

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

**Vliv chylozity a hemolýzy biologického materiálu na
výsledky biochemických analýz**

Monika Tobiášková

Bakalářská práce

2012

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Monika Tobiášková**
Osobní číslo: **C09320**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Vliv chylozity a hemolýzy biologického materiálu na výsledky biochemických analýz**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracovat teoretickou rešerši zabývající se vlivem stavu biologického materiálu na biochemická stanovení.
2. Zaměřit se na popis biologického materiálu a postupy jeho vyšetření (preanalytická, analytická, postanalytická fáze).
3. Další část věnovat popisu hemolýzy a chylozity (definice, vliv na biochemická stanovení, možnosti odstranění).

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **ca 30 stran**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **3. října 2011**
Termín odevzdání bakalářské práce: **22. června 2012**



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.



doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2011

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 14.6.2012

.....

Seznam použitých zkratek

a.	arteria
ACP	kyselá fosfatáza
ALP	alkalická fosfatáza
ALT	alanin aminotransferáza
AST	aspartát aminotransferáza
CK	kreatinkináza
ČIA	Český institut pro akreditaci
EQA	externí kontrola kvality (external quality control)
ELFO	elektroforéza
Fe	železo
hCG	lidský choriový gonadotropin
IgA	imunoglobulin A
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
IQA	interní kontrola kvality (internal quality control)
LD	laktát dehydrogenáza
Li	lithium
LPL	lipoproteinová lipáza
Mg	hořčík
NaCl	chlorid sodný
P	fosfor
pCO ₂	parciální tlak oxidu uhličitého
PNH	paroxysmální noční hemoglobinurie
pO ₂	parciální tlak kyslíku
SLP	správná laboratorní práce
SEKK	Systém externí kontroly kvality
TG	triglyceridy
Zn	zinek

Souhrn

Cílem této práce je zjistit vliv hemolýzy a chylozity na stanovení biologického materiálu v klinické laboratoři.

Největší vliv na stanovení má hemolýza. Vzniká při porušení membrány erythrocytu a následném vylití buněčného obsahu včetně hemoglobinu do plazmy.

Chylozita vzniká rozptýlením lipidových částic v séru. Chylózní vzorek je zakalený, čímž ruší metody stanovení založené na rozptylu světla.

Klíčová slova

hemolýza, chylozita, interference, krev, hemoglobin

Title

Influence of hemolysis and chylosity of biological material to the results of biochemical analyses.

Annotation

The aim of this work is to determine the influence of hemolysis and chylosity of biological material in clinical laboratory.

The greatest influence on the determination has hemolysis. It arises by the violation of the erythrocyte membrane and the following spillage of cell contents including hemoglobin into plasma.

Chylosity arises by the lipid particle dispersion in serum. Chylosis sample is turbid, which cancels methods based on light scattering.

Keyword

hemolysis, chylosity, interference, blood, hemoglobin

Obsah

1. Úvod	8
2. Definice biologického materiálu	9
2.1 Typy biologického materiálu	9
2.1.1 Krev	9
2.1.2 Moč	11
2.1.3 Mozkomíšni mok	12
2.1.4 Stolice	13
2.1.5 Pot	14
2.1.6 Sliny	14
3. Vyšetření biologického materiálu	16
3.1 Preanalytická fáze	16
3.1.1 Pacient	16
3.1.2 Odběr vzorku	18
3.1.3 Transport vzorku	19
3.1.4 Uchování vzorku	19
3.1.5 Příprava vzorku k analýze	19
3.2 Analytická fáze	20
3.2.1 Vnitřní kontrola kvality	20
3.2.2 Vnější kontrola kvality	20
3.2.3 Správná laboratorní práce	21
4. Stav biologického materiálu	22
4.1 Hemolýza	23
4.1.1 Rozdělení	24
4.1.2 Příčiny hemolýzy	25
4.1.3 Interference	26
4.1.4 Sérové indexy	28
4.2 Chylozita	29
4.2.1 Interference	30
5. Závěr	32
6. Zdroje	33

1. Úvod

Výsledky biochemických analýz mohou být ovlivněny celou řadou endogenních a exogenních látek obsažených v biologickém materiálu. Látkami způsobujícími interference jsou především hemoglobin, bilirubin a lipidy.

Chyby, které ovlivňují stanovení biologického materiálu, mohou vzniknout v různých fázích manipulace se vzorkem. Nejčastěji dochází ke vzniku interferencí v preanalytické fázi. Do tohoto období patří příprava pacienta, odběr vzorku, jeho uchování a transport. Nedodržení diety před odběrem není jediný faktor, který má vliv na výsledky stanovení. Některé faktory, jako je pohlaví, věk, gravidita nebo cyklické změny, ale ovlivnit nelze. V těchto případech se liší referenční rozmezí hodnot daného analytu. Vzorek musí být transportován co nejrychleji a při vhodné teplotě. Při skladování se také musí dodržovat správná teplota, pro dlouhodobé skladování se musí vzorek zamrazit. Další fází je fáze analytická, při které musí být v laboratoři dodržovány správné postupy a pravidla.

Důsledkem těchto interferencí je vznik chybných výsledků, vedoucích ke špatné diagnóze nebo léčbě pacienta. Proto je hlavním cílem laboratoří vznik těchto interferencí eliminovat.

2. Definice biologického materiálu

Biologickým materiálem se rozumí materiál lidského nebo zvířecího původu, který obsahuje genetickou informaci. Využívá se pro laboratorní stanovení. K těmto účelům se nejčastěji získává krev, moč, mozkomíšní mok, stolice, pot, sliny, atd.

Vzhledem k možné přítomnosti choroboplodných zárodků se s biologickým materiálem zachází jako s potenciálně infekčním – včetně jeho likvidace. Podobně se postupuje v případě nástrojů či jiných předmětů, které s ním přišly do styku. [1]

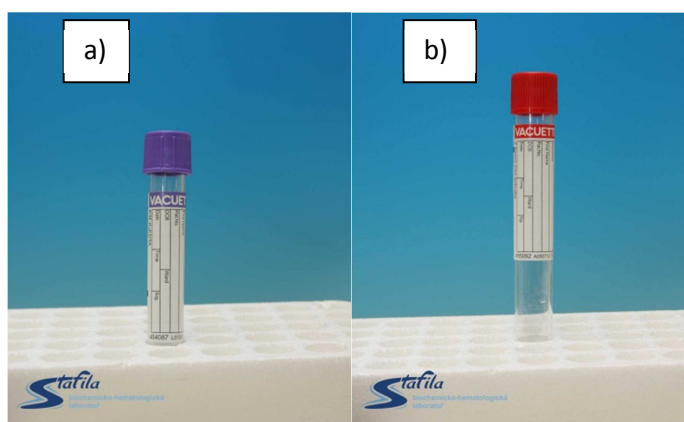
2.1 Typy biologického materiálu

2.1.1 Krev

Krev je tělní tekutina, obsahující červené krvinky (erytrocyty), bílé krvinky (leukocyty) a krevní destičky (trombocyty) rozptýlené v krevní plazmě.

Podle místa, ze kterého krev odebíráme, ji dělíme na arteriální, venózní a kapilární.

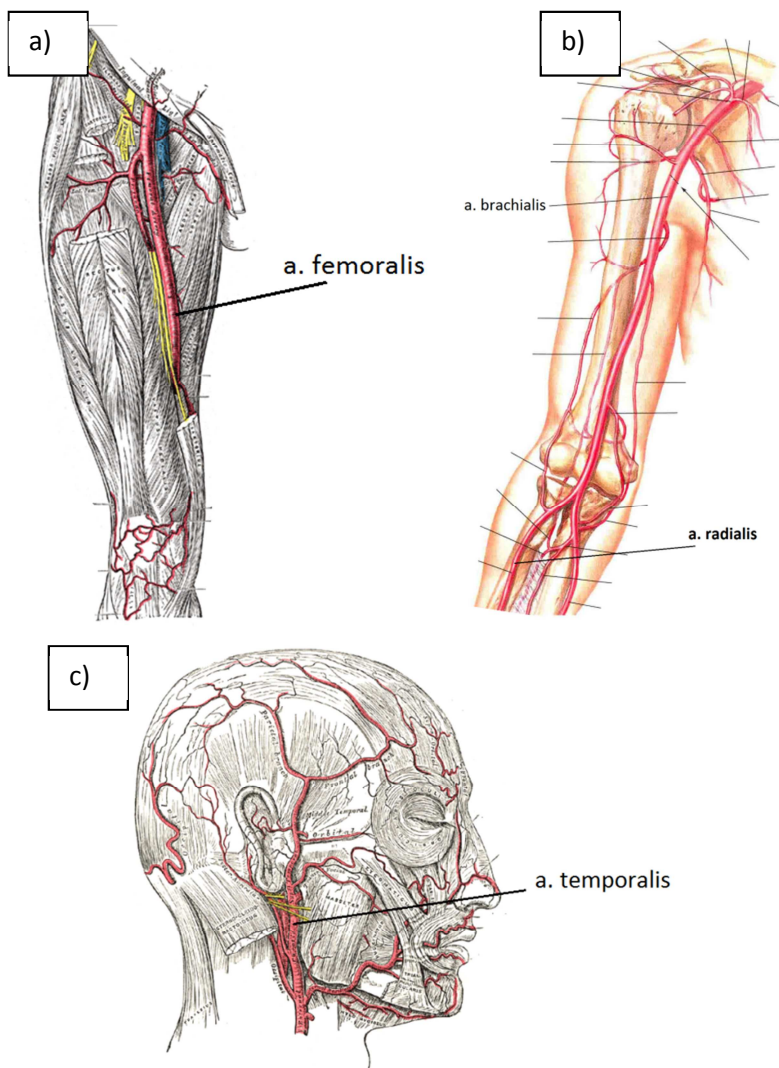
Venózní krev se nejčastěji odebírá z loketní jamky. Odběr se provádí nalačno v ranních hodinách, protože hladiny látek v krvi během dne kolísají. Podle typu odběrové zkumavky můžeme získat nesrážlivou (viz obr. 1a) nebo srážlivou krev (viz obr. 1b). Pokud použijeme protisrážlivá neboli antikoagulační činidla, kterými může být citrát sodný nebo K_3EDTA získáme krev nesrážlivou, z té můžeme po centrifugaci získat plazmu. Bez antikoagulantů se krev srazí a po centrifugaci z ní můžeme získat sérum. To se využívá ke stanovení většiny analytů. [2, 3]



Obr. 1 - Odběrové zkumavky

a) na nesrážlivou krev s K_3EDTA [4] b) na srážlivou krev s akcelerátorem [5]

Arteriální krev se odebírá z arterie (a.) femoralis (viz obr. 2a), a. brachialis, a. radialis (viz obr. 2b) a u novorozenců z lebeční arterie (a. temporalis) (viz obr. 2c).



Obr. 2a – a. brachialis, a. radialis [6]

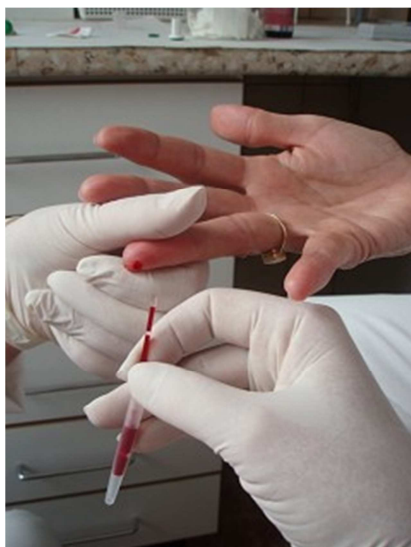
2b – a. femoralis [7]

2c – a. temporalis [8]

Pro odběr arteriální krve se používají speciální pomůcky - křeslo, které lze upravit do potřebné pozice a heparinizované zkumavky. Ve zkumavce nesmí být vzduchové bubliny a transport do laboratoře musí být velmi rychlý, při teplotě 25° C do 10 minut a při teplotě 1 – 5° C do dvou hodin.

Takto odebraná krev se využívá hlavně ke stanovení acidobazické rovnováhy (ABR) a to zejména pH, parciálního tlaku oxidu uhličitého ($p\text{CO}_2$), parciálního tlaku kyslíku ($p\text{O}_2$) nebo base excess, vyjadřující množství bazí které je nutno dodat nebo ubrat z 1 litru krve, aby se pH vrátilo k normální hodnotě 7,4.

Odběr kapilární krve (viz obr. 3) se provádí z vnitřní strany článku prstu nebo z ušního lalůčku. Místo vpichu se důkladně prohřeje, vydezinfikuje. Provádí se vpich pomocí jehly nebo lancety. První kapka krve se otře a následně se k místu vpichu přiloží kapilára, pomocí které se plní zkumavka. [2, 3]



Obr. 3 – Odběr kapilární krve [9]

2.1.2 Moč

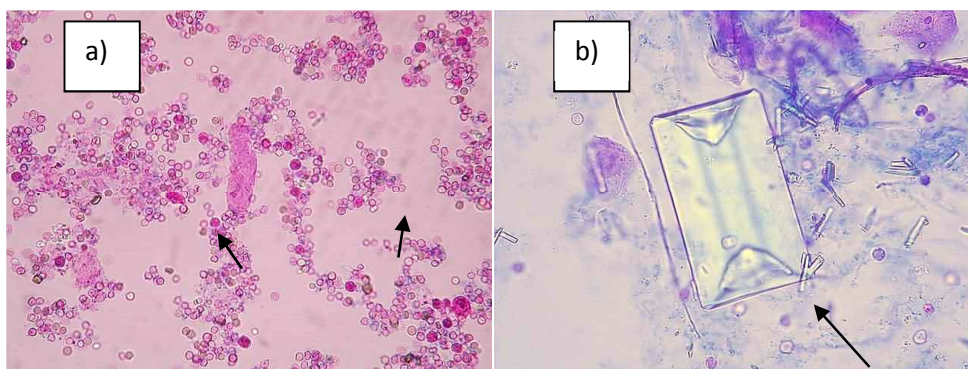
Ze vzorku moči provádíme chemickou analýzu nebo vyšetření močového sedimentu. K chemické analýze se využívají tzv. diagnostické proužky (obr. 4). Tyto proužky se ponoří na několik sekund do vzorku moče a ihned po vyjmutí se hodnotí. Hodnocení může být subjektivně okem nebo pomocí speciálních přístrojů – reflexních fotometrů. Diagnostický proužek je rozdělen na několik políček. Každé políčko slouží k určení množství stanovované látky. Nejčastěji se zjišťuje pH, množství bílkovin, glukózy, ketolátek, žlučových barviv nebo krve. Množství látky odpovídá zbarvení políčka, které porovnááme s barevnou škálou na obalu.

Většina vyšetření se provádí z jednorázového vzorku moči, na kvantitativní analýzu ale potřebujeme moč sbíranou. Sběr trvá většinou 24 hodin. Ze sběru moči můžeme zjistit objem neboli diurézu a také vypočítat funkční schopnost ledvin.



Obr. 4 – Diagnostické papírky na moč [10]

Další možností vyšetření je stanovení močového sedimentu. Vzorek se centrifuguje, odsaje se supernatant a sediment se prohlíží pod mikroskopem. Většinou nalézáme erythrocyty (obr. 5a), leukocyty, epiteliie a kvasinky. Běžně nalézáme urátovou drť a krystaly (obr. 5b). Nejzávažnější je nález různých válců, z nichž většina ukazuje na vážné onemocnění ledvin. [3, 11]



Obr. 5 – Mikroskopické vyšetření moči

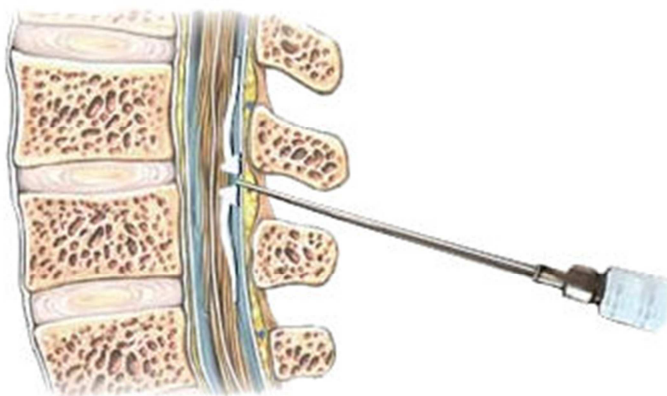
a) erythrocyty [12], b) krystaly triplfosfátu [13]

2.1.3 Mozkomíšní mok

Odběr likvoru se provádí při podezření na míšní onemocnění, při zánětlivých onemocněních jako je meningitida, encefalitida nebo myelitida. Dalším podnětem

mohou být nádorová onemocnění nebo degenerativní onemocnění jako Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba.

Mozkomíšni mok se nejčastěji získává lumbální punkcí (obr. 6). Transport do laboratoře musí proběhnout co nejdříve, nejdéle do 1 hodiny, jinak by došlo k rozpadu elementů a ke změnám koncentrace glukózy a laktózy.



Obr. 6 – Odběr mozkomíšního moku lumbální punkcí [14]

Normálně je likvor bezbarvá čirá tekutina. Změna barvy značí hnisavý zánět nebo krvácení. Kvantitativně v mozkomíšním moku stanovujeme celkovou bílkovinu, glukózu, laktát nebo chloridy. Mezi chemická vyšetření likvoru patří spektrofotometrie nebo elektroforéza. Dále můžeme rozlišovat buněčné elementy. Fyziologicky nacházíme pouze mononukleáry z nichž většinu tvoří lymfocyty. Patologický je výskyt erytrocytů, fagocytů nebo nádorových buněk. [2, 3]

2.1.4 Stolice

Velmi důležité vyšetření stolice je test na okultní krvácení. To je velmi důležité pro včasné odhalení karcinomu tlustého stěva. Jde o chemický průkaz krve ve stolici. Test je založen na peroxidázové aktivitě hemu. Při tomto testu je nutné, aby pacient 3 dny před vyšetřením vynechal všechny potraviny obsahující krev a preparáty železa, mohly by poskytnout falešně negativní výsledky. Vyšetření se provádí 3 dny po sobě a odebírají se vzorky ze dvou různých částí stolice. [3] Na obr. 7 je znázorněna souprava pro vyšetření okultního krvácení.



Obr. 7 – Souprava pro vyšetření okultního krvácení [15]

2.1.5 Pot

Potní test neboli vyšetření chloridů v potu se provádí při podezření na cystickou fibrózu. Trvá asi 45 minut. Sbírá se pot z předloktí, po předchozí stimulaci potní žlázy k tvorbě potu.

Normální koncentrace chloridů v potu je 10 – 30 mmol/l, u cystické fibrózy nad 60 mmol/l. [16]

2.1.6 Sliny

Vyšetření slin se provádí hlavně kvůli zjištění přítomnosti drog a návykových látek. Test se provádí pomocí speciálních destiček, které obsahují protilátky (obr. 8). [17]



Obr. 8 – Test na drogy [18]

Ve slinách můžeme také stanovit koncentraci sodíku, hydrogen uhličitanů, draslíku nebo močoviny. Prokázat můžeme také řadu proteinů např. albumin nebo imunoglobuliny. Z hormonů je to kortizol, progesteron nebo testosteron. [19]

3. Vyšetření biologického materiálu

Proces vyšetřování biologického materiálu můžeme rozdělit na tři části - preanalytickou, analytickou a postanalytickou fázi.

3.1 Preanalytická fáze

Do preanalytické fáze patří příprava pacienta, způsob odběru, uchování vzorku před transportem nebo samotný transport.

V tomto období nejčastěji dochází k chybám, které mohou ovlivnit konečné výsledky analýzy. Mezi faktory ovlivňující výsledky patří: pacient, odběr vzorku, transport vzorku, uchování vzorku před analýzou a příprava vzorku k analýze. [3, 11]

3.1.1 Pacient

U pacienta rozlišujeme faktory ovlivnitelné a ty, které nelze ovlivnit. Mezi neovlivnitelné faktory řadíme:

Pohlaví – většina hodnot analytů na pohlaví nezávisí, existuje však několik, u nichž se referenční rozmezí mužů a žen liší. Tento rozdíl je nutné znát pro správné vyhodnocení výsledku. Příkladem jsou hodnoty červených krvinek, u mužů jsou hodnoty $4,3 - 5,3 \times 10^{12} / l$ u žen $3,8 - 4,8 \times 10^{12} / l$.

Rasa – příslušníci různých ras mají různé metabolické cesty nebo podíl svalové hmoty. Různé jsou také hodnoty referenčních rozmezí. Například Afroameričané mají až dvojnásobné hodnoty kreatinkinázy (CK), Mongoloidní rasa má vyšší aktivitu slinné amylázy v porovnání s ostatními rasami.

Věk – u dětí je horní hranice referenčního rozmezí u většiny analytů nižší než u dospělých. Naopak vyšší jsou aktivity kyselá a alkalická fosfatázy a koncentrace anorganického fosfátu a to z důvodu zvýšené tvorby kostní hmoty.

Cyklické změny – cirkadiálním rytmům podléhají hlavně hormony. Například kortizol vylučující se v týdenním rytmu nebo ženské pohlavní hormony, které se vylučují v měsíčním rytmu.

Gravidita – během těhotenství se v krvi matky objevují bílkoviny i jiné látky produkované plodem. Např. lidský choriový gonadotropin (hCG), který je jedním

z prvních ukazatelů těhotenství. Mění se však i hladina běžných metabolitů, stoupá glomerulární filtrace a v posledním trimestru také cholesterolemie.

Faktory ovlivnitelné nelze ovlivnit ve všech případech. Pacient by se měl dostavit nalačno a po určité době fyzického klidu, toho však nelze dosáhnout vždy. Také nelze eliminovat určitý stupeň psychického vypětí nebo vlivu kouření u silného kuřáka.

Fyzická aktivita – ovlivňuje změnu složení tělních tekutin. Při anaerobní zátěži klesá pH a stoupá laktát v krvi. Velikost změn závisí na délce a frekvenci zátěže a na trénovanosti jedince. Po skončení fyzické aktivity se hodnoty postupně vrací k normálu.

Psychický stres – některá onemocnění nebo odběr krve může u pacientů vyvolávat stres. To způsobí vyplavení hormonů kůry i dřeně nadledvin. Dále může psychický stres ovlivňovat funkční zkoušky ledvin nebo sekreci žaludečních šťáv.

Vliv potravy, alkoholu a tekutin – pokud není odběr krve proveden nalačno, dochází ke zvýšení hladiny glukózy, triacylglycerolů a dalších látek. Strava ovlivňuje i pH moči. Zelenina a ovoce moč alkalizují, maso a tučná jídla moč acidifikují. Výsledky laboratorních vyšetření ovlivňují také dlouhodobé stravovací nároky, vegetariáni mají nízkou koncentraci cholesterolu, triacylglycerolů, dochází také k deficitu vitamínu B₁₂. Příjem tekutin se projevuje různou hustotou moči a také změnou koncentrace některých látek v séru. U některých biochemických testů je nutné dodržovat dietu, například u testu na okultní krvácení je nutné vynechat maso. Také alkohol má vliv na biochemická vyšetření, způsobuje uvolnění jaterních enzymů do krve nebo ovlivňuje metabolismus glukózy.

Kouření – zvyšuje podíl karboxylhemoglobinu a koncentraci thiokyanatanu v séru. Nikotin stimuluje sekreci žaludeční šťávy. Dále mají kuřáci vyšší hladinu hemoglobinu, železa nebo fibrinogenu.

Léky – ovlivňují biochemická vyšetření tak, že působí na metabolismus stanovené látky (mění jeho rychlost nebo ovlivňují vazbu na transportní bílkovinu).

Operace – vyšetření může ovlivnit podané narkotikum, řez svalovou tkání a její zhmoždění. Hormony nadledvin, uvolněné při stresu ovlivňují řadu metabolických dějů včetně vzestupu koncentrace bílkovin akutní fáze. [3, 11]

3.1.2 Odběr vzorku

Pro správné výsledky vyšetření je důležitá poloha pacienta a určitá doba před a po odběru. Vliv mají také přípravky přidané k odebrané krvi a odběrové nádoby.

Nejčastěji se odebírá venózní krev z žíly v loketní jamce. Důležitá je poloha pacienta, ovlivňuje totiž koncentraci některých látek. Například u bílkovin je koncentrace vestoje asi o 10 % vyšší.

Dalším důležitým faktorem je dezinfekce, pokud totiž stanovujeme koncentraci alkoholu a použijeme alkoholický roztok, můžeme dostat falešně pozitivní výsledek.

Stažení paže a následné „cvičení“ by mělo být co nejkratší, aby nedošlo k již zmíněnému zvýšení koncentrace bílkovin nebo ke vzestupu koncentrace laktátu ve stažené paži.

U odběru kapilární krve je důležité, aby nebyla krev dlouho v kontaktu s dezinfekčním činidlem, jinak by došlo k hemolýze. Dále není vhodné krev „vymačkávat“, dochází tak k naředění krve tkáňovým mokem.

Tepenná krev se odebírá pro vyšetření krevních plynů. Velmi důležitý je proto anaerobní průběh odběru a naplnění skleněné kapiláry bez bublin.

Velmi důležitým faktorem je odběrová nádobka. Ta musí být ještě před vlastním odběrem označena jménem pacienta, případně čárovým kódem, aby nedošlo k záměně. Krev se do zkumavky vypouští pomalu a nikdy ne přes jehlu, aby nedošlo k hemolýze. Pro většinu vyšetření se využívá sérum, proto se krev musí nechat srazit. Většina zkumavek je ale jednorázových - z plastu, v nich se krev málo a pomalu sráží, proto jsou opatřeny vrstvou kaolinu, což reakci urychlí. Ve skleněných zkumavkách se krev sice rychleji sráží, ale zato mají dvě velké nevýhody - častěji dochází k prasknutí a tím ke ztrátě materiálu a také kontaminaci prostředí. Další nevýhodou je nutnost vymývání, pokud to není provedeno dokonale a ve zkumavce zůstanou zbytky činidel, dojde následně u dalšího vzorku ke kontaminaci a tím ke zkreslení výsledků.

U vyšetření prováděných z nesrážlivé krve je důležité množství a druh antikoagulancia. [2, 3]

3.1.3 Transport vzorku

Velmi důležitý pro správné výsledky analýzy je transport. Vzorky musí být při transportu v uzavřené nádobce. Ale i uzávěr má vliv na výsledky, například z gumové zátky se může uvolňovat zinek.

Transport musí být prováděn co nejrychleji, při nízké teplotě a v temnu. Při vysoké teplotě může docházet k poklesu koncentrace některých látek, při nízké zase k hemolýze. Vlivem světla dochází k odbourávání bilirubinu.

Rychlost je také důležitá proto, aby mohlo být včas odděleno sérum od krvinek. Pokud transportujeme vzorek na delší vzdálenost, zasíláme raději pouze sérum, aby nedošlo k mechanické hemolýze.

Pro některá vyšetření je nutné transportovat vzorek v ledu, například pro stanovení amoniaku nebo acidobazické rovnováhy. [2, 3]

3.1.4 Uchování vzorku

Uchování vzorku je důležité pro zajištění stability analytů. Při delším stání krve dochází k vyčerpání glukózy a tím k poruše transportních vlastností erytrocytární membrány. Při uchování v teple dochází k poklesu pH, proto se při vyšetření acidobazické rovnováhy musí vzorek uchovávat v ledu.

Pokud vyšetření neprovádíme hned, uchováváme sérum v chladničce při teplotě + 4°C, v dobře uzavřené zkumavce, aby se neodpařovala voda. Většina analytů, je stabilní několik dní. Pro delší skladování vzorek zmrazujeme teplotou - 20°C. Poslední možností je lyofilizace neboli mrazová sublimace, ta se nejčastěji provádí u kontrolních vzorků. [2, 3]

3.1.5 Příprava vzorku k analýze

Téměř před každou analýzou se provádí centrifugace neboli odstředění krve, při které dojde k oddělení buněčných elementů od séra nebo plazmy. Dále se provádí deproteinace – vysrážení bílkovin, zahuštění vzorku nebo například promývání erytrocytů.

U centrifugace musíme dávat pozor na rychlost a počet otáček, aby nedošlo k mechanické hemolýze. Při deproteinaci zase na vlastnosti deproteinačního činidla, aby neovlivňovalo následnou analýzu. [2, 3]

3.2 Analytická fáze

Analytická fáze probíhá v laboratoři a musí při ní být dodržovány postupy Správné laboratorní práce (SLP), zahrnující vnitřní (interní) kontrolu kvality (IQA) a vnější (externí) kontrolu kvality (EQA).

Tyto kontroly mají za úkol eliminovat chyby, které mohou vznikat při analýze. [11]

3.2.1 Vnitřní kontrola kvality

Při vnitřní kontrole kvality se zjišťuje pomocí kontrolních vzorků přesnost a správnost analytické metody.

Kontrola přesnosti – po každé sérii vzorku se také stanovuje kontrolní vzorek. Jeho koncentrace nemusí být známa, ale protože jeho analýzu stále opakujeme, nesmí se jeho výsledky příliš lišit.

Kontrola pravdivosti – provádí se pomocí komerčně vyráběných sér, u kterých známe rozmezí, ve kterém se mají nacházet naměřené výsledky.

Vnitřní kontrolu provádějí sami pracovníci laboratoře. Kontrolní měření se provádí pravidelně a všechny výsledky se zaznamenávají do výsledkových protokolů a archivují se. [3]

3.2.2 Vnější kontrola kvality

Kontrolní vzorky pro vnější kontrolu kvality zasílá organizace Systém externí kontroly kvality (SEKK). Laboratoř vzorky vyšetří a výsledky zašle zpět do SEKK, která je porovná s výsledky ostatních laboratoří.

Stanovovaný vzorek musí být dostatečně stabilní a hlavně musí mít vlastnosti jako vzorek pacienta. Při hodnocení se užívají dva vzorky, jeden s fyziologickými, druhý s patologickými hodnotami. Jsou povolené určité procentuelní odchylky od

cílových hodnot, tzv. kontrolní limity. Ty by měli být pro všechny země Evropské unie stejné, jsou však různé. České limity jsou stejné jako v Německu.

Úspěšná účast by se měla stát povinností každé laboratoře. [3]

3.2.3 Správná laboratorní práce

Přesnost a spolehlivost výsledku nezávisí jen na pravidelných kontrolách, ale také na dalších vlivech. Pracovníci v laboratoři musí respektovat preanalytické vlivy, musí být dodržována organizace práce a správná manipulace se vzorky, aby nedošlo k záměně vzorků. Také všechny reagenty a přístroje musí být dostatečně kvalitní. V neposlední řadě je také velmi důležitá dokumentace výsledků a jejich následná interpretace.

A právě dokumentace je hlavní zásadou SLP, jejím smyslem je eliminovat chyby, které by mohly vzniknout při ústním předáváním výsledků. Díky tomu, je také možné všechny analýzy, které byly v laboratoři provedeny, zpětně kontrolovat.

Systém Správné laboratorní práce se v současné době velmi rozšiřuje téměř po celém světě a to podle platných norem.

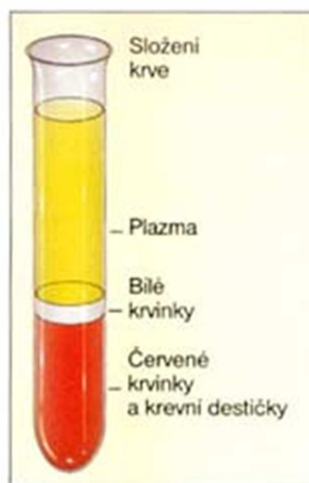
Dodržování zásad SLP, umožní laboratoři získat certifikaci. Certifikát ukazuje, že má laboratoř dostatečnou úroveň pravdivosti měření.

Dále může laboratoř získat akreditaci – neboli úřední uznání způsobilosti laboratoře vykonávat určitou činnost. Akreditaci lze získat prostřednictvím Českého institutu pro akreditaci (ČIA).

Pokud chce laboratoř získat akreditaci, podá žádost a tím začne proces příprav. Vytvoří se patřičné dokumenty, např. Laboratorní příručka. V tom období, ale i po něm provádí ČIA pravidelné kontroly a sleduje, jak si daná laboratoř vede a jestli dodržuje všechny správné postupy. [3]

4. Stav biologického materiálu

Biologický materiál, který lze vyšetřit v laboratoři musí být bez vlivu interferencí. Materiál – plazma nebo sérum, který není ovlivněn vedlejšími vlivy, v tomto případě hemolýzou nebo chylozitou má světle žlutou nebo čirou barvu (obr. 9).



Obr. 9 – Vzhled krevní plazmy [20]

Interference si můžeme definovat jako účinek látky přítomné ve vzorku, který mění správnou hodnotu výsledku.

Interference mohou být exogenní – potrava obsahující tuky nebo neustále se zvyšující množství léků, které mají taktéž velký vliv na laboratorní stanovení.

Dále mohou být interference endogenní, kam můžeme zařadit vliv bilirubinu, paraproteinémie a hlavně hemolýzy nebo ikteritu.

Výše uvedené interference způsobují vznik nepřesných nebo úplně nesprávných výsledků, dochází ke zvýšení nebo snížení hladiny měřeného analytu. Tyto chyby mohou dále vést k předání špatných výsledků lékaři, což následně vede k určení špatné diagnózy a tím k navození špatné léčby pacienta.

Aby k takovýmto situacím nedocházelo, musí se laboratoř snažit zajistit, aby byly analytické chyby způsobené preanalytickými vlivy co nejmenší. Toho lze dosáhnout vypracováním, vylepšováním a následným správným používáním postupů, vedoucích k eliminaci chyb vznikajících při odběru, uchování a následném transportu vzorku.

Nejčastějšími zdroji chyb laboratorních stanovení je hemolýza a chylozita ve vzorku. [21, 22]

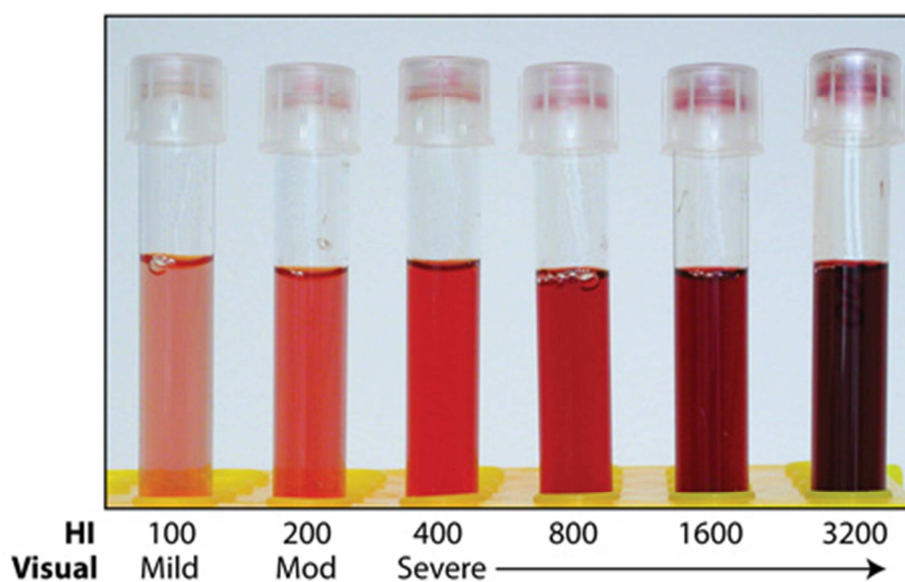
4.1 Hemolýza

Hemolýza, tj. rozpad erytrocytů způsobený porušením membrány buněk, má za následek vylití obsahu buněk včetně krevního barviva hemoglobinu do plazmy.

Horní referenční limit pro volný hemoglobin v plazmě je 20 mg/l a 50 mg/l pro sérum.

Zánik erytrocytů můžeme rozdělit podle místa, kde k němu dochází na extravaskulární a intravaskulární. K extravaskulárnímu zániku dochází, pokud je vnitřní struktura erytrocytu nějak pozměněna. To může být způsobeno vyčerpáním energetických zásob pro zajištění metabolismu erytrocytů. Následně dochází ke strukturálním změnám červené krvinky, jako jsou zmenšení buňky, ztenčení membrány a v neposlední řadě změna tvaru erytrocytu z bikonkávního na kulovitý. Právě změna tvaru má za následek ztížený pohyb kapilárním řečištěm a následné zachycení ve slezině, kde dojde k jeho destrukci fagocyty. Takto zaniká většina erytrocytů.

Určitá část červených krvinek však zaniká intravaskulárně neboli v cévách. Právě při tomto zániku se erytrocyt rozpadá a uvolňuje se z něj hemoglobin – nastává hemolýza. [23, 24]

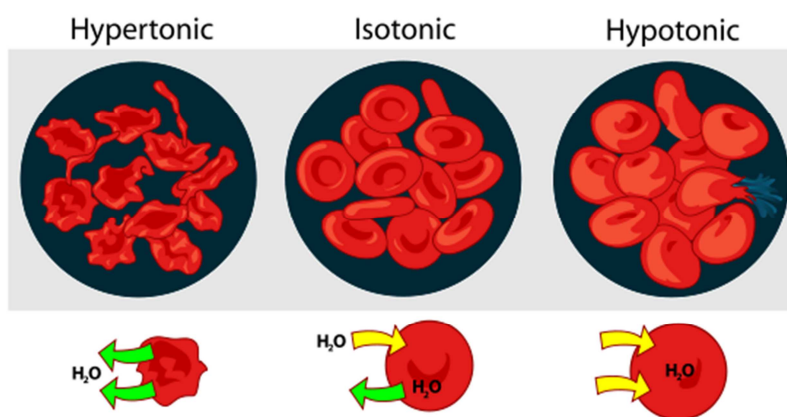


Obr. 10 – Různé stupně hemolýzy [25]

4.1.1 Rozdělení

Hemolýzu můžeme podle vlivů, které ji způsobují rozdělit několik druhů.

Osmotická hemolýza – prostředí okolo erytrocytu můžeme rozlišit podle jeho koncentrace. Pokud je okolní koncentrace větší, než v červené krvince jedná se o hypertonické prostředí, ve kterém dochází k uvolňování vody a ke smrskávání buňky. Pokud je však koncentrace okolí menší, mluvíme o hypotonickém prostředí a v tomto případě dochází k přijímání vody do krvinky a tím k jejímu nafouknutí. Dále se vytvářejí póry v membráně a tím se uvolňuje hemoglobin. V isotonicném prostředí, kdy je koncentrace okolí stejná jako v buňce nedochází k žádné změně. Izotonické prostředí pro erytrocyt je 0,9% roztok NaCl (obr. 11).



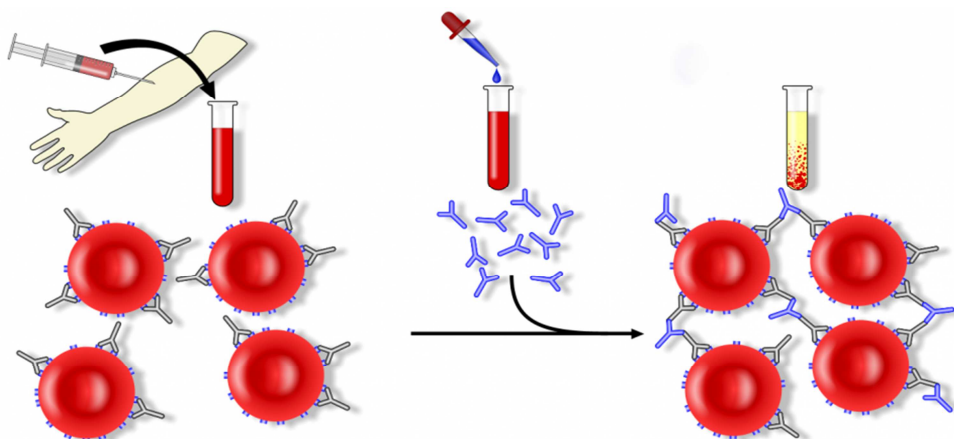
Obr. 11 – Erytrocyt v prostředí s různou koncentrací [26]

Fyzikální hemolýza – tento typ hemolýzy může být způsoben různými fyzikálními vlivy jako je například působení ultrazvukových vln nebo vlivem teploty.

Chemická hemolýza – nejčastěji bývá způsobena účinkem kyselin a zásad nebo rozpouštědel. U těchto látek dochází k reakci s lipidy v membráně buněk.

Mechanická hemolýza – může být způsobena nadměrným třepáním, mícháním, nebo centrifugací, neopatrným transportem nebo nešetrným zacházením. Dalším důvodem může být použití malého průměru jehly při odběru vzorku krve.

Imunologická hemolýza – je způsobena činností komplementu (obr. 12). K této situaci může dojít, pokud jsou přítomny protilátky proti antigenům na povrchu erytrocytu a to například při inkompatibilní transfuzi krve. Další možností je také zvýšená křehkost erytrocytů v důsledku dědičných chorob.



Obr. 12 – Imunologická hemolýza [27]

Toxická hemolýza – nastává účinkem některých rostlinných nebo hadích jedů či působení bakteriálních toxinů. Příkladem bakteriálních toxinů je hemolysin produkovaný bakterií *Staphylococcus aureus*. [3, 21, 28]

4.1.2 Příčiny hemolýzy

Kromě vlivů uvedených v bodě 3.1.2 může hemolýza vzniknout i z řady dalších příčin. Důvodem například může být použití vlhké nebo již expirované odběrové soupravy, dále přítomnost dezinfekčního činidla na pokožce. K hemolýze dochází nejčastěji v období odběru vzorku nebo při transportu.

Při odběru musí být kladen důraz hlavně na používané jehly, jejichž příliš malý průměr nebo prudké vstříknutí krve do zkumavky přes jehlu může být důvodem hemolýzy. Dále při odběru kapilární krve nesmíme příliš „mačkat“ místo odběru a krev musíme ihned odebrat do zkumavky a ne ji nechat stékat po kůži.

Značný vliv má také použití protisrážlivého činidla, musí být v dostatečném množství a také musí být použitý správný typ činidla.

V období transportu musí být největší důraz kladen na vhodnou teplotu a přiměřenou dobu transportu. [21, 22, 29]

4.1.3 Interference

Hemolýzu nelze vizuálně pozorovat, dokud není koncentrace hemoglobinu vyšší než 0,2 g/l, žlutá barva séra má potenciál skrývat zvýšenou koncentraci hemoglobinu.

Pokud je koncentrace hemoglobinu vyšší než 5 g/l dochází ke snížení aktivity lipázy v séru až o 50 %. Dále může hemoglobin způsobit výrazné negativní interference s metodami stanovení bilirubinu.

Uvolněný hemoglobin může přímo zabraňovat průběhu chemických reakcí.

Buněčné složky erytrocytů zvyšují hladiny některých analytů. Intracelulární koncentrace laktát dehydrogenázy je 160x vyšší než její koncentrace v plazmě, u draslíku je 22x vyšší a u hořčíku 3x vyšší než v plazmě. Pokud tedy dojde k jejich uvolnění, jejich hladina v plazmě se výrazně zvýší.

Kromě zvýšení hladiny analytů má uvolnění hemoglobinu a dalších intracelulárních látek za následek tzv. zřed'ovací efekt, kdy dojde ke snížení koncentrace glukózy, bilirubinu, alkalické fosfatázy, sodíku nebo chloridů.

Dalšími analyty, které mohou být ovlivněny, jsou aspartát aminotransferáza, alanin aminotransferáza, kreatin-kináza a železo.

Dále má hemolýza vliv při spektrofotometrických metodách. Hemoglobin totiž začíná absorbovat záření při 340 nm, zvyšuje absorbanci a tím ovlivňuje metody založené na měření absorbance.

Při stanovení vitamínu B12, kortizolu a testosteronu dochází k poklesu signálu až o 20 %.

Hemolýza také ovlivňuje stanovení aktivity CK, díky uvolnění adenylát kinázy, která katalyzuje přeměnu dvou adenosindifosfátů (ADP) na adenosintrifosfát (ATP) a adenosinmonofosfát (ADM).

Dále může uvolněná adenylát kináza interferovat se stanovením izoenzymů CK.

[22, 30, 31]

Kyselina listová je v erytrocytech přítomna v koncentraci přibližně 30x vyšší než v séru, proto by neměla být stanovována ve vzorcích s jakýmkoli stupněm hemolýzy.

[24, 32]

Hemolytické interference jsou u imunologických metod méně časté než u fotometrických. U těchto metod je problémem spíše než přítomnost volného hemoglobinu uvolnění buněčných enzymů a dalších elementů. Rušení může nastat, pokud protilátky používané v imunologických stanoveních jsou méně specifické a zkříženě reagují s některými uvolněnými látkami z erytrocytů. Některé uvolněné látky se také mohou vázat na analyzovanou látku a tím inhibovat vazebná místa protilátky.

Hemolýza bývá také používána při imunologických reakcích jako detekce. V těchto případech nám hemolýza značí vznik imunokomplexu.

Dále hemolýza ovlivňuje imunologické reakce uvolněním proteolytických enzymů, které ničí některé analyty jako je inzulín, glukagon, kalcitonin, parathormon, adenokortikotropní hormon a gastrin. [28, 33, 34, 35]

In vivo hemolýza se může objevit například u paroxysmální noční hemoglobinurie (PNH). PNH je onemocnění, které je způsobeno mutací v hemopoetické kmenové buňce. Erytrocyty jsou při tomto onemocnění zvýšeně citlivé na lýzu komplementem. Dochází tedy k hemolýze erytrocytů ve spánku a po probuzení se projeví hemoglobinurií (tmavá moč). [23]

Problémem při laboratorních vyšetřeních také mohou být syntetické náhražky krve, jejichž základem jsou polymerní analogy hemoglobinu. Ty jsou intenzivně barevné a terapeuticky se využívají ve vysokých koncentracích. Tyto výrobky způsobují významné analytické interference se současnými technologiemi, které využívá většina laboratoří. U pacientů užívajících tyto produkty proto nelze spolehlivě provést velké množství laboratorních testů. [24, 36, 37]

Výše uvedené vlivy se mohou vzájemně kombinovat, pak dochází ke složité, nepřehledné a těžko řešitelné situaci. [31]

Pokud hemolýza vzniká z in vitro příčin, je nejlepším řešením tohoto problému kvantifikace volného hemoglobinu, upozornění klinických lékařů a získání nového vzorku. [30]

4.1.4 Sérové indexy

V laboratořích, kde se preanalytická fáze provádí automaticky, se zavádějí tzv. sérové indexy (SI). Těmi se nahrazuje vizuální popis, který nelze provést, protože vidíme pouze plnou krev před jejím vložením do preanalytického systému.

Hodnoty sérových indexů se získávají výpočtem z absorbance změřené po naředění vzorku fyziologickým roztokem při různých vlnových délkách.

Porovnáváním hodnot SI lze objektivně posuzovat míru interference. [31]

Tab. 1 – Vliv hemolýzy na výsledky biochemických analýz [38]

Analyt	Vliv
ACP	↑↓
Albumin	ruší
ALP	↑
ALT (7x více v erytrocytech)	↑
AST (40x více v erytrocytech)	↑↑
Bilirubin	↑↓
CK, CK-MB	↑
Kalium	↑↑
ELFO	ruší
P	ruší
Mg	ruší
IgG, IgA, IgM	ruší
Kreatinin	↑
LD (160x více v ery)	↑↑↑
Lipáza	ruší
Li	ruší
Zn	↑
Fe	ruší

4.2 Chylozita

Chylozita je rozptýlení tukových částic v séru. K tomuto stavu dochází, pokud není odběr proveden nalačno. Sérum obsahující lipidové části je zakalené, tento zákal lze pozorovat i pouhým okem (obr. 13). Podle množství tukových částic může být zákal slabý až mléčně bílý. [39]



Obr. 13 – Nechylozní (vlevo) a chylozní (vpravo) vzorek [40]

Lipidy jsou ve vodě nerozpustné částice. Ve vodném prostředí, jako například v plazmě jsou transportovány ve vazbě na bílkoviny. Tyto částice pak nazýváme apolipoproteiny.

Lipoproteiny můžeme podle jejich hustoty a pohyblivosti při elektroforéze rozdělit do pěti skupin (obr. 14).

Největší lipoproteiny, které mají největší obsah lipidů a tím i nejmenší hustotu nazýváme **chylomikrony**. Ty vznikají v tenkém střevě a lymfatickými cestami vstupují do krve. Pomocí chylomikronů jsou transportovány exogenní triacylglyceroly a cholesterol. V krvi jsou chylomikrony štěpeny lipoproteinovou lipázou (LPL). Uvolněné mastné kyseliny slouží jako zdroj energie svalů a tkání, ukládají se v tukové tkáni jako zásoba energie nebo jsou vycitávány játry a metabolizovány.

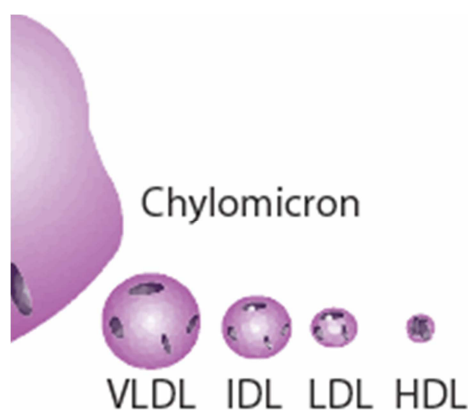
Dalším typem lipoproteinů jsou **VLDL** – lipoproteiny o velmi nízké hustotě (very low – density lipoprotein). VLDL jsou tvořeny v játrech, obsahují 90 % lipidů a

10 % proteinů. Přítomnost VLDL v séru se projeví opalescencí. Lipoproteinovou lipázou jsou VLDL štěpeny na IDL - lipoproteiny o střední hustotě.

IDL obsahují oproti VLDL výrazně větší množství cholesterolu. Asi 60 % IDL je vychytáváno v játrech a metabolizováno, zbytek je pomocí jaterní lipázy přeměněn na další typ lipoproteinů – LDL.

Lipoproteiny o nízké hustotě (low - density lipoproteins) jsou z plazmy odstraňovány prostřednictvím specifických receptorů v membráně buněk. Asi 75 % je vychytáváno játry. Hlavní funkcí LDL je transport cholesterolu k buňkám. Cholesterol v LDL částicích je zodpovědný za vznik aterosklerózy. Proto tyto částice bývají laicky nazývány jako „zlý cholesterol“.

HDL neboli lipoproteiny o vysoké hustotě jsou posledním a také nejmenším typem lipoproteinových částic. Vznikají v játrech a tenkém střevě. Jejich funkcí je vychytávání volného cholesterolu a jeho odvod do jater. Proto je nazýváme „hodným cholesterolem“. [3]



Obr. 14 – Lipoproteiny [41]

4.2.1 Interference

Chylozita může rušit laboratorní stanovení zákalem, rozptylem světla nebo změnou objemu.

Rozptyl světla na tukových částicích způsobí zvýšení absorbance blanku a tím snižuje citlivost metody. Dále má velký vliv na metody založené na rozptylu světla, jako je například nefelometrie.

Změna objemu ovlivňuje většinu metod přesunem vody, což může mít za následek takové problémy jako je pseudohyponatremie.

Pokud se stanovení provádí ve vodné frakci, není ovlivněno lipemií. Mezi takové patří metody využívající iontově – selektivní elektrody.

Činidla pro mnoho enzymatických metod obsahují detergenty, pomocí kterých dojde k odstranění lipoproteinů a tím ke snížení jejich vlivu na absorbanci.

Chylozita má dále vliv na stanovení triacylglycerolů, glukózy, fosforu, celkového bilirubinu, kyseliny močové a celkové bílkoviny. [21]

Tab. 2 – Vliv chylozity na výsledky biochemických analýz [42]

Analyt	Vliv
ELFO	ruší
Mg	ruší
IgG, IgA, IgM	ruší
TG	↑ (zvyšuje)
Fe	ruší

5. Závěr

Tato práce je zaměřena především na vliv hemolytických a lipemických vzorků na výsledky biochemických analýz.

Nejčastější interferencí je vliv hemoglobinu. Jeho přítomnost ovlivňuje stanovení velkého množství analytů a provedení několika laboratorních metod. Hemolýza in vivo vzniká ve většině případů kvůli chybnému odběru, uchování nebo transportu. Snahou klinických a laboratorních pracovníků by proto mělo být těmto situacím zabránit.

Vliv chylózních vzorků na stanovení není tak velký jako u předchozí interference. Možností jak této interferenci zabránit je správné poučení pacienta, tj. tedy odběrem nalačno.

6. Zdroje

- [1] <http://lekarske.slovníky.cz/pojem/biologicky-material>; (17.5.2012).
- [2] ZIMA, T. *Laboratorní diagnostika*. 1. vyd. Praha: Galén, 2002, 728 s. ISBN 80-726-2201-3.
- [3] RACEK, J. *Klinická biochemie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Galén, 2006, 329 s. ISBN 80-726-2324-9.
- [4] <http://www.stafila.cz/clanek/hematologie---plna-krev-k3edta/> (17.3.2012).
- [5] <http://www.stafila.cz/clanek/biochemie-imunologie---serum/> (17.3.2012).
- [6] <http://bedahunmuh.files.wordpress.com/2010/05/brachial-artery-and-anastomoses-around-elbow.jpg> (5.6.2012).
- [7] <http://de.academic.ru/pictures/dewiki/71/Gray550.png> (5.6.2012).
- [8] http://www.ask.com/wiki/Middle_temporal_artery (5.6.2012).
- [9] http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/praktika/odber_krve.htm (17.3.2012).
- [10] <http://www.lecba-rakoviny.cz/novinky/rakovina-se-v-budoucnu-bude-diagnostikovat-pomoci-dechu-a-moci-343> (17.3.2012).
- [11] ZIMA T., RACEK J., DASTYCH M., KREIDLOVÁ M. et al. *Doporučené diagnostické a terapeutické postupy pro všeobecné praktické lékaře*. Laboratorní metody – Část 1. Biochemické metody.
- [12] http://www.sekk.cz/atlas/cell_ery.htm (18.4.2012).
- [13] http://www.sekk.cz/atlas/xtal_triple.htm (18.4.2012).
- [14] <http://www.zbynekmlcoch.cz/informace/medicina/neurologie-nemoci-vysetreni/atraumaticka-lumbalni-punkce-foto-vyhody-provedeni-typ-a-cena-jehly> (5.6.2012).
- [15] <http://rakovinats.euweb.cz/TOKS.html> (14.6.2012).
- [16] <http://www.cfklub.cz/Potni-test/> (14.4.2012).
- [17] <http://www.transcomczech.cz/testy-na-drogy-na-sliny.htm> (14.4.2012).
- [18] <http://www.transcomczech.cz/testy-na-drogy-na-sliny.htm> (14.4.2012).
- [19] http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/AJCAC.htm (3.6.2012).

- [20] <http://www.radioservis-as.cz/archiv01/1001/10styl11.htm> (14.4.2012).
- [21] KROLL, M. H., ELIN, R. J. *Interference with clinical laboratory analyses. Clinical chemistry*, 1994, 40; 11;1996 – 200.
- [22] CARRARO P., *Hemolyzed Specimens: A Reason for Rejection or a Clinical Challenge?* *Clinical Chemistry* 2000; 46; 306 – 307.
- [23] PECKA, M. *Laboratorní hematologie v přehledu: fyziologie a patofyziologie krevní buňky*. Český Těšín: FINIDR, 2006. ISBN 80-866-8200-5.
- [24] LIPPI G., BLANCKAERT N., BONINI P., GREEN S., KITCHEN S., PALICKA V., VASSAULT A. J. and PLEBANI M. - *Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories*. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2008; 46(6): 764 – 772.
- [25] <http://ahdc.vet.cornell.edu/clinpath/modules/chem/hemol.htm> (17.5.2012)
- [26] <http://chemistry.about.com/od/imagesclipartstructures/ig/Science-Clipart/Osmosis--Blood-Cells.htm> (14.6.2012).
- [27] <http://www.pathologystudent.com/?p=1003> (8.6.2012).
- [28] VERMEER H.J., STEEN G., NAUS A.J.M., GOEVAERTS B., AGRICOLA P.T., SCHOENMAKERS Ch.H.H. *Correction of patient results for Beckman Coulter LX-20 assays affected by interference due to hemoglobin, bilirubin or lipids: a practical approach*. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2007, 114 – 119.
- [29] <http://lab-turnov.ic.cz/index.php?page=odbery/odbery4> (14.4.2012).
- [30] HAQUE M., NAHAR N., SULTAN M.T., AZIZ R., ISLAM S., MAZED M.A. *Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing*. *JCMCTA* 2007; 18(1): 12 – 14.
- [31] BENOVSKA M., DASTYCH M., CERMAKOVA Z., TUMOVA J. - *Preanalytické interference a praktické využití sérových indexů*. *Klinická Biochemie a Metabolismus*, 18 (39), 2010, No. 3, p. 144–148.
- [32] JONES AM, HONOUR JW. *Unusual results from immunoassays and the role of the clinical endocrinologist*. *Clinical Endocrinology* 2006; 64:234 – 44.
- [33] SELBY C. *Interference in immunoassay*. *Annals of Clinical Biochemistry* 1999; 36:704 – 21.

- [34] EVANS MJ, LIVESEY JH, ELLIS MJ, YANDLE TG. *Effect of anticoagulants and storage temperatures on stability of plasma and serum hormones*. Clinical Biochemistry 2001; 34:107 – 12.
- [35] SNYDER JA, ROGERS MW, KING MS, PHILLIPS JC, CHAPMAN JF, HAMMETT-STABLER CA. *The impact of hemolysis on Ortho-Clinical Diagnostic's ECI and Roche's Elecsys immunoassay systems*. Clinica Chimica Acta 2004; 348:181 – 7.
- [36] MA Z, MONK TG, GOODNOUGH LT, McCLELLAN A, GAWRYL M, CLARK T, et al. *Effect of hemoglobin- and perflubronbased oxygen carriers on common clinical laboratory tests*. Clinical Chemistry 1997; 43:1732 – 7.
- [37] ALI AC, CAMPBELL JA. *Interference of o-raffinose crosslinked hemoglobin with routine Hitachi 717 assays*. Clinical Chemistry 1997; 43:1794 – 6.
- [38] Manuál pro odběr a zpracování vzorků biologického materiálu, BioLab spol. s r.o. Klatovy. <http://www.biolab-kt.cz/soubory/ManualOdberuBiolab.pdf> (17.1.2012).
- [39] Manuál pro odběr a zpracování vzorků biologického materiálu, BioLab spol. s r.o. Klatovy. <http://www.biolab-kt.cz/soubory/ManualOdberuBiolab.pdf> (17.1.2012).
- [40] <http://www.cdha.nshealth.ca/system/files/lipemia.jpg> (17.5.2012).
- [41] <http://www.medicina.bloguje.cz/497480-dyslipo-proteinemie.php> (17.5.2012).
- [42] Manuál pro odběr a zpracování vzorků biologického materiálu, BioLab spol. s r.o. Klatovy. <http://www.biolab-kt.cz/soubory/ManualOdberuBiolab.pdf> (17.1.2012).