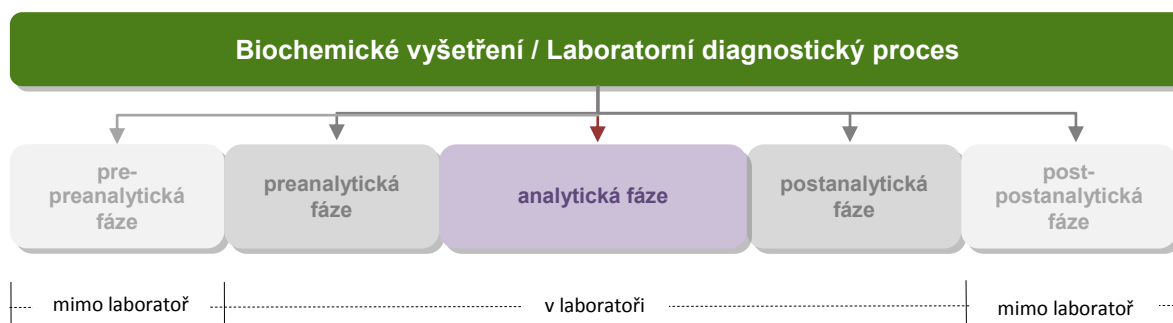


## Analytická část laboratorního vyšetření

### Úvod

Po preanalytické fázi je vzorek zpracovaný a připravený k vlastní analýze, ke konkrétnímu testování. V laboratoři klinické biochemie to budou převážně chemické reakce, kterým bude testovaný vzorek podrobován a na jejichž konci bude žádaný výsledek. Vzorek vstupuje do *analytické fáze* laboratorního diagnostického procesu.



### Měření a některé pojmy z metrologie

Člověk v denním životě stále něco měří. Měříme čas, abychom přišli včas do školy, do práce, nezpозdili se na schůzku, nepropásali začátek filmového představení, měříme svou velikost a podle výsledku vybíráme šaty, boty, klobouky a čepice, měřením své výšky zjišťujeme, zda ještě rosteme, měříme svou hmotnost (tloustneme, hubneme...?), měříme si teplotu, abychom se ujistili že jsme či nejsme nemocni, měříme svá obydlí, když je chceme vybavit nábytkem a různými přístroji („at' se tam ta myčka vejde“), měříme zahradu, když ji chceme oplotit, vyměřujeme na ní záhony, vyhledáváme (již někým jiným) změřené vzdálenosti, abychom věděli kam až pojedeme na dovolenou, kolik času strávíme na cestě (měření), kolik benzínu spálíme (měření objemu) atd., občas si „měříme“ síly, mnohdy se „měříme“ navzájem (třeba zlými, nebo i dobrými, pohledy). Nemělo by nás udivit konstatování, že podstatou práce v analytické fázi je *měření*. Měřením se zabývá věda zvaná *metrologie* (neplést si s *meteorologií*). Od pracovníka s vyšším odborným vzděláním se zcela jistě očekává určitá orientace v dané problematice, a proto nebude na škodu se s metrologií a (některými) *metrologickými pojmy* zabývat trochu podrobněji. V dalším textu si pak povíme něco o (analytické) metodě a jejich vlastnostech (znacích).

**Metrologie** je (stále se vyvíjející) věda o měření a jeho aplikaci a přesně definuje celou řadu metrologických pojmů. S některými z nich se, jak již bylo uvedeno, v dalším textu seznámíme. Východiskem i oporou v této činnosti nám bude poslední překlad (2008) *Mezinárodního metrologického slovníku, tzv. VIM3*, který je (zdarma) k dispozici např. na stránkách *Úřadu pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví*. Definice převzaté z tohoto slovníku budou dále označeny graficky menším (9) modrým písmem (italikou), růžovým pozadím a symbolem (VIM3).

#### Měření je

- soubor činností, jejichž cílem je stanovit hodnotu *měřené veličiny*
- cesta, kterou se získá výsledek analýzy (toto sice nejsou definice, ale podstatu pojmu vysvětlují docela jasně).

*Měření (VIM3) je proces experimentálního získávání jedné nebo více hodnot veličiny, které mohou být důvodně přiřazeny veličině.*

**Poznámka:** Od začátku je třeba vzít na vědomí, že každý vědní obor má nejen svou terminologii, ale i určitá slovní spojení a způsob vyjadřování. Např. v právě uvedené definici je pod slovním spojením „*mohou být důvodně přiřazeny*“ možno tušit např. skutečnost, že jsme změřili nějaký délkový rozměr (délka = jedna z veličin) a protože jsme měřili správným postupem a kalibrovaným měřidlem, můžeme změřený výsledek (např. 1,35 m) oprávněně (tedy i důvodně) považovat za hodnotu, kterou daná, měřená veličina má, čili, jinými slovy, jsme tuto hodnotu veličině přiřadili.

Uvidíme, že měření v sobě obsahuje *porovnání veličin* a také *zjišťování počtu entit*. Měření slouží nějakému účelu, má nějaký záměr, výsledek měření má něčemu sloužit, proto měření předem předpokládá *popis veličiny*, a to takový, aby určenému použití *výsledku měření* odpovídal. Měření obsahuje i popis *podmínek měření*, *postupu měření* a kalibrovaného *měřicího systému*, který pracuje v souladu se specifikovaným postupem měření.

V klinické biochemii se měří veličiny **komponent** (*analytů, entit, analyzovaných složek*), které se analyzují v nějakém **systemu**. Hodnoty veličin jsou uspořádány ve **stupnicích**. Naměřené hodnoty, čili **výsledek měření**, se vydávají v (měřicích) **jednotkách**. Výsledek v sobě obsahuje **nejistotu měření**.

Je na čase, tuto přehršel uvedených pojmů vysvětlit.

**Veličina (VIM3)** je fyzikální nebo chemická **vlastnost** jevu, tělesa nebo látky, která **má velikost**, jež může být vyjádřena jako číslo a reference.

**Poznámka I: reference** = odkaz, odvolávka, odvolání, vztah, poukázání; tímto odkazem může být např. *měřicí jednotka (2,0 mmol/l, kde číslo je 2,0 a reference je mmol/l)*, nebo *postup měření, referenční materiál či jejich kombinace*.

**Poznámka II:** od pojmu „fyzikální nebo chemická vlastnost...., která má velikost“ je třeba odlišit pojem „jmenovitá vlastnost“, což je vlastnost jevu, tělesa nebo látky, kde vlastnost *nemá* velikost (pohlaví člověka, barva vzorku nátěru, barva při kapkové zkoušce v chemii, pořadí aminokyselin v polypeptidu apod.). Jmenovitá vlastnost má hodnotu, která může být vyjádřena slovně, číslicemi, písmeny, či jinak. Pro jmenovité vlastnosti se nepoužívá měření. V této souvislosti je vhodnější používat pojem „vyšetření“.

**Poznámka III:** Veličina je český výraz pro latinské *quantitas, množství, počet* (odvozeno od *quantum*, tj. *kolik, jak mnoho*). V angličtině má podobu *quantity*, kde latinský původ je zřejmý (na rozdíl např. od němčiny, kde tu latinu není znát – *messgrösse*, ale význam je stejný; francouzské vyjádření *grandeur* zcela odpovídá výrazu v češtině).

Veličiny tvoří **soustavu**, jakýsi **soubor veličin a základní veličinou** se rozumí ta veličina, která v dané soustavě veličin **nemůže být vyjádřena jinou veličinou**, tudíž základní veličiny jsou vzájemně nezávislé (podle (VIM3)).

**Mezinárodní soustava veličin (ISQ)** je tvořena souborem **sedmi základních veličin**:

- délkou
- hmotností
- časem
- elektrickým proudem
- termodynamickou teplotou
- látkovým množstvím
- svítivostí.

**Poznámka:** Na ISQ je založena **Mezinárodní soustava jednotek (SI)**. „ISQ“ je soustava veličin, včetně vztahů mezi nimi a veličinami užitými jako základ jednotek v SI.

**Měřená veličina** je veličina, která má být měřena. Anglickým ekvivalentem pro měřenou veličinu je **measurand**. Měřenou veličinu (např. koncentraci) v daném vzorku je třeba specifikovat (např. koncentrace *čeho*), tzn., je třeba popsat nositele veličiny (př. koncentrace *bilirubinu*), případně i další okolnosti (např. teplotu, *měřeno při 37 °C*, soustavu, *v séru* apod. ). Změna hodnoty měřené veličiny, zejména výrazná změna (oproti „normálu“), vede v klinické biochemii většinou k úsudku, že organismus není v optimálním stavu, není zdrav.

**Poznámka:** veličiny lze chápat v obecném smyslu (délka, čas, látkové množství...) a v konkrétním smyslu (délka konkrétní tyčky, koncentrace bilirubinu v konkrétním krevním vzorku). **Measurand** (měřená veličina) je **konkrétní veličina subjektu, který má být měřen**.

**Příklady měřených veličin** (s ohledem na prostředí klinické biochemie): *látková koncentrace, hmotnostní koncentrace, katalytická koncentrace, látková a hmotnostní změna aj. (elektrolytů, proteinů, prvků, metabolitů apod.)*.

Zde si je třeba uvědomit skutečnost, že měření, měřicí systém a podmínky za jakých je měřeno, mohou měnit jev, těleso nebo látku tak, že veličina, která je (právě) měřena, se může lišit od **měřené veličiny** jak je definována. V tomto případě je nutno použít odpovídající **korekci**.

**Příklad:** *odměrné nádobí kalibrované na teplotu 25 °C ale vytemperované na teplotu místnosti 23 °C bude poskytovat výsledky, které je nutno korigovat na definovanou teplotu 25 °C; hodnoty naměřené urinometrem je nutno korigovat na přítomnost bílkovin, glukózy apod.*

K řazení veličin stejného druhu podle velikosti se používá **uspořádaný soubor hodnot veličiny u veličin daného druhu**, zvaný **stupnice hodnot veličiny**, nebo krátce, **měřicí stupnice (VIM3)**.

Rozeznávají se tři typy stupnic:

- **poměrná** (relativní) kvantitativní stupnice
- **nominální** (jmenovitá) stupnice
- **ordinální** (pořadová) stupnice

- a. **Poměrná kvantitativní stupnice** se získá pomocí vzorků, u kterých je známý obsah měřené veličiny. Tyto vzorky se nazývají *měřicí standardy* nebo **etalony** či **kalibrátory**. Výsledky měření u neznámých vzorků se srovnávají či poměřují (proto *poměrná*) s touto stupnicí. Sestrojení této stupnice je **kalibrací** měření (viz odst.3.3.). V poslední době se velmi často proces kalibrace odehrává přímo u výrobce (výrobci dodávají uzavřené systémy, tj. přístroj (analyzátor), reagentie, kalibrátory, kontrolní vzorky, případně přímo i kalibrační křivky, které se instalují do analytického systému pomocí čárového kódu.
- b. **Nominální stupnice** se používá ke klasifikaci měřené veličiny při *kvalitativních* měřeních, při *kvalitativní analýze* (tato měření se označují též jako *pozorování* a vzhledem k poznámce uvedené na str. 1 je to v tomto případě, i v případě stupnice ordinální, správnější). Pozorování je druh *vyšetření*, které vede k vyjadřování výsledků na nominální stupnici nebo na ordinální stupnici. Hodnoty veličin jsou označovány slovně nebo dohodnutými symboly.

Příklady nominálních stupnic	
Vyšetření/pozorování	Nominální stupnice
Dusitany (nitrity) v moči ( <i>přítomnost</i> )	negativní/pozitivní
Krevní skupina ( <i>typ</i> )	A <sub>1</sub> +, A <sub>1</sub> Rh(D)pozitivní
Výsledek měření laboratoře v EHK	akceptovatelný/neakceptovatelný

*Nominální = jmenovitý, formální, týkající se jmen, vyjádřený v penězích; nominální hodnota – hodnota udaná na bankovce, cenném papíru...*

- c. **Ordinální stupnice** (stupnice podle pořadí *priority* hodnot) představuje velikost hodnot veličiny, ale bez přesného matematického vyjádření. Vyšetřování, které vede k výsledkům na ordinální škále, se označuje jako semikvantitativní analýza.

Příklad ordinální stupnice	
Vyšetření/pozorování	Ordinální stupnice
U-celková bílkovina ( <i>přítomnost</i> )	negativní; +1; +2;+3; +4

**Měřicí jednotka (VIM3)**, reálná skalární veličina, definovaná a přijatá konvencí, se kterou může být porovnávána jakákoliv jiná veličina stejného druhu vyjádřením podílu veličin jako čísla. Zkrácený název je *jednotka*, často se používá v kombinaci s názvem veličiny, např. *hmotnostní jednotka* nebo *jednotka hmotnosti*. Měřicí jednotky jsou označovány konvencí přidělenými názvy a značkami.

**Poznámka:** „podíl veličin...“ vlastně vyjadřuje „kolikrát je měřicí jednotka obsažena v naměřené hodnotě veličiny“

**Mezinárodní soustava jednotek (VIM3)**, soustava jednotek založená na *Mezinárodní soustavě veličin*, jejich názvech, značkách, včetně řad předpon a jejich názvů a značek, společně s pravidly pro jejich použití, přijatá Generální konferencí pro váhy a míry (CGPM).

V ČR jsou **zákonnými měřicími jednotkami** pouze jednotky uvedené v ČSN ISO 80000-1 (z účinnosti od 1.8.2011, tato norma nahradila normu ISO 1000 z června 1997) a jsou jednotkami SI (*Système International d'Unités*).

Základní veličina	Základní jednotky SI	
	Název	Značka
délka	metr	m
hmotnost	kilogram	kg
čas	sekunda	s
elektrický proud	ampér	A
termodynamická teplota	kelvin	K
látkové množství	<b>mol</b>	<b>mol</b>
svítivost	kandela	cd

Základní jednotkou látkového množství v soustavě SI je **mol**. Jednotky měření používané v klinických laboratořích musí být odvozeny od této základní jednotky, případně musí vycházet ze soustavy SI, nebo být z ní odvozeny.

**Systém.** Český výraz pro systém je *soustava*. Z toho lze intuitivně vytušit, že se jedná o *souhrn prvků, které spolu nějakým způsobem souvisejí tak, že tvoří smysluplný celek*. Systém je vymezen hranicemi, a to hranicemi skutečnými nebo myšlenými a oblast mimo tyto hranice se nazývá *okolí*. Systémem v dané souvislosti může být například *organismus, pacient, orgán, tkáň, buňka, chemická látka*. Systém studovaný v klinických laboratořích může být odvozen nebo připraven z biologického materiálu.

V klinické biochemii jako nejčastější systémy připadají v úvahu

Zkratka	Systém (anglicky)	Systém (česky)
B-	blood	krev
S-	serum	sérum
P-	plasma	plazma
U-	urine	moč
Sf-	spinal fluid	mozkomíšní mok/ likvor
Af-	amniot fluid	plodová voda
F-	faeces	stolice
Pt-	patient	pacient

**Poznámka:** české ekvivalenty zkratk v tabulce nejsou uvedeny, protože se prakticky nepoužívají.

**Komponenta**, čili složka, je definovatelná část systému. V odborném tisku se často místo pojmu *komponenta* používá pojem *entita*.

**Příkladem** komponent mohou být atomy, molekuly, ionty, radikály, makromolekuly, fyzikální tělesa (buňky, mikroby, viry) atd.

**Analyt** je složka vzorku stanovovaná analýzou a uvedená v názvu měřené veličiny. Synonymem jsou výrazy *analyzovaná složka* a *komponenta*.

**Příklad:** stanovovanou složkou/komponentou/entitou/analytem může být např. glukosa v plazmě, čili P-glukosa, vápník v séru, neboli S-Ca, amyláza v moči, tj. U-AMS apod.

### Přehled důležitých jednotek v klinické laboratoři a některých probraných pojmů

Měřená veličina	Jednotka	Analyt
Látková koncentrace elektrolytů	mol/l	S-Na <sup>+</sup>
Hmotnostní koncentrace proteinů	g/l	S-IgG
Katalytická koncentrace enzymů	kat/l	S-AST
Arbitrární koncentrace proteohormonů	U/l	S-TSH
Látková změna při vylučování elektrolytu	mol/d	U-Ca <sub>celk</sub>
Hmotnostní změna při vylučování proteinu	g/d	U-proteiny
Objemová změna u glomerulární filtrace	l/s	S,U-kreatinin
Početní koncentrace elementů	n/l	U-leukocyty

**Legenda k tabulce:** První řádek tabulky pod nadpisy ukazuje, že měřenou (odvozenou) veličinou je látková koncentrace, analyzovanou složkou v daném systému (v séru) jsou elektrolyty, konkrétním analytem je sérový kation Na<sup>+</sup>, jednotkou (mírou stanovované veličiny) je mol/l. Jinými slovy, měří se látková koncentrace konkrétního elektrolytu v mol/l. Některé, snad na první pohled nejasné, vztahy určitých (odvozených) jednotek k molu vysvětlí z jejich definice – typickým příkladem je katal na litr (kat/l), kde stačí si prostudovat definici katalu v kapitole 12 na str. 12-6.

Měření neprobíhá v celém systému, ale pouze v jeho (charakteristické) části, nazývané **vzorek**.

**Vzorek** je jedna nebo více reprezentativních částí odebraných ze systému za účelem *získání informací o systému* (tato definice může znít zcela logicky když si uvědomíme, jak např. vybíráme obkladačky do koupelny, látku na šaty apod. – také se díváme na vystavený nebo zapůjčený vzorek a z něho usuzujeme na vlastnost systému – jak bude nakonec vypadat koupelna, šaty apod.).

Výsledkem prvotního odebrání je **primární vzorek**. V praktickém (laboratorním) životě je primárním vzorkem odběrová nádoba (zkumavka), která je přijata laboratoří. Právě ta je myšlena, pokud se mluví o zpracování primárních vzorků a myslí se tím skutečnost, že nedochází k žádnému rozpipetování přijatého vzorku, jeho alikvotaci (viz dále), přelévání do dalších nádobek apod., ale přímo tato (prvotní) zkumavka se zpracovává, tj., že se např. vloží do analytické linky, resp. *měřicího systému*.

**Analytický vzorek** je do laboratoře dodaná část vzorku, ze které se odebírají zkoušené (analyzované) části pro jednotlivé analýzy. Jak je zřejmé z předchozího odstavce, analytickým vzorkem může být přímo vzorek primární.

**Analytický podíl** je podíl čili *část materiálu*, který je odebraný z analytického vzorku a s nímž se provádí aktuální měření nebo pozorování. Nazývá se také **aliquot** (aliquot).

*Příklad použití: jedna část – aliquot – je určena pro biochemický analyzátor, druhá pro imunochemický analyzátor, další je určena pro elektroforetické dělení apod.*

Měření není možné bez *měřidla*, případně bez *měřicího systému*.

**Měřidlo**, měřicí přístroj (VIM3), zařízení používané k měření buď samotné, nebo ve spojení s jedním nebo více *přídavnými zařízeními*. Konstrukce měřicího zařízení vychází z principu měření.

*Poznámka: zacházení s měřidly (mimo jiné) upravuje [zákon č. 505/1990 Sb.](#), Zákon ze dne 16. listopadu 1990 o metrologii.*

**Měřicí systém** (VIM3), sestava jednoho nebo více měřidel a často dalších zařízení, včetně jakýchkoliv čidel a zdrojů, sestavená a přizpůsobená k poskytování informace používané ke generování hodnot veličiny ve specifikovaných intervalech pro veličiny specifikovaných druhů. Jsou to tedy všechny složky, které jsou zapotřebí k provedení daných vyšetření. Měřicí systém se může skládat i z jediného měřidla.

*Příklad složení měřicího systému: měřicí přístroj či přístroje - ostatní technická zařízení - postup měření – reagentie – kalibrátor - referenční čili kontrolní materiály.*

**Měřicí princip**, princip měření (VIM3), jev, který slouží jako základ měření. Tento jev může být fyzikální, chemické nebo biologické povahy.

*Příklad: V klinické biochemii jsou k měření látkového množství hojně využívány spektrofotometrické metody, kde měřicím principem je absorpce (zářivé) energie; ke zjištění aktivity/koncentrace iontů mohou být použity iontové selektivní elektrody, kde měřicím principem je změna potenciálu indikační elektrody; přítomnost či nepřítomnost určité látky v živném prostředí může vést k růstu či zastavení růstu kolonie bakterií – princip zjištění přítomnosti/nepřítomnosti testované látky v růstovém médiu podle chování bakterií*

**Metodou měření** či **měřicí metodou** se rozumí „generický popis logického organizování činností použitých při měření,“ (VIM3).

Podle způsobu zjišťování měřené veličiny lze rozeznávat měřicí metody přímé, nepřímé, absolutní a relativní, kontaktní a nekontaktní, komparační, kompenzační a omezovací, substituční, diferenční, statické, dynamické... Metody přímé stanovují veličinu přímo podle definice měřené veličiny, všechny ostatní metody jsou nepřímé a jsou založeny na známém vztahu měřené veličiny k jiným veličinám, hodnota měřené veličiny se zjišťuje výpočtem, odečtením z nomogramu, z grafu či z tabulky.

*Příklad: Přímé měření teploty teploměrem – hodnota měřené veličiny se odečte přímo na stupnici měřidla, nepřímé stanovení odporu  $R$  kovového vodiče změřením protékajícího proudu  $I$  při daném napětí  $U$  a výpočtem podle vztahu  $R=U/I$ . Délku lze stanovit absolutně, tj. vzhledem k jednotce, přímo na stupnici měřidla (ta udává násobek základní jednotky délky – metru), koncentrace se stanovuje (většinou) relativně, vzhledem k etalonu (standardu, normálu). V tomto případě udává výsledek měření násobek hodnoty standardu, na který bylo měřidlo nakalibrováno.*

**Postup měření** (VIM3), podrobný popis měření podle jednoho nebo více měřicích principů a dané metody měření, založený na modelu měření a zahrnující jakýkoliv výpočet nutný k získání výsledku měření.

Laboratorní personál má k dispozici podrobně popsáný postup měření ve formě *standardního operačního postupu* (SOP), který mu umožňuje měření provést. Často bývají k dispozici i *zkrácené pracovní postupy*.

**Výsledek měření (VIM3)**, soubor hodnot veličiny přiřazený měřené veličině společně s jakoukoliv dostupnou relevantní (tj. podstatnou, důležitou) informací. Je to hodnota získaná měřením. Relevantní informací může být např. **nejistota měření** (viz dále na str.8).

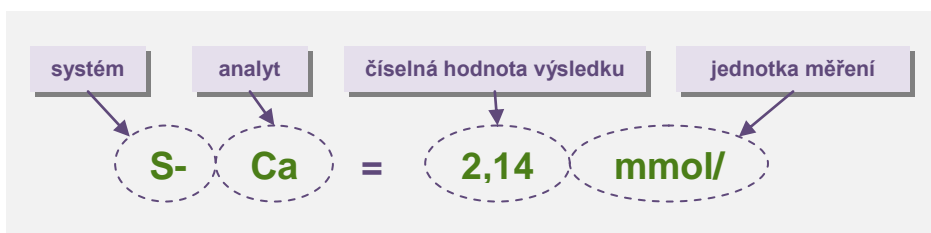
**Poznámka:** Preferovaným formátem IUPAC-IFCC pro označování veličin v laboratorní medicíně je „Systém-Složka; druh veličiny“.

Standardizovaný laboratorní výsledek v klinické biochemii by měl vždy obsahovat tyto informace:

- vyšetřovaný systém (*pacient, krev, plazma, sérum, moč, mozkomíšní mok*)
- vyšetřovaný analyt/komponenta (*kreatinin, močovina, glutamátdehydrogenáza, glukóza*)
- druh měřené veličiny (*látkové množství, hmotnostní koncentrace, látková změna*)
- číselnou hodnotu (*2,14; 38,4; 215*)
- jednotku (*mol/l,  $\mu$ kat/l, g/l*)

Když doposud uvedené informace shrneme do (hypotetického) výsledku měření, může zápis výsledku měření na pracovišti klinické biochemie vypadat např. takto: S-Ca = 2,14 mmol/l.

Názvy jednotlivých členů rovnice jsou uvedeny na schématu:



Uvedený zápis lze interpretovat např. takto:

- v analyzovaném vzorku krevního séra (systém) byla zjištěna látková koncentrace (měřená veličina) 2,14 (číselná hodnota) mmol kalcia v litru séra (koncentrace s jednotkou měření mmol/l)
- látková koncentrace vápníku v krevním séru je rovna 2,14 mmol vápníku v jednom litru séra, nebo
- koncentrace vápníku je 2,14 mmol v litru séra,
- analyzovaný vzorek obsahuje v litru séra 2,14 jednotek atomů vápníku,
- zjištěná koncentrace vápníku v 1 litru séra představuje 2,14 (odvozené) jednotky, jinými slovy, tato koncentrace je 2,14x větší než je měřicí jednotka, atd., atp.

Nauka o měření, metrologie, vychází z předpokladu, že měření vede pouze k *přibližné* hodnotě, více nebo méně odlišné od hodnoty skutečné, která je svou podstatou nezjistitelná (podobně, jako nelze dosáhnout absolutní nuly). Rozdíl hodnoty zjištěné a skutečné byl nazván *chybou* (od *chyběti*, něco naměřené hodnotě *chybí*).

**Chyba měření, chyba (VIM3)**, naměřená hodnota veličiny minus referenční hodnota.

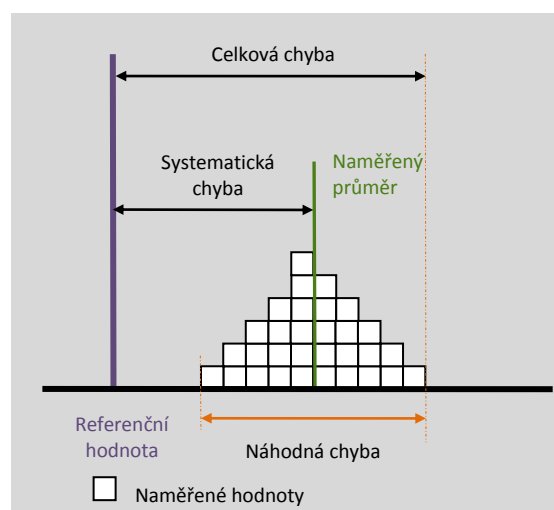
**Poznámka:** Chyba měření není omyl, výrobní chyba apod. Je to pojem použitelný za určitých podmínek. Předchozí vydání VIM (VIM2) definovalo touto definicí pojem **odchylka**. V praxi se setkáme s oběma pojmy.

Znalost *chyby* umožňuje *korekci*, čili *opravu* výsledku. Je logické, že čím je menší *chyba*, tím lepší je výsledek.

Chyby lze rozdělit na **chyby systematické** (soustavné, anglicky *systematic errors*) a **chyby náhodné** (nahodilé, anglicky *random errors*).

**Chyby systematické** lze rozdělit na chyby

- *metody*, které vznikají z nedokonalosti použité metody měření
- *měřicích přístrojů*, způsobené jejich nedokonalou, špatnou, zhoršenou či neodpovídající funkcí
- *osobní*, které mají původ v osobě obsluhy.



Systematické odchylky se také nazývají *bias*.

Typickými zdroji systematických chyb jsou *rozdílné laboratoře, rozdílné metody, rozdílné přístroje a pracovníci laboratoří*. *Věk jedince (stárnutí)* může rovněž být zdrojem systematických odchylek. *Chemikálie*,

reagencie, kalibrátory a komponenty přístrojů se mohou časem měnit (kazit se) a být příčinou narůstajících či klesajících trendů v laboratorních výsledcích. Systematická chyba, odchyluje výsledek vždy *jedním směrem*.

Může mít složku

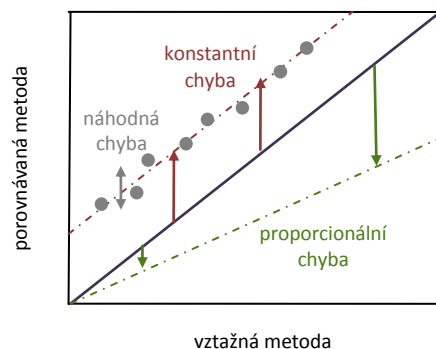
- *konstantní* (výsledek je u různé koncentrace odchýlen vždy o *stejnou hodnotu*) a
- *proporcionální* (výsledek se liší od správné hodnoty u všech hladin o *stejný násobek*).
- Další možností je kombinace obou předchozích.

Systematickou chybu charakterizuje *aritmetický průměr*.

Jak uvidíme dále, je systematická chyba v podstatě totožná s pojmem **pravdivost**.

**Chyby náhodné** se odlišují od chyb systematických především tím, že neznáme jejich původ. Odhad jejich výskytu lze zjistit statistickými metodami založenými na počtu pravděpodobnosti. Náhodnou chybu charakterizuje *směrodatná odchylka*.

Zdroje náhodných chyb ovlivňují každé měření různě, a to jak pozitivně, tak negativně. Příkladem náhodného působení mohou být např. výkyvy (fluktuační) v elektro-optickém mechanismu měřicího přístroje, smíchávání vzorku a reagencie, teplota přístroje, odpařování vzorku a reagencí. Další náhodné ovlivnění může mít svůj původ v kalibraci metody, která může ovlivnit náhodným způsobem výsledky ze dne na den.



Jak uvidíme dále, je náhodná chyba v podstatě totožná s pojmem **preciznost**.

Kromě toho může docházet přímo k **hrubým chybám** v práci. Každá lidská činnost je zatížena asi 5% chybou. Snížit toto procento může plně automatizovaný provoz (asi na 0,5%). K hrubým chybám by v práci laboratorních pracovníků docházet nemělo, ale nelze je zcela vyloučit.

## Kalibrace

V analytickém procesu představuje kalibrace ústřední záležitost. Špatně nakalibrovaná metoda dává špatné výsledky, je nepoužitelná. Při kalibraci jde v principu o nalezení vztahu mezi závisle a nezávisle proměnnými, tj. mezi hodnotami veličiny dané etalony (standards) a hodnotami analytického signálu (danými většinou měřidlem, měřicím systémem).

**Kalibrace (VIM3):** činnost, která za specifikovaných podmínek v prvním kroku stanoví vztah mezi hodnotami veličiny s nejistotami měření poskytnutými etalony (standards) a odpovídajícími indikacemi s přidruženými nejistotami měření a ve druhém kroku použije tyto informace ke stanovení vztahu pro získání výsledku měření z indikace.

**Poznámka:** Indikacemi se v definici rozumí hodnota analytického signálu.

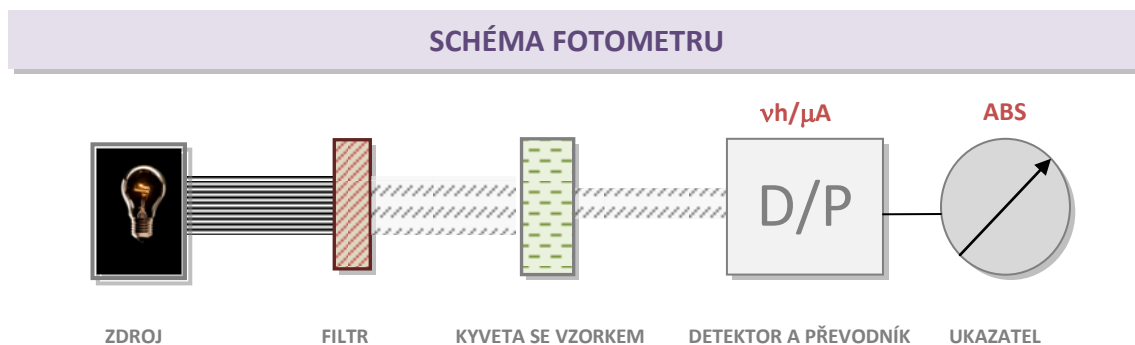
**Etalon, standard měření, standard, (measurement standard, etalon) (VIM3), realizace definice dané veličiny, se stanovenou hodnotou veličiny a přidruženou nejistotou měření, používaná jako reference.**  
(srovnej též text na str. 3-3, poměrná kvantitativní stupnice).

**Některé příklady:** vodíková referenční elektroda s přidělenou hodnotou veličiny 7,072 a přidruženou standardní nejistotou měření 0,006; řada referenčních roztoků kortisolu v lidské plazmě, která má certifikovanou hodnotu veličiny s nejistotou měření pro každý roztok; referenční materiál poskytující hodnoty veličiny s nejistotami měření pro hmotnostní koncentraci každého z deseti různých proteinů.

Prakticky se každé měření provádí na nějakém přístroji (fotometr, koagulometr, coulometr...), který na měřenou veličinu reaguje odezvou čili *signálem* (generace či změna napětí, proudu apod.).

**Např. při fotometrii může být popsán tento sled kroků:**

Analyt reaguje s činidlem za tvorby barevné sloučeniny. Intenzita zbarvení této sloučeniny je přímo úměrná původní koncentraci analytu. Přístroj – fotometr, měří intenzitu zbarvení prostřednictvím proudu, který se tvoří po dopadu světelného záření na detektor. Odezvou čili signálem je v tomto případě intenzita proudu, která je ve vztahu k intenzitě zbarvení sloučeniny a tedy i ve vztahu k původní koncentraci analytu. Intenzita proudu může být vyjádřena v ampérech (mA,  $\mu$ A) nebo po převodu hodnot proudu na absorbanci, jako absorbance. V tomto případě bude nejčastější odezvou absorbance.



Popsaný soubor činností (a podobné další soubory činností prováděné za definovaných podmínek) ustavuje mezi touto odezvou **S** (intenzitou signálu, indikací) a měřenou vlastností **c** (množstvím, koncentrací stanovovaného analytu ap.) funkční vztah (tzv. *kalibrační funkce*): **S = f(c)**.

**Opakování z matematiky:** Vždy, když můžeme k danému souboru čísel přiřadit jistým způsobem jiný soubor čísel, máme co činit s funkční závislostí.

Tato funkční závislost (předpis) může být

- *lineární*, kdy funkcí je rovnice přímky, nebo
- *nelineární*, kdy funkci představuje křivka odlišná od přímky.

Pro popsání případu s fotometrem platí (za předpokladu, že  $c$  = koncentrace) **A = f(c)**, což říká, že absorbance **A** je nějakou funkcí **f** koncentrace (**c**), čili hodnota absorbance se mění (podle nějakého předpisu, tj. funkce – lineární, nelineární) v závislosti na hodnotách koncentrace daného analytu. Existují postupy matematické statistiky umožňující rozhodnout, zda se jedná o lineární či nelineární závislost.

**Lineární závislost** (funkce) je vyjádřena obecnou rovnicí **y = a + b.x**,

kde *y* = hodnota odezvy, *a* = úsek na ose *y* (intercept), *b* = směrnice přímky a *x* = množství-koncentrace analytu; *a* by se mělo blížit nule

Pro případ výše uvedeného vztahu mezi absorbancí a koncentrací analytu bude obecná rovnice vypadat takto: **A = a + b.c** resp. **A = a + k.c**

Nejjednodušším příkladem této funkční závislosti (tj. kalibrační křivky), je vztah pro **a = 0** (přímka procházející počátkem – viz obrázek na další stránce): **A = k.c**, s obvykle používanou symbolikou, tj. absorbance (**A**) je přímo úměrná koncentraci (**c**), **k** je směrnice křivky.

Z této rovnice lze vypočítat *kalibrační faktor* **f**: **f = c/A**

Kalibrační faktor je nejjednodušším vyjádřením kalibrace. Upravením vztahu dostaneme **c = f . A**, což je **analytická funkce**, kterou můžeme *zjistit obsah stanovované složky z intenzity signálu* (tj. princip stanovení koncentrace analytu pomocí faktoru).

Průběh kalibrační funkce se ověří zpracováním sady standardů o vzrůstající koncentraci a vnesením do grafu. Kalibrační křivka se prokládá experimentálními body metodou nejmenších čtverců. Jednou ověřený lineární průběh (postupem popsaným dále u nelineárních závislostí) dané funkce umožňuje napříště pracovat již s omezeným počtem kalibrátorů (etalonů, standardů), tedy v případě *lineárních závislostí* se kalibrační křivka většinou sestojí pomocí kalibrátoru s nulovou hodnotou stanovovaného analytu a kalibrátoru s určitou hodnotou tohoto analytu, nejčastěji hodnotou blízkou horní hranici *referenčních hodnot*.

**Pracovní rozsah** v případě lineární závislosti je oblast kalibračního grafu mezi (dolní) *mezí stanovitelnosti* ( $L_Q$ ) a bodem, kde křivka závislosti signálu/odpovědi přístroje na koncentraci přestává být lineární<sup>1</sup>, případně *horní mezí stanovitelnosti*.

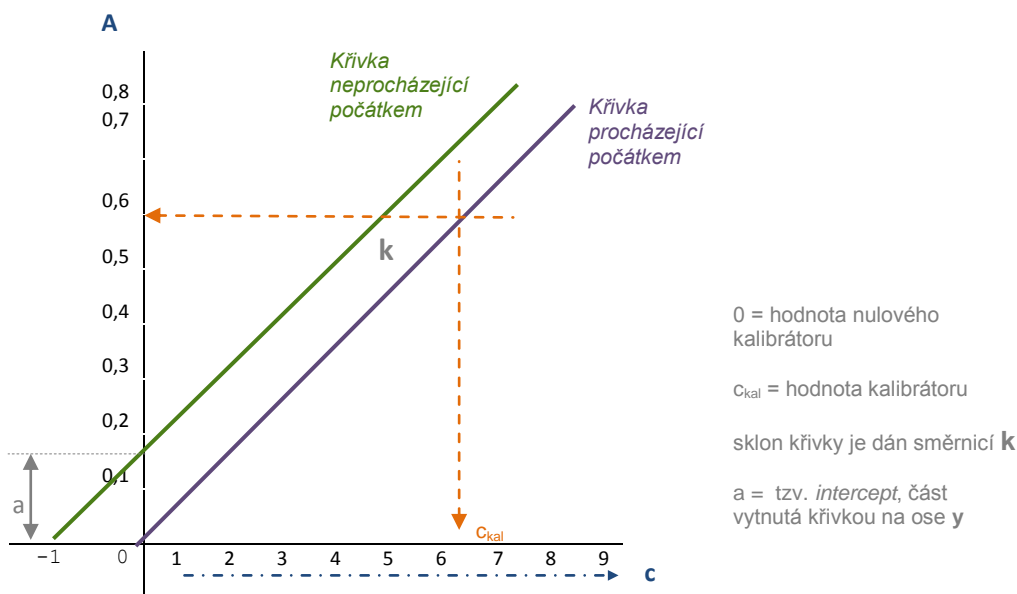
U *nelineárních závislostí* se obvykle používá standardní roztok (kalibrátor) o nulové hodnotě stanovovaného analytu a (minimálně) pět dalších standardních roztoků (kalibrátorů), s koncentracemi pokrývajícími pracovní rozsah.

<sup>1</sup> Z praktického hlediska je výhodné, shoduje-li se oblast linearit s pracovním rozsahem, ne vždy tomu tak však je.



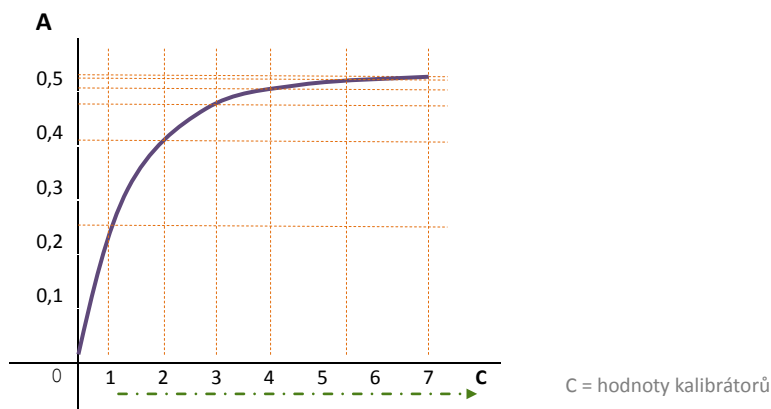
Jak u lineárních tak u nelineárních závislostí se každý standard (kalibrátor) při kalibraci měří 2 - 5x (u pěti standardních roztoků je to tedy až 25 měření). Konečný tvar kalibrační křivky u nelineárních závislostí je různý. Průběh může být polynomický, velmi často se provádí tzv. kubická neboli *spline* interpolace. (Na uvedeném odkazu je možno si „pohrát“ s šesticí naměřených bodů a intuitivně si ozřejmit o co se v principu jedná).

### Schematické znázornění lineárních kalibračních křivek procházejících i neprocházejících počátkem



Měřicí/pracovní rozsah u nelineárních kalibrací je obvykle vymezen hodnotami kalibrátorů s nejnižší a nejvyšší koncentrací analytu. Výsledky mimo tyto meze se uvádějí formou „výsledek < dolní limit“, případně „výsledek > horní limit“, pokud se u vysokých koncentrací původní vzorek (z nějakých důvodů) neředí nebo se ho neaplikuje menší množství. Konkrétní postup při kalibraci se ozřejmí v praktických cvičeních klinické biochemie.

### Obecný příklad průběhu nelineární kalibrační křivky



Nové kalibrace se provádějí vždy

- se zavedením metody
- po nasazení nových šarží činidel či kalibrátoru
- je-li v interní kontrole jakosti indikována systematická chyba
- po opravě, úpravě, preventivní prohlídce a kontrole měřicího přístroje
- v souladu s požadavkem výrobce diagnostické soupravy na frekvenci kalibrací

## Definitivní, referenční a rutinní metody měření

Základními zdroji správně určených hodnot jsou

- *definitivní a*
- *referenční metody měření.*

**Definitivní (primární, absolutní) metody měření** jsou vesměs buď časově a/nebo přístrojově, případně i finančně náročné metody, proto jsou určeny zejména pro stanovení správnosti jiných metod měření (referenčních a rutinních) a primárních referenčních materiálů (viz dále). V jiných případech to naopak mohou být metody principiálně velmi jednoduché a nenákladné, ale nevhodné např. pro sériovou práci (*gravimetrie*).

Definitivní metody

- vykazují nejvyšší metrologickou kvalitu
- jejich postup měření je zcela pochopen a je dokonale dokumentován
- mají přesně známou a dostatečně nízkou *nejistotu měření*
- jejich výsledky jsou vyjádřené v SI jednotkách
- jsou vysoce specifické

Tyto metody jsou prakticky nezávislé, jak na prostředí v němž se sledovaný analyt nachází (tj. na tzv. matici<sup>2)</sup>), tak na jiném standardu (tj. výsledek nezávisí na kalibrátoru/standardu, ale vyplývá z metody). Analýza materiálu primární (definitivní) metodou se provádí s úmyslem přiblížit se co nejtěsněji k „pravdivé hodnotě“.

<sup>2)</sup> **Příklad rozdílných matic:** stanovení Na<sup>+</sup> v séru – bílkovinná matrice, stanovení Na<sup>+</sup> v moči – matrice roztoku elektrolytu, čili krystaloidní

### Principy primárních/definitivních metod měření

- ID/MS resp. ID/GC/MS (tj. *izotopová diluce* čili *ředění/hmotnostní spektrometrie* resp. *izotopová diluce/plynová chromatografie/hmotnostní spektrometrie*)  
Při *izotopové diluci* kombinované s *hmotnostní spektrometrií* se ke stanovovanému analytu přidá izotop analytu nebo analyt značený stabilním izotopem (např. *deuteriem*) jako vnitřní standard; nechá se ustavit rovnováha mezi izotopy (případně značenou a neznačenou formou analytu) a pomocí hmotnostní spektrometrie se změří poměr izotopů (resp. *neznačený analyt/značený analyt*). Metoda je velmi přesná a nezávislá na matici.
- gravimetrie (vážení)
- volumetrie (odměrná analýza)
- *coulometrie*
- snížení bodu tání (*kryoskopie*)

**Referenční metody** se používají pro posouzení správnosti rutinních metod a certifikaci laboratoří a měřicích systémů.

Referenční metody

- mají dobře prozkoumaný a velmi podrobně popsany postup měření
- mají dokumentovanou, uvedenou a dostatečně nízkou nejistotu měření
- navazují na primární metody měření, nebo na primární referenční materiály (tzv. *návaznost* na primární metody či primární referenční materiály), jinými slovy, poskytují stejné nebo obdobné výsledky jako metody primární

Referenční metody jsou na rozdíl od primárních metod do jisté míry výsledkem shody (domluvy) odborníků a často představují *soudobý maximální standard kvality (state-of-the-art)*, tj. na úrovni doby, nejmodernější. Při jeho překonání vývojem, jsou nahrazeny metodami dokonalejšími. Primární metody jsou v podstatě referenční metody nejvyšší kvality. Primární a referenční metody vykazují oproti metodám rutinním především významně vyšší selektivitu.

**Rutinní metody** jsou metody užívané v běžném provozu v klinických laboratořích, mají návaznost na metody referenční. Některé rutinní metody mohou být metodami referenčními (např. hexokinázová metoda při stanovení glukózy, coulometrické titrace při stanovení chloridových aniontů).

Někdy se lze setkat i s pojmem **metody unifikované** [*unifikovaný = shodný, sjednocený, sourodý*], čímž se myslí metody, které byly doporučeny k všeobecnému používání; jsou to metody poskytující shodné výsledky v laboratořích, které je používají; všeobecný profit z používání unifikovaných metod je zřejmý. Vzájemné vztahy mezi definitivními, referenčními a rutinními metodami jsou uvedeny, spolu s kalibračními materiály, na schématu „Návaznost“ na straně 3-12.

## Referenční a kontrolní materiály

**Referenční materiál, RM (VIM3)**, materiál dostatečně homogenní a stabilní, s referencí ke specifikovaným vlastnostem, které byly stanoveny tak, že se hodí pro jejich zamýšlené použití při měření nebo při zkoumání jmenovitých vlastností.

**Poznámka:** referenční materiál zahrnuje materiály ztělesňující **veličiny** (lidská plazma bez přidělené hodnoty veličiny látkové koncentrace látkového množství cholesterolu, používaná jako kontrolní materiál preciznosti měření) stejně jako **jmenovité vlastnosti** (stupnice barev indikující jednu nebo více specifikovaných barev).

Referenční materiály jsou určeny pro kalibrace přístrojů nebo pro verifikaci (ověření) měřicí metody. V daném měření může být referenční materiál použit pouze buď pro kalibraci nebo k prokazování kvality

**Certifikovaný referenční materiál, CRM (VIM3)**, referenční materiál doprovázený dokumentem vydaným způsobilou osobou a poskytuje jednu nebo více specifikovaných hodnot vlastností s přidruženými nejistotami a návaznostmi s použitím platných postupů.

**Příkladem** mohou být komerční referenční materiály s přidělenými hodnotami koncentrací analytů a přidruženými nejistotami měření uvedenými v připojeném certifikátu a sloužící jako **kalibrátor**, nebo jako **kontrolní materiál** pravdivosti měření.

**Primární referenční materiály** – jsou validovány pomocí **definitivních** měřících metod (jsou vztaženy na pravdivé hodnoty).. Primární referenční materiály slouží k **vývoji a validaci referenčních měřících metod**.

**Sekundární referenční materiály** – slouží k **vývoji a přípravě kalibračních materiálů pro rutinní metody** a jsou zdrojem dat (hodnot) pro **kontrolní materiály**. Někteří autoři nehovoří o přípravě, ale uvádějí jako sekundární referenční materiál přímo **kalibrační a testovací materiál (CTM)**.

**Kontrolní materiály** – se používají ke **sledování (monitorování) rutinních metod**, tedy za účelem sledování jakosti (kontroly kvality, QC), nikoliv k účelům kalibrace.

**Metrologická návaznost, (metrological traceability) (VIM3)**, vlastnost výsledku měření, pomocí níž může být výsledek vztažen ke stanovené referenci přes dokumentovaný nepřerušovaný řetězec kalibrací, z nichž každá se podílí svým příspěvkem na stanovené nejistotě měření.

**Poznámka:** Místo pojmu **metrologická návaznost** se často používá jednodušší pojem **návaznost**.

(Metrologická) návaznost je nástroj pro zajištění správných výsledků a postup, který dává do vztahu naměřené hodnoty s hodnotami referenčního standardu. Je důležité, aby kalibrační materiály používané v laboratoři navazovaly na referenční materiály vyššího řádu, jak je zřejmé z grafu na následující straně.

**Referenci** pro tuto definici může být definice měřicí jednotky nebo postup měření.

K pochopení návaznosti asi nejlépe poslouží obrázek uvedený na následující straně: primární metodou je definován primární referenční materiál, na ten se nakalibruje referenční metoda, a ta je následně zdrojem hodnot sekundárního referenčního materiálu, který slouží ke kalibraci rutinních metod. Referenční metody spolu s referenčními materiály také poskytují data pro přípravu kontrolních materiálů pro vnitřní i vnější sledování jakosti/hodnocení kvality rutinních metod (viz dále). Útvar na obrázku vpravo svou různou šířkou nahoře a dole vyjadřuje nejistotu jednotlivých metod.

**Validace (VIM3), ověřování, že specifikované požadavky jsou přiměřené pro zamýšlené použití.**

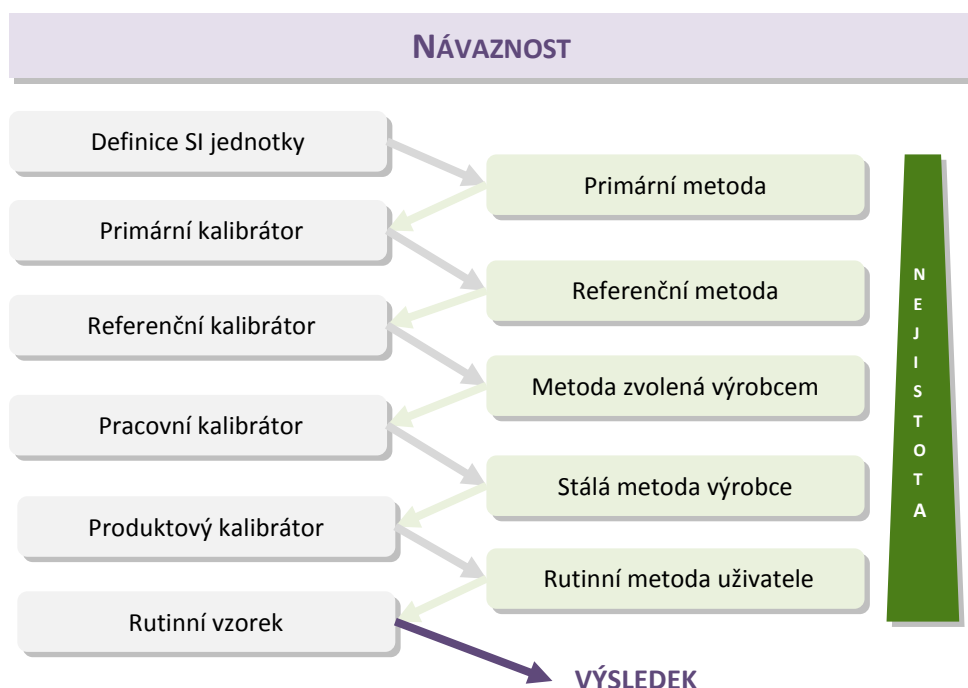
**Příklad:** postup měření běžně používaný pro měření hmotnostní koncentrace dusíku ve vodě, smí být také validován pro měření v lidské plazmě.

**Ověřování, (verifikace, VIM3) poskytnutí objektivního důkazu, že daná položka splňuje specifikované požadavky.**

**Příklad:** ověření, že pracovní postup (manuální, v analyzátoru) pro stanovení určitého analytu v lidském séru popsany výrobcem diagnostické soupravy platí také pro konkrétní podmínky konkrétní laboratoře.

Jedná se tedy v podstatě o (objektivní) potvrzení faktu, že daná metoda splňuje podmínky na ni kladené Např.:

- je použita správná analytická metoda měření
- je použit správný analytický postup měření
- jsou zabezpečeny takové podmínky v preanalytické fázi, že je dosahováno správných a přesných výsledků
- jsou použity vhodné a vyhovující přístroje
- je dostatečně správně ošetřena postanalytická fáze měření – vhodný počítačový program apod.)



Výsledky dosažené v různých laboratořích různými metodami by při zajištění metrologické návaznosti měly pro stejný analyt poskytovat stejné výsledky (i když, velmi pravděpodobně) s různými nejistotami.

### Chyby v analytické fázi

Při dodržování všech zásad správné laboratorní práce by nemělo docházet v podstatě k žádným chybám v laboratorní práci (proto byly zásady SLP ustanoveny). Někdy však nejsou tyto zásady doceněny, nebo nejsou dostatečně zřejmé, proto jsou dále uvedeny nejčastější zdroje chyb v analytické fázi měřicího procesu:

- nesprávné uchovávání reagensů (nevhodná teplota, světlo rozkládající světlocitlivé reagensie či analyty, prošlá doba expirace...)
- nesprávná příprava reagensů (špatné poměry ředění, nekvalitní destilovaná voda, záměna reagensů...)
- při manuální práci: nesprávné odměřování roztoků, špatná teplota vodní lázně, nesprávné časové intervaly, chyby ve výpočtech ...
- při práci na automatech: neznalost ovládání přístroje, chybné vkládání reagenčních souprav, nádobek s reagensy, nesprávné zadávání požadavků, chybné vložení vzorků, chybná kontrola (nesprávné či vadné kontrolní vzorky) ...
- špatně nastavená metoda (nevhodné chemické parametry...)
- nesprávné ředění (případně neředění) příliš koncentrovaných (aktivních) vzorků
- nesprávná funkce měřicího přístroje (zanedbání vnitřní kontroly jakosti)

Uvedené příčiny nesprávných výsledků měření, jsou zaviněny nesprávným postupem, čili skutečnou **chybou** obsluhy. Tato chyba se projeví na konkrétním výsledku či souboru výsledků. Při nápravě tato chyba zmizí nebo se alespoň zmenší. Je tedy vlastností výsledku nebo souboru výsledků. Chyby nelze zaměňovat za nejistoty výsledků měření.

### Automatizace a její role v klinické chemii

O úloze mechanizace a automatizace v klinických laboratořích byla již zmínka v kapitole věnované preanalytické a částečně i postanalytické fázi laboratorního diagnostického procesu. K těmto pojmům dlužno dodat ještě pojem další, *robotizace*, což je celosvětově užívané slovo původem od českého spisovatele Karla Čapka, který slovo „robot“ použil v roce 1920 ve svém románu R.U.R., a to již v názvu (*Rossum's Universal Robots*). Má význam „umělý člověk“ a v pojmu *robotizace* budeme hledat činnosti,

které kopírují a nahrazují činnost člověka. Příkladem z klinické laboratoře může být „ruka“ přenášející stojánky se zkumavkami z jednoho přístroje do druhého, vozík, který se sám naviguje a dorazí s nákladem na určené místo apod.

Automatizace laboratorních procesů zcela jistě zvýšila kvalitu laboratorní práce. Uvádí-li se, že chybovost lidské práce je asi 5%, pak zavedení automatů snižuje tuto chybovost desetkrát, na hodnotu 0,5%, a to je již významný posun. Proto byla do této kapitoly věnované analytické kvalitě zařazena i krátká zmínka o automatických systémech používaných v klinických laboratořích.

### Automatické analyzátory

První laboratorní pracoviště, která začala využívat automatické analyzátory, byla pracoviště klinické biochemie.

Umožnil to

- vznik nových analytických metod (bez agresivních činidel a postupů ztěžujících automatizaci, jako jsou var, deproteinace, centrifugace aj.)
- rozvoj výpočetní techniky a následně přístrojové techniky.

V současné době existují automaty i pro postupy, o nichž se nepředpokládalo, že jsou automatizace schopné: elektroforéza, heterogenní imunoanalýza, močová analýza pomocí diagnostických proužků, močový sediment, krevní nátěry a mikroskopie diferencíálu bílé řady apod.

**Automaty** jsou přístroje pracující samostatně, autonomně [automatos, ř. = z vlastního podnětu]. Jsou to přístroje opatřené zpětnou vazbou, která ovlivňuje vstup. Jsou tedy schopny regulace a samostatné, čili autonomní práce. Rozvoj automatů byl umožněn rozvojem techniky a počítačové vědy. Automaty ve formě automatických (chemických) analyzátorů vstoupily do našich laboratoří v osmdesátých letech minulého století (v ostatní Evropě v letech sedmdesátých, počátky jsou na konci padesátých let), masivního rozšíření se dočkaly počátkem devadesátých let. Rozvoj v tomto oboru stále pokračuje a přístroje tohoto typu zastarávají relativně rychle (i když jsou použitelné poměrně dlouhou dobu – kolem 10 let).

### Rozdělení automatických analyzátorů

#### Přehled rozdělení automatických analyzátorů

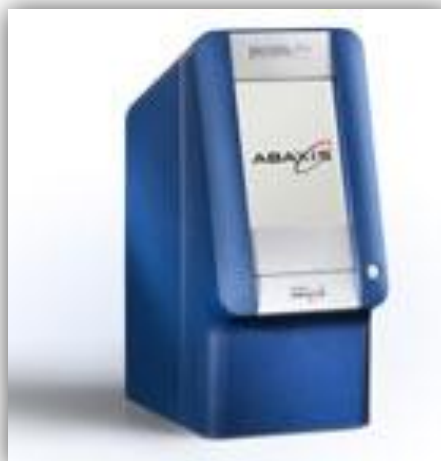
(Dělení převzato z J.Racek a kol.: *Klinická biochemie*)

Princip dělení	Typ analyzátoru	Princip dělení	Typ analyzátoru
<b>Způsob práce</b>	centrifugální	<b>Velikost a rychlost analyzátoru</b>	malé
	průtokové (kontinuální)		střední
	diskrétní		velké
<b>Princip měření</b>	optické systémy	<b>Pořadí prováděných testů</b>	batch mode
	elektrochemické systémy		random access
	kombinované systémy	<b>Prostředí v němž probíhá reakce</b>	roztok („mokré“ analyzátory)
<b>Počet prováděných metod</b>	jednouúčelové		„suchá chemie“
	pro několik vybraných metod	<b>Zařazení v diagnostickém procesu</b>	centrální
	mnohouúčelové		bed-side
	kombinované		

## Dělení podle způsobu práce

- **centrifugální**

„Boom“ těchto přístrojů zdánlivě pominul. Vznikly z potřeb kosmického výzkumu – gravitační pole je vytvářeno centrifugální silou, rotací. V těchto přístrojích tvoří pracovní prostor, „kyveta“, ve kterém probíhá reakce, součást rotoru/disku. Kyveta se skládá z několika navzájem spojených částí, do kterých se pipetuje vzorek a jedna případně dvě reagensie. Ke vzájemnému spojení roztoků a promíchání dochází po roztočení rotoru/disku odstředivou silou. Svou roli hrají i síly kapilární. Světelný paprsek fotometru prochází kyvetou zezdola nahoru, či opačně. Vlastní měření je velmi rychlé, nicméně je možno provádět vždy jen jeden typ reakcí (např. stanovit ALT, močovinu nebo glukosu apod.), tj. přístroj pracuje „po metodách“ (*batch mode*). Pokusem o robotizovaný centrifugální analyzátor byl přístroj MONARCH fy *IL Instruments*, který používal rotory na jedno použití, využíval robotické prvky a díky propracovanému softwaru bylo možno stanovit několik analytů vedle sebe (odložení rotoru na inkubační místo a práce s druhým rotorem, poté návrat k práci s původním rotorem atd.). Pokus však nebyl příliš úspěšný. V současné době dochází k oživení centrifugálního principu zejména v malých přístrojích typu POCT, pro humánní i veterinární medicínu. Příkladem může být malý chemický analyzátor *Piccolo Express* od firmy *ABAXIS*, který má k dispozici několik specifických disků – panelů *de facto* souborů, čili lze stanovit několik parametrů současně (nikoliv ovšem jednotlivý parametr). *BioChemistry Panel Plus* panel zmiňovaného přístroje umožňuje současné stanovení albuminu, alkalické fosfatázy, alaninaminotransferázy, amylázy, aspartátaminotransferázy, močoviny, kalcia, kreatininu, C-reaktivního proteinu, gamaglutamyltransferázy, glukosy, celkové bílkoviny a kyseliny močové, tedy celkem 13 parametrů.



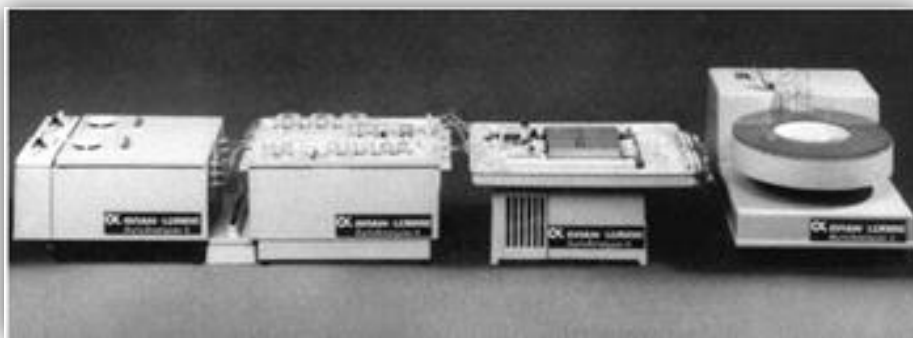
Piccolo Express



Piccolo Express – rotor/disk

- **průtokové (kontinuální)**

V těchto analyzátoch procházel vzorek a reagensie systémem hadiček, vzájemně odděleny vzduchovou bublinou. Na vhodném místě došlo k promíchání vzorku a reagensií (oddělily se vzduchové bubliny a reagensie se vzorkem prošly spirálově stočenou hadičkou), ve vyhřívané oblasti k inkubaci (průběh vlastní reakce) a fotometrii v průtokové kyvetě. Metoda analýzy se nazývá *kontinuální průtoková analýza (CFA)*, případně *segmentovaná průtoková analýza (segmented flow analysis, SFA)*. Zdokonalený způsob se nazývá *FIA*, průtoková injekční analýza (*flow injection analysis*), která je obdobná *SFA*, ale do systému není zaváděn vzduch. Příkladem (*SFA*) jsou přístroje firmy *Technicon Corporation*. Přístroj této firmy *AutoAnalyzer II* byl prvním automatickým analyzátozem, který byl použit v klinických analýzách, a to již v roce 1957 a zcela změnil dosavadní charakter práce. (Firma *Technicon* prodala v roce 1980 tuto část své činnosti firmě *Revlon*, která o sedm let později učinila totéž a prodala firmu společnosti *Bayer*. Vlastníkem této části *Bayeru* je v současnosti firma *Siemens*).



Technicon AutoAnalyzer II (AAII)

Uveden firmou *Technicon*® v roce 1972, dosud po celém světě pracují stovky těchto přístrojů, mnoho z nich ještě s logem firmy *Technicon*®

- diskrétní**  
 Zde dochází k oddělenému (čili *diskrétnímu*) pipetování vzorku a reagensů do reakčních nádobek (kyvet), k promíchání míchadlem a následné (po určité inkubační době) fotometrii. Kyvety jsou buď k jednorázovému použití a musí se proto do přístroje stále doplňovat, nebo je přístroj vybaven mycí stanicí, kyvety jsou promývány a opakovaně používány. Jsou to nejrozšířenější analyzátoři a příkladem jsou např. analyzátoři firmy *Hitachi* (704, 717, 917, MODULAR), *Olympus* (AU 400, AU 640, AU 2700, AU 5400), *Abbott* (AEROSET, ARCHITECT) aj. Analyzátoři *Dade Behring Dimension*<sup>®</sup> používají plastické kyvety na jedno použití, které si analyzátoři vytváří sám ze speciální fólie; po zatavení slouží současně jako snadno skladovatelný, přepravovatelný a spalitelný sáček s odpadem.



ABBOTT Architect c4000

Měřicí kyvety analyzátorů  
Dade Behring Dimension<sup>®</sup>

### Dělení podle principu měření

- optické systémy**  
 Jsou nejčastější. Principem je klasická fotometrie v UV/VIS oblasti, umožňující i turbidimetrická měření. Moderní analyzátoři většinou mají možnost pracovat současně s minimálně dvěma vlnovými délkami (*bichromatické měření*), což zpřesňuje analýzy
- elektrochemické systémy**  
 Mají za princip *potenciometrii*, *amperometrii*, *konduktometrii* apod. Tyto systémy umožňují pracovat bez ohledu na optické vlastnosti vzorku (hemolýza, zákal), tedy i v plné krvi. Na elektrochemických principech pracují analyzátoři na stanovení pH a parciálního tlaku krevních plynů (AB rovnováha), ale také stále častěji ke stanovení koncentrace iontů ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) a ionizovaných frakcí ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), prostřednictvím tzv. *iontově selektivních elektrod* (ISE). ISE s imobilizovaným enzymem v membráně tvoří tzv. *enzymovou elektrodu*, vhodnou ke stanovení různých substrátů (glukosa – viz kapitola 7. Glukosa, laktát, močovina, kreatinin). Tyto elektrody bývají ve velmi rychlých statimových analyzátořích (pro omezený počet základních analýz). Analyzátoři tohoto typu provede základní vyšetření z několika kapek krve během několika desítek sekund (většinou do minuty)
- kombinované systémy**  
 Jsou velmi časté – např. většina moderních analyzátořů pracujících na optickém principu obsahuje tzv. ISE-modul pro stanovení iontů na elektrochemickém principu.
- integrované systémy**  
 Kombinace biochemického a imunochemického analyzátoři.

Vitros<sup>®</sup> 5600 Integrovaný systém

### Dělení podle počtu prováděných metod

- jednoúčelové**  
 Provádějí jednu, vysoce frekventní metodu – typickým příkladem jsou *glukózové analyzátoři*
- pro několik vybraných metod**  
 Provádějí několik společně požadovaných metod: např. acidobazické analyzátoři, analyzátoři iontů, kombinace acidobazických analyzátořů s iontovým modulem, analyzátoři pro současné stanovení glukosy, močoviny, kreatininu apod.
- mnohoúčelové**  
 Selektivní výběr metod z nabídky několika desítek metod, často lze volit i druh analýz (biochemické analýzy, analýzy lékových hladin, imunochemické analýzy apod.)

BIOSEN C-line Clinic  
Analyzátoři glukózy a laktátu  
firma EKF Diagnostics

- **kombinované**  
Kombinované analytické systémy složené z několika výše uvedených přístrojů, řízené počítačem z jednoho centra (např. dva analyzátoři s výkonem 1000t/hod poskytují kombinovaný systém s výkonem 2000 t/hod.).

#### Dělení podle velikosti a rychlosti analyzátoru

- *malé*: zpracovávají do 300 testů/analýz za hodinu
- *střední*: zpracovávají zhruba 400 – 800 testů/h
- *velké*: zpracovávají nad 1000 testů/h, někdy 2 i 3 testů za hodinu, případně i více  
Toto dělení je ovšem individuální a pouze přibližné

#### Dělení podle pořadí prováděných testů

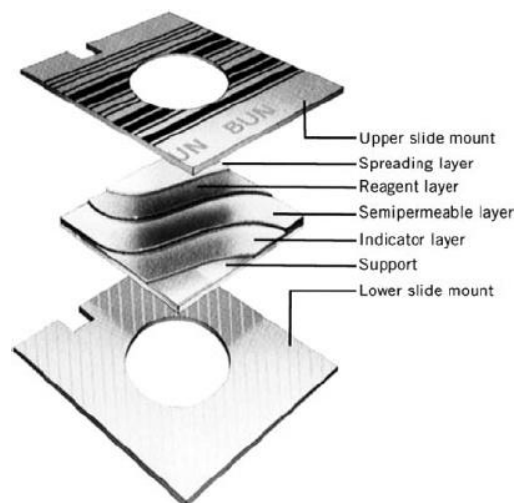
- **pracující podle metod**  
Tzv. „batch mode“ analyzátoři. Typickým příkladem jsou centrifugální (ale i jiné) analyzátoři. U všech vzorků se nejprve zpracuje jeden typ analýzy, pak druhý atd. U těchto přístrojů je předpokladem tzv. *uzavřený příjem materiálu* a jsou problémy např. se statimovými vzorky
- **pracující „po pacientech“**  
Tzv. „random access“ analyzátoři, čili analyzátoři *s náhodným přístupem*. Analyzátor provádí všechny analýzy postupně pro jednotlivé pacienty, jak byly zadány požadavky (např. pro pacienta č. 1 – ALT, AST, BIL, GLUK, pro pacienta č. 2 – močovinu, kreatinin, kyselinu močovou atd.). Nejrozšířenější typ analyzátorů

#### Dělení podle prostředí v němž probíhá reakce

- **roztok**  
Převážná většina analyzátorů pracuje s roztoky reagensů, tj. reagenty jsou buď přímo od výrobce v kapalně formě, nebo se, např. z práškových či lyofilizovaných chemikálií, roztoky připraví rozpouštěním destilovanou vodou
- **„suchá chemie“ (dry chemistry)**  
Tento typ přístrojů využívá chemikálie imobilizované ve vrstvě celulózy želatiny, kde po zvlhčení (vzorkem) dojde k vývinu zbarvení, které je možno měřit reflexní (tj. odraznou – paprsek zbarvením neprochází, ale odráží se) fotometrií. Typickým příkladem jsou reagenční proužky pro analýzu moči. Existují však i diagnostické proužky pro stanovení celé řady analytů v plné krvi pacienta (pracuje s nimi např. přístroj REFLOTRON fy *Roche Diagnostics*). Firma *Kodak* vyvinula řadu vícevrstevných filmů určených pro klinicko-biochemické analýzy v séru; jednotlivé vrstvy slouží k separaci, reakcím pomocným i konečné reakci s vývinem zbarvení. Tyto filmy se používají v analyzátořích EKTACHEM, které tvoří celou výkonnostní řadu od malých po velké přístroje. Práce s těmito analyzátoři je velmi „čistá“, s malým snadno spalitelným odpadem, je však dražší a filmy jsou vyvinuty pro omezený, i když široký, okruh analýz

#### Slovníček pojmů k obrázku:

Mount	podložka, podpora, držák
Upper	horní
Lower	dolní
Slide	film, slide
Layer	vrstva
Spreading	roznášecí, rozdělující
Reagent	reagenční
Semipermeable	polopropustná
Indicator	indikační
Support	podpora, opora



Ilustrativní ukázka konstrukce vícevrstvého filmu (slide) fy Kodak



## Dělení podle zařazení v diagnostickém procesu

### Analyzátory

- **centrální**  
Analyzátor umístěný v centrální laboratoři a provádějící podstatnou část rutinních (případně i speciálních) analýz požadovaných po laboratoři
- **u lůžka pacienta**  
Menší analyzátory jednoúčelové, či s omezeným spektrem metod, na principu suché chemie nebo na elektrochemických principech umožňující tzv. *bed-side diagnostics* (diagnózu u lůžka pacienta), *point-of-care testing* (testování, vyšetřování v laboratorních koutech), *near-patient testing* (testování, vyšetřování v blízkosti pacienta)

*Poznámka: Mezi výkonnostními parametry analyzátoru je někdy uváděn i parametr WALKAWAY, což je doba, za kterou přístroj provede maximálně možný počet analýz bez zásahu obsluhy (tj. přístroj se maximálně naplní, zadá se maximální počet požadavků a obsluha může "walkaway" – odejít, a vrátit se až po této době, kdy budou analýzy provedeny. Pak může doplnit reagentie... atd.).*



Reflotron Plus®  
Přenosný analyzátor určený do  
ambulancí praktických lékařů,  
případně k lůžku pacienta  
Fa ROCHE s.r.o.

## Některé vybrané analyzátoři

Zde jsou na obrázcích ukázány některé (namátkou) vybrané analyzátoři



Beckman-Coulter (Olympus) AU480



Olympus AU5400  
Dva analyzátoři AU2700 tvořící vysoce výkonný kombinovaný systém

Biochemické analyzátoři ADVIA 1600 (Siemens) a Vitros 5,1 FS (Ortho-Clinical Diagnostics a Johnson-Johnson company)



ADVIA 1600, výkonný automatický analyzátoři firmy Bayer (dnes Siemens) poměrně hojně rozšířený v ČR



VITROS představuje kombinaci „mokré“ a „suché“ chemie. Základem je původní EktaChem doplněný o mokrou chemii v „mikro“ provedení (malé nádobky, malé objemy)

Kombinované analyzátoři Architect ci8200 (Abbott) vlevo a Dimension® RxL (Dade Behring) vpravo



Dva spojené analyzátoři – biochemický a imunochemický; díky patentovanému mytí dávkovačů lze pracovat s primární zkumavkou bez tvorby alikvotů



Biochemický analyzátoři s heterogenním modulem pro imunoanalýzu.

Modulární analytický systém cobas® 6000 a Cobas (vlevo) a stolní imunochemický analyzátor Cobas e411 (Roche)



Stolní imunochemický analyzátor Elecsys® 2010 a modulární imunochemický analyzátor Modular® E170 (Roche)



Biochemické analyzátoři firmy Beckman-Coulter



Představitel analyzátoři řady UniCel® DxC



Synchron LX systém



Synchron CX systém

Analýzátoři firmy Siemens



Dimension Vista 1500 Intelligent Lab System  
v sobě skrývá 4 technologie  
(ISE, fotometrie, nefelometrie, imunochemie)



Přístroje na bázi proteinové biočipové technologie firmy Randox:  
vlevo Evidence<sup>®</sup> Investigator (poloautomat) a vpravo automatický analyzátor Evidence<sup>®</sup>

Podrobnosti o analyzátoru **Evidence<sup>®</sup> Investigator** lze nalézt na odkazu:

<http://www.randox.com/Evidence%20Investigator.php>, kde si lze stáhnout i brožuru o biočipové technologii použité v tomto přístroji.

Podrobnosti včetně videa k analyzátoru **Evidence<sup>®</sup>**: <http://www.selectscience.net/suppliers/randox-laboratories-ltd/?complD=7614&u=62E1AFE0-3EB2-46A2-852F-E564D43E7F2E>

A k analyzátoru Evidence Evolution:

<http://www.selectscience.net/products/evidence-evolution/?prodID=86723&u=62E1AFE0-3EB2-46A2-852F-E564D43E7F2E&techBID=116>

**Evolution** je celosvětově první plně automatický imunochemický systém typu random access na platformě biočipové technologie. Systém je schopen provést 2940 testů za hodinu, pracovat v modu *batch* i *true random access* a okamžitý STAT. Systém je napojitelný na perianalytický modul s radiofrekvenční identifikací vzorků. O moderních přístrojích s čipovými technologiemi je pojednáno v kreditním kurzu věnovaném bílkovinám a v kreditním kurzu věnovaném nukleovým kyselinám.



Evidence Evolution

**První plně automatizovaná laboratorní linka Power Procesor Beckman-Coulter v Čechách, v klinických laboratořích KlinLab s.r.o. v Praze (Immunotech a.s.)**

Nejedná se o úplnou automatizaci ve smyslu robotizace, ale vysoký stupeň automatizace je z obrázků patrný.

Realizace linky: firma Immunotech a.s.



## Dodatek

### Některé další pojmy a definice z metrologie

**Hodnotou veličiny (VIM3)** se rozumí číslo a reference, které společně vyjadřují velikost veličiny.

**Příklady:** délka tyče 1,25 m, resp. 125 cm; hmotnost objektu 0,534 kg, resp. 534 g; teplota daného vzorku +18 °C.

**Číselná hodnota veličiny (VIM3)**, číslo ve vyjádření hodnoty veličiny kromě jakéhokoliv čísla sloužícího jako reference.

**Příklady:** ve výše uvedených příkladech hodnot veličiny, jsou číselnými hodnotami veličiny čísla 1,25/125; 0,534/534, 18. Je zřejmé, že číselná hodnota veličiny v daných příkladech závisí na měřicí jednotce.

**Referenční hodnota (veličiny) (VIM3):** hodnota veličiny používaná jako základ pro porovnání s hodnotami veličin stejného druhu.

**Poznámka:** Referenční hodnotou veličiny může být pravá hodnota veličiny měřené veličiny, nebo konvenční hodnota veličiny. Referenční hodnota veličiny s přidruženou nejistotou měření je obvykle poskytována s referencí k materiálu, např. certifikovanému referenčnímu materiálu, k zařízení, např. stabilizovanému laseru, k referenčnímu postupu měření, k porovnávání etalony (standards).

**Odvozená veličina (VIM3)** je veličina v soustavě veličin definovaná pomocí základních veličin této soustavy.

**Příklad:** V soustavě veličin, která má za základní veličiny délku a hmotnost, je **hustota** odvozenou veličinou definovanou jako podíl hmotnosti a objemu (což je třetí mocnina délky).

**Další odvozené veličiny:** Plošný obsah, objem, rychlost, hustota, poměrná hustota, síla, tíha, práce, energie, výkon, dynamická viskozita, povrchové napětí, tlak, kmitočet, frekvence otáčení (otáčky), vlnová délka, Avogadrova konstanta, molární zlomek, molalita, elektrický náboj, elektrický potenciál, kapacita, hustota elektrického proudu, odpor (rezistance), elektrická vodivost, aktivita, poločas (přeměny), ozáření.

**Odvozená jednotka (VIM3)**, měřicí jednotka pro odvozenou veličinu (viz).

**Příklad:** Kilometr za hodinu, značka km/h je odvozenou měřicí jednotkou rychlosti, ale mimo SI (nicméně jej přijatá pro použití s SI). Tzv. koherentní odvozenou jednotkou rychlosti v soustavě SI je metr za sekundu (m/s). Mol na metr krychlový ( $\text{mol}/\text{m}^3$  resp.  $\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$ ) je koherentní odvozená jednotka látkové koncentrace.

**Základní jednotka (VIM3)**, měřicí jednotka, která je přijata konvencí pro základní veličinu. V každé koherentní (tj. souvislé, systémové, soudržné, logické) soustavě jednotek (takovou je např. Mezinárodní soustava jednotek SI) existuje pro každou základní veličinu pouze jedna základní jednotka.

**Soustava jednotek (VIM3)**, soubor základních jednotek a odvozených jednotek, společně s jejich násobky a díly, stanovený v souladu s danými pravidly pro danou soustavu veličin.

Koherentní soustava jednotek je soustava jednotek založená na dané soustavě veličin, ve které měřicí jednotka pro každou odvozenou veličinu je koherentní odvozenou jednotkou.

[koherentní = souvislé, systémové, logické]

**Příklad:** Soustava koherentních jednotek SI a vztahů mezi nimi. Uvědomme si, že SI neplatí až tak dlouho. Ti starší z nás se učili jinou koherentní soustavu jednotek, a to CGS, tj. „centimetr, gram, sekunda“, kde základní jednotky jsou zřejmé z názvu soustavy.

**Limit of detection –  $L_D$ , (VIM3)**, naměřená hodnota veličiny získaná daným postupem měření, pro kterou je pravděpodobnost nepravdivého tvrzení o nepřítomnosti složky v materiálu  $\beta$ , přičemž pravděpodobnost nepravdivého tvrzení o její přítomnosti je  $\alpha$ .

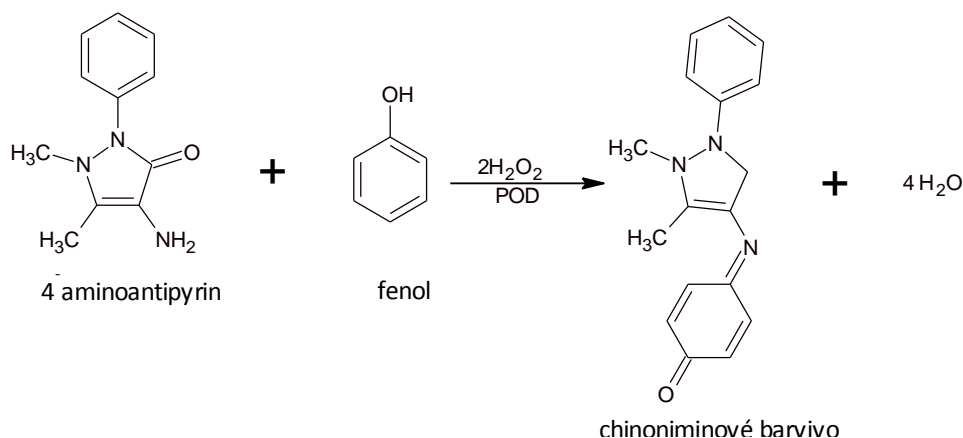
**Poznámka:** IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry, Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii) doporučuje implicitní hodnoty pro  $\alpha$  a  $\beta$  rovné **0,05**. Odtud plyne přibližný výklad výše uvedené definice, že mez detekce je takové množství analytu, které zajišťuje, že chybná interpretace výsledku bude 5%: 5% bude pravděpodobnost, že toto množství ve vzorku nebude rozpoznáno, 5% bude pravděpodobnost, že toto množství bude detekováno jako přítomné ve vzorku, i když analyt ve vzorku přítomen nebude. Jinými slovy, při tomto množství analytu je 95% pravděpodobnost (= téměř jistota), že výsledek bude správně interpretován – přítomnost i nepřítomnost analytu budou (spolehlivě) rozpoznány. (**implicitní** = zahrnutý, obsažený, ale nevyjádřený přímo)

## Specifické analytické reakce v klinické biochemii

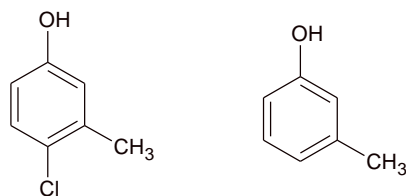
V klinické biochemii se můžeme setkat s analytickými reakcemi různých typů, nicméně dvě z nich zaujímají svým způsobem významné postavení. Jsou to **modifikovaná Trinderova reakce** a **optický** či **UV test**.

### Modifikovaná Trinderova reakce

V roce 1940 popsal *Emerson* vysoce citlivou barevnou reakci fenolů s 4-aminoantipyrinem v přítomnosti oxidačního činidla, jejímž výsledkem jsou chinoniminová barviva. Jedná se zde o spojení (kopulaci) dvou činidel za oxidačních podmínek, proto se tento typ reakce obecně nazývá *oxidační kopulace*. V roce 1969 *Trinder* použil tuto reakci v uspořádání, ve kterém jako oxidační činidlo využil peroxid vodíku rozložený peroxidázou. Tato *Trinderova reakce* bývá často, vzhledem k výše uvedené skutečnosti, nazývána *Emerson-Trinderovou reakcí*. Reakce se stala předmětem bádání za účelem zlepšení jejích analytických vlastností. Při této činnosti se došlo k závěru, že místo prostého fenolu, je lépe použít fenol substituovaný, např. 4-chlor-3-methyl-fenol. Uspořádání se substituovanými fenoly pak nesou název *modifikovaná Trinderova reakce*.



Na schématu je „klasická“ Trinderova reakce. Modifikovaná Trinderova reakce by obsahovala místo fenolu např. již zmíněný 4-chlor-3-methyl fenol nebo 3-methylfenol (jak je tomu v případě reagentů fy Erba Lachema) apod.



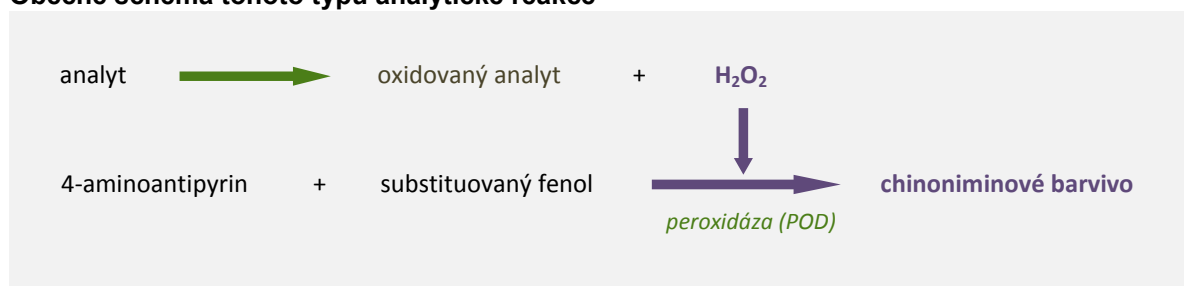
4-chlor-3-methyl-fenol

3-methyl-fenol

Při stanovení konkrétního analytu (glukosa, cholesterol...) předchází Trinderově reakci oxidace tohoto analytu za tvorby jeho oxidované formy a peroxidu vodíku a *Trinderova reakce tak slouží v podstatě ke stanovení H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*.

V případě cholesterolu je to ještě o něco složitější, protože prvním z reakčních sledů je hydrolýza esterů cholesterolu, které tvoří převažující formu výskytu tohoto analytu v séru/plazmě/krví a jako takové by oxidovat nešly, protože oxidovatelná OH- skupina cholesterolu je vázána právě v esteru. Jakékoli vedlejší/soutěživé reakce odčerpávající peroxid vodíku snižují výtěžnost (Trinderovy) reakce a poskytují falešně nižší výsledky (např. reakce s kyselinou askorbovou a některými léčivými).

### Obecné schéma tohoto typu analytické reakce



## Využití

### Stanovení

- glukózy (metoda GOD/POD) – kapitola 7, str. 7-2
- kreatininu (enzymové stanovení, barevný test) – kapitola 7, str. 7-10
- kyseliny močové (enzymové metody) – kapitola 7, str. 7-15
- cholesterolu (enzymové metody) – kapitola 11, str. 11-13
- triacylglycerolů (enzymové metody) – kapitola 11, str. 11-16.

### Optický/UV test

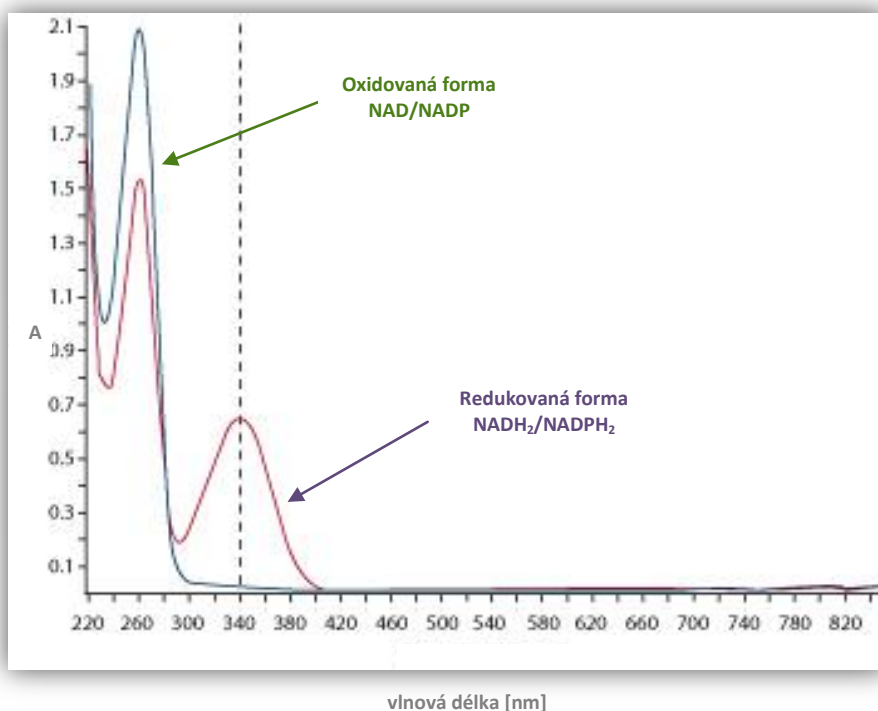
Tento typ analytické reakce využívá skutečnosti, že redukovaná forma NAD/NADP má jiné fyzikálně-chemické vlastnosti než forma oxidovaná. Chemicky správné zápisy těchto dvou nukleotidů vypadají takto:

Oxidovaná forma	Redukovaná forma
$\text{NAD}^+$	$\text{NADH} + \text{H}^+$
$\text{NADP}^+$	$\text{NADPH} + \text{H}^+$

Pro stručnost bývá někdy formálně správný, ale poněkud zdoluhavý zápis redukované formy nahrazován méně správným, zato však rychlejším (a možná i přehlednějším) zápisem  $\text{NADH}_2/\text{NADPH}_2$  (někdy i pouze  $\text{NADH}/\text{NADPH}$ ) a zkratky názvů oxidovaných forem se často píšou bez kladného znaménka.

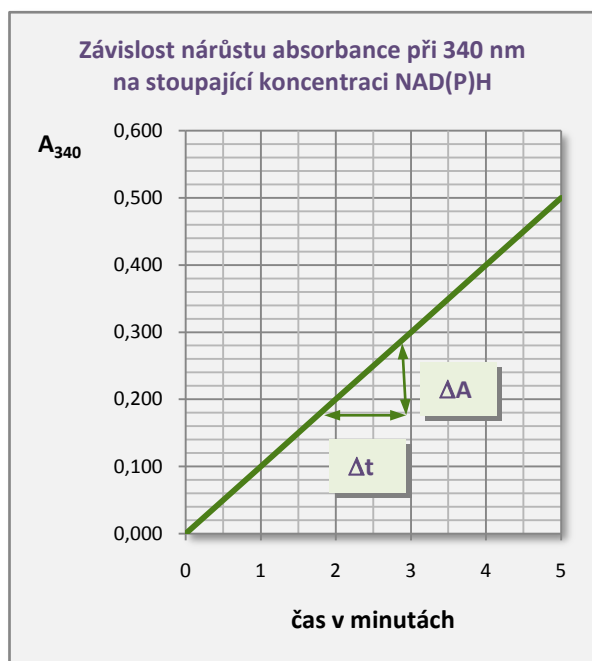
Redukované formy, na rozdíl od forem oxidovaných, absorbují záření o vlnové délce 340 nm, absorpční křivky těchto forem tedy budou mít rozdílný průběh:

#### Průběh absorpční křivky dvou forem NAD/NADP



Lze si představit, že při přeměně  $\text{NAD(P)}$  na  $\text{NAD(P)H}_2$  v kyvetě, kterou bude procházet záření o vlnové délce 340 nm, bude na výstupu pozorovatelný nárůst absorpance.

Při přeměně  $\text{NAD(P)H}_2$  na  $\text{NAD(P)}$  tomu bude opačně.



Lze měřit rychlost průběhu reakce, tj. změnu absorpance za časovou jednotku, čili poměr  $\Delta A/\Delta t$ , přesněji  $\Delta A/1 \text{ min}$ .

Většinou se měří změna absorpance za 3 minuty a dělí se třemi (při manuálním provedení) nebo se nastaví vhodný čas, resp. počet měřicích bodů v automatickém analyzátoru. Zde záleží na možnostech analyzátoru.

Při opačném průběhu reakce má graf opačný průběh (křivka směřuje dolů), princip měření však zůstává zachován.

Podrobnosti jsou uvedeny dále v textu.

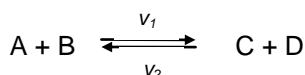
Využití tohoto typu reakce je značné, jak vysvitne z dalších částí tohoto učebního textu.

## Průběhy analytických reakcí

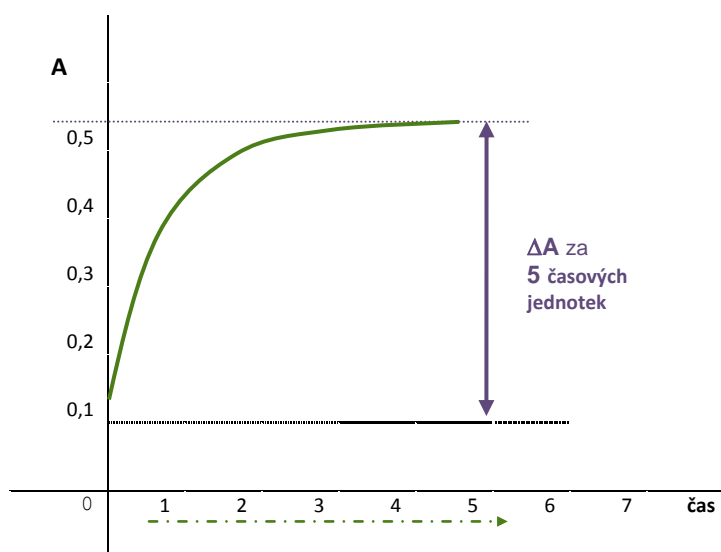
V této části textu jsou uvedeny nejobvyklejší způsoby vyhodnocování průběhu chemických reakcí a zjišťování výsledku v laboratořích klinické biochemie. Na dále uvedených grafech jsou uváděny reakční koordináty, tj. průběh závislosti signálu/indikace (nejčastěji absorpance) na čase a způsoby vyhodnocení.

### End point

Reakce dosáhne po určité době koncového bodu (*end point*), kdy rychlost přeměny výchozích složek na produkty rovná se přeměně produktů na výchozí složky. V obecném schématu reakce se rychlosti  $v_1$  a  $v_2$  sobě rovnají:  $v_1 = v_2$ .



Měří-li se absorpance vznikajícího produktu (většina případů), pak od okamžiku vyrovnání rychlostí se její hodnota nemění. Měří se hodnota absorpance dosažená v tomto koncovém bodu. „Přetažení“ doby inkubace není rozhodující, pokud výsledný produkt je stabilní.



Obrázek ukazuje jak může například vypadat průběh závislosti absorpance na čase v případě reakce *end point*.

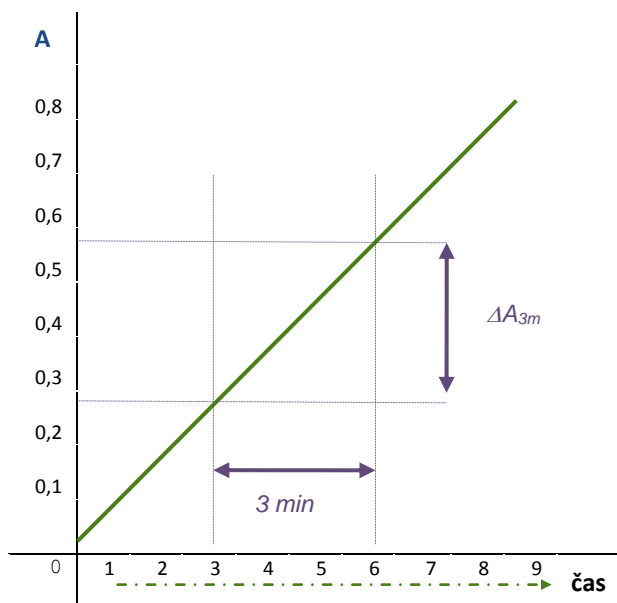
**Poznámka:** při kalibraci se vynášejí na osu  $x$  hodnoty koncentrací analytu v kalibračních roztocích a na osy  $y$  hodnoty absorpance naměřené pro tyto jednotlivé koncentrace.

V pracovním návodu pro tuto metodu bude uvedena, jak vyplývá z obrázku, např. tato formulace: „Inkubujte 5 minut a změřte absorpanci roztoku při xxx nm“.



### Kinetické měření

Reakce probíhá tak rychle, že je možno za časovou jednotku, nejčastěji 1 minutu, zaznamenat zřetelný nárůst či pokles absorpance. V anglosaské literatuře se nazývá tento způsob měření *rate* (rychlost, ev. poměr). V grafickém znázornění vypadá princip měření takto:



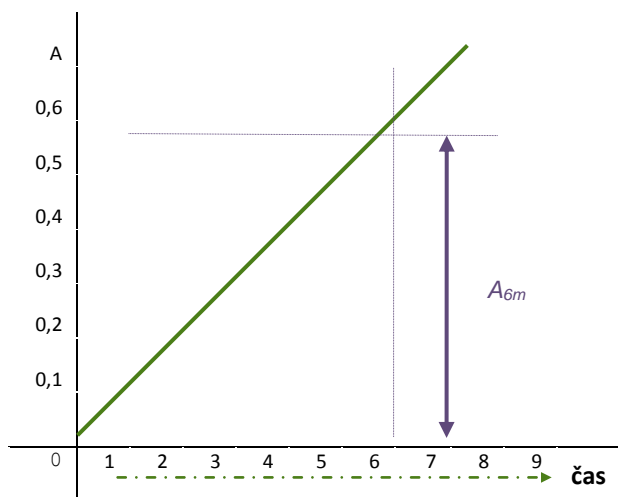
Na obrázku je znázorněno měření změny absorpance ( $\Delta A$ ) v daném případě za 3 minuty. Výsledek změny absorpance se převede na změnu za jednu minutu vydělením naměřené změny absorpance třemi:

$$\Delta A = \Delta A_{3m}/3$$

Podmínkou pro tento způsob měření je lineární průběh závislosti absorpance na čase. U kinetických měření enzymových se toleruje maximálně 15% odchylka od linearity průběhu.

**Poznámka:** při kalibraci se vynášejí na osu *x* hodnoty koncentrací analytu v kalibračních roztocích a na osy *y* hodnoty  $\Delta A_{min}$  naměřené pro tyto jednotlivé koncentrace.

### Měření v konstantním čase



Pokud by se tento typ měření prováděl manuálně, bylo by třeba reakci v konkrétním čase (na obrázku v bodě „6“) zastavit inhibitorem reakce.

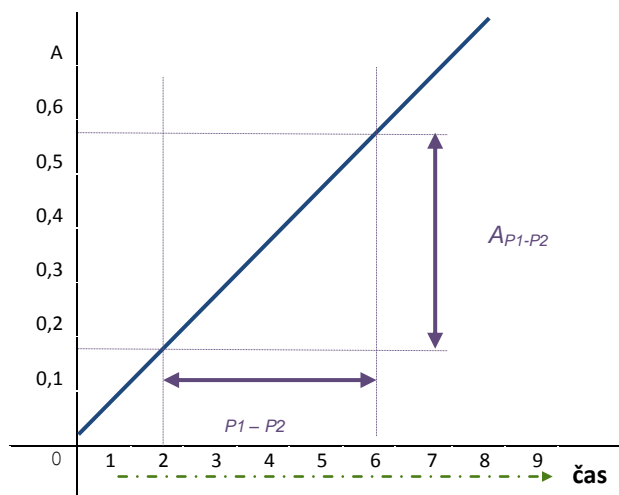
Analýzátor dokáže v předepsaném čase přesně odečíst hodnoty absorpance, reakce se nezastavuje.

**Poznámka:** při kalibraci metody se na osu *x* vynášejí hodnoty koncentrace kalibračních roztoků a na osu *y* naměřené hodnoty absorpance (v daném příkladu  $A_{6m}$ ) pro tyto koncentrace

Měří se absorpance dosažená po určité době. „Přetažení“ inkubační doby by vedlo k falešně pozitivním výsledkům, je tedy třeba přesně dodržet inkubační čas. Toho se často dosahuje i pomocí zastavení reakce v konkrétním čase inhibitorem. Při analýze na automatickém analyzátoru není třeba reakci zastavovat, analyzátor přesně měří časové intervaly.

## Dvoubodové měření

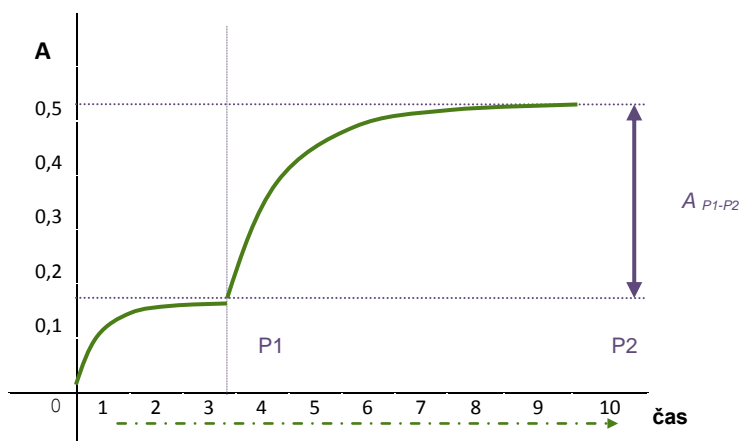
Dvoubodové měření (v anglosaské literatuře *two point, 2P*) je obdobou měření v konstantním čase. Měření nezačíná však v čase „0“, tj. na počátku reakce, ale až po uplynutí určité doby, v měřicím bodě P1.



Na obrázku je znázorněno měření absorbance ( $A_{P1-P2}$ ) v daném případě mezi časovými úseky 2 – 6.

Při pohledu na ilustrační obrázek je potřeba si uvědomit, že průběh reakce v čase nemusí být takto lineární (jak je požadováno pro měření typu rate), ale lze dvoubodově měřit např. reakce typu end point.

Dvoubodové měření je obvyklé při analýze na automatických analyzátořech, kdy první měřicí bod (P1) se obvykle určuje tak, aby měření absorbance proběhlo těsně po přidání vzorku a druhý bod buď po určité době průběhu reakce (*fixed time*), nebo po dosažení rovnováhy (*end point* – viz následující schéma).

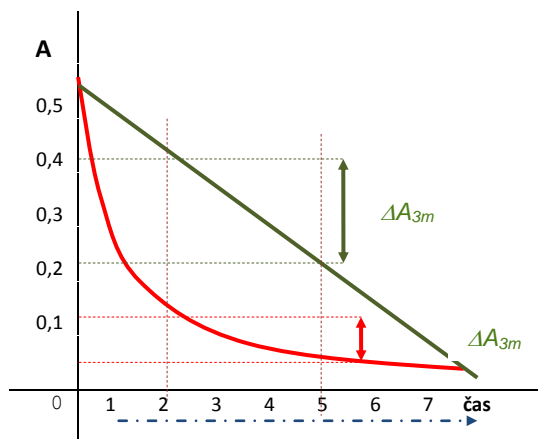


Při tomto nastavení metody dochází v podstatě k „blankování“ zabarvení či zakalení vzorku a není pro tyto případy třeba stavět speciální „slepý“ (blank) vzorek.

**Poznámka:** při kalibraci metody se na osu *x* vynášejí hodnoty koncentrace kalibračních roztoků a na osu *y* naměřené hodnoty absorbance (v daném příkladu  $A_{P2-P6}$ ) pro tyto koncentrace.

## Vyčerpání reakční směsi

Zde se nejedná o způsob měření, ale o častý úkaz v denní praxi klinické biochemie. Může se stát, že během reakce dojde k takovému poklesu koncentrace součásti či součástí reakční směsi, že reakce přestane probíhat. Tento jev je obvyklý zejména při enzymových reakcích (viz kapitola 12), kdy stanovovaný analyt se může vyskytovat v analyzovaném vzorku v takovém množství, že dojde k překročení katalytických možností enzymu či ke spotřebování substrátu a k praktickému zastavení reakce.



Reakce s koncentrací analytu v oblasti linearity metody by měla probíhat podle zelené čáry (pokles absorbance v čase).

Při výrazném nadbytku např. stanovovaného enzymu však reakce probíhá zpočátku výrazně rychle a po krátké době dochází ke spotřebování substrátu a praktickému zastavení reakce.

Pokud bylo (kinetické) měření nastaveno např. mezi 2. a 5. časovým úsekem (zelená šipka) je ve skutečnosti naměřena falešně nízká hodnota. Automaty mají funkce, které hlídají tyto skutečnosti: např. je limitovaná rychlost změny absorbance s časem, je hlídána spodní (či horní) hranice (limita) absorbance apod.

Při tzv. **reflexním retestování** automat posune oblast měření, např. v tomto případě by to mohlo být mezi body 0-1, tzn., že změní počáteční rychlost

## Odkazy

Velmi užitečný WEB o historii jednotek, definicích jednotek, převodu jednotek, atd:

<http://www.converter.cz/index.htm>

Databázi biologických variací lze nalézt na adrese <http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>.

Westgardova stránka je v dané oblasti veskrze užitečným zdrojem informací .

*Hlavním pramenem informací textu 3. kapitoly byl edukační CD-ROM „Metrologická terminologie v klinické a analytické laboratoři“, 2. přepracované vydání, autorů doc. Ing. Zbyňka Plzáka, CSc., RNDr. Bedřicha Friedeckého, Ph.D. a RNDr Josefa Kratochvíla, který čerpá (zejména) z třetího vydání Mezinárodního metrologického slovníku (VIM 3).*

*Další užitečnou pomůckou byl edukační CD-ROM „Analytická kvalita v klinické laboratoři“, od autorů RNDr. Bedřicha Friedeckého, Ph.D. a RNDr Josefa Kratochvíla.*

*Dále byla velmi užitečnou pomůckou Technická fyzika od dr. F. Nachtikala, 2. vydání, JČMF, Praha 1937.*

*Důležitým zdrojem byl i překlad Mezinárodního metrologického slovníku z roku 2008 (VIM 3), uveřejněný na stránkách Úřadu pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, dostupný na adrese:*

[http://www.unmz.cz/files/Sborniky%20TH/Terminologie%20v%20oblasti%20metrologie\\_DEF.pdf](http://www.unmz.cz/files/Sborniky%20TH/Terminologie%20v%20oblasti%20metrologie_DEF.pdf)

*ROC analýza viz např.: <http://gim.unmc.edu/dxtests/ROC1.htm>*

## Kontrolní otázky a pokyny

Následující otázky zkuste zodpovědět ještě před závěrečným testem. Může to být užitečné.

1. Co je to metrologie?
2. Umíte vyjádřit pojem „měření“?
3. Víte co je veličina?
4. Víte co je to měřicí jednotka?
5. Jaký je vztah mezi veličinou a měřicí jednotkou?
6. Čím se liší *základní* veličina od *odvozené* veličiny?
7. Co je to stupnice? Jaké stupnice znáte?
8. Jsou v ČR zákonné i jiné měřicí jednotky než jednotky SI?
9. Která základní jednotka je nejvíce užívána v klinické biochemii? Které základní veličiny se týká?
10. Co je to systém? Které systémy obvykle připadají v úvahu v klinické biochemii?
11. Co si představíte pod pojmem *primární vzorek*?
12. Umíte popsat *měřicí systém*?
13. Které části tvoří *výsledek měření* v klinické biochemii?
14. Prostudujte si pojem *chyba*. Co to je? Jaké chyby znáte? Jak se to řekne anglicky?
15. Zkuste svými slovy říci co je *kalibrace*, pak svůj výrok zkonfrontujte s definicí.
16. Je rozdíl mezi pojmy *etalon* a *standard*?
17. Co si představujete pod pojmem *funkční závislost*? Dá se vyjádřit graficky? Pokud ano, jak byste postupovali?
18. Co je to *kalibrační faktor* a co je to *analytická funkce*?
19. Chápete rozdíl mezi *linearitou* a *pracovním rozsahem* metody? Nezapomeňte si k tomu přechíst poznámku na str. 3-8.
20. Jak se provádí kalibrace? Dovedete si to představit prakticky?
21. Promyslete, jaký je rozdíl mezi definitivní, referenční a rutinní metodou měření. Promyslete různá hlediska.
22. Chápete rozdíl mezi *referenčním* a *certifikovaným referenčním* materiálem? Který z nich bude dražší?
23. Co je to metrologická návaznost? Jak se to řekne anglicky?
24. Co je to *validace*? A co *verifikace*?
25. Jaký je rozdíl mezi mechanizací, automatizací a robotizací?
26. Rozdělte automatické analyzátoři.
27. Jaký je rozdíl mezi Trinderovou reakcí a *modifikovanou* Trinderovou reakcí?
28. Jaký je princip *UV testu*?
29. Jaký je rozdíl mezi měřením *end point*, *rate*, *two point* a *fixed time*?
30. Čeho se týká pojem *vyčerpání reakční směsi*?

## OBSAH:

Kapitola 3 Analytická část vyšetření .....	1
Úvod .....	1
Měření a některé pojmy z metrologie.....	1
Kalibrace .....	7
Definitivní, referenční a rutinní metody měření .....	10
Referenční a kontrolní materiály .....	11
Chyby v analytické fázi.....	12
Automatizace a její role v klinické chemii.....	12
Automatické analyzátory.....	13
Rozdělení automatických analyzátorů .....	13
Dělení podle způsobu práce.....	14
Dělení podle principu měření .....	15
Dělení podle velikosti a rychlosti analyzátoru .....	16
Dělení podle pořadí prováděných testů.....	16
Dělení podle prostředí v němž probíhá reakce .....	16
Dělení podle zařazení v diagnostickém procesu.....	17
Některé vybrané analyzátory .....	18
Dodatek .....	21
Některé další pojmy a definice z metrologie.....	21
Analytické reakce v klinické biochemii.....	22
Modifikovaná Trinderova reakce .....	22
Optický/UV test.....	23
Průběhy analytických reakcí .....	24
End point .....	24
Kinetické měření.....	25
Měření v konstantním čase .....	25
Dvoubodové měření .....	26
Vyčerpání reakční směsi .....	26
Odkazy .....	27
Kontrolní otázky a pokyny .....	28