobrazení nádorové tkáně *in vivo*, nové metody vizuální detekce buněčných markerů, metody zaměřené na měření solubilních biomarkerů a postupy směřující k možnému vývoji nových protinádorových terapeutik. Projektový tým tvoří špičkoví vědci s mezinárodní reputací a publikační historií, kteří budou zapojeni nejen do práce badatelské, nýbrž i do výuky pre- a postgraduálních studentů brněnských univerzit. Projekt má být ukončen koncem roku 2014. Předpokládá se, že projekt nastaví novou kvalitativní hladinu aplikovaného výzkumu v onkologii, zvýší zapojení regionálních partnerů (biotechnologický průmysl, univerzity). Upevní dále pozici MOÚ jako špičkového evropského komplexního onkologického centra. Centrum RECAMO (CZ.1.05/2.1.00/03.0101) je spolufinancováno Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky.

**RECAMO** 

Regional Centre  
for Applied Molecular  
Oncology

# MATERIÁL VYŠETŘOVANÝ V DIAGNOSTICKÉ LABORATOŘI

*Lenka Dubská*

Klinická laboratoř vyšetřuje nejrůznější typy biologického materiálu. Hematologická, biochemická, imunologická laboratoř pracuje zpravidla s materiálem odvozeným z krve vyšetřovaného. Vyšetřovaným materiálem může být dále moč, mozkomíšni mok či stolice. Histologická a histopatologická laboratoř pracuje především s tkáněmi vyšetřovaného nebo v rámci cytologických vyšetření s jednotlivými buňkami např. ve výplších (např. bronchoalveolární laváži), punktátu – při vodnatelnosti (ascitu), otisku mízní uzliny apod. Mikrobiologická laboratoř provádí kultivace patogenů z materiálu, ve kterém se předpokládá jejich výskyt, zejména. krev, moč, stolice, stěry, výtěry, oplachy (např. umělých materiálů v těle – žilní vstupy, srdeční chlopně). Vyšetření založená na nukleových kyselinách se provádějí z materiálu, v němž jsou přítomny buňky vyšetřovaného, nebo v případě extrahumánního genomu materiál, v němž je přítomna nukleová kyselina patogena.

**Krev** se vyšetřuje jako tzv. plná krev nebo složky krve, jako je plazma či sérum. Přirozenou vlastností krve je srážení, v němž hrají úlohu krevní proteiny koagulačního systému, krevní destičky a ostatní krevní elementy. Tato vlastnost je pro většinu analýz nevyhovující a srážení krve se předchází přidávkem protisrážlivých prostředků k odebírané krvi. V dnešní



době se zpravidla k odběrům krve používá uzavřený systém, kdy odběrová nádobka slouží zároveň jako zkumavka a je předplněna definovaným množstvím příslušného antikoagulačního prostředku. Po odběru je nutno krev s antikoagulans promíchat opakovaným převrácením zkumavky. Krevní buněčné elementy (červené a bílé krvinky, krevní destičky) se vyšetřují z plné krve, která je ošetřena proti srážení

přídavkem  $K_3EDTA$  nebo  $K_2EDTA$  (draselnou solí kyseliny etylendiaminotetraoctové), která má vlastnosti chelatačního činidla, tedy má schopnost vychytávat ionty.  $Ca^{2+}$  jsou nezbytné pro krevní srážení a jejich vychytáním brání EDTA velmi účinně koagulaci. Pro vyšetření nebuněčných složek krve se používá krevní plazma nebo sérum. Oba materiály získáme separací od buněčných elementů odstředěním (centrifugací). Sérum získáme centrifugací sražené krve, tedy po jejím odběru bez přítomnosti protisrážlivého prostředku (někteří laboratoři používají přídavek aktivátorů koagulace, např. kaolin). Plazmu získáme centrifugací krve ošetřené protisrážlivým přípravkem,  $K_3EDTA$  či  $K_2EDTA$  plazma se zpravidla nepoužívá. Vzhledem k tomu, že součástí biochemických vyšetření je většinou také ionogram, tedy stanovení iontů (K, Na, Cl, Ca, Mg, Fe), je pro tato vyšetření  $K_3EDTA$ , případně  $K_2EDTA$  plazma naprosto nevhodná. V takovém případě se využívá schopnosti heparinu blokovat krevní srážení způsobem nezávislým na chelataci iontů a odběr tzv. velké krve se provádí do zkumavky obsahující lithium-heparin. Pro vyšetření koagulačního systému je  $K_3EDTA$  ( $K_2EDTA$ ) plazma také nevhodná vzhledem k vysoké antikoagulační mohutnosti EDTA, se kterou souvisí nemožnost zvrátit její efekt přídavkem  $Ca^{2+}$ . Pro koagulační vyšetření se tedy používá plazma vzniklá separací krve s příměsí citrátu sodného. Podobně jako u EDTA je antikoagulační efekt založen na vyvázání  $Ca^{2+}$  a jejich následné nedostupnosti pro zahájení srážení. Nicméně tento efekt je v závislosti na prováděném testu potlačen přídavkem  $Ca^{2+}$  do reakční směsi koagulačního vyšetření.

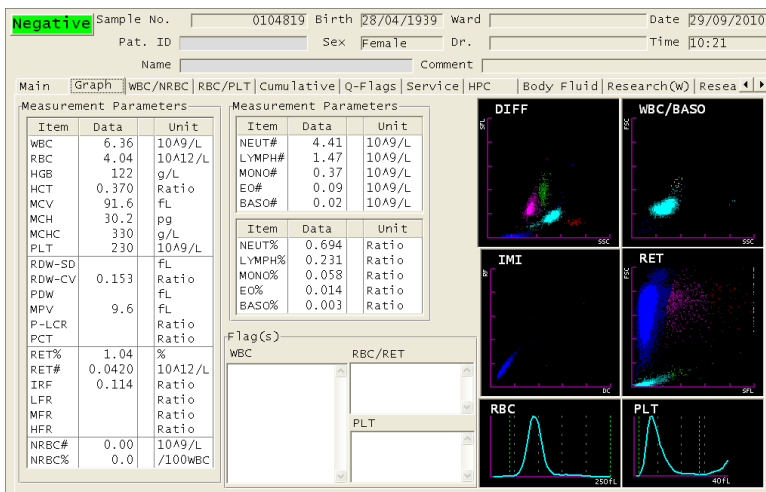
**Odběr moči** také reflektuje požadovaná vyšetření. Pro vyšetření chemických vlastností moči a močových částic - močového sedimentu se používá jednorázově odebraná moč (cca 10 ml) z tzv. středního proudu. Z takového vzorku může být provedena kultivace patogenů (většinou bakterií způsobujících infekce močových cest). Pro zjištění funkce ledvin se vyšetřuje tzv. sbíraná moč, což je vzorek moči sbírané do jedné nádoby po definovanou dobu, zpravidla 24 hodin. Vzhledem k tomu, že sběr moči není pro vyšetřovaného příliš komfortní, je snaha o nahrazení testů ze sbírané moči vyšetřeními z krve.



# KREVNÍ OBRAZ

Tereza Plesková

Krevní obraz (KO) je základní vyšetření krve, které poskytuje kvantitativní informace o buňkách bílé i červené krevní řady a krevních destičkách. Parametry KO jsou počet červených krvinek (erytrocytů), počet bílých krvinek (leukocytů), počet krevních destiček (trombocytů), koncentrace červeného krevního barviva (hemoglobinu), hematokrit, parametry týkající se erytrocytů, např. střední objem erytrocytu (MCV), střední obsah hemoglobinu v erytrocytu (MCH), střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytech (MCHC) a šíře distribuce erytrocytů (RDW), což je parametr ukazující na stejnou nebo rozdílnou velikost erytrocytů. Krevní obraz je v dnešní době stanovován pomocí automatických analyzátorů z plné krve a jeho součástí bývá i diferenciální rozpočet bílých krvinek. Některé hodnoty KO jsou určeny přímo analyzátozem (např. počty krevních buněk, koncentrace hemoglobinu, MCV), jiné musí být dopočítány (např. hematokrit). Uvedená referenční rozmezí jsou převzata z publikace *Hematology: Basic Principles and Practice / R. Hoffman et al. – 4th Ed. New York: Churchill Livingstone, 2005.*



## Erytrocyty

Erytrocyty člověka (ery) – červené krvinky jsou bezjaderné buňky velikosti přibližně 6-8x2  $\mu\text{m}$ . Mají bikonkávní tvar, který buňkám zajišťuje největší možný povrch pro výměnu dýchacích plynů dovnitř a ven z buňky a umožňuje průchod cévami o velmi malém průměru (2  $\mu\text{m}$ ). Erytrocyty se neustále tvoří v kostní dřeni procesem zvaným erythropoéza. Vývoj od kmenové buňky po zralý erytrocyt trvá přibližně 7 dní a každou sekundu je produkováno přibližně 2,4 milionu nových erytrocytů. Předposlední vývojové stadium se nazývá retikulocyt (jejich počet může být součástí vyšetření KO). Erythropoéza je regulována hormonem erythropoetinem, který je syntetizován v ledvinách a játrech. Životnost erytrocytu je 100-120 dní. Poškozené či staré krvinky jsou fagocytovány převážně retikuloendoteliálními buňkami sleziny, ale i jater a kostní dřene (makrofágy).

Hlavní funkcí erytrocytů je transport kyslíku z plic do všech tkání lidského organismu. Cytoplazma erytrocytů je bohatá na červené krevní barvivo (hemoglobin), který umožňuje transport především kyslíku a oxidu uhličitého v organismu.

Fyziologické hodnoty počtu erytrocytů (RBC) se liší podle věku a v dospělosti také podle pohlaví. Zvýšení počtu erytrocytů se nazývá **polycytemie**. Primárně vzniká při onemocnění *polycythaemia vera*. Sekundární polycytemie vzniká při poklesu  $\text{pO}_2$  u některých srdečních vad, chronických obstrukčních nebo restričních plicních onemocněních; při nádorech ledvin, CNS, jater, při renovaskulárních onemocněních, dále po transplantaci ledvin.

Snížení počtu erytrocytů se nazývá **oligocytémie**. Oligocytémie bývá u anémií. Anémie vzniká při nedostatku železa, ale také při polékovém útlumu kostní dřene (např. po aplikaci chemoterapeutik), nebo při infiltraci kostní dřene maligními buňkami, u hematologických onemocnění či chronickém onemocnění ledvin.

## Hemoglobin

Hemoglobin (Hb, HbG) - červené krevní barvivo, je kompaktní globulární bílkovina složená ze 4 podjednotek. Každá podjednotka je tvořena polypeptidovým řetězcem globinu s navázanou prostetickou skupinou hemu. Hem je cyklický tetrapyrrol obsahující v centru atom železa v oxidačním stupni II, které má schopnost na sebe vázat kyslík. Hb je tvořen vždy dvěma dvojicemi odlišných polypeptidů ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , S atd.). Normální lidský hemoglobin HbA obsahuje podjednotky  $\alpha$  a  $\beta$  ( $\alpha_2\beta_2$ ). Nejdůležitější funkcí hemoglobinu je transport kyslíku z plic do periferních tkání. Podílí se také na transportu  $\text{CO}_2$  opačným směrem, tedy z tkání do plic. Hemoglobin je také součástí pufrovacího systému krve, který udržuje acidobazickou rovnováhu.

Fyziologické koncentrace hemoglobinu v krvi jsou různé s ohledem na věk a v dospělosti na pohlaví stejně jako u erytrocytů, s jejichž hodnotami korelují.

Zvýšení koncentrace hemoglobinu nacházíme u stejných stavů jako polycytemie. Při diagnostice anémií je snížení koncentrace hemoglobinu často cennějším ukazatelem než absolutní počet erytrocytů. U nejčastěji diagnostikované sideropenické anémie (z nedostatku železa) je nízká koncentrace hemoglobinu při nesníženém počtu erytrocytů.

## Hematokrit

Hematokrit (HCT, Ht) je poměr objemu erytrocytů k objemu plné krve. Hodnota hematokritu je udávána v l/l nebo v %. Dříve se hematokrit stanovoval centrifugací nesrážlivé krve v kapiláře (mikrohematokrit), kdy dojde k oddělení krevních elementů a plazmy. V současné době se hematokrit stanovuje výpočtem z celkového počtu erytrocytů (RBC) a středního objemu erytrocytu (MCV) jako  $\text{HCT} = \text{RBC} \times \text{MCV}$ .

Fyziologicky vyšší hematokrit mají novorozenci. Patologicky se s ním setkáváme při polycytemii (viz výše). Hematokrit je také pomocným ukazatelem u pacientů s dehydratací (hodnota se zvyšuje).

Hematokrit je snížen při anémiích (viz výše) nebo také při infuzní terapii, kdy dochází k naředění (diluci) krve.

## Střední objem erytrocytu

Střední objem erytrocytu (MCV) je základním parametrem erytrocytu. V současné době je stanovován přímo hematologickými analyzátoři. Dříve se stanovil výpočtem: vydělením hodnoty hematokritu (stanovené centrifugací v kapiláře) celkovým počtem červených krvinek. Udává se ve femtolitrech ( $10^{-15}$  l).

Hodnota MCV je důležitá v diferenciální diagnostice anémií. Podle MCV můžeme anémie klasifikovat na (1) **mikrocytární** se sníženým objemem erytrocytů, např. sideropenická anémie, (2) **normocytární**, např. anémie při deficitu vitamínu B<sub>2</sub> či B<sub>6</sub> nebo zvýšeném rozpadu červených krvinek, (3) **makrocytární** se zvýšeným MCV, při megaloblastové anémii z nedostatku vitamínu B<sub>12</sub> či kyseliny listové.

Referenční hodnoty parametrů krevního obrazu týkající se erytrocytů

Věk	Ery [ $10^{12}$ /l]	Hb [g/l]	HCT [l/l]	MCV [fl]
do 3 dnů	4,0-6,6	145-205	0,45-0,67	95-121
do 7dnů	3,9-6,2	135-215	0,42-0,66	88-126
do 14 dnů	3,6-6,2	125-205	0,39-0,63	86-124
do 30 dnů	3,0-5,4	100-180	0,31-0,55	85-123
do 2 měsíců	2,7-4,9	90-140	0,28-0,42	77-115
do 6 měsíců	3,1-4,5	95-135	0,29-0,41	74-108
do 23 měsíců	3,7-5,3	105-135	0,33-0,39	70-86
do 6 roků	3,9-5,1	115-135	0,34-0,40	75-87
do 12 roků	4,0-5,2	115-155	0,35-0,45	77-95
dívky do 18 roků	4,1-5,1	120-160	0,36-0,46	78-102
chlapci do 18 roků	4,5-5,3	130-160	0,37-0,49	78-108
ženy	4,0-5,2	120-160	0,36-0,46	80-110
muži	4,5-5,9	135-175	0,41-0,53	80-110

## **Trombocyty**

Trombocyty (Plt) – krevní destičky, nejsou pravé buňky, ale bezjaderné části cytoplazmy, fragmenty mateřské buňky megakaryocyty, jež se nachází v kostní dřeni. Velikost trombocytů je u člověka 2-4  $\mu\text{m}$  a patří mezi krátce žijící krevní elementy. V krvi přetrvávají 5-9 dní. Krevní destičky hrají důležitou roli v hemostáze (zástavě krvácení) a srážení krve. Základními funkcemi destiček je adheze, aktivace, agregace a prokoagulace. Adhezí krevních destiček na obnažené endotelie poraněné cévy a jejich následnou agregací vzniká primární hemostatická zátka. Definitivní krevní sraženina se vytvoří až zpevněním primárního trombu fibrinovými vlákny. Současně probíhá i plazmatická koagulace, jejímž výsledkem je přeměna rozpustného fibrinogenu na nerozpustný fibrin. Trombocyty jsou také zdrojem růstových faktorů.

Zvýšení počtu trombocytů se nazývá **trombocytémie**. Z patologických stavů se zvýšeným počtem trombocytů vyznačují solidní nádory (např. plicní karcinom), bakteriální infekce, chronická zánětlivá onemocnění (např. revmatoidní artritida), nedostatek železa, krvácivé stavy (přechodně zvýšení), přechodně také myeloproliferační onemocnění atd. Reaktivní trombocytémie může vzniknout také při námaze. Počet trombocytů často odráží aktivitu nemoci a při úspěšné terapii klesá. Příliš vysoké množství trombocytů může vést k tvorbě trombů (krevních sraženin uvnitř cév). Obstrukce cévy trombem může způsobit např. plicní embolii nebo mozkovou příhodu.

Snížení počtu trombocytů se nazývá **trombocytopenie**. Vyskytuje se např. při splenomegalii (trombocyty jsou nadměrně destruovány ve zvětšené slezině), infiltraci kostní dřeni nádorovými buňkami (je utlumena tvorba trombocytů), hemoragiích (krvácení), přechodně také při postinfekčních stavech, ale také při menstruaci. Velmi nízká hodnota počtu trombocytů vede k nadměrnému, nejčastěji kožnímu a slizničnímu krvácení v důsledku poruchy primární hemostázy.

## Referenční hodnoty počtu krevních destiček

Ženy		Muži	
Věk	Plt [10 <sup>9</sup> /l]	Věk	Plt [10 <sup>9</sup> /l]
do 6 roků	229-553	do 6 roků	217-497
do 11 roků	184-488	do 11 roků	181-521
do 16 roků	153-442	do 16 roků	156-408
do 21 roků	154-386	do 21 roků	140-392
do 31 roků	154-386	do 31 roků	140-336
do 41 roků	170-394	do 41 roků	132-356
do 51 roků	139-409	do 51 roků	139-403
do 61 roků	136-380	do 61 roků	136-380
do 71 roků	152-396	do 71 roků	152-396
nad 71 let	139-335	nad 71 let	150-362

## Leukocyty

Leukocyty (leu) - bílé krvinky, jsou buňky imunitního systému, který zajišťuje obranyschopnost vůči patogenním organismům, cizím materiálům či nádorovým buňkám. Rozlišuje se 5 odlišných populací leukocytů. Informaci o jejich počtu získáme vyšetřením diferenciálního rozpočtu bílé krevní řady.

Celkový počet bílých krvinek (WBC) je často indikátorem nemoci. Zvýšení počtu bílých krvinek se nazývá **leukocytóza**. Leukocytóza provází bakteriální infekční onemocnění, zánětlivá onemocnění, nádorová onemocnění, myelo- a lymfoproliferativní onemocnění aj. Zvýšení počtu leukocytů pozorujeme i v pozdním těhotenství, u kuřáků, obézních, po fyzické námaze, při traumatech, z emocionálních příčin, jako je strach či úzkost, po aplikaci léků jako heparin atd.

Snížení počtu leukocytů se nazývá **leukopenie**. Leukopenie může nastat z poruchy zrání granulocytů, po chemo- či radioterapii, při leukemiích i u solidních tumorů, sekundárně u virových infekčních onemocnění (např. chřipky, hepatitidy A, B, neštovic aj.).

Referenční hodnoty celkového počtu bílých krvinek

	Věk	Leu [10 <sup>9</sup> /l]
<b>Děti</b>	do 24 hodin	13,0-38,0
	do 7dnů	9,4-34,0
	do 14 dnů	5,0-21,0
	do 30 dnů	5,0-20,0
	do 6 měsíců	5,0-19,5
	do 24 měsíců	6,0-19,5
	do 4 roků	6,0-17,0
	do 6 roků	5,5-15,5
	do 8 roků	5,0-14,5
	do 10 roků	4,5-13,5
	do 16 roků	4,5-13,5
<b>Dospělí</b>	do 21 roků	4,5-13,0
	od 21 roků	4,5-11,0

## DIFERENCIÁLNÍ ROZPOČET BÍLÝCH KRVINEK

*Lenka Dubská*

Bílé krvinky (leukocyty) hrají velmi důležitou úlohu při obraně organismu proti cizímu a/nebo nebezpečnému. Primárně se dělí leukocyty na **granulocyty** (inherentní součástí cytoplazmy jsou granule), které jsou zároveň **polynukleáry** nebo polymorfonukleáry (PMN, mají segmentované jádro), a do této skupiny patří neutrofilní granulocyty, bazofilní granulocyty, eozinofilní granulocyty. Druhou významnou skupinou jsou **agranulocyty/mononukleáry** - lymfocyty a monocyty. Toto rozdělení ještě nereflktuje funkci leukocytů a používá se spíše v cytologii nežli v hematologii. Všechny krevní elementy se diferencují ze společné buňky v kostní dřeni. Posledními společnými stadii granulocytů jsou prekurzory myeloblast a následně promyelocyt. Diferenciace do buňky se segmentovaným jádrem, která se vyskytuje v periferní krvi, probíhá přes stadia: myelocyt, metamyelocyt, tyčka, segment. Na úrovni myelocytu lze granulocyt již diferencovat podle charakteru granúl (např. neutrofilní myelocyt, neutrofilní metamyelocyt, neutrofilní tyčka, neutrofilní segment; a analogicky pro další dva typy granulocytů). Samostatná vývojová stadia v kostní dřeni jsou v případě lymfocytů: lymfoblast a prolymfocyt; pro monocyty: monoblast a promonocyt. Nejpočetnější složkou bílých krvinek v periferní krvi jsou za fyziologických podmínek u dospělého člověka neutrofilny, následují lymfocyty, monocyty, eozinofily a bazofily.

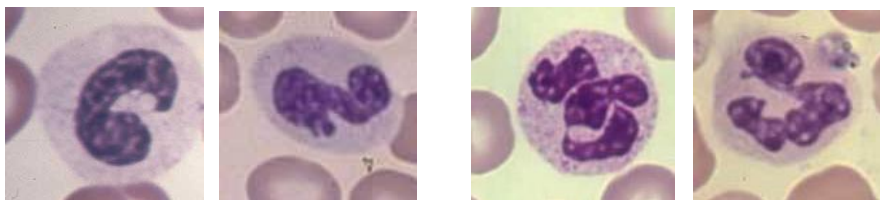
Pozn.: Fotografie ilustrující morfologii jednotlivých buněčných typů jsou převzaty z [www.bloodline.net](http://www.bloodline.net) Copyright © 2010 Carden Jennings Publishing Co., Ltd.

### Neutrofilní granulocyty

Neutrofilní granulocyty (neutrofilny) jsou zásadní složkou vrozené imunity. Za fyziologických okolností jsou přítomny v periferní krvi a v případě odpovědi organismu na cizorodé/nebezpečné činitele, přítomnost bakteriálního patogena ve tkáni, putují skrz cévní stěnu (diapedéza) a tkáň



do cílového místa v procesu zvaném chemotaxe (jsou přitahovány chemickými látkami produkovanými buňkami v místě poškození). Neutrofilové se tak vyskytují v první linii při boji proti patogenům, kde jejich obranný mechanismus zahrnuje především fagocytózu, tj. schopnost pohlcovat částice (neutrofilové jsou na základě jejich velikosti označovány mikrofágy), uvolnění antimikrobiálních látek přítomných v cytoplazmatických granulích těchto bílých krvinek a schopnost produkovat cytokiny a chemokiny, tedy látky stimulující jak samotné neutrofilové, tak další složky imunitního systému k další akci. Morfologicky můžeme zralé neutrofilové rozeznat jako buňky se segmentovaným jádrem, tzn. jejich jádro je rozčleněno zpravidla do 2-5 segmentů. Cytoplazmatické granule jsou neutrální, při panoptickém (přehledném) barvení hematoxylinem-eozinem se barví fialově. V periferní krvi cirkulující neutrofilové přežívají přibližně 12 hodin, ve tkáni po aktivaci 1-2 dny.



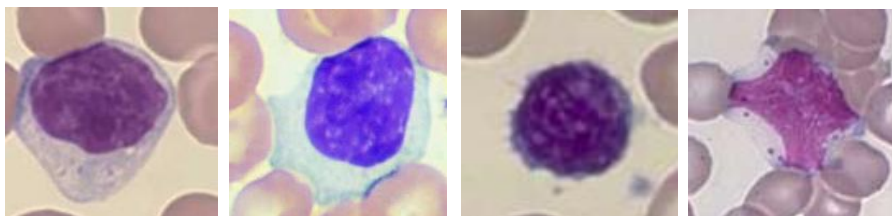
Tyčky

Segmenty

### Lymfocyty

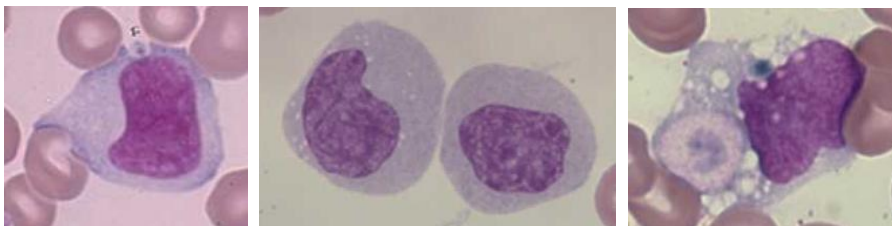
Lymfocyty tvoří heterogenní skupinu buněk, kdy majoritní populace tvoří pomocné (Th-) a cytotoxické (Tc-) lymfocyty, B-lymfocyty a NK (natural killer)-buňky. Morfologicky jsou tyto buněčné typy nerozlišitelné. Pro jejich diferenciaci se využívá značení specifických povrchových antigenů a detekce pomocí průtokové cytometrie. T- a B-lymfocyty jsou důležitou složkou adaptivní imunity. B-lymfocyty jsou významnou složkou humorální (látkové) části adaptivní imunity, jelikož jejich funkce je založena převážně na produkci protilátek proti specifickým antigenům, kterými může být např. protein bakteriálního původu, složka virové kapsidy, modifikovaný protein produkovaný nádorovou buňkou, nebo organismu cizí protein (alogenní transplantace). Mimo produkci protilátek

je důležitou funkcí B-lymfocytů tvorba cytokinů a schopnost prezentovat antigeny na svém povrchu. Th-lymfocyty nemají přímou schopnost likvidovat nežádoucí elementy. Jejich zásadní úloha spočívá ve stimulaci ostatních složek imunitního systému k obranné reakci. Toto se děje přímou interakcí molekul na povrchu buněk nebo prostřednictvím secernovaných molekul. Oproti tomu Tc-lymfocyty mají přímou schopnost likvidovat infikované nebo dysfunkční buňky prostřednictvím uvolnění cytotoxických látek. Cílovou buňku rozeznávají na základě prezentace antigenu v komplexu MHC I (hlavní histokompatibilní systém I) na povrchu buněk. Komplementární funkci k cytotoxickým T-lymfocytům mají NK-buňky, a to především pro jejich schopnost likvidovat buňky, které antigen prezentující molekuly MHC I na své povrchu nemají.



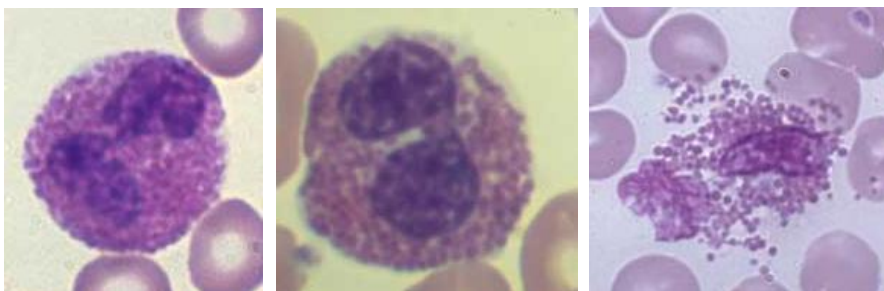
### Monocyty

Hlavní funkcí monocytů je fagocytóza, tuto vlastnost plní především ve tkáni, kde se vyskytují diferencované jako makrofágy a dendritické buňky. V periferní krvi cirkulují monocyty přibližně 1-3 dny. Ve tkáních fagocytují částice, které jsou obalené protilátkami (opsonizovány) nebo složkami komplementu. Monocyty a jejich deriváty plní také funkci buněk prezentujících antigen (APC). Mají schopnost fagocytózy i v periferní krvi, v takovém případě se vyznačují přítomností četných vakuol v cytoplasmě.



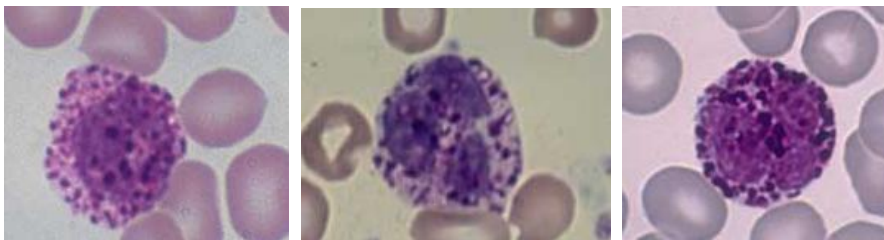
### Eozinofilní granulocyty

Eozinofilní granulocyty (eozinofily) tvoří spíše minoritní složku bílých krvinek periferní krve. Podobně jako neutrofilů cirkulují v krvi a následně putují do tkáně typicky postižené mnohobuněčnými parazity. Významnou úlohu hrají eozinofily v patogenezi astmatu a alergie. Obranná reakce eozinofilů spočívá v uvolnění obsahu cytoplazmatických granulí (histaminu, ribonukleázy, peroxidázy, lipázy a dalších látek). Další efektorová funkce eozinofilů spočívá v produkci celé řady cytokinů a tím interakci s ostatními složkami imunitního systému.



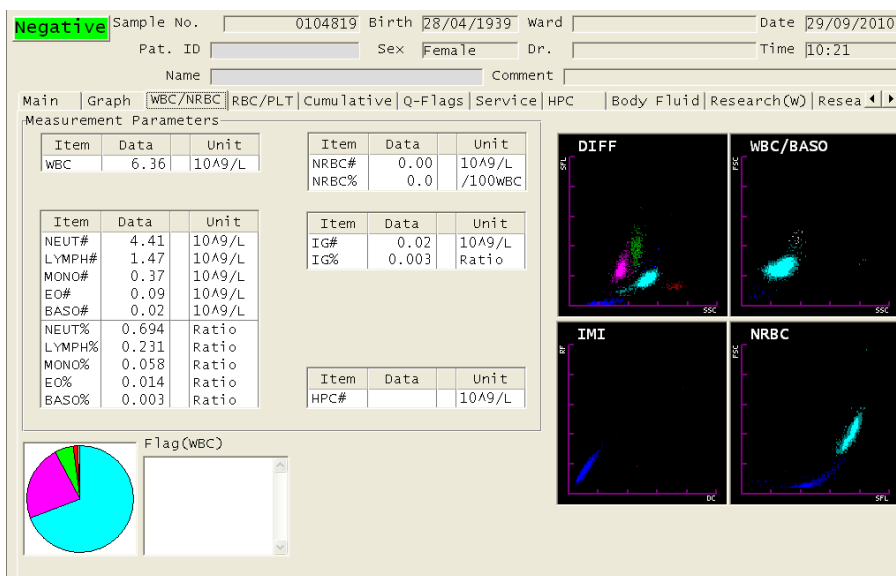
### Bazofilní granulocyty

Bazofilní granulocyty (bazofily) jsou prekurzorem žírných buněk (mastocytů) ve tkáni. Granule bazofilů obsahují histamin, proteoglykany, jako např. heparin, chondroitin, a proteolytické enzymy. Dále produkují leukotrieny a cytokiny. Na svém povrchu mají bazofily receptor pro IgE, z čehož vyplývá jejich zásadní úloha při alergické reakci, především při hypersenzitivitě typu I, při které alergen/antigen vázaný na IgE spouští degranulaci bazofilů a následnou alergickou reakci.

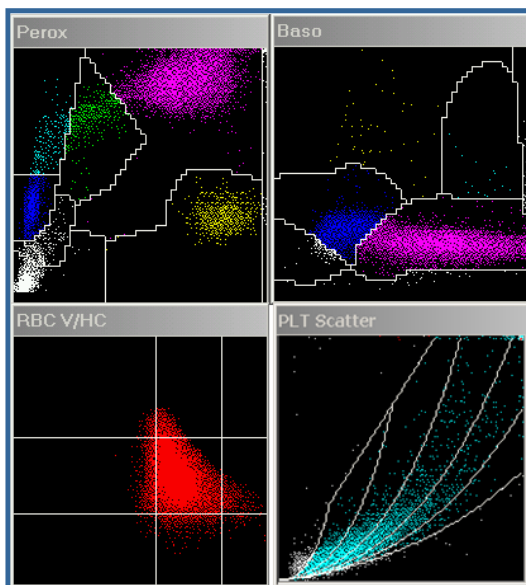


Klasickým přístupem, dnes využívaným především pro zhodnocení patologických nebo suspektně patologických vzorků, je morfologické hodnocení nátěru periferní krve po panoptickém barvení, kdy je možné odlišit jednotlivé buněčné typy a oproti automatickému analyzátoru také vyhodnotit abnormální morfologii buněk, která často implikuje specifické onemocnění.

V dnešní době je stanovení 5populačního diferenciálního rozpočtu bílých krvinek běžnou součástí hematologických analyzátorů, které pracují zpravidla na principu průtokové cytometrie a při průchodu jednotlivých buněk laserovým paprskem dochází k vyhodnocení velikosti a komplexnosti buněk a tím k přiřazení k jednotlivé leukocytární populaci:



Některé analyzátory diferencují také na základě jiných vlastností, např. přítomnosti myeloperoxidázy v leukocytech:



Výsledek z hematologického analyzátoru obsahuje jednak absolutní počet buněk na objemovou jednotku a také podíl (případně % zastoupení) z celkového počtu bílých krvinek.

## KREVŇÍ SKUPINY – TRANSFUZNÍ MEDICÍNA

*Lenka Dubská*

Transfuzní medicína se zabývá především přípravou transfuzních přípravků a vyšetřením dárců a příjemců **transfuzních přípravků (TP)**. Transfuzních přípravků nazývaných také **krevní deriváty** je celá řada. Nejčastěji používané jsou erytrocytární přípravky, např. erytrocytární masa, **erymasa**, deriváty krevní plazmy bez krvinek, např. **čerstvá zmrazená plazma**, přípravky obsahující destičky, např. **trombokonzentrát** (trombonáplav). Důvod podání těchto krevních derivátů vyplývá z příčiny potíží pacienta. Erymasy se podávají při akutní či chronické chudokrevnosti (anémii), plazma se podává především při krvácivých stavech (suplementace koagulačními faktory v ní obsaženými), trombokonzentráty se podávají pacientům ohroženým krvácením z nedostatku krevních destiček.

Při podání transfuzních přípravků se bere vždy v potaz výskyt protilátek proti podávaným krevním elementům u příjemce a výskyt protilátek dárce v transfuzním přípravku. V případě erytrocytárních přípravků se řeší v první řadě výskyt přirozených protilátek proti antigenům **krevně skupinového systému AB0** u dárce. Existuje celá řada krevních skupin daných antigenními vlastnostmi povrchu erytrocytů, ale pouze v případě systému AB0 se protilátky vyskytují přirozeně, tzn. bez předchozí imunizace AB0 antigeny. Přítomnost jednotlivých antigenů na povrchu erytrocytů udává enzym glykozyltransferáza, jejíž specifita je dána geneticky. Existují tři alely genu pro tento enzym  $I^A$ ,  $I^B$ ,  $i$  produkující dva typy glykozyltransferáz ( $I^A$ ,  $I^B$ ) a neaktivní enzym ( $i$ ). Mezi alelami  $I^A$  a  $I^B$  existuje vztah kodominance, jsou produkovány oba enzymy a na buněčném povrchu jsou obě antigenní determinanty. Přirozené protilátky proti těmto krevním determinantům se tvoří během prvních měsíců postnatálního vývoje a při podání erytrocytárních přípravků je třeba myslet na tyto přirozené protilátky, z čehož vyplývá možnost podání erytrocytárních přípravků, jak je uvedeno:

Genotyp příjemce	Fenotyp příjemce			Krevní skupina dárce
	Specifická antigenní determinanta	Krevní skupiny	Protilátky	
I <sup>A</sup> I <sup>A</sup> nebo I <sup>A</sup> i	N-acetylgalaktosamin	A	anti-B	B nebo 0
I <sup>B</sup> I <sup>B</sup> nebo I <sup>B</sup> i	galaktóza	B	anti-A	A nebo 0
I <sup>A</sup> I <sup>B</sup>	N-acetylgalaktosamin, galaktóza	AB	---	A, B, AB, nebo 0
i i	---	0	anti-A, anti-B	0

Dalším běžně vyšetřovaným krevně skupinovým antigenem je tzv. **Rh faktor**, daný přítomností nebo nepřítomností antigenu D. Tento znak je děděn s úplnou dominancí a tedy antigenní determinanta D se vyskytuje u homozygotů *DD* a heterozygotů *Dd*, jejichž fenotyp se pak označuje Rh+. Antigen D se nevyskytuje u recesivních homozygotů *dd*, jejichž fenotyp se označuje Rh-. Přestože se proti tomuto antigenu nevytváří přirozené protilátky, jeho význam spočívá ve vysoké imunogenicitě, která se uplatňuje především při nekompatibilitě matky a plodu. Pokud je matka Rh- a dítě Rh+, může dojít při porodu k imunizaci, tj. organismus matky vytváří anti-Rh protilátky třídy IgG, které při následné graviditě budou procházet přes placentu a ohrožovat Rh+ plod.

U erytrocytárních přípravků se v transfuzní medicíně dodržuje pravidlo podání přípravků shodných v krevní skupině AB0, Rh+ příjemcům se mohou podat Rh- přípravky.

Zda je pro příjemce konkrétní erytrocytární přípravek vhodný, znamená provést vyšetření kompatibility. **Zkouška kompatibility** spočívá v křížovém pokusu, kdy se pozoruje, zda dochází k reakci mezi plazmou/sérem příjemce a erytrocyty určenými k podání. Pokud k reakci dochází, došetřuje se dále její důvod. Příčinou mohou být protilátky proti

**dalším krevním skupinám**, např. MNS, P, Lutheran, Kell, Lewis, Duffy, Kidd a mnoho dalších. Tyto protilátky se také nevytváří přirozeně, ale až následkem imunizace a tudíž je najdeme častěji u polytransfundovaných jedinců. Pokud příjemce vytváří tyto nepravidelné protilátky, musí se pro něj hledat transfuzní přípravek s ohledem na relevantní krevně skupinové antigeny na erythrocytech. Některé transfuzní stanice proto vyšetřují mimo AB0/Rh i další krevní skupiny u svých dárců.

Červené krvinky se shlukují (aglutinují) v přítomnosti anti-erythrocytárních protilátek, proto obecným principem, jak zjistit výskyt anti-erythrocytárních protilátek a erythrocytárních antigenů je **aglutinace**. Krevní skupina AB0 se zjišťuje vyšetřením erythrocytů vyšetřovaného pomocí diagnostických protilátek, kdy k aglutinaci dochází tímto způsobem:

KS Protilátky	A	B	AB	0
anti-A	<b>aglutinace</b>	bez aglutinace	<b>aglutinace</b>	bez aglutinace
anti-B	bez aglutinace	<b>aglutinace</b>	<b>aglutinace</b>	bez aglutinace

Při určení krevní skupiny AB0 se vždy vyšetřuje i tzv. zadní řada, čímž se v imunohematologii rozumí přítomnost AB0 komplementárních protilátek v séru/plazmě vyšetřovaného. Vyšetření se provádí sledováním výskytu reakce mezi sérem/plazmou vyšetřovaného a typovými (diagnostickými) krvinkami, kdy k aglutinaci dochází tímto způsobem:

KS Krvinky	A	B	AB	0
A	bez aglutinace	<b>aglutinace</b>	bez aglutinace	<b>aglutinace</b>
B	<b>aglutinace</b>	bez aglutinace	bez aglutinace	<b>aglutinace</b>



Při vyšetření přítomnosti Rh faktoru zkoumáme aglutinaci krvinek po přidání Rh<sup>+</sup> séra. Při zkoušce kompatibility se sleduje, zda došlo k aglutinaci při smíchání erytrocytů určených k podání a séra/plazmy příjemce. Pokud k aglutinaci došlo, přípravek není kompatibilní a pro daného příjemce je třeba najít jiný erytrocytární přípravek.

Při podání čerstvé mražené plazmy se bere v úvahu přítomnost protilátek v podávané plazmě. Plazma dárce B obsahuje anti-A protilátky, které by reagovaly s A erytrocyty příjemce. Podává se tedy plazma AB0 shodná, Rh faktor se nemusí respektovat. V případě trombocytárních přípravků se dodržuje krevní skupina AB0 a v případě podezření na výskyt nepravidelných protilátek proti trombocytům se vyšetřuje jejich přítomnost v séru/plazmě příjemce trombokoncentrátu.

# NÁDOROVÉ MARKERY

*Lenka Dubská*

## **Biologická povaha nádorových markerů**

Nádorovým markerem rozumíme substanci přítomnou v nádoru nebo produkovanou nádorem nebo hostitelem jako odpověď na přítomnost tumoru. Tuto substanci lze využít k diferenciaci nádoru od zdravé tkáně nebo na základě analýzy tělesných tekutin uvažovat o přítomnosti tumoru. Obecně mohou být nádorové markery solubilní, buněčné nebo založené na nukleových kyselinách. Substanci lze měřit kvalitativně nebo kvantitativně metodami chemickými, imunologickými nebo metodami molekulární biologie. Mezi solubilní markery produkované tumorem patří enzymy (např. laktátdehydrogenáza – LD, neuron-specifická enoláza - NSE, prostatický specifický antigen - PSA, thymidinkináza), imunoglobuliny nebo jejich fragmenty či podjednotky (monoklonální imunoglobuliny, tzv. "paraproteiny"), hormony (např. lidský choriový gonadotropin - hCG, parathormon - PTH, adrenokortikotropin - ACTH, kalcitonin - CT, gastrin, prolaktin, noradrenalin, adrenalin), fragmenty komplexních glykoproteinů, (např. CA19-9, CA15-3, CA125), fragmenty cytokeratinů (TPA, TPS, CYFRA21-1), onkofetální antigeny, molekuly receptorové povahy (estrogenový a progesteronový receptor, receptor pro interleukin 2, HER2/neu) a cirkulující buněčné elementy (cirkulující nádorové buňky, cirkulující endotelové buňky a cirkulující endotelové prekurzory). Mimo obvyklé aplikace klasických (solubilních) nádorových markerů se zdají být klinicky užitečné jako nádorové markery i některé genetické abnormality, a to především pro specifikaci abnormality nádorových buněk určující způsob léčby.

## **Preanalytické aspekty**

V současnosti se většina používaných solubilních nádorových markerů stanovuje v **séru**. Jde obvykle o štěpy velkých molekulových komplexů, které nevykazují příliš velkou preanalytickou variabilitu. Pro správnou interpretaci změn v hladinách markerů, zejména při dlouhodobém

sledování nemocných s nádorovými chorobami, je třeba vyloučit možné rušivé faktory, které by mohly stanovení ovlivnit již ve fázi preanalytické. V určitých případech mohou být výsledky analýzy ovlivněny některými postupy klinického vyšetřování, např. pro stanovení prostatického specifického antigenu (PSA) má být odebrána krev nejdříve 48 hodin po rektálním vyšetření prostaty. Kontaminace vzorku slinami nebo potem může znehodnotit stanovení antigenu skvamózních buněk (SCCA) nebo CA 19-9. Neuron-specifická enoláza je při hemolýze významně uvolňována z erytrocytů, oddělení séra od krevních elementů je třeba provést nejpozději do 1 hodiny po odběru. Hemolýza nad 300 mg/l falešně zvyšuje výsledek stanovení NSE a LD.

### **Vlastní laboratorní analýza**

Měření hladiny nádorového markeru je třeba provádět pomocí technologie určené k *in vitro* diagnostice, kalibrované podle pokynů dodavatele technologie. Metodika musí být v souladu s Nařízením vlády č. 453/2004 Sb. ze dne 7. července 2004 v platném znění, kterým se stanoví technické požadavky na diagnostické zdravotnické prostředky *in vitro*, a musí být pravidelně sledována vnitřní kontrolou kvality. Pracoviště by mělo disponovat kvalifikovaným personálem znalým problematiky a pravidelně by se mělo účastnit procesu externího hodnocení kvality. K vyšetření koncentrace solubilních nádorových markerů jsou obvykle používány metody imunoanalýzy, případně se měří enzymové aktivity. Potřeba dlouhodobého sledování pacienta vyžaduje neměnní se technologii stanovení pro daný marker. Z tohoto důvodu by měla být laboratoř schopna zajistit dlouhodobě výsledek o pokud možno stejné analytické nejistotě a vysoké reprodukovatelnosti. Pokud je změnu technologie nutné v praxi realizovat, je třeba nejprve provést srovnávací sérii měření na dostatečném množství konkrétních patientských vzorků pomocí obou souprav, aby laboratoř získala data o chování nové soupravy v konkrétních podmínkách (tzv. rebaselining).

## **Interpretace**

Při interpretaci vyšetření solubilních nádorových markerů v klinické praxi se řídíme následujícími pravidly:

**Screening** (plošné vyšetřování za účelem vyhledávání chorob v časných stadiích, kdy ještě nejsou potíže a příznaky): vzhledem k poměrně nízké diagnostické citlivosti a specifčnosti není většina nádorových markerů vhodná k tomuto účelu u bezpříznakových vyšetřovaných. Použitelným markerem pro screening ovariálního karcinomu u bezpříznakových jedinců je CA125. U nemocných s příznaky nebo u skupin pacientů s vysokým rizikem vývoje nádorového onemocnění lze použít vyšetření některých nádorových markerů ke screeningu nemoci. Jako příklad lze uvést screeningové vyšetřování kalcitoninu v rodinách s výskytem medulárního karcinomu štítné žlázy, nebo vyšetření CA 15-3 spolu se zobrazovacími metodami, dnes nejlépe magnetickou rezonancí, v rodinách s mutacemi v genech BRCA1 a BRCA2.

**Staging** (určení stadia nádorového onemocnění): tímto pojmem rozumíme posouzení patoanatomického rozsahu. Vysoká hodnota nádorového markeru v séru např. může upozornit na nesprávně určené nižší stadium nemoci.

**Prognóza:** určení prognózy onemocnění není podstatnou rolí solubilních nádorových markerů. Určitý význam má AFP a hCG u germinálních (zárodečných) tumorů, CEA u kolorektálních karcinomů, případně beta-2-mikroglobulin u myelomů.

**Sledování průběhu choroby:** hlavní indikace těchto vyšetření. Vzestup hladin nádorových markerů představuje včasné upozornění, které předchází klinickou diagnózu návratu (rekurence) choroby.

**Účinek terapie:** sledování účinku terapie pomocí nádorových markerů je významnou indikací vyšetření solubilních nádorových markerů. Vzhledem k různým biologickým poločasům jednotlivých markerů je nutno správně volit intervaly odběrů krve k vyšetření tak, aby se skutečně postihl efekt terapie, nikoli pouze tzv. fenomén lýzy, tj. prudké zvýšení koncentrace markeru jako důsledek rozpadu buněk po bezprostředním působení protinádorové terapie.

## **Onkofetální proteiny**

Nádorová buňka se od buněk tkáně, ze které vznikla, liší menší či větší mírou **dediferenciace**, což je proces, kterým vzniká z buňky diferencované (zpravidla terminálně) buňka funkčně a morfologicky méně specializovaná. Proces dediferenciace je zpravidla spojen s regenerativními procesy u rostlin i u živočichů. U dediferencované nádorové buňky dochází k obnovení schopnosti syntetizovat (exprimovat) proteiny produkované v ontogeneticky nižším stadiu, tedy v embryonálním/fetálním období. Proteiny, které jsou produkovány během prenatalního vývoje a nádorovými buňkami, nazýváme onkofetální proteiny.

Karcinoembryonální antigen (CEA) je onkofetální glykoprotein s vysokým obsahem sacharidů o molekulové hmotnosti 180-200 kDa. Za fyziologických podmínek je CEA produkován ve vyvíjejícím se embryu. V dospělosti je omezeně syntetizován epitelovými buňkami střevní sliznice, žaludku a bronchů. CEA patří do imunoglobulinové genové rodiny. Podílí se pravděpodobně na procesu adheze a metastazování buněk.

Klinické použití v onkologii: Pro screening i diagnostiku maligního onemocnění nelze CEA použít. CEA produkují karcinomy trávicího traktu, adenokarcinomy plic, karcinomy mléčné žlázy, nádory ženských pohlavních orgánů (mucinózní adenokarcinomy), endometriální nádory i nádory děložního těla, karcinomy močového měchýře, ledvin, diferencované karcinomy prostaty aj. Monitorování průběhu onemocnění a odpovědi na léčbu patří k základnímu využití CEA. Pokles hodnot CEA po chirurgickém zákroku může poskytnout údaj o úspěšnosti terapie, podobně lze hodnotit efekt chemo- či radioterapie, pokud byly hodnoty před terapií zvýšené. Zvýšení CEA v séru lze také pozorovat u benigních nebo premaligních lézí jako jsou jaterní cirhóza, Crohnova choroba, střevní polypy, onemocnění plic, ledvin, žlučníku, pankreatu, benigní onemocnění prsu, dále u kuřáků a alkoholiků. Klinické použití pro sledování těhotenství není.

Alfa1-fetoprotein (AFP) je onkofetální glykoprotein produkovaný v embryonálním žloutkovém vaku a ve fetálních játrech. V dospělém zdravém organismu je syntéza AFP omezena na minimum. V séru matky, kam přechází přes placentu, je důležitým ukazatelem fyziologického vývoje těhotenství. Významná je především jeho role transportní (vazba steroidů, některých těžkých kovů, bilirubinu, mastných kyselin, retinoidů, drog, antibiotik apod.).

Klinické použití v onkologii: screening maligního procesu pomocí AFP v séru je vhodný pouze u symptomatických nemocných s jaterní cirhózou nebo podezřením na germinální nádory varlat u rizikových jedinců s nesestoupným varletem, nádorem varlat u sourozence – dvojčete. Monitorování průběhu onemocnění patří k základním využitím AFP. Pro hepatocelulární karcinom (karcinom jaterních buněk, které obnoví schopnost syntetizovat AFP) je AFP markerem první volby. U germinálních nádorů ovariálních i testikulárních je senzitivita rovněž vysoká.

Nemaligními příčinami zvýšené hladiny AFP v séru většinou bývají akutní virový i chronický zánět jater, cirhóza jater a těhotenství.

Klinické použití v graviditě: v kombinaci s vyšetřením hladiny hCG, nekonjugovaného estriolu (uE3) a PAPP-A (pregnancy-associated plasma protein A) v séru gravidní ženy a ultrazvukovým vyšetřením plodu slouží k prenatalním screeningu vrozených vývojových vad.

### **Lidský choriový gonadotropin**

Lidský choriový gonadotropin (hCG) je glykoprotein tvořený dvěma rozdílnými podjednotkami: alfa (14,5 kDa) a beta (22,2 kDa). *In vivo* může docházet k disociaci jednotek alfa a beta, beta-složka může být dále štěpena na močový gonadotropinový peptid (beta-core fragment).

Klinické použití v onkologii: v závislosti na použitém detekčním systému je stanovení specifické pro celkový beta-hCG (tj. intaktní hormon-dimer + volná podjednotka beta), pro intaktní hCG (dimer bez volné podjednotky beta), pro volnou podjednotku beta nebo pro beta-core fragment (stanovení v moči). Stanovení má význam pro zhodnocení stadia onemocnění, pro

potvrzení histologické charakteristiky nádorů varlat a choriokarcinomů a pro jejich monitorování.

Zvýšené hladiny hCG v séru mohou způsobovat fyziologické i patologické stavy v těhotenství, myomy a ovariální cysty.

Klinické použití v graviditě: během prvních týdnů těhotenství udržuje hCG funkci žlutého tělíska (*corpus luteum*). Tvorba hCG se zvyšuje postupně v prvním trimestru (8-10 týdnů), maximum je přibližně 10. týden po poslední menstruaci. Koncentrace hCG potom v další fázi těhotenství pomalu klesají, ustalují se a přetrvávají až do porodu. K průkazu těhotenství se používají kvalitativní stanovení, při kterých se pouze dokazuje, zda je hCG v normě, nebo zda analyzovaný vzorek obsahuje zvýšené množství hCG. Na začátku těhotenství se množství hCG v krvi zdvojnásobí každé dva až tři dny. Kvantitativní vyšetření hCG stanovuje aktuální množství hCG přítomné v krvi a pomáhá diagnostikovat mimoděložní těhotenství (pomalejší nárůst hCG), selhávající (patologické) těhotenství (pomalejší nárůst nebo snižující se koncentrace hCG) a sledovat ženy po potratu a po porodu (jestliže hCG neklesne k fyziologickým hodnotám, je to známka přítomnosti tkáně produkující hCG, která musí být odstraněna). V kombinaci s vyšetřením hladin AFP, uE3 a PAPP-A v séru gravidní ženy a ultrazvukovým vyšetřením plodu slouží k prenatálním screeningu vrozených vývojových vad.

Pozn.: Adaptováno z „**Doporučení** České společnosti klinické biochemie (ČSKB ČLS JEP), České onkologické společnosti (ČOS ČLS JEP), České společnosti nukleární medicíny (ČSNM ČLS JEP) – sekce imunoanalytických metod **k využití nádorových markerů v klinické praxi**“ autorů: Dalibor Valík, Miroslava Nekulová, Lenka Dubská, Tomáš Zima, Drahomíra Springer, Ivan Malbohan, Ondřej Topolčan.

## **KARDIOMARKERY**

*Lenka Dubská*

Kardiomarkery jsou enzymy, bílkoviny a hormony, které jsou spojeny s funkcí srdce, jeho poškozením nebo selháním. Některé z těchto testů reflektují poškození svaloviny (srdeční i kosterní). Jiné jsou specifické pro srdce. Kardiomarkery se používají k diagnostickým a prognostickým účelům a také pro zjištění míry kardiotoxicity některých látek.

### **Myoglobin**

Myoglobin je globulární protein, který reverzibilně váže a přenáší kyslík ve svalových buňkách. V ledvinách je filtrován glomerulární membránou a vylučován do moči. Má velmi krátký biologický poločas – 10–20 minut. Jako cytoplazmatický protein s nízkou molekulovou hmotností je rychle uvolňován z postižené svalové tkáně do krve, kde ho můžeme laboratorně stanovit. Vzestup sérových koncentrací myoglobinu u akutního infarktu myokardu nastupuje rychle (za 0,5–2 hodiny) od začátku bolesti na hrudi. Hladiny myoglobinu, které mohou dosahovat dvacetinásobku fyziologických hodnot, kulminují asi za 6–12 hodin a v průběhu 12–24 hodin se vrací k původním hodnotám. Myoglobin je považován za nejcitlivější biochemický marker **akutního infarktu myokardu** vhodný pro časný záchyt. Myoglobin z myokardu i kosterního svalstva je identický, a proto je hlavní nevýhodou stanovení myoglobinu nedostatek kardiospecifity. Jeho zvýšení můžeme pozorovat při jakémkoliv poškození kosterního svalstva (včetně např. intramuskulárních injekcí či drobného pohmoždění po pádu), po velké svalové zátěži (včetně např. zapojování břišního lisu při déletrvajícím zvracení), při renální insuficienci (není vylučován ledvinami).

### **Kreatinkináza**

Kreatinkináza (CK) je převážně cytoplazmatický enzym, který katalyzuje fosforylací kreatinu na kreatinfosfát pomocí ATP. Při nedostatku ATP probíhá reakce opačným směrem. CK je obsažena především v kosterním



svalstvu, v myokardu a v mozkové tkáni. Je tvořena dvěma podjednotkami, které jsou dvojího typu – M (muscle) a B (brain). Různým zastoupením podjednotek se odlišují tři izoenzymy kreatinkinázy: CK-BB (CK-1, mozkový izoenzym), CK-MB (CK-2, myokardiální izoenzym), CK-MM (CK-3, svalový izoenzym). V kosterním svalstvu převažuje CK-MM, ale je přítomen i izoenzym CK-MB. V mozku je izoenzym CK-BB, který se při neporušené hematoencefalické bariéře v krvi neprokazuje. Pro myokard je typická CK-MB, ale srdeční svalovina obsahuje i CK-MM. Katalytická koncentrace celkové CK se zvyšuje v průběhu 3–6 hodin od začátku ischemie myokardu. Vzhledem k nedostatečné kardiospecifitě má její stanovení u akutního infarktu myokardu omezený význam. Větší diagnostickou hodnotu má vyšetřování izoenzymu CK-MB. Ani CK-MB není plně kardiospecifická. Zvýšení může být způsobeno i poškozením kosterního svalstva (trauma, svalové dystrofie, intramuskulární injekce, resuscitace, defibrilace), extrémním cvičením a chronickou renální insuficiencí.

## **Troponiny**

Součástí kardiomyocytů jsou svalová vlákna, sestavená ze dvou hlavních typů myofilament: (1) tlustá (myozinová) myofilamenta tvořená molekulami myozinu s fibrilární a globulární částí, v níž je zakotvena ATPáza; (2) tenká (aktinová) myofilamenta. Základem jejich struktury jsou vlákna stočená do dvojité šroubovice, vznikající polymerizací monomerů globulárního aktinu. S aktinem úzce souvisí troponin-tropomyozinový komplex, který reguluje svalovou kontrakci. V brázdě šroubovice aktinu je uložena dvojité šroubovice tropomyozinu, jehož vláknitá molekula ho obtáčí. Troponin je komplex tří globulárních proteinů: troponinu T (TnT), troponinu C (TnC) a troponinu I (TnI). TnT, který má největší molekulovou hmotnost, zabezpečuje připojení troponinového komplexu k tropomyozinu. TnI v klidovém stavu brání vzniku můstku mezi myozinem a aktinem. TnC váže ionty kalcia, uvolňované ze sarkoplazmatického retikula myocytů do sarkoplazmy. Navázáním  $\text{Ca}^{2+}$  na TnC se indukují změny konfigurace troponinových komplexů a v důsledku toho je TnI

odsunut od vazebných míst pro myozin, jehož globulární části se poté mohou navázat na aktinová myofilamenta. Aktivací ATPázy v globulárních částech myozinových molekul se spustí svalová kontrakce.

Jako kardiomarkery se využívají troponin T (TnT) a troponin I (TnI). Troponin C (TnC) není pro diagnostiku **akutní koronární léze** vhodný, protože je identický v srdečním i kosterním svalstvu. TnT a TnI se vyskytují v kosterním svalstvu a myokardu. Kardiální izoformy (cTnT a cTnI) mají jedinečné aminokyselinové složení a jsou proto pro myokard specifické. Většinou jsou kardiální izoformy TnT a TnI obsaženy v kontraktálním aparátu a jsou uvolňovány v důsledku proteolytické degradace. V krvi se troponin cTnT fyziologicky nevyskytuje. Průběh uvolňování cTnT je bifázický. Zvýšení troponinu po začátku akutního infarktu myokardu nastupuje v průběhu 3–8 hodin a prvního vrcholu je dosaženo za 12–18 hodin po poškození myokardu. Je vyvolán rychlým uvolněním volné cytoplazmatické frakce cTnT. Počáteční vrchol je sledován dalším vrcholem za 3–4 dny, který odpovídá pomalejšímu vyplavování cTnT vázaného v troponin-tropomyozinovém komplexu v nekrotickém ložisku. Během 7–10 dnů klesá na nedetekovatelné hladiny. Při časném obnovení krevního průtoku koronární arterií je maximální vzestup asi za 14 hodin a pak následuje pozdější druhý, podstatně nižší vrchol. Délka zvýšení závisí na rozsahu infarktu. U rozsáhlejších infarktů může být cTnT prokazatelný až 21 dnů. Určitou nevýhodou cTnT je jeho nespecifické zvýšení u pacientů s renální insuficiencí. Nástup zvýšených hladin cTnI, který se vyznačuje vysokou specifičností, nastává podobně jako u cTnT již asi za 3 hodiny po začátku ischemie. Zvýšené hladiny přetrvávají 5–10 dnů. Ve srovnání s cTnT není u cTnI obvykle pozorováno druhé maximum (menší cytosolová frakce).

Jiných kardiomarkerů se využívá pro monitorování **kardiotoxicity**, a to především v podmínkách léčby onkologických pacientů, kdy kardiotoxicky působí protinádorová léčba. Kardiotoxicky působí nejčastěji cytostatika ze skupiny antracyklinů (doxorubicin, epirubicin, daunomycin), méně často antracenoidy (mitoxantron) nebo některé alkylační látky, zvláště ve vyšších

dávkách (cyklofosfamid, ifosfamid). Kardiotoxicita byla popsána též po aplikaci 5-fluorouracilu, mitomycinu C, cisplatině, vinkristinu, bleomycinu a paklitaxelu.

### **Natriuretické peptidy**

Mimo vyšetření EKG (elektrokardiogram) a MUGA (*Multi Gated Acquisition*) slouží pro monitorování kardiotoxicity stanovení některého z natriuretických peptidů. Natriuretické peptidy (atriální natriuretický peptid – ANP, brain natriuretický peptid - BNP, C-type natriuretický peptid - CNP) jsou součástí vnitřního vazodilatačního systému organismu (spolu s prostaglandiny a NO) a přispívají tak k udržení elektrolytové a objemové rovnováhy. Jejich kompenzační účinek vede k systémové vazodilataci, zvýšení natriurézy, diurézy, k inhibici buněčného růstu a k inhibici renin-angiotenzin-aldosteronového systému. ANP je produkován kardiomyocyty srdečních síní, BNP je produkován kardiomyocyty síní a především komor, CNP se vyskytuje ve dvou formách v centrálním nervovém systému, v přední části hypofýzy, v ledvinách a endotelu cév. Srdeční natriuretické peptidy působí na ledviny na úrovni glomerulů a tubulů, kde mimo jiné zvyšují glomerulární filtraci a snižují reabsorpci sodíku. Vliv na natriurézu a diurézu je rovněž zprostředkovan nepřímo inhibicí sekrece aldosteronu.

K vzestupu koncentrací ANP a BNP dochází vždy jako odpověď na objemovou expanzi a tlakové zatížení srdce. Sekrece natriuretických peptidů je zvýšena u pacientů s neischemickým srdečním selháním. Koncentrace BNP se ukázaly být významnějším prognostickým ukazatelem u pacientů se srdečním selháním než koncentrace ANP. ANP se ukazuje být hormonem akutní odpovědi, kdežto BNP se uvolňuje až při déletrvajícím komorovém přetížení. BNP je syntetizován jako biologicky neúčinný prekurzor proBNP, jehož N-terminální konec je totožný s BNP. Koncentrace NT-proBNP koreluje s chronickým srdečním selháváním, pulmonární hypertenzí a je ukazatelem míry funkční kardiotoxicity.

# MOČOVÁ CHEMIE A MOČOVÝ SEDIMENT

*Kateřina Pilátová*

## Chemické vyšetření moči

Chemické vyšetření moči se v klinických laboratořích rutinně provádí za využití diagnostických proužků, které slouží k důkazu a semikvantitativnímu vyšetření základních složek a parametrů moči (tj. glukózy, bílkoviny, bilirubinu, urobilinogenu, krve, ketolátek, nitritů, pH a poměrné hustoty) na principu kolorimetrické reakce. Diagnostické proužky jsou zhotoveny z plastické hmoty nebo chromatografického papíru s nalepenými indikačními zónami. V indikační zóně jsou imobilizovaná činidla (např. pH indikátor, chromogen, enzym) v suchém stavu a po jejich namočení do moči dochází ke vzniku kolorimetrické reakce. Množství analytu lze na základě změny zbarvení indikační zóny stanovit vizuálně jejím porovnáním s barevnou stupnicí na obalu diagnostických proužků nebo speciálními reflexními fotometry, které jsou schopné vyhodnotit také barvu a zákal moči. Vyšetření se provádí z nativní neodstředěné moči.



## Glukóza

Glukóza se dostává do moči z krevního oběhu glomerulární filtrací, většina je však v ledvinových tubulech vstřebávána zpět do krve. Za fyziologických okolností se do moči dostává jen nepatrná část glukózy (0,11-0,83 mmol/l). Zvýšená koncentrace glukózy v moči (tzv. glukosurie, glykosurie) je nejčastěji důsledkem vzestupu glukozemie, glykemie.

Vysoká koncentrace glukózy v primární moči překročí schopnost její resorpce v tubulech a dostává se tak do definitivní moči, dochází k překročení tzv. ledvinového prahu pro glukózu. Není-li glykemie zvýšená, glykosurie je výsledkem snížení renálního prahu pro glukózu při poruše tubulárních transportních mechanismů. Enzymové stanovení pomocí diagnostických proužků je specifické pro D-glukózu.

### Proteiny

Bílkoviny jsou odděleny od nízkomolekulárních složek plazmy glomerulární filtrací, jen velice málo molekul projde do Bowmanova pouzdra, odkud jsou v tubulu z velké části resorbovány zpět. Za fyziologických okolností jsou proteiny v moči přítomny jen ve stopovém množství, které není diagnostickými proužky detekovatelné. Jelikož je koncentrace bílkovin v moči závislá na poloze těla a tělesné námaze, kdy může dojít k jejich zvýšení až na pětinašobek, vyšetřuje se první ranní moč. Bílkoviny v moči mohou znamenat nadměrný výskyt některých bílkovin v krvi, onemocnění ledvin, infekci močových cest apod. Při pozitivitě jde nejčastěji o glomerulární proteinurii. Detekována je totiž především přítomnost albuminu, méně citlivá je proužková reakce na ostatní typy proteinurii (např. tubulární proteinurii, při které převažují glykoproteiny).

### Žlučová barviva

Žlučová barviva vznikají při metabolismu hemoglobinu. V moči se stanovuje bilirubin a urobilinogen (diagnostické proužky reagují také na urobilin vznikající oxidací urobilinogenu). V moči se vyskytují v množstvích běžnými chemickými metodami neprokazatelných. Nález konjugovaného bilirubinu v moči vypovídá o poruše schopnosti jeho vylučování z těla žlučí (při obstrukci žlučových cest kamenem nebo nádorem) nebo při poškození jaterního parenchymu (např. při virové hepatitidě, infekční mononukleóze nebo toxickém poškození jater), kdy je překročen ledvinový práh. Nekonjugovaný bilirubin se v moči vyskytuje jen vzácně (není rozpustný ve vodě). Urobilinogen nemá ledvinový práh a může být z krve vylučován močí. Jeho zvýšená koncentrace v moči může

být způsobená poškozením jaterního parenchymu nebo zvýšeným katabolismem hemoglobinu, kdy nestačí být zpracován játry (např. při hemolytické anémii). Při uzávěru žlučových cest je jeho hodnota snížena nebo může v moči i úplně chybět, což však nelze diagnostickými proužky stanovit.

### Krevní barvivo

Za fyziologických podmínek ledviny krev do moče nepropouštějí. V moči se krevní barvivo prokazuje za patologických stavů ve formě erytrocytů (erythrocyturie) nebo přímo hemoglobinu (hemoglobinurie). Může se vyskytovat (vzácněji) též myoglobin (myoglobinurie). Mezi nejčastější příčiny výskytu krevního barviva v moči patří poranění močového měchýře nebo ledvin, záněty ledvin, záněty močového měchýře a nádory ledvin, močového měchýře nebo prostaty. Prerenálním důvodem pozitivivity mohou být hemolytické stavy nebo myopatie, které vedou k přítomnosti hemoglobinu a myoglobinu v plazmě. Stanovení diagnostickými proužky je citlivé pro hemoglobin i myoglobin, přítomnost erytrocytů prokáží nad 10 ery/μl moče (modré tečky na indikační zóně).

### Leukocyty

Leukocyty jsou indikátory zánětu močového ústrojí. Diagnostickými proužky se stanovují téměř výhradně neutrofilní granulocyty (a makrofágy), jelikož jejich stanovení je založeno na průkazu granulocytárních esteráz. Z tohoto důvodu je chemické vyšetření oproti mikroskopickému schopné analyzovat také lyzované neutrofilny, lymfocyty reakci neposkytují.

### Ketolátky

Ketolátky (acetacetát, beta-hydroxybutyrát, aceton) vznikají v játrech jako meziprodukt při metabolismu lipidů. Hlavní význam stanovení ketolátek v moči (ketonurie) je včasné rozpoznání metabolické dekompenzace diabetiků (zvýšená lipolýza). Ketolátky se v moči vyskytují dále například při hladovění, nadbytku tuků a bílkovin v potravě atd. Referenční hodnoty

(do 0,19 mmol/l) jsou diagnostickými proužky neprokazatelné (také nereagují na beta-hydroxybutyrát).

### Nitrity

Přítomnost nitritů v moči poukazuje na významnou bakteriurii, jelikož gramnegativní bakterie jsou schopné přeměňovat močové nitráty na nitrity.

### pH

Referenční rozmezí pH moči u člověka je 5,0-7,0. pH moči je výrazně ovlivněno stravou (rostlinná alkalizuje, živočišná acidifikuje). Patologické hodnoty jsou výsledkem poruchy acidobazické rovnováhy organismu nebo mohou být spojeny s infekcí ledvin a močových cest. Hodnota pH může být rizikovým faktorem vzniku močových kamenů a je nutná pro interpretaci ostatních parametrů močového nálezu. Hlavní přínos vyšetření pH moči je tedy diagnostika a léčba močových infekcí a urolitiázy (tvorby močových konkrementů).

### Poměrná hustota

Tento parametr udává poměr specifické hmotnosti moči a vody. Za fyziologických podmínek se pohybuje v rozmezí 1,015-1,025. Nízká hustota může být způsobena chronickým onemocněním ledvin, zvýšená osmotickou diurézou, například při *diabetes mellitus* nebo proteinurii. Hlavní význam má pro interpretaci nálezů v močovém sedimentu.

Reflexní fotometr stanovuje také fyzikální parametry moči, jako je barva a zákal. Normální moč je čirá kapalina s nažloutlou barvou vyvolanou přítomností urochromů. Barvu moči může ovlivnit řada látek. Změna barvy moči do růžova nebo až do červena může být dána přítomností erytrocytů, hemoglobinu, myoglobinu, porfyrinů, ale také některých chemické látek nebo léků. Přítomnost chylu, hnisu nebo fosfátových krystalů mění barvu moči do běla. Oranžová a hnědá barva může být vyvolaná přítomností bilirubinu, urobilinogenu a některých léků, modrozelená barva biliverdinem, infekcí moči pseudomonádami nebo vitamínem B<sub>2</sub>. Zákal může být způsoben přítomností solí (krystalů), tuku, krve, bakteriální

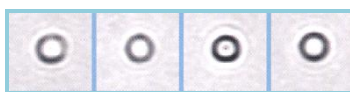
mikroflóry nebo hnisu. Druh zákalu lze stanovit mikroskopicky z močového sedimentu.

### **Vyšetření močového sedimentu**

Součástí vyšetření moči je také mikroskopické vyšetření, kterým hodnotíme její orgánové a krystalické složení. Automatický analyzátor klasifikuje a kvantifikuje 12 typů částic (erythrocyty, leukocyty, hyalinní válce, ostatní válce, dlaždicové epitelie, jiné epitelie, bakterie, kvasinky, krystaly, shluky leukocytů, hlen, sperma) a artefakty. Dále je možná další subkategorizace jednotlivých druhů částic (např. u krystalů, válců). Analyzátor pracuje s nativními vzorky moče. V textu jsou fotografie močových částic poskytované automatickým analyzátozem.

#### Erythrocyty a leukocyty

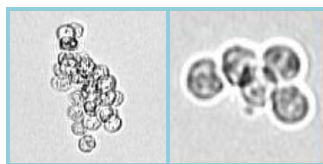
O významu nálezu erythrocytů a leukocytů již bylo řečeno v kapitole o chemické analýze moči. Fyziologická hodnota je  $<5$  erythrocytů/ $\mu\text{l}$  moči a  $\leq 10$  leukocytů/ $\mu\text{l}$  moči (u žen je jejich počet fyziologicky vyšší než u mužů). Při nadměrném výskytu leukocytů nacházíme také jejich shluky.



Erythrocyty



Leukocyty



Shluky leukocytů

#### Válce

Matrix válců (cylindrů) je tvořena Tammovým-Horsfallovým glykoproteinem, který chrání povrch výstelky renálního tubulu. Ten může



za určitých okolností (nízké pH, vysoká osmolalita, vysoká koncentrace proteinů) v tubulu precipitovat a vytvořit tak odlitky tubulů, které se uvolňují do moči. Přítomnost a typ válců jsou důležitým údajem při diagnostice nefropatií. Válce v moči nejsou za normálních okolností přítomny. Výjimkou jsou válce hyalinní, které jsou tvořeny pouze samotným glykoproteinem a mohou být v moči přítomny v malém množství, nicméně jejich zvýšený počet se vyskytuje při proteinurii. Dále se v moči mohou vyskytovat válce granulované či voskové, které obsahují nekrotické zbytky tubulů a jsou tedy prognosticky závažnější. Existují i další druhy válců podle typů buněk, které na nich adherují (erytrocytové, leukocytové, epitelové a bakteriální).



Válce: hyalinní, granulovaný, buněčný

### Epitelie

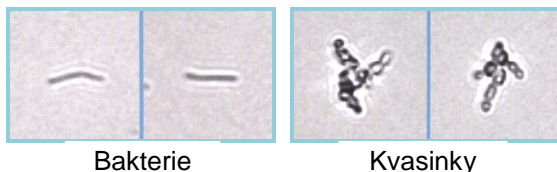
Pocházejí z epitelové výstelky renálních tubulů a vývodných cest močových. Dlaždicové epitelie pocházejí především z močové trubice, jejich množství závisí na kvalitě odběru a nemají diagnostický význam. Přechodné epitelie vystylají vývodné močové cesty a jejich výskyt obvykle svědčí o infekci dolních močových cest, zejména při současném výskytu leukocytů. Výskyt renálních epitelí vždy svědčí o vážném poškození ledvin, především tubulů. Jsou podobné přechodným epitelíím, ale menší.



Epitelie: dlaždicová, přechodná, renální

## Bakterie a kvasinky

Při vyloučení kontaminace je nález bakteriurie patologický. Další postup se odvíjí od výsledku mikrobiologického vyšetření. Kvasinky typicky vytvářejí shluky a řetízky.



## Krystaly

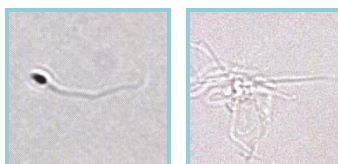
Nález krystalů není kromě průkazu krystalů cystinu (diagnostika cystinurie) obvykle klinicky významný. Nález krystalů může být v důsledku přechodného přesycení moči (např. při příjmu potravy bohaté na oxaláty, uráty). Častý nález urátů a fosfátů může znamenat infekci močových cest. Přítomnost krystalů tyrozinu a leucinu doprovází těžká onemocnění jater. Cholesterol je známkou poškození glomerulární membrány.



Krystaly: oxalát, kyselina močová, tripelfosfát, cystin, cholesterol

## Další nálezy

V močovém sedimentu můžeme dále zaznamenat spermie, hlenová vlákna nebo různé kontaminující útvary (vlákna textilií apod.).



Spermie

Hlen

## EXTERNÍ HODNOCENÍ KVALITY

*Kristína Greplová*

Klíčovou oblastí standardizace procesů v klinických laboratořích je odborná způsobilost pracovníků laboratoře, dokumentovaná a faktická standardizace postupů, kontrola kvality laboratorních výsledků a akreditace laboratoří podle relevantní normy (např. ISO 15189).

**Externí hodnocení kvality (EHK)** představuje systém objektivního hodnocení laboratorních výsledků nezávislou organizací. Provádí se pravidelným porovnáváním výsledků měření hodnocených navzájem a porovnáním s referenčními hodnotami měření (pravdivost výsledků měření). Hlavním cílem provádění EHK je dosažení vzájemné **porovnatelnosti výsledků jednotlivých laboratoří**. V kontrolních cyklech EHK se pokud možno používají kontrolní materiály s hodnotami měřeného analytu s návazností na referenční materiály a referenční metody. Toto je doloženo formou certifikátu, který kromě cílových hodnot obsahuje i odhady rozšířených nejistot těchto hodnot. V ostatních případech jsou cílové hodnoty určovány jako průměry s eliminací odlehlých hodnot.

Realizace EHK probíhá formou **kontrolních cyklů**, kdy jsou organizátorem EHK laboratořím rozeslány kontrolní vzorky s příloženými obecnými pokyny pro zpracování vzorků a s průvodním listem pro zapsání výsledných hodnot analytů. V laboratořích jsou kontrolní vzorky zpracovány stejným způsobem jako patientské vzorky a výsledné hodnoty analytů jsou zapsány do průvodního listu. Průvodní list je v daném časovém termínu odeslán zpět organizátorovi EHK, který výsledky zpracuje a následně rozešle zúčastněným laboratořím vyhodnocení daného kontrolního cyklu. Vyhodnocení obsahuje osvědčení o účasti, certifikát se seznamem úspěšných zkoušek, výsledkový list, komplexní statistiku a komentář supervizora. Laboratoř z těchto informací získá přehled o své úspěšnosti v daném cyklu. V případě neúspěšné zkoušky zjišťuje, zda se jednalo o náhodnou chybu vzniklou např. záměnou vzorků nebo o systematickou chybu.



EVALUATION

FH9-B 2010 Hematology Auto Differentials, FH9

Test Unit of Measure Peer Group	Specimen	Evaluation and Comparative Method Statistics						Your Grade	Plot of the Relative Distance of Your Results from Target as Percentages of allowed Deviation	
		Your Result	Mean	S.D.	No. of Labs	S.D.I	Limits of Acceptability Lower Upper			
White Blood Cell Count PER/L SYNEX NE-3000 PRIMARY MODE	FH9-06	17.7	17.75	0.44	237	-0.1	15.0	20.5	Acceptable	
	FH9-07	18.0	2.90	0.09	237	+1.1	2.4	3.4	Acceptable	
	FH9-08	7.6	7.76	0.20	235	-0.8	6.5	9.0	Acceptable	
	FH9-09	2.9	2.91	0.10	238	-0.1	2.4	3.4	Acceptable	
	FH9-10	7.7	6.67	0.22	238	+1.1	5.8	8.0	Acceptable	
Red Blood Cell Count x10E12/L SYMEX NE-3000 PRIMARY MODE	FH9-06	5.15	5.18	0.057	236	-0.5	4.86	5.49	Acceptable	
	FH9-07	5.17	5.10	0.057	235	-0.2	4.86	5.50	Acceptable	
	FH9-08	2.46	2.49	0.028	236	-0.6	2.32	2.63	Acceptable	
	FH9-09	2.26	2.24	0.027	237	-2.2	2.18	2.46	Acceptable	
	FH9-10	4.32	4.30	0.045	237	-1.1	4.10	4.64	Acceptable	
Hemoglobin g/L SYMEX NE-3000 PRIMARY MODE	FH9-06	158.0	157.7	1.59	233	+0.2	146.7	168.9	Acceptable	
	FH9-07	157.0	155.6	1.79	237	+0.8	144.7	166.6	Acceptable	
	FH9-08	65.0	65.3	0.77	233	-0.4	60.7	70.0	Acceptable	
	FH9-09	58.0	59.25	0.71	233	-0.3	55.0	63.4	Acceptable	
	FH9-10	122.0	121.05	1.40	233	+0.7	112.6	135.4	Acceptable	
Hematocrit % SYMEX NE-3000 PRIMARY MODE	FH9-06	44.60	44.44	0.705	234	-1.2	42.71	47.11	Acceptable	
	FH9-07	44.40	44.906	0.794	235	-0.6	42.21	47.61	Acceptable	
	FH9-08	19.40	19.783	0.433	235	-0.9	18.59	20.97	Acceptable	
	FH9-09	17.40	18.000	0.000	219	0.0	16.92	19.08	Acceptable	
	FH9-10	35.00	35.946	0.370	233	-1.7	33.79	38.10	Acceptable	

Hodnocení analyt  
Technologie měření

Označení vzorku

Vlastní výsledek

Cílová hodnota

Dolní a horní mez

Odhylka od cílové hodnoty v předchozích kontrolních cyklech



EVALUATION

C-B 2010 Chemistry

Test Unit of Measure Peer Group	Specimen	Evaluation and Comparative Method Statistics						Your Grade	Plot of the Relative Distance of Your Results from Target as Percentages of allowed Deviation	
		Your Result	Mean	S.D.	No. of Labs	S.D.I	Limits of Acceptability Lower Upper			
HDL Cholesterol mmol/L ROCHE HDL-CHOL PLUS ROCHE COBAS INTEGRA	CHM-06									
	CHM-07									
	CHM-08									
	CHM-09									
	CHM-10									
Method/Instrument	CHM-06	1.37	1.304	0.081	189	+1.1	0.91	1.70	Acceptable	
	CHM-07	1.66	1.561	0.075	190	+1.3	1.09	2.03	Acceptable	
	CHM-08	1.92	1.819	0.086	190	+1.2	1.27	2.37	Acceptable	
	CHM-09	2.19	2.058	0.095	189	+1.4	1.44	2.68	Acceptable	
	CHM-10	1.37	1.804	0.082	189	+0.8	1.26	2.35	Acceptable	
bCG, serum, quant mIU/mL (IU/L) ROCHE COBAS e601/E170	CHM-06	183.9	186.96	6.85	255	-1.1	175.9	217.1	Acceptable	
	CHM-07	273.2	281.24	9.73	255	-0.8	252.0	310.5	Acceptable	
	CHM-08	259.6	267.84	8.84	255	-0.9	241.3	294.4	Acceptable	
	CHM-09	337.9	351.97	11.86	255	-1.2	316.3	387.6	Acceptable	
	CHM-10	257.7	267.96	9.17	256	-1.1	240.4	295.5	Acceptable	
Iron mmol/L FERRACHROME r/o PFR ROCHE COBAS INTEGRA	CHM-06	19	18.1	0.7	115	+1.3	14	22	Acceptable	
	CHM-07	22	22.6	0.7	115	-0.9	18	28	Acceptable	
	CHM-08	23	23.0	0.7	116	0.0	18	28	Acceptable	
	CHM-09	30	27.5	0.9	116	+2.8	22	33	Acceptable	
	CHM-10	23	23.2	0.8	115	-0.3	18	28	Acceptable	

# VÝSLEDKOVÝ LIST (kvantitativní výsledky)

## Kontrolní cyklus: KO3/10 - Krevní obraz

**Odborná garance:** Česká hematologická společnost ČLS J.E.P.  
 NKRL pro hematologii

**Datum kontroly:** 06.08.2010

**Pracoviště:** Masarykův onkologický ústav, Oddělení laboratorní medicíny

Žlutý kopec 7, Brno 2 IČ: 00209805

Doc. MUDr. Dalibor Valík Ph.D.

Legenda: C = celkové hodnocení vašeho stanovení analytu		Vz. = vzorek	TV = cílová hodnota							
+ ... správné stanovení ve všech vzorcích		VV = váš vlastní výsledek	TMU = toleranční rozpětí	LL	UL					
- ... chybné stanovení v některém vzorku		TE = vaše relativní chyba	UL = dolní mez							
± ... nehodnoceno, nejsou k dispozici cílové hodnoty s dostatečně nízkou nejistotou			UL = horní mez							
Zkouška (analyt, parametr) [jednotka]	Metoda (skupina)	C	Vz.	VV	TE [%]	TV	TMU [%]	LL	UL	Úspěšnost za 2 roky
Leukocyty [10 <sup>9</sup> /l]	(1) Počítač automat	+	A	3,080	4,05	2,960	13	2,575	3,345	50%
			B	15,40	1,99	15,10		13,13	17,07	
Erytrocyty [10 <sup>12</sup> /l]	(1) Počítač automat	+	A	4,890	1,66	4,810	8	4,425	5,195	88%
			B	5,280	1,93	5,180		4,765	5,595	
Hemoglobin [g/l]	(1) Počítač automat	+	A	143,0	0,000	143,0	6	134,4	151,6	100%
			B	171,0	0,000	171,0		160,7	181,3	
Hematokrit [-]	(1) Počítač automat	+	A	0,407	1,75	0,400	10	0,360	0,440	100%
			B	0,477	1,49	0,470		0,423	0,517	
MCV [fl]	(1) Počítač automat	+	A	83,20	-120	83,30	10	74,97	91,63	100%
			B	90,30	-660	90,90		81,91	99,99	
Trombocyty [10 <sup>9</sup> /l]	(1) Počítač automat	+	A	341,0	-7,84	370,0	20	296,0	444,0	88%
			B	682,0	-1,02	689,0		551,2	826,8	
RDW [%]	(747) Sysmex XE 5000	+	A	13,80	-1,43	14,00	10	12,60	15,40	100%
			B	13,00	-7,63	13,10		11,79	14,41	

Vaše celkové úspěšnosti v jednotlivých kontrolních cyklech tohoto typu za poslední 2 roky:

G359

2008: KO4/08 = 86%

2009: KO1/09 = 86%

2010: KO1/10 = 100%

KO2/09 = 57%

KO2/10 = 100%

KO3/09 = 83%

KO3/10 = 100%

KO4/09 = 100%

Ing. Marek Budina  
 ředitel společnosti SEKK

**PROHLÍDKA LABORATOŘÍ ODDĚLENÍ LABORATORNÍ  
MEDICÍNY MOÚ  
A PRAKTICKÉ ÚKOLY PRO ÚČASTNÍKY VZDĚLÁVACÍHO  
KURZU**

**ÚKOL 1: PRINCIP EXTERNÍHO HODNOCENÍ KVALITY +  
MORFOLOGIE BÍLÝCH KRVINEK.**

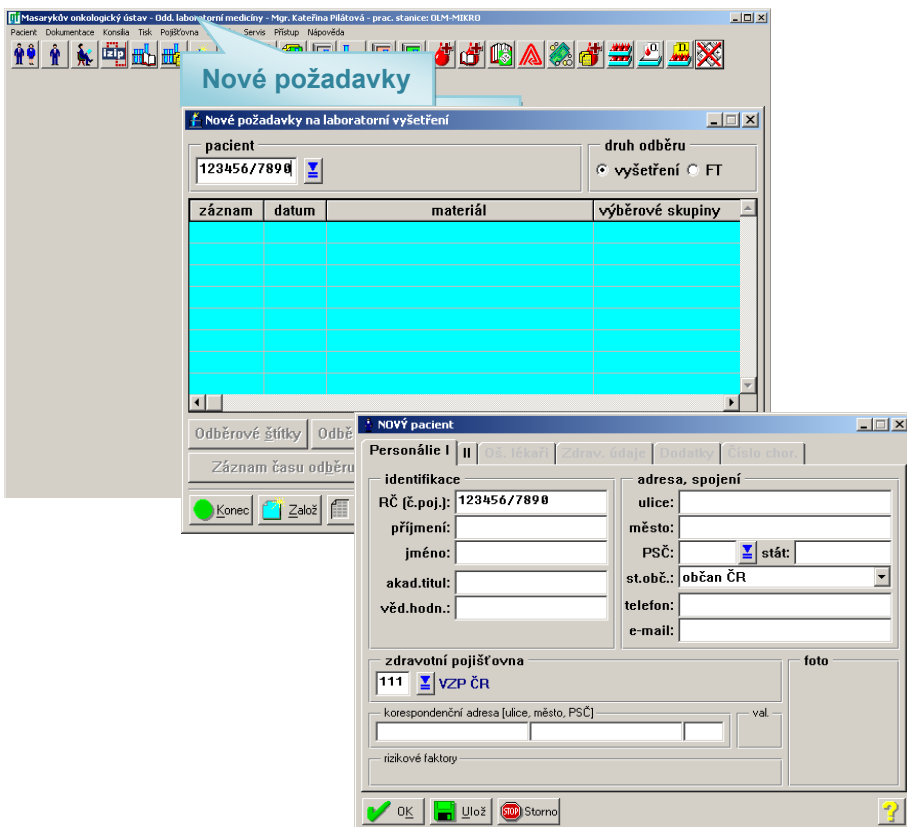
Určete jednotlivé typy bílých krvinek, ve formě diferenciálního rozpočtu zapište do výsledkového listu, výsledkový list odevzdejte ve stanoveném termínu k hodnocení. Společně probereme princip hodnocení a získané výsledky.

1. Pracujete ve dvojici, každá dvojice bude představovat jedno diagnostické pracoviště zapojené do cyklu externího hodnocení kvality.
2. Každá dvojice obdrží „kontrolní vzorek“, který bude simulován fotografiemi leukocytů periferní krve.
3. Účastníci provedou zhodnocení vzorku rozlišením jednotlivých typů bílých krvinek a vyplní „výsledkový list“, který obdrží spolu s „kontrolním vzorkem“.
4. Na výsledkovém listu je uveden mimo jiné také STOP termín, který musí účastníci respektovat.
5. Bude provedeno hodnocení jednotlivých „diagnostických pracovišť“ a na něm demonstrován systém hodnocení.

## ÚKOL 2: ELEKTRONICKÝ LABORATORNÍ POŽADAVEK, ODBĚR MATERIÁLU, PŘÍJEM VZORKU DO LABORATOŘE, ANALÝZA MOČI (CHEMIE + ČÁSTICE), HODNOCENÍ A INTERPRETACE NÁLEZU.

### 1. Vytvoření elektronického požadavku na vyšetření:

Pracujte ve dvojicích. Jeden z dvojice („zdravotní sestra“): v aplikaci GreyFox si otevřete odkaz „nové požadavky“, v otevřeném dialogovém okně klikněte na odkaz „založ“, pro nového pacienta (ten, který si z vaší dvojice bude odebírat moč) vyplňte osobní údaje a potvrďte tlačítkem OK:



Poté opět klikněte na odkaz „založ“ a v hlavičce zatrhněte „nevytvářet účet pro ZP“:

U žadatele vyplňte IČZ: 72931513 (pro OLM), datum vyšetření: dnešní datum a diagnózu: Z108 (rutinní celková prohlídka, jiné stanovení):

Požadavky - NOVÝ ZÁZNAM - Pilátová Kateřina [856009/4235]

Editace Texty Přenos ZP

Hlavička **Zadatel** Požadavky Dodatky

evidence  
datum: 29.09.10 čas: 16:44

vyhrazeno (blokováno) pro uživatele Změna

parametry  
 nevytvářet účet pro ZP H-U  
 neúčtovat odběr  
 neúčtovat zpracování materiálu  
 vyřadit z hromadného tisku  
 vyřadit z aut. exportu požadavků

bloky provozu

blok	datum	poř.

kategorie vyšetření

OK Ulož Storno Tisk ?

Požadavky - NOVÝ ZÁZNAM - Pilátová Kateřina [856009/4235]

Editace Texty Přenos ZP

Hlavička **Zadatel** Požadavky Dodatky

Žadatel  
IČZ: 72931513 odb: 801 dne: 29.09.10  
kdo: Odd. laboratorní medicíny  
adr:

umístění pacienta  
 ambulanti  
 mimoústavní  
 hospitalizace  
 nezjištěno

vyšetření  
datum: 29.09.10 status:   poznámka:  

diagnózy  
Z108 Rutinní celková zdravotní prohlídka jiné stanov

OK Ulož Storno Tisk ?



V požadavcích zatrhněte „Moč chemicky“ a „Moč sediment“.  
Potvrďte OK:

Hlavička	Žadatel	Požadavky	Dodatky
<input type="checkbox"/> SQ_Natrium	<input checked="" type="checkbox"/> Moč chemicky	<input type="checkbox"/> U_Erytrocyty	<input type="checkbox"/> U_Tripeliosfáty
<input type="checkbox"/> SQ_Celk. bílkovin	<input type="checkbox"/> U_Moč chemicky	<input type="checkbox"/> U_Epitelie dlaždic	<input type="checkbox"/> U_Přísně
<input type="checkbox"/> SQ_Urea	<input type="checkbox"/> U_Bílkovina	<input type="checkbox"/> U_Epitelie kulať	<input type="checkbox"/> U_Spermie v moči
<input type="checkbox"/> SQ_Bilirubin	<input type="checkbox"/> U_Glukóza	<input type="checkbox"/> U_Močan sodný	<input type="checkbox"/> Specifická hustot.
<input type="checkbox"/> Hematokrit v těl. t	<input type="checkbox"/> U_Ketony	<input type="checkbox"/> U_Močan amonný	<input type="checkbox"/> Odpady v moči
<input type="checkbox"/> SQ_Glukóza	<input type="checkbox"/> U_Urobilinogen	<input type="checkbox"/> U_Dxaláty	<input type="checkbox"/> U_Natrium
<input type="checkbox"/> SQ_Laktátdehydri	<input type="checkbox"/> U_Bilirubin	<input type="checkbox"/> U_Kyselina močů	<input type="checkbox"/> U_Kalium
<input type="checkbox"/> SQ_Lipáza	<input type="checkbox"/> U_Nitrity	<input type="checkbox"/> U_Dř' v sediment	<input type="checkbox"/> U_Chloridy
<input type="checkbox"/> SQ_pH semikvan	<input type="checkbox"/> U_Specifická hus	<input type="checkbox"/> U_Hlen v sediment	<input type="checkbox"/> U_Osmolalita
<input type="checkbox"/> SQ_Chloridy	<input type="checkbox"/> U_Krev	<input type="checkbox"/> U_Bakterie v moči	<input type="checkbox"/> U_Vápník
<input type="checkbox"/> SQ_Albumin	<input checked="" type="checkbox"/> Moč sediment	<input type="checkbox"/> U_Kvasinky	<input type="checkbox"/> U_Fosfor
<input type="checkbox"/> SQ_Osmolalita	<input type="checkbox"/> U_Moč sediment	<input type="checkbox"/> U_Válce hyalinní	<input type="checkbox"/> U_Hořčík
<input type="checkbox"/> U_ELF0 bílkovin	<input type="checkbox"/> U_Leukocyty	<input type="checkbox"/> U_Válce granulov	<input type="checkbox"/> U_Kreatinin
<input type="checkbox"/> Moč Imunofkace	<input type="checkbox"/> U_Shluky leukoc	<input type="checkbox"/> U_Sediment popř	<input type="checkbox"/> U_Urea
<input type="checkbox"/> U_Kyselina močů	<input type="checkbox"/> U_Glukóza	<input type="checkbox"/> U_AMS	<input type="checkbox"/> U_Celková bílkov
<input type="checkbox"/> U_Melanogeny	<input type="checkbox"/> U_Hamburger	<input type="checkbox"/> OGTT - Objem	<input type="checkbox"/> K-Pas
<input type="checkbox"/> T_Gly12Aasp	<input type="checkbox"/> T_Gly12Aa	<input type="checkbox"/> T_Gly12Val	<input type="checkbox"/> T_Gly12Ser
<input type="checkbox"/> T_Gly12Aig	<input type="checkbox"/> T_Gly12Cys		

denní odpad (DU) celkem 2 položky

## 2. Odběr materiálů:

Moč si odebere jeden ze dvojice (pro kterého byla vytvořena elektronická žádanka) do žluté zkumavky („střední proud“).

## 3. Příjem vzorku:

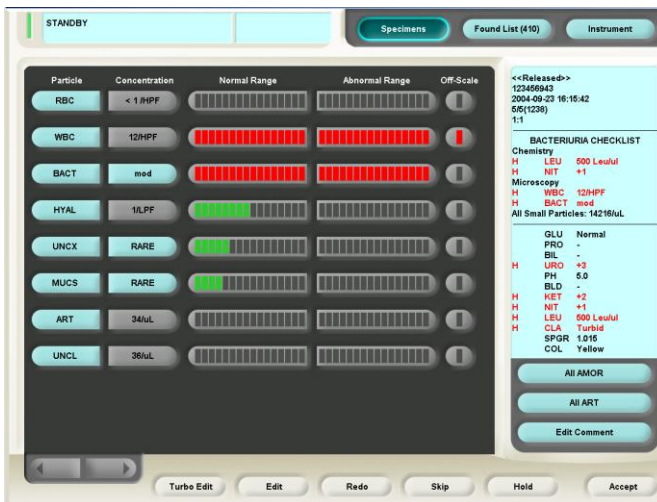
Ten z dvojice, který nezadával elektronický požadavek („laborant“): v aplikaci GreyFox si opět otevřete odkaz „nové požadavky“, do pole pacient zadejte rodné číslo, myší označte záznam s dnešním datem U (žlutá), klikněte na odkaz „příjem materiálu“. Po označení materiálu U (žlutá) myší, klikněte na odkaz „příjem a štítky“ a vytisknutý identifikační štítek nalepte vertikálně na zkumavku.

## 4. Analýza:

Společně: zkumavku s močí vložte podle instrukcí do stojánu a stojánek poté do močového analyzátoru, kde bude provedena automatická chemická analýza moči a analýza močového sedimentu.

## 5. Vyhodnocení

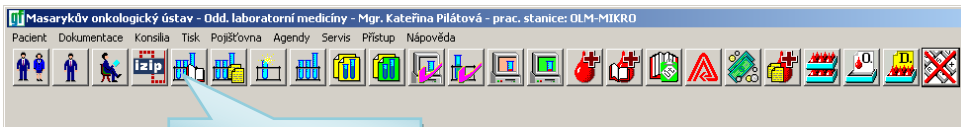
Po analýze se na obrazovce osobního počítače zobrazí naměřené hodnoty:



Kliknutím na tlačítko označující jednotlivé částice (RBC, WBC atd.) je možné podívat se na jednotlivé snímky částic a popřípadě je správně zařadit, zařadí-li je software nesprávně, nebo částice subkategorizovat (válce, krystaly atd.) Kliknutím na tlačítko „accept“ dojde k potvrzení naměřených hodnot a přenosu výsledků do systému GreyFox.

## 6. Prohlížení výsledků v GreyFoxu:

V GreyFoxu klikněte na odkaz „kniha záznamů“, v otevřeném dialogovém okně na tlačítko „číslo záznamu“, které sem zadejte (číslo záznamu se dozvíte na štítku - vpravo nahoře nebo v GreyFoxu u požadavku na vyšetření moči). Potvrďte OK. Nyní se v seznamu objeví vaše jméno, po kliknutí na tlačítko „náhled“ se můžete podívat na výsledky.



### **ÚKOL 3: URČENÍ KREVNÍ SKUPINY A VÝBĚR TRANSFUZNÍHO PŘÍPRAVKU (TP).**

**Na základě určení vlastní krevní skupiny (AB0 Rh) vyberte pro sebe připravené transfuzní přípravky – erymasu a plazmu.**

1. Pracujte ve dvojici, aby minimálně jeden ze dvojice byl subjektem určení krevní skupiny, kterému budou virtuálně přiřazeny transfuzní přípravky, bude tedy příjemce TP.
2. Krevní skupina příjemce TP bude vyšetřena ze třech kapek krve získaných z vpichu do bříška prstu.
3. Pracujte v rukavicích!
4. „Příjemce“ by neměl mít studené ruce; zahřátí je možné pod tekoucí teplou vodou.
5. Na připravenou podložku připravte diagnostické protilátky, anti-A, anti-B, anti-D.
6. „Příjemcův“ prst dezinfikujte a sterilní injekční jehlou proved'te vpich do bříška prstu (nejlépe prsteník); tři kapky krve kápněte do každé z připravených protilátek.
7. Promíchejte protilátky s krví a odečtete, zda došlo k aglutinaci.
8. Interpretujte nález do stanovení krevní skupiny „příjemce“.
9. Vyberte z virtuálního krevního skladu 2 erytrocytární přípravky, které by mohly být vhodné pro „příjemce“, a 2 čerstvé mražené plazmy k podání.

# VETERINÁRNÍ ASPEKTY LABORATORNÍ DIAGNOSTIKY

Jaroslav Doubek, Eva Matalová

## ZÁKLADNÍ BIOCHEMICKÉ VYŠETŘENÍ PERIFERNÍ KRVE

Ve veterinární klinické biochemii jsou analyzovány tyto biologické materiály: krev, její části (sérum, plazma), moč, punktáty (mozkomíšní mok, hrudní, břišní, kloubní a jiné punktáty), žaludeční a bachorová tekutina, stolice.

### Fáze vyšetření

- **Preanalytická fáze** (rozhoduje o správnosti výsledku z více jak 50 %, přesto je v praxi často podceňovaná) a zahrnuje:
  - **Přípravu pacienta a odběrového materiálu**
    - klidné zacházení se zvířetem,
    - dodržování zásad asepse a antisepse,
    - správná volba a správné použití antikoagulačního prostředku,
    - označování vzorků odebraných, tj. **primárních**, ale i zpracovaných, tj. **sekundárních** kvůli vyloučení záměny.
  - **Odběr vzorku**
    - místa odběru:
      - pes, kočka: zevní krytá žíla, přídatná hlavová žíla, zevní hrdelní žíla,
      - skot: zevní hrdelní žíla, střední ocasní žíla,
      - malí přežvýkavci: zevní hrdelní žíla,
      - kůň: zevní hrdelní žíla,
      - prase: ušní žíla,
    - doba odběru: nejlépe ráno, nalačno (12hodinová hladovka, u mláďat a drobných savců (myš, potkan) 6hodinová, tj. po periodě odpočinku, nepřijímání léků, krmiva),
    - způsob odběru: stejná poloha zvířete, minimální komprese,
    - druhy vzorků
      - plná krev: krevní plyny, tj. kyslík a oxid uhličitý (acidobazické vyšetření – viz dále),

- části krve:
  - krevní plazma (po oddělení krevních buněk centrifugací při použití antikoagulačního prostředku),
  - krevní sérum (z krve sražené při 37 °C odsátím nebo centrifugací): většina analytů.

*U přežvýkavců se krev sráží pomalu (za 12-24 hodin), pro urychlení srážení lze použít zkumavky s granulátem.*

### ■ Žádanku

- nacionále pacienta,
- identifikace žadatele,
- druh krve a čas odběru,
- požadované parametry,
- druh služby (rutinní, statim),
- datum a podpis žadatele
- někdy jsou vyžadovány i údaje o klinickém stavu, terapii apod.  
(v případě, že laboratoř provádí vyhodnocení, tj. interpretaci výsledků).

### ■ Transport vzorků

- uzavřené odběrové nádoby,
- ochrana před vysokou nebo extrémně nízkou teplotou,
- ochrana před světlem,
- upřednostňovat části krve (plazmu nebo sérum) před plnou krví (riziko hemolýzy),
- krátký časový interval mezi odběrem a příjmem, resp. analýzou (stanovení koncentrace draslíku do 1 hodin, ostatní analyty obvykle do 2 hodin).

### ■ Uchovávání vzorku

- plazma/sérum v uzavřených nádobkách (ochrana před odpařením):
  - při 4 °C - stabilita analytů několik dní,
  - při -20 °C - stabilita analytů několik týdnů,
- EDTA krev:
  - při 4 °C - stabilita analytů maximálně 24 hodin,

- plná krev:  
při 4 °C - únik draslíku z buněk.

### ■ **Zpracování vzorku**

Především je to **centrifugace**, tzn. oddělení jednotlivých částí krve na základě jejich rozdílné specifické hmotnosti. Centrifugace závisí hlavně na gravitační síle (g) a délce trvání.

### ■ **Negativní vlivy/chyby v preanalytické fázi a jejich následky:**

- **fyzická aktivita:** zvýšení koncentrací celkové bílkoviny, látek vázaných na proteiny (v důsledku přestupu tekutiny z intravaskulárního prostoru do intersticiálního), uvolnění enzymů do krve (kreatinkinázy, laktátdehydrogenázy, aspartátaminotransferázy), zvýšení koncentrace laktátu (v důsledku práce svalů, event. rozvoje anaerobních procesů), zvýšení koncentrací močoviny a kreatininu (v důsledku centralizace krevního oběhu a tím sníženého prokrvení ledvin),
- **stres:** zvýšení koncentrace glukózy (v důsledku glykogenolýzy),
- **nestejná poloha těla při odběru:** změny koncentrace celkové bílkoviny,
- **nestejně místo odběru krve** (hrdelní žíla vs. střední ocasní žíla u skotu):  
možné rozdílné koncentrace fosforu a močoviny (hrdelní žíla – únik do slin),
- **nevhodný antikoagulační prostředek:** počítat se snížením koncentrací vápníku a hořčíku, zvýšením koncentrace sodíku, snížením aktivit enzymů,
- **hemolýza** (rušivý faktor při analýzách): zvýšení koncentrace draslíku, aktivit laktátdehydrogenázy, aspartátaminotransferázy (v důsledku uvolnění z erytrocytů),
- **vytlačování krve:** snížené hodnoty analytů (v důsledku zředování krve intersticiální tekutinou),
- **nesprávná teplota při transportu a uchování:** nebezpečí hemolýzy, snížení aktivit enzymů, při vysoké teplotě snížení koncentrace glukózy,
- **působení světla:** degradace bilirubinu,

- **kontaminace antiseptikem („dezinfekčním“ prostředkem):** snížené hodnoty analytů (v důsledku zředění krve),

*Požadavky preanalytické fáze by měly být uvedeny na webových stránkách nebo shrnuty v dokumentu – příručce.*

- **Analytická fáze** zahrnuje:
  - **Přípravu vzorku**
    - šetrné promíchání,
    - temperování,
    - další operace podle použité metody.
  - **Vlastní analýzu**
    - vyšetření metabolismu proteinů,
    - vyšetření energetického metabolismu,
    - vyšetření minerálního metabolismu,
    - stanovení aktivit enzymů,
    - stanovení hladin hormonů,
    - stanovení hladin vitaminů.
- **Postanalytická fáze** zahrnuje:
  - **Získání výsledků, jejich archivaci.**
  - **Interpretaci (hodnocení)**
    - vztah k/ke: referenčním hodnotám,  
ostatním laboratorním nálezům,  
klinickému nálezu.
  - **Vydání, odeslání výsledků.**

## Indikace k biochemickému vyšetření periferní krve

<b>Všeobecné vyšetření</b> glukóza, močovina, kreatinin, celková bílkovina, transferázy, alkalická fosfatáza
<b>Předoperační vyšetření</b> celková bílkovina, glukóza, kreatinin, transferázy, alkalická fosfatáza
<b>Šokové stavy</b> celková bílkovina, glukóza, kreatinin, acidobazický stav, kyselina mléčná
<b>Nechutenství</b> močovina, kreatinin, glukóza, celková bílkovina, triacylglyceroly, transferázy, alkalická fosfatáza
<b>Zvracení</b> celková bílkovina, acidobazický stav, močovina, kreatinin, draslík, sodík, chloridy, transferázy
<b>Průjem</b> celková bílkovina, acidobazický stav, močovina, kreatinin, draslík, sodík, chloridy, transferázy, alkalická fosfatáza
<b>Nadměrné močení/žíznivost</b> celková bílkovina, glukóza, močovina, kreatinin, alkalická fosfatáza
<b>Anémie</b> železo, vitamin B <sub>12</sub> , kyselina listová
<b>Slabost, poruchy růstu a vývoje</b> kreatinkináza, kyselina mléčná, acidobazický stav, transferázy, alkalická fosfatáza
<b>Onemocnění kůže</b> alkalická fosfatáza, transferázy, cholesterol, glukóza
<b>Onemocnění respiračního systému</b> acidobazický stav, draslík, sodík, chloridy
<b>Onemocnění trávicího systému</b> draslík, sodík, chloridy, acidobazický stav, amyláza, lipáza, vitamin B <sub>12</sub> (poruchy absorpce v tenkém střevě), kyselina listová (vleklá onemocnění střeva)



<b>Onemocnění jater</b> alaninaminotransferáza, aspartátaminotransferáza, alkalická fosfatáza, $\gamma$ -glutamyltransferáza, bilirubin, žlučové kyseliny, amoniak
<b>Onemocnění exokrinního pankreatu</b> amyláza, lipáza, glukóza, imunoreaktivní trypsin
<b>Onemocnění ledvin</b> močovina, kreatinin, celková bílkovina, draslík, sodík, chloridy, vápník, anorganický fosfor, acidobazický stav

### Parametry základního biochemického profilu u zvířat

Parametr	Jednotka
Celková bílkovina	g/l
Albumin	g/l
Glukóza	mmol/l
Močovina	mmol/l
Kreatinin	$\mu$ mol/l
Bilirubin	$\mu$ mol/l
Triacylglyceroly	mmol/l
Cholesterol	mmol/l
Alkalická fosfatáza (ALP)	$\mu$ kat/l
Alaninaminotransferáza (ALT)	$\mu$ kat/l
Aspartátaminotransferáza (AST)	$\mu$ kat/l
Kreatinkináza (CK)	$\mu$ kat/l
$\Gamma$ -glutamyltransferáza (GGT)	$\mu$ kat/l
Ketolátky	mmol/l
Draslík	mmol/l
Sodík	mmol/l
Vápník	mmol/l
Fosfor	mmol/l

## ACIDOBAZICKÉ VYŠETŘENÍ PERIFERNÍ KRVE

Vyšetření slouží k hodnocení stavu vnitřního prostředí organismu z hlediska vztahů mezi kyselinami a bázemi, a to na základě základních ukazatelů, případně ukazatelů doplňkových (odvozených).

### Fáze vyšetření

#### ● Preanalytická fáze zahrnuje:

##### ■ Přípravu pacienta a odběrového materiálu

- klidné zacházení se zvířetem,
- heparinizované speciální stříkačky, skleněné kapiláry nebo máloobjemové injekční stříkačky „propláchnuté“ heparinem,

##### ■ Odběr vzorku

- způsob odběru:  
anaerobně s minimální kompresí, poté okamžitě odstranit veškeré vzduchové bubliny a převrácením důkladně promíchat (bubliny vyšetření zcela znehodnocují – mění se parciální tlaky  $O_2$  a  $CO_2$ ).

##### ■ Druhy vzorků

- plná heparinizovaná krev:
  - kapilární krev (skleněné kapiláry),
  - venózní krev (injekční stříkačky).

##### ■ Uchovávání vzorku

- při 4 °C, co nejrychleji (do 2 hodin) transportovat do laboratoře (omezit tvorbu  $CO_2$  krevními buňkami),
- zmrazení je nevhodné.

#### ■ Negativní vlivy/chyby v preanalytické fázi a jejich následky:

- **dlouhotrvající komprese:** laboratorní obraz acidózy (lokální hromadění  $CO_2$  v krvi),
- **nedostatečně uzavřené zkumavky nebo odběrové stříkačky:** laboratorní obraz alkalózy (odvětrání  $CO_2$ ),
- **uchovávání při vyšší teplotě:** laboratorní obraz acidózy (uvolnění

CO<sub>2</sub> metabolizujícími krevními buňkami).

- **Analytická fáze** zahrnuje:
  - **Stanovení základních parametrů**
    - pH, standardní výchylka bází extracelulární tekutiny (BE<sub>ECT</sub>),  
parciální tlak oxidu uhličitého (pCO<sub>2</sub>),
  - **Stanovení doplňkových parametrů**
    - koncentrace hydrogenuhličitanů v krevní plazmě, sdružené  
nárazníkové báze a parciální tlak kyslíku (pO<sub>2</sub>),
  - **Vyšetření s využitím základních biochemických parametrů**
    - aniontové okno, difference silných iontů (rozdíl v koncentraci  
kationtů a aniontů), natrium-chloridový rozdíl, celková  
koncentrace neprchavých kyselin (albuminu, sulfátů, fosfátů)  
aj.
  
- **Postanalytická fáze** zahrnuje:
  - **Získání výsledků, jejich archivaci.**
  - **Interpretaci (hodnocení)**
    - vztah k/ke: referenčním hodnotám,  
ostatním laboratorním nálezům,  
klinickému nálezu.
  - **Předání, odeslání výsledků.**

## Indikace k vyšetření acidobazického stavu

<b>Nedostatečná funkce orgánů a systémů</b> (respiračního, kardiovaskulárního systému, jater, ledvin)
<b>Změny funkce gastrointestinálního traktu</b> (vleklé průjmy nebo zvracení, stavy neprůchodnosti střeva, poruchy funkce předžaludku u přežvýkavců)
<b>Šokové stavy</b>
<b>Hodnocení účinnosti kompenzačních mechanismů a úprava poruch acidobazické rovnováhy</b>

## Parametry k vyšetření acidobazického stavu

<b>Parametr</b>	<b>Jednotka</b>
pH	
Standardní výchylka bází	mmol/l
pCO <sub>2</sub>	kPa
Aniontové okno	mmol/l
Diference silných iontů	mmol/l
Natrium-chloridový rozdíl	mmol/l
Celková koncentrace neprchavých kyselin	mmol/l

## ZÁKLADNÍ HEMATOLOGICKÉ A HEMOSTAZEOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ PERIFERNÍ KRVE

Ve veterinární klinické hematologii jsou analyzovány: krev a její části, tzn. krevní sérum/plazma. Pro potřeby klinické hematologie se laboratorně vyšetřují ještě vzorky kostní dřeně, mízních uzlin, případně dalších orgánů (sleziny, jater).

### Fáze vyšetření

● **Preanalytická fáze** (význam - viz biochemické vyšetření) zahrnuje:

#### ■ **Přípravu pacienta a odběrového materiálu**

- klidné zacházení se zvířetem,
- dodržování zásad asepse a antiseptiky,
- správný antikoagulační prostředek,
- správný odběrový materiál,
- značení vzorků odebraných (primárních), ale i zpracovaných (sekundárních) k zábraně záměny.

#### ■ **Odběr vzorku**

- místo odběru: viz biochemické vyšetření,
- doba odběru: viz biochemické vyšetření,
- způsob odběru:
  - stálá poloha těla, minimální komprese:
  - šetrný odběr zejména na koagulační vyšetření (viz dále),
- druhy vyšetřovaných vzorků
  - nativní krev (bez antikoagulačního prostředku): imunohe-  
matologické vyšetření,
  - EDTA krev: hematologické vyšetření,
  - citrátová krev: sedimentace,
  - sérum: imunohe-  
matologické vyšetření,
  - citrátová plazma: koagulační testy.

#### ■ **Žádanku**

- viz biochemické vyšetření.

### ■ Zpracování vzorku

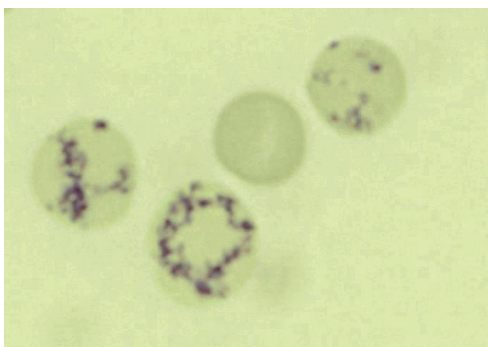
- především je to centrifugace – např. při stanovení mikrohematokritu nebo pro vyšetření krevní hemostáze.

### ■ Transport vzorku

- uzavřené odběrové nádoby (zkumavky),
- ochrana před výkyvy teploty (nebezpečí hemolýzy),
- ochrana před nárazy (nebezpečí hemolýzy).

### ■ Uchovávání vzorku

- nativní krev: při 18-25 °C zpracovat do 2 hodin,  
při 4 °C uchovávat maximálně 24 hodin,
- EDTA krev: při 18-25 °C krevní nátěr a retikulocyty  
(tj. proerythrocyty) do 1 hodiny,  
ostatní do 2 hodin,  
při 4 °C krevní obraz do 24 hodin  
(před vyšetřením temperovat),
- citrátová krev: zpracovat do 2 hodin,
- citrátová plazma: při 4°C maximálně 4 hodin,  
při -20 °C maximálně 48 hodin,
- sérum: při 18-25 °C do 2 hodin,  
při 4 °C do 10 dní,  
při -20 °C maximálně 30 dní.



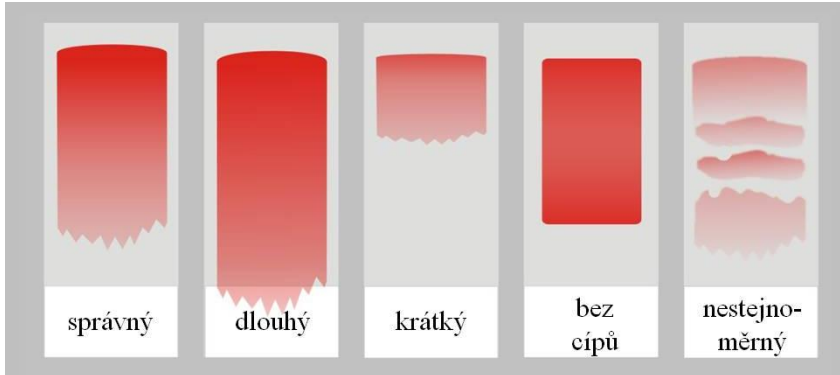
Retikulocyty

## ■ Negativní vlivy/chyby v preanalytické fázi a jejich následky

- **fyzická aktivita**: hemokoncentrace v důsledku přesunu tekutiny z intravaskulárního prostoru do intersticia,
- **stres**: redistribuce krve ze zásobáren a uvolnění marginujících buněk,
- **nestejná poloha těla**: vliv gravitace u stojícího pacienta,
- **pomalé vytékání krve z místa vpichu**: snížení počtu trombocytů v důsledku jejich adheze k okrajům vpichu,
- **vytlačování kapilární krve**: zředění vzorku intersticiální tekutinou,
- **použití mokré jehly nebo zkumavky**: rozpad erytrocytů,
- **kontakt s antiseptikem**: rozpad erytrocytů, iniciace hemokoagulace (zejména při odběru první kapky u kapilární krve),
- **rychlá aspirace, prudké vyprázdnění stříkačky přes jehlu, příliš tenká jehla, vysoké otáčky při centrifugaci**: poškození buněk, aktivace koagulace,
- **zmrznutí krve nebo působení vysoké teploty**: rozpad erytrocytů, upozornění - plná krev se nezmrazuje!,
- **EDTA krev**: agregace trombocytů (falešně snížený počet trombocytů)  
zejména u koček,
- **krev na heparin**: shlukování erytrocytů, poškození leukocytů, trombocytů,
- **nadbytek antikoagulačního prostředku**: hemodiluce, případně hemolýza – pokles hematokritu a počtu erytrocytů, nález akantocytů, echinocytů a jiných defektů membrány,
- **opožděná analýza** (nad 4-8 hodin po odběru – zejména při odběru na EDTA): zvětšení erytrocytů (zvýšení hematokritu a středního objemu erytrocytu), nález krenace erytrocytů a echinocytů, absence centrálního projasnění erytrocytů – falešné sférocety, bazofilie, pyknóza a fragmentace jader, hypersegmentace jader neutrofilů, lobulizace jader lymfocytů – falešné reaktivní

lymfocyty, vakuolizace cytoplazmy v prekurzorech a maligních buňkách se objevují tyto degenerativní změny dříve,

- **záměny buněk při použití automatů:** erythroblasty vs. leukocyty, reaktivní lymfocyty vs. monocyty,
- **hemoglobin uvolněný při hemolýze:** může reagovat s činidly a tak ovlivňovat jiné analýzy (zejména fotometrické),
- **nesprávně zhotovené nátěry:**



**změny barvy nátěrů:** tmavě fialové („přebarvené nátěry“) – zásadité pH, dlouhá doba barvení, prodloužené uchovávání neobarveného nátěru – obtížná diferenciace leukocytů,

- **nedostatečně zaschlý nátěr:** refraktilní tělíska v erythrocytech (světlé měchýřky na periferii erythrocytů).

- **Analytická fáze** zahrnuje:

- **Kvantitativní hematologické vyšetření (numerické testy)**

- počty erythrocytů, retikuloctů, leukocytů, trombocytů, koncentrace hemoglobinu, hematokrit.

- **Kvalitativní (morfologické) vyšetření**

- diferenciální rozpočet leukocytů (5populační leukogram), hodnocení buněčných atypií z panoptických krevních nátěrů (abnormality tvaru erythrocytů, barvitelnosti, inkluze v cytoplazmě erythrocytů (Howellova-Jollyho tělíska), leukocytů (toxické granulace, Döhleho tělíska).



■ **Funkční vyšetření**

- osmotická rezistence erytrocytů.

■ **Vyšetření hemostáze** (dnes se od hematologického vyšetření odděluje jako samostatné)

- časy krvácení, agregace trombocytů, aktivity fibrinogenu, případně další,

- nad rámec základního vyšetření jsou testy aktivity koagulačních faktorů a kofaktorů, inhibitorů koagulace (antitrombinu, proteinů C a S), fibrin(ogen)degradačních produktů a D dimerů.

■ **Negativní vlivy/chyby v analytické fázi a jejich následky**

- především jde o **interference při použití automatických**

**analyzátorů**: erytroblasty vs. lymfocyty, makrotrombocyty vs.

lymfocyty, reaktivní lymfocyty vs. monocyty, mimo rámec korektního hodnocení jsou potom prekurzory leukocytů.

● **Postanalytická fáze** zahrnuje:

■ **Získání výsledků, jejich archivaci.**

■ **Interpretaci (hodnocení)**

- vztah k/ke: referenčním hodnotám,  
ostatním laboratorním nálezům,  
klinickému nálezu.

■ **Předání, odeslání výsledků.**

**Indikace k hematologickému vyšetření**

**Preventivní vyšetření**

hematokrit, počet leukocytů, diferenciální rozpočet leukocytů, železo (u prasete)

**Předoperační vyšetření, biopsie**

hematokrit, hemoglobin, počet leukocytů, diferenciální rozpočet leukocytů, počet trombocytů, protrombinový čas (Quickův test), aktivovaný parciální tromboplastinový čas

<p style="text-align: center;"><b>Šokové stavy</b></p> <p>hematokrit, počet leukocytů, diferenciální rozpočet leukocytů</p>
<p style="text-align: center;"><b>Zvracení</b></p> <p>hematokrit, počet leukocytů, diferenciální rozpočet leukocytů</p>
<p style="text-align: center;"><b>Průjem</b></p> <p>hematokrit, hemoglobin, počet leukocytů, diferenciální rozpočet leukocytů</p>
<p style="text-align: center;"><b>Nadměrné močení/žíznivost</b></p> <p>hematokrit, počet leukocytů, diferenciální rozpočet leukocytů</p>
<p style="text-align: center;"><b>Anémie (jako projev)</b></p> <p>hematokrit, hemoglobin, počet erytrocytů, počet leukocytů, počet retikulocytů, střední objem erytrocytů, střední obsah hemoglobinu v erytrocytu, střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytech, železo, vyšetření kostní dřeně</p>
<p style="text-align: center;"><b>Krvácení</b></p> <p>časy krvácení, počet trombocytů, protrombinový čas, dále aktivita koagulačních faktorů</p>
<p style="text-align: center;"><b>Nechutenství</b></p> <p>hematokrit, počet leukocytů, diferenciální rozpočet leukocytů</p>
<p style="text-align: center;"><b>Únava, slabost</b></p> <p>hematokrit, hemoglobin, počet leukocytů, diferenciální rozpočet leukocytů</p>
<p style="text-align: center;"><b>Projevy onemocnění kůže</b></p> <p>počet leukocytů, diferenciální rozpočet leukocytů</p>
<p style="text-align: center;"><b>Projevy onemocnění respiračního systému</b></p> <p>hematokrit, počet leukocytů, diferenciální rozpočet leukocytů</p>
<p style="text-align: center;"><b>Projevy onemocnění trávicího traktu</b></p> <p>hematokrit, počet leukocytů, diferenciální rozpočet leukocytů</p>

**Projevy onemocnění jater**

počty erytrocytů, leukocytů, trombocytů, protrombinový čas,

**Projevy onemocnění ledvin**

hematokrit, hemoglobin, počet retikulocytů, počet leukocytů, diferenciální rozpočet leukocytů

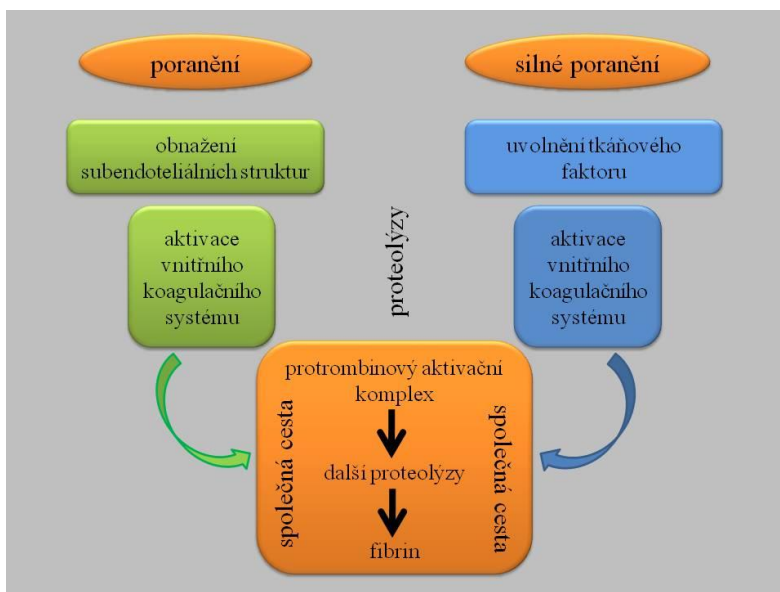
**Parametry základního hematologického profilu**

<b>Parametr</b>	<b>Jednotka</b>
Hematokrit	l/l
Hemoglobin	g/l
Erytrocyty	$*10^{12}/l$
Retikulocyty	$*10^{12}/l$
Střední objem erytrocytu (MCV)	fl
Střední obsah hemoglobinu v erytrocytu (MCH)	pg
Střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytech (MCHC)	g/l
Leukocyty	$*10^9/l$
Neutrofilý - tyčky	$*10^9/l$
Neutrofilý - segmenty	$*10^9/l$
Lymfocyty	$*10^9/l$
Monocyty	$*10^9/l$
Eozinofily	$*10^9/l$
Bazofily	$*10^9/l$

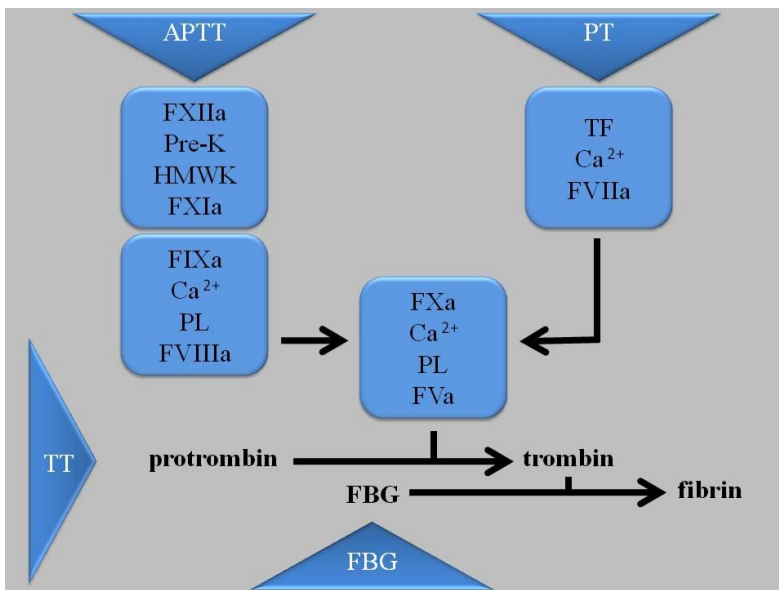
## Parametry základního hemostazeologického profilu

Parametr	Jednotka
Trombocyty	$\cdot 10^9/l$
Protrombinový čas (PT, Quickův test)	s
Aktivovaný parciální tromboplastinový čas (APTT)	s
Trombinový čas (TT)	s
Čas krvácení	min
Fibrinogen	g/l
Antitrombin (AT)	U/ml

## Klasický model srážení krve



Základní skupinové testy srážení krve (podle Matýškové a Zavřelové, 2001)



# VYŠETŘENÍ MOČI

## Fáze vyšetření

### ● Preanalytická fáze zahrnuje:

#### ■ Přípravu pacienta a odběrového materiálu

- klidné zacházení se zvířetem,
- očištění cest odchodu moči sterilní gázou od potencionálních kontaminantů (výtoků).

#### ■ Odběr vzorku

- doba odběru:
  - nejlépe ráno (nejlepší obraz o koncentrační schopnosti ledvin – hustota ranních vzorků musí být vždy vyšší než hustota primární moči, nejvyšší záchyt buněk, válců a bakterií),
- způsob odběru:
  - spontánní mikce (záchyt ze středního proudu),
  - manuální komprese krajiny močového měchýře,
  - katetrizace (sterilní katétr),
  - cystocentéza (punkce močového měchýře).

#### ■ Zpracování vzorku

- chemická konzervace (pozor na interference konzervačního prostředku s analyty).

#### ■ Uchovávání vzorku

- při pokojové teplotě ne déle než 30 minut (jinak dochází ke zvýšení pH, snížení koncentrace močoviny a glukózy, rozpadu buněk i válců a tvorbě nových krystalů),
- při 4 °C (vysrážení solí, tvorba nových krystalů),
- zmrazení nevhodné (destrukce močového sedimentu, snížení koncentrace močoviny a kreatininu).

### ● Analytická fáze zahrnuje:

#### ■ Fyzikální vyšetření

- objem (u mláďat vyjádřený na kg živé hmotnosti a den - vyšší),
- poměrná hustota (ukazatel koncentrační funkce ledvin – činnosti

tubulů,

- barva, zákal, zápach.

### ■ Chemickou analýzu

- semikvantitativní/kvalitativní (diagnostické proužky):

pH (stanovit ihned!), proteiny, glukóza, ketolátky, bilirubin, krev,

*Nejčastější chyby při práci s „papírky“: vymytí reagensií (ponořit na 2 s, přebytek moči otřít o okraj nádobky), překročení doby pro odečtení nálezu, nejistota při porovnávání nálezu s barevným standardem (srovnání provést co nejrychleji).*

- kvantitativní:

-- poměr protein/kreatinin, urea,

-- aktivita močových enzymů ( $\gamma$ -glutamylaminotransferáza, N-acetyl- $\beta$ -D-glukosaminidáza, alkalická fosfatáza),

-- minerální profil ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , fosfáty),

-- močové aniontové okno, osmolalita,

-- močový profil k hodnocení metabolismu u skotu.

*Osmolalita je počet rozpuštěných látek, tj. solí, glukózy, dusíkatých látek (proteiny mají malý vliv).*

### ■ Močový sediment

- mikroskopie: erytrocyty, leukocyty, epitelie, válce, krystaly, mikroorganismy.

■ Mikrobiologické vyšetření (má charakter doplňkového vyšetření).

● Postanalytická fáze zahrnuje:

- Získání výsledků, jejich archivaci.

- Interpretaci.

- Předání, odeslání výsledků.

## Indikace k vyšetření moči

<b>Nadměrné močení/žíznivost, nedostatečné močení, poruchy močení</b>
<b>Odchytky moči při smyslovém posouzení</b> (změna barvy, zákal nebo zápach)
<b>Výtok</b> (vaginální, prepuciální)
<b>Hypo/hyperproteinemie „nejasného původu“</b>

## Parametry základního profilu vyšetření moči

<b>Parametr</b>	<b>Jednotka</b>
Objem	ml/kg/d
Poměrná hustota	
pH	
Protein	mg/kg/d
Kreatinin	mg/kg/d
Urea	mmol/l
Protein/kreatinin	



# VYŠETŘENÍ BACHOROVÉ TEKUTINY

## Fáze vyšetření

### ● Preanalytická fáze zahrnuje:

#### ■ Přípravu pacienta a odběrového materiálu

- klidné zacházení se zvířetem.

#### ■ Odběr vzorku

- doba odběru:

2-4 hodiny po nakrmení, kdy je nejvyšší intenzita bachorové fermentace, tzn. nejnižší pH (hodnoty v průběhu 24 hodin kolísají v rozmezí 5,4–6,8), maximální koncentrace těkavých mastných kyselin a nejvyšší počet nálevníků,

- způsob odběru:

-- bachorová sonda – prvních 50-100 ml tekutiny odstranit z důvodu kontaminace slinami,

-- ruminocentéza (punkce ventrálního kaudálního bachorového vaku) – získané hodnoty pH bachorové tekutiny jsou ve srovnání s odběrem skrze dutinu ústní o 0,3 nižší.

#### ■ Zpracování vzorku

- přecezení po předchozím smyslovém posouzení,

- konzervace:

--  $\text{HgCl}_2$  k vyšetření pH, celkové acidity, amoniaku a kyseliny mléčné,

-- toluenem k vyšetření těkavých mastných kyselin,

-- formaldehydem k stanovení počtu nálevníků.

#### ■ Uchovávání vzorku

- nativní bachorová tekutina: při pokojové teplotě uchovávat maximálně 9 hodin (stáním se prodlužuje čas redukční aktivity),

při 4 °C zpracovat do 24 hodin,

- bachorová tekutina s použitím konzervačního prostředku: zpracovat do 48 hodin.

- **Analytická fáze** zahrnuje:
  - **Přípravu vzorku**
    - důkladné promíchání.
  - **Fyzikální vyšetření**
    - barva, zápach, konzistence.
  - **Chemickou analýzu**
    - pH (diagnostické proužky pouze pro hrubou orientaci), těkavé mastné kyseliny, kyselina mléčná (fyziologicky pouze ve stopách), amoniak, chloridy.
  - **Vyšetření bacherových mikroorganismů**
    - aktivita bacherové mikroflóry:
      - sedimentace,
      - flotace (vynášení hydrofobních částic k hladině, částice vznikají v přítomnosti plynu produkovaného bacherovou mikroflórou, jsou lehčí než okolní tekuté prostředí),
      - čas sedimentační aktivity (čas od nalití vzorku do odměrného válce po vytvoření tří základních vrstev, tj. plynné, tekuté části a sedimentu, čas je prakticky totožný s časem flotace),
      - redukční aktivita
      - počet a poměr nálevníků,
      - jako možný indikátor fermentační aktivity v bacheru se ukazuje aktivita enzymů celuláz.
  
- **Postanalytická fáze** zahrnuje:
  - **Získání výsledků, jejich archivaci.**
  - **Interpretaci.**
  - **Předání, odeslání výsledků.**

## Indikace k vyšetření bachorové tekutiny

<b>Poruchy trávení</b> (poruchy příjmu potravy, omezení bachorové motoriky)
<b>Snížená užítkovost</b> při odpovídající krmné dávce
<b>Změny ve složení mléka</b> (pokles tuku, pokles bílkoviny)
<b>Veterinárně produkční analýzy stáda</b> (kontrola konverze živin, adaptace bachorových mikroorganismů)

## Základní parametry vyšetření bachorové tekutiny

<b>Parametr</b>	<b>Jednotka</b>
Sedimentace	min
Flotace	min
Redukční aktivita s metylenovou modří	min
pH	
Celkové těkavé mastné kyseliny	mmol/l
- Kyselina octová	%
- Kyselina propionová	%
- Kyselina máselná	%
Kyselina mléčná	mmol/l
NH <sub>3</sub>	mmol/l
Chloridy	mmol/l
Počet nálevníků	*10 <sup>6</sup> /l

# Interpretace základních biochemických a hematologických nálezů u zvířat

**DOUBEK J. A KOL.** 2. doplněné vydání

02-APR-10 08:59  
 ID DOG 0012

WBC 17.8H 10<sup>9</sup>/L  
 RBC 6.60 10<sup>12</sup>/L  
 HGB 137 g/L  
 HCT 48.1 %  
 MCV 69.8 fL  
 MCH 20.8 pg  
 MCHC 297L g/L  
 PLT 239 10<sup>9</sup>/L

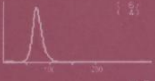
ANALYSIS RESULTS 001

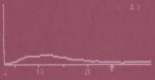
PATIENT INFORMATION

NAME ID 150  
 PAT. TEMP 39.4 °C  
 HR 162 3/min  
 RR 21 3/min  
 S.P.O<sub>2</sub> 99.0 KPa

pH 7.444  
 PCO<sub>2</sub> 3.94 KPa ↓  
 PO<sub>2</sub> 6.0 KPa ↓

WBC  


RBC  


PLT  


RESPIRA. RESULTS  
 Respiratory  
 - hyperventilates  
 Additional respiratory acid to be confirmed by water vapor analysis.

CALCULATED VALUES

pH(T) 7.423  
 PCO<sub>2</sub>(T) 4.12 KPa  
 PO<sub>2</sub>(T) 6.6 KPa

TCO<sub>2</sub> 21.2 mmol/L  
 HCO<sub>3</sub> 20.3 mmol/L  
 BEp - 2.6 mmol/L  
 BEcf - 3.9 mmol/L  
 SBC 22.4 mmol/L

%SO<sub>2</sub>c 83.4 %  
 O<sub>2</sub>ct 18.3 ml/dL  
 s-sDO<sub>2</sub> 3.9 KPa  
 RI 1.31

APR-02-10: 09:58



## ZÁVĚR

Volba parametrů pro laboratorní vyšetření vychází obecně z diagnostické výpovědi ukazatele. V zájmu racionality a etiky jsou stanoveny profily (skupiny parametrů) a algoritmy (postupy) vyšetření.

Interval vyšetření závisí na závažnosti onemocnění (urgentní pacient = kratší interval).

Diagnostický význam (interpretace) parametrů je odvozen – za předpokladu splnění kritérií kvality laboratorního vyšetření – z role daného ukazatele ve zdravém a nemocném organismu. Pro správnou interpretaci je proto nezbytná znalost této úlohy, neopomenutí vzájemných souvislostí mezi parametry, povědomí o různých rušivých vlivech (hemolýzy, lipemie) a znalost referenčních hodnot (referenčního intervalu) jednotlivých parametrů. Zevrubněji je diagnostický význam základních parametrů vyšetření krve, moči a bachorové tekutiny uveden v publikaci: Doubek, J. a kol. (2010) Interpretace základních biochemických a hematologických nálezů u zvířat. ISBN 978-80-86542-22-5.

## **OBSAH**

<b>ESF projekt „Od fyziologie k medicíně“</b>	<b>2</b>
<b>Úvod</b>	<b>5</b>
<b>Masarykův onkologický ústav</b>	<b>11</b>
<b>Materiál vyšetřovaný v diagnostické laboratoři</b>	<b>14</b>
<b>Krevní obraz</b>	<b>16</b>
<b>Diferenciální rozpočet bílých krvinek</b>	<b>23</b>
<b>Krevní skupiny – transfuzní medicína</b>	<b>29</b>
<b>Nádorové markery</b>	<b>33</b>
<b>Kardiomarkery</b>	<b>39</b>
<b>Močová chemie a močový sediment</b>	<b>43</b>
<b>Externí hodnocení kvality</b>	<b>50</b>
<b>Prohlídka laboratoří OLM MOÚ a praktické úkoly pro účastníky vzdělávacího kurzu</b>	<b>53</b>
<b>Veterinární aspekty laboratorní diagnostiky</b>	<b>59</b>
Základní biochemické vyšetření periferní krve	59
Acidobazické vyšetření periferní krve	65
Základní hematologické a hemostazeologické vyšetření periferní krve	68
Vyšetření moči	77
Vyšetření bachorové tekutiny	80
Závěr	84

Oddělení laboratorní  
medicíny  
Masarykův onkologický  
ústav

Ústav fyziologie  
Veterinární  
a farmaceutická  
univerzita Brno

Vydala  
Veterinární  
a farmaceutická  
univerzita  
Brno  
2010

ISBN 978-80-7305-116-7

1. vydání, neprodejné