



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

**Ověření (verifikace) referenčních mezí základních
biochemických vyšetření**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: **SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ**

Autor: Helena Blažková

Vedoucí práce: prim. MUDr. Jaroslava Ambrožová

České Budějovice 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „Ověření (verifikace) referenčních mezí základních biochemických vyšetření“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 15. 7. 2018

Poděkování

Ráda bych poděkovala především vedoucí mé bakalářské práce paní prim. MUDr. Jaroslavě Ambrožové za velikou ochotu, odbornou pomoc, cenné rady a připomínky. Dále bych ráda poděkovala všem kolegyním oddělení klinické biochemie a hematologie Nemocnice Prachatice a.s. za spolupráci při praktické části. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za velikou trpělivost a podporu.

Ověření (verifikace) referenčních mezí základních biochemických vyšetření

Abstrakt

Tématem mé bakalářské práce je praktická aplikace postupu, kterým se dle doporučené odborné literatury ověřují (verifikují) v klinické praxi používané referenční meze/interval (RI) uváděné výrobcem či jinou dárcovskou laboratoří. Cílem verifikačního postupu je zjistit, že RI stanovený jinde či převzatý z výzkumu, je v praxi konkrétní zdravotnické laboratoře použitelný, a to se smysluplnou spolehlivostí a s použitím relativně malého počtu referenčních individuů ($n = 20$). K ověřování bylo použito dat celkem 20 rutinních klinicko-biochemických metod. Z této práce vyplývá, že výběr referenčních jedinců je lepší provádět pomocí smysluplných diagnostických celků a zařazovat do výběru pro konkrétní referenční mez pouze jedince, u nichž byly v případě diagnosticky sdružených analytů a priori dosaženy fyziologické hodnoty.

Klíčová slova

Referenční distribuce; referenční jedinec; referenční hodnota; referenční mez/interval; referenční populace; referenční výběr.

Verification of the reference limits of basic biochemical examinations

Abstract

The topic of my bachelor thesis is the practical application of the verification procedure according to the recommended professional literature as to verify the reference limits / intervals (RI) reported by a manufacturer or other donor laboratory. The purpose of the verification procedure is that RI found out elsewhere or taken from research is transferable to a particular medical lab, with meaningful reliability by examining a relatively small number of reference individuals ($n = 20$). Data from 20 routine clinical-biochemical methods were used in this verification process. This work suggests, that selecting reference individuals, is better performed with meaningful diagnostic units, and that only those individuals who have previously had physiological values in the case of diagnostically complex analytes would to be included in the selection for a specific reference.

Key words

Reference distribution; Reference individual; Reference value; Reference limit / interval; Reference population; Reference sample group.

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Základní pojmy	9
2.1	Referenční interval	9
2.2	Pozorovaná hodnota	9
2.3	Preciznost měření	9
2.4	Referenční individuum.....	9
2.5	Referenční populace.....	10
2.6	Referenční výběrová skupina	10
2.7	Referenční distribuce	10
2.8	Zjištění nebo také určení referenčního intervalu.....	10
2.9	Vymezení referenčního intervalu.....	10
2.10	Převzetí referenčního intervalu	10
2.11	Verifikace či validace referenčního intervalu	10
2.12	Referenční mez.....	10
3	Referenční hodnoty	11
4	Tvorba referenčních hodnot.....	15
4.1	Multicentrické studie referenčních intervalů	16
4.2	Výběr referenčních jedinců	17
4.3	Preanalytické a analytické úvahy	18
4.4	Analýza referenčních hodnot	19
4.5	Přenositelnost	20
4.6	Validace/verifikace referenčních mezí.....	20
5	Preanalytické vlivy na laboratorní vyšetření.....	21
5.1	Příklad preanalytických a analytických podmínek při stanovení glukózy.....	22
5.2	Příklad preanalytických a analytických podmínek při stanovení krevních lipidů	23
6	Stanovované analyty	24
7	Cíl práce.....	30
8	Metodika.....	31
8.1	Analýza vzorků	31
8.2	Postup pro ověření referenčních mezí.....	34

9	Výsledky a diskuze.....	35
10	Závěr	52
11	Zdroje.....	54
12	Zkratky.....	59

1 Úvod

Referenční hodnoty jsou nedílnou součástí výsledkového listu laboratorního vyšetření a slouží k porovnání se získanými hodnotami pacienta. Ověření referenčních mezi stanovovaných metod ukládá laboratoři za povinnost norma ČSN EN ISO 15189 v plném znění, pokud laboratoř změní postup laboratorního vyšetření nebo postup před vyšetřením. Cílem této práce je ověření dosud interpretovaných referenčních mezi základních biochemických vyšetření oddělením Klinické biochemie a hematologie v Nemocnici Prachatice a.s. Téma této práce jsem si vybrala, protože může být přínosem i této laboratoři.

2 Základní pojmy

V této části uvádím několik základních výrazů, týkajících se tématu této práce. Kmenovým výrazem jsou referenční hodnoty. Jedná se o hodnoty získané pozorováním či měřením referenčních jedinců na vybrané referenční skupině a využívají se k vymezení normálních hodnot. Obtížnost specifikace „normálních“ hodnot si v odborné praxi vyžádala definování referenčního intervalu (C28-A3, 2008).

2.1 Referenční interval

Jako referenční rozmezí se obvykle používá interval vymezující 2,5 - 97,5% percentil výsledků referenční populace daného stanovení (Henny, 2016). Referenční interval (RI) se tedy vztahuje k sérii hodnot pozorovaných na vybrané referenční skupině či predikované pro referenční populaci a je definovaný specifickými procenty (C28-A3, 2008). Zjištění RI ovlivňuje volba referenční skupiny, použitá statistická metoda, výběr metody pro stanovení daného analytu i použité komerční soupravy. Ze závislosti RI na metodě stanovení daného analytu tedy vyplývá, že by laboratoře měly posoudit, zda hodnoty převzaté z literatury odpovídají místní populaci a metodě stanovení daného analytu. Referenční intervaly některých analytů se mění v závislosti na pohlaví a věku vyšetřovaného pacienta. Hodnoty, které jeví závislost na věku pacienta, nemusí mít spojitou následnost. Na výsledné hodnoty má velký vliv preanalytická část stanovení, a to především: příprava pacienta, odběr a transport vzorku (Zima, 2013). V některých případech může být použita pouze jedna referenční hodnota, pak se obvykle jedná o horní referenční mez/limit (Henny, 2016).

2.2 Pozorovaná hodnota

Pozorovaná hodnota (výsledek laboratorního testu pacienta) je konkrétní kvantitativní hodnota, získaná pozorováním či měřením testovaného subjektu (např. pacienta), jež má být srovnávána s referenční hodnotou, referenční distribucí či referenčními mezemi (C28-A3, 2008).

2.3 Preciznost měření

Preciznost měření je těsnost shody mezi nezávislými výsledky testů získanými opakovaným měřením za stanovených podmínek (C28-A3, 2008).

2.5 Referenční individuuum

Jako referenční individuuum je zde označena osoba - jedinec, vybraný k testování na základě dobře definovaných kritérií (C28-A3, 2008).

2.6 Referenční populace

Skupina všech referenčních individuí se nazývá referenční populace. Referenční populace má obvykle neznámý počet členů, a proto se jedná o hypotetickou entitu (C28-A3, 2008).

2.7 Referenční výběrová skupina

Referenční výběrová skupina je adekvátní počet osob vybraných k reprezentaci referenční populace (C28-A3, 2008).

2.8 Referenční distribuce

Pojmem referenční distribuce je zde myšleno rozložení referenčních hodnot. Hypotetickou distribuci referenční populace lze testovat pomocí referenční distribuce referenční skupiny vzorků a adekvátních statistických metod (C28-A3, 2008).

2.9 Zjištění nebo také určení referenčního intervalu

Zjištění, určení, stanovení či zavádění RI je postup používaný při jeho vytváření, zahrnující všechny kroky od výběru referenčních jedinců, včetně detailů analytických metod a údajů o jejich sběru (vzorkování) a analýze (C28-A3, 2008).

2.10 Vymezení referenčního intervalu

Detailní popis charakteristik RI je nazýván vymezením referenčního intervalu (C28-A3, 2008).

2.11 Převzetí referenčního intervalu

Jako převzetí RI je označen postup, kterým lze přizpůsobit již dříve stanovený referenční interval nové analytické metodě nebo do jiné laboratoře (C28-A3, 2008).

2.12 Verifikace či validace referenčního intervalu

Verifikací či validací RI nazýváme postup, kterým se zajišťuje s použitím relativně malého počtu referenčních individuí, že RI stanovený jinde či převzatý z jiné studie, je lokálně použitelný (C28-A3, 2008).

2.14 Referenční mez

Referenční mez (limit) je hodnota odvozená z referenční distribuce a užitá pro popisné účely. Je obvyklou praxí definovat referenční mez tak, aby stanovená část referenčních hodnot byla menší nebo rovna resp. větší nebo rovna horní či dolní mezi. Referenční mez je popisnou charakteristikou referenčních hodnot a může se lišit od různých jiných typů rozhodovacích mezí (C28-A3, 2008).

3 Referenční hodnoty

Interpretace laboratorních testů je jednou z hlavních obav nejen zdravotních laborantů. Referenční intervaly doplňují výsledky kvantitativní analýzy, aby s interpretací pomohly především lékařům. Porovnání výsledku laboratorní analýzy s referenčními hodnotami není jediným výstupem, ale je také podnětem pro vyžádání dalších laboratorních analýz (Dalton, 2010). Jako první se stanovením referenčních mezí zabývali Gräsbeck a Fellman, kteří publikovali v roce 1968 článek, kde se prozatímne pracovalo s pojmem „normální hodnoty“. Koncept referenčních mezí byl oficiálně přijat v roce 1970. Navrhovatelem byla skandinávská skupina v čele s Ralphem Gräsbeckem, a stalo se tak na konferenci v roce 1969. Na prvotní popud reagovaly mezinárodní a národní společnosti vydáním vlastních doporučení týkajících se referenčních hodnot a specifikací důležitých faktorů ovlivňujících výsledné hodnoty vydávané zdravotnickými laboratořemi (např. standardizací odběrů vzorků, podmínek preanalytické fáze zpracování vzorku a postanalytického zpracování dat (Gräsbeck, 2005). V České republice se tématem referenčních mezí zabýval RNDr. Jan Hendl, který ve své publikaci z roku 1987 popisuje získání referenčních hodnot, jejich zpracování, procesy srovnání s nalezenými hodnotami a ostatní problematiku. Jeho doporučení jsou inspirována doporučeními IFCC a přidává další důležité připomínky týkající se např. individuálních referenčních mezí nebo diskriminační analýzy z hlediska teorie rozhodování. Další zásadní opatření představuje evropská směrnice, která výrobcům udává povinnost uvádět referenční limity v přílohových listech u reagentů (98/79/CE). Na nové poznatky v oblasti referenčních mezí zareagoval CLSI ve spolupráci s IFCC-LM revizí svého dokumentu, věnovanému stanovení referenčních intervalů (Siest et al., 2013). Pokyn C28-A3 představuje v současnosti nejvýznamnější krok ve vývoji referenčních mezí (Ozarda, 2016). Původní teorie nebyla změněna, pouze byly pozměněny cesty zavádění referenčních mezí, např. použité statistické metody, metoda pro zpracování hodnot nižšího počtu subjektů či možnosti zajištění zdravých jedinců.

Přesto některé důležité otázky stále zůstávají nezodpovězeny. Např.: Zda jsou referenční meze skutečně pro lékaře důležité nebo zda příliš nezasahují do jejich rozhodování. Další se týkají úskalí posuzování zdraví použitých subjektů (Siest et al., 2013). Stále je také řešen problém platných referenčních intervalů určitých věkových skupin, stejně jako konkrétní hodnoty pro těhotné ženy a netradiční vzorky. Nejnáročnější téma bezpochyby představuje stanovení referenčních mezí pro genetická vyšetření (Ozarda, 2016). Nicméně obecnou pravdou zůstává, že stanovení referenčních intervalů je vždy náročné jak časově tak především finančně. Laboratoře musí mít velice dobře nastavené analytické systémy, mít je pod stálou kontrolou a musí ovládat zásady výběru vhodné populace (Henny, 2007). V některých případech jsou rozhodovací meze vydávány národními nebo mezinárodními společnostmi jako v případě celkového cholesterolu nebo glykovaného hemoglobinu. Pro novou metodu, kde nejsou v literatuře spolehlivé referenční meze, je vhodné využít primárně stanovené hodnoty. Tam, kde jsou v literatuře ověřené referenční meze, lze s výhodou využít publikovaných dat. Postup navržený IFFC je považován za nejlepší řešení, ale pro běžnou praxi klinické laboratoře je velmi náročný a složitý na provedení. V současné době není metoda, která by byla jednoduchá a zároveň univerzální. Největším problémem bývá výběr referenční populace, čímž především mohou být referenční limity zkresleny, i když je statistická metoda vybrána správně. Nejčastější příčinou vyloučení bývá přítomnost akutního nebo chronického onemocnění, nadváhy, abusu alkoholu nebo kouření (Henny, 2011). Stále zůstává problém záměny referenčních intervalů a klinických rozhodovacích mezí (Ozarda, 2016). Bylo zjištěno, že v situacích, kde nejsou pod kontrolou preanalytické a analytické podmínky, není vhodné použít nepřímý postup. To platí rovněž pro skupiny, jako jsou novorozenci, děti a starší osoby, kde je stanovení referenčních mezí velice obtížné (Ceriotti, 2007).

Zdravotnické laboratoře by se měly zaměřit především na přesnost výsledků, které uvádějí. Výsledné laboratorní hodnoty by se významně neměly lišit od hodnot vydaných referenční laboratoří. Je proto vyvíjen tlak na výrobce souprav, aby zajistili návaznost svých metod na referenční materiály a v případě laboratoří, aby zajistily správné zavedení metod. Při stanovení referenčních mezí je především velmi obtížné získat dostatečně početný vzorek referenčních jedinců, a to zejména u metod, kde referenční meze závisí například na věku a pohlaví. Některé laboratoře nebo výrobci využívají jako jejich zdroj studií, které byly provedené před více než desítkami let, a

kde byly použity rozdílné metody i populace. Z toho tedy vyplývá, že laboratoře by měly minimálně ověřovat (verifikovat) zvolené referenční meze v místě, kde laboratoř působí (Horowitz, 2010). Zdroje referenčních intervalů, jež mají být ověřeny, se mohou lišit. Jsou uváděné ve standardních operačních postupech laboratoří, či příbalových listech, nebo publikované v renomovaných odborných doporučeních mezinárodních odborných společností (Tate et al., 2015).

Dokument C28-A3 zahrnuje doporučení týkající se postupů k získání a verifikaci referenčních intervalů ve zdravotnických laboratořích. Dále jsou zde diskutovány otázky preanalytických a analytických postupů. Původní doporučení z roku 2000 bylo opakovaně přepracováno, a to především ze dvou důvodů: Prvním bylo, že u některých analytů byly referenční intervaly nahrazeny tzv. rozhodovacími limity, které byly vytvořeny na základě národních či mezinárodních dohod. Druhým důvodem bylo zjištění, že jen velmi málo zdravotnických laboratoří provádí vlastní studie zaměřené na referenční intervaly. Laboratoře obvykle využívají studie provedené před desítkami let, kdy byla jiná volba populace i analytické metody než v současnosti. Pokud se laboratoře k vlastnímu stanovení uchýlí, často použijí méně subjektů, než je doporučeno. Z těchto důvodů se doporučuje spíše referenční intervaly ověřovat tj. verifikovat, než provádět náročné studie. Laboratoř může verifikovat referenční meze dvěma rozdílnými způsoby: pomocí jejich přenositelnosti dle protokolárního dokumentu CLSI EP09, který je součástí dokumentu C28-A3. V tomto případě není nutné zajišťovat vzorky od zdravých jedinců, což je pro většinu laboratoří výhodné. Mohou využít vzorky pacientů, které mají k dispozici, aniž by se zjišťovalo, zda jde o zdravou populaci. Druhý postup vyžaduje výběr minimálně 20 zdravých jedinců (C28-A3, 2008).

Konečnou podobu referenčních intervalů ovlivňují především kritéria výběru referenčních jedinců, preanalytické podmínky a statistické zpracování dat. Snaha by měla být zacílena na standardizaci metod, minimalizaci až eliminaci rozdílnosti analytických metod a různých místních vlivů. Srovnatelnost výsledků lze zajistit pouze standardizací měřicích postupů, jejíž součástí je navázání na oficiální „referenční měřicí systém“, nezávislý na analyzátoru, reagentech či analytickém principu. Pokud je srovnatelnosti metod dosaženo, pak jediným důvodem zdravotnické laboratoře k určení referenčních mezí je specifická rozdílnost konkrétní referenční populace, pro niž laboratoř pracuje. Existují analyty, jejichž hodnoty dané měřené veličiny jeví významnou rozdílnost v závislosti na druhu populace. Pro většinu analytů však tato

rozdílnost neplatí. Proto můžeme obvykle využít multicentrických studií. Kritéria provádění těchto multicentrických studií uvádí dokument C28-A3. Důraz je zde opět kladen na výběr referenčních jedinců a jejich počet, který je úměrný rozdělení intervalů v závislosti na věku, pohlaví, rase atp. Jasně definovány musí být podmínky preanalytické fáze. Dále je nutný průkaz návaznosti výsledků a mezilaboratorní srovnatelnosti, jež jsou jasným důsledkem standardizace metody. V praxi zdravotnické laboratoře je klíčová výkonnost použitého programu kontroly kvality každé analytické metody (C28-A3, 2008).

V další části této kapitoly bych ráda uvedla některé studie zabývající se tématem referenčních mezí.

Práce G. L. Horowitz z roku 2010 se zabývá postupy pro stanovení rozhodovacích limitů se zaměřením na přesnost. Dále se zabývá postupy pro ověření referenčních rozmezí převzatých z jiných zdrojů a stanovením referenčních intervalů. V části ověření referenčních intervalů se pozastavuje nad tím, že k ověření referenčních intervalů stačí laboratoři dvacet referenčních jedinců, přesto ověření provádí velice málo laboratoří. Navrhuje i shromažďování dat z jednotlivých ověřování. To by bylo možností srovnání jednotlivých zúčastněných pracovišť a dalších statistických výstupů.

Studie Arzideha et al. z roku 2010 reaguje na situaci, kdy laboratoře z finančních důvodů obvykle nestanovují referenční meze a často opomíjejí problém jejich přenositelnosti. Jednalo se o stanovení referenčních limitů pro stanovení kreatininu v séru i plasmě s využitím statistických metod. Autoři využili databázi z několika laboratoří, a s pomocí kritérií pro vyloučení nevhodných referenčních jedinců získali vhodné referenční intervaly, pouze s omezením vhodnosti pro různé analytické postupy.

Rozsáhlá studie byla provedena v severní Evropě. Spolupracovalo zde 102 klinických laboratoří, kdy každá vybrala minimálně 25 referenčních jedinců s rovnoměrným zastoupením věku a pohlaví. Odebrané a zpracované vzorky těchto referenčních jedinců byly použity pro analýzu 25 biochemických stanovení. Se stanoveními byl analyzován i referenční kontrolní materiál. Všechny naměřené hodnoty byly shromážděny do centrální databáze a použity pro výpočty referenčních intervalů v severských zemích (Rustad et al., 2004).

Porovnáním referenčních hodnot různých věkových skupin španělské populace se

zabývá studie Millán-Calentiho et al. z roku 2012. Jako referenční populace byla použita skupina 600 jedinců ve věku nad 65 let. Dosažené výsledky byly porovnány s referenčními hodnotami používanými pro mladé dospělé jedince. Některé studované metody měly vysokou část hodnot nad horní hranicí referenční meze. Jednalo se o glukózu, močovinu kreatinin, celkový cholesterol a HDL-cholesterol. Studie navrhuje zaměřit se do budoucna na stanovení referenčních intervalů pro starší dospělou populaci, a tím přispět k včasné a správné diagnostice zejména diabetu a dyslipidémie.

V České Republice se referenčními intervaly zabývá práce Šprongla a kol. z roku 2014, která prezentuje praktické ověření referenčních mezí převzatých z jiné zahraniční studie. Do referenční skupiny autor zařadil 200 jedinců. Ověření provedl pro stanovení: ALT, AST, GGT, ALP, Na, K, Ca, ureu, kreatinin, kyselinu močovou, celkový bilirubin a albumin. Závěrem bylo doporučení možné aplikace hodnot referenčních intervalů ze zahraniční studie pro dospělou populaci. Autor v závěru doporučuje použít jednotné referenční hodnoty v rámci celé České republiky.

Tématikou referenčních mezí pro dětskou populaci se zabývá např. studie Stranda et al. (2018), která uvádí referenční intervaly lipidů v souvislosti s onemocněním dyslipidemií u norských dětí ve věku 6-12 let. Jednalo se o celkový cholesterol, HDL cholesterol a LDL cholesterol. Studie se zúčastnilo 1340 dětí a referenční intervaly byly vytvořeny podle doporučení IFCC. Bylo zjištěno, že referenční intervaly zkoumané skupiny odpovídají hodnotám stanoveným v ostatních zemích. Byla zde zdůrazněna důležitost vhodných referenčních mezí ve vztahu k věku a pohlaví pacienta. Podobná studie byla provedena také pro německou dětskou populaci. Zde bylo studováno 2571 jedinců ve věku od 0,5 do 16 let. Zde byly zjišťovány hodnoty triglyceridů, celkového cholesterolu, LDL a HDL cholesterolu a apolipoproteinů A1 a B. Závěrem bylo zjištění, že nově naměřené hodnoty odpovídají již dříve provedeným studiím (Dathan-Stumpf et al., 2016).

Další studií zabývající se referenčními hodnotami je práce Ichihara et al. (2017). V této studii bylo měřeno 23 klinických analytů pro 13 396 zdravých jedinců. Ve studii šlo o porovnání mezinárodních hodnot z 12 zemí. Bylo zjištěno, že jsou hodnoty mezi zeměmi téměř srovnatelné s ohledem na pohlaví, věk, kouření a konzumaci alkoholu. Rozdílnosti hodnot byly zjištěny v souvislosti s etnickými rozdíly v náchylnosti k chorobám souvisejícími s výživou.

4 Tvorba referenčních hodnot

Zavádění nové metody vyžaduje tvorbu fyziologických referenčních hodnot a následný odhad referenčního intervalu. Zde se musí postupovat podle dobře definovaného protokolu, který zahrnuje následující operace:

- Zjištění analytických interferencí a zdrojů biologické variability z vědecké a lékařské literatury
- Stanovení výběrových a rozdělovacích kritérií referenčních jedinců a vytvoření dotazníku pro zjištění těchto kritérií
- Vytvoření informovaného souhlasu s účastí ve studii a dohled na jeho vyplnění referenčními jedinci
- Rozdělení referenčních jedinců na základě vyplněných dotazníků a dalších vhodných zdravotnických posudků
- Vyřazení nevhodných jedinců pomocí výběrových kritérií
- Zajištění vhodného počtu jedinců
- Správná a důsledná edukace referenčních jedinců před odběrem vzorku
- Odběr a nakládání s biologickým materiálem referenčních jedinců podle rutinní praxe
- Analýza vzorků podle analytické metodologie za dobře definovaných podmínek a v souladu s rutinní praxí
- Zpracování dat referenčních hodnot a vytvoření histogramu k posouzení jejich distribuce
- Vyřazení možných chybných a odlehlých hodnot
- Provedení statistické analýzy získaných hodnot, výběr metody odhadu a odhad referenčního intervalu
- Dokumentace všech přechozích operací

Tento postup pro získání referenčních hodnot je v souladu s přístupem „a priori“. Pro metodu „a posteriori“ platí stejné úvahy k zahrnutí osob resp. jejich měřených hodnot, pouze k těmto operacím dochází až po provedení měření (C28-A3, 2008).

4.1 *Multicentrické studie referenčních intervalů*

Hodnoty referenčních intervalů ovlivňuje mnoho proměnných. Patří mezi ně kritéria výběru referenčních jedinců, preanalytické podmínky, statistické ověření dat a mnohé další. Pro laboratoř, která si stanovuje své vlastní referenční intervaly, představují

kritické body volba použité analytické metody a definice populace, z níž jsou referenční jedinci vybíráni. Vzhledem ke standardizaci metod je snaha o minimalizaci vlivů rozdílností plynoucích z bezpočtu analytických metod a regionálních odlišností. Pokud již bylo u nějaké metody dosaženo srovnatelnosti, pak je jediným důvodem pro určení referenčních mezí předpoklad nějaké rozdílnosti v referenční populaci. Taková rozdílnost vlivu rasy existuje např. u sérového kreatininu. Další regionální rozdílnosti mohou být ve srovnání s Asijskou populací např. u některých specifických proteinů. Nicméně pro většinu analytů nebyly zjištěny téměř žádné rozdílnosti mezi populacemi, proto je možné u těchto analytů provést multicentrické studie referenčních intervalů. U těchto studií je nutné dodržovat tato kritéria:

- Výběr referenčních jedinců podle bodů vyjmenovaných v předchozí části pro tvorbu referenčních hodnot. Počet center podílejících se na studii a počet referenčních jedinců by měl být úměrný počtu cílových hodnot s ohledem na rozdělení podle věku, pohlaví, rasy atd.
- Jasná definice podmínek preanalytické části
- Průkaz návaznosti výsledků na uznávané standardy, ideálně zahrnující minimálně dva referenční materiály s určenými cílovými hodnotami vztaženými na referenční metodu. Tato část je velice důležitá, protože zajištění návaznosti na referenční materiál umožňuje její celosvětovou srovnatelnost výsledků měření.
- Dobře definovaný program kontroly kvality s jasnými kritérii pro přijetí nebo vyloučení získaných laboratorních údajů, který je definován „a priori“

Dodržením těchto kritérií by měly být rozeznány rozdílnosti v populacích. Pro populace bez rozdílností by měla být data předána k dalšímu zpracování. U populací, kde budou nalezeny rozdílnosti, se musí tyto rozdílnosti dobře zdokumentovat. Pokud již byly takto referenční meze stanoveny, pak je povinností zdravotní laboratoře tyto meze již pouze validovat (C28-A3, 2008).

4.2 Výběr referenčních jedinců

Definice zdraví představuje problém každé podobné studie. Proto prvním krokem výběru referenčních jedinců představuje stanovení kritérií pro vyloučení evidentně nezdravých jedinců z referenčního vzorku. Tato kritéria jsou *vice versa* závislá na typu stanovení, které je předmětem studie. Každá laboratoř nebo výzkumný pracovník mohou použít různá kritéria, jako např. různá vyšetření, anamnéza nebo klinické testy.

Jedinci mohou být vyloučeni z důvodu konzumace alkoholu, dárcovství krve, užívání léků, genetických faktorů, kuřáctví, nedávno prodělané operace, těhotenství, laktace, obezity, diety, cvičení, poloha při odběru, životního prostředí, lačnění či příjem potravy a mnoho dalších. Nejčastěji používaná kritéria jsou věk a pohlaví subjektů. To co lze v jedné laboratoři použít jako vylučovací kritérium, se může v jiné laboratoři jevit jako kritérium sloužící k následnému rozdělení populace (rozdělovací kritéria). Kritéria by však měla být definována a popsána ještě před zahájením studie. Doporučuje se použít vhodný dotazník. Dobře definované dotazníky poskytují výborný způsob použití vylučovacích i rozdělovacích kritérií. Dotazník by měl mít co nejjednodušší formu a formulace otázek by měla být taková, aby formou odpovědi bylo „ANO/NE“ nebo jen velmi jednoduchá odpověď. Samozřejmostí je zachování důvěrnosti při zacházení s takto získanými informacemi a výsledky testů. Doporučuje se také v dotaznících uvádět jméno, adresu a telefonní číslo pro případ výskytu abnormalit v testech a nutnosti zpětné vazby.

Při výběru referenčních jedinců není nutné vybírat mladé dospělé jedince. Naopak je doporučen výběr ze všech věkových kategorií s obezřetností zaměřenou na fakt, že hodnoty související s věkem nemusí prezentovat stav dobrého zdraví. Pokud se referenční jedinci vybírají z referenční populace pomocí definovaných kritérií před sběrem a analýzou vzorků, pak se tento způsob nazývá „*a priori*“. Pokud jsou kritéria použita až poté, co jsou vzorky nasbírány, pak se způsob nazývá „*a posteriori*“. Odborníci se přiklánějí k přímým technikám, ale v některých případech, jako např. v pediatrii, může být obtížné použít přímou techniku. V takových případech je použitelná nepřímá technika sběru dat, kde se využívá hodnot z databáze a jejich následného statistických zpracování.

4.3 Preanalytické a analytické úvahy

Při získávání referenčních dat je samozřejmostí brát zřetel na analytické a preanalytické proměnné. Proto musí být pečlivě definovány a používány všechny preanalytické faktory, včetně přípravy osob, odběru vzorků a postupů, analytické metody a přístroje. Níže je uvedena tabulka č. 1 s příklady důležitých preanalytických faktorů (C28-A3, 2008).

Tab. č. 1. Možné preanalytické faktory

Příprava osob	Odběr vzorků	Manipulace se vzorky
<ul style="list-style-type: none"> • Předchozí dieta 	<ul style="list-style-type: none"> • Vlivy okolí během odběru 	<ul style="list-style-type: none"> • Transport
<ul style="list-style-type: none"> • Lačnění vs příjem potravy 	<ul style="list-style-type: none"> • Čas 	<ul style="list-style-type: none"> • Srážení
<ul style="list-style-type: none"> • Abstinence léků 	<ul style="list-style-type: none"> • Tělesný postoj 	<ul style="list-style-type: none"> • Separace séra/plazmy
<ul style="list-style-type: none"> • Lékový režim 	<ul style="list-style-type: none"> • Typ vzorku 	<ul style="list-style-type: none"> • Uskladnění
<ul style="list-style-type: none"> • Doba odběru v relaci s biologickým rytmem 	<ul style="list-style-type: none"> • Místo odběru 	<ul style="list-style-type: none"> • Příprava k analýze
<ul style="list-style-type: none"> • Fyzická aktivita 	<ul style="list-style-type: none"> • Průtok krve 	
<ul style="list-style-type: none"> • Doba odpočinku před odběrem 	<ul style="list-style-type: none"> • Vybavení 	
<ul style="list-style-type: none"> • Stres 	<ul style="list-style-type: none"> • Technika 	
	<ul style="list-style-type: none"> • Doba zatažení ruky 	

(C28-A3, 2008)

4.4 Analýza referenčních hodnot

Referenční interval je interval mezi dvěma hodnotami, tzv. horní a dolní mezí, které jsou odhadovány specifickými procenty hodnot populace, ze které byly referenční osoby vybírány. V některých případech je potřebná jen jedna referenční mez. Statistické metody určují referenční meze postupy parametrickými a neparametrickými (C28-A3, 2008).

Parametrická metoda v praxi předpokládá, že pozorované hodnoty, nebo některé matematické transformace těchto hodnot sledují Gaussovské pravděpodobnostní rozložení. Hodnoty, které Gaussovské rozložení nemají, se musí předem transformovat a poté teprve otestovat, zda mají normální rozložení. Pro toto zpracování je nutná statistická teorie a odpovídající softvérové vybavení (C28-A3, 2008).

Při zavádění referenčních hodnot se doporučuje jednoduchá neparametrická metoda, která není tolik náročná na statistické zpracování. Zde se klade vyšší důraz na výběr referenčních jedinců, testování odpovídajícího počtu osob a předcházení analytickým chybám (C28-A3, 2008).

Pokud laboratoř nemůže z nějakého důvodu zajistit dostatečně velký vzorek referenčních jedinců, může využít „robustní metodu“. Taková metoda představuje kompromis mezi parametrickými a neparametrickými metodami. Má vzhled parametrické metody, v níž se nepožaduje vysoký počet referenčních jedinců, stejně

jako v neparametrické metodě. Zároveň nevyžaduje, aby získané hodnoty sledovaly Gaussovské rozložení. Tato metoda má v podstatě formu parametrickou s výjimkou toho, že nepoužívá průměr a směrodatnou odchylku, ale robustních měř polohy a šíře. Robustní metoda byla využita v nejrůznějších situacích, kde velikost vzorku nedosahovala 120 referenčních jedinců a kde se o populaci soudilo, že nemá normální rozložení (C28-A3, 2008).

4.5 Přenositelnost

Stanovení spolehlivých referenčních intervalů je náročný úkol, proto je možné využít přenosu těchto hodnot z jiné donorské zdravotnické laboratoře. Jde o řešení, které je méně nákladné a pohodlnější. Přenos referenčních hodnot vyžaduje splnění jistých podmínek, aby mohly být přijaty. Pokud předpokládáme, že původní studie byly provedeny správně, potom přenos referenčních dat zahrnuje dva odlišné problémy: srovnatelnost analytických systémů a srovnatelnost testovaných populací (C28-A3, 2008).

V případech, kdy si laboratoř již referenční hodnoty pro daný analyt stanovila a rozhodne se pro změnu analytické metody, není nutné k zavedení nových referenčních intervalů provádět nový sběr nových referenčních vzorků. Nutností však zůstává srovnání těchto dvou metod. Výstupem je zjištění, zda lze využít starých referenčních dat nebo je nutné zavést nové. Má-li nová metoda podobnou preciznost a známé interference, používá-li stejných standardů nebo kalibrátorů a poskytuje-li hodnoty srovnatelné, pak lze referenční interval převzít (C28-A3, 2008).

Pokud chce zdravotní laboratoř převzít referenční hodnoty zavedené jinou laboratoří nebo výrobcem pro stejný či přijatelně srovnatelný analytický systém, pak je nutné posoudit srovnatelnost referenční populace. V rámci převodu těchto hodnot by měly být srovnatelné i další preanalytické faktory, jako např. příprava referenčních jedinců nebo odběr vzorku a nakládání s ním. V takovém případě se doporučuje validace referenčních mezí. Tento typ přenosu je v klinických laboratořích stále častější (C28-A3, 2008).

4.6 Validace/verifikace referenčních mezí

K ověření referenčních mezí lze využít tří postupů: subjektivní posouzení, statistický test na relativně malém počtu referenčních jedinců nebo hodnocení relativně vysokého počtu referenčních jedinců (C28-A3, 2008).

Pro subjektivní posouzení referenčních mezí je nutné adekvátním způsobem popsat a posoudit všechny demografické proměnné referenční populace a proměnné geografických lokací. Nutné je také řádné posouzení všech detailů preanalytických a analytických postupů. Pokud vše odpovídá předem určeným podmínkám, pak musí laboratorní pracovník posoudit, zda jsou tyto podmínky v souladu s operacemi v dané laboratoři a s testovanou populací (C28-A3, 2008).

Při validaci resp. zde spíše verifikaci s použitím malého počtu referenčních jedinců se nejčastěji vybírá dvacet jedinců odpovídající vlastní populaci a provádí se srovnání s původní větší studií. Jedinci by měli tvořit homogenní skupinu. Zde by měly být opět preanalytické a analytické podmínky v souladu s postupy v příjmové laboratoři. Referenční meze lze označit za ověřené (verifikované), pokud nebyly více než dva výsledky mimo původní referenční interval. Pokud je více než dva naměřené výsledky mimo původní referenční interval, pak je nutný výběr dalších 20 referenčních vzorků. Jestliže nejsou více než dva nové výsledky mimo původní referenční meze, může původní referenční interval považovat za ověřený. Jsou-li více než dva nové výsledky mimo původní referenční meze, pak by měla laboratoř přezkoumat analytické postupy, zvážit možné rozdíly v biologických charakteristikách vzorkovaných populací a zvážit, zda by si neměla zavést vlastní referenční intervaly dle pokynů v plném rozsahu (C28-A3, 2008).

V případě referenčního intervalu, kriticky důležitého pro klinickou interpretaci vyšetřované metody, může laboratoř provést validaci s použitím velkého počtu referenčních jedinců. V takovém případě se vybírá větší populace referenčních jedinců, např. 60. Opět je nutné pečlivě dodržovat postupy preanalytických a analytických fází. Větší studie má větší statistickou sílu k odhalení rozdílů mezi původní studií a nově zkoumanou populací (C28-A3, 2008).

Dále je popsán způsob verifikace referenčního intervalu tak, že se referenční populace určí podle vybraných laboratorních ukazatelů, které tvoří smysluplný diagnostický celek. Např. při ověřování referenčních mezí renálních funkčních ukazatelů byli vybráni z databáze laboratorního informačního systému pacienti, kteří měli hodnoty sodného kationtu v séru, draselného kationtu v séru, urey v séru, kreatininu v séru i moči a osmolality v séru i moči v referenčním intervalu (Jabor, 2008).

Pro hrubý odhad, zda hodnoty referenčních mezí od výrobce odpovídají, lze také využít

výsledků externího hodnocení kvality. Je nutné se zaměřit na rozdílné výsledky kontroly mezi jednotlivými diagnostickými technologiemi (Jabor a Franeková, 2013).

5 Preanalytické vlivy na laboratorní vyšetření

Podmínky ovlivňující preanalytickou fázi stanovení analytu mohou být rozděleny na ovlivnitelné a neovlivnitelné. Důležitým ovlivnitelným faktorem je strava. Pokud není odběr proveden nalačno, je ovlivněna koncentrace glukózy, triacylglycerolů, volných mastných kyselin a lipoproteinů. Strava s vysokým obsahem tuků zvýší hladinu triacylglycerolů a sníží hladinu dusíkatých látek v séru. Při zvýšeném příjmu bílkovin je zvýšena hladina amoniaku a urey. Dále je ovlivněna hladina hormonů, účastnících se trávení, které ovlivňují další analyty. Vliv na hladinu některých analytů má i konzumace nápojů. Ovlivnitelným faktorem je fyzická zátěž organismu před odběrem, která může ovlivnit koncentraci glukózy, aspartátaminotransferázy (AST), laktátdehydrogenázy (LDH), kreatinkinázy (CK), laktátu a mastných kyselin. Při dlouhodobé zvýšené fyzické zátěži dochází k poklesu glykémie, zvýšení hladiny kreatininu a laktátu a snížení hladiny cholesterolu a triacylglycerolů. Dalšími ovlivnitelnými faktory jsou mechanické trauma, vliv léků nebo stres. Jako neovlivnitelné faktory řadíme věk, pohlaví, rasu a biologické rytmy. Při odběru krve je nutné brát zřetel na načasování odběru, polohu pacienta, doba zatažení paže turniketem a volba odběrového systému (Švagera a Šigutová, 2013).

5.1 Příklad preanalytických a analytických podmínek při stanovení glukózy

Stanovení glukózy se obvykle provádí z plazmy nebo plné krve. Pro odběr se doporučuje zkumavka s antiglykolytickou přísadou NaF a dále s antikoagulanty K₂EDTA, heparin, oxalát nebo citrónan. Stanovení z plné krve bez antiglykolytických přísad je nutné provést ihned po odběru, protože dochází k úbytku glukózy o 5-7% za hodinu. V odběru s antiglykolytickou přísadou dochází také k úbytku glukózy, ale zde se jedná o glukózu kovalentně vázanou na proteiny. Je nutná správná interpretace výsledků, protože se liší koncentrace glukózy v plné krvi a plazmě. V plné krvi je koncentrace průměrně nižší o 10 až 15%. Koncentrace glukózy v odběru z arterie je o 5 až 10% vyšší než v odběru venózním. Vzorek pro stanovení glukózy v séru bez antiglykolytické přísady je nutné zpracovat do jedné hodiny po odběru, tzn. oddělit sérum od krevních elementů. Stabilita vzorku pro stanovení glukózy z plazmy je 24 h

při teplotě 18-26°C (Fons, 2007).

Pro stanovení glukózy se využívá spektrofotometrie. Nejčastěji se využívá stanovení s glukózaoxidázou (GOD) a peroxidázou (POD), založené na oxidaci glukózy na D-glukonolakton a peroxid vodíku. Některá spektrofotometrická stanovení využívají pro katalýzu hexokinázu. Další využívanou metodou je reflexní fotometrie. Tato metoda je využívána při stanovení glukózy glukometry. Využívá se také metody ampérometrického měření a referenční metoda ID-GC/MS. Základem této metody je přidání glukózy se značeným uhlíkem ^{14}C (Fons, 2007).

Pro zjištění dlouhodobého průměru hladiny glukózy v krvi je možné využít stanovení glykovaného hemoglobinu. Hodnotu tohoto stanovení je možné využít pro zjištění poruchy glukózové homeostázy (Friedecký et al., 2015).

5.2 Příklad preanalytických a analytických podmínek při stanovení krevních lipidů

Mezi standardní vyšetření krevních lipidů patří celkový cholesterol, triacylglyceroly (TAG), HDL cholesterol a LDL cholesterol. LDL cholesterol je možné přímo měřit nebo vypočítat podle Friedewaldova vzorce s podmínkou, že hladina TAG nepřesáhne 4,5 mmol/l (Friedewald et al., 1972). Tato stanovení lze doplnit o výpočty non-HDL cholesterol a remnantní cholesterol. Hodnotu non-HDL cholesterolu získáme odečtením hodnoty HDL-cholesterolu od hodnoty celkového cholesterolu. Hodnotu remnantního cholesterolu získáme odečtením HDL a LDL cholesterolu od celkové hodnoty cholesterolu. Jedná se o cholesterol na lipoproteinech bohatých triglyceridů. Pro krevní lipidy jsou stanoveny referenční meze při odběru nalačno. Hlavním důvodem bylo zvyšování hladiny triglyceridů v závislosti na příjmu potravy. Doporučení ČSKB ohledně odběrů pro stanovení krevních lipidů se zabývá otázkou, zda je nutný odběr nalačno. Odběr bez lačnění nevylučuje, ale upozorňuje na změnu hladiny TAG oproti odběru nalačno. Také pro výpočet hodnoty LDL-cholesterolu doporučuje upřednostnit odběry nalačno (Soška et al., 2017). ČSKB a ČSAT doporučuje u krevních lipidů nahradit referenční meze na výsledkových listech hodnotícími mezemi, které uvádí ve svém doporučení pro prevenci a léčbu kardiovaskulárních onemocnění. Je zde také kladen důraz na individuální přístup k pacientům při interpretaci výsledků, např. zhodnocení rizikových faktorů a hladiny jednotlivých krevních lipidů vůči ostatním (Soška et al., 2010).

V preanalytická fázi pro stanovení cholesterolu je důležité nepřekračovat dobu

komprese vény přes 3 minuty. Delší použití manžety by mohlo ovlivnit hladinu cholesterolu. Doba od odběru do zpracování vzorku by neměla přesáhnout 4 h. Koncentrace cholesterolu v krvi je ovlivněna věkem pacienta, dietou, pohlavím a menstruačním cyklem. Pro stanovení HDL-cholesterolu je vhodná třítydenní dieta před odběrem a separace krevních elementů do 2-3 hodin po odběru. Pro stanovení TAG je nutná separace plazmy do dvou hodin po odběru krve (Fons, 2007). Zvýšení hladiny TAG může způsobit požití alkoholu i několik dní po konzumaci. Dále je nutné brát zřetel na závažné akutní choroby, které mohou výsledky cholesterolu ovlivnit i dva měsíce po prodělání nemoci (Zima a kol., 2007).

Nejvyžívanější metodou v praxi pro stanovení cholesterolu a TAG jsou enzymové metody. Jako referenční metoda pro stanovení cholesterolu se využívá izotopová diluce s hmotnostní spektrofotometrií (Fons, 2007).

6 Stanovované analyty

V poslední kapitole teoretické části bych ráda v krátkosti uvedla stanovované analyty.

Albumin

Albumin je bílkovina produkovaná hepatocyty a tvoří největší podíl z celkového množství bílkovin v lidské krvi. Zvýšení hladiny albuminu je obvykle důsledkem dehydratace. Snížení hladiny albuminu může být způsobeno různými příčinami, jako např. onemocněním ledvin, onemocněním jater, malabsorpcí, malnutricí, infekcí nebo nádorovým onemocněním (Ambrožová, 2017a).

Alkalická fosfatáza (ALP)

ALP se vyskytuje prakticky ve všech tkáních těla. Její koncentrace je zvýšena v osteoblastech, hepatocytech, placentě, ledvinách, střešní stěně a v mléčných žlázách v laktaci. ALP vyskytující se v séru zdravých dospělých jedinců pochází obvykle z hepatocytů. U dětí a dospívajících osob může být zvýšena o množství pocházející z kostí. Tato skutečnost se projevuje zvýšením rozsahu referenčních hodnot u těchto skupin. Hodnota ALP může být také zvýšena u těhotných žen. Patologická příčina zvýšení hladiny ALP nastává při onemocnění jater a žlučových cest, kostí, ledvin, štítné žlázy nebo trávicího ústrojí. Dále může být zvýšena u pacientů s Hodgkinovým lymfomem, leukémií, mononukleózou nebo sarkoidózou. Snížení hladiny ALP může být způsobeno hypotyreózou, těžkou anemií nebo hypofosfatasémií (Ambrožová,

2017b).

Alaninaminotransferáza (ALT)

ALT je enzym, který je přítomný v mnoha tkáních, ale nejvyšší hodnoty koncentrace se vyskytují v játrech a ledvinách. Při poškození tkáně je tento intracelulární enzym uvolněn do krevního řečiště. Zvýšení hladiny ALT nastává při onemocnění jater, jako je hepatitida, mononukleóza a cirhóza (Ambrožová, 2017c).

Aspartátaminotransferáza (AST)

AST je nitrobuněčný enzym, vyskytující se v nejvyšších koncentracích ve tkáních srdce, jater, svalů a ledvin. Poškození těchto tkání může zapříčinit zvýšení koncentrace AST v séru. Zvýšení hladiny tohoto enzymu může být dále způsobeno infarktem myokardu, těžkou angínou, onemocněním jater, onemocněním kosterního svalstva, křečemi, tepelným šokem, popáleninami, akutní pankreatitidou, intenzivním cvičením, toxickým šokem, mozkovým infarktem a traumaty. Snížení hladiny může nastat při urémii, nedostatku vitamínu B a po některých lécích (Ambrožová, 2017d).

Bilirubin

Většinové množství bilirubinu vzniká rozkladem červených krvinek zejména ve slezině. Zde dochází k odstranění železa z hemové skupiny a přeměně na bilirubin. Nižší podíl z celkového množství bilirubinu vzniká rozpadem myoglobinu a cytochromů a katabolismem nezralých červených krvinek v kostní dřeni. Vzniklý bilirubin je navázán na albumin a transportován do jater. Tento bilirubin je označován jako nepřímý nebo nekonjugovaný bilirubin, který je v játrech konjugován kyselinou glukuronovou. Tento konjugovaný neboli přímý bilirubin je přenesen do zažívacího traktu, kde je téměř všechen metabolizován. Koncentrace celkového bilirubinu je zvýšena při onemocnění jater, hemolytickém onemocnění a některých vrozených enzymových deficitech (Ambrožová, 2017e).

Glukóza

Glukóza je hlavním zdrojem energie pro buňky v těle. Po přijetí z potravy je v játrech přeměněna na glykogen nebo na mastné kyseliny, které jsou uloženy v tukové tkáni. Koncentrace glukózy v krvi je udržována hormony, které jsou z velké části produkovány pankreatem. Nejčastější příčinou zvýšení hladiny glykémie je nedostatečná sekrece nebo účinnost inzulínu, tzv. diabetes mellitus. Dalšími příčinami hyperglykémie jsou pankreatitis, dysfunkce štítné žlázy, renální poškození a jaterní

choroby (Ambrožová, 2017f).

Cholesterol

Cholesterol je přijímán z potravy a přibližně tři čtvrtiny jsou syntetizovány všemi buňkami těla. Slouží pro výstavbu membrán a vznik lipoproteinů, steroidních hormonů a žlučových kyselin. V plasmě se vyskytuje ve formě volné, neesterifikované a esterifikované s nenasycenými mastnými kyselinami. Měří se obě formy dohromady, jako celkový cholesterol. Cholesterol v plasmě je velmi špatně rozpustný ve vodném prostředí, proto je transportován v komplexech s apolipoproteiny. Vyšší množství cholesterolu transportují lipoproteiny o nízké hustotě (LDL), zbývající množství lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL), velmi nízké hustotě (VLDL) a chylomikrony. Cholesterol je stanovován pro hodnocení rizika aterosklerózy. Dále je stanovení koncentrace cholesterolu důležité při metabolických poruchách lipidů a lipoproteinů (Ambrožová, 2017g).

Kyselina močová

Kyselina močová je konečným produktem rozkladu nukleových kyselin. V plasmě se vyskytuje kyselina močová částečně volná a částečně vázaná na albumin nebo specifický globulin. Část volné kyseliny močové je vyloučena do moči a přibližně jedna třetina je vyloučena střevy. Abnormální hladina kyseliny močové naznačuje poruchu přeměny purinů, nukleových kyselin nebo nukleoproteinů. Zvýšená hladina může být pozorována při renální dysfunkci, dně, leukémii, polycytémii, ateroskleróze, diabetu, hypotyreóze nebo při některých genetických onemocněních. Se sníženou hladinou močovou se setkáváme u pacientů s Wilsonovou chorobou (Ambrožová, 2017h).

Lipoproteiny

Plasmatické lipoproteiny jsou částice obsahující cholesterol, triacylglyceroly, fosfolipidy a proteiny v různém množství. Vnější část je složena fosfolipidy, neesterifikovaným cholesterolem a proteiny. Vnitřní část obvykle obsahuje esterifikovaný cholesterol, a triacylglycerol (TAG). Tyto sférické částice umožňují transport cholesterolu a TAG krevním řečištěm. Rozdělení lipoproteinů je na základě podílu proteinů a lipidů a určuje jejich hustotu. Čtyři základní typy jsou chylomikrony, lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL), lipoproteiny o nízké hustotě (LDL) a lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL). Hlavní funkcí HDL cholesterolu je transport cholesterolu z periferních tkání do jater. Nízká hladina HDL cholesterolu je spojena

s rizikem vzniku koronárních srdečních onemocnění (Ambrožová, 2017ch).

Močovina

Močovina je konečným produktem rozkladu bílkovin v játrech. Velká část je vyloučena močí. Zbytek močoviny je štěpen bakteriemi v gastrointestinálním traktu na amoniak. Hladina močoviny je vyšetřována při akutní nebo chronické nedostatečnosti ledvin, pro stanovení bilance dusíku nebo monitorování pacienta v dialyzačním programu (Ambrožová, 2017i).

Triacylglyceroly (TAG)

TAG nebo také triglyceridy náleží do skupiny lipidů získaných z potravy. Jedná se o estery trojsytného alkoholu glycerolu. V lidském zásobním tuku jsou to obvykle nerozvětvené monokarboxylové kyseliny s velikostí řetězce 16-18 uhlíků. V krvi jsou tyto lipidy vázány na lipoproteiny, jedná je především o chylomikrony a lipoproteiny o velmi nízké hustotě. Stanovení hladiny TAG se využívá pro screening rizika koronárního onemocnění a dále při diagnostice a léčbě hyperlipidemií (Ambrožová, 2017j).

Proteiny celkové

Syntéza plazmatických proteinů probíhá v játrech, lymfatických orgánech, plazmatických buňkách a kostní dřeni. Významem těchto bílkovin je udržení osmotického tlaku plazmy, transport lipidů, aminokyselin, hormonů a dalších důležitých látek. Chorobný stav může způsobit výrazné změny poměru celkových proteinů a jednotlivých frakcí. Hypoproteinémie může být způsobena onemocněním ledvin, krvácením, poruchou vstřebávání proteinů v tenkém střevě, rozsáhlými popáleninami nebo také nedostatkem proteinů. Zvýšení koncentrace plazmatických proteinů může nastat např. při závažné dehydrataci, mnohočetném myelomu chronickém zánětu nebo sarkoidóze. Významné změny v poměru celkových proteinů a jednotlivých frakcí mohou nastat při cirhóze jater, akutních či chronických infekcích, některých onemocněních ledvin, akutní hepatitidě či lupus erythematodes (Ambrožová, 2017k).

Fosfor

V lidském organismu se fosfor nachází v kostech v podobě fosfátů vápníku, buňkách svalů a vnitřních orgánech. Zde je ve formě fosfolipidů, nukleových kyselin a ATP. V séru se nachází volný, vázaný na proteiny nebo ve vazbě s vápníkem a hořčíkem ve formě anorganických fosfátů a organicky vázané kyseliny fosforečné. Fosfor přechází

do buněk měkkých tkání při potřebě metabolických a energetických procesech a naopak se vyplavuje z buněčných prostor při katabolických procesech. Snížení hladiny vápníku a zvýšení hladiny parathormonu a vitamínu D způsobí vyplavení fosforu z kostí. Zvýšená hladina fosforu v séru může být dále způsobena sníženou glomerulární filtrací fosfátů. Snížená hladina fosforu je obvykle zjištěna při křivici nebo hyperparathyroidismu (Ambrožová, 2017l).

Sodík

Jedná se o kationt extracelulární tekutiny. V těle je využit pro normální distribuci vody a pro udržení osmotického tlaku. Nízké koncentrace sodíku mohou být způsobeny sníženým příjmem z potravy, zvýšeným příjmem diuretik, dlouhodobým zvracením nebo metabolickou acidózou. Zvýšená koncentrace může být zjištěna u jedinců s Cushingovým syndromem nebo při závažné dehydrataci (Ambrožová, 2018).

Kalium

Kalium je hlavním kationtem v buňce. Jeho koncentrace v erytrocytu je přibližně 23x vyšší než v plazmě, proto je nutné zpracovávat pouze nehemolytické vzorky. Snížení množství draslíku v plazmě může být způsobeno nedostatečným příjmem z potravy nebo změnou přerozdělení mimobuněčného draslíku. Příčiny zvýšení koncentrace draslíku mohou být následkem nevhodné intravenózní terapie, dehydratace, šoku, diabetické ketoacidózy nebo popálenin (Ambrožová, 2018).

Chloridy

Tyto anionty jsou součástí extracelulární tekutiny. Obvykle jsou přijímány potravou a vylučovány s dalšími ionty močí. Nízká hladina chloridů je obvykle naměřena při dlouhodobém zvracení, metabolické acidózy nebo onemocnění ledvin. Příčina zvýšení množství chloridů v plazmě může být metabolická acidóza, onemocnění ledvin nebo hyperparatyreóza (Ambrožová, 2018).

Gama-glutamyl transferáza (GGT)

GGT je enzym, který katalyzuje přenos gama-glutamylové skupiny z gama-glutamylpeptidů na jiné peptidy, aminokyseliny nebo vodu. Vyskytuje se ve všech tkáních, zvláště v membránách buněk s vysokou absorpční nebo sekreční schopností. Většinové množství GGT nacházející se v séru pochází z jater a žlučových cest, proto je tento analyt ordinován při diagnostice a monitorování hepatobiliárních onemocnění (Ambrožová, 2017m).

Kreatinin

Kreatinin vzniká dehydratací kreatinu v organismu, který je uložen ve svalové tkáni v podobě kreatinfosfátu. Tento kreatinfosfát je v těle využíván pro regeneraci ATP. Kreatinin odchází z organismu pomocí glomerulární filtrace, proto je zvýšení hladiny kreatininu spojeno se sníženou funkcí ledvin (Ambrožová, 2017n).

Celkový vápník

V organismu je většinové množství vápníku uloženo v kostech. V lidském séru se nachází jako volný nebo komplexně vázaný dvojmocný iont. Pro organismus je nezbytný v koagulační kaskádě, metabolismu kostí, aktivaci enzymů, řízení koncentrační schopnosti ledvin, pro snížení permeability buněčné membrány a neuromuskulární dráždivost. Hyperkalcémie nastává při neúměrném příjmu vápníku potravou, neúměrném uvolňování z kostí nebo při poruše ledvinových funkcí. Naopak hypokalcémie může být důsledkem sníženého přívodu nebo zvýšené spotřeby vápníku v organismu, dále např. poruchy endokrinní regulace (Ambrožová, 2017o).

Cholinesteráza (CHE)

Tento enzym je syntetizován v hepatocytech a je vylučován do krevní plasmy. Jeho koncentrace v krevní plasmě je tedy využívána pro sledování chronických onemocnění jater nebo pro určení rozsahu jejich akutního poškození (Masopust, 1998).

7 Cíl práce

Cílem této práce je ověření dosud interpretovaných referenčních mezí základních biochemických vyšetření oddělením Klinické biochemie a hematologie v Nemocnici Prachatice a.s. Do základních biochemických metod jsem zahrnula celkem 20 základních biochemických metod, a to stanovení glukózy, celkového bilirubinu, natria, kalía, chloridů, kalcia, fosforu, močoviny, kreatininu, kyseliny močové, ALT, AST, GGT, ALP, cholinesterázy, celkového cholesterolu, lipoproteinů o vysoké hustotě, triacylglycerolů, celkových proteinů a albuminu.

8 Metodika

8.1 Analýza vzorků

Jako referenční jedince jsem použila dvacet náhodně odebraných vzorků dárcům krve z transfúzní stanice, z důvodu edukace dárců před odběrem i jejich výběru do systému dárců. Odběry byly provedeny do zkumavky pro srážlivou krev s gelem proškolenými pracovníky transfúzní stanice, byly ihned transportovány do laboratoře a zpracovány při teplotě 15-25°C. Po příjmu byla provedena centrifugace 3000 r.p.m. po dobu 10 minut. Dále byla všechna séra analyzována pomocí přístroje Architect c8000 od firmy Abbott. Všechna měření byla provedena pod vedením oprávněné osoby. Analyzátor byl před měřením vzorků nakalibrován a kalibrace všech metod byly ověřeny pomocí dvou hladin certifikovaného referenčního kontrolního materiálu Omni CORE. Pro stanovení hladin analytu byly použity následující principy metod:

Albumin

Principem metody stanovení albuminu v séru je navázání bromkresolové zeleně na lidský albumin za vzniku barevného komplexu, jehož množství je přímo úměrné koncentraci albuminu v séru. Komplex je stanoven spektrofotometricky při 628 nm.

Alkalická fosfatáza (ALP)

Metoda využívá hydrolýzy bezbarvého p-nitrofenylfosfátu za vzniku žlutého p-nitrofenolu. Tato reakce je katalyzována alkalickou fosfatázou. Měřená absorbance při 404nm je přímo úměrná aktivitě alkalické fosfatázy ve vzorku.

Aspartátaminotransferáza (AST)

AST katalyzuje reakci L-aspartátu na 2-oxoglutarát za vzniku oxalacetátu, která se za přítomnosti NADH redukuje na L-malát. Měření je pokles absorbance při vlnové délce 340nm.

Celkový bilirubin

Využívá se reakce konjugovaného i nekonjugovaného bilirubinu s diazoreagencií, za přítomnosti povrchově aktivní látky. Nárůst absorbance při vlnové délce 548 nm je přímo úměrný koncentraci celkového bilirubinu.

Glukóza

Principem stanovení glukózy je její fosforylace hexokinázou za přítomnosti adenosintrifosfátu a iontů hořčíku za vzniku glukóza-6-fosfátu, která je dále oxidován

na glukonát-6-fosfát. Tato reakce je spřažena s redukcí NAD^+ na NADH. Množství vzniklého NADH je přímo úměrné množství spotřebované glukózy. Vzniklý NADH absorbuje při vlnové délce 340 nm a je detekován spektrofotometricky.

Cholesterol

Základem stanovení je enzymatická hydrolyza esterů cholesterolu ve vzorku na cholesterol a volné mastné kyseliny. Volný cholesterol, včetně původně přítomného cholesterolu je dále oxidován na cholest-4-en-3-on a peroxid vodíku. Peroxid vodíku dále reaguje s kyselinou hydroxybenzoovou a 4-aminoantipyrinem za vzniku chromoforu, který je měřen při vlnové délce 500 nm.

Kyselina močová

Základem tohoto stanovení jsou dvě reakce. První je oxidace kyseliny močové urikázou za vzniku peroxidu vodíku. Dále reaguje peroxid vodíku za přítomnosti peroxidázy s dalšími reaktanty za vzniku chinoniminového činidla. Výsledná změna absorbance při vlnové délce 604nm je přímo úměrná koncentraci kyseliny močové.

Ultra HDL Cholesterol

Tato metoda je založena na reakci cholesteroloxidázy s non-HDL neesterifikovaným cholesterolem a na selektivním rozpouštění HDL cholesterolu za použití specifického detergentu. Vzniká chromogen, který je kvantifikován při vlnové délce 604 nm.

Močovina

Test funguje na principu kinetické metody. Močovina ve vzorku je hydrolyzována ureázou na amoniak a oxid uhličitý. Dále amoniak a α -oxoglutarát reaguje na glutamát a vodu za souběžné oxidace NADH. Na 1 mol močoviny se oxidují dva moly NADH. Počáteční rychlost poklesu absorbance měřené při vlnové délce 340 nm je úměrná koncentraci močoviny ve vzorku.

Triglyceridy (TAG)

Zde je principem několik následných enzymatických reakcí triacylglycerolu za vzniku dihydroxyacetonfosfátu a peroxidu vodíku. Následuje reakce peroxidu katalyzovaného peroxidázou za vzniku červeného barviva. Absorbance tohoto barviva je přímo úměrná koncentraci triacylglycerolů přítomných ve vzorku.

Proteiny

Reakce pro stanovení proteinů probíhá v alkalickém prostředí s měďnatými ionty.

Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci proteinu. Stanovuje se měření nárůstu absorbance při 572 nm.

Fosfor

Pro stanovení anorganických fosfátů se využívá reakce s molybdenanem amonným za vzniku komplexu, který je poté měřen při vlnové délce 340 nm. Naměřená absorbance je přímo úměrná hladině anorganického fosforu ve vzorku.

Natrium, kalium, chloridy

Sodné, draselné a chloridové ionty byly stanoveny pomocí iontově selektivní elektrody, která využívá selektivní membrány pro jednotlivé ionty. Mezi referenční a měřicí elektrodou vzniká elektrický potenciál, jehož hodnota je porovnána s předem stanoveným napětím pro kalibrátor a převedena na koncentraci iontu.

Gamaglutamyltransferáza (GGT)

Test využívá reakce kde GGT katalyzuje přenos gama-glutamyllové skupiny z donoru na akceptor za vzniku 3-karboxy-4-nitroanilinu. Rychlost nárůstu absorbance při vlnové délce 412 nm je přímo úměrná množství GGT ve vzorku.

Kreatinin

Základem stanovení je reakce kreatininu ve vzorku s pikrátem v alkalickém prostředí za vzniku kreatinin-pikrátového komplexu. Rychlost tvorby komplexu, měřená jako nárůst absorbance při vlnové délce 500 nm, je přímo úměrná koncentraci kreatininu ve vzorku.

Celkový vápník

Principem stanovení vápníku je fotometrie. Vápník reaguje s barvivem arsenazo III v kyselém prostředí za vzniku nachového komplexu. Vzniklé zbarvení se měří při vlnové délce 660 nm.

Alaninaminotransferáza (ALT)

ALT přítomná ve vzorku katalyzuje přenos aminoskupiny z L-alaninu na 2-oxoglutarát. Za přítomnosti pyridoxal-5-fosfátu vzniká pyruvát a L-glutamát. Pyruvát se za přítomnosti NADH a laktátdehydrogenázy redukuje na L-laktát. Při této reakci se NADH oxiduje na NAD. Tato reakce je monitorována měřením rychlosti poklesu absorbance při vlnové délce 340 nm.

Cholinesteráza

Principem testu pro stanovení hladiny cholinesterázy je její katalytické působení v hydrolytické reakci butyrylthiocholinu za vzniku butyrátu a thiocholinu. Thiocholin redukuje trojmocné železo, které je přítomné v reakční směsi. Katalytická koncentrace cholinesterázy je přímo úměrná intenzitě zbarvení výsledné směsi a je měřena při 405 nm.

Měření všech hodnot bylo vždy provedeno dvakrát a pro zpracování výsledků byl použit průměr těchto dvou hodnot. Pro zjištění rozložení hodnot byl využit Kolmogorov-Smirnov test s 10% hladinou významnosti a pro každý analyt byl vypracován frekvenční histogram.

8.2 Postup pro ověření referenčních mezí

Bylo vybráno dvacet referenčních jedinců, u kterých byly stanoveny hodnoty základních biochemických metod. Hodnoty byly porovnány s referenčními intervaly. Vzhledem k tomu, že u některých metod byly více než dvě hodnoty mimo referenční interval, nemohl být referenční interval považován za verifikovaný. Následoval nový výběr referenčních jedinců. Vzhledem k předchozímu neúspěchu byli jedinci vybráni při splnění kritérií vybraných laboratorních ukazatelů. Hodnota určitého ukazatele byla považována za „zdravou“, pokud hodnoty ukazatelů stejné funkce byly v referenčním intervalu. Tedy např. hodnota sodného kationtu byla považována za normální, pokud ostatní hodnoty renálních ukazatelů byly v referenčním intervalu. Takto bylo vybráno dalších 20 referenčních jedinců, u kterých byly opět stanoveny základní biochemické analyty. Pokud bylo více než dvě hodnoty každého analytu mimo referenční interval, pak nebyl tento interval verifikován. Pokud nebylo více než dvě hodnoty z původních dvaceti referenčních jedinců mimo referenční meze, pak se považoval referenční interval za verifikovaný.

9 Výsledky a diskuze

Pro měření jsem zařadila do skupiny dvaceti referenčních jedinců sedm žen a čtrnáct mužů ve věkovém rozmezí dvacet až šedesát tři let. Všechny naměřené hodnoty byly porovnány s referenčními intervaly pro dané pohlaví a věkovou skupinu a byly statisticky zpracovány. Dále je pro každou metodu posuzováno rozložení dané populace a stanovena nulová hypotéza, zda je toto rozložení je Gaussovské.

Glukóza

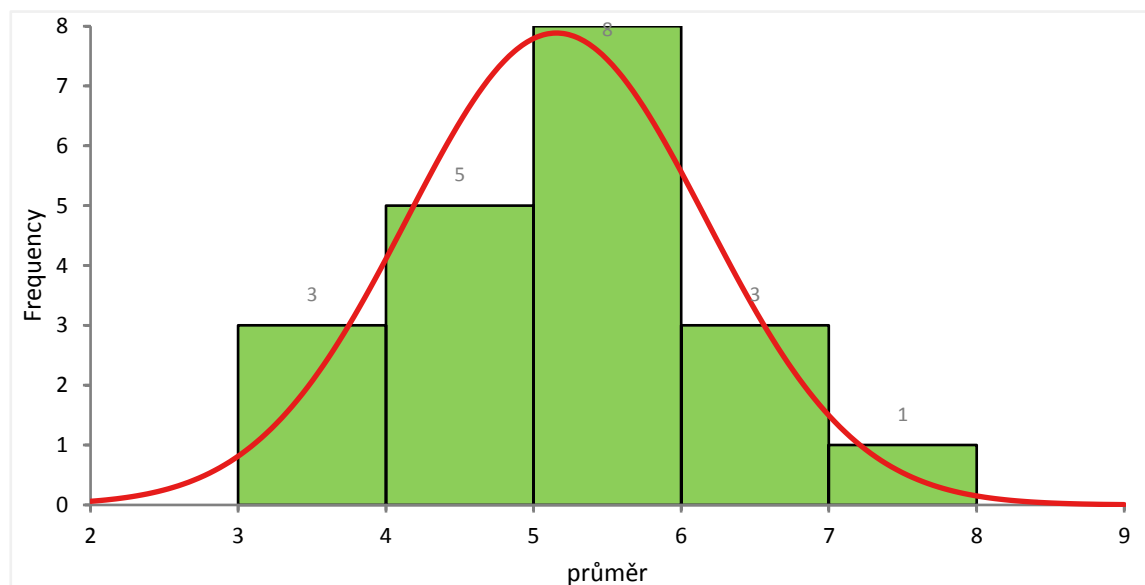
Ověřované referenční rozmezí: 3,30 – 5,59 mmol/l

Tab. č. 2. Naměřené hodnoty pro stanovení glukózy

pořadí měření	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
glukóza (mmol/l)	3,01	5,55	4,90	5,40	4,56	6,47	5,40	4,16	5,16	6,03
pořadí měření	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
glukóza (mmol/l)	5,01	5,39	3,97	4,69	5,75	5,35	6,48	7,33	4,75	3,78

Hodnoty ležící mimo RI jsou vyznačeny barvou.

Pro stanovení glukózy bylo zjištěno normální rozložení hodnocené populace, jak ukazuje obr. 1 a dále bylo zjištěno, že nelze odmítnout nulovou hypotézu na 10% hladině významnosti. Referenční meze pro glukózu nebyly zvoleným postupem ověřeny. Při měření ležely více než dvě hodnoty mimo referenční meze i při opakovaném měření. Tyto hodnoty nebyly důvodem změny referenčních mezí, protože jsme předpokládali nedůslednost referenčních jedinců při lačnění před odběrem.



Obr. 1. Rozložení naměřených hodnot glukózy

Celkový bilirubin

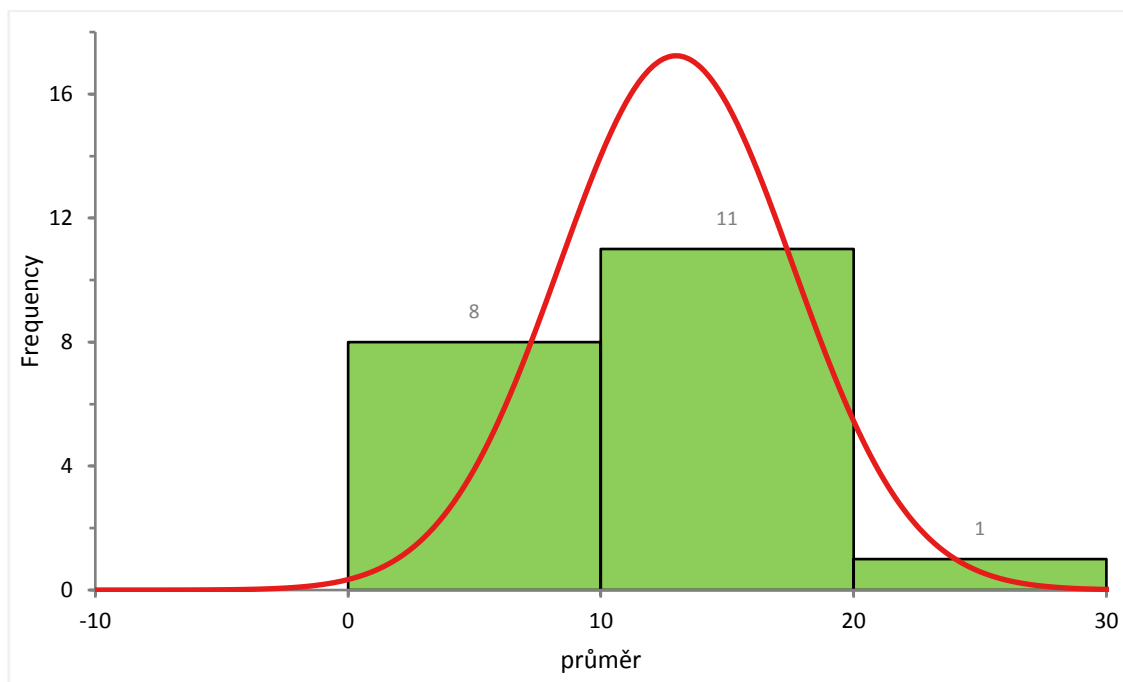
Ověřované referenční rozmezí: 3,40 – 20,5 $\mu\text{mol/l}$

Tab. č. 3. Naměřené hodnoty pro stanovení celkového bilirubinu

pořadí měření	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
celkový bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	17,2	9,3	9,0	18,5	8,8	10,8	9,1	16,4	21,8	5,3
pořadí měření	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
celkový bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	7,7	7,8	9,5	13,9	17,3	18,4	16,7	15,0	11,6	15,8

Hodnoty ležící mimo RI jsou vyznačeny barvou.

Populace referenčních jedinců má pro metodu celkového bilirubinu normální rozložení. Tato skutečnost je znázorněna na obr. 2. Nulovou hypotézu na 10% hladině významnosti nelze zamítnout. Původní referenční interval celkového bilirubinu byl ověřen. Pouze jedna hodnota z dvaceti měření byla mimo referenční meze.



Obr. 2. Rozložení naměřených hodnot celkového bilirubinu

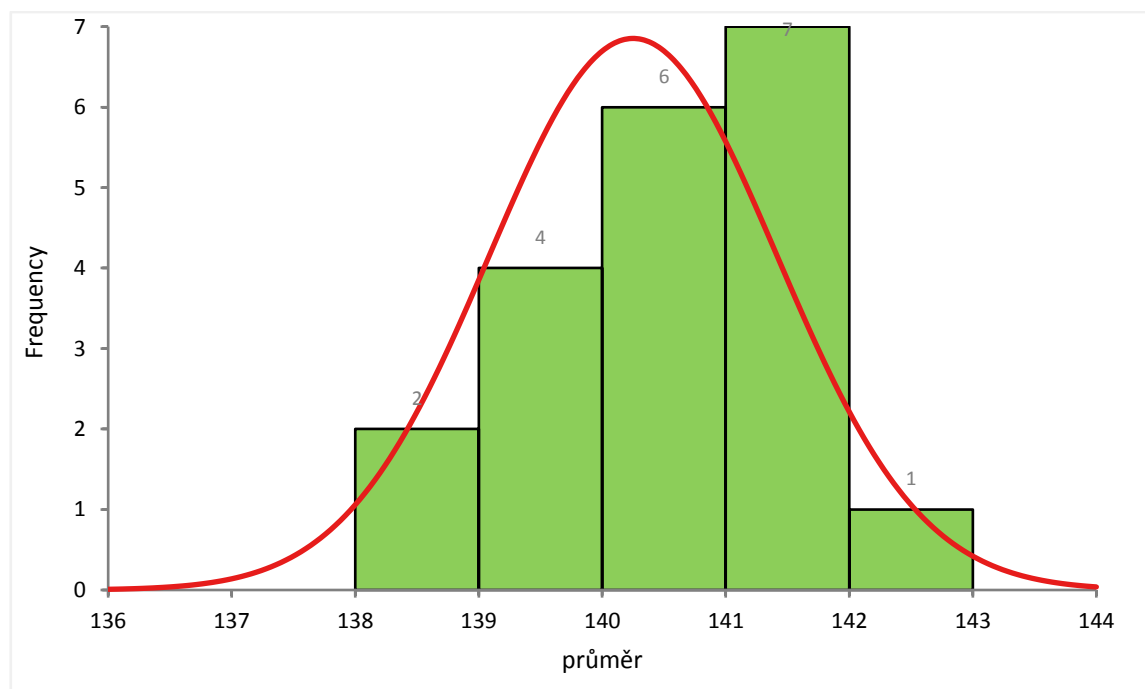
Natrium

Ověřované referenční rozmezí: 130-145 mmol/l

Tab. č. 4. Naměřené hodnoty pro stanovení natria

pořadí měření	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
natrium (mmol/l)	141	138	141	142	142	143	140	141	141	140
pořadí měření	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
natrium (mmol/l)	138	140	141	141	140	141	139	139	141	140

Referenční skupina pro stanovení natria měla normální rozložení, což je znázorněno na obr. 3. Nulová hypotéza tudíž nebyla zamítnuta na 10% hladině významnosti. Všechny naměřené hodnoty ležely v referenčním rozmezí, proto byl referenční interval považován za ověřený.



Obr. 3. Rozložení naměřených hodnot natria

Kalium

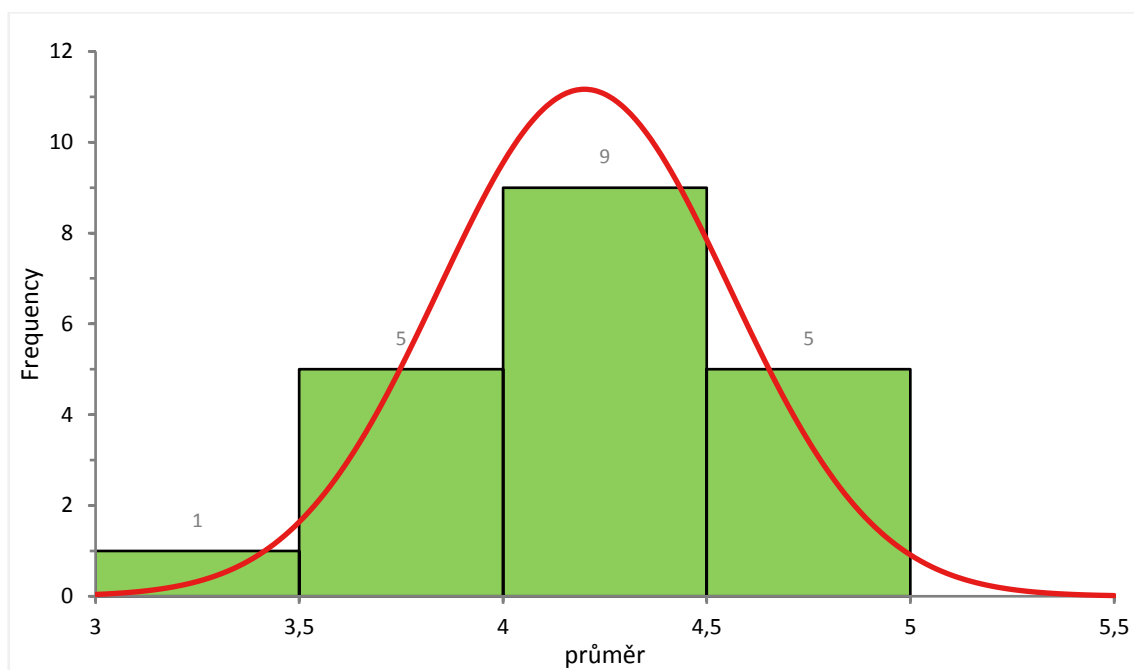
Ověřované referenční rozmezí: 3,8 -5,5 mmol/l

Tab. č. 5. Naměřené hodnoty pro stanovení kalia

pořadí měření	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
kalium (mmol/l)	4,00	4,05	3,40	4,50	3,90	4,30	4,10	3,90	3,95	4,85
pořadí měření	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
kalium (mmol/l)	4,10	4,40	4,45	4,25	4,10	4,50	3,95	3,90	4,90	4,50

Hodnoty ležící mimo RI jsou vyznačeny barvou.

Komogorův – Smirnovův test ukázal normální rozložení hodnot kalia referenčních jedinců, jak je znázorněno na obr. 4, proto nebyla zamítnuta nulová hypotéza na 10% hladině významnosti. Pro stanovení kalia byly také referenční meze ověřeny, pouze jedna hodnota ležela mimo interval.



Obr. 4. Rozložení naměřených hodnot kalia

Chloridy

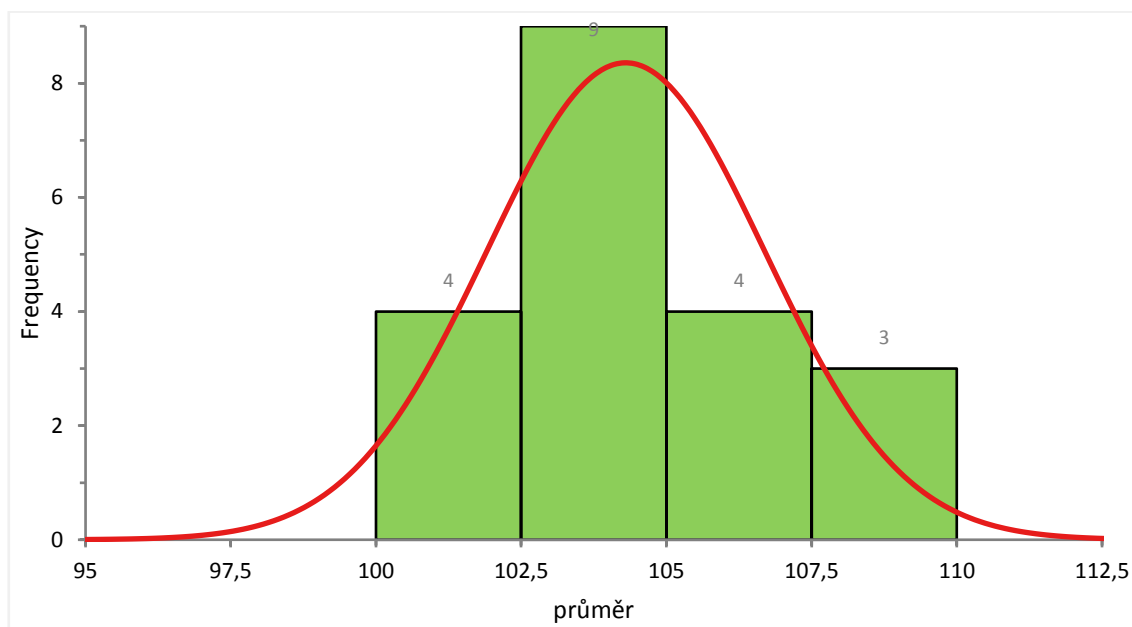
Ověřované referenční rozmezí: 97-108 mmol/l

Tab. č. 6. Naměřené hodnoty pro stanovení chloridů

pořadí měření	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
chloridy (mmol/l)	106	103	101	108	106	109	104	107	100	106
pořadí měření	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
chloridy (mmol/l)	102	105	108	103	105	104	103	102	104	104

Hodnoty ležící mimo RI jsou vyznačeny barvou.

Populace pro stanovení chloridů měla normální distribuci a nulová hypotéza na 10% hladině významnosti nebyla zamítnuta. Rozložení naměřených hodnot chloridů je znázorněno na obr. 5. Referenční interval pro stanovení chloridů byl považován za správně stanovený, protože z dvaceti jedinců byla pouze jednomu stanovena hodnota mimo rozmezí.



Obr. 5. Rozložení naměřených hodnot chloridů

Celkový vápník

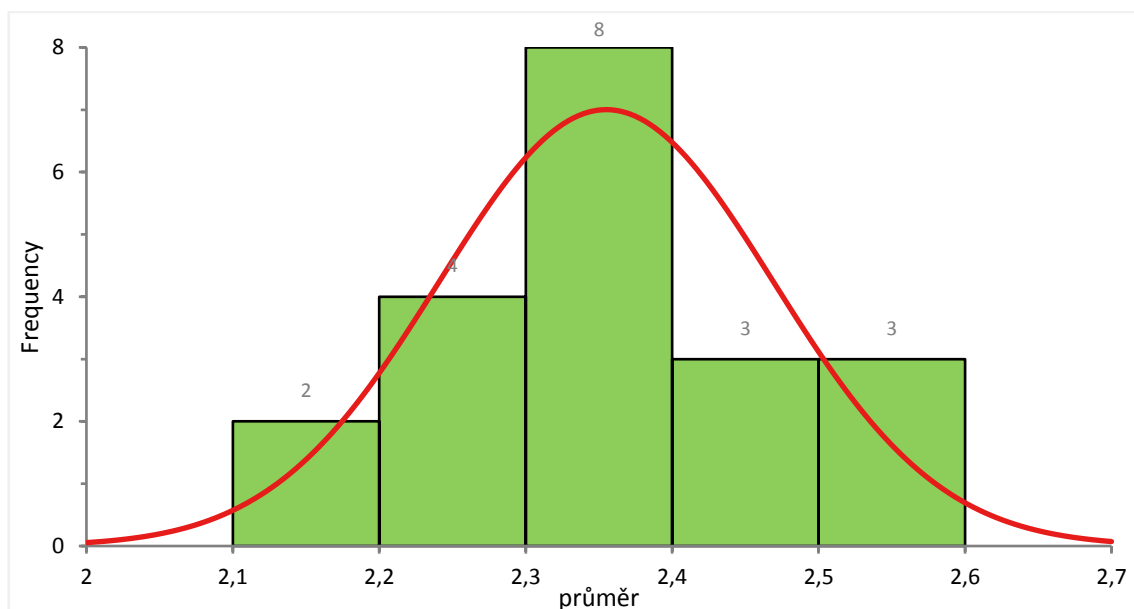
Ověřované referenční rozmezí: 2,10 - 2,55 mmol/l

Tab. č. 7. Naměřené hodnoty pro stanovení celkového vápníku

pořadí měření	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
celkový vápník (mmol/l)	2,28	2,39	2,54	2,30	2,48	2,17	2,41	2,24	2,53	2,41
pořadí měření	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
celkový vápník (mmol/l)	2,36	2,27	2,14	2,31	2,31	2,37	2,31	2,56	2,37	2,40

Hodnoty ležící mimo RI jsou vyznačeny barvou.

Distribuce hodnot kalcia byla normální, jak je znázorněno na obr. 6. Nulovou hypotézu toho stanovení na 10% hladině významnosti nelze zamítnout. Posouzené referenční rozmezí celkového kalcia ukázalo, že je určené správně. Pouze jedna hodnota neležela v referenční oblasti.



Obr. 6. Rozložení naměřených hodnot kalcia

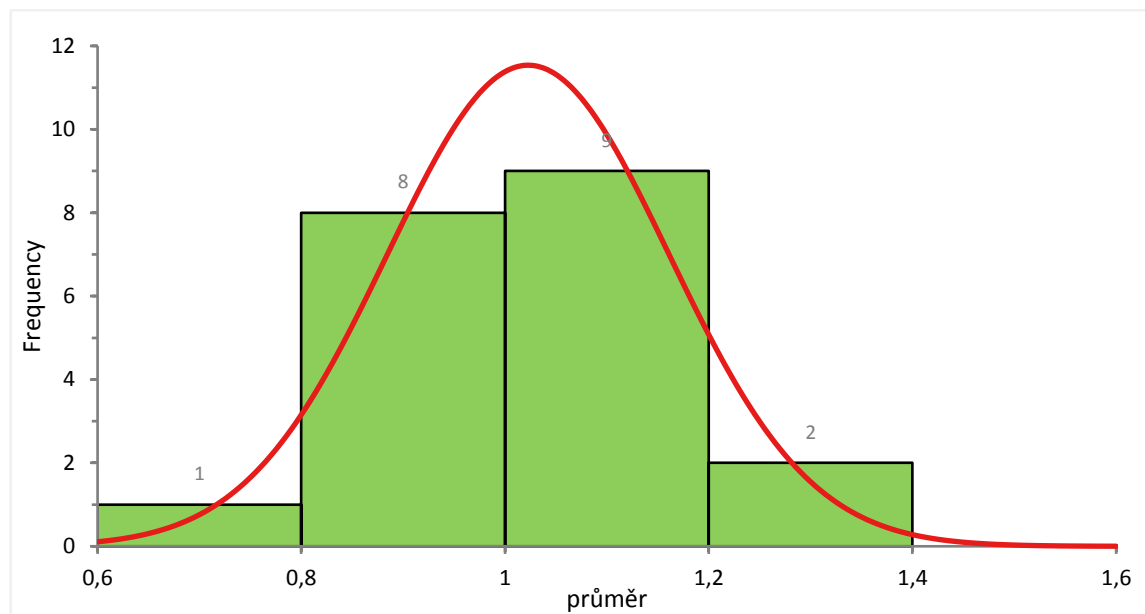
Fosfor

Ověřované referenční rozmezí: 0,74 – 1,52 mmol/l

Tab. č 8. Naměřené hodnoty pro stanovení fosforu

pořadí měření	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
fosfor (mmol/l)	1,15	0,97	0,84	0,99	1,29	0,97	1,04	1,19	1,09	0,77
pořadí měření	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
fosfor (mmol/l)	0,94	1,12	1,04	1,03	0,82	0,88	0,97	1,24	1,14	1,02

Ověření referenčních mezí fosforu rovněž prokázalo normální rozložení hodnot, tj. že nulovou hypotézu na 10% hladině významnosti nelze zamítnout. Toto zjištění je vyobrazeno na obr. 7. Interval byl považován za ověřený, protože se všech dvacet hodnot vyskytovalo uvnitř intervalu.



Obr. 7. Rozložení naměřených hodnot fosforu

Močovina

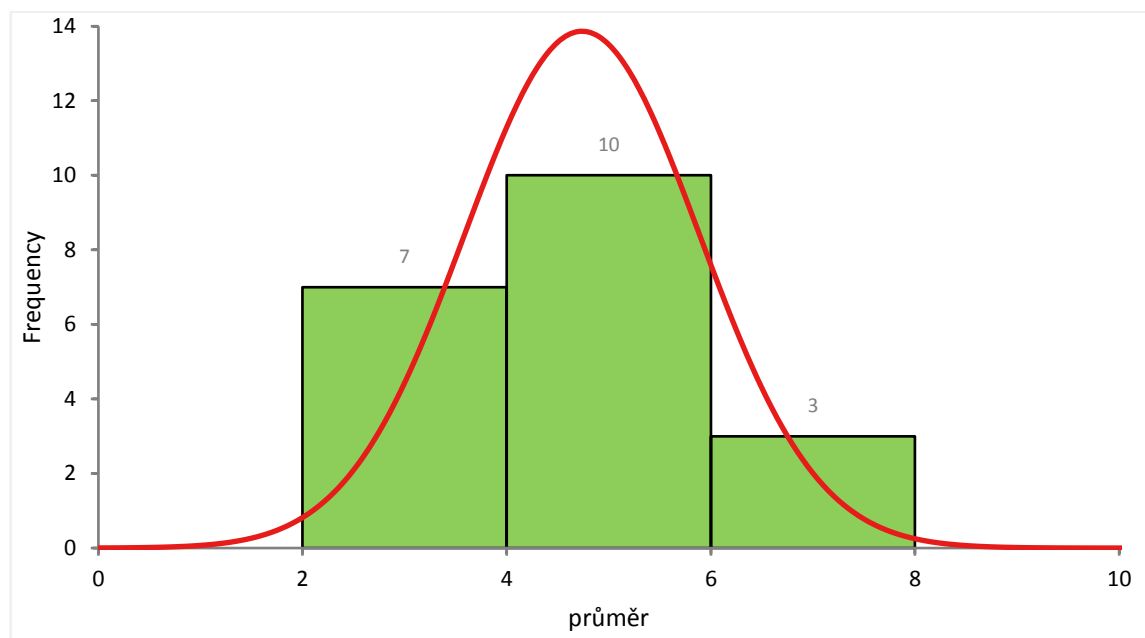
Ověřované referenční rozmezí: muži 2,8 – 8,3 mmol/l, ženy 2,0 – 6,7 mmol/l

Tab. č. 9. Naměřené hodnoty pro stanovení močoviny

pořadí měření	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
urea (mmol/l)	3,90	5,60	3,95	5,00	4,80	7,10	5,20	4,90	3,55	6,00
pořadí měření	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
urea (mmol/l)	2,80	4,25	4,55	5,55	3,60	4,25	6,85	5,65	3,30	3,95

Hodnoty naměřené ženám jsou podbarveny šedě.

Naměřené hodnoty močoviny měly normální rozložení, jak je ukázáno na obr. 8. Nulovou hypotézu tohoto stanovení nelze s 10% hladinou významnosti zamítnout. Referenční interval pro stanovení močoviny byl také přijat. Všechny naměřené hodnoty ležely uvnitř tohoto intervalu.



Obr. 8. Rozložení naměřených hodnot močoviny

Kreatinin

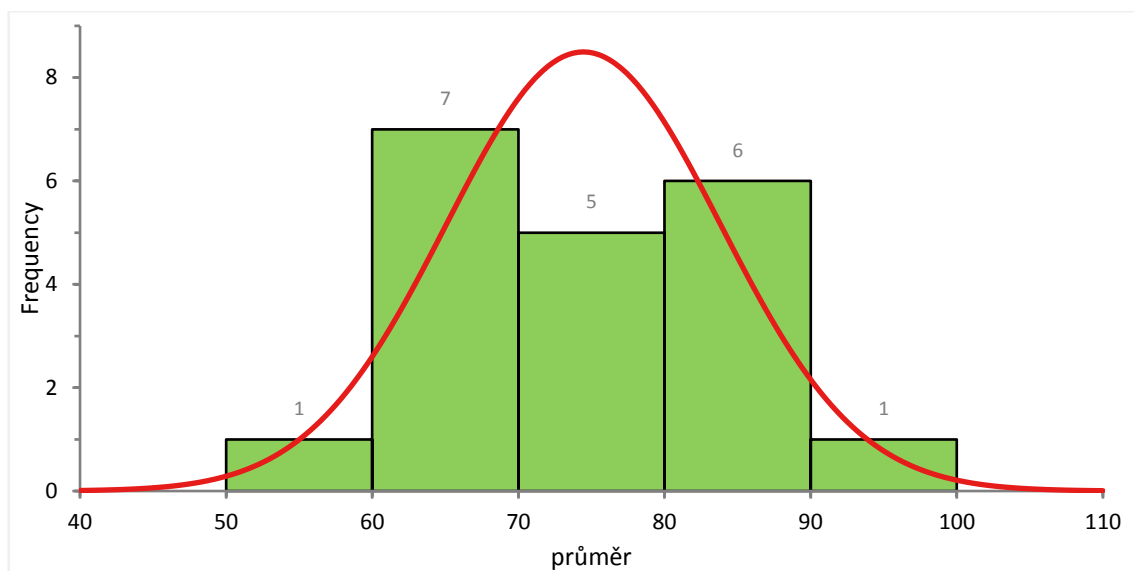
Ověřované referenční rozmezí: muži 64 -104 $\mu\text{mol/l}$, ženy 49 -90 $\mu\text{mol/l}$

Tab. č. 10. Naměřené hodnoty pro stanovení kreatininu

pořadí měření	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	65,0	81,5	68,5	69,5	64,5	85,0	84,0	65,0	69,5	80,5
pořadí měření	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	71,5	67,0	57,0	81,5	84,0	78,0	75,5	96,5	74,5	70,0

Hodnoty naměřené ženám jsou podbarveny šedě.

Pro stanovení kreatininu bylo zjištěno normální rozložení naměřených hodnot, jak ukazuje obr. 9, tj. že nelze zamítnout nulovou hypotézu na 10% hladině významnosti. Všechny naměřené hodnoty patřily do původního referenčního intervalu, proto byl považován za ověřený.



Obr. 9. Rozložení naměřených hodnot kreatininu

Kyselina močová

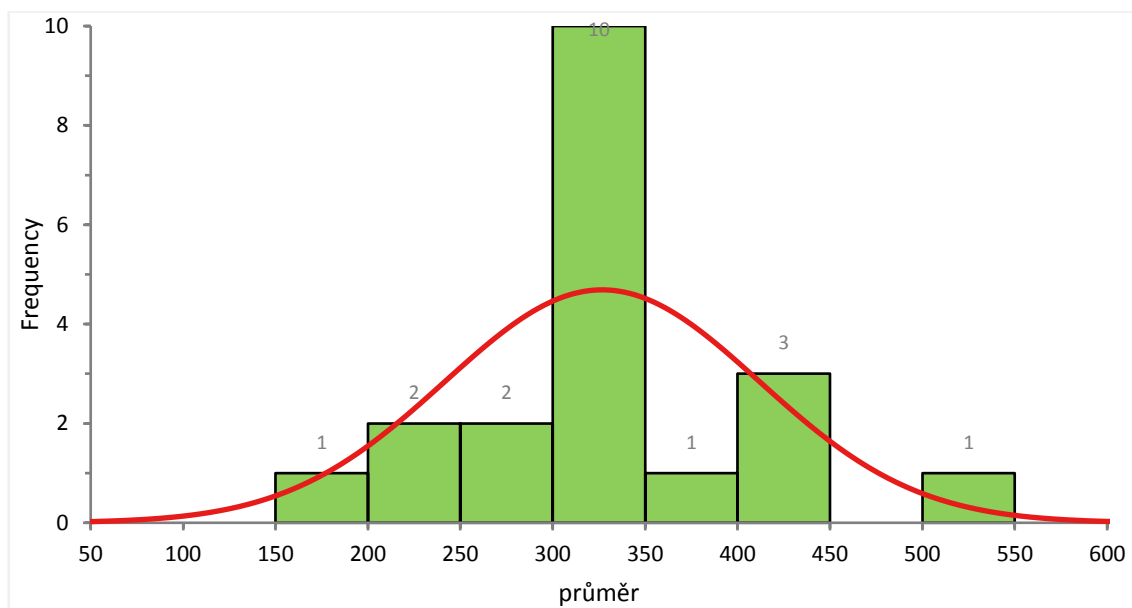
Ověřované referenční rozmezí: muži 210-420 $\mu\text{mol/l}$, ženy 15 – 350 $\mu\text{mol/l}$

Tab. č. 11. Naměřené hodnoty pro stanovení kyseliny močové

pořadí měření	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
kyselina močová ($\mu\text{mol/l}$)	158	324	281	420	261	323	305	312	361	309
pořadí měření	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
kyselina močová ($\mu\text{mol/l}$)	324	233	216	445	331	331	543	333	424	306

Hodnoty ležící mimo RI jsou vyznačeny barvou a hodnoty naměřené ženám jsou podbarveny šedě.

Naměřené hodnoty při ověření referenčních hodnot kyseliny močové neměly normální rozložení, jak ukazuje obr. 10, tj. nulová hypotéza byla na 10% hladině významnosti zamítnuta ve prospěch alternativní hypotézy. Pro stanovení kyseliny močové se nepodařilo interval ověřit. Z dvaceti naměřených hodnot bylo více než dvě mimo oblast ověřovaného intervalu i přes opakování ověření referenčních mezí. Důvodem bylo zřejmě nedodržení dietního režimu referenčních jedinců.



Obr. 10. Rozložení naměřených hodnot kyseliny močové

Alaninaminotransferáza (ALT)

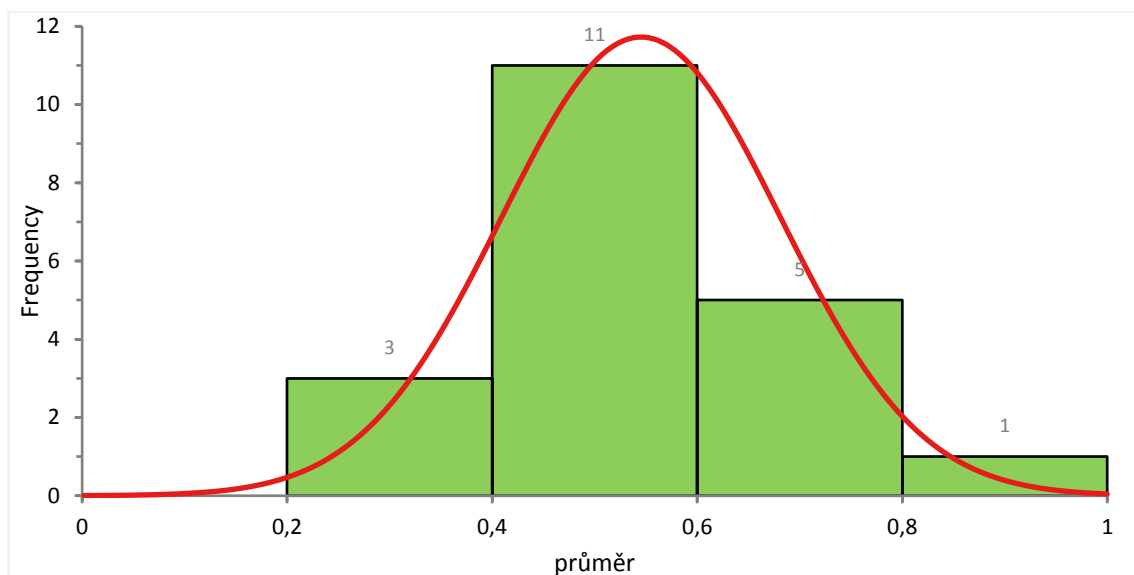
Ověřované referenční rozmezí: ženy 0,05 – 0,73 $\mu\text{kat/l}$, muži 0,05 – 0,85 $\mu\text{kat/l}$

Tab. č. 12. Naměřené hodnoty pro stanovení ALT

pořadí měření	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ALT ($\mu\text{kat/l}$)	0,36	0,31	0,49	0,50	0,53	0,45	0,64	0,38	0,47	0,67
pořadí měření	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
ALT ($\mu\text{kat/l}$)	0,74	0,54	0,52	0,49	0,57	0,73	0,56	0,50	0,85	0,65

Hodnoty naměřené ženám jsou podbarveny šedě.

Pro stanovení ALT byla zjištěna normální distribuce hodnot. Tato skutečnost je znázorněna na obr. 11, čili výsledkem testování nulové hypotézy bylo doporučení nezamítnout ji na 10% hladině významnosti. Referenční interval byl považován za ověřený, protože všechny naměřené hodnoty ležely uvnitř posuzovaného intervalu.



Obr. 11. Rozložení naměřených hodnot ALT

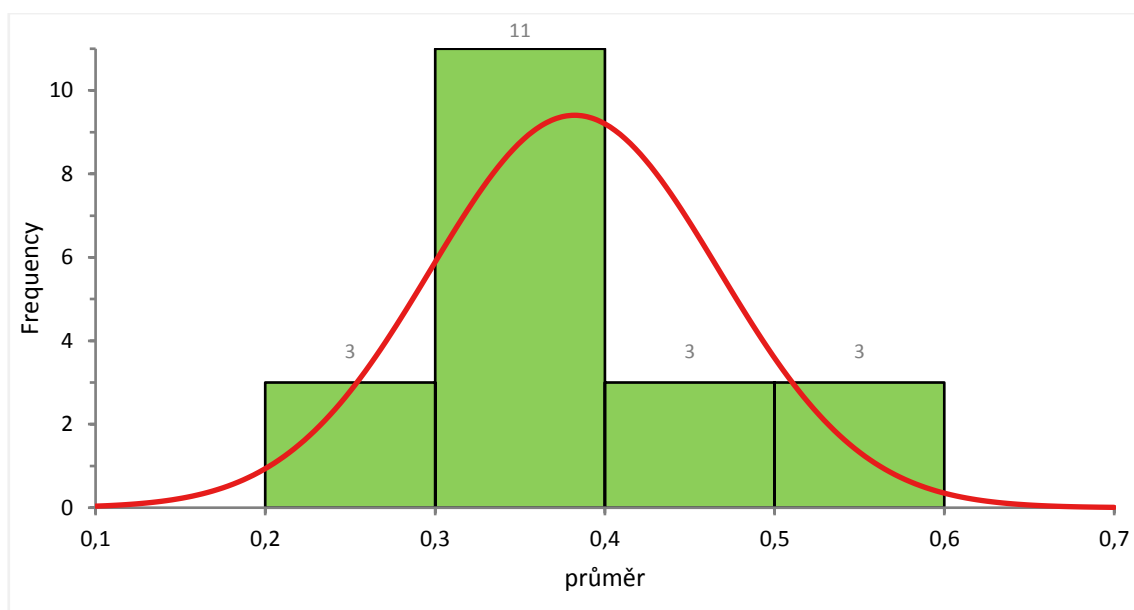
Aspartátaminotransferáza (AST)

Ověřované referenční rozmezí: 0,05 – 0,75 $\mu\text{kat/l}$

Tab. č. 13. Naměřené hodnoty pro stanovení celkového AST

pořadí měření	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AST ($\mu\text{kat/l}$)	0,24	0,29	0,38	0,37	0,32	0,43	0,40	0,29	0,36	0,39
pořadí měření	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
AST ($\mu\text{kat/l}$)	0,55	0,34	0,32	0,38	0,32	0,53	0,39	0,54	0,47	0,39

Stanovené hodnoty pro AST neměly normální rozložení, jak je ukázáno na obr. 12 a nulová hypotéza byla na 10% hladině významnosti odmítnuta ve prospěch alternativní hypotézy. Nicméně referenční rozmezí bylo ověřeno, neboť všech dvacet získaných hodnot náleželo posuzovanému intervalu.



Obr. 12. Rozložení naměřených hodnot AST

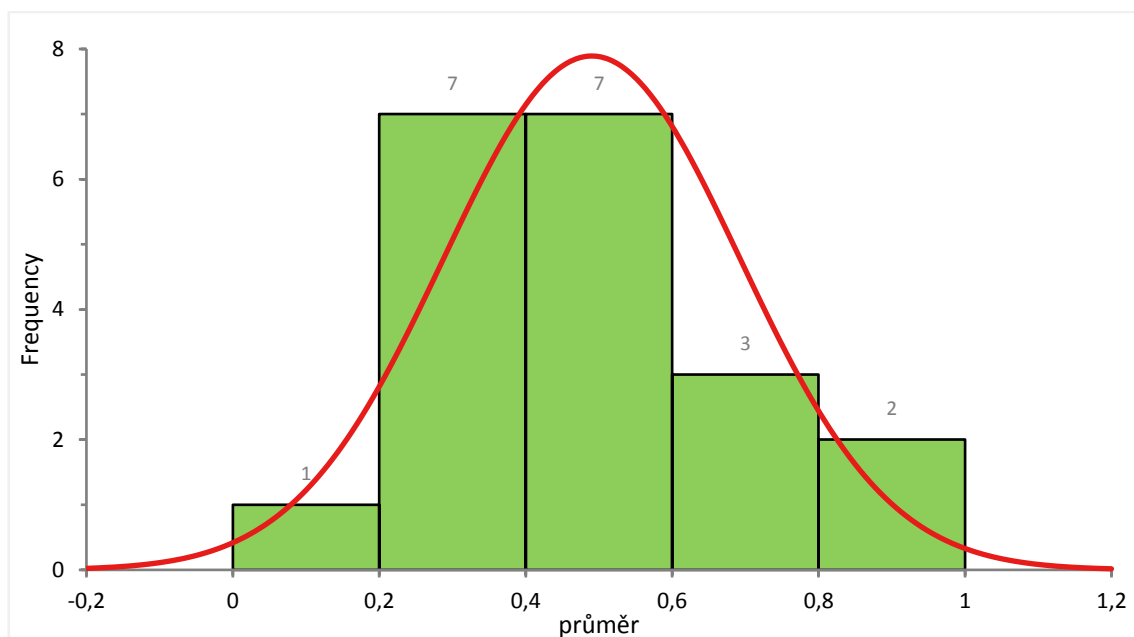
Gamaglutamyltransferáza (GGT)

Ověřované referenční rozmezí: <1,10 $\mu\text{kat/l}$

Tab. č. 14. Naměřené hodnoty pro stanovení GGT

pořadí měření	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GGT ($\mu\text{kat/l}$)	0,20	0,34	0,50	0,52	0,32	0,38	0,40	0,23	0,33	0,79
pořadí měření	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
GGT ($\mu\text{kat/l}$)	0,87	0,50	0,68	0,50	0,47	0,93	0,66	0,35	0,52	0,35

Pro stanovení GGT byly naměřeny hodnoty, které neměly normální rozložení. Toto rozložení ukazuje obr. 13 a nulová hypotéza byla zamítnuta na 10% hladině významnosti ve prospěch alternativní. Ověření referenčních mezí bylo hodnoceno kladně, protože všech dvacet hodnot leželo uvnitř referenčního intervalu.



Obr. 13. Rozložení naměřených hodnot G7GT

Alkalická fosfatáza (ALP)

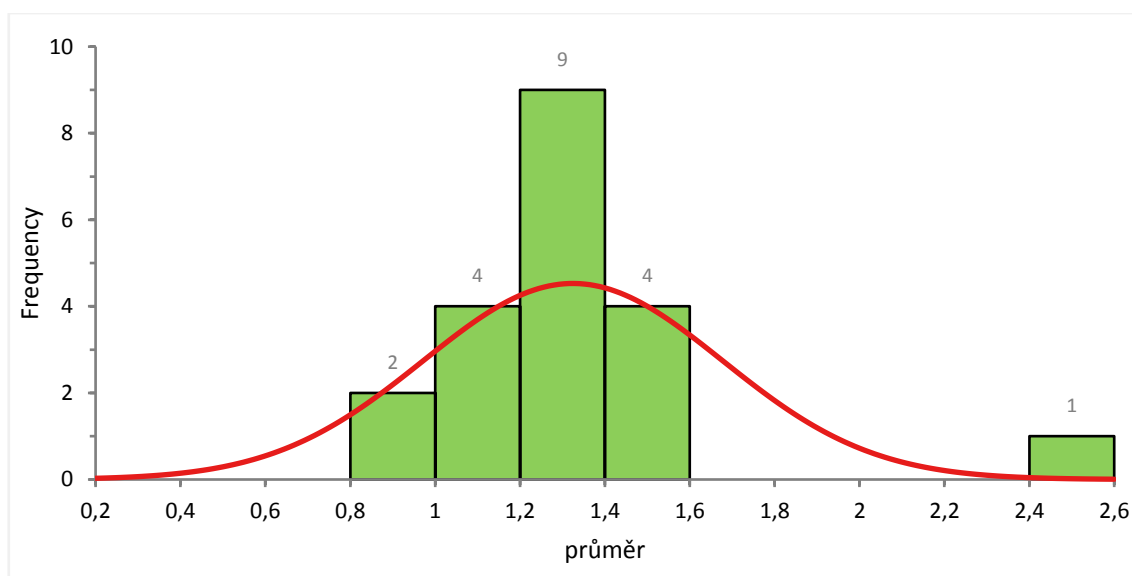
Ověřované referenční rozmezí: ženy 0,58 – 1,74 $\mu\text{kat/l}$, muži 0,67 – 2,15 $\mu\text{kat/l}$

Tab. č. 15. Naměřené hodnoty pro stanovení ALP

pořadí měření	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ALP ($\mu\text{kat/l}$)	0,83	1,33	1,22	1,36	0,98	1,02	1,05	1,35	1,24	1,40
pořadí měření	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
ALP ($\mu\text{kat/l}$)	1,53	2,60	1,32	1,37	1,38	1,43	1,50	1,15	1,40	1,08

Hodnoty ležící mimo RI jsou vyznačeny barvou a hodnoty naměřené ženám jsou podbarvené šedě.

Ověření referenčních hodnot ALP přineslo hodnoty, které neměly normální rozložení. Tyto hodnoty jsou znázorněny na obr. 14. Pro stanovení ALP byla tedy nulová hypotéza na 10% hladině významnosti zamítnuta ve prospěch alternativní hypotézy. Nicméně verifikací referenčních mezí alkalické fosfatázy bylo prokázáno, že je interval stanoven správně. Pouze jedna z dvaceti naměřených hodnot ležela mimo tento interval.



Obr. 15. Rozložení naměřených hodnot ALP

Cholinesteráza

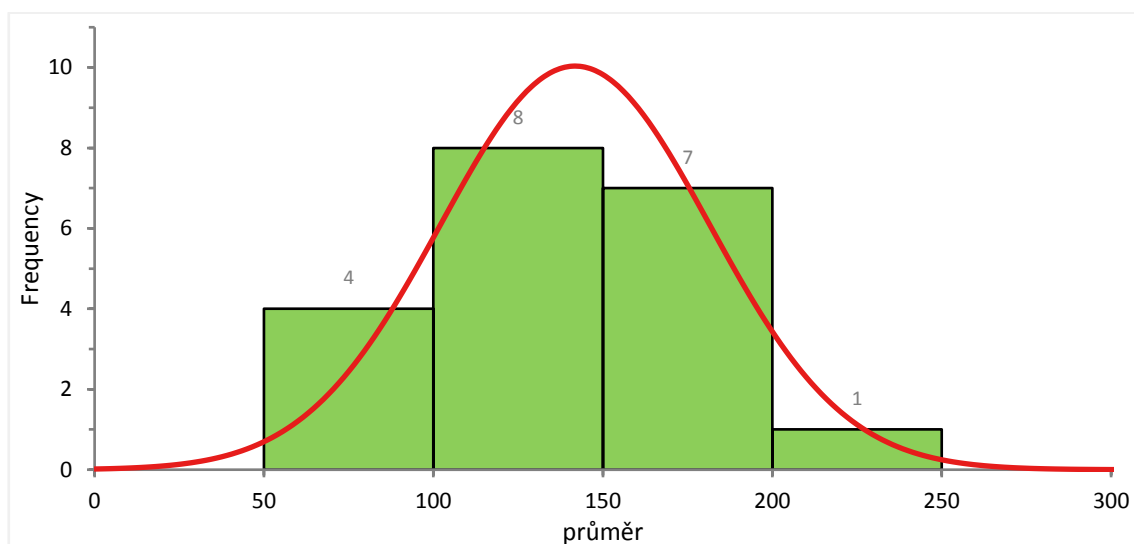
Ověřované referenční rozmezí: ženy 66 - 180 $\mu\text{kat/l}$, muži 77 – 192 $\mu\text{kat/l}$

Tab. č. 16. Naměřené hodnoty pro stanovení cholinesterázy

pořadí měření	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
cholinesteráza ($\mu\text{kat/l}$)	80	79	178	140	126	208	177	82	191	130
pořadí měření	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
cholinesteráza ($\mu\text{kat/l}$)	143	119	89	117	148	164	190	174	175	131

Hodnoty ležící mimo RI jsou vyznačeny barvou a hodnoty naměřené ženám jsou podbarveny šedě.

Při ověření referenčního intervalu cholinesterázy byly získány hodnoty normálního rozdělení. Tato skutečnost je vyobrazena na obr. 15. Nulová hypotéza tohoto stanovení nemůže být na 10% hladině významnosti zamítnuta. Z naměřených hodnot cholinesterázy bylo zjištěno, že může být interval použit dál beze změn. Pouze jedna získaná hodnota ležela mimo tento interval.



Obr. 15. Rozložení naměřených hodnot cholinesteráza

Cholesterol

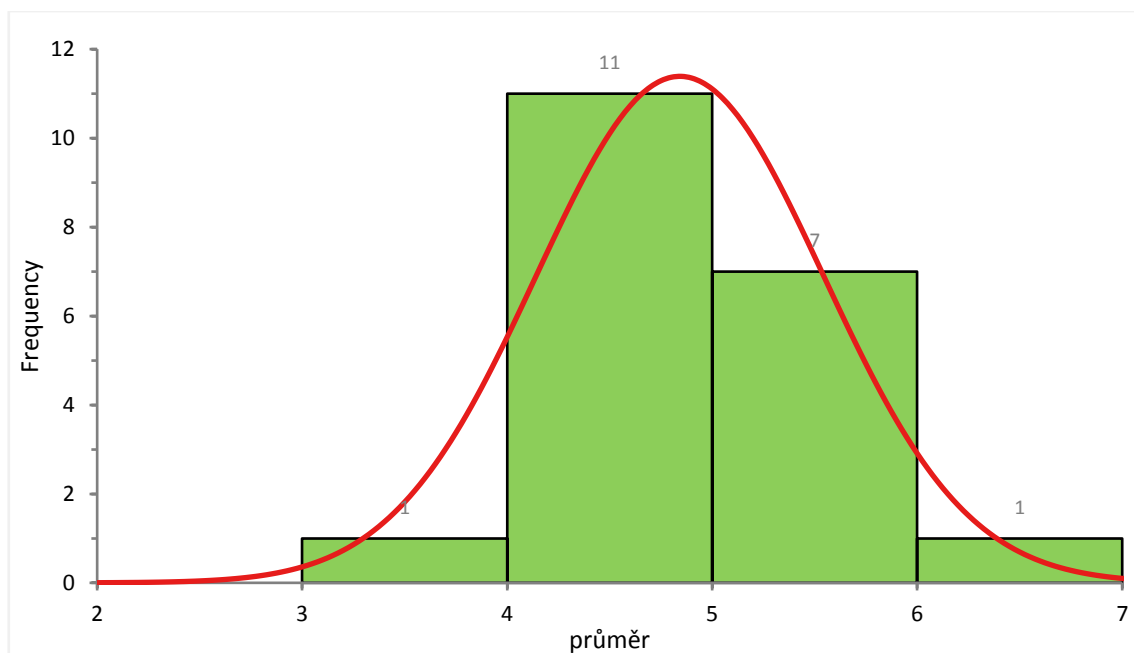
Ověřované referenční rozmezí: 3,4 – 5,2 mmol/l

Tab. č. 17. Naměřené hodnoty pro stanovení cholesterolu

pořadí měření	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
cholesterol (mmol/l)	4,80	4,60	5,10	4,70	5,60	4,60	5,00	4,00	3,85	5,50
pořadí měření	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
cholesterol (mmol/l)	6,80	5,50	4,50	4,10	5,10	5,50	4,10	4,70	4,40	4,40

Hodnoty ležící mimo RI jsou vyznačeny barvou.

Naměřené hodnoty při validaci referenčního intervalu cholesterolu měly normální rozdělení, jak ukazuje obr. 16 a nulovou hypotézu na 10% hladině významnosti nelze proto pro toto stanovení odmítnout. Referenční interval nebyl ověřen, i přes opakování postupu pro ověření referenčních mezí. Z dvaceti referenčních jedinců měli více než dva hladinu cholesterolu mimo původní referenční interval. Důvodem bylo zřejmě nedodržení dietního režimu před odběrem. Pro cholesterol byly již pevně stanoveny referenční meze, proto není nutné je již ověřovat. Toto stanovení jsme provedli pouze ze zajímavosti.



Obr. 16. Rozložení naměřených hodnot cholesterolu

Ultra HDL cholesterol

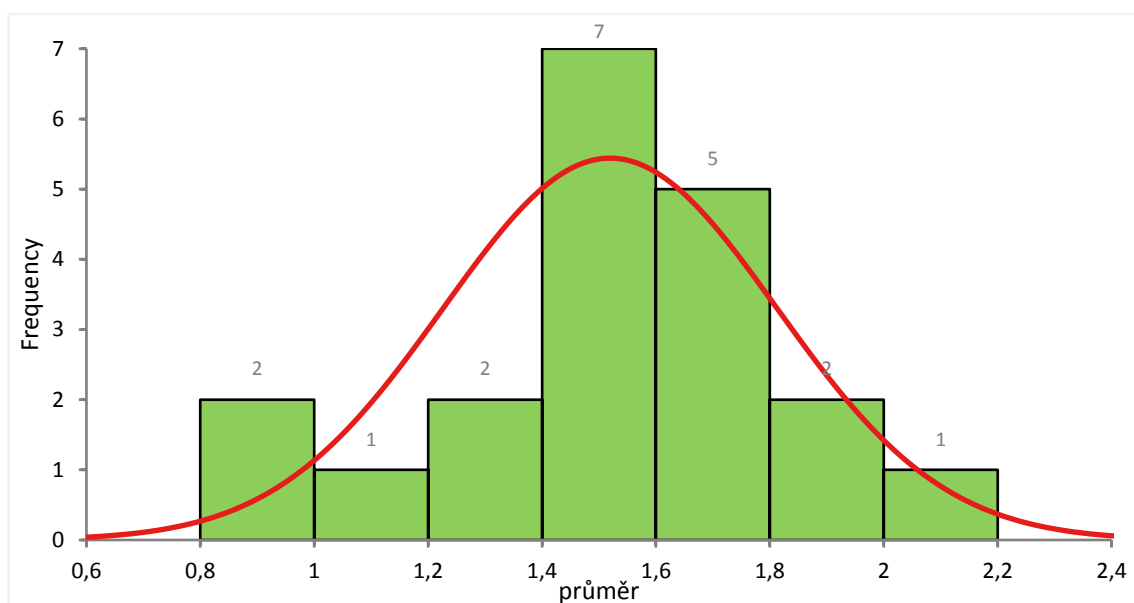
Ověřované referenční rozmezí: ženy >1,68 mmol/l, muži >1,42 mmol/l

Tab. č. 18. Naměřené hodnoty pro stanovení celkového Ultra HDL cholesterolu

pořadí měření	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
UHDL colesterol (mmol/l)	1,82	1,11	1,86	0,97	1,71	1,52	1,55	1,39	1,46	1,74
pořadí měření	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
UHDL cholesterol (mmol/l)	1,49	1,72	1,70	1,36	1,41	2,17	0,98	1,65	1,42	1,42

Hodnoty ležící mimo RI jsou vyznačeny barvou a hodnoty naměřené ženám jsou podbarveny šedě.

Referenčním jedincům pro stanovení ultra HDL cholesterolu byly naměřeny hodnoty s normálním rozdělením. Rozložení naměřených hodnot je vyobrazeno na obr. 17 a statistické zpracování pomocí Kolmogorov-Smirnovova testu ukázalo, že nelze pro toto stanovení zamítnout nulovou hypotézu na 10% hladině významnosti. Interval pro tento ukazatel nebyl ověřen. Ze získaných hodnot leželo více než dvě mimo původní interval, i přes opakování postupu pro ověření referenčních mezí. Zde bylo pravděpodobně opět důvodem neúspěchu ověření referenčních mezí nedodržení dietního režimu referenčních jedinců.



Obr. 18. Rozložení naměřených hodnot ultra HDL cholesterolu

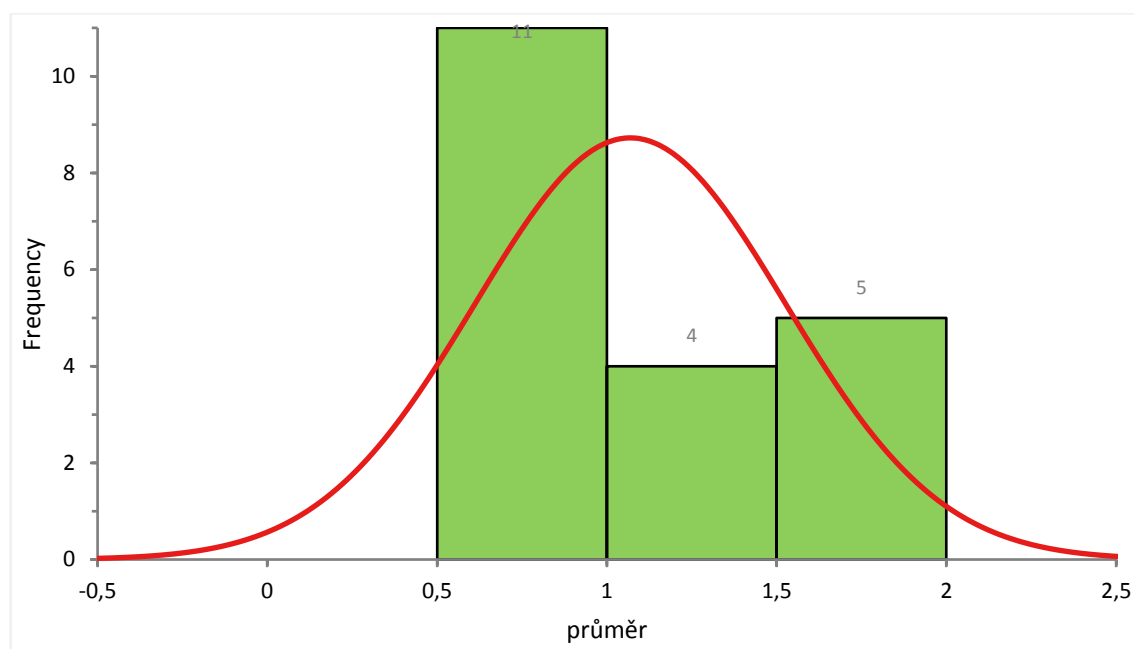
Triglyceridy (TAG)

Ověřované referenční rozmezí: ženy <1,10 mmol/l, muži <2,08 mmol/l

Tab. č. 19. Naměřené hodnoty pro stanovení TAG

pořadí měření	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
TAG (mmol/l)	0,60	1,46	0,58	1,85	0,54	0,91	0,78	0,54	0,70	1,49
pořadí měření	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
TAG (mmol/l)	1,58	1,07	0,69	0,69	1,49	1,63	1,70	0,85	1,50	0,78

Ověřením referenčních mezí triglyceridů byly získány hodnoty, které neodpovídaly normálnímu rozdělení, jak je znázorněno na obr. 18 a nulová hypotéza tohoto stanovení byla na 10% hladině významnosti zamítnuta ve prospěch alternativní hypotézy. Referenční meze tohoto ukazatele byly ověřeny, protože naměřené hladiny triglyceridů patřily všechny do tohoto rozmezí.



Obr. 18. Rozložení naměřených hodnot TAG

Celkové proteiny

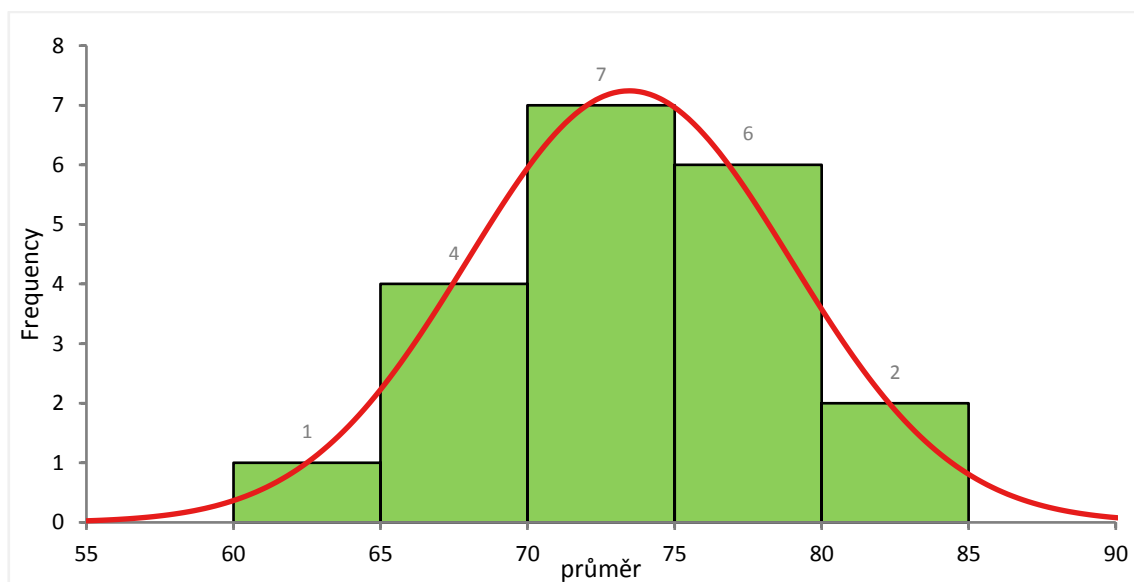
Ověřované referenční rozmezí: 64 – 82 g/l

Tab. č. 20. Naměřené hodnoty pro stanovení celkových proteinů

pořadí měření	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
celkové proteiny (g/l)	65,6	67,6	77,8	72,1	79,7	68,8	70,7	71,4	84,2	73,7
pořadí měření	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
celkové proteiny (g/l)	77,7	71,2	64,9	71,7	65,9	75,3	74,9	82,7	76,1	77,7

Hodnoty ležící mimo RI jsou vyznačeny barvou.

Naměřené hodnoty celkových proteinů měly normální distribuci, jak je ukázáno na obr. 19. Statistické zpracování těchto hodnot ukázalo, že nelze zamítnout nulovou hypotézou na 10% hladině významnosti. Z dvaceti naměřených hodnot se nacházely pouze dvě mimo ověřovaný interval, proto byl interval považován za správný.



Obr. 20. Rozložení naměřených hodnot celkových proteinů

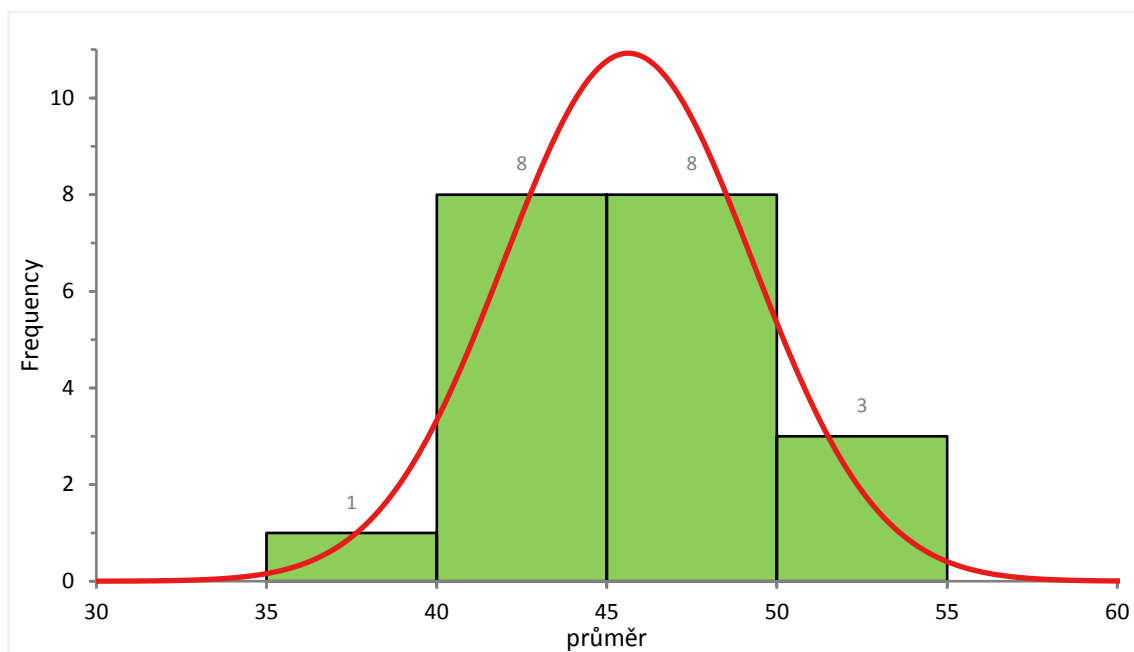
Albumin

Ověřované referenční rozmezí: 35 – 53 g/l

Tab. č. 21. Naměřené hodnoty pro stanovení albuminu

pořadí měření	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
albumin (g/l)	42,3	39,6	51,8	42,2	50,2	41,8	47,7	43,7	51,0	44,4
pořadí měření	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
albumin (g/l)	45,9	41,7	40,2	46,5	44,5	47,8	48,6	49,2	45,5	48,5

Stanovené hodnoty albuminu měly normální rozložení. Toto rozložení je znázorněno na obr. 20. Testování hypotéz prokázalo, že nulovou hypotézu o Gaussovském rozložení hodnot nelze na 10% hladině významnosti zamítnout. Referenční jedinci měli všichni hladinu albuminu ležící v referenčním intervalu, proto byl referenční interval považován za ověřený.



Obr. 21. Rozložení naměřených hodnot albuminu

10 Závěr

V této práci byly ověřeny referenční intervaly pro celkový bilirubin, natrium, kalium, chloridy, kalcium, fosfor, močovinu, kreatinin, alaninaminotransferázu, aspartátaminotransferázu, gama-glutamyltransferázu, alkalickou fosfatázu, cholinesterázu, triacylglyceroly, celkové proteiny a albumin. Pro tato stanovení leželo minimálně 18 výsledných hodnot z dvaceti v původním referenčním intervalu pro danou metodu.

Pro stanovení glukózy, kyseliny močové, celkový cholesterol a HDL-cholesterol se nepodařilo referenční meze ověřit. Důvodem nebyly chybné původní referenční intervaly, ale nedůslednost referenčních jedinců při dodržení lačnění před odběrem a stravovacích návyků. Pro ověření těchto metod by byla nutná pečlivější edukace referenčních jedinců před odběrem. Dále by bylo nutné dlouhodobé sledování stravovacích návyků, tělesných aktivit a celkového životního stylu referenčních jedinců. Tento postup by byl velice nejen časově, ale i finančně náročný. To je také důvodem, proč většina laboratoří neověřuje referenční meze. Problematickým bodem se může jevit i vlastní rozsah ověřovaných referenčních mezí, k nimž jsou posléze naměřená data vztahována, pakliže se při výběru jedinců nerespektují rozdílnost těchto RI s ohledem na pohlaví. Nicméně klíčový důvod toho, proč se nepodařilo některé referenční intervaly metodou malých výběrů referenčních jedinců ověřit, spočíval dozajista v ne zcela důsledném výběru vhodných tzv. zdravých jedinců. Teprve v průběhu práce jsem zjistila, že volbu tzv. zdravých jedinců je s výhodou lepší provádět pomocí smysluplných diagnostických celků a zařazovat do výběru pro konkrétní referenční mez pouze jedince, u nichž byly v případě diagnosticky sdružených analytů předem dosaženy fyziologické hodnoty: například do referenčního výběru pro ověření močoviny v séru zahrnout pouze jedince s fyziologickými hodnotami kreatininu, jakož i celého mineraloramu tak, jak doporučuje odborná literatura (Jabor, 2013). Potíž spočívá ve faktu, že často nejsou výsledné hodnoty analytů smysluplně směřujících k podobnému diagnostickému cíli dostupné z důvodů rozdílných podmínek preanalytické fáze (např. nebyly k dispozici výsledky glykovaného hemoglobinu pro výběr zdravých jedinců pro ověření referenčních mezí glukózy).

Doufám, že výsledky mé práce budou prospěšné laboratoři Oddělení klinické biochemie a hematologie Nemocnice Prachatice a.s., jejíž referenční hodnoty jsem ověřovala.

11 Zdroje

1. AMBROŽOVÁ, J., 2017a. Standardní operační postup. Albumin. 9s
2. AMBROŽOVÁ, J., 2017b. Standardní operační postup. Alkalická fosfatáza. 9s
3. AMBROŽOVÁ, J., 2017c. Standardní operační postup. Alanin aminotransferáza. 9s.
4. AMBROŽOVÁ, J., 2017d. Standardní operační postup. Aspartát aminotransferáza. 9s.
5. AMBROŽOVÁ, J., 2017e. Standardní operační postup. Celkový bilirubin. 10s
6. AMBROŽOVÁ, J., 2017f. Standardní operační postup. Glukóza. 11s
7. AMBROŽOVÁ, J., 2017g. Standardní operační postup. Cholesterol. 9s
8. AMBROŽOVÁ, J., 2017h. Standardní operační postup. Kyselina močová. 11s
9. AMBROŽOVÁ, J., 2017ch. Standardní operační postup. UHDL cholesterol. 10s
10. AMBROŽOVÁ, J., 2017i. Standardní operační postup. Močovina. 11s
11. AMBROŽOVÁ, J., 2017j. Standardní operační postup. Triacylglyceroly. 9s
12. AMBROŽOVÁ, J., 2017k. Standardní operační postup. Celkové bílkoviny. 9s
13. AMBROŽOVÁ, J., 2017l. Standardní operační postup. Fosfor. 10s
14. AMBROŽOVÁ, J., 2017m. Standardní operační postup. Gama-glutamyl transferáza. 9s
15. AMBROŽOVÁ, J., 2017n. Standardní operační postup. Kreatinin. 12s
16. AMBROŽOVÁ, J., 2017o. Standardní operační postup. Vápník. 11s
17. AMBROŽOVÁ, J., 2018. Standardní operační postup. Sodík, draslík a chloridy. 14s
18. ARZIDEH, F., WOSNIOK, W., HAECKEL, R., 2010. Reference limits of plasma and serum creatinine concentrations from intra-laboratory data bases of several German and Italian medical centres Comparison between direct and indirect

- procedures. *Clin Chim Acta*. 411(3-4), 215-21, doi:10.1016/j.cca.2009.11.006.
19. CERIOTTI, F., 2007. Prerequisites for use of common reference intervals [online]. *Clin Biochem Rev*. 28(3), 115-21, [cit. 2018-4-1]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1994109/>
 20. CLSI and IFCC. C28-A3 document; Defining, establishing and verifying reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline-third edition, 2008;28:1-76.
 21. DALTON, R. N., 2010. Serum creatinine and glomerular filtration rate: perception and reality. *Clinical Chemistry*. 56(5), 687–689, doi:10.1373/clinchem.2010.144261.
 22. DATHAN-STUMPF, A., et al., 2016. Pediatric reference data of serum lipids and prevalence of dyslipidemia: Results from a population-based cohort in Germany. *Clin Biochem*. 49(10-11), 740-9. doi:10.1016/j.clinbiochem.2016.02.010. Epub 2016 Mar 4.
 23. FONS: Informační bulletin pro odborníky z oblastí intenzivní péče, laboratorní a zdravotnické techniky, výpočetní techniky a klinické biochemie [online], 2007. Pardubice: Stapro s. r. o. [cit. 2018-4-1]. Dostupné z: <https://www.katalogfons.cz/Produkty/38DD2207-AC76-4C1E-B514-EFE034B0E0EC>
 24. FRIEDECKÝ, B., KRATOCHVÍLA, J., SPRINGER, D., PRÁZNÝ, M., ZIMA, T., 2015. Diabetes mellitus - laboratorní diagnostika a sledování stavu pacientů [online]. Česká společnost klinické biochemie a Česká diabetologická společnost [cit. 2018-4-1]. Dostupné z: http://www.diab.cz/dokumenty/standard_labor_2016.pdf
 25. FRIEDEWALD, W. T., LEVY, R. I., FREDRICKSON, D. S., 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.*, 18(6), 499-502.
 26. GRÄSBECK, R., 2005. The evolution of the reference value concept. *Clin Chem Lab Med*. 42(7), 692-697, doi:10.1515/CCLM.2004.118.

27. GRÄSBECK, R., FELLMAN, J., 1968. Normal values and statistics. *Scand J Clin Lab Invest.* 21(3), 193-5, doi: 10.3109/00365516809076984
28. HENDL, J., 1987. Referenční hodnoty v klinické biochemii. ILF Praha, 100 s.
29. HENNY, J., 2007. Interpretation of laboratory results: the Reference Intervals, a necessary evil? *Clin Chem Lab Med.* 45(8), 939–941, doi: 10.1515/CCLM.2007.272.
30. HENNY, J., 2011. Determining and verifying reference intervals in clinical laboratories. *Annales de biologie clinique.* 69(2), 229-37, doi: 10.1684/abc.2011.0537
31. HENNY, J. et al., 2016. Recommendation for the review of biological reference intervals in medical laboratories. *Clin Chem Lab Med.* 54(12), 1893–1900, doi:10.1515/cclm-2016-0793
32. HOROWITZ, G. L., 2008. Reference intervals: practical aspects [online]. *EJIFCC.* 19(2). [cit. 2018-5-6]. Dostupné z: <http://www.ifcc.org/ifccfiles/docs/190201200802.pdf>
33. HOROWITZ, G., L. et al., 2010. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline. 3. vydání. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute. 12 s. ISBN 1-56238-682-4.
34. ICHIHARA, K., et al., 2017. A global multicenter study on reference values: 2. Exploration of sources of variation across the countries. *Clinica Chimica Acta.* 467, 83-97. doi: 10.1016/j.cca.2016.09.015
35. JABOR, A. a kol., 2008. Vnitřní prostředí. Praha: Grada. 530s. ISBN: 978-80-247-1221-5
36. JABOR, A., FRANEKOVÁ, J., KUBÍČEK, Z., 2013. Principy interpretace laboratorních testů. 1. vydání. Praha: Roche. 386 s. ISBN 978-80-260-5094-0.
37. MASOPUST, J., 1998. Klinická biochemie. Požadování a hodnocení biochemických vyšetření. Praha: Karolinum. 832s. ISBN: 80-7184-648-1
38. MILLÁN-CALENTI, J. C., SÁNCHEZ, A., LORENZO-LÓPEZ, L., MASEDA,

- A., 2012. Laboratory values in a Spanish population of older adults: A comparison with reference values from younger adults [online]. *Maturitas*. 71, 396-401 [cit. 2018-5-12]. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/65e3/9e7fa9644db74dde796802a5723c3fef7c86.pdf>
39. RUSTAD, P., et al., 2004. The Nordic Reference Interval Project 2000: recommended reference intervals for 25 common biochemical properties. *Scand J Clin Lab Invest*. 64(4), 271-84. doi:10.1080/00365510410006324
40. SIEST, G., HENNY, J., GRÄSBECK, R., WILDING P., PETITCLERC, C., QUERALTÓ, J. M., PETERSEN, H. P., 2013. The theory of reference values: an unfinished symphony. *Clin Chem Lab Med*. 51(1), 47-64. doi: 10.1515/cclm-2012-0682.
41. SOŠKA, V., FRANKEOVÁ, J., FRIEDECKÝ, B., JABOR, A., KRAML, P., ROSOLOVÁ, H., VRABLÍK, M., 2017. Společné stanovisko českých odborných společností ke konsensu European Atherosclerosis Society a European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine k vyšetřování krevních lipidů a k interpretaci jejich hodnot [online]. Česká společnost pro aterosklerózu a Česká společnost klinické biochemie [cit. 2018-4-7]. Dostupné z: http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2017/2017-1/KBM-2017-1-dop_lipidy-36.pdf
42. SOŠKA, V., ZIMA, T., FRIEDECKÝ, B., FRANEKOVÁ, J., BURYŠKA, J., PALIČKA, V., JABOR, A., POLEDNE, R., SOŠKA, V., FRIEBERGER, T., PIŤHA, J., ROSOLOVÁ, H., ŠTULC, T., URBANOVÁ, Z., VAVERKOVÁ, H., VRABLÍK, M., ČEŠKA, R., 2010. Společné doporučení České společnosti klinické biochemie ČLS JEP a České společnosti pro aterosklerózu ČLS JEP ke sjednocení hodnoticích mezí krevních lipidů a lipoproteinů pro dospělou populaci [online]. Česká společnost pro aterosklerózu a Česká společnost klinické biochemie [cit. 2018-4-7]. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2010/2010-1/dop-lipidy.pdf>
43. STRAND, M., F., FREDRIKSEN, P., M., HJELLE, O., P., LINDBERG, M., 2018. Reference intervals for serum lipids and prevalence of dyslipidaemia in 6-

- 12-year-old children: The Health Oriented Pedagogical Project (HOPP). *Scand J Public Health*. 46(21), 21-27. doi: 10.1177/1403494818767824.
44. ŠPRONGL, L., PLÁŇKOVÁ, H., STEJSKAL, D., 2014. Sjednocení a validace referenčních intervalů – pilotní studie [online]. *Klin. Biochem. Metab.* 22(43), 132-137 [cit. 2018-5-12]. Dostupné z: http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2014/2014-3/KBM_3_2014_Sprongl-132.pdf
45. ŠVAGERA, Z., ŠIGUTOVÁ, R., 2013. Klinická biochemie [online]. Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova. [cit. 2018-4-15]. Dostupné z: <https://elius.lfp.cuni.cz/ebio/KlinickaBiochemieCZ.pdf>
46. TATE, J. R., YEN, T., JONES, G. R. D., 2015. Transference and Validation of Reference Intervals. *Clinical Chemistry*. 61(8), 1012–1015, doi: 10.1373/clinchem.2015.243055
47. OZARDA, Y., 2016. Reference intervals: current status, recent developments and future considerations. *Biochem Med*. 26(1), 5-16, doi: 10.11613/BM.2016.001
48. ZIMA, T. a kol., 2007. Doporučené diagnostické a terapeutické postupy pro všeobecné praktické lékaře[online]. Česká společnost klinické biochemie ČSL JEP a Společnost všeobecného lékařství ČSL JEP [cit. 2018-5-12]. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporuceni--biochemicke-metody#2.11>.
49. ZIMA, T., 2013. Laboratorní diagnostika. 3. vydání. Praha: Galen. 1146 s. ISBN 978-80-7492-062-2.
50. Norma ČSN EN ISO 15 189 : 2012 Medical laboratories: particular requirements for quality and competence. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization
51. Directive 98/79/CE. of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices Brussels: European Community

12 Zkratky

ALP – alkalická fosfatáza

ALT – alanin aminotransferáza

AST – aspartát aminotransferáza

CLSI - The Clinical and Laboratory Standards Institute

ČSL JEP – Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně

GGT – gama-glutamyltransferáza

IFCC-LM - International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

RI – referenční interval

SOP – standardní operační postup

TAG - triacylglyceroly