



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

Vliv preanalytické fáze na vyšetření glukózy a kália
v krvi

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: [SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ](#)

Autor: Bc. Iva Černá

Školitel: MUDr. Přemysl Kotoul

České Budějovice 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „Vliv preanalytické fáze na vyšetření glukózy a kália v krvi“ 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 16. 4. 2018

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli MUDr. Přemyslovi Kotoulovi a konzultantovi MUDr. Pavlu Malinovi za cenné rady, čas, vstřícnost a trpělivost při řešení problematiky v mé bakalářské práci. Také bych ráda poděkovala všem mým dobrovolníkům včetně kolegyň za ochotné darování krve, odběrové sestře paní Frýdkové za profesionálně provedené odběry a v neposlední řadě své rodině za podporu.

Vliv preanalytické fáze na vyšetření glukózy a kália v krvi.

Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá stanovením stability u glukózy a draslíku v krvi. Tyto dva analyty patří mezi nejdůležitější z biochemických testů, ale často podléhají chybám v rámci preanalytické fáze. Nejvíce jsou ovlivněny velkou prodlevou mezi odběrem vzorku a jeho separací a také teplotou, při které jsou vzorky skladovány před analýzou.

Koncentrace glukózy v krvi může pomoci diagnostikovat u pacienta nemoc diabetes mellitus a také slouží coby kontrola léčeného s diabetem. Znalost přesné a skutečné koncentrace v krvi pacienta je proto velmi důležitá. Stejně důležitá je přesnost a skutečnost u vyšetření draslíku v krvi, jehož vyšší hodnota může poukazovat na akutní selhání ledvin či náhlou zástavu srdce.

Cílem této práce bylo otestovat stabilitu u obou zmíněných analytů a to vzhledem k prodlužujícímu se času od odběru vzorku po jeho separaci a teplotním podmínkám při skladování vzorků před analýzou. U glukózy byla stabilita testovaná ještě ve dvou různých materiálech a to v séru a plazmě s přidavkem inhibitoru glykolýzy. Vzorky byly analyzovány v časech 0, 2, 4, 5, 6 a 8 hodin. Skladovací teplota před analýzou byla pokojová 24 °C a teplota v lednici 4 °C.

Výsledky měření poukazují na porušenou stabilitu u vzorků separovaných později od odběru a to u obou analytů. Koncentrace glukózy postupně klesá a to zvláště ve vzorcích séra. Koncentrace draslíku v séru naopak stoupá a to již dvě hodiny od odběru.

Klíčová slova

Glukóza; draslík; preanalytická fáze; stabilita analytů; prodleva před separací.

Influence of the pre-analytical phase on glucose and potassium blood examination.

Abstract

This bachelor thesis deals with the stability of glucose and potassium in blood. These two analytes are among the most important of biochemical tests, but they are often subject of faults in the pre-analytical phase. Most of these faults are affected by the long time gap between sampling and separation, as well as the temperature at which the samples are stored before the actual analysis.

The glucose concentration in blood can help us diagnose diabetes mellitus in the patient organism and also serve as a control for diabetes treatment. Knowing the exact and actual concentration in the blood of the patient is therefore very important. The accuracy and reality of a blood potassium testing is equally important and higher value may point to urgent kidney failure or sudden cardiac arrest.

The main objective of this work was to test the stability of both analytes with regard to the prolonged time from sampling to separation and the temperature conditions of sample storage before the actual analysis. For glucose, stability was tested in two different materials, both in serum and plasma, with the addition of a glycolysis inhibitor. Samples were analyzed at 0, 2, 4, 5, 6 and 8 hours. Storage temperature before analysis was room temperature 24 ° C and refrigerator temperature 4 ° C.

The results of these measurements point to impaired stability in samples separated after collection and also in both analytes. The glucose concentration gradually decreases, especially in serum samples. Concentration of potassium in the serum, on the other hand, is increasing and all this just after two hours from actual collection.

Key words

Glucose; potassium; preanalytic phase; stability of analytes; delay before separation.

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Preanalytická část	10
2.1 Zdroje variability před odběrem.....	10
2.2 Zdroje variability při odběru	11
2.3 Zdroje variability mezi odběrem a analýzou.....	12
3. Glukóza.....	14
3.1 Stabilita glukózy.....	15
3.2 Diabetes mellitus	17
4. Draslík.....	19
4.1 Možné druhy ovlivnění draslíku před stanovením.....	19
5. Laboratorní metody měření glukózy.....	21
5.1 Metoda glukózaoxidázová-peroxidázová (GOD-POD).....	21
5.2 Metoda hexokinázová	22
5.3 Metoda glukózadehydrogenázová.....	22
5.4 Metody elektrochemické	23
6. Laboratorní metody měření draslíku.....	24
6.1 Potenciometrické měření.....	24
6.2 Plamenová emisní spektrofotometrie.....	24
6.3 Spektrofotometrické metody.....	25
7. Hypotéza a cíl práce.....	26
7.1 Hypotéza	26
7.2 Cíl práce	26
8. Metodika	27
8.1 Probandi	27
8.2 Preanalytická fáze mimolaboratorní	27
8.3 Preanalytická fáze laboratorní.....	28
8.4 Analytická fáze.....	29
8.4.1 Kalibrace	30
8.4.2 Interní kontrola kvality	31
8.4.3 Použitý princip pro stanovení glukózy	31
8.4.4 Použitý princip pro stanovení draslíku	31

8.4.5	Referenční meze	32
9.	Výsledky	33
9.1	Měření glukózy	33
9.2	Měření draslíku	38
9.3	Porovnání dat	42
10.	Diskuze	46
11.	Závěr	49
12.	Seznam literatury	50
13.	Seznam zkratk	54

1. Úvod

V současné době patří laboratorní diagnostika neodmyslitelně k lékařské profesi. Výsledky analýz pomáhají lékařům určit onemocnění, stupeň poškození organismu nebo monitorují hladinu léků v těle pacienta.

I přes značnou modernizaci a standardizaci laboratorních postupů je během analýzy stále velké riziko chyby, které může ovlivnit výsledek vyšetření. Chyba může vzniknout v části samotné analýzy. Nedbale nakalibrovaný analyzátor, výsledky kontrol mimo povolenou mez nebo špatně napipetovaný vzorek jsou nejčastějšími původci nepřesnosti měření. I během postanalytické fáze je určité riziko výskytu chyb, různé přenosy dat, tisk výsledkových zpráv i lidský faktor zde hraje důležitou roli. Nejrizikovější ale bývá preanalytická fáze vyšetření. Tvoří 50% celkového času laboratorního vyšetření a patří sem jak mimolaboratorní část tak i laboratorní část. Do této fáze lze zařadit již edukaci pacienta a jeho vlastní přípravu na odběr laboratorního materiálu, ale také samotný odběr, transport do laboratoře a označení společně s přípravou vzorku k analýze. Některé z těchto parametrů jsou přímo ovlivnitelné a jejich správným provedením se dá zamezit mnohým negativním dopadům na výsledek analýzy.

Do preanalytické části patří také dva parametry, doba od odběru vzorku až po jeho zpracování a různé teplotní podmínky během transportu a skladování. Dle studie Christiany Oddoze z roku 2012 je mnoho analytů, které nejsou na tento časový interval nijak vázané a jejich výsledek ve vzorku je konstantní po dlouhou dobu, ale jsou i analyty, které bývají ovlivněné během krátké doby po odběru. Například některé doporučení WHO uvádí, že stabilita draslíku v celé krvi je udržena přibližně 2 hodiny (Guder et al. 2009).

Tato bakalářská práce si vzala za cíl ověřit právě stabilitu glukózy a draslíku v různých časových a teplotních podmínkách v krvi bez nebo s přidavkem aditiva. Glukóza byla měřena v séru ve zkumavce se separačním gelem a v plazmě ve zkumavce s přidavkem inhibitoru glykolýzy fluoridem sodným a oxalátem draselným. Draslík byl měřen pouze v séru ve zkumavce se separačním gelem.

Odebrané vzorky byly před analýzou skladovány ve dvou různých teplotách, 24°C a 4°C. Následně probíhalo měření v 0, 2, 4, 5, 6 a 8 hodinách, přičemž byly vzorky

centrifugovány až těsně před samotným měřením. Současně za stejných podmínek probíhalo i měření vzorku, který byl separován jako první, chvíli po odběru tzv. při 0 hodinách. Stabilita obou analytů byla porovnána z hlediska prodlevy separace a vlivu teplotních podmínek při skladování.

2. Preanalytická část

Proces analýzy vzorku je obecně rozdělován do 3 částí. První začíná již u přípravy pacienta a je známá jako preanalytická část. Ta se ještě rozděluje na mimolaboratorní a laboratorní. Následuje část analytická začínající ve chvíli, kdy vkládáme vzorek do analyzátoru k vlastní analýze. Poslední neméně důležitá je část postanalytická, kde pracujeme již s hotovým výsledkem a doručujeme jej lékaři.

Největší riziko takového ovlivnění sebou nese část preanalytická, která obsahuje velké množství zdrojů preanalytické variability (Wiwanitkit, 2001). Během procesu zpracování vzorku může docházet ve větší míře ke vzniku chyb, které dokonce mohou více či méně ovlivnit výsledek vyšetření (Racek et al., 2006). V analytické a postanalytické části se chyby také vyskytují, ale je jim do určité míry zamezeno především díky dobře fungujícímu systému kontroly kvality. Ten předpokládá vznik chyby a snaží se jí předejít pomocí přesně popsanych postupů a preventivních opatření (Bartoš et al., 2005)

Oproti tomu preanalytické období nemá standardizovaný postup a laboratoř tuto část jen těžko kontroluje, především pokud si lékař odebírá vzorky v ordinaci. Navíc jsou zde i faktory, které nelze ovlivnit (Guder, 2009).

2.1 Zdroje variability před odběrem

Na zdroje variability před odběrem by měl být pacient včas upozorněn lékařem popřípadě odběrovým personálem. Správnou edukací pacienta lze minimalizovat mnoho původců chyb a zajistit tak přesnější výsledek vyšetření (Friedecký, 2007). Některé faktory ovlivnit nelze, jako kupříkladu pohlaví pacienta, jeho věk, rasu, u žen například graviditu nebo menstruaci. Do této skupiny můžeme také zařadit současně probíhající jinou nemoc a cyklické variace ať už se jedná o cirkadiánní nebo diurnální cykly. S těmito neovlivnitelnými faktory musí lékař při interpretaci výsledku počítat (Narayanan, 2000).

Mezi ovlivnitelné faktory se řadí fyzická zátěž, kde je potřeba zvážit trénovanost pacienta, druh a délka aktivity i její náročnost. Vliv diety, kdy stravováním se před odběrem výrazně mění hladina velkého množství analytů. Především jde o hormony,

enzymy vyplavované během jídla a dále již vstřebané látky z potravy. Podobně významné změny způsobuje hladovění (Bonini et al. 2002).

Aby se zabránilo různé interpretaci výsledku, doporučuje se ve většině případů dvanáctihodinové lačnění, omezení tučných jídel a alespoň 24 hodin před odběrem nepít alkoholické nápoje.

Se stravou je ruku v ruce spojen i pitný režim. V případě, že pacient nepije déle jak 12 hodin, mohou se projevit známky hemokoncentrace, v některých případech může dojít i ke komplikaci samotného odběru (Racek et al., 2006).

Za další významný faktor je považováno brání léků. Medikamenty mohou nepříznivě působit na analyty nebo stanovovanou látku přímo maskovat. Léky, které pacient nemůže kvůli svému zdravotnímu stavu přestat brát jako například antikoagulační léčbu, by měly být na žádance uvedeny a lékař při zhodnocování výsledku by měl na tuto skutečnost brát zřetel (Narayanan, 2000).

2.2 Zdroje variability při odběru

Dosud zmiňované zdroje může z velké míry pacient ovlivnit sám svou důslednou přípravou na odběr a tím dopomoci správnému výsledku vyšetření.

Odběr samotný může být též původcem mnoha různých variabilit, a proto by měl každý odběrový pracovník dokonale ovládat obecná pravidla při odběru a minimalizovat možný vznik chyb (Lippi, 2007).

Načasování odběru vzorku by mělo být v souladu s vyšetřením. V případě terapeutického monitorování léků by mělo být přihlédnuto k poločasům podaných medikamentů. Pokud je odběr určen pro základní vyšetření, měl by probíhat ideálně v ranních hodinách, aby se zamezilo vlivu biorytmických cyklů na měřené analyty (Friedecký, 2007).

Zpravidla se odebírá venózní krev z dobře přístupných periferních žil. Nejčastěji se jedná o žíly v loketní jamce, ale využívají se i žíly na předloktí nebo hřbetu ruky. Pacient by měl být vsedě v ideálním případě vleže, a to už několik minut před odběrem, aby nedošlo k přesunu tekutiny z intravaskulárního prostoru do intersticia, a tím zahuštění plazmy vysokomolekulárními látkami (Racek et al., 2006).

Velmi často odběrový personál volí použití turniketu a následné cvičení paže pro lepší orientaci a výběr žíly určené k pichu. Tento postup však není zcela vhodný a jeho

použitím dochází k ovlivnění kvality vzorku. Stejně jako při odběru ve stoje se krev zahušťuje vysokomolekulárními látkami a voda se přesouvá do oblasti intersticia. Cvičení paže také výrazně zvyšuje koncentraci draselného kationu, a proto se před odběrem nedoporučuje (Bartoš et al., 2005).

Před samotným odběrem by měl odebírající vždy důkladně zkontrolovat výběr vhodných odběrových nádob dle požadovaného vyšetření a jejich označení minimálně celým jménem pacienta a jeho rodným číslem. Tuto kontrolu je vhodné provádět dvakrát, při označování odběrových nádob a přímo u pacienta těsně před odběrem (Racek et al., 2006).

Při použití vakuového systému, kde se krev do nádobky dostává pomocí podtlaku, je důležité nenasazovat zkumavku na jehlu dříve, než je provedena venepunkce aby nedošlo ke zrušení vakua. Objem krve v těchto zkumavkách je vakuem přesně definován, a proto je dodržen správný poměr mezi krví a protisrážlivým činidlem. Složitější je to při použití jehly a stříhačky. Krev se musí ze stříkačky vypouštět po sundání jehly a pomalým proudem, aby nedošlo k mechanické hemolýze. Také je potřeba dbát na optimální objem krve v odběrové nádobě. Přeplněním není dodržen správný poměr a krev se může srazit, naopak u malého objemu se může naředit.

Jakmile je krev vypuštěna do zkumavky, je nutné ji opatrně promíchat převrácením nebo rotací. Není vhodné použít pro promíchání třepání, které by způsobilo mechanickou hemolýzu (Racek et al., 2006).

2.3 Zdroje variability mezi odběrem a analýzou

Po ukončení odběru je potřeba vzorky dopravit do laboratoře. Ve velkých laboratořích, které mají k dispozici odběrovou místnost nebo u nemocnic je transport víceméně jednoduchý a rychlý. Vzorky jsou dopraveny do laboratoře bez velkého vlivu okolní teploty a bez zbytečných otřesů. Mohou být neprodleně označeny čárovým kódem a připraveny k dalšímu zpracování.

Jinak je tomu u vzorků z ambulancí a ordinací soukromých lékařů. Zde musí být transport zajištěn jinak. Obvykle laboratoře nabízí dopravu vzorku v určitých domluvených intervalech tak, aby se odebrané materiály dostaly do laboratoře v co nejkratším čase a nebyla tak ovlivněna stabilita vzorku. Pro převoz jsou používány chladičí boxy s integrovanými stojánky či přepravnými sáčky, které udržují vzorky

v konstantní teplotě a zamezují volnému pohybu zkumavek v boxu. Zkumavky jsou uloženy stabilně a vzorky jsou chráněné před otřesy.

Obecným problémem, kterému čelí klinické laboratoře, je integrita necentrifugovaných vzorků určených pro chemickou analýzu. Prodloužený kontakt plazmy nebo séra s buňkami je běžnou příčinou falešných výsledků testů (Lippi et al. 2006). Plazma či sérum by mělo být ideálně odděleno od buněk v co nejkratším čase, aby se zabránilo pokračujícímu metabolismu buněčných složek, jakožto i aktivnímu či pasivnímu pohybu analytů mezi plazmou nebo sérem a buněčnými oddíly (Tanner et al. 2008).

Za nejvíce ovlivnitelné prodlouženým časem do doby separace bývají označovány biochemické analyty jako draslík, anorganický fosfát, magnezium, laktátdehydrogenáza, glukóza a laktát (Oddoze et al. 2012). Většina této nestability je přisuzována úbytku zdroje energie – glukózy v odebraném vzorku a následné omezené funkci sodno-draselné pumpy. Intracelulární komponenty pak mohou volně procházet přes buněčnou membránu a zvyšovat svoje koncentrace v séru či plazmě ((Tanner et al. 2008).

Během transportu musí být zajištěna správná teplota, ve které jsou vzorky uchovány. Některé vzorky vyžadují transport na ledu, některým postačí konstantní pokojová teplota, která činí přibližně 24°C. Vzorky by měly být ochráněny proti nadměrným otřesům způsobující mechanickou hemolýzu a přímému světlu (Racek et al., 2006).

Ve chvíli, kdy je vzorek předán do laboratoře, se již jedná o preanalytickou fázi laboratorní. V laboratoři je nutné vzorky roztřídit a správně přiřadit k žádánkám. Laborant nebo pracovník příjmu musí dbát vždy zvýšené opatrnosti při přiřazování vzorků k žádánkám, aby nedošlo k záměně a vzniku velmi vážné chyby. Dle typu materiálu se pak vzorky uvolňují k analýze nebo se dále upravují. Pokud je k analýze zapotřebí sérum či plazma, musí se elementy ve vzorku separovat. Nejvhodnější je centrifugace, kdy je obecně doporučeno použít 3000 otáček po dobu 10 minut. Tato doba by měla být dostatečná k úplné separaci krvinek a rychlost zvolená by přitom neměla poškodit buňky (Bartoš et al., 2005).

3. Glukóza

Glukóza je jednoduchý cukr, který v těle funguje jako nejdůležitější zdroj energie pro všechny buňky. Zvláště důležitý je pro mozkové buňky a erytrocyty. Tímto monosacharidem začínají nebo končí veškeré základní dráhy sacharidového metabolismu. Předpokladem pro správnou funkci lidského těla je plynulý přístup glukózy do všech buněk (Racek 2006)

Jako zdroj využívá tělo potravu a v ní obsažené sacharidy jako samotnou glukózu, fruktózu, galaktózu, sacharózu a polysacharidy. Po jídle se zvýšená koncentrace glukózy navrácí velmi rychle do obvyklé hodnoty, jelikož se okamžitě využívá ke krytí energetické spotřeby procesem zvaným glykolýza (Špička 2004).

Jelikož je glukóza tak důležitá, vyvinulo si tělo citlivé regulační mechanismy udržující její koncentraci v relativně úzkém rozmezí. Fyziologické hodnoty u dospělého člověka bez ohledu na pohlaví jsou ve venózní krvi na lačno 3,3 – 5,6 mmol/l, v séru či plazmě je to nepatrně vyšší 3,6 až 6,2 mmol/l. U dětí (6 týdnů – 15 let) je pak fyziologická koncentrace glukózy 3,3 – 5,4 mmol/l a u novorozenců do šesti týdnů 1,7 – 4,2 mmol/l (Racek 2006).

Pokud není glukóza buňkami okamžitě využita, dochází ke glykogenezi, jejímž následkem je transformace glukózy na glykogen coby zásobní zdroj energie v játrech.

Při nadbytečném příjmu glukózy může též probíhat její přeměna na triacylglyceroly a ukládat se v tukové tkáni.

Na druhou stranu, kdy tělo nemá okamžitý dostatek energie, využívá rozkladu zásobního glykogenu z jater glykogenolýzou. Po vyčerpání zásob vytváří glukózu složitým procesem zvaným glukoneogeneze z nesacharidových látek přeměnou tělesného tuku (Ledvina 2004).

Na regulaci hladiny glukózy se též podílí řada hormonů. Převážně se jedná o hormony žláz s vnitřní sekrecí jako je pankreas, nadledvinky a štítná žláza.

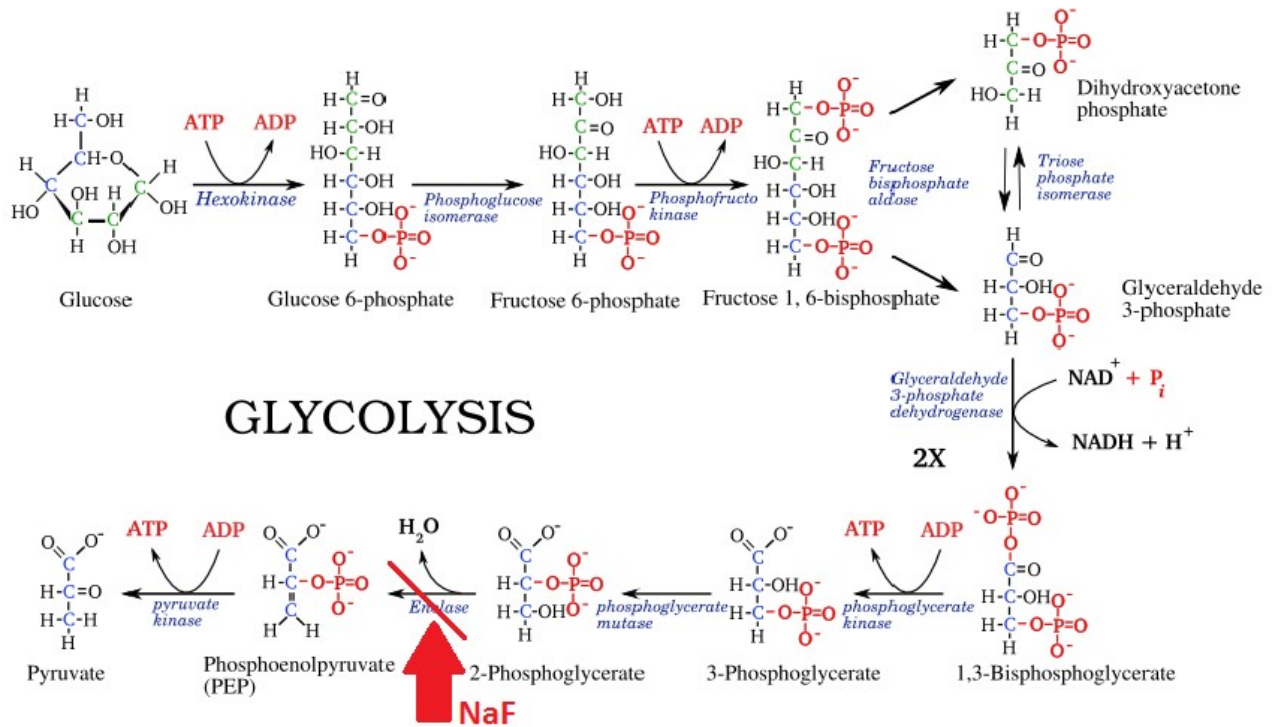
Hlavní roli zde má inzulín, který je vyplavován z beta buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu. Sekrece je přímo vázaná na zvyšující se koncentraci glukózy v krvi. Jeho účinek pozitivně ovlivňuje proniknutí monosacharidů do buňky pomocí navázání se na receptory v buněčné membráně a tím snižuje koncentraci glukózy v krvi.

Antagonista inzulínu je glukagon. Sekrece probíhá v alfa buňkách Langerhansových ostrůvků při poklesu glukózy v krvi. Předává informaci játrům, aby začaly s glykogenolýzou a vytvářely ze zásobního glykogenu krevní cukr. Po vyčerpání glykogenu spouští glukoneogenézu (Dastych 2008).

3.1 Stabilita glukózy

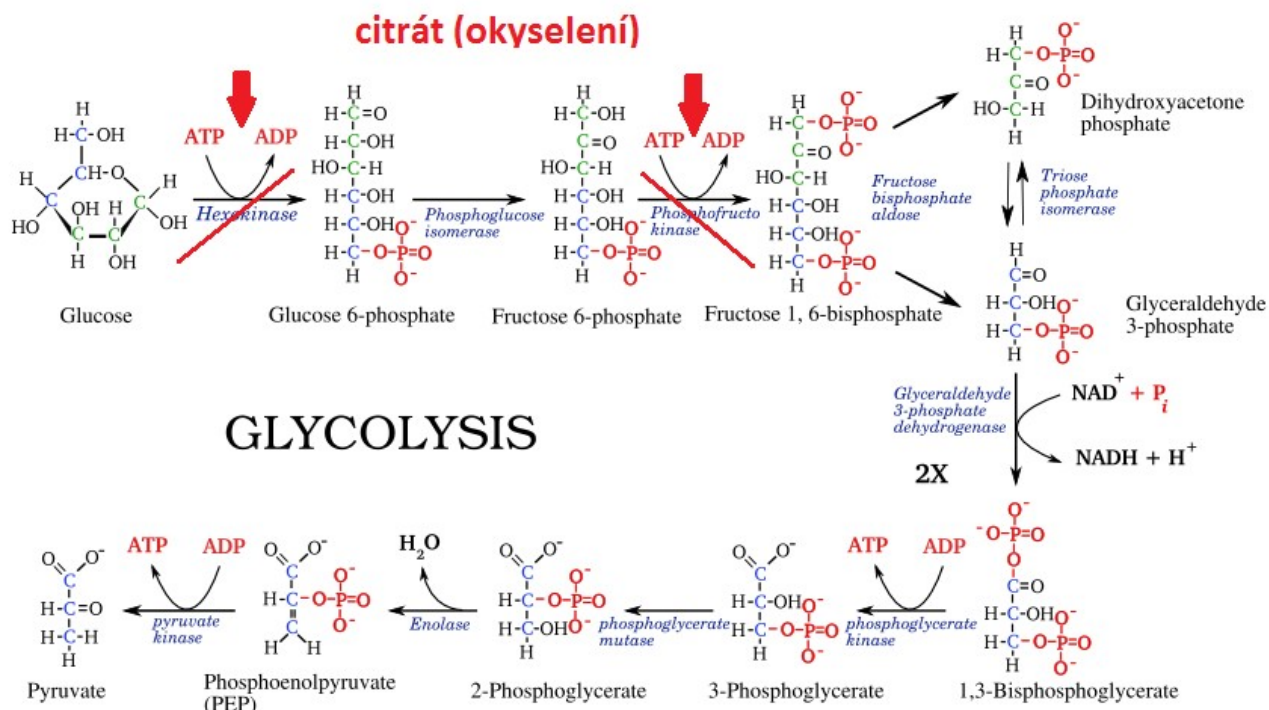
Přesné stanovení koncentrace glukózy v krvi je velmi významné pro určení diagnózy diabetu a to zvláště gestačního, u kterého nelze využít jiné stanovení jako hemoglobin A1c. Bohužel i přes moderní a přesné vybavení klinických laboratoří je zde stále neautomatizovaná preanalytická část jejíž součástí jsou postupy při odběru a transportu a dobře vyškolený odběrový personál. Tyto faktory výrazně ovlivňují právě koncentraci glukózy (Friedecký et al. 2015). I po odebrání krve do odběrové nádoby ve vzorku stále probíhají metabolické děje jako je anaerobní glykolýza, která fyziologicky snižuje hladinu cukru v krvi. Úbytek glukózy v odebraném vzorku představuje větší riziko chyby než analytická chyba v laboratoři, může se jednat až o snížení 5–10 % po jedné či více hodin po odběru vzorku (Brunds 2009).

V současné době se k odběru používají speciální odběrové nádoby, které obsahují sloučeniny inhibující glykolýzu. Nejběžněji je využíván fluorid sodný (NaF), případně „zlatý standard“ fluorid sodný/oxalát nebo směsi NaF + EDTA (Gambino a Bruns 2013). Již ve studii z roku 1941 je popsáno jak nedostatečná je inhibice glykolýzy pomocí NaF a to hlavně v první hodině po odběru. Fluoridy obsažené v NaF inhibují glykolýzu až na konci. Přesněji jde o deaktivaci enzymu enoláza, který katalyzuje redukci 2-fosfoglycerátu na fosfoenolpyruvát jak je vidět na obr. 1 (Bueding a Goldfarb 1941).



Obrázek 1: Účinek NaF na průběh glykolýzy (Racek prezentace).

Vzhledem k vysokému klinickému významu tohoto stanovení byl v roce 1988 vyvinut nový a vylepšený způsob stabilizace glukózy ve vzorku. Byl využit vliv nízkého pH 5,3 – 5,9 na enzymy působící v první a třetí reakci cyklu glykolýzy. Snížení bylo dosaženo přidavkem citrátu sodného a kyseliny citronové ve zkumavce viz. obr. 2 (Friedecký et al. 2015).



Obrázek 2: Účinek citrátu sodného na průběh glykolýzy (Racek prezentace).

V nedávné době proběhlo nebo stále probíhá několik studií týkající se hlavně tří následujících odběrových systémů. Jde o Terumo Venosafe, Sarsted GlucoEXACT, Greiner Glucomedics. Publikované výsledky se mírně odlišují v míře potlačení glykolýzy, ale všechny se shodují, že použití citrátu s kyselinou citronovou má lepší výsledky na úbytku glukózy způsobené glykolýzou (Friedecký et al. 2015).

3.2 Diabetes mellitus

Pod tímto názvem je ukryto onemocnění projevující se poruchou metabolismu sacharidů. Mývá chronický charakter a v neléčeném stádiu dlouhodobě zvýšenou hladinou glukózy nad referenční mez. Prevalence tohoto onemocnění v současnosti velmi roste. Příčinou může být genetická predispozice či špatný životní styl jedinců. Počet lidí s diabetem vzrostl ze 108 milionů v roce 1980 na 422 milionů v roce 2014. Celosvětová prevalence tedy tvoří 8,5% obyvatel, přičemž největší nárůst je měřen v zemích středních a nízkopříjmových (Mathers 2006). Toto číslo může být navýšeno počtem lidí, u kterých ještě onemocnění není diagnostikované.

U tohoto onemocnění je důležitá včasná a přesná diagnostika, ke které napomáhá přímé stanovení koncentrace glukózy či zátěžové testy. Neméně důležitou součástí vyšetření jsou i vhodné podmínky odebrání vzorku a použití správných inovujících přísad ke konzervaci glukózy.

Diabetes mellitus je rozdělován na několik druhů chronických onemocnění.

- diabetes mellitus I. typu – absence tvorby inzulínu
- diabetes mellitus II. typu – inzulínová rezistence
- gestační diabetes - narušení glukózové tolerance u těhotných
- prediabetes - narušení glukózové tolerance
- typy diabetu způsobené jinými mechanismy – destrukce β -buněk jiným mechanismem

Nejčastěji se vyskytuje diabetes mellitus II. typu, především u starší populace. Diabetes mellitus I. typu se projevuje již u mladých lidí kolem 18 let, ale i méně. Ostatní typy jsou méně časté (Racek 2006).

4. Draslík

Draslík patří v těle mezi hlavní kationy intracelulární tekutiny. Jeho celkový obsah v těle činí okolo 3 500 mmol. Intracelulární draslík je vázaný v buňce na různé makromolekuly jako jsou proteiny nebo polysacharidy a jeho koncentrace tvoří 98% z celkového draslíku. Zbývá 2% se nalézají mimo buňku povětšinou ve formě izolovaného kationtu (Racek et al. 2006).

Pro správnou funkci nervové soustavy a celkově organismu je velice důležité, aby tělo udrželo koncentraci draslíku mezi intracelulární a extracelulární tekutinou v takto rozdílném poměru. Mechanismus určený k udržení tohoto poměru se nazývá sodno-draselná pumpa. Jedná se o aktivní přenos dvou draselných kationtů dovnitř buňky a tří sodných kationtů vně buňky. Při přenosu dochází ke spotřebě ATP za účasti enzymu Na⁺-K-adenozintrifosfatázy.

Draslík je jedním z nejčastěji testovaných analytů v klinické laboratoři. Kvůli své rozhodující úloze při homeostáze těla mohou laboratorní chyby, které způsobují nepřesné výsledky draslíku, významně ovlivnit bezpečnost pacientů (Racek et al. 2006)..

4.1 Možné druhy ovlivnění draslíku před stanovením

Je třeba dbát zvýšené pozornosti u pseudohyperkalemických stavů, které neodrážejí skutečný stav *in vivo* a mohou tak vést ke zpoždění péče o pacienta nebo dokonce k jeho nesprávné léčbě. Je nezbytné identifikovat všechny proměnné, které mohou způsobit pseudohyperkalémii a porozumět těmto mechanismům, jimiž tyto proměnné ovlivňují hladinu draslíku v séru.

Ve většině případů je zvýšená hladina draslíku v séru způsobena faktory v preanalytické fázi testovacího cyklu. Objevují se účinky specifických proměnných a proměnných, které se týkají získávání a zpracování vzorků, manipulace a transportu (Stankovic a Smith 2004).

Před náběrem krve, který je určen k vyšetření draselných kationtů, se nedoporučuje cvičit paži tzv. pumpování (Friedecký, 2007). Stejně tak by neměl být použit turniket nebo by měl být uvolněn několik minut před odběrem. Vlivem těchto dvou faktorů

dochází ve stažené paži k anaerobnímu metabolismu. To způsobuje zvýšení koncentrace draslíku až o dvě desítky procent v místě vpichu (Racek et al. 2006).

Pro stanovení draslíku je velmi důležité, aby ve vzorku nebyla hemolýza. Ta sice může vzniknout jako patologický jev *in vivo*, ale ve většině případů vzniká *in vitro* nějakým mechanickým poškozením během náběru nebo transportu. Při hemolýze dochází k poškození buněk erytrocytů a vylití jejich obsahu. Takto vzniká v séru nebo plazmě zvýšená koncentrace intracelulárních analytů jako je například právě draslík. V klinickém výsledku pak tyto analyty mohou vykazovat falešně pozitivní výsledek (Friedecký, 2007).

Vzorek pro stanovení kália, ať už je to srážlivá či nesrážlivá krev, musí být separován od buněk v co nejkratším čase. V odebraném vzorku totiž i nadále probíhají metabolické děje. Při vyčerpání energie buňky začínají omezovat svoje funkce jako sodno-draselnou pumpu, která nedokáže udržet nerovnoměrný poměr draslíku a sodíku mezi intracelulární a extracelulární tekutinou.

Ještě rychlejší únik draslíku nastává při skladování plné krve v nízkých teplotách. Sodno-draselná pumpa je složená z enzymů, které v chladných podmínkách okamžitě zastavují svou činnost (Racek et al. 2006).

Běžně se při vyšetření draslíku používá sérum resp. odběr srážlivé krve do zkumavky se separačním gelem. Zde však fyziologicky bývá o několik procent vyšší hladina draslíku, než je tomu u odběru plazmy – nesrážlivé krve. Tato pseudohyperkalémie je odrazem procesu srážení, kdy se draslík uvolňuje z destiček (Bronson et al. 1966).

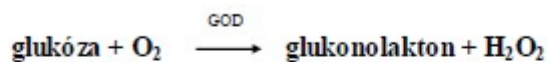
5. Laboratorní metody měření glukózy

Pro stanovení glukózy v krvi existuje mnoho druhů metod. V současné době se nejvíce využívají metody na principu enzymových a elektrochemických. Dříve se též používaly metody na principu oxidoredukce či metody postavené na barevných reakcích, ale dnes vzhledem k časové náročnosti, nedostatečné specifitě či kancerogennímu vlivu se od nich ve velké míře upouští (Kotyza et al. 2007).

5.1 Metoda glukózaoxidázová-peroxidázová (GOD-POD)

Standardizovaná a v praxi nejčastěji používaná metoda. Principem této metody je oxidace glukózy vzdušným kyslíkem na D-glukonolakton a peroxid vodíku za katalýzy glukózaoxidázou (GOD). Peroxid se využívá buď k oxidaci některých leukobází (aromatické diaminy typu o-tolidin) nebo častěji k oxidační kopulaci při které reaguje s fenolem a 4-aminoantipyrinem na červeně zbarvený chinonimin. Reakce je katalyzovaná peroxidázou (POD). Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci glukózy ve vzorku a měří se spektrofotometricky při 500 nm.

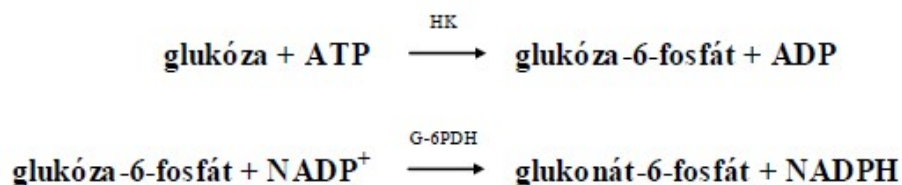
U této metody lze využít buď měření typu end-point, kdy koncentraci analytu měříme po dokončení barevné reakce nebo využijeme měření kinetického typu. U kinetiky měříme nárůst zbarvení vznikající během procesu za určitou časovou jednotku (Kotyza et al. 2007).



5.2 Metoda hexokinázová

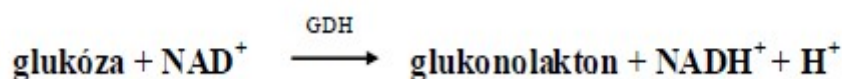
Všeobecně akceptovaná referenční metoda s vysokou specifitou a velice přesnými výsledky. Principem je reakce glukózy s molekulami adenosintrifosfátu (ATP), kterou katalyzuje hexokináza za vzniku glukózo-6-fosfátu a adenosindifosfátu (ADP). Glukózo-6-fosfát se dále oxiduje za přítomnosti glukóza-6-fosfátdehydrogenázy (G-6-PDH) na 6-fosfoglukonát. Současně dochází k redukci NADP^+ (nikotinamidadenindinukleotidfosfát) nebo NAD^+ (nikotinamidadenindinukleotid). Sleduje se nárůst absorbance NADPH nebo specifitějšího NADH při 340 nm, která je přímo úměrná koncentraci glukózy v analyzovaném vzorku. V tomto spektru nedochází k interferenci glukóza-6-fosfátdehydrogenázy z erytrocytů (Kotyza et al. 2007, Yee et al. 1972).

Reakce může probíhat i ve viditelné oblasti světla. Pokud NADPH necháme dále reagovat s fenazinmetosulfátem a substituovanou tetrazoliovou solí za vzniku zbarvení měřeného při 520 nm.



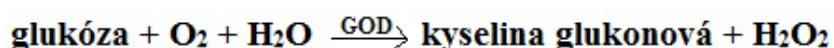
5.3 Metoda glukózadehydrogenázová

V České republice se s touto metodou takřka nepotkáme hlavně z ekonomických důvodů. Princip je podobného rázu jako u metody GOD-POD. Glukóza ve vzorku se oxiduje enzymem glukózadehydrogenázy (GDH) za současné redukce NAD^+ na NADH (Dastych et al. 2008).



5.4 Metody elektrochemické

Tyto metody jsou založeny na měření koncentrace glukózy pomocí enzymových elektrod a následném ampérometrickém měření. K tomuto účelu se využívá Clarkova kyslíková elektroda, která má glukózaoxidázu (GOD) zakotvenou na vrstvě pryskyřice na svém povrchu. Enzym katalyzuje reakci glukózy se vzdušným kyslíkem za vzniku glukonolaktonu a peroxidu vodíku (Čermáková et al. 2003).



Peroxid vodíku difunduje přes membránu z acetátu celulózy a oxiduje se zpět na platinové anodě. Na stříbrné katodě pak dochází k jeho redukci na vodu. Dojde k úbytku elektrického proudu, který je přímo úměrný koncentraci glukózy ve vzorku.

Glukometr je též založen na elektrochemickém principu. Stačí pouze jedna kapka krve na reakční zónu proužku (celulózová či skleněná vlákna nebo želatinový film), aby došlo k barevné reakci, která je přímo úměrná výši glykémie a měřena reflexní fotometrií. Toto jednoduché použití a nenáročnost přístrojového vybavení je hlavním důvodem použití této metody k orientačnímu a rychlému stanovení glykémie v domácím prostředí. Glukometry pracují na principu GOD-POD (Dohnal, Štern 2008).

6. Laboratorní metody měření draslíku

Pro stanovení draslíku v laboratorním prostředí se nejčastěji používá metoda potenciometrie. Další, ale již méně používané v běžné praxi jsou plamenová emisní spektrofotometrie a enzymatická metoda.

6.1 Potenciometrické měření

Metoda založená na tomto principu využívá iontově-selektivní elektrody (ISE), na jejichž membráně, která je selektivně propustná jen pro určité ionty, vzniká potenciál, přesněji řečeno Donnanův potenciál. Ionty, které jsou specifické pro danou elektrodu, mohou volně vstupovat přes membránu, kde vyvolávají potenciálový rozdíl mezi membránou a okolním prostředím (Klouda 2003).

ISE membrána ve své struktuře zahrnuje specifický nosič draselných iontů rozpuštěný na porézním PVC. Místo PVC může být použit také teflon nebo méně používaný boritanový anion. U analyzátorů dovážených například z Japonska se používají „crown“ etery nebo kryptandy (FONS 2018).

Na membránu je aplikovaný roztok KCl a pomocí iontoměniče je udržována stálá aktivita draselných iontů. Velikost Donnanova potenciálu je pak podmíněna pouze aktivitou specifického iontu ve vzorku.

Membrána na ISE elektrodě odděluje od sebe roztok vzorku od vnitřního roztoku. Vnitřní roztok obsahuje stanovovaný iont, pro který je membrána propustná. Vzniká membránový potenciál dle Nernstovy rovnice. Porovnáním s interferencí referenční elektrody je tento elektrický potenciál převeden na napětí a poté na koncentraci iontu ve vzorku (Klouda 2003).

6.2 Plamenová emisní spektrofotometrie

Při tomto typu měření je kapalným vzorkem společně s přísadkou solí lithia vstříkovan do plamene o 1925 °C. Lithium ve vzorku funguje coby vnitřní standard k vyrovnání

měřeného signálu. Při měření sledujeme emisi elektromagnetického záření volnými atomy látek v plynném stavu.

Draslík je měřen při 768 nm a barví plamen do fialova (Čermáková 2003).

6.3 Spektrofotometrické metody

Pracují na principu makrocyclických sloučenin, které dokážou vázat draslíkový iont a zároveň odštěpovat rovnocenné množství vodíkových iontů. V soustavě se změní hodnota pH a upraví barvu acidobazického indikátoru. Taktéž může být použito enzymové stanovení, kdy aktivita pyruvátkinázy je přímo úměrná aktivitě draslíku (Čermáková 2001).

7. Hypotéza a cíl práce

7.1 Hypotéza

Koncentrace glukózy stanovované v séru (zkumavka se separačním gelem) by měla klesat v závislosti na čase od odebrání krve po její separaci v centrifuze.

Koncentrace glukózy v plazmě (zkumavka s aditivem fluorid sodný/oxalát draselný) by měla zůstat konstantní po celý průběh měření.

Koncentrace draslíku ve vzorku plné krve by měla být stabilní 3 hodiny, poté by měla hodnota koncentrace stoupat.

Tyto předpoklady vychází z odborné literatury nebo jsou deklarovány výrobcem zkumavek.

7.2 Cíl práce

Cílem tohoto experimentu je snaha o ověření skutečnosti, zda se koncentrace měřeného analytu bude ve vzorku měnit. Vzorky jsou vystaveny odlišným podmínkám, kterými jsou:

- Odběrové zkumavky – srážlivá a nesrážlivá krev
- Prodlužující se čas od odběru po separaci vzorku
- Různé teplotní podmínky během skladování před separací vzorku

Z výsledku měření se potvrdí či vyvrátí, zda je trend změny hodnot koncentrací v souladu s vlastnostmi zkumavek udávanými výrobcem.

Změny hodnot koncentrací jednotlivých analytů v odlišných podmínkách budou posuzovány z hlediska klinického významu pro danou analýzu.

8. Metodika

8.1 Probandi

Pro měření byly použity vzorky krve od 11 dobrovolníků. Probandi byli ve věku od 20 do 50 let. Mezi účastníky byli dva diabetici, jejichž vzorky byly vyhodnocovány samostatně, ostatní vykazovaly hodnoty koncentrací obou analytů v referenčních mezích.

8.2 Preanalytická fáze mimolaboratorní

Vzorky byly odebírány kvalifikovanou odběrovou zdravotní sestrou v odběrové místnosti sousedící s laboratoří. Každému účastníkovi bylo odebráno 12 zkumavek krve neprodleně za sebou a to 6 zkumavek se separačním gelem a 6 zkumavek s přídavkem fluoridu sodným/oxalátem draselným.

Dobrovolníci před odběrem dodržovali pitný režim a dietu dle doporučení a ráno před odběrem každý vypil doporučené množství tekutin, přibližně 250 ml vody či neslazeného čaje. Samotný odběr probíhal v poloze vsedě v 7 hodin ráno ze žíly na paži. Účastníkům byla nasazena manžeta na pár sekund před odběrem pro zviditelnění žil a usnadnění odběru.

Pro odběr byl použit sterilní vakuový systém BD Vacutainer viz. obr. 3 využívající tzv. kloboučky viz. obr. 4 umožňující odběrovým zdravotním sestram snadnou a bezpečnou manipulaci s minimalizací přenosu potenciální infekce.

Zkumavky byly před odběrem řádně označeny a po naplnění byl obsah vždy pomalým opakovaným obrácením promíchán.

Vzorky byly po odběru neprodleně doručeny do laboratoře.



Obrázek 3: Odběrové zkumavky použité při výzkumu.



Obrázek 4: Použití kloboučku při odběru.

8.3 Preanalytická fáze laboratorní

Po přijetí odběrů do laboratoře byly vzorky rozděleny na vzorky měřené při pokojové teplotě a na vzorky měřené při teplotě 4 °C, které byly uloženy v lednici až do doby separace.

Vzorek určený pro měření v 0 hodin byl po přijetí do laboratoře umístěn na 15 minut do stojánku, aby se vytemperoval na pokojovou teplotu a nedošlo při centrifugaci k hemolýze.

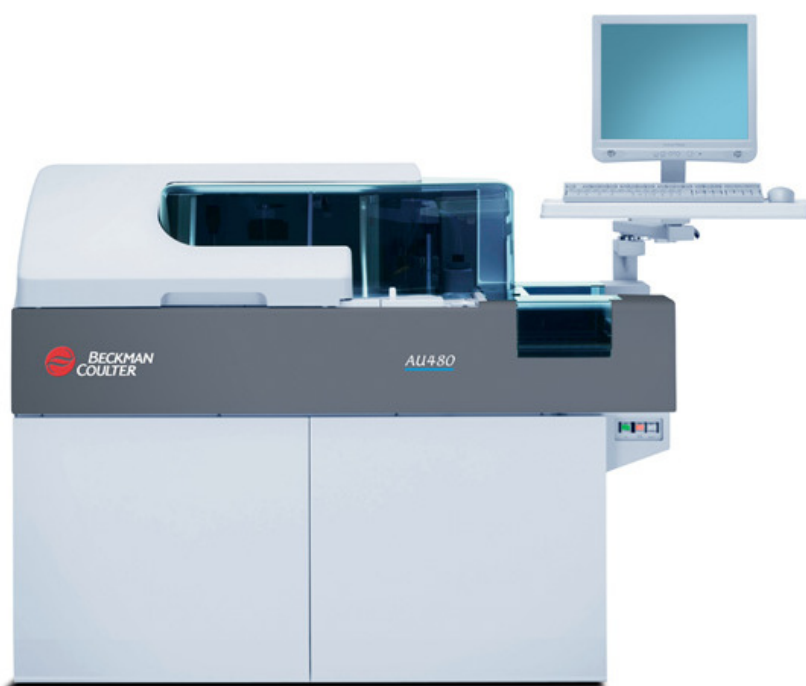
Po uplynutí stanoveného času byl vzorek umístěn do centrifugy Centric 322A a separován na 3000 ot/min po dobu 10 minut. Tato doba by měla být dostatečná k úplné separaci buněčných složek krve od séra či plazmy.

Ostatní vzorky byly separovány vždy těsně před měřením a to v časech 2, 4, 5, 6 a 8 hodin od odběru. Vzorky z lednice byly před separací ponechány přibližně 15 minut ve stojánku při pokojové teplotě, aby nedošlo k hemolýze.

Před samotnou analýzou bylo nutné zadat požadavky na vyšetření do LISu. Poté byly vzorky polepeny čárovým kódem, který nesl informace o zadaném vyšetření.

8.4 Analytická fáze

Vzorky byly měřeny na analyzátoru AU480 jenž je otevřený, plně automatizovaný selektivní analytický systém od firmy Beckman Coulter viz. obr. 5 s maximálně flexibilním programem pro rutinní a statimové biochemické analýzy s výkonem 400 testů za hodinu, s ISE modulem 800 testů za hodinu. Software analyzátoru nabízí 99 předprogramovatelných metod – 96 fotometrických (dvoučinnidlových) a 3 metody ISE a s více než 120 různými aplikacemi reagensů, včetně sérových indexů (www.beckmancoulter.com).



Obrázek 5: Analyzátor AU480 (www.beckmancoulter.com)

Měření se provádí na principu fotometrie, turbidimetrie, latexové aglutinace, homogenní EIA (CEDIA) v rozsahu 13 pevných vlnových délek (340 až 800 nm). Volitelná jednotka je ISE modul na stanovení koncentrace iontů (Na, K, Cl) na principu nepřímé potenciometrie. Na analyzátoru se stanovují běžné biochemické parametry v biologickém materiálu: enzymy, substráty, minerály, specifické proteiny, DAU, TDM

atd. Analyzátor umožňuje předředění vzorků, analýzu se sníženým nebo zvýšeným objemem vzorku (SOP.T.Vim 2017).

Analyzátor provádí několik typů měření END, END1 (test konečného bodu) kdy se měří absorbance po ukončení reakce a intenzita zbarvení (zákalu), jenž je úměrná koncentraci analytu ve vzorku. RATE, RATE1 (kinetické měření). Měří se změna absorbance během reakce (v čase), přičemž je její rychlost úměrná aktivitě analytu ve vzorku. FIXED, FIXED1 (test pevného bodu), při níž se měří změna absorbance mezi 2 body, intenzita zbarvení (zákalu) je poté úměrná koncentraci analytu ve vzorku.

Veškeré reagenty jsou dodávány výrobcem v kapalném stavu, připravené k přímému použití v podobě kitů s barcodem, který si analyzátor sám načte a informace uloží do systému. Exspirace reagentů v analyzátoru je sledována jeho softwarem a obsluha je povinná hlášení o expiraci kontrolovat.

Vzorky připravené k analýze byly vkládány do analyzátoru ve speciálním stojánku a srovnány čárovým kódem na přední stranu, aby analyzátor mohl přečíst požadavky a provést požadované testy. Společně s požadavky byl analyzátor automaticky nastaven na měření hodnoty hemolýzy, ikterity a chylozity ve vzorku. Toto automatické měření je zvláště důležité pro stanovení draslíku, který je velmi náchylný na hemolýzu.

8.4.1 Kalibrace

Před analýzou vzorků na analyzátoru musí být každá metoda kalibrovaná. Provedení a časové intervaly kalibrace jsou přesně specifikovány v SOP pro daný analyzátor. Draslík se kalibruje automaticky každý den před provedením IKK (interní kontrola kvality) a glukóza vždy dle potřeby či při změně šarže reagentů.

Kalibrátory pro draslík jsou připravené k přímému použití od výrobce:

- ISE Hight Serum Standard
- ISE Low Serum Standard

Kalibrátor pro glukózu je dodáván v lyofilizovaném stavu a ředí se před použitím:

- Olympus System Calibrator

8.4.2 Interní kontrola kvality

Součástí vyšetření vzorků je i provedení interní kontroly kvality. Dle konkrétního analytického SOP je kontrola prováděna periodicky každé ráno před zahájením provozu pomocí sériově vyráběného kontrolního materiálu s přesně deklarovanými hodnotami. Vyšetřují se dvě hladiny resp. jedna nízká kontrola a jedna vysoká kontrola. Kontroly jsou dodávány v lyofilizovaném stavu a před použitím je nutné rozředit je dle návodu.

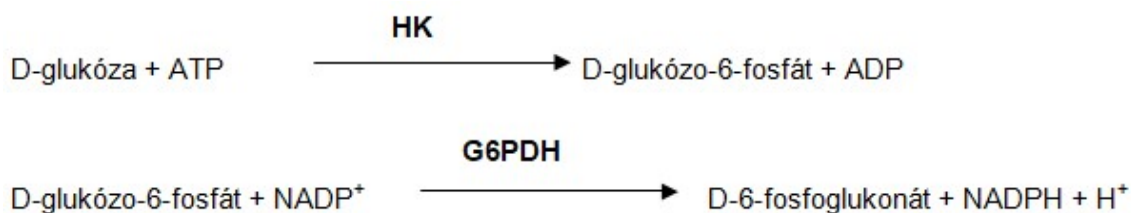
Pro vyšetření glukózy a draslíku byl použit kontrolní materiál dodávaný firmou Beckman Coulter:

- Control serum 1
- Control serum 2

8.4.3 Použitý princip pro stanovení glukózy

Enzymatická referenční metoda s hexokinázou.

Hexokináza (HK) katalyzuje fosforylaci glukózy pomocí adenosintrifosfátu (ATP) na glukózo-6-fosfát a adenosindifosfát (ADP). V následné reakci se druhý enzym, glukózo-6-fosfát dehydrogenáza (G6PDH), užívá ke katalýze oxidace glukózo-6-fosfátu pomocí NADP⁺ za vzniku NADPH. Zvýšení absorbance (měřené při 340 nm) způsobené zvýšením koncentrace NADPH je úměrné koncentraci glukózy ve vzorku.



8.4.4 Použitý princip pro stanovení draslíku

Modul ISE pro K⁺ využívá membránové elektrody s korunovými étery (crown ether) pro stanovení sodíku a draslíku a molekulárně orientovanou membránu z PVC pro

stanovení chlóru. Tyto membrány jsou specifické pro jednotlivé typy analyzovaných iontů ve vzorku. Vývoj elektrického potenciálu určitého iontu se řídí Nernstovou rovnicí. Porovnáním s interní referencí je tento elektrický potenciál převeden na napětí a poté na koncentraci iontu ve vzorku.

8.4.5 Referenční meze

Glukóza

Děti do 16 let : 3,3 - 5,5 mmol/l

Dospělí : 3,3 - 5,6 mmol/l

Draslík

0 – 6 týdnů : 4,70 – 7,50 mmol/l

6 týdnů – 1 rok : 4,00 – 6,20 mmol/l

1 - 15 let : 3,60 – 5,90 mmol/l

Více než 15 let : 3,80 – 5,00 mmol/l

9. Výsledky

9.1 Měření glukózy

Výsledky měření byly rozříděny dle stanovovaného analytu a teploty uskladnění vzorků před analýzou.

Pro lepší orientaci ve výsledcích primárního měření jsou data zapsaná do tabulky, přičemž každý pacient se dělí na dvě měření podle použitého vzorku a na další dvě podle stavu vzorku před stanovením. Celkově bylo tedy u každého pacienta měřeno separované sérum dále pouze st. sérum, sérum separované těsně před analýzou a separovaná plazma, dále pouze st. plazma a vzorek plazmy separovaný těsně před analýzou. Všechna uvedená měření byla analyzována současně ze stejného odběru krve. V tab. 1 jsou uvedeny primární výsledky z měření glukózy při laboratorní teplotě 23 °C. Žlutě označené výsledky jsou vzorky séra separované těsně před analýzou. Oranžově označené výsledky jsou vzorky plazmy separované těsně před analýzou. Nepodbarvené výsledky jsou vzorky stočené při prvním měření po odběru, tzn. při 0 hodinách a následně znovu analyzované vždy v uvedený čas.

Tabulka 1: Primární data měření glukózy při 23 °C.

teplota	pacient	vzorek	Koncentrace glukózy v mmol/l					
			0 hod.	2 hod.	4 hod.	5 hod.	6 hod.	8 hod.
23 °C	Pacient 1	st. sérum	5,3	5,27	5,31	5,29	5,31	5,34
		sérum		4,6	4,3	4,4	3,9	3,9
		st. plazma	5,4	5,36	5,43	5,49	5,37	5,51
		plazma		5,4	5,3	5,4	5,2	5,3
23 °C	Pacient 2	st. sérum	5,4	5,34	5,49	5,49	5,56	5,46
		sérum		5	5	4,9	4,8	4,2
		st. plazma	5,3	5,42	5,48	5,51	5,51	5,46
		plazma		5,2	5,4	5,5	5,5	5,4
23 °C	Pacient 3	st. sérum	5,7	5,81	5,86	5,93	5,82	5,87
		sérum		5,2	5	5	4,8	4,5
		st. plazma	5,8	5,9	5,99	6,03	5,98	5,8
		plazma		5,6	5,7	5,8	5,6	5,6
23 °C	Pacient 4	st. sérum	5,6	5,62	5,96	5,7	5,72	5,87
		sérum		5,1	5,1	4,9	4,6	4,30
		st. plazma	5,7	5,63	5,75	5,67	5,62	5,71
		plazma		5,6	5,6	5,5	5,4	5,40
23 °C	Pacient 5	st. sérum	5,2	5,17	5,31	5,28	5,31	5,4
		sérum		4,6	4,6	4,4	4,2	3,80
		st. plazma	5,39	5,56	5,41	5,5	5,74	5,51
		plazma		5,1	5,3	5	5,1	5,00
23 °C	Pacient 6 - DIA	st. sérum	2,5	2,54	2,59	2,61	2,6	2,6
		sérum		2	1,5	1,4	1,1	1
		st. plazma	2,5	2,46	2,56	2,37	2,59	2,39
		plazma		2,43	2,4	2,34	2,4	2,31
23 °C	Pacient 7 - DIA	st. Sérum	6,5	6,49	6,62	6,56	6,6	6,61
		sérum		5,8	5,4	4,5	4,3	4,4
		st. plazma	6,5	6,46	6,32	6,43	6,58	6,42
		plazma		6,6	6,4	6,5	6,46	6,4

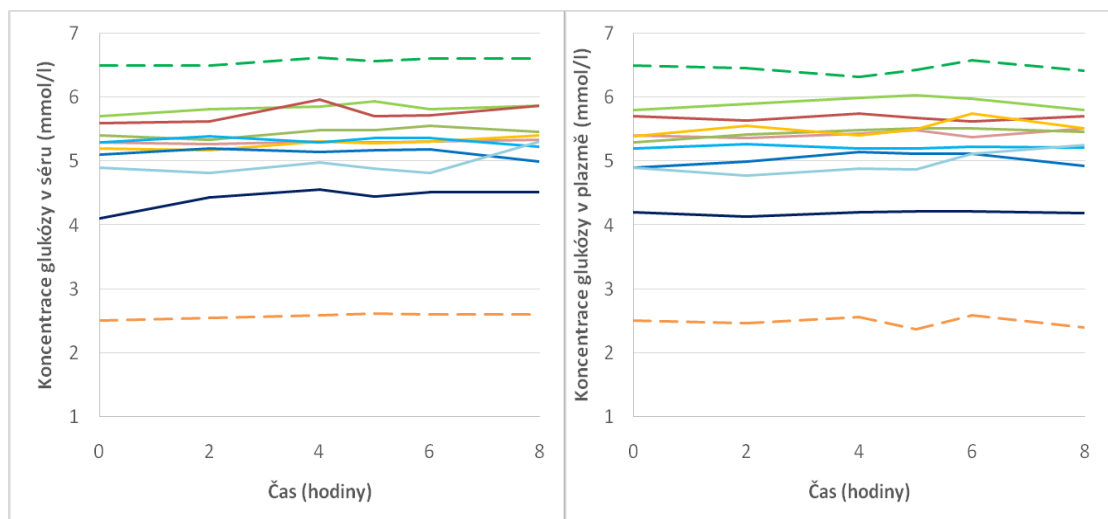
Stejně probíhalo i měření vzorků skladovaných při teplotě 4 °C. Vždy před analýzou byl vzorek přibližně 5 minut temperován při pokojové teplotě a poté separován. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Primární data měření glukózy při 4 °C.

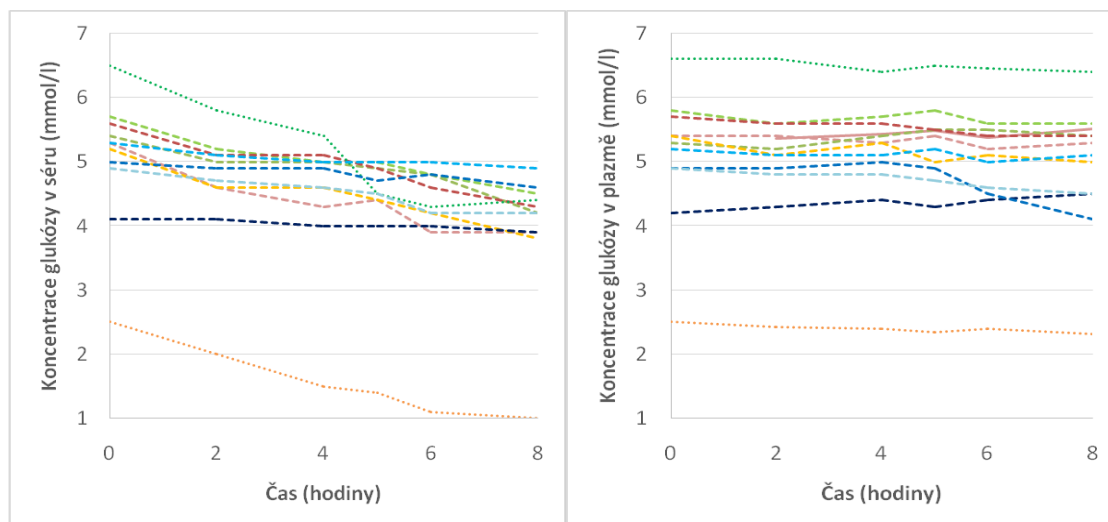
teplota	pacient	vzorek	Koncentrace glukózy v mmol/l					
			0 hod.	2 hod.	4 hod.	5 hod.	6 hod.	8 hod.
4°C	Pacient 8	st. sérum	5,3	5,39	5,29	5,36	5,36	5,22
		sérum		5,1	5	5	5	4,9
		st. plazma	5,2	5,27	5,2	5,2	5,23	5,21
		plazma		5,1	5,1	5,2	5	5,1
4°C	Pacient 9	st. sérum	4,1	4,43	4,56	4,45	4,52	4,51
		sérum		4,1	4	4	4	3,9
		st. plazma	4,2	4,13	4,2	4,22	4,22	4,18
		plazma		4,3	4,4	4,3	4,4	4,5
4°C	Pacient 10	st. sérum	5,1	5,2	5,15	5,17	5,19	5
		sérum		4,9	4,9	4,7	4,8	4,6
		st. plazma	4,9	5	5,14	5,11	5,12	4,92
		plazma		4,9	5	4,9	4,5	4,1
4°C	Pacient 11	st. sérum	4,9	4,81	4,98	4,88	4,82	5,31
		sérum		4,7	4,6	4,5	4,2	4,2
		st. plazma	4,9	4,77	4,88	4,87	5,11	5,25
		plazma		4,8	4,8	4,7	4,6	4,5

Vzorky separované již při prvním měření byly dále analyzovány společně se vzorky separovanými těsně před analýzou. Jejich výsledky podávají konstantní hodnoty a nevyznačují se velkým rozptylem, proto sloužily při měření hlavně coby kontrola viz. obr. 6.

Vzorky separované těsně před analýzou vykazují v séru postupné snížení koncentrace glukózy viz. obr. 7.

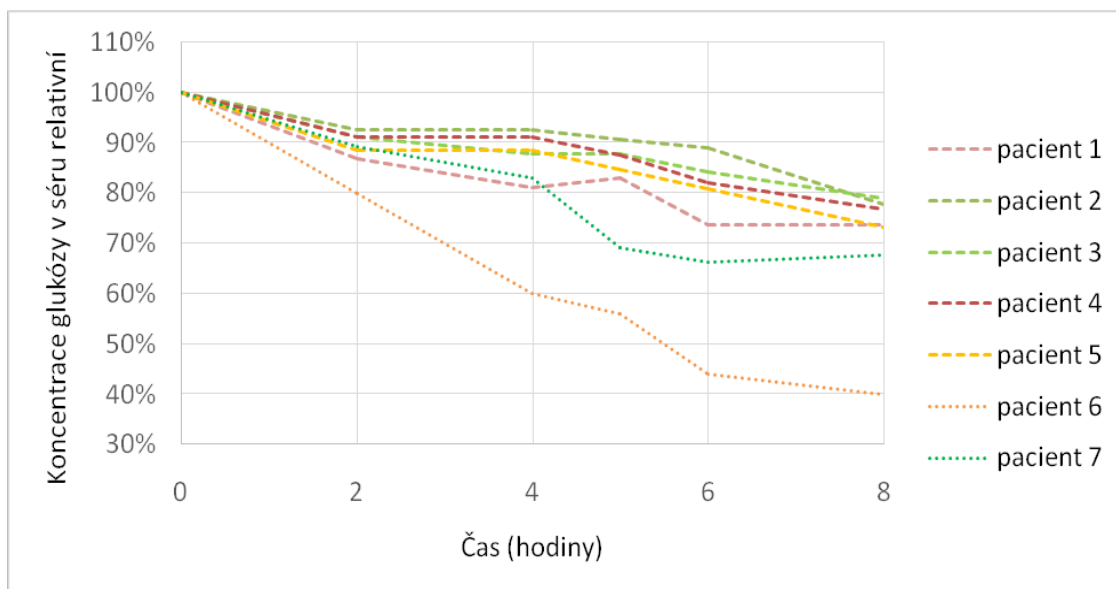


Obrázek 6: Koncentrace glukózy ve vzorcích separovaných následně po odběru.

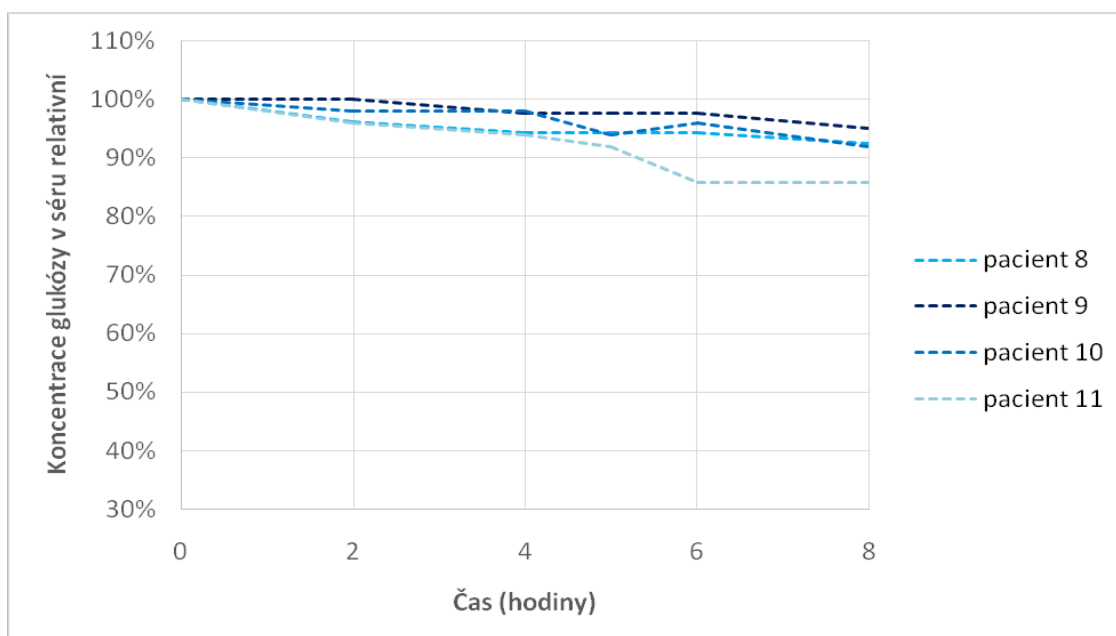


Obrázek 7: Koncentrace glukózy ve vzorcích separovaných těsně před analýzou.

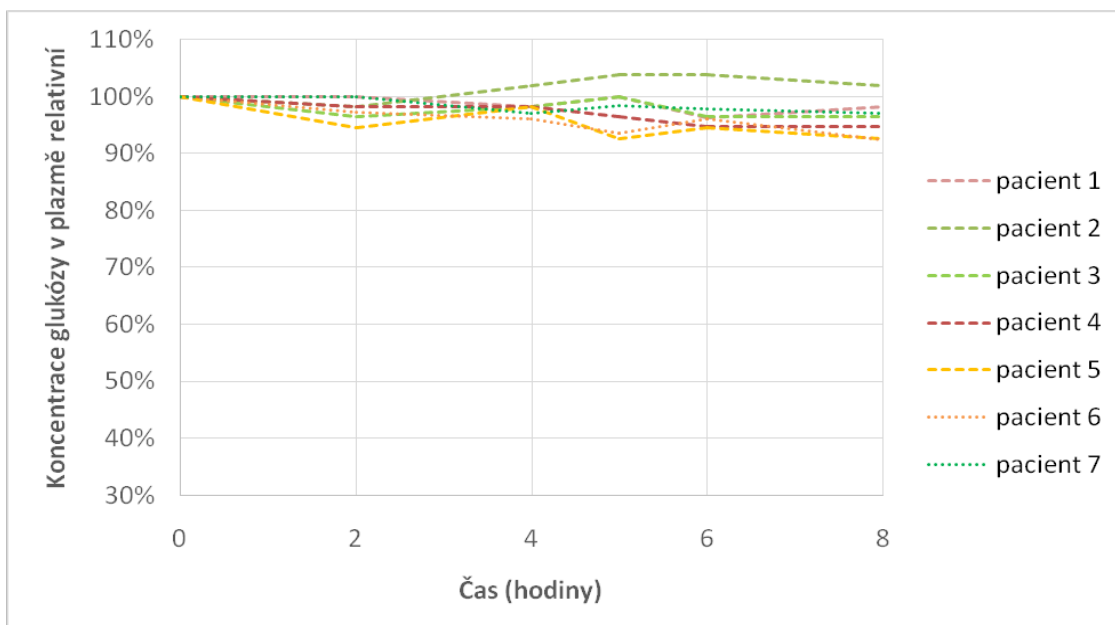
Hodnoty koncentrací vzorků separovaných před analýzou byly převedeny na procenta, přičemž hodnota 100% odpovídá prvnímu měření při 0 hodin a je výchozí hodnotou. Data jsou rozdělena podle materiálu - sérum či plazma a podle teploty 23 °C a 4°C (Obr. 8., 9., 10., 11)



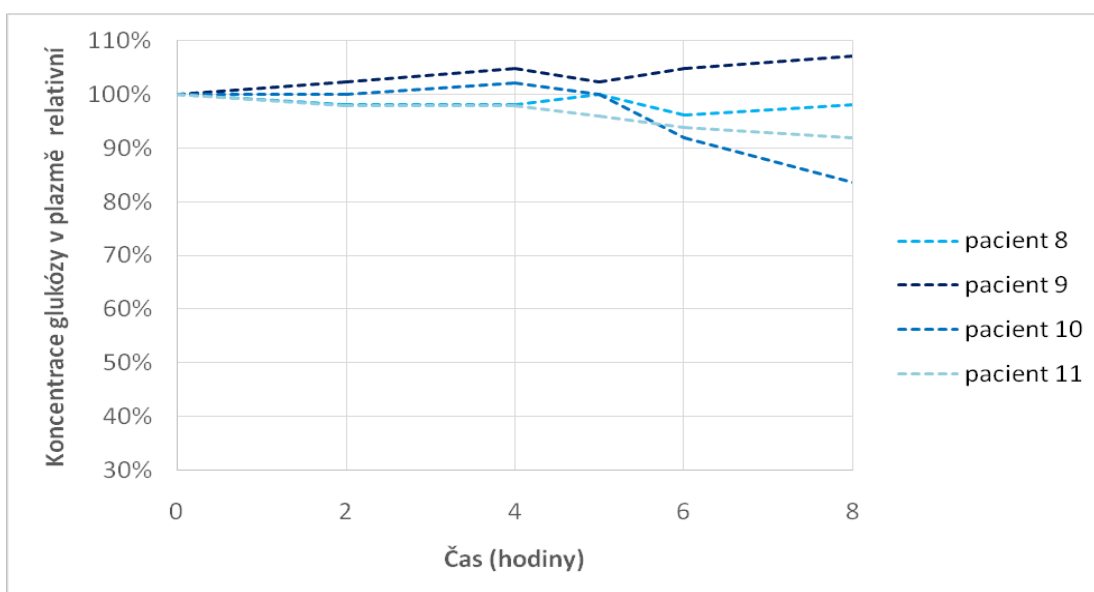
Obrázek 8: Koncentrace glukózy v séru skladovaném při pokojové teplotě 23 °C.



Obrázek 9: Koncentrace glukózy v séru skladovaném při teplotě 4 °C.



Obrázek 10: Koncentrace glukózy v plazmě skladované při pokojové teplotě 23 °C.



Obrázek 11: Koncentrace glukózy v plazmě skladované při teplotě 4 °C.

9.2 Měření draslíku

Draslík byl měřen v séru obdobně jako glukóza. V tabulce 3 jsou výsledky měření při pokojové teplotě. V tabulce 4 jsou výsledky sér skladovaných v lednici při 4°C. Tabulky jsou sestaveny stejně jako u měření glukózy.

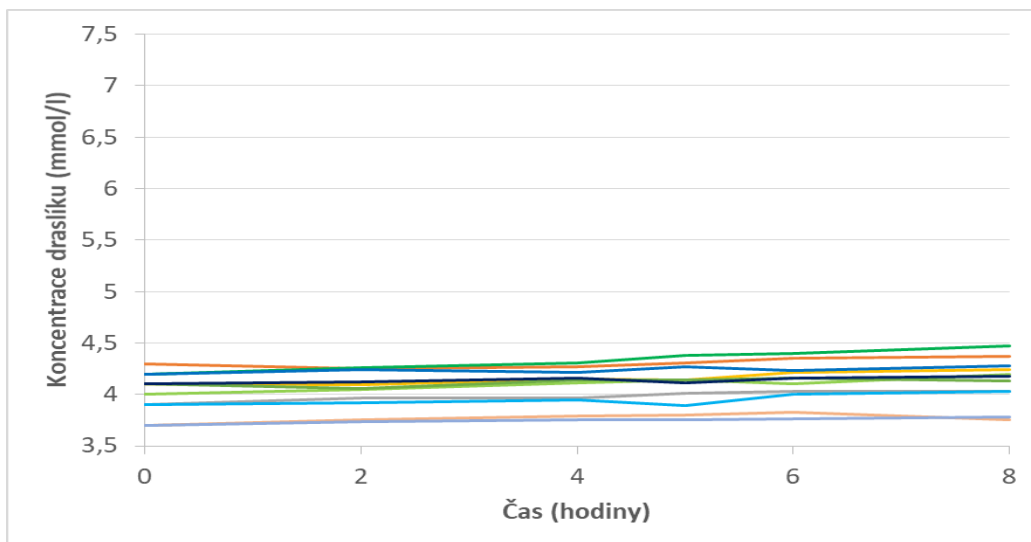
Tabulka 3: Primární data měření draslíku při 23 °C.

			Koncentrace draslíku v mmol/l					
teplota	pacient	vzorek	0 h.	2 h.	4 h.	5 h.	6 h.	8 h.
23 °C	Pacient 1	st. sérum	3,7	3,75	3,79	3,8	3,83	3,75
		sérum		3,8	3,7	3,9	3,8	3,96
23 °C	Pacient 2	st. sérum	3,9	3,97	3,97	4,01	4,03	4,03
		sérum		3,9	3,8	3,9	4	3,9
23 °C	Pacient 3	st. sérum	4	4,05	4,11	4,14	4,1	4,2
		sérum		4	4	4	4,4	4,5
23 °C	Pacient 4	st. sérum	4,3	4,25	4,27	4,31	4,35	4,37
		sérum		4,3	4,4	4,6	4,8	4,90
23 °C	Pacient 5	st. sérum	4,1	4,09	4,15	4,14	4,21	4,24
		sérum		4,3	4,3	4,3	4,2	4,39
23 °C	Pacient 6	st. sérum	4,1	4,06	4,14	4,14	4,16	4,13
		sérum		4,4	4,5	4,5	4,6	5
23 °C	Pacient 7	st. sérum	4,2	4,26	4,31	4,38	4,4	4,47
		sérum		4,6	4,7	4,7	4,7	4,8

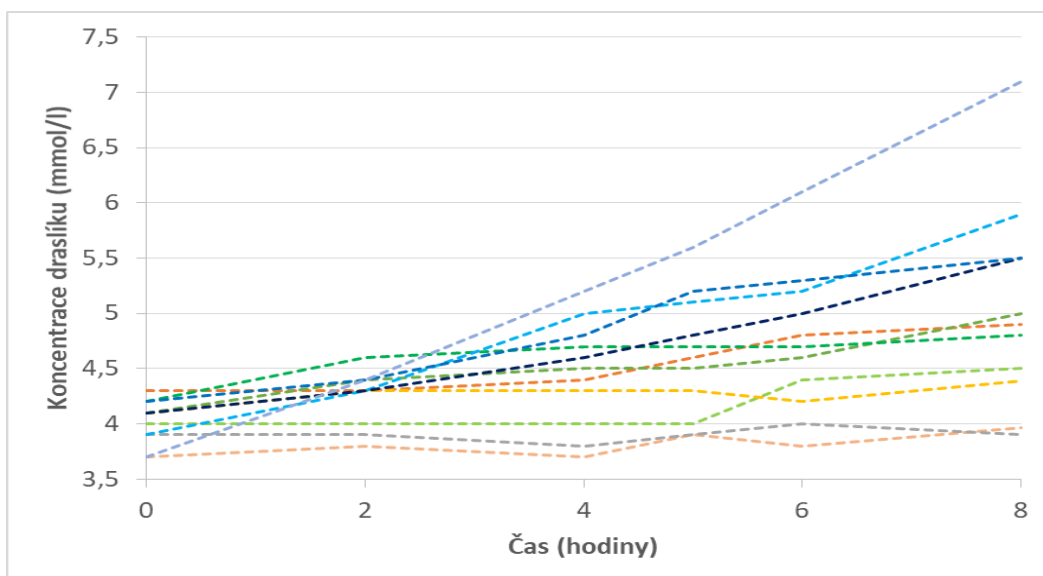
Tabulka 4: Primární data měření draslíku při 4 °C.

			Koncentrace draslíku v mmol/l					
teplota	pacient	vzorek	0 h.	2 h.	4 h.	5 h.	6 h.	8 h.
4°C	pacient8	st. sérum	3,9	3,92	3,95	3,89	4	4,03
		sérum		4,3	5	5,1	5,2	5,9
4°C	pacient9	st. sérum	4,1	4,12	4,16	4,11	4,16	4,18
		sérum		4,3	4,6	4,8	5	5,5
4°C	pacient10	st. sérum	4,2	4,24	4,21	4,27	4,23	4,28
		sérum		4,4	4,8	5,2	5,3	5,5
4°C	pacient11	st. sérum	3,7	3,74	3,75	3,75	3,76	3,78
		sérum		4,4	5,2	5,6	6,1	7,1

Podobně jako u měření glukózy byly výsledky u sér separovaných při prvním měření konstantní po celou dobu vyšetřování (Obr. 12). Naopak séra separovaná těsně před analýzou vykazují značnou změnu koncentrace (Obr. 13).

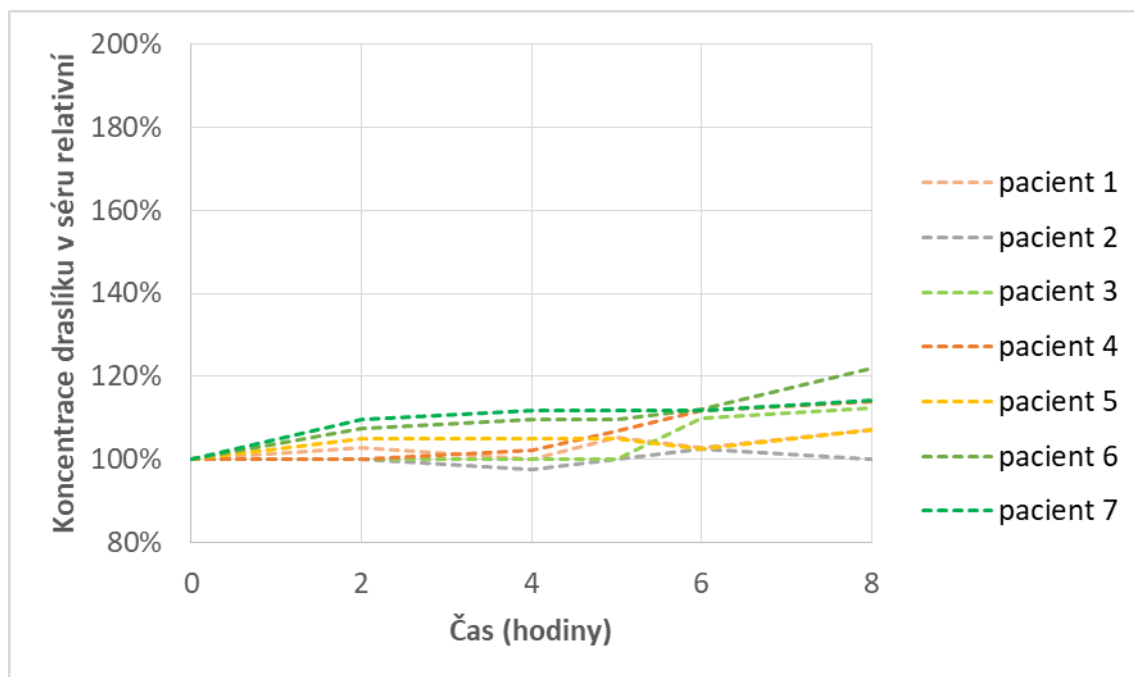


Obrázek 12: Koncentrace draslíku ve vzorcích separovaných na začátku celého měření.

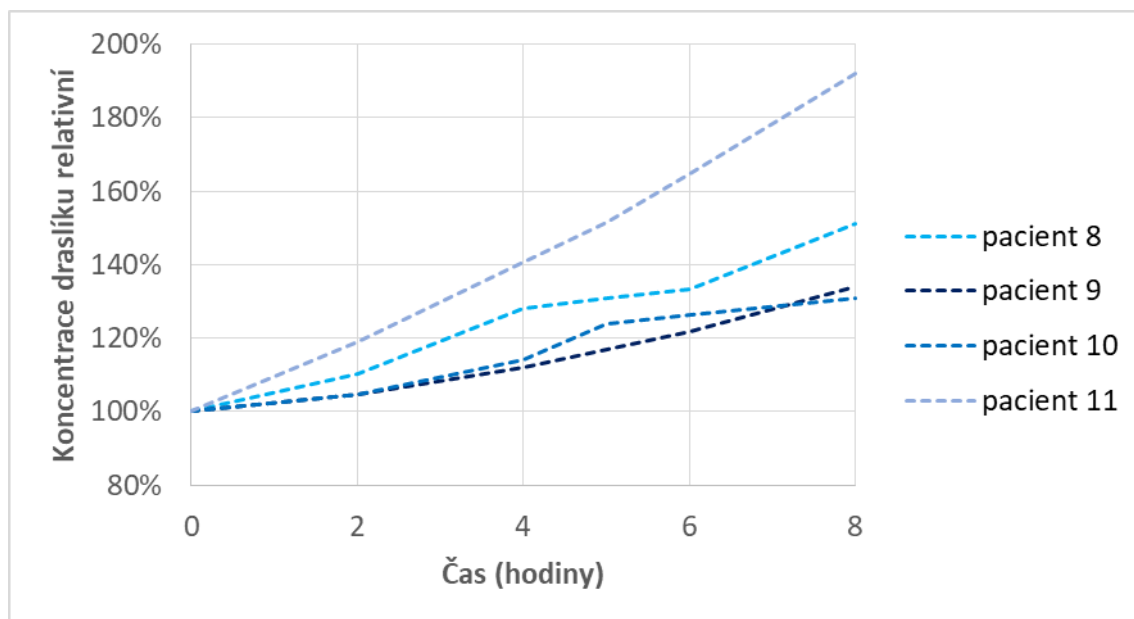


Obrázek 13: Koncentrace draslíku ve vzorcích separovaných těsně před jednotlivým měřením.

Výsledky koncentrací u sér separovaných těsně před měřením byly stejně jako u glukózy převedeny na procenta. Výsledek z prvního měření je považován za hodnotu 100%. Na obrázku 14 jsou uvedeny výsledky sér skladovaných při pokojové teplotě a na obrázku 15 jsou výsledky sér skladovaných v lednici.



Obrázek 14: Koncentrace draslíku v séru při skladování v pokojové teplotě 23 °C.



Obrázek 15: Koncentrace draslíku v séru při skladování v teplotě 4 °C.

9.3 Porovnání dat

Výsledky z měření vykazovaly v čase určitý trend - změnu. U glukózy je patrné, že koncentrace postupem času ve vzorku klesá, u draslíku je to přesně naopak.

Každá klinicko-biochemická metoda má určité malé odchylky v měření, ale nikdy by chyba, pokud je vzorek stálý, neměla přesáhnout určitou hodnotu. Tato hodnota je nazývána Dmax a znamená přijatelný rozdíl ve výsledku. Obvykle je udávána relativně v procentech, ale lze ji vyjádřit též v absolutních jednotkách měření, přičemž může popisovat i asymetrické okolí vztažných hodnot.

Hodnoty Dmax jsou nastavované z hlediska zkušeností jak celosvětových tak i vlastních, jsou odrazem pro aktuálně používanou techniku (state-of-art), ale také berou v úvahu biologickou variabilitu a klinické požadavky.

V přehledu přijatelných rozdílů v procentech pro kvantitativní zkoušky EHK pro rok 2018 je pro glukózu uvedena hodnota Dmax 7% a pro draslík je to 6% (SEKK 2018).

Naměřené koncentrace byly s těmito hodnotami porovnány. Výsledky, které jako první v konkrétním měření přesahují danou hodnotu Dmax jsou označeny červeně a následné měření je označeno růžově (Tab. 5, 6, 7)

Tabulka 5: Porovnání výsledku glukózy v séru s hodnotou Dmax 7%.

teplota	pacient	vzorek	0 hod.	2 hod.	4 hod.	5 hod.	6 hod.	8 hod.
24 °C	pacient 1	st. sérum	100%	99%	100%	100%	100%	101%
24 °C		sérum	100%	87%	81%	83%	74%	74%
24 °C	pacient 2	st. sérum	100%	99%	102%	102%	103%	101%
24 °C		sérum	100%	93%	93%	91%	89%	78%
24 °C	pacient 3	st. sérum	100%	102%	103%	104%	102%	103%
24 °C		sérum	100%	91%	88%	88%	84%	79%
24 °C	pacient 4	st. sérum	100%	100%	106%	102%	102%	105%
24 °C		sérum	100%	91%	91%	88%	82%	77%
24 °C	pacient 5	st. sérum	100%	99%	102%	102%	102%	104%
24 °C		sérum	100%	88%	88%	85%	81%	73%
24 °C	pacient 6 - DIA	st. sérum	100%	102%	104%	104%	104%	104%
24 °C		sérum	100%	80%	60%	56%	44%	40%
24 °C	pacient 7 - DIA	st. sérum	100%	100%	102%	101%	102%	102%
24 °C		sérum	100%	89%	83%	69%	66%	68%
4 °C	pacient 8	st. sérum	100%	102%	100%	101%	101%	98%
4 °C		sérum	100%	96%	94%	94%	94%	92%
4 °C	pacient 9	st. sérum	100%	108%	111%	109%	110%	110%
4 °C		sérum	100%	100%	98%	98%	98%	95%
4 °C	pacient 10	st. sérum	100%	102%	101%	101%	102%	98%
4 °C		sérum	100%	98%	98%	94%	96%	92%
4 °C	pacient 11	st. sérum	100%	98%	102%	100%	98%	108%
4 °C		sérum	100%	96%	94%	92%	86%	86%

Tabulka 6: Porovnání výsledku glukózy v plazmě s hodnotou Dmax 7%.

teplota	pacient	vzorek	0 hod.	2 hod.	4 hod.	5 hod.	6 hod.	8 hod.
24 °C	pacient 1	st. plazma	100%	99%	101%	102%	99%	102%
24 °C		plazma	100%	100%	98%	100%	96%	98%
24 °C	pacient 2	st. plazma	100%	102%	103%	104%	104%	103%
24 °C		plazma	100%	98%	102%	104%	104%	102%
24 °C	pacient 3	st. plazma	100%	102%	103%	104%	103%	100%
24 °C		plazma	100%	97%	98%	100%	97%	97%
24 °C	pacient 4	st. plazma	100%	99%	101%	99%	99%	100%
24 °C		plazma	100%	98%	98%	96%	95%	95%
24 °C	pacient 5	st. plazma	100%	103%	100%	102%	106%	102%
24 °C		plazma	100%	94%	98%	93%	94%	93%
24 °C	pacient 6 - DIA	st. plazma	100%	98%	102%	95%	104%	96%
24 °C		plazma	100%	97%	96%	94%	96%	92%
24 °C	pacient 7 - DIA	st. plazma	100%	99%	97%	99%	101%	99%
24 °C		plazma	100%	100%	97%	98%	98%	97%
4 °C	pacient 8	st. plazma	100%	101%	100%	100%	101%	100%
4 °C		plazma	100%	98%	98%	100%	96%	98%
4 °C	pacient 9	st. plazma	100%	98%	100%	100%	100%	100%
4 °C		plazma	100%	102%	105%	102%	105%	107%
4 °C	pacient 10	st. plazma	100%	102%	105%	104%	104%	100%
4 °C		plazma	100%	100%	102%	100%	92%	84%
4 °C	pacient 11	st. plazma	100%	97%	100%	99%	104%	107%
4 °C		plazma	100%	98%	98%	96%	94%	92%

Tabulka 7: Porovnání výsledku draslíku v séru s hodnotou Dmax 6%.

teplota	pacient	vzorek	0 hod.	2 hod.	4 hod.	5 hod.	6 hod.	8 hod.
24 °C	pacient 1	st. sérum	100%	101%	102%	103%	104%	101%
24 °C		sérum	100%	103%	100%	105%	103%	107%
24 °C	pacient 2	st. sérum	100%	102%	102%	103%	103%	103%
24 °C		sérum	100%	100%	97%	100%	103%	100%
24 °C	pacient 3	st. sérum	100%	101%	103%	104%	103%	105%
24 °C		sérum	100%	100%	100%	100%	110%	113%
24 °C	pacient 4	st. sérum	100%	99%	99%	100%	101%	102%
24 °C		sérum	100%	100%	102%	107%	112%	114%
24 °C	pacient 5	st. sérum	100%	100%	101%	101%	103%	103%
24 °C		sérum	100%	105%	105%	105%	102%	107%
24 °C	pacient 6	st. sérum	100%	99%	101%	101%	101%	101%
24 °C		sérum	100%	107%	110%	110%	112%	122%
24 °C	pacient 7	st. sérum	100%	101%	103%	104%	105%	106%
24 °C		sérum	100%	110%	112%	112%	112%	114%
4 °C	pacient 8	st. sérum	100%	101%	101%	100%	103%	103%
4 °C		sérum	100%	110%	128%	131%	133%	151%
4 °C	pacient 9	st. sérum	100%	100%	101%	100%	101%	102%
4 °C		sérum	100%	105%	112%	117%	122%	134%
4 °C	pacient 10	st. sérum	100%	101%	100%	102%	101%	102%
4 °C		sérum	100%	105%	114%	124%	126%	131%
4 °C	pacient 11	st. sérum	100%	101%	101%	101%	102%	102%
4 °C		sérum	100%	119%	141%	151%	165%	192%

10. Diskuze

Vyšetření glukózy a draslíku patří mezi základní a nejčastěji vyšetřované biochemické analyty. Přesnost výsledků je pro tato stanovení velmi důležitá. Falešně snížené hodnoty glukózy mohou ovlivnit léčbu diabetiků nebo dokonce zabránit odhalení nemoci, přičemž včasná diagnóza je pro toto onemocnění klíčová. Falešně zvýšené hodnoty draslíku jsou zvláště nebezpečné u lidí s akutní nebo chronickou nedostatečností ledvin nebo mohou falešně poukazovat na vnitřní krvácení či zvýšený rozpad buněk v těle pacienta.

Práce se zaměřovala na určení ideální preanalytické fáze, při které by došlo k minimální nebo žádné změně koncentrace zkoumaného analytu. I přes doporučení doby stability v laboratorní příručce laboratoře není vždy v silách svozové služby ani samotných praktických lékařů stihnout vzorek doručit do laboratoře ve vymezenou dobu. Na odběry byly použity odběrové soupravy značky BD Vacutainer, které lékaři běžně využívají. Časy měření byly navrženy tak, aby pokud možno odpovídaly skutečnosti. Změřené hodnoty koncentrací byly převedeny na procenta, přičemž koncentrace získaná z prvního měření po odběru byla vždy brána za (výchozí hodnota stanovená jako 100%) hodnotu 100%.

Glukóza stanovená v séru při pokojové teplotě bez předchozí separace vykazuje dle předpokladů postupné snižování koncentrace. Z výsledků v tabulce 5 je patrné, že všechny vzorky již 2 hodiny od odběru vykazují snížení koncentrace o více jak 7%, což je hraniční hodnota D_{max} uznávaná například v SEKKu. Nejvíce zaznamenaný úbytek je u pacientů s diabetem, kteří měli již v počátku měření patologické hodnoty glukózy. Po 8 hodinách měli dokonce 30% i 60% změnu koncentrace oproti prvnímu měření. Glukóza, která byla separovaná chvíli po odběru a měřena dále ve stanovených časech byla poměrně stálá, i po 8 hodinách nepřekračuje danou hodnotu D_{max} .

Glukóza stanovená v séru při teplotě 4 °C měla o poznání lepší stabilitu a to jak ve vzorcích separovaných hned na začátku měření tak i ve vzorcích separovaných těsně před analýzou. Vzorky separované před analýzou se dají označit za stabilní do 5 hodin od odběru. U vzorků separovaných na začátku měření je stabilita do 6 hodin od odběru. Pouze u jednoho vzorku došlo k překročení 7% již po 2 hodinách.

Glukóza měřená v plazmě ve zkumavce s přidavkem fluoridu sodného a oxalátem draselným vykazovala nejlepší výsledky stability a to jak při pokojové teplotě, tak i při 4 °C. V podstatě všechny vzorky separované na začátku měření, zůstaly po celou dobu stabilní. Vzorky separované před analýzou přesáhly hodnotu Dmax jednou při 5 hodinách od odběru, jednou při 6 hodinách a dvakrát při 8 hodinách. Výsledky diabetiků se nijak výrazně nelišily od výsledků pacientů s normální počáteční hodnotou glukózy v plazmě.

Stanovení draslíku v séru při pokojové teplotě u vzorků separovaných na začátku měření vykazuje stálou stabilitu až do 8 hodin od odběru. U vzorků, které byly separované před analýzou, jsou hodnoty stability o něco nižší. U dvou vzorků hodnota přesahuje povolené Dmax, v tomto případě 6%, již po 2 hodinách od odběru. Ostatní dosahují stability až do 5 hodin od odběru a více.

Vzorky udržované při teplotě 4 °C a separované až před analýzou mají koncentraci draslíku o poznání zvýšenou již po 2 hodinách. Polovina vzorků přesahuje Dmax již po 2 hodinách, druhá polovina má hodnotu po 2 hodinách na hraně a Dmax přesahuje po 4 hodinách. Vzorky ukládané v této teplotě svou koncentraci mění výrazně, nejvýznamnější hodnota je až o 92% vyšší než prvotní výsledek. U stočených sér byly hodnoty stále po celou dobu měření.

Získané hodnoty byly porovnány s rozsáhlou studií Christiany Oddoze, která se zabývá velice podobnými kritérii (Oddoze et al. 2012). Ve své práci uvádí hraniční časy stanovovaných analytů při pokojové teplotě a teplotě 4 °C. U vyšetření glukózy v séru uvádí hraniční čas méně než 2 hodiny při pokojové teplotě a 2 hodiny při teplotě 4 °C. U glukózy v plazmě uvádí stabilitu 24 hodin v obou teplotách. Draslík je dle studie stabilní 4 hodiny v pokojové teplotě a méně než 2 hodiny v teplotě 4 °C. S těmito výsledky se mohou výsledky této práce ztotožnit.

V této práci byly ověřované zkumavky BD Vacutainer s inhibítorem glykolýzy fluoridem sodným/oxalátem draselným. Výrobce u tohoto typu zkumavek uvádí stabilitu glukózy bez separace 24 hodin (katalog BD Vacutainer). Z výsledků měření je patrné, že 4 vzorky z 12 měřených limit Dmax překročí mnohem dříve. Vždy je vhodné, aby si laboratoř ověřila stability analytů deklarované výrobcem odběrového materiálu.

Po analýze výsledků měření je zřejmé, že doporučené časové intervaly vydané ČSKB a současně i interní doporučení naší laboratoře předcházejí falešným hodnotám koncentrací zkoumaných analytů. Je potřeba správně edukovat lékaře i odběrové sestry

a poukazovat ve zvýšené míře na maximální časové prodlevy od odběru do analýzy vzorku a také na vhodně vybraný odběrový materiál.

11. Závěr

Tato práce měla za cíl ověřit stabilitu glukózy a draslíku v různých časových a teplotních podmínkách v krvi bez nebo s přidavkem aditiva. Pro měření glukózy byly použity zkumavky BD Vacutainer® s gelem a BD Vacutainer® s fluoridem sodným a oxalátem draselným. Pro měření draslíku byly použity zkumavky BD Vacutainer® s gelem.

- Stabilita glukózy v séru u stočené krve před prvním měření je víceméně stálá po celou dobu testování a to v obou skladovacích teplotách.
- Stabilita glukózy v séru u předem nestočené krve při pokojové teplotě je stála maximálně do 2 hodin od odběru.
- Stabilita glukózy v séru u předem nestočené krve při teplotě 4 °C je stála maximálně do 4 hodin od odběru.
- Stabilita glukózy v plazmě u stočené krve před prvním měření je stálá po celou dobu testování a to v obou skladovacích teplotách.
- Stabilita glukózy v plazmě u předem nestočené krve při pokojové teplotě je stála maximálně do 5 hodin od odběru.
- Stabilita glukózy v plazmě u předem nestočené krve při teplotě 4 °C je stála maximálně do 6 hodin od odběru.
- Stabilita draslíku v séru u stočené krve před prvním měření je stálá po celou dobu testování a to v obou skladovacích teplotách.
- Stabilita draslíku v séru u předem nestočené krve při pokojové teplotě je stála do 2 hodin od odběru.
- Stabilita draslíku v séru u předem nestočené krve při teplotě 4 °C je stála maximálně do 2 hodin od odběru.

Naměřené hodnoty se shodují i s interním doporučením laboratoře, které jsou součástí laboratorní příručky. Příručka je dostupná na webových stránkách laboratoře a slouží jako zdroj informací pro lékaře. Zároveň lze konstatovat, že doporučení výrobců odběrového materiálu je vhodné si v konkrétních podmínkách laboratoře ověřit.

12. Seznam literatury

1. AU 480 [online], 2017[online], Beckmancoulter. [cit. 2018-01-10]. Dostupné z: <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsr/diagnostics/clinical-products/chemistry/au480/index.htm>
2. BARTOŠ, V., JABOR, A., ZÁMEČNÍK, M., 2005. *Preanalytická fáze*. Praha: Česká společnost klinické biochemie ČLS JEP. ISBN 80-239-5198-x.
3. BONINI, P., PLEBANI, M., CERIOTTI, F., RUBBOLI, F., 2002. Errors in Laboratory Medicine. *Clinical Biochemistry*. **48**(5), 691-698. ISSN 0009-9120.
4. BRONSON, W.R, DEVITA, V., CARBONE P., COTLOVE, E., 1966. Pseudohyperkalemia Due to Release of Potassium from White Blood Cells during Clotting. *The new england journal of medicine*. 274(7), 369-375. DOI: 10.1056/NEJM196602172740702.
5. BRUNS, D., KNOWLER, W., 2009. Stabilization of glukose in blood samples: why it matters. *Clin Chem.*, 55(5), p. 850–852.
6. BUEDING, E., GOLDFARB W., 1941. The Effect of Sodium Fluoride and Sodium Iodoacetate on Glycolysis in Human Blood. *The Journal of Biological Chemistry*. 539-544.
7. ČERMÁKOVÁ, M., ŠTĚPÁNOVÁ, I., 2003. *Klinická biochemie 1. díl*. 1st ed. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. ISBN 978-80-210-4572-9.
8. DASTYCH, Milan a Petr BREINEK, 2008. *Klinická biochemie: bakalářský obor Zdravotní laborant*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-4572-9.

9. DOHNAL, L., ŠTERN, P., 2008. *Stanovení glukózy glukometrem – mýty a skutečnost*. Informační bulletin FONS, no. 3, p. 36–38. ISSN 1211-7137.
10. FONS, 2018. DRASELNÉ IONTY. *Katalogfons* [online]. [cit. 2018-01-14]. Dostupné z: <https://www.katalogfons.cz/Produkty/20D78ABF-0D21-4DE2-ABFA-42E5CD1CEE6C>
11. FRIEDECKÝ, B., 2007. Chyby neanalytických fází vyšetření ve zdravotnické laboratoři. *Klinická biochemie a metabolismus*.(2), 111-115. ISSN 1210 – 7921
12. FRIEDECKÝ, B., SPRINGER D., KRATOCHVÍLA J., 2015. Stabilita glukózy ve vzorcích krve po odběru. *Fons. Informační bulletin*. 25(1), 15-16. ISSN 1211-7137.
13. GAMBINO, R. BRUNS D. E., 2013. Stabilization of glucose in blood samples: out with the old, in with the new. *Clin Chem Lab Med*. 51(10), 1883–1885. DOI: 10.1515/ccm-2013-0341.
14. GUDER, W. G., 2009. Preanalytical Factors and Their Influence on Analytical Quality Specifications. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 59(7), 545-549. doi: <http://dx.doi.org/10.1080/00365519950185328>.
15. GUDER, W.G., FONSECA-WOLLHEIM, F., HEIL, W., SCHMITT, Y., TOPFER, G., WISSER, H., ZAWTA, B., 2009. Quality of Diagnostic Samples: Recommendations of the Working Group on Preanalytical Quality of the German United Society for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Who. Rev*, 2; 85 pp.
16. KATALOG BD VACUTAINER. *Www.schubert24.cz* [online]. [cit. 2018-02-16]. Dostupné z: http://www.schubert24.cz/medic_bd.php

17. KOTYZA, J., 2007. *Úvod do klinické biochemie a enzymologie pro studující lékařství: teorie a praktikum*. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-1350-5
18. KLOUDA, P., 2003. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda. ISBN 80-86369-07-2.
19. LEDVINA, M., STOKLASOVÁ A., CERMAN J., 2004. *Biochemie pro studující medicíny*. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-0850-2.
20. LIPPI, G., GUIDI, G.C., 2007. Risk management in the preanalytical phase of laboratory testing. *Clinical Chemical Laboratory Medicine*. 45(1), 7, doi: org/10.1515/CCLM.2007.167. ISSN 14374331.
21. LIPPI, G., GUIDI, G.C., MATTIUZZI, C., PLEBANI, M., 2006. Preanalytical variability: the dark side of the moon in laboratory testing. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 44(4), 358-365. DOI: 10.1515/CCLM.2006.073. ISSN 1437-4331.
22. MATHERS, C., D., LONCAR D., SAMET J., 2006. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *PLoS Medicine*[online], 3(11), e442- [cit. 2018-02-21]. DOI: 10.1371/journal.pmed.0030442. ISSN 1549-1676. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.0030442>
23. NARAYANAN, S., 2000. The Preanalytic Phase: An Important Component of Laboratory Medicine. *American Journal of Clinical Pathology*. 113(3), 429-452, doi: 10.1309/C0NM-Q7R0-LL2E-B3UY.
24. ODDOZE, Ch., LOMBARD, E., PORTUGAL, H., 2012. Stability study of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma. *Clinical Biochemistry*. 45(6), 464-469. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2012.01.012.

25. RACEK, J., 2006. *Klinická biochemie. 2.*, přeprac. vyd. Praha: Galén. ISBN 80-7262-324-9
26. SEKK, 2018. Přehled přijatelných rozdílů v procentech pro kvantitativní zkoušky EHK. *www.sekk.cz* [online]. 2018, 2018 [cit. 2018-02-12]. Dostupné z: <https://www.sekk.cz/eqa/Dmax.pdf>
27. SOP.T.Vim. 2017. Obsluha a údržba analyzátoru Beckman Coulter AU48. *Standardní operační postup technický. Vimperk.*
28. STANKOVIC, A.K. a S. SMITH. 2004. Elevated Serum Potassium Values: The Role of Preanalytic Variables. *Pathology Patterns Reviews*. 121(1), 105–S112. DOI: 10.1309/UEPQUM11WH9P8JNY.
29. ŠPIČKA, J., 2004. Biochemie. *České Budějovice: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta.* ISBN 80-7040-683-6.
30. TANNER, M., KENT, N., SMITH, B., FLETCHER, S., LEWER. M., 2008. Stability of common biochemical analytes in serum gel tubes subjected to various storage temperatures and times pre-centrifugation. *Annals of Clinical Biochemistry*.45(4), 375-379. DOI: 10.1258/acb.2007.007183.
31. WIWANITKIT, V., 2001. Types and frequency of preanalytical mistakes in the first Thai ISO 9002:1994 certified clinical laboratory, a 6 – month monitoring. *BMC Clinical Pathology* [online]. 1-5 [cit. 2017-11-05]. doi: <https://doi.org/10.1186/1472-6890-1-5>. ISSN 1472-6890.
32. YEE, H., 1972. *Automated hexokinase procedure for assaying glucose in urine, serum, or plasma.* Adv. Clin. Chem., vol. 18, no. 11, p. 1416–9.

13. Seznam zkratek

WHO	Světová zdravotnická organizace
NaF	Fluorid sodný
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová, antikoagulační činidlo
ATP	Adenosintrifosfát
ADP	Adenosindifosfát
GOD	Glukózaoxidáza
POD	Peroxidáza
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
SOP	Standardní operační postup
ISE	Iontově selektivní elektrody
GDH	Glukózadehydrogenáza
HK	Hexokiáza
St. Sérum	Separované sérum
SEKK	SEKK spol. s.r.o, systém externí kontroly kvality
ČSKB	Česká společnost klinické biochemie