

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**Katedra biochemických věd**

**PROBLEMATIKA ANALYTICKÉ KVALITY  
STANOVENÍ LABORATORNÍCH MARKERŮ  
CHRONICKÉHO ABÚZU ALKOHOLU VE VZTAHU  
K DIAGNOSTICKÉMU ALGORITMU JATERNÍCH  
ONEMOCNĚNÍ**

Bakalářská práce

**Vedoucí bakalářské práce: prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc.**

**Školitel bakalářské práce: RNDr. Kateřina Andelová**

**Hradec Králové, 2017**

**Marcela Barvíková**

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala prof. MUDr. Jaroslavu Dršatovi, CSc za odborné vedení a cenné rady při tvoření práce, rovněž děkuji RNDr. Kateřině Andelové za odborné konzultace, pomoc a připomínky během zpracování dat a práce samotné. Dále bych chtěla poděkovat všem svým spolupracovníkům a hlavně své rodině za trpělivost a podporu během celého studia.

## **Prohlášení**

„Prohlašuji, že tato bakalářská práce „Problematika analytické kvality stanovení laboratorních markerů chronického abúzu alkoholu ve vztahu k diagnostickému algoritmu jaterních onemocnění“ je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, 2017

.....

# ABSTRAKT

**Autor:** Marcela Barvíková

**Název:** Problematika analytické kvality stanovení laboratorních markerů chronického abúzu alkoholu ve vztahu k diagnostickému algoritmu jaterních onemocnění

**Bakalářská práce**

**Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Studijní obor:** zdravotní laborant

**Cíl práce:** Cílem bakalářské práce bylo přiblížit problematiku laboratorní diagnostiky nadměrné konzumace alkoholu a zdravotní problémy s ní související. Předkládaná práce porovnává spolehlivost výsledků stanovení karbohydrát-deficientního transferinu (CDT) a jiných biochemických markerů, používaných ke sledování abúzu alkoholu a jejich implementace v klinické praxi.

**Metoda:** Pro kvantitativní měření CDT byla využita metoda vysokotlaké kapalinové chromatografie s detekcí v ultrafialové a viditelné oblasti na analyzátoru VARIANT (Bio-Rad, Německo). Ostatní sledované parametry ukazatele chronického abúzu alkoholu (AST, GGT) byly stanoveny na modulárním analytickém systému Cobas 8000 (Roche, Německo).

**Výsledky:** Po provedení verifikačního šetření u metod, které se nejčastěji používají k monitorování chronického užívání alkoholu, bylo provedeno porovnání výkonnostních parametrů analytického postupu (stanovení opakovatelnosti, vychýlení metody, mezilehlé preciznosti a ověření pracovního rozsahu) s hodnotami uvedenými výrobcem diagnostických souprav v příbalové dokumentaci. Finálním výstupem práce byl výpočet rozšířené kombinované relativní nejistoty měření a jeho interpretace pro klinickou praxi.

**Závěr:** Provedenou řádnou verifikací metod a následným porovnáním rozšířených kombinovaných relativních nejistot měření sledovaných analytů bylo zjištěno, že všechny ověřované metody jsou vhodné ke klinickému použití v rutinní laboratoři.

**Klíčová slova:** abúzus alkoholu, karbohydrát-deficientní transferin, gama-glutamyltransferáza, aspartátaminotransferáza, verifikace

# ABSTRACT

**Author:** Marcela Barvíková

**Title:** Analytical quality issues of chronic alcohol abuse laboratory markers in relation to the diagnostic algorithm of liver diseases.

**Bachelor thesis**

**Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Field of study:** medical laboratory technician

**Aims:** The aim of this bachelor thesis was to bring up problems of laboratory diagnostics of excessive alcohol consumption and related health problems. This work compares reliability of CDT and other biochemical markers used for monitoring of alcohol abuse and their implementation in clinical practice.

**Methods:** For quantitative measurement of CDT a high-pressure liquid chromatography method with UV/VIS detection was used on the VARIANT analyzer (Bio-Rad, Germany). Other monitored parameters of chronic alcohol abuse (AST, GGT) were determined on the Cobas 8000 modular analytical system (Roche, Germany).

**Results:** Following a verification survey of the most commonly used methods for monitoring of chronic alcohol use, performance parameters of analytical methods (repeatability, bias, intermediate precision, working range) were compared with values given by manufacturers of diagnostic kits. The final output of this work was the calculation of the extended combined relative uncertainty of measurement and its interpretation for clinical practice.

**Conclusions:** Due to the proper method verification and subsequent comparison of the extended combined relative uncertainties of measured analytes it was found that all validated methods are suitable for clinical use in a routine laboratory.

**Keywords:** alcohol abuse, carbohydrate-deficient transferrin, gamma-glutamyltransferase, aspartate aminotransferase, verification

# OBSAH

1. ÚVOD.....	9
2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE.....	10
3. TEORETICKÁ ČÁST .....	11
3.1. Anatomie a fyziologie jater .....	11
3.2. Jaterní onemocnění.....	11
3.3. Klasifikace jaterních onemocnění .....	11
3.3.1. Jaterní cirhóza .....	12
3.3.2. Alkoholické onemocnění jater .....	12
3.3.2.1. Alkoholická jaterní steatóza.....	12
3.3.2.2. Steatohepatitida .....	13
3.3.2.3. Alkoholická cirhóza .....	14
3.4. Metody laboratorní diagnostiky a monitorování alkoholického poškození jater. 14	
3.4.1. Jaterní enzymy .....	15
3.4.1.1. Gama-glutamyltransferáza (GGT) .....	15
3.4.1.2. Aspartátaminotransferáza (AST) .....	16
3.4.1.3. Alaninaminotransferáza (ALT).....	17
3.4.1.4. Metody stanovení jaterních enzymů .....	17
3.4.2. Střední objem erytrocytu (MCV).....	17
3.4.2.1. Laboratorní diagnostika v hematologii .....	18
3.4.3. Karbohydrát deficientní transferin (CDT) .....	18
3.4.3.1. Struktura CDT .....	20
3.4.3.2. Metody stanovení CDT .....	21
3.4.3.2.1. Imunochemické metody .....	21
3.4.3.2.2. Elektroforetické metody.....	22
3.4.3.2.3. Chromatografické metody.....	23
3.4.4. Ethylsulfát (EtSt), ethylglukuronid (EtG).....	23
3.5. Ukazatele analytické kvality v rutinní biochemické laboratoři.....	24
4. PRAKTICKÁ ČÁST .....	25
4.1. Stanovení CDT na analyzátoru VARIANT firmy Bio - Rad.....	25
4.1.1. Základní komponenty analyzátoru .....	26

4.1.2. Princip stanovení CDT .....	26
4.1.2.1. Reagenční sada .....	26
4.1.2.2. Analytické parametry metody .....	27
4.1.2.3. Omezení metody .....	28
4.1.3. Odběr a stabilita vzorku .....	29
4.1.4. Biologické referenční rozmezí a interpretace výsledků .....	29
4.1.5. Kontrola kvality .....	30
4.1.6. Výpočet .....	31
4.1.6.1. Výpočty bez kalibrace .....	31
4.2. Stanovení AST a GGT na analyzátoru COBAS® 8000 (Roche) .....	31
4.2.1. Stanovení AST na analyzátoru Cobas 8000 .....	31
4.2.1.1. Reagencie a pracovní roztoky .....	32
4.2.1.2. Analytické parametry metody .....	32
4.2.1.3. Omezení metody .....	33
4.2.2. Stanovení GGT na analyzátoru Cobas 8000 .....	33
4.2.2.1. Reagencie a pracovní roztoky .....	34
4.2.2.2. Analytické parametry metody .....	34
4.2.2.3. Omezení metody .....	35
4.2.3. Odběr a stabilita vzorků .....	35
4.2.4. Očekávané hodnoty, referenční intervaly .....	36
4.2.5. Kontrola kvality .....	36
4.2.6. Výpočet .....	36
5. VÝSLEDKY .....	37
5.1. Validace .....	37
5.2. Verifikace .....	37
5.2.1. Opakovatelnost a vychýlení (bias) .....	37
5.2.2. Mezilehlá preciznost .....	41
5.2.3. Nejistota měření .....	43
5.2.4. Pracovní rozsah .....	44
5.3. Implementace naměřených dat z verifikací (výsledky rozšířených kombinovaných relativních nejistot měření) na reálné vzorky pacientů podle CDT ..	46
6. DISKUSE .....	48

7. ZÁVĚR .....	50
8. ZKRATKY .....	51
9. SEZNAM TABULEK .....	53
10. SEZNAM GRAFŮ .....	55
11. SEZNAM OBRÁZKŮ .....	55
12. POUŽITÁ LETERATURA .....	56



# 1. ÚVOD

Alkohol je nejrozšířenější návykovou látkou. Jeho nadměrná a dlouhodobá konzumace vede k postupné závislosti, která ovlivňuje, jednak zdravotní stav jedince, ale také samotné chování. Alkoholismus je jedním z nejdiskutovanějších problémů společnosti, který je veřejností mnohdy podceňován.

Chronická konzumace nadměrného množství alkoholu vede k poškození mnoha orgánů. Jedním z nejčastěji postižených orgánů jsou játra, která jsou hlavním orgánem přeměny alkoholu. V kontextu nárůstu počtu jaterních onemocnění vzrůstá potřeba diagnosticky diferencovat jednotlivá jaterní postižení. S ohledem na etylickou etiologii jaterního postižení, příp. patientskou non-compliance při zavedené medikaci jsou nejvhodnějšími ukazateli, pomocí kterých lze zjistit abúzus alkoholu, standardně užívané laboratorní markery, mezi které patří aktivity sérových transamináz, především gama-glutamyl transferáza (GGT), aspartátaminotransferáza (AST) a střední objem erytrocytů (mean corpuscular volume - MCV). Nejčastěji užívaným biochemickým markerem je karbohydrát deficientní transferin (CDT). V současné době existuje široká nabídka diagnostických souprav odlišných výrobců pro ukazatele chronického abúzu alkoholu pracujících na odlišném principu stanovení. Analytická kvalita je nedílnou součástí rutinních diagnostických laboratoří. Nedodržování jejich zásad může vyústit v mylnou klinickou interpretaci výsledků stanovení s přímým dopadem na testované jedince. Nepřesné a špatné vyšetření může fatálním způsobem ovlivnit zdraví, kvalitu života, ale i samotný život pacienta a proto je profesionální povinností každého analytika provádět měření o dostatečné kvalitě.

Předkládaná bakalářská práce prezentuje základní ukazatele analytické kvality v laboratoři klinické biochemie se zaměřením na laboratorní ukazatele chronického abúzu alkoholu, kterými jsou především CDT, GGT, AST. Práce je členěna do pěti kapitol, přičemž ve třech kapitolách jsou shrnuty teoretické základy. Stěžejní úsek představuje praktická část, která prezentuje analytické znaky rutinních metod s využitím stanovení opakovatelnosti, vychýlení metody, mezilehlé preciznosti a výpočtu relativní kombinované nejistoty měření, které jsou porovnány s hodnotami uvedenými výrobcem v příbalové dokumentaci k daným diagnostickým soupravám.

Výběr tématu reflektuje aktuálnost problematiky analytické kvality v rutinních diagnostických laboratořích, stejně tak i použité literární zdroje.

## 2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Předkládaná bakalářská práce si klade za cíl přiblížit problematiku nadměrné konzumace alkoholu a zdravotní problémy s ním související. Dále se zaměřuje na diagnostiku alkoholového poškození jater, zejména na nejspecifičtější biochemický marker chronického abúzu alkoholu a monitorování abstinence – karbohydrát-deficientní transferin (CDT) a jeho stanovení. CDT má rovněž význam v diferenciální diagnostice neuropatií, epilepsií, psychotických stavů, hepatopatií, dyslipidemií, pankreatitid, špatně korigovaných hypertenzí, u dekompenzovaných diabetiků a diabetiků s opakovanou hypoglykemií. Práce popisuje také základní funkční charakteristiky analytické metody, především opakovatelnost, mezilehlou preciznost, vychýlení měření a relativní nejistotu měření.

Cílem práce je porovnávání spolehlivosti výsledků stanovení CDT a jiných biochemických markerů používaných ke sledování abúzu alkoholu i jejich implementace v klinické praxi. Praktická část bakalářské práce byla prováděna v privátní diagnostické laboratoři Spadia Lab, a.s.; v laboratoři klinické biochemie, která pro měření CDT využívá metodu vysokotlaké kapalinové chromatografie s detekcí v ultrafialové a viditelné oblasti (dále jen HPLC UV/VIS detekce) na analyzátoru VARIANT (Bio-Rad, Německo). Ostatní parametry ukazatele chronického abúzu alkoholu byly stanoveny na modulárním analytickém systému Cobas 8000 (Roche, Německo).

## **3. TEORETICKÁ ČÁST**

### **3.1. Anatomie a fyziologie jater**

Játra jsou největším orgánem v břišní dutině z větší části uloženy v oblasti pravého podžebří, částečně také zasahují do levé části těla. Hrají hlavní roli v udržení homeostázy - stálosti vnitřního prostředí, protože mají řadu metabolických a regulačních funkcí, čímž udržují stálé složení krve. Červenohnědá barva jater je vnějším ukazatelem jejich funkce - zpracovávají velké množství krve a kontrolují její chemické složení. Většinu těchto funkcí, kromě odstraňování odpadních látek, což zprostředkovávají Kupfferovy buňky, vykonávají jaterní buňky - hepatocyty. (Robertsová, 2012)

Mezi hlavní činnosti a funkce jater patří metabolické procesy všech základních živin - sacharidů, lipidů, aminokyselin. Játra mají význam při tvorbě a degradaci některých hormonů, skladování vitaminů rozpustných v tucích či železa, krvetvorbě, regulaci tělesné teploty nebo imunitě. Podílí se na udržování rovnovážné hladiny cukru v krvi, zpracování cholesterolu, degradaci hemu nebo tvorbě bílkovin. Důležitá je detoxikační funkce jater, kdy dochází k přeměně látek přijatých z vnějšku (např. alkohol, léky), nebo vzniklých v lidském těle, ale už nejsou pro tělo potřebné, nebo jsou dokonce toxické. Játra jsou důležitá pro tvorbu žluči potřebné k trávení tuků ve střevech, která se ukládá ve žlučníku a je uvolňována do dvanáctníku. (Merkunová a Orel, 2008)

### **3.2. Jaterní onemocnění**

Játra jsou pro člověka velmi důležitá a nezbytná, bez jater nelze žít. Existuje mnoho chorob, které játra mohou poškodit a dokonce způsobit jejich selhání. Jaterní poškození se může projevit steatózou, steatohepatitidou, fibrózou, nebo jaterní cirhózou. Nemoci je však daleko více. (Brůha, et. al., 2009)

### **3.3. Klasifikace jaterních onemocnění**

Jednotná klasifikace jaterních onemocnění neexistuje, nemoci jater se rozdělují na akutní a chronické, nebo místní (nejčastěji se jedná o nádory, cysty) a difúzní (hepatitidy, fibróza, cirhóza).

### **3.3.1. Jaterní cirhóza**

Existuje více příčin způsobujících jaterní cirhózu. Kromě alkoholu jsou hlavními příčinami chronické virové hepatitidy, toxické vlivy (alkohol, různé chemické toxické látky) nebo houbové jedy (u pacientů, kteří akutní otravu přežili), onemocnění žlučovodů, metabolická onemocnění, cévní příčiny a autoimunitní onemocnění. (Mačák a Mačáková, 2004; Ehrmann a Schneiderka, 2006)

Asi 10 % jaterních cirhóz je postnekrotických, většinou po prodělané chronické hepatidě způsobené B a C viry, ale také po nekrózách způsobených toxickými látkami. Z celkového množství cirhóz tvoří 60-70 % alkoholická cirhóza. Vzniku alkoholické cirhózy předcházejí některé hepatopatie, např. alkoholická steatóza, alkoholická hepatitida. (Mačák a Mačáková, 2004)

### **3.3.2. Alkoholické onemocnění jater**

Poškození jater nesouvisí s druhem alkoholického nápoje, ale především záleží na množství čistého alkoholu, které je v něm obsaženo. Při konzumaci více než 30 g čistého alkoholu za den, bez ohledu na pohlaví, existuje zvýšené riziko jaterního poškození. Vznik jaterních chorob také závisí na způsobu pití alkoholu. Pro játra je šetrnější nárazové pití alkoholu s přestávkami, než trvalý přísun. Také pití alkoholu k jídlu je příznivější než konzumace mimo hlavní jídlo. (Brůha et al., 2009)

Každý organismus může být individuálně vnímavý a navíc jakékoli jiné jaterní postižení, jako například virová hepatitida, či metabolická onemocnění, znásobují riziko postižení alkoholem. Obezita je dalším vysoce rizikovým faktorem. (Brůha et al., 2009)

Objevuje se také mnoho informací o vztahu mezi genetickými polymorfizmy enzymů metabolizujících alkohol a vznikem alkoholového poškození jater, i samotná závislost na alkoholu je spjata s některými genetickými polymorfizmy genů pro GABA receptor či některé neuropeptidy. (Brůha et al., 2009)

#### **3.3.2.1. Alkoholická jaterní steatóza**

Alkoholická jaterní steatóza je nejčastějším patologickým nálezem při chronickém užívání alkoholu pozorovaným až u 90 % alkoholiků a to i při mírné konzumaci. Asi u 40 % alkoholiků přechází steatóza do steatohepatitidy. Objevuje se také u abstinentů po alkoholickém excesu. (Ehrmann, 2003; Ehrmann a Schneiderka, 2006)

Steatóza je charakterizovaná zvýšeným hromaděním triacylglycerolů v cytoplazmě hepatocytů a to ve formě tukových vakuol. V počátečních stádiích mají vakuoly tuku membránu, později se zvětšují, vzájemně splývají a membránu ztrácejí. (Ehrmann a Schneiderka, 2006)

Ehrmann a Schneiderka (2006) rozlišuje několik forem steatózy:

- **Makrovezikulární steatóza** je nejčastější formou alkoholické steatózy, kdy se v cytoplazmě hepatocytu objeví pouze jedna velká vakuola odtlačující jádro na okraj. Po vysazení alkoholu steatóza mizí po 4 - 8 týdnech.
- **Mikrovezikulární steatóza** je způsobena porušenou beta - oxidací mastných kyselin v mitochondriích. V cytoplazmě se vyskytuje mnoho drobných tukových vakuol, jádro je bez dislokace na periférii. Nejčastější příčinou jsou léky, u alkoholického postižení je méně častá.
- **Smišená steatóza** u alkoholického postižení je stav, který může být provázen jaterním selháním, při vysazení alkoholu dochází k rychlé normalizaci klinického a morfologického obrazu. Nález je doprovázen ikterem a hepatomegalií bez zánětlivých známek. Hepatocyty obsahují četné drobné kapénky tuku pěnivého vzhledu.
- **Fokální steatóza** se vyskytuje zřídka, u jinak zcela normálních jater. Při ultrazvukovém vyšetření může být zaměněn s nádorem.
- **Lipogranulom** je způsoben rupturou hepatocytů obsahujících lipidy, kolem které se shlukují makrofágy, leukocyty, eozinofily a tvoří se lipogranulomy vyvolávající ve svém okolí fibrózu, která však nemá vliv na rozvoj chronického alkoholového postižení jater.

### 3.3.2.2. Steatohepatitida

Steatohepatitida se vyskytuje asi u 20 % pacientů, kteří se léčí pro alkoholismus. Existují různé stupně závažnosti postižení. K základním prvkům morfologického obrazu steatohepatitidy patří vždy steatóza, další poškození hepatocytů, zánět a fibróza. Probíhá v podobě akutní alkoholické hepatitidy s lehkým průběhem, kdy se po několika dnech od požití alkoholu objevují dyspeptické obtíže, slabost a únava. Těžký průběh představuje závažný klinický stav provázený slabostí, někdy teplotou a postupně se rozvíjí jaterní selhání s velmi vážnou prognózou. Alkoholická hepatitida může také

probíhat léta, jako chronické onemocnění s postupnou fibrotizací a rozvojem cirhózy. Jde správně o chronické poškození jater, které má obvykle méně vážné příznaky než akutní alkoholická hepatitida. (Ehrmann a Schneiderka, 2006)

### **3.3.2.3. Alkoholická cirhóza**

Alkoholická cirhóza se v zásadě neliší od cirhózy z jiných příčin. Předpokládaná denní dávka užívání alkoholu pro vznik cirhózy je (60 - 80g čistého alkoholu u mužů) a (20g u žen) po dobu 10 let. Toxický vliv nemá jen etanol, ale i jeho metabolické produkty, např. acetaldehyd. Cirhózu můžeme definovat jako konečné stádium důsledku fibrózy jaterního parenchymu vyúsťujícího do uzlové přestavby jater s následnou poruchou jejich funkce. Jde o ireverzibilní stav. Jaterní cirhóza patří mezi nejsledovanější a nejobávanější choroby trávicího systému, která postihuje miliony osob na celém světě. Prognóza u nemocných s alkoholickou cirhózou je lepší než u nemocných s cirhózou z jiných příčin, avšak je nutná abstinence. (Mačák a Mačáková, 2004; Ehrmann a Schneiderka, 2006)

Mezi nejčastější komplikace jaterní cirhózy projevující se změnami jaterní tkáně patří vznik makroregeneračních uzlů, vznik dysplastických uzlů a vznik hepatocelulárního karcinomu. Další možné komplikace mohou být: portální hypertenze, ascites, bakteriální spontánní peritonitida, jaterní encefalopatie, hepatorenální syndrom a další. (Ehrmann, 2003; Ehrmann a Schneiderka, 2006 )

Objektivním nálezem u tohoto onemocnění je ikterus, žluté zbarvení tkání (kůže, sliznice a skléry), podmíněné zvýšenou hladinou bilirubinu v séru. Mezi další nálezy při objektivním vyšetření nemocného patří pavoučkové névy, které vypadají jako červená vyrážka, ale ve skutečnosti se jedná o řadu ložisek rozšířených podkožních cévek, nacházejících se na hrudníku, krku, obličeji a horních končetinách. (Ehrmann a Schneiderka, 2006)

### **3.4. Metody laboratorní diagnostiky a monitorování alkoholického poškození jater**

Spolehlivá diagnostika stanovení abúzu alkoholu má velký význam ve všech oborech současné medicíny. Samotná diagnostika alkoholového poškození jater není tak složitá jako monitorování abstinence. Mezi standardně užívané laboratorní markery chronického nadužívání alkoholu a monitorování abstinence, patří aktivity sérových

transamináz, především gama- glutamyl transferázy (GGT), aspartátaminotransferázy (AST) a střední objem erytrocytu MCV (mean corpuscular volume) ( Wohl, Trunečka a Špičák, 2003)

Vzhledem k nízké specifitě uvedených parametrů a dlouhým plazmatickým poločasům transamináz i životnosti erytrocytů a tedy jejich nevhodnosti pro longitudinální sledování pacientů přetrvává snaha o nalezení vhodnějšího markeru s vysokou specifitou, pružně reagujícího na aktuální změny v příjmu alkoholu u daného jedince a umožňujícího verifikaci abstinence u pacientů v odvykací terapii. V současnosti se k diagnostice alkoholové závislosti nejčastěji užívá biochemický marker - karbohydrát deficiční transferin (CDT), který nejlépe splňuje uvedená kritéria. Poprvé byl použit Stiblerovou a Kjellinem v roce 1976. (Reynaud, Schellenberg a Loiseux-Meunier, 2000; Cylwik, Chrostek a Szmitkowski, 2006)

### **3.4.1. Jaterní enzymy**

Játra obsahují mnoho enzymů, které jsou důležité pro jejich funkci. Aktivitu enzymů lze prokázat vyšetřením krevního séra, přičemž zvýšené hodnoty těchto enzymů v krvi mohou poukazovat na poškození jaterní tkáně, nejčastěji se jedná o poškození nějakou toxickou látkou (alkohol, paracetamol) nebo nemocí (infekce, nádory).

U postižení jater bývají zvýšené všechny čtyři enzymy (AST, ALT, ALP, GGT), podle konkrétní situace mohou být některé více zvýšené než ostatní, díky tomu lze s určitou pravděpodobností odhadnout, jak moc závažně jsou játra poškozená. (Torrente, Freeman a Vrana, 2012; Horák a Ehrmann, 2014)

#### **3.4.1.1. Gama-glutamyltransferáza (GGT)**

GGT je enzym který katalyzuje přenos gama-glutamyllové skupiny. Jde o membránově vázaný enzym s exkretorickou nebo absorpční funkcí, vyskytující se zejména v epitelech žlučových a pankreatických cest, ale také v mikrozomech hepatocytů, enterocytech, tubulárních buňkách ledvin a dalších tkáních. Vyskytuje se i v prostatě a seminálních váčcích, proto je vyšší aktivita GGT u mužů. Hodnota GGT stoupá u řady mimojaterních chorob- u srdečního infarktu, renální insuficience, diabetu, onemocnění pankreatu, nebo při chronickém abúzu alkoholu. Hodnoty katalytických aktivit zdravé populace se mohou lišit podle výrobce použitých diagnostických souprav a dle pohlaví, průměrné hodnoty se pohybují od 0,18 až 0,82  $\mu\text{kat/l}$ . Příčinou vzestupu

GGT může být navození syntézy v poškozených hepatocytech při adaptaci na škodlivinu (alkohol, léky), uvolnění z membrán detergentním účinkem (žlučové kyseliny, ethanol), nebo také poruchou permeability membrány a nekróze buněk (zánět). Více než 20 krát mohou být zvýšené hodnoty GGT u extrahepatální a intrahepatální cholestázy, ale také při alkoholovém poškození jater jsou hodnoty GGT zvýšené a to i bez přítomnosti cholestázy. Biologický poločas GGT je 14-26 dnů a návrat k normálním hodnotám při abstinenci je 4-5 týdnů. Koeficient GGT/ AST  $\mu\text{kat/l}$  větší než 6 je typický pro alkoholové jaterní poškození.

(Masopust, 1998; Ehrman, Hůlek et al., 2010; Torrente, Freeman a Vrana, 2012; Horák a Ehrmann, 2014)

#### **3.4.1.2. Aspartátaminotransferáza (AST)**

AST je enzym, který přenáší aminoskupinu z kyseliny asparagové na oxoglutarát za vzniku kyseliny glutamové a oxalacetátu. Tento enzym je přítomen v játrech, srdečním a kosterním svalstvu, pankreatu, plicích, ledvinách, ve slezině a erytrocytech. Jde o bilokulární enzym, poněvadž jedna molekulová forma se nachází v cytoplazmě a druhá v mitochondriích. Zvýšení AST 3- 20 krát je typické pro akutní i chronické hepatitidy a toxické poškození jater včetně alkoholového. Pokles hodnot může představovat ústup onemocnění, ale i masivní nekrózu. AST hraje významnou roli v glukoneogenezi a tvorbě glukózy z nesacharidových substrátů. Mitochondriální isoenzym může být zvýšený poškozením mitochondrií v hepatocytech (akutní i chronické hepatitidy, alkoholové poškození). Hodnoty katalytických aktivit zdravé populace se mohou lišit podle výrobce použitých diagnostických souprav a dle pohlaví, průměrné hodnoty se pohybují od 0,18 až 0,92  $\mu\text{kat/l}$ . Jaterní specificita i senzitivita jsou menší než 70 %. Až 40 krát zvýšené hodnoty AST jsou u akutních virových hepatitid, až 30 krát u toxického jaterního poškození, infekční mononukleózy, šokových jater, až 10 krát u steatózy, chronických hepatitid a obstrukčního ikteru. (Masopust, 1998; Ehrman, Hůlek et al., 2010; Torrente, Freeman a Vrana, 2012; Horák a Ehrmann, 2014)



### **3.4.1.3. Alaninaminotransferáza (ALT)**

ALT je enzym, který katalyzuje transaminační reakci, při níž přenáší aminoskupinu z alaninu na 2-oxoglutarát za vzniku kyseliny glutamové a pyruvátu. ALT je enzym primárně lokalizován v játrech a vyskytuje se pouze v cytosolu. Hraje významnou roli v glukoneogenezi a tvorbě glukózy z nesacharidových substrátů. Spolu s AST patří mezi nejpoužívanější enzymy indikující hepatocelulární poškození. Poměr AST/ALT je významný především u alkoholového poškození jater, pokud je poměr AST/ALT vyšší než 2, je pokládán za specifický pro alkoholové jaterní choroby. U jiných jaterních onemocnění je tento poměr menší než 1. ALT má větší specifitu pro poškození jater než AST, proto nález fyziologické hodnoty vylučuje hepatobiliární onemocnění. (Masopust, 1998; Ehrman, Hůlek et al., 2010)

### **3.4.1.4. Metody stanovení jaterních enzymů**

V klinické biochemii se při stanovení katalytické aktivity AST používá fotometrická metoda na automatickém biochemickém analyzátoru. AST katalyzuje transaminační reakci mezi aspartátem a 2-oxoglutarátem za vzniku oxalacetátu a glutamátu. V následné reakci je oxalacetát redukován enzymem malátdehydrogenázou na malát. Při reakci dochází k oxidaci koenzymu nikotinamidadeninukleotidu (NADH) na NAD<sup>+</sup>, což se projeví poklesem absorbance při 340 nm v měřící kyvetě. Míra poklesu se hodnotí kineticky, tzn. hodnotí se úbytek absorbance vztažený na jednotku času. Rychlost oxidace NADH je přímo úměrná katalytické aktivitě AST ve vzorku, reakce probíhá při 37 °C po dobu 15 minut pokud nedojde k předčasnému vyčerpání substrátu v důsledku vysoké aktivity enzymu. (Andelová et al., 2011; Beránek a Tichý, 2013)

Při stanovení GGT je substrátem transaminační reakce gama-glutamyl-3-karboxy-4-nitroanilid, ze kterého odštěpením gama-glutamylového zbytku vzniká 5-amino-2-nitrobenzoát absorbující při 410 nm. Enzym gama-glutamyltransferáza přenáší gama-glutamylovou skupinu na glycyglycin. Množství uvolněného 5-amino-2-nitrobenzoátu je přímou měrou aktivity GGT ve vzorku, stanovuje se fotometricky měřením nárůstu absorbance. (Andelová et al., 2011; Beránek a Tichý, 2013)

### **3.4.2. Střední objem erytrocytu (MCV)**

Střední objem erytrocytu (MCV) vyjadřuje průměrný objem buňky v hodnocených erytrocytech. MCV je jeden z nejdůležitějších a velmi přesně měřitelných parametrů,

podle kterého lze dělit chudokrevnost na mikrocytární (pod 80 fl), normocytární (80-97 fl) a makrocytární (nad 97 fl). MCV se zjišťuje přímým měřením na analyzátoch, nebo výpočtem podle vzorce:  $MCV = HCT / RBC$  (HCT- hematokrit; RBC- počet erytrocytů). (Pecka, 2006)

V posledních letech se zvyšuje frekvence makrocytové anémie při dlouhodobém nadužívání alkoholu, změna má mírnější stupeň (od 100 do 110 fl) a zvýšení MCV lze pozorovat po 6 týdnech abúzu, závisí na dávce přijatého alkoholu (10 g etanolu denně MCV zvyšuje o 1,7 fl), obvykle je zvýšená i hodnota GGT. Při abstinenci klesá hodnota MCV až po 2-3 měsících. (Ehrmann, 2003; Ehrmann a Schneiderka, 2006; Torrente, Freeman a Vrana, 2012)

#### **3.4.2.1. Laboratorní diagnostika v hematologii**

Existuje velký výběr nejrůznějších typů hematologických analyzátorů, každý má svá specifika, ale v zásadě používají dva základní principy měření: optický a impedanční. Měřením lze získat informace o velikosti buněk, počtu buněk, tvaru a složení buněk. Principy metod mohou být na analyzátoch kombinovány a umožňují tak různé kvantitativní a kvalitativní analýzy prošlých elementů. (Penka a Tesařová, 2011)

#### **3.4.3. Karbohydrát deficientní transferin (CDT)**

CDT je v současné době považován za nejspecifičtější biochemický marker alkoholové závislosti s nejvyšší diagnostickou validitou, znázorněno v tab. 1, který je vhodný pro diagnózu chronického i akutního abúzu alkoholu. Úroveň CDT se zvyšují po dobu 1,5 - 2 týdnů. Pro zjištění časného relapsu abúzu je také možné vyšetření etylglukuronidu, což je přímý metabolit etanolu, který lze stanovit v tělesných tekutinách, ale i ve vlasech. Spolu s CDT je výhodné stanovit aktivitu GGT, protože nejsou na sobě závislé a odpověď těchto parametrů na abúzus je způsobena odlišnými mechanismy. CDT poukazuje na kvantitu a na frekvenci užívání menšího množství alkoholu, zatímco GGT již informuje o jaterní indukci při vysoké intenzitě požívání alkoholu. Diagnostická senzitivita kombinace CDT a GGT se pohybuje okolo 60 - 70 % a specificita přibližně okolo 80 - 100 %. Nejvýhodnější je doplnění této kombinace o stanovení MCV, tato trojkombinace má nejvyšší senzitivitu a specificitu. (Wohl, Trunečka a Špičák, 2003; Ehrmann a Schneiderka, 2006)

**Tab.1. Screening abúzu alkoholu** (Wohl, Trunečka a Špičák, 2003)

	Abúzus alkoholu		Alkoholická závislost	
	Senzitivita %	Specifická %	Senzitivita %	Specifická %
<b>AST</b>	10.30	větší než 90	33-55	větší než 90
<b>GGT</b>	20-50	55-100	60-90	55-100
<b>MCV</b>	20-30	64-100	40-50	64-100
<b>CDT</b>	26-62	větší než 90	65-95	větší než 90

Hladiny CDT v séru mohou být ovlivněny jinými stavy, které nesouvisí s užíváním alkoholu, jako je anorexie nervosa, těhotenství a nedostatek železa. Falešně negativní výsledky jsou spojeny s ženským pohlavím z důvodu nižšího užívání alkoholu, také akutní traumata se ztrátou krve mohou být příčinou falešně negativního výsledku, nebo naopak bylo zjištěno, že u některých jedinců zůstávají hladiny CDT vysoké i po 6 týdnech ukončení pití alkoholu. Také vzácné izoformy transferinu ovlivňují hladiny CDT. Jedná se o genetické B-varianty transferinu, které mohou způsobit falešně negativní výsledky a genetické D-varianty transferinu, které mohou způsobit falešně pozitivní výsledky. Podobně i zvýšený trisialotransferin může za falešně pozitivní výsledky. Navzdory těmto omezením se CDT považuje za nejspolehlivějšího ukazatele abúzu alkoholu v porovnání s jinými markery (AST, GGT, CMV). (Torrente, Freeman a Vrana, 2012)

Porovnání časových změn laboratorních markerů CDT, GGT, MCV je zachyceno v tabulce 2.

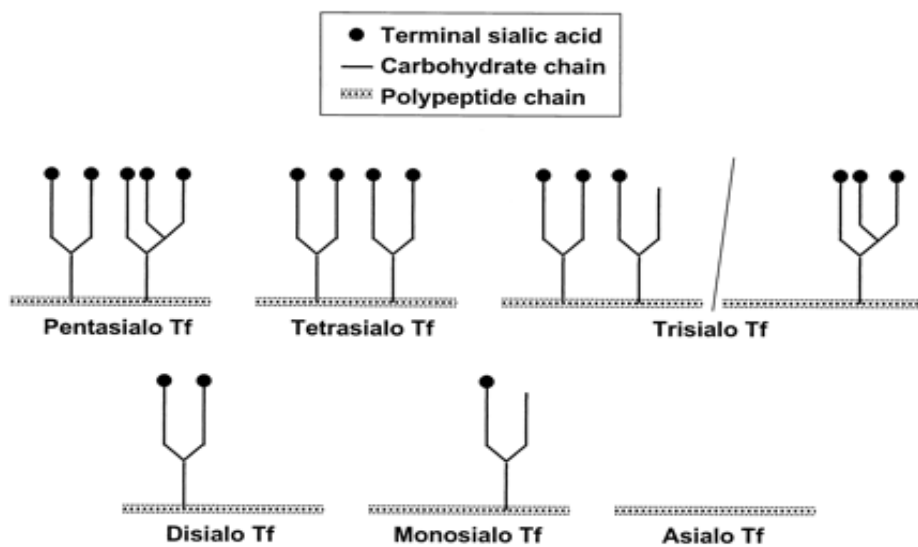
**Tab.2. Časové intervaly laboratorních markerů při chronickém abúzu a v období abstinence** (Wohl, Trunečka a Špičák, 2003)

Marker	Zvýšení po abúzu	Normalizace při abstinenci
<b>CDT</b>	2 týdny	2-3 týdny
<b>GGT</b>	5 týdnů	5 týdnů
<b>MCV</b>	6 týdnů	2-3 měsíce

Při chronickém abúzu alkoholu se během několika týdnů v krvi i v likvoru zvyšuje zastoupení molekulových forem transferinu se dvěma zbytky kyseliny sialové (disialotransferin). Transferin je jaterní protein, který se podílí na transportu železa, existuje ve formách obsahujících až devět zbytků kyseliny sialové, přičemž čtyři

(tetrasialotransferrin) jsou nejběžnější. Struktura hlavních izoforem sérového transferinu je znázorněna na obr. 1. (Helander et al., 2001)

CDT se týká transferinu s nižšími stupni glykosylace. Převládající izoformu tvoří tetrasialo, která reprezentuje okolo 80 % po saturaci železem, zatímco disialo izoforma normálně okolo 1 %. Relativní množství disialo izoformy roste po nadměrném pití ( $\geq 50 - 80$  g etanolu/den) v období dvou nebo více týdnů. Pro stanovení CDT je primární cílovou sloučeninou disialotransferin, ojediněle se nacházejí asialo-izoformy a vzácně monosialo-izoformy jejichž izoelektrický bod (pI) je vyšší než 5,7. Izelektrický bod transferinové molekuly ovlivňuje množství vázaných sialových kyselin a saturace železem všech molekul transferinu. Spotřeba etanolu zvyšuje sérové koncentrace CDT, zejména asialo- a disialo-transferin. Bylo prokázáno, že vyšší zastoupení asialo a monosialo – izoforem mají ženy. Trisialotransferrin není v měření CDT zahrnut, neboť bylo zjištěno, že konzumace alkoholu neovlivňuje jeho hladiny. (Helander et al., 2001; Arndt, 2007; Torrente, Freeman a Vrana, 2012)

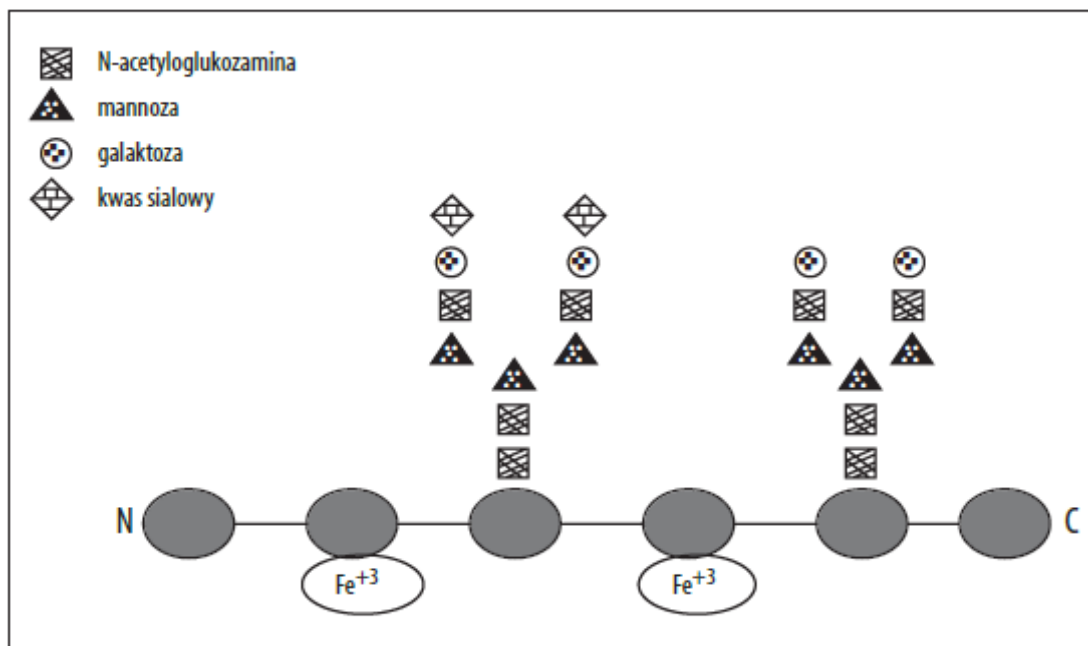


**Obr. 1. Struktura hlavních izoforem sérového transferinu (Helander et al., 2001)**

### 3.4.3.1. Struktura CDT

Transferin je glykoprotein o molekulové hmotnosti 79,6 kDa (kilodalton), který je důležitý při transportu železa v plazmě, je syntetizován zejména v játrech. Transferin vytváří komplexní strukturu (obr. 2), která se skládá z jednoho polypeptidického řetězce, tvořeného z 679 aminokyselin, dvou nezávislých vazebných míst pro železo

a dvou N-terminálních oligosacharidových jednotek. (Cylwik, Chrostek a Szmitkowski, 2006)



**Obr. 2. Schematická struktura CDT ( Disialo-Fe<sup>2+</sup>-transferrin)** (Cylwik, Chrostek a Szmitkowski, 2006)

### 3.4.3.2. Metody stanovení CDT

Pro stanovení CDT se nejčastěji používají chromatografické, elektroforetické a imunologické metody, díky kterým se rozdělí jednotlivé izoformy transferinu podle velikosti elektrického náboje a hodnoty izoelektrického bodu. Hodnota (pI) se liší podle obsahu železa v molekule transferinu, proto je nutné odstranit tyto rozdíly saturací všech vazebných míst transferinu ionty Fe<sup>3+</sup>. (Valaštová a Libčinská, 2010; Torrente, Freeman a Vrana, 2012)

#### 3.4.3.2.1. Imunochemické metody

Imunochemické metody jsou založené na saturaci transferinu Fe<sup>3+</sup> a následné separaci na iontově vyměnné koloně podle rozdílných sialových řetězců, kdy eluované izoformy CDT vytváří imuno-komplexy s anti-transferinovou protilátkou a poté se CDT stanovuje různou detekční technikou.

- **Imunoturbidimetrie (TIA)** je heterogenní metoda, která po separaci na koloně využívá následné turbidimetrické měření, kdy se celkový transferin ve vzorku

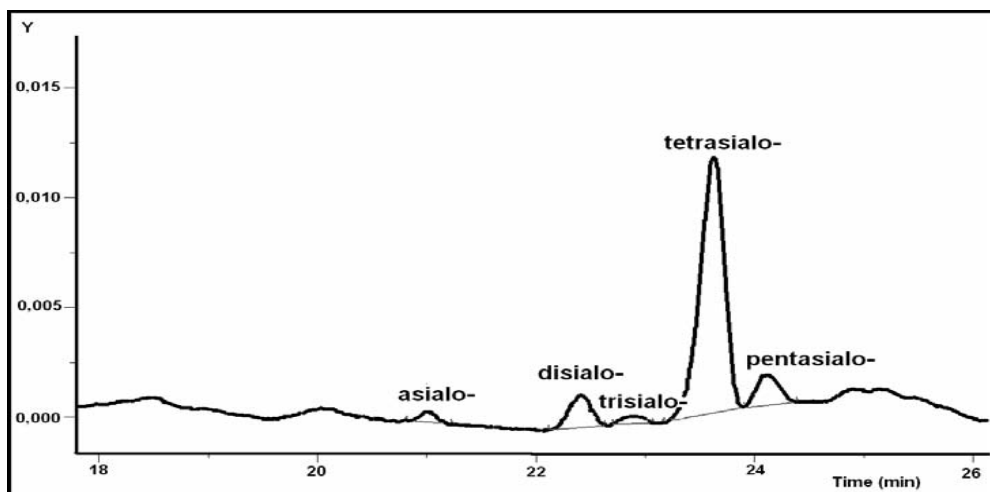
určí samostatně za použití stejných anti-transferinových protilátek. Podíl CDT se vypočítá z naměřených hodnot pomocí kalibrační křivky, v případě většího podílu trisialoformy není separace dokonalá a stanovená hodnota je falešně pozitivní. (Cylwik, Chrostek a Szmitkowski, 2006)

- **Radioimunoanalýza (RIA)** je metoda založena na principu vzniku komplexu antigen-protilátka. Izoformy CDT soutěží o vazbu na protilátce značenou radioaktivní značkou ( $^{125}\text{I}$ ), výsledkem reakce jsou dva komplexy antigen-protilátka se značeným a nenaznačeným antigenem. Pro měření koncentrace CDT se využívá záření, které vysílá radionuklid  $^{125}\text{I}$ . (Cylwik, Chrostek a Szmitkowski, 2006)

#### 3.4.3.2.2. Elektroforetické metody

Elektroforetické metody se vyznačují vysokou citlivostí a rozlišením.

- **Kapilární elektroforéza (CE)** je metoda vhodná pro rutinní stanovení CDT, výhodou je rychlost, spotřeba malého množství vzorku a činidel, možnost automatizace. Nevýhodou jsou vysoké náklady na vybavení. K separaci dochází kombinací vlivu elektroforetické migrace (pohyb nabitých molekul v elektrickém poli) a elektroosmotického toku (tok elektrolytu způsobený nábojem vnitřní stěny kapiláry a aplikovaným potenciálem). Separace sérového transferinu po saturaci železem probíhá v kapiláře z křemičitého skla, kde silanové skupiny ve styku s elektrolytem mají tendenci podél vnitřní stěny kapiláry ionizovat a vytvářet elektrickou dvojvrstvu. Signály jednotlivých izoform CDT jsou zaznamenány na elektroforeogramu, obr. 3. (Cylwik, Chrostek a Szmitkowski, 2006; Valašková a Libčinská, 2010)



**Obr. 3. Elektroforeogram analýzy CDT ( Valaštová a Libčinská, 2010)**

- **Izoelektrická fokusace (IEF)** je velice citlivá metoda, ale pro rutinní účely je příliš složitá a náročná. U této referenční metody dochází po saturaci transferinu železem k rozdělení všech izoform CDT včetně genetických variant. Po aplikaci napětí migrují proteinové frakce na polyakrylamidovém gelu se stálým gradientem pH do místa svého pI kde se zastaví a fokusují. Izoelektrickou fokusaci lze kombinovat s metodou Western blot, která je založena na elektroforéze v agarózovém gelu. (Cylwik, Chrostek a Szmitkowski, 2006)

#### 3.4.3.2.3. Chromatografické metody

- **Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)**, princip této metody je založen na přitahování opačných nábojů, kdy stacionární fáze nese na svém povrchu náboj a při průchodu mobilní fáze obsahující ionty opačného náboje, dochází díky elektrostatickým silám k jejich zadržení na povrchu stacionární fáze. Poté je nutné, aby byly opět uvolněny, toho docílíme změnou charakteru elučního činidla, buď aby došlo k vytěsnění dělených iontů, nebo ke změně jejich náboje, jde o tzv. gradientovou eluci (s časem se mění složení elučního roztoku). (Cylwik, Chrostek a Szmitkowski, 2006)

#### 3.4.4. Ethylsulfát (EtSt), ethylglukuronid (EtG)

Ethylsulfát je biochemický marker pro detekci konzumace alkoholu a pro monitorování abstinence v průběhu léčby. Ethylsulfát (EtSt) a ethylglukuronid (EtG) jsou přímé metabolity etanolu, které lze stanovit v tělesných tekutinách a ve vlasech. Vznikají v těle enzymatickou konjugací etanolu s kyselinou glukuronovou, resp.

sulfátem. Etanol je prokazatelný v moči pouze několik hodin po požití (8 - 12 h), zatímco EtG lze zjistit po dobu až 80 hodin a EtSt je prokazatelný až 30 hodin po požití etanolu nebo vdechování jeho par. EtG a EtSt je tedy možné používat jako diagnostické markery nedávného požití alkoholu nebo k monitorování abstinence léčených alkoholiků. Výhodou EtG a EtSt je, že se jedná o stabilní netěkavé sloučeniny a na rozdíl od etanolu, který může za určitých okolností vzniknout v moči dodatečně (např. u diabetiků přeměnou glukózy činností kvasinek nebo některých bakterií, pokud je moč nějakou dobu v teple), vzniká EtG a EtSt v játrech a do moče jsou pouze vylučovány. Koncentrace EtG v moči může být snížena činností bakterií obsahujících beta-glukuronidázu, z tohoto důvodu se doporučuje posílat k analýze vzorek čerstvé moče uchovaný v chladu, zatímco EtSt tomuto procesu nepodléhá, proto je výhodné stanovit oba parametry současně, protože vznikají rozdílnými metabolickými pochody a jejich současné stanovení zvyšuje diagnostickou senzitivitu při monitorování alkoholového abúzu. (Andelová et al., 2011; Torrente, Freeman a Vrana, 2012)

### **3.5. Ukazatele analytické kvality v rutinní biochemické laboratoři**

V klinické biochemii se používají metody, které jsou spolehlivé (validní) a dlouhodobě vyhovují kontrole kvality. Procesy laboratorního vyšetřování jsou děleny na 3 fáze: preanalytickou, analytickou a postanalytickou. Požadavkem v analytické fázi je, aby výsledek byl precizní, přesný, pravdivý a opakovatelný a aby v analytickém procesu nedocházelo k chybám. Mezi základní ukazatele analytické kvality patří nejistota měření, preciznost, pravdivost, výtěžnost, mez detekce, mez stanovitelnosti, linearita, analytická citlivost a selektivita, interference a další. Systém kontroly kvality v analytické fázi laboratorního vyšetřování zahrnuje interní (vnitřní) kontrolu kvality (VKK) a externí kontrolu (hodnocení) kvality (EHK).



## 4. PRAKTICKÁ ČÁST

Vlastní analýza vzorků pro stanovení CDT byla provedena na automatizovaném analyzátoru VARIANT. K získání naměřených hodnot byla použita komerčně dodaná reagenční sada Ready-Prep % CDT by HPLC firmy Bio-Rad a všechna měření byla provedena dle návodu výrobce souprav a v souladu se standardním operačním postupem laboratoře.

Stanovení enzymatické aktivity AST a GGT bylo provedeno na oddělení biochemie na analyzátoru Roche/Hitachi Cobas<sup>®</sup> 8000 podle pokynů uvedených v dokumentaci k tomuto analyzátoru. Systém Roche/Hitachi Cobas<sup>®</sup> 8000 automaticky vypočítá aktivitu analytu každého vzorku. Převodní faktor:  $U/l \times 0,0167 = \mu\text{kat/l}$ .

### 4.1. Stanovení CDT na analyzátoru VARIANT firmy Bio - Rad

Stanovení CDT bylo provedeno na analyzátoru VARIANT (obr. 4). Jedná se o plně automatizovaný systém, který se používá pro snadné, rychlé a spolehlivé stanovení CDT v lidském séru a díky tomu je vhodný pro rutinní použití v laboratořích. Pomocí reagenční sady firmy Bio-Rad % CDT by HPLC se měří relativní množství jednoduchých izoform transferinu v poměru k celkovému množství transferinu jako procenta plochy pod píkem. I přesto že mohou vzácné izoformy transferinu a abnormální koncentrace trisialotransferinu způsobit s ostatními metodikami nesprávné výsledky, je identifikace těchto variant možná při použití metodiky Bio-Rad % CDT By HPLC.



**Obr. 4. Analyzátor VARIANT firmy Bio – Rad (foto: Barvíková Marcela)**

#### 4.1.1. Základní komponenty analyzátoru

Mezi základní komponenty patří:

- Vysokotlaká pumpa, která zajišťuje konstantní průtok mobilní fáze 1,4/2,6 ml/min a dostatečný tlak do 100 kg/cm<sup>2</sup>, aby byla schopna vytlačit trojkový gradient pufru. Mikročástice v koloně kladou při průchodu mobilní fáze velký odpor.
- Injektor slouží k přesnému nástřiku vzorku do proudu mobilní fáze (100 µl vzorku).
- Odplynění je doporučeno pro zamezení tvorby vzduchových bublin pomocí odplyňovacího zařízení.
- UV detektor schopný měřit při 460 nm a 10 mA UFS.
- Tlumič pulsů generuje základní linii (baseline) bez vzruchu při 10 mA UFS na UV detektoru.
- Termostat kolony zajišťuje konstantní teplotu mezi 35-40°C a zahřívá kolonu a držák kolony. (Bio- Rad, 2009; Loučka, 2016)

#### 4.1.2. Princip stanovení CDT

150 µl séra se přenesse do příslušně označených lahvíček Ready-Prep. (350 µl předem připravené směsi reagentů). Po 30 min inkubace při pokojové teplotě se precipitát odstraní centrifugací. 100 µl supernatantu se nastříkne do HPLC systému. Izoformy transferinu jsou separovány na gradientovém HPLC systému na koloně s výměnou aniontů a měřeny UV- detektorem při 460 nm. Měření při vlnové délce 460 nm je vysoce specifické a detekuje selektivně výhradně železem saturované transferiny. Metoda bez kalibrace, interní kontrola Bio-Rad, Cut off 1,9 %. (Bio- Rad, 2009; Loučka, 2016)

##### 4.1.2.1. Reagenční sada

Pro kvantitativní stanovení CDT se používá reagenční sada, kterou dodává firma Bio-Rad, pod označením- Ready-Prep % CDT by HPLC. Jedna reagenční sada je určena pro 100 analýz (kat. č.195- 6670):

- Ready-Prep vialky – obsahují reagenční mix, 100 ks

- Mobilní fáze (MF) - 3 x (1700, 1000, 250 ml). Složení MF- Bis-TRis pufr, obsahuje azid sodný (< 0,1 %)
- Předkolona – 5 x 4,6 mm ID (pro 100 nástřiků)
- Analytická kolona - 30 x 4 mm ID, je naplněna stacionární fází, (600 nástřiků), kat. č. 195-6662
- Promývací roztok (1900ml), kat. č. 195-6654
- % CDT Kontrolní sada, kat. č. 195-6669 obsahuje:
  - Kontrola hladina 1 (2 x 1,0 ml)
  - Kontrola hladina 2 (2 x 1,0 ml)
  - HPLC voda (Bio- Rad, 2009)

#### 4.1.2.2. Analytické parametry metody

Mezi základní analytické parametry metody zahrnujeme:

- Rozsah měření
- Limit detekce: citlivost metody záleží na citlivosti UV/VIS detektoru. Nízké hladiny jako 0,3 % mohou být stanoveny dostatečně citlivým detektorem.
- Preciznost byla stanovena studií podle směrnice NCCLS EP5-A „Ověření charakteristiky přesnosti klinických chemických zařízení“, kdy bylo denně prováděno duplicitní testování po dobu 10 pracovních dnů. V každé sérii byly provedeny analýzy alikvótů s nízkou i vysokou koncentrací DST v dubletech.

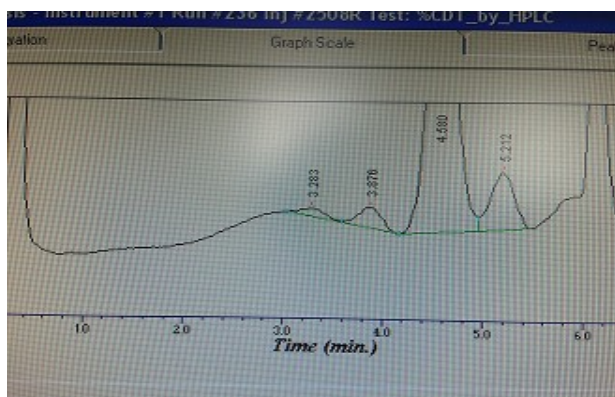
Byly získány následující údaje:

Hladina 1	Hladina 2
Průměr: 1,29 %	Průměr: 6,39 %
Opakovatelnost (CV): 5,97 %	Opakovatelnost (CV): 3,65 %
Mezilehlá preciznost (CV): 4,27%	Mezilehlá preciznost (CV): 2,01 %
(Bio- Rad, 2009)	

### 4.1.2.3. Omezení metody

Stanovení CDT může být problematické u pacientů trpících anémií nebo onemocněním jater (snížení celkového množství transferinu). I při zvýšené hladině trisialotransferinu (> 7 %) může být zaznamenána přítomnost monosialotransferinu, který nelze odlišit a separovat od DST, tím může při stanovení dojít k jeho interferenci. Interference jsou pozorovány u vzorků hemolytických s hladinou hemoglobinu nad 0,5 %, kdy dochází ke zvýšení baseliny kvůli dalším elučním komponentám za „pentasialo“ píkem, takže interferují se stanovením CDT (Obr. 5). Mezi další látky, které mohou ovlivnit stanovení CDT, patří triacylglyceroly (lipemie) s koncentrací nad 6,0 mg/dl a bilirubin (ikterus) jehož koncentrace nad 2 mg/dl může interferovat chromatografií. Také vzácné izoformy transferinu mohou falešně ovlivnit výsledek:

- Genetické varianty transferinu: běžnou formou transferinu je C-forma, ale častými variantami jsou heterozygotní formy s B- a D-formou (BC a CD). Pro tyto varianty není možné správné měření CDT, protože se tyto izoformy přesmykují.
- CDG syndrom (syndrom karbohydrát-deficientního glykoproteinu), nyní jako vrozené poruchy glykosylace, mohou způsobovat zvýšené hladiny CDT. Bylo prokázáno, že metoda stanovení Bio-Rad % CDT by HPLC se může používat pro diagnostiku CDG u dětí. (Bio- Rad, 2009)



**Obr. 5. Chromatogram hemolytického vzorku (foto: Barvíková Marcela)**

#### 4.1.3. Odběr a stabilita vzorku

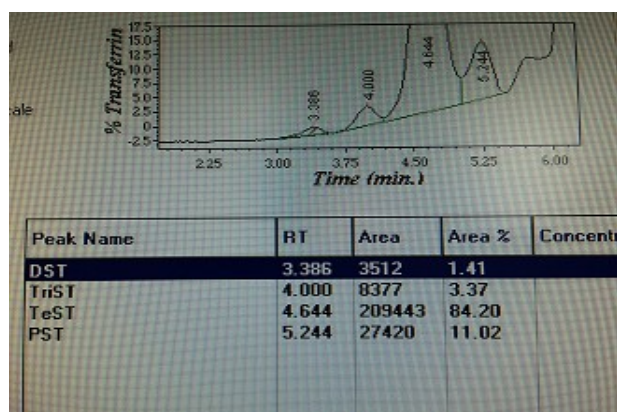
Pro obvyklé vyšetřování je vhodný odběr ráno nalačno. Speciální příprava pacienta před odběrem žilní krve není nutná. Vyšetření se provádí ze séra, které se získává odběrem krve do standardních odběrových souprav nebo souprav obsahujících separační gel. Minimální množství séra potřebné pro přípravu vzorku je 150  $\mu$ l.

Vzorky séra jsou stabilní 48 hodin při 2-8°C. Mohou být však skladovány zamražené (< -20°C) po dobu 3 měsíců. Frekvence stanovení je 2x týdně, výsledek vyšetření je považován za pozitivní, je-li hodnota CDT vyšší než 1,9 %. (Bio- Rad, 2009)

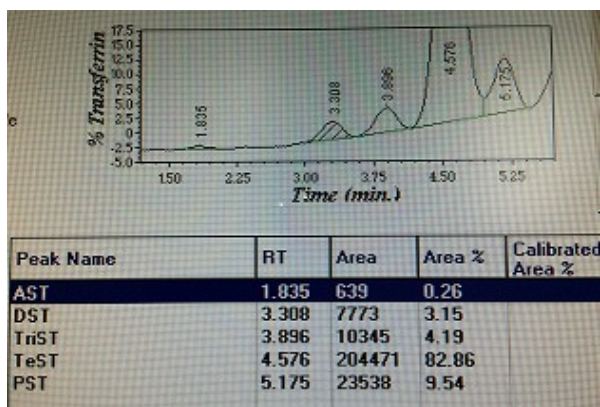
#### 4.1.4. Biologické referenční rozmezí a interpretace výsledků.

Hodnoty CDT do 1,9 % jsou považovány za negativní a nad 1,9 % jsou vyhodnoceny již jako patologické, tzn. cut off = 1,9 %.

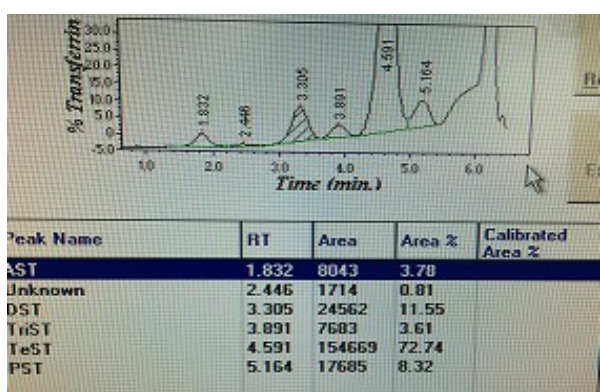
Interval spolehlivosti 95 % byl přepočítán s použitím průměrného kalibračního faktoru z výsledků studie pro rutinní použití kalibrace a pro analyzátor VARIANT firmy Bio-Rad by HPLC platí: interval spolehlivosti nad 95 % (průměr + 2 SD) = 1,90 % CDT. Při interpretaci výsledků slouží jako pomůcka chromatogramy (viz. obr. 6, 7, 8) (Bio- Rad, 2009)



Obr. 6. Chromatogram vzorku s normálním CDT (foto: Barvíková Marcela)



Obr. 7. Chromatogram vzorku se zvýšeným CDT (foto: Barvíková Marcela)



Obr. 8. Chromatogram vzorku s vysokým CDT (foto: Barvíková Marcela)

#### 4.1.5. Kontrola kvality

Kontrola kvality se provádí s každou analytickou sérií. Sada kontrol obsahuje vždy negativní a pozitivní hladinu CDT. Jakmile jsou hodnoty obou kontrol v deklarovaném rozmezí (uvedeno v příbalovém letáku), pokračuje se s analýzou patientských vzorků. Pokud jedna, nebo obě kontroly vyjdou mimo deklarované rozmezí, je nutné zkontrolovat nastavené parametry na přístroji a provedený postup. Po nalezení a opravě předpokládané chyby se znovu připraví kontroly, patientské vzorky a měření kontrol se opakuje. Když jsou hodnoty kontrol v udávaném rozmezí, proměří se vzorky. (Loučka, 2016)

#### 4.1.6. Výpočet

Analyzátor VARIANT firmy Bio-Rad pro stanovení CDT HPLC metodou měří relativní množství jednotlivých izoform transferinu v poměru k celkovému množství transferinu jako % plochy pod píkem. V závislosti na použitém analytickém software jsou procentuální hodnoty jednotlivých izoform vypočítány automaticky.

(Bio- Rad, 2009)

##### 4.1.6.1. Výpočty bez kalibrace

Procentuální hodnota izoform k celkovému transferinu se dá po analýze kontrol a vzorků vypočítat pomocí následující rovnice:

$$\% \text{ asialotransferin (\% AST)} = \frac{\text{plocha píku AST} \times 100}{\text{celková plocha píků (AST+MonoST+DST+TriST+TeST+PeST)}}$$

$$\% \text{ disialotransferin (\% DST)} = \frac{\text{plocha píku DST} \times 100}{\text{celková plocha píků (AST+MonoST+DST+TriST+TeST+PeST)}}$$

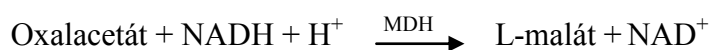
(Bio- Rad, 2009)

#### 4.2. Stanovení AST a GGT na analyzátoru COBAS® 8000 (Roche)

Kvantitativní stanovení AST a GGT v séru bylo prováděno na analyzátoru Cobas 8000, jedná se o modulární analytický systém určený pro velké laboratoře, který integruje klinicko-biochemický modul pracující na principu fotometrie a turbidimetrie. (Hoffmann, 2006)

##### 4.2.1. Stanovení AST na analyzátoru Cobas 8000

Stanovení AST dodržuje doporučení IFCC (International Federation of Clinical Chemistry), bylo ale optimalizováno pro provedení a stabilitu. Přidání pyridoxalfosfátu k metodě způsobuje zvýšení aktivity aminotransferázy a tím předchází falešnému snížení této aktivity ve vzorcích pacientů s nedostatkem endogenního pyridoxalfosfátu (deficit vitamínu B6). AST katalyzuje přenos aminoskupiny mezi L-aspartátem a 2-oxoglutarátem za vzniku oxalacetátu a L-glutamátu. Vzniklý oxalacetát je redukován NADH v přítomnosti MDH (malátdehydrogenázy) na L-malát a NAD<sup>+</sup>. Pyridoxalfosfát slouží jako koenzym při přenosu aminoskupiny v reakci a zajišťuje úplnou aktivaci enzymu. Rychlost oxidace NADH je přímoúměrná katalytické aktivitě AST a je stanovena fotometricky při 340 nm.



(Roche- diagnostics, 2014; Anđelová a Garčic, 2016)

#### 4.2.1.1. Reagencie a pracovní roztoky

Cobas 8000:

- ASTPM (Aspartate Aminotransferase acc. To IFCC with pyridoxal phosphate activation, Roche), 740 testů, kat. č. 05531446
  - Reagencie R1: TRIS pufr: 264 mmol/l, pH 7,8 (37 °C); L-aspartát: 792 mmol/l; LDH (mikroorganismy):  $\geq 24 \mu\text{kat/l}$ ; LDH (mikroorganismy):  $\geq 48 \mu\text{kat/l}$ ; albumin (hovězí): 0,25 %; konzervans
  - Nádobka: Pyridoxalfosfát: 730  $\mu\text{mol/l}$
  - Reagencie R3 = cobas c pack: NADH (kvasinky):  $\geq 1,7 \text{ mmol/l}$ ; 2-oxoglutarát: 94 mmol/l konzervans
  - Pozice C: konzervans
- Calibrátor f.a.s. (Roche, 12 x 3 ml), kat.č. 10759350
- NaCl Diluent 9 % (Roche 119 ml), kat. č. 05172152
- Destilovaná voda
- PreciControl ClinChem Multi 1 (Roche, 20 x 5 ml), kat.č. 05117208
- PreciControl ClinChem Multi 2 (Roche, 20 x 5 ml), kat.č. 05117291

(Roche- diagnostics, 2014)

#### 4.2.1.2. Analytické parametry metody

Byly použity lidské vzorky, kontrolní materiál a údaje výrobce diagnostické soupravy:

- Rozsah měření: 0,08-11,7  $\mu\text{kat/l}$ , vzorky s vyšší aktivitou AST jsou automaticky ředěny analyzátozem 1:10 a výsledky jsou vynásobeny faktorem 10, (automaticky rerun).



- Limit detekce: 0,08  $\mu\text{kat/l}$ . Spodní detekční limit představuje nejnižší měřitelnou hladinu analytu, kterou lze odlišit od nuly. Vypočítá se jako hodnota ležící 3SD nad nejnižším standardem (standard 1 + 3SD, opakovatelnost, n = 21). Hodnoty pod spodním detekčním limitem (< 0,08  $\mu\text{kat/l}$ ) nejsou přístrojem označeny.
- Preciznost byla měřena použitím lidských vzorků a kontrol podle interního protokolu s opakovatelností (n = 21) a mezilehlou precizností (3 alikvoty na sérii, 1 série denně, 21 dní).

Byly získány následující údaje:

Hladina 1	Hladina 2
Průměr: 0,772 $\mu\text{kat/l}$	Průměr: 2,66 $\mu\text{kat/l}$
Opakovatelnost (CV): 2,4 %	Opakovatelnost (CV): 0,6 %
Mezilehlá preciznost (CV): 1,6 %	Mezilehlá preciznost (CV): 0,8 %
(Roche- diagnostics, 2014)	

#### 4.2.1.3. Omezení metody

Mezi nejčastější interferující látky při stanovení AST patří zvýšená koncentrace hemoglobinu (hemolýza), bilirubinu (ikterus) a triacylglycerolů (lipémie). Výrobce ve své dokumentaci uvádí, že hemolýza je bez významných interferencí do hodnoty H indexu 20 (přibližná koncentrace hemoglobinu 12,8  $\mu\text{mol/l}$ ), kontaminace erytrocyty zvýší výsledky, protože hladina analytu v erytrocytech je vyšší než v séru. Lipémie bez významných interferencí do hodnoty L indexu 150, lipemické vzorky mohou způsobit označení > Abs, je nutné na analyzátoru zvolit zacházení s naředěným vzorkem pro (automatický rerun). Ikterus je bez významných interferencí do hodnoty I indexu 60 pro konjugovaný a nekonjugovaný bilirubin (přibližná koncentrace 1026  $\mu\text{mol/l}$ ).

(Roche- diagnostics, 2014)

#### 4.2.2. Stanovení GGT na analyzátoru Cobas 8000

V roce 2002 doporučila IFCC standardizovanou metodu měření GGT, včetně optimalizace koncentrace substrátu, použití NaOH, pufru s glycyglycinem a zahájenou vzorkem. Jedná se kolorimetrický test. GGT přenáší gama-glutamyllovou skupinu L-gama-glutamyl-3-karboxy-4-nitroanilidu na glycyglycin. Množství uvolněného

5-amino-2-nitrobenzoátu bylo přímo úměrné aktivitě GGT ve vzorku. Stanovovalo se fotometricky, měřením nárůstu absorbance.

$$\text{L-}\gamma\text{-glutamyl-3-karboxy-4-nitroanilid} + \text{glycylglycin} \xrightarrow{\text{GGT}} \text{L-}\gamma\text{-glutamyl-glycylglycin} + \text{5-amino-2-nitrobenzoát}$$
  
(Roche- diagnostics, 2014; Andelová a Garčic, 2016)

#### 4.2.2.1. Reagencie a pracovní roztoky

Cobas 8000:

- $\gamma$ -Glutamyltransferase ver.2 GGT-2 (Roche), 1200 testů, kat. č. 05168775
  - Reagencie R1: TRIS: 492 mmol/l; pH 8,25; glycylglycin:492 mmol/l; konzervans; aditiva
  - Reagencie R3: L-gama-glutamyl-3-karboxy-4-nitroanilid: 22,5 mmol/l; acetát: 10 mmol/l; pH 4,5; konzervans; stabilizátor
  - R1 je v pozici B a R3 je v pozici C
- Calibrátor f.a.s. (Roche, 12 x 3 ml), kat. č. 10759350
- NaCl Diluent 9 % (Roche, 119 ml), kat. č. 05172152
- Destilovaná voda
- PreciControl ClinChem Multi 1 (Roche, 20 x 5 ml), kat. č. 05117208
- PreciControl ClinChem Multi 2 (Roche, 20 x 5 ml), kat.č. 05117291

(Roche- diagnostics, 2014)

#### 4.2.2.2. Analytické parametry metody

Údaje od výrobce diagnostické soupravy, byly použity lidské vzorky i kontrolní materiál (n = 21),

- Rozsah měření: 0,05-20,0  $\mu\text{kat/l}$ , vzorky s vyšší koncentrací GGT jsou automaticky ředěny analyzátozem 1:11 (automatický rerun) a výsledky jsou vynásobeny faktorem 11.
- Limit detekce: spodní detekční limit testu je 0,05  $\mu\text{kat/l}$ , jedná se o nejnižší měřitelnou hladinu analytu, kterou lze odlišit od nuly. Hodnoty pod spodním detekčním limitem (< 0,05  $\mu\text{kat/l}$ ) nejsou přístrojem označeny.

- Preciznost byla stanovena použitím lidských vzorků a kontrol podle interního postupu s opakovatelností (n = 21) a mezilehlou precizností (3 alikvoty na sérii, 1 série denně, 21 dní).

Byly získány následující údaje:

Hladina 1	Hladina 2
Průměr: 0,655 $\mu$ kat/l	Průměr: 3,02 $\mu$ kat/l
Opakovatelnost (CV): 1,4 %	Opakovatelnost (CV): 0,5 %
Mezilehlá preciznost (CV): 1,8 %	Mezilehlá preciznost (CV): 1,7 %

(Roche- diagnostics, 2014)

#### 4.2.2.3. Omezení metody

Mezi nejčastější interferující látky při stanovení GGT patří zvýšená koncentrace hemoglobinu (hemolýza), bilirubinu (ikterus) a triacylglycerolů (lipémie). Výrobce ve své dokumentaci uvádí, že hemolýza vzorku je bez významných interferencí do hodnoty H indexu 200 (přibližná koncentrace hemoglobinu 124  $\mu$ mol/l). U lipémie bez významných interferencí do hodnoty L indexu 700, mezi L indexem (odpovídá zákalu) a koncentrací triglyceridů je slabá korelace. V případě ikteru také uvádí bez významných interferencí do hodnoty I indexu 50 pro konjugovaný a 20 pro nekonjugovaný bilirubin (přibližná koncentrace konjugovaného bilirubinu je 855  $\mu$ mol/l a přibližná koncentrace nekonjugovaného bilirubinu je 342  $\mu$ mol/l). Při terapeutických koncentracích nebyla při použití běžných panelů léků zjištěna žádná interference.

(Roche- diagnostics, 2014)

#### 4.2.3. Odběr a stabilita vzorků

Pro obvyklé vyšetřování je vhodný odběr ráno nalačno. Speciální příprava pacienta před odběrem žilní krve není nutná, stanovení ovlivňuje dieta, alkohol, hematokrit, teplota, místo vpichu odběrové jehly. Důležité je používání vhodné zkumavky, stanovení lze provést v séru nebo plazmě. Sérum nesmí být hemolytické, plazmu lze použít Li- heparin nebo K2 EDTA. Před analýzou je nutná centrifugace. (Kvasnicová, 2007)

#### 4.2.4. Očekávané hodnoty, referenční intervaly

AST – podle IFCC/Standard Metod 94 s aktivací pyridoxalfosfátem při 37°C

- Muži: 15 - 100 let      0,17 - 0,85  $\mu\text{kat/l}$
- Ženy: 15 - 100 let      0,17 - 0,60  $\mu\text{kat/l}$
- Děti: 0 - 2 měsíce      0,38 - 1,21  $\mu\text{kat/l}$ 
  - 2 měsíce - 1 rok      0,27 - 0,97  $\mu\text{kat/l}$
  - 1 - 15 let      0,2 - 0,63  $\mu\text{kat/l}$  (Roche- diagnostics, 2014)

GGT – standardizováno podle IFCC

- Muži: 15 - 100 let      0,17 - 1,19  $\mu\text{kat/l}$
- Ženy: 15 - 100 let      0,10 - 0,70  $\mu\text{kat/l}$
- Děti: 0 - 2 měsíce      0,37 - 3,00  $\mu\text{kat/l}$ 
  - 2 měsíce - 1 rok      0,10 - 1,04  $\mu\text{kat/l}$
  - 1 - 15 let      0,10 - 0,39  $\mu\text{kat/l}$  (Roche- diagnostics, 2014)

#### 4.2.5. Kontrola kvality

V procesu vnitřní kontroly kvality se používají kontrolní materiály PreciControl ClinChem multi 1 a 2 (fyziologická a patologická kontrola), naměřené hodnoty by se měly pohybovat v deklarovaných hodnotách, které jsou uvedeny v příbalovém letáku a automaticky převedeny z Cobas Link. Kontrola kvality je stanovována denně, vždy před zahájením rutinního provozu – na dvou koncentračních hladinách, dále vždy po kalibraci, výměně reagensů a servisním zásahu. (Roche- diagnostics, 2014; Andelová a Garčic, 2016)

#### 4.2.6. Výpočet

System Cobas 8000 automaticky vypočítá katalytickou aktivitu GGT-2, ASTPM u každého vzorku (převodní faktor je  $U/L \times 0,0167 = 0,67\mu\text{kat/l}$ ). (Roche- diagnostics, 2014)

## **5. VÝSLEDKY**

### **5.1. Validace**

V klinických laboratořích se většinou používají validované metody, které jsou produkovány výrobcem in vitro diagnostik- medical device v souladu se Směrnicí IVD 98/79 EC (IVD MD). Validace potvrzuje, že měřicí postup/ systém je na dostatečné úrovni měření, postupy měření jsou korektní s řádně provedenou kalibrací. Laboratoř provádí validaci jen u metod, které vypracovali pracovníci laboratoře nebo dojde-li k modifikaci již validovaných metod. Klinická laboratoř musí používat jen validované metody.

### **5.2. Verifikace**

Verifikace je proces ověřování, zda je laboratoř schopna dosáhnout při zavádění a používání již validovaných metod deklarovanou výkonnost metody a že měřicí postup/ systém výrobek IVD MD je v konkrétní laboratoři plně funkční. V klinické laboratoři se verifikují všechny metody a postupy měření. Cílem verifikace je dokázat, že je laboratoř schopná dosáhnout výkonnostních parametrů, které výrobce uvádí ve své dokumentaci. Mezi základní ukazatele verifikace patří opakovatelnost, vychýlení (bias), mezilehlá preciznost a relativní kombinovaná nejistota měření.

#### **5.2.1. Opakovatelnost a vychýlení (bias)**

Opakovatelnost byla stanovena analýzou referenčních materiálů, které byly použity v programu EHK a jejich součástí byly referenční hodnoty analytů a jejich nejistoty.

Vychýlení metody (bias) udává rozdíl mezi průměrnou hodnotou výsledků měření a referenční hodnotou udanou výrobcem.

Pro stanovení opakovatelnosti a vychýlení metody bylo provedeno 10 měření v dekapletech nízké (Level I), vysoké (Level II) kontroly pro stanovení CDT a kontrolních vzorků (AKS 4354, AKS 4352) pro AST a GGT, poté byly výsledné hodnoty srovnány s parametry uvedenými výrobcem. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tab. 3, 7, 11, stanovená opakovatelnost pro dekaplety je zaznamenána v tab. 4, 8, 12. Opakovatelnost uváděná výrobcem Bio-Rad je uvedena v tab. 5 a firmy Roche

v tab. 9, 13. Zjištěné hodnoty vychýlení metody i hodnoty udávané výrobcí jsou uvedeny v tab. 6, 10, 14.

**Tab. 3. Naměřené hodnoty Level I, Level II při měření opakovatelnosti metody pro stanovení CDT.**

<b>Level I</b>	1,39	1,39	1,38	1,31	1,48	1,43	1,29	1,23	1,34	1,3
<b>Level II</b>	3,37	3,43	3,38	3,31	3,46	3,37	3,33	3,39	3,28	3,3

**Tab. 4. Opakovatelnost metody stanovení CDT na analyzátoru VARIANT by HPLC pro vzorek Level I, II.**

<b>Označení kontroly</b>	<b>Aritmetický průměr (AM)</b>	<b>Směrodatná odchylka (SD)</b>	<b>Variační koeficient VK (%)</b>
CDT Level I	1,35	0,01	<b>5,5</b>
CDT Level II	3,36	0,06	<b>1,7</b>

**Tab. 5. Opakovatelnost metody stanovení CDT uváděná výrobcem Bio-Rad.**

<b>Označení kontroly</b>	<b>Aritmetický průměr (AM)</b>	<b>Variační koeficient VK (%)</b>
hladina I	1,29	<b>5,97</b>
hladina II	6,39	<b>3,65</b>

Opakovatelnost metody CDT vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka vyšla pro negativní kontrolu (level I) 5,5 %, pro pozitivní kontrolu (level II) 1,7 %. Výsledek negativní kontroly téměř koresponduje s hodnotou udanou výrobcem. V případě pozitivní kontroly se od hodnoty výrobce liší, což je pravděpodobně způsobeno odlišnou hodnotou % CDT (level I = 3,36 % a hladina II = 6,39 % CDT).

**Tab. 6. Vychýlení metody stanovení CDT na analyzátoru VARIANT by HPLC pro vzorek Level I, II.**

	<b>Hodnoty výrobce</b>	<b>Zjištěné hodnoty</b>	<b>Bias (%)</b>
CDT- Level I	1,4	1,35	<b>-3,3</b>
CDT- Level II	3,5	3,36	<b>-3,9</b>

Vychýlení metody (bias) pro negativní kontrolu (level I) je pouze -3,3 % a pro pozitivní kontrolu (level II) -3,9 %, námi naměřené hodnoty jsou velmi podobné hodnotám výrobce.

**Tab. 7. Naměřené hodnoty AKS 4354, AKS 4352 při měření opakovatelnosti metody pro stanovení AST.**

AKS 4352	1,6	1,58	1,6	1,6	1,62	1,6	1,6	1,64	1,59	1,56
AKS 4354	2,99	2,98	3	3,03	3,04	3,03	3,04	3,05	3,04	3,09

**Tab. 8. Opakovatelnost metody stanovení enzymatické aktivity AST na analyzátoru Cobas 8000 pro vzorek AKS 4352, 4354.**

Označení kontroly	Aritmetický průměr (AM)	Směrodatná odchylka (SD)	Variační koeficient VK (%)
AST AKS 4352	1,6	0,02	2,2
AST AKS 4354	3,03	0,03	2,22

**Tab. 9. Opakovatelnost metody stanovení enzymatické aktivity AST uvedena výrobcem.**

Označení kontroly	Aritmetický průměr (AM)	Variační koeficient VK (%)
hladina I	0,772	2,4
hladina II	2,66	0,6

Variační koeficient stanovený za podmínek opakovatelnosti vyšel pro kontrolu s nižší hladinou 2,2 %, téměř shodně jako u výrobce. U kontroly s vyšší hladinou vyšel variační koeficient 2,22 % což je vyšší, než deklaruje výrobce.

**Tab. 10. Vychýlení metody stanovení enzymatické aktivity AST na analyzátoru Cobas 8000 pro vzorek AKS 4352, 4354.**

	Hodnoty výrobce	Zjištěné hodnoty	Bias (%)
AST- AKS 4352	1,804	1,6	-11,4
AST- AKS 4354	3,412	3,03	-11,2

**Tab. 11. Naměřené hodnoty AKS 4354, AKS 4352 při měření opakovatelnosti metody pro stanovení GGT.**

AKS 4352	2,6	2,58	2,6	2,59	2,61	2,58	2,6	2,56	2,56	2,58
AKS 4354	2,73	2,77	2,76	2,74	2,76	2,77	2,76	2,78	2,78	2,73

**Tab. 12. Opakovatelnost metody stanovení enzymatické aktivity GGT na analyzátoru Cobas 8000 pro vzorek AKS 4352, 4354.**

Označení kontroly	Aritmetický průměr (AM)	Směrodatná odchylka (SD)	Variační koeficient VK (%)
GGT AKS 4352	2,59	0,02	2,5
GGT AKS 4354	2,46	0,02	2,54

**Tab. 13. Opakovatelnost metody stanovení enzymatické aktivity GGT uvedena výrobcem.**

Označení kontroly	Aritmetický průměr (AM)	Variační koeficient VK (%)
hladina I	0,655	1,4
hladina II	3,02	0,5

Variační koeficient stanovený za podmínek opakovatelnosti vyšel vyšší, než deklaruje výrobce. Pro měření nebyl k dispozici vzorek s nízkou hladinou, proto byly použity dva téměř shodné kontrolní materiály.

**Tab. 14. Vychýlení metody stanovení enzymatické aktivity GGT na analyzátoru Cobas 8000 pro vzorek AKS 4352, 4354.**

	Hodnoty výrobce	Zjištěné hodnoty	Bias (%)
GGT- AKS 4352	2,877	2,59	-10,1
GGT- AKS 4354	3,069	2,877	-10,1



### 5.2.2. Mezilehlá preciznost

Mezilehlá preciznost vyjadřuje proměnlivost uvnitř laboratoře. Měření bylo provedeno stejnou metodou, na stejném místě, za delší časové období. Mezilehlá preciznost byla stanovena analýzou referenčních materiálů. Během 20 měření se opět sledovaly negativní (Level I) a pozitivní (Level II) kontroly pro CDT (tab. 15) a kontrolní vzorky (PCC1 a PCC2) pro AST (tab. 18) a GGT (tab. 21). Z naměřených výsledků a jejich rozptylů byly vypočítány hodnoty mezilehlé preciznosti, které jsou uvedeny v tab. 16, 19, 22. Tyto hodnoty byly porovnány s údaji uvedenými výrobcem, které jsou zaznamenány v tab. 17, 20, 23.

**Tab. 15. Naměřené hodnoty Level I, Level II při měření mezilehlé preciznosti metody stanovení CDT.**

<b>Level I</b>	1,35	1,33	1,03	1,25	1,25	1,23	1,49	1,24	1,25	1,29
	1,13	1,25	1,45	1,14	1,29	1,43	1,39	1,25	1,41	1,35
<b>Level II</b>	3,24	3,46	3,38	3,09	3,16	3,54	3,58	3,18	3,16	3,21
	3,31	3,46	3,35	3,36	3,4	3,35	3,33	3,53	3,59	3,51

**Tab. 16. Mezilehlá preciznost stanovení CDT na analyzátoru VARIANT pro vzorek Level I a Level II.**

<b>Označení kontroly</b>	<b>Aritmetický průměr (AM)</b>	<b>Směrodatná odchylka (SD)</b>	<b>Variační koeficient VK (%)</b>
CDT Level I	1,29	0,11	<b>8,9</b>
CDT Level II	3,36	0,15	<b>4,5</b>

**Tab. 17. Mezilehlá preciznost CDT uvedena výrobcem Bio-Rad.**

<b>Označení kontroly</b>	<b>Aritmetický průměr (AM)</b>	<b>Variační koeficient VK (%)</b>
CDT Level I	1,29	<b>4,27</b>
CDT Level II	6,39	<b>2,01</b>

Námi zjištěné hodnoty mezilehlé preciznosti jsou u negativní kontroly (level I) 8,9 % a pozitivní kontroly (level II) 4,5 %. Tyto hodnoty se od hodnot uvedených výrobcem

liší, což může být v případě pozitivní kontroly způsobeno odlišnou hodnotou udanou výrobcem. Pravděpodobně se jedná o jednu z příčin vyšší relativní kombinované nejistoty měření.

**Tab. 18. Naměřené hodnoty PCCC1, PCCC2 při měření mezilehlé preciznosti metody stanovení enzymatické aktivity AST.**

<b>PCCC1</b>	2,23	2,23	2,21	2,23	2,32	2,2	2,21	2,22	2,18	2,21
	2,38	2,2	2,2	2,22	2,21	2,21	2,19	2,2	2,18	2,18
<b>PCCC2</b>	0,75	0,74	0,78	0,69	0,76	0,72	0,73	0,71	0,76	0,75
	0,74	0,74	0,72	0,74	0,73	0,74	0,73	0,7	0,71	0,7

**Tab. 19. Mezilehlá preciznost metody stanovení enzymatické aktivity AST na analyzátoru Cobas 8000 pro vzorek PCCC1, PCCC2.**

<b>Označení kontroly</b>	<b>Aritmetický průměr (AM)</b>	<b>Směrodatná odchylka (SD)</b>	<b>Variační koeficient VK (%)</b>
AST- PCCC1	0,73	0,02	<b>3,1</b>
AST- PCCC2	2,22	0,05	<b>2,2</b>

**Tab. 20. Mezilehlá preciznost při stanovení enzymatické aktivity AST uvedena výrobcem.**

<b>Označení kontroly</b>	<b>Aritmetický průměr (AM)</b>	<b>Variační koeficient VK (%)</b>
AST- PCCC1	0,772	<b>1,6</b>
AST- PCCC2	2,66	<b>0,8</b>

**Tab. 21. Naměřené hodnoty PCCC1, PCCC2 při měření mezilehlé preciznosti metody stanovení enzymatické aktivity GGT.**

<b>PCCC1</b>	0,81	0,82	0,82	0,81	0,82	0,79	0,79	0,81	0,81	0,79
	0,83	0,81	0,8	0,79	0,8	0,8	0,8	0,79	0,82	0,82
<b>PCCC2</b>	3,33	3,36	3,42	3,37	3,41	3,34	3,35	3,38	3,39	3,36
	3,57	3,35	3,38	3,39	3,37	3,35	3,35	3,32	3,41	3,37

**Tab. 22. Mezilehlá preciznost metody stanovení enzymatické aktivity GGT na analyzátoru Cobas 8000 pro vzorek PCCC1, PCCC2.**

<b>Označení kontroly</b>	<b>Aritmetický průměr (AM)</b>	<b>Směrodatná odchylka (SD)</b>	<b>Variační koeficient VK (%)</b>
GGT- PCCC1	0,81	0,01	<b>0,6</b>
GGT- PCCC2	3,38	0,05	<b>1,5</b>

**Tab. 23. Mezilehlá preciznost při stanovení enzymatické aktivity GGT uvedena výrobcem.**

<b>Označení kontroly</b>	<b>Aritmetický průměr (AM)</b>	<b>Variační koeficient VK (%)</b>
GGT- PCCC1	0,655	<b>1,8</b>
GGT- PCCC2	3,02	<b>1,7</b>

### 5.2.3. Nejistota měření

K určení rozšířené kombinované relativní nejistoty měření byla použita pomůcka (webový kalkulač) nacházející se na [www.sekk.cz](http://www.sekk.cz), která umožňuje automatické vypočítání této nejistoty po dosazení hodnot opakovatelnosti a mezilehlé preciznosti. Rozšířené kombinované relativní nejistoty měření byly určeny pro obě hladiny měřených vzorků, jak pro stanovení CDT na analyzátoru VARIANT, tak k určení enzymatické aktivity AST a GGT na analyzátoru Cobas 8000.

Rozšířená kombinovaná relativní nejistota měření byla stanovena pro CDT Level I (Bio-Rad) s hodnotou 18 % a CDT Level II (Bio-Rad) s hodnotou 9,9 %. Zdrojem této relativní kombinované nejistoty mohou být chyby v procesu měření. Může se jednat o chybu operátora, zaokrouhlování výsledků měření, nebo také vliv prostředí. Externí

hodnocení kvality (mezinárodní organizace Instand, Německo) proběhlo úspěšně, povolený maximálně přijatelný rozdíl v % je 30. Metoda je vhodná pro laboratoř LKB OIM.

Rozšířená kombinovaná relativní nejistota měření u enzymu AST byla stanovena na PCCC1 (0,76  $\mu$ kat/l) s hodnotou 14 % a na PCCC2 (2,32  $\mu$ kat/l) s hodnotou 13 %. Velikost rozšířené kombinované relativní nejistoty je vyhovující vzhledem k požadavkům EHK SEKK s.r.o. ( $D_{\max}=15\%$ ). Externí hodnocení kvality proběhlo úspěšně. Metoda je vhodná ke klinickému použití.

Rozšířená kombinovaná relativní nejistota měření enzymatické aktivity GGT byla stanovena na PCCC1 (0,86  $\mu$ kat/l) s hodnotou 12 % a na PCCC2 (3,59  $\mu$ kat/l) s hodnotou 12 %. Externí hodnocení kvality proběhlo úspěšně, velikost rozšířené kombinované relativní nejistoty je vyhovující vzhledem k požadavkům EHK SEKK s.r.o. ( $D_{\max}=15\%$ ). Metoda je vhodná ke klinickému použití.

#### **5.2.4. Pracovní rozsah**

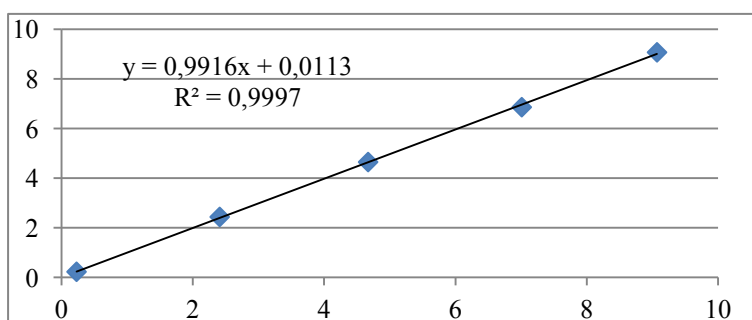
Pracovní rozsah měření vymezuje interval v němž lze bezpečně očekávat, že platí výrobcem/ laboratoří deklarované a validačními experimenty ověřené hodnoty preciznosti a vychýlení metody.

Pracovní rozsah metody stanovení CDT nebyl vzhledem k absenci biologického materiálu s vysokou hodnotou CDT ověřen.

Pro ověření pracovního rozsahu metody stanovení enzymatické aktivity AST a GGT bylo změřeno pět vzorků v tripletech, kdy první vzorek měl hodnotu blízkou hodnotě LoQ (mez stanovitelnosti) a poslední vzorek hodnotu blízkou horní hranici pracovního rozsahu. Ze získaných výsledků měření se vypočetl průměr a výtěžnost (tab. 24, 25). Výtěžnosti dosažené u jednotlivých vzorků (R v %) se vypočítají podle vztahu:  $R = 100 \times (\text{výsledek měření} / \text{teoretická hodnota})$ . Závislost průměrů změřených hodnot na teoretických známých hodnotách je vyhodnocena graficky metodou lineární regrese (graf 1,2).

**Tab. 24. Pracovní rozsah metody stanovení enzymatické aktivity AST na analyzátoru Cobas 8000 (výťažnost v intervalu 97,9 – 101,2 %)**

Pracovní rozsah		Ř.č.1	Ř.č.2	Ř.č.3	Ř.č.4	Ř.č.5
Testovaný vzorek	sérum					
Počet měření (n)		3	3	3	3	3
Průměrná hodnota	μkat/l	0,23	2,41	4,67	7,01	9,07
Teoretická hodnota	μkat/l	0,23	2,44	4,65	6,86	9,07
Výpočet R (%)		100	101,2	99,6	97,9	100



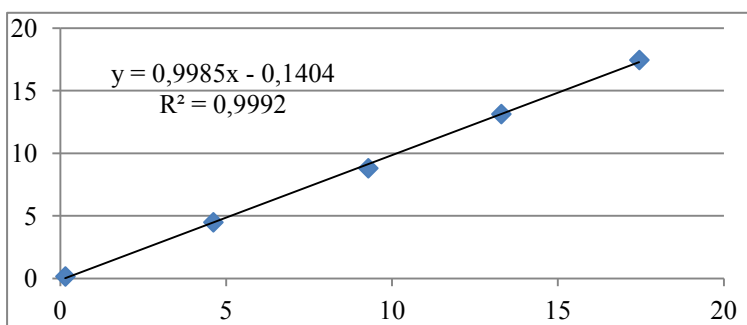
Osa x představuje teoretické známé hodnoty AST v μkat/l

Osa y představuje hodnoty průměrů měřených hodnot AST v μkat/l

**Graf 1. Závislost průměrů naměřených a známých hodnot AST**

**Tab. 25. Pracovní rozsah metody stanovení enzymatické aktivity GGT na analyzátoru Cobas 8000 (výťažnost v intervalu 94,8 – 98,8 %)**

Pracovní rozsah		Ř.č.1	Ř.č.2	Ř.č.3	Ř.č.4	Ř.č.5
Testovaný vzorek	sérum					
Počet měření (n)		3	3	3	3	3
Průměrná hodnota	μkat/l	0,15	4,61	9,28	13,29	17,45
Teoretická hodnota	μkat/l	0,15	4,48	8,8	13,13	17,45
Výpočet R (%)		100	97,2	94,8	98,8	100



Osa x představuje teoretické známé hodnoty GGT v  $\mu\text{kat/l}$

Osa y představuje hodnoty průměrů měřených hodnot GGT v  $\mu\text{kat/l}$

## Graf 2. Závislost průměrů naměřených a známých hodnot GGT

### 5.3. Implementace naměřených dat z verifikací (výsledky rozšířených kombinovaných relativních nejistot měření) na reálné vzorky pacientů podle CDT

**Př.1:** Muž 60 let, dg. K746, změřeno CDT 0,8 %, AST = 1,32  $\mu\text{kat/l}$ , GGT = 7,71  $\mu\text{kat/l}$ . Byla naměřena hodnota CDT 0,8 % (rozšířená kombinovaná relativní nejistota u fyziologické hodnoty byla 18 %.) Výsledek CDT 0,8 % může tedy oscilovat od 0,7- 0,9 %. Tato změna není klinicky významná.

**Př.2:** Muž 45 let, dg. K768, změřeno CDT 2,0 %, AST = 0,53  $\mu\text{kat/l}$ , GGT = 8,05  $\mu\text{kat/l}$ . Byla naměřena hodnota CDT 2,0 % (rozšířená kombinovaná relativní nejistota byla 18 %). Výsledek se může pohybovat od 1,6 – 2,36 %. Vzhledem k tomu, že by rozšířená kombinovaná relativní nejistota měření měla být vždy součástí výsledku, tak je tato změna klinicky významná, protože nám nabízí výsledek negativní i pozitivní (cut off = 1,9 %).

**Př.3:** Žena 64 let, dg. K760, změřeno CDT 1,8 %, AST = 0,45  $\mu\text{kat/l}$ , GGT = 0,54  $\mu\text{kat/l}$ . Hodnota CDT = 1,8 % (rozšířená kombinovaná relativní nejistota byla 18 %). Výsledek se může pohybovat od 1,48 – 2,12 %. Opět klinicky významná změna, protože výsledek z analyzátoru byl negativní, ale po přidání rozšířené kombinované relativní nejistoty může být i pozitivní.

**Př.4:** Muž 74 let, dg. K703, změřeno CDT 4,5 %, AST = 0,46  $\mu$ kat/l, GGT = 0,25  $\mu$ kat/l. Hodnota CDT 4,5 % (rozšířená kombinovaná relativní nejistota u vyšší hodnoty je 9,9 %). Výsledek CDT 4,5 % může oscilovat od 4,05 – 4,95 %. Výsledek byl pořád pozitivní, takže změna není klinicky významná.

Hodnota CDT ukazuje na abúzus alkoholu, ale hodnoty AST i GGT jsou ve fyziologickém rozmezí. Z důvodu delšího vzestupu hodnot enzymů při chronickém užívání alkoholu je spolehlivějším ukazatelem CDT.

## 6. DISKUSE

V této bakalářské práci jsem provedla verifikaci metod u markerů, které se používají při stanovení abúzu alkoholu. Na otázku „ proč je nutná validace a verifikace?“ lze odpovědět jednoduše. Výsledky analytických měření v klinické laboratoři mohou mít silný dopad při léčbě pacienta. Nepřesné a špatné vyšetření může fatálním způsobem ovlivnit zdraví, kvalitu života, ale i samotný život pacienta. Proto je profesionální povinností každého analytika provádět měření o dostatečné kvalitě, které lze dosáhnou pravidelnou validací a verifikací systémů a metod stanovení. Validace a verifikace je činnost, která při správném provedení zajišťuje laboratoři kvalitu dat při rutinním provozu a poskytuje potřebná data pro odhad rozšířené kombinované relativní nejistoty měření.

Pro vyhodnocení analytické kvality laboratorních markerů byla provedena řádná verifikace metody podle doporučení ČSKB. Základními parametry byly: opakovatelnost pro stanovení CDT a enzymů AST, GGT včetně vychýlení metody, dále byla u těchto metod provedena mezilehlá preciznost a v případě enzymatické aktivity AST a GGT byl ověřen i pracovní rozsah, jehož výtěžnost byla pro AST v intervalu 97,9 - 101,2 % a GGT v intervalu 94,8 – 98,8 %. Tyto naměřené hodnoty jsem porovnávala s údaji, které uvádí výrobce v příbalovém letáku. Variační koeficienty interní kontroly kvality stanovené za podmínek opakovatelnosti, příp. mezilehlé preciznosti imitovaly výstupy výrobce diagnostické soupravy uvedené v aktuálních příbalových letácích, u některých byly zjištěny odchylky publikované výrobcem (uvedeno v kapitole výsledky).

K výpočtu rozšířené kombinované relativní nejistoty měření jsem použila pomůcku (webový kalkulátor), která je přístupná na [www.sekk.cz](http://www.sekk.cz) a po dosazení zjištěných hodnot opakovatelnosti a mezilehlé preciznosti automaticky vypočítá rozšířenou kombinovanou relativní nejistotu vyjádřenou v %. Rozšířená kombinovaná relativní nejistota měření u CDT vyšla vyšší než jsem předpokládala, ale je nižší než maximální povolená odchylka, která představuje přijatelný povolený rozdíl v %, metoda je tedy vhodná ke stanovení. Stejně je tomu i v případě AST a GGT.

Hodnota rozšířené kombinované relativní nejistoty měření by měla být součástí výsledku a hraje významnou roli, pokud se jedná o výsledek v nějaké mezní hodnotě. V případě CDT se jedná o hodnotu 1,9 % (cut off). Je důležité, aby byla rozšířená kombinovaná relativní nejistota měření co nejnižší, proto jsem doporučila její snížení.



Snížení lze dosáhnout odstraněním chyb, které celý proces analýzy zatěžují. Mohou to být náhodné chyby, které nelze úplně odstranit. Jedná se o náhodné změny (otřesy, změna teploty, tlaku vzduchu). Co můžeme ovlivnit, jsou soustavné (systematické) chyby, jako je například přesnost měřicího přístroje, metody. Vysoká rozšířená kombinovaná relativní nejistota měření, která se týká stanovení CDT, mohla vzniknout větším rozdílem variačního koeficientu při měření mezilehlé preciznosti a variačního koeficientu udávaného výrobcem. Tento rozdíl může být způsoben použitím analytické kolony s jinou výrobní šarží. V minulosti již byly zaznamenány výkyvy měřených hodnot kontrolního materiálu při používání různých šarží analytických kolon. Výrobce nedokáže zajistit dostatečnou reprodukovatelnost výroby těchto kolon, které se mění po 600 nástřicích a při použití stejné šarže reagenčního kitu a analytické kolony s jinými analytickými vlastnostmi může dojít ke změně výsledků kontrol, které ovšem vychází v deklarovaném rozmezí.

Obdobné závěry lze aplikovat na interpretaci závěrů verifikačního šetření stanovení katalytické aktivity AST, GGT. Situaci komplikuje fakt, že v případě stanovení enzymů se jedná o vyšetření prováděná na uzavřeném analytickém systému, jejímž jediným požadavkem je striktní dodržování doporučené frekvence kalibrace a provádění vnitřní kontroly kvality, včetně evidování doporučené stability reagentie na palubě analyzátoru.

## 7. ZÁVĚR

Předkládaná bakalářská práce byla zaměřena na problematiku analytické kvality stanovení laboratorních markerů chronického abúzu alkoholu a to především na kvantitativní stanovení CDT, enzymů AST a GGT v krevní cirkulaci. Provedením řádné verifikace metod byly vyhodnoceny základní parametry dle doporučení ČSKB: po stanovení opakovatelnosti, mezilehlé preciznosti, vychýlení metody a v případě enzymů ověření pracovního rozsahu jsem porovnála výsledky s údaji výrobců diagnostických souprav uvedených v příbalových letácích. Diskrepantní nálezy interpretovány v diskuzní části.

Z naměřených hodnot, jsem vypočítala rozšířené kombinované relativní nejistoty měřených analytů, které jsou vyhovující vzhledem k požadavkům národních i mezinárodních organizátorů systému externího hodnocení kvality v rutinních klinických laboratořích. EHK SEKK s.r.o. ( $D_{\max} = 15 \%$ ) v případě enzymatické aktivity AST a GGT. Pro metodu stanovení CDT je dominujícím organizátorem společnost Instand ( $D_{\max} = 30 \%$ ). Výše uvedené závěry verifikačních šetření splňují náležitosti doporučení ČSKB a jsou tedy vhodná k rutinnímu klinickému užívání.

## 8. ZKRATKY

ALP	alkalická fosfatáza
ALT	alaninaminotransferáza
AM	aritmetický průměr
AST	aspartátaminotransferáza
CDG	karbohydrát-deficientní glykoprotein
CDT	karbohydrát-deficientní transferin
CE	kapilární elektroforéza
CO <sub>2</sub>	oxid uhličitý
CV	variační koeficient
ČSKB	česká společnost klinické biochemie
D <sub>max</sub>	maximální povolená odchylka
EHK	externí kontrola kvality
EtG	ethylglukuronid
EtSt	ethylsulfát
GABA	kyselina gama-aminomáselná
GGT	gamaglutamyltransferáza
HGB	hemoglobin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HTC	hematokrit
IF	izoelektrická fokusace
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry
IgA	imunoglobulin třídy A
IVD MD	in vitro diagnostik medical device
LIS	laboratorní informační systém
LKB	laboratoř klinické biochemie

LKM-1	protilátky proti mikrozomům
MCV	střední objem erytrocytu
MDH	malátdehydrogenáza
NAD <sup>+</sup>	oxidovaný nikotinamidadeninukleotid
NADH	redukováný nikotinamidadeninukleotid
O <sub>2</sub>	kyslík
OIM	oddělení instrumentálních metod
PCCC	Preci Control Clin Chem
pI	izoelektrický bod
RBC	počet erytrocytů
RIA	radioimunoanalýza
SD	směrodatná odchylka
SEKK	system externí kontroly kvality
SOP	standardní operační postup
TEa	celková povolená chyba
TIA	imunoturbidimetrie
USG	ultrasonografie
VKK	vnitřní kontrola kvality

## 9. SEZNAM TABULEK

<b>Tab.1.</b> Screening abúzu alkoholu .....	19
<b>Tab.2.</b> Časové intervaly laboratorních markerů při chronickém abúzu a v období abstinence .....	19
<b>Tab.3.</b> Naměřené hodnoty Level I, Level II při měření opakovatelnosti metody pro stanovení CDT .....	38
<b>Tab.4.</b> Opakovatelnost metody stanovení CDT na analyzátoru VARIANT by HPLC pro vzorek Level I, II .....	38
<b>Tab.5.</b> Opakovatelnost metody stanovení CDT uváděná výrobcem Bio-Rad.....	38
<b>Tab.6.</b> Vychýlení metody stanovení CDT na analyzátoru VARIANT by HPLC pro vzorek Level I, II.....	38
<b>Tab.7.</b> Naměřené hodnoty AKS 4354, AKS 4352 při měření opakovatelnosti metody pro stanovení AST .....	39
<b>Tab.8.</b> Opakovatelnost metody stanovení enzymatické aktivity AST na analyzátoru Cobas 8000 pro vzorek AKS 4352, 4354 .....	39
<b>Tab.9.</b> Opakovatelnost metody stanovení enzym. aktivity AST uvedena výrobcem.....	39
<b>Tab.10.</b> Vychýlení metody stanovení enzymatické aktivity AST na analyzátoru Cobas 8000 pro vzorek AKS 4352, 4354.....	39
<b>Tab.11.</b> Naměřené hodnoty AKS 4354, AKS 4352 při měření opakovatelnosti metody pro stanovení GGT .....	40
<b>Tab.12.</b> Opakovatelnost metody stanovení enzymatické aktivity GGT na analyzátoru Cobas 8000 pro vzorek AKS 4352, 4354 .....	40
<b>Tab.13.</b> Opakovatelnost metody stanovení enzymatické aktivity GGT uvedena výrobcem.....	40
<b>Tab.14.</b> Vychýlení metody stanovení enzymatické aktivity GGT na analyzátoru Cobas 8000 pro vzorek AKS 4352, 4354.....	40

<b>Tab.15.</b> Naměřené hodnoty Level I, Level II při měření mezilehlé preciznosti metody stanovení CDT .....	41
<b>Tab.16.</b> Mezilehlá preciznost stanovení CDT na analyzátoru VARIANT pro vzorek Level I a Level II .....	41
<b>Tab.17.</b> Mezilehlá preciznost CDT uvedena výrobcem Bio-Rad.....	41
<b>Tab.18.</b> Naměřené hodnoty PCCC1, PCCC2 při měření mezilehlé preciznosti metody stanovení enzymatické aktivity AST .....	42
<b>Tab.19.</b> Mezilehlá preciznost metody stanovení enzymatické aktivity AST na analyzátoru Cobas 8000 pro vzorek PCCC1, PCCC2 .....	42
<b>Tab.20.</b> Mezilehlá preciznost při stanovení enzymatické aktivity AST uvedena výrobcem.....	42
<b>Tab.21.</b> Naměřené hodnoty PCCC1, PCCC2 při měření mezilehlé preciznosti metody stanovení enzymatické aktivity GGT .....	43
<b>Tab.22.</b> Mezilehlá preciznost metody stanovení enzymatické aktivity GGT na analyzátoru Cobas 8000 pro vzorek PCCC1, PCCC2 .....	43
<b>Tab.23.</b> Mezilehlá preciznost při stanovení enzymatické aktivity GGT uvedena výrobcem.....	43
<b>Tab.24.</b> Pracovní rozsah metody stanovení enzymatické aktivity AST na analyzátoru Cobas 8000 .....	45
<b>Tab.25.</b> Pracovní rozsah metody stanovení enzymatické aktivity GGT na analyzátoru Cobas 8000 .....	45

## 10. SEZNAM GRAFŮ

<b>Graf 1.</b>	Závislost průměrů naměřených a známých hodnot AST .....	45
<b>Graf 2.</b>	Závislost průměrů naměřených a známých hodnot GGT .....	46

## 11. SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obr. 1.</b>	Struktura hlavních izoform sérového transferinu .....	20
<b>Obr. 2.</b>	Schematická struktura CDT .....	21
<b>Obr. 3.</b>	Elektroforeogram analýzy CDT .....	23
<b>Obr. 4.</b>	Analyzátor VARIANT firmy Bio – Rad .....	25
<b>Obr. 5.</b>	Chromatogram hemolytického vzorku .....	28
<b>Obr. 6.</b>	Chromatogram vzorku a normálním CDT .....	29
<b>Obr. 7.</b>	Chromatogram vzorku se zvýšeným CDT .....	30
<b>Obr. 8.</b>	Chromatogram vzorku s vysokým CDT .....	30

## 12. POUŽITÁ LETERATURA

**ANDELOVÁ, K., et al.** (2011). Laboratorní příručka. *Www.spadia.cz* [online]. Český Těšín: Distrimed, 2011 [cit. 2017-06-24]. Dostupné z: <https://virtuallab.medivis.cz/laboratorni-prirucka.aspx>

**ANDELOVÁ, K., L. GARČIC.** (2016). *Stanovení katalytické aktivity aspartátaminotransferázy (AST) fotometrickou metodou*. Ostrava, 2016 (5). Standardní operační postup. Diagnost. Lab. Spadia

**ANDELOVÁ, K., L. GARČIC.** (2016). *Stanovení katalytické aktivity  $\gamma$ -glutamyltransferázy (GGT) fotometrickou metodou*. Ostrava, 2016 (5). Standardní operační postup. Diagnost. Lab. Spadia

**ARNDT, T.** (2001). Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis, and interpretation. *Clinical chemistry*. 2001, 47(1), 13-27.

**ARNDT, T. et al.** (2007). Toward standardization of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurements: I. Analyte definition and proposal of a candidate reference method. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* [online]. 2007, 45(4) [cit. 2017-01-22]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1515/CCLM.2007.107>

**BARTOŠ, V. et al.** (2008). Příručka k vnitřní kontrole kvality. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. 2008, 16(37), 56-68 [cit. 2017-04-12]. Dostupné z: [http://www.cskb.cz/res/file/doporuceni/VKK\\_pub\\_08.pdf](http://www.cskb.cz/res/file/doporuceni/VKK_pub_08.pdf)

**BARTOŠ, V.** (2008). *Příručka k vnitřní kontrole kvality*. Praha: Česká společnost klinické biochemie, Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, 2008. ISBN 978-80-254-1130-8.

**BERÁNEK, M., M. TICHÝ et al.** (2013). *Vybrané kapitoly z klinické biochemie pro studijní program zdravotnická bioanalytika*. Praha: Karolinum, 2013. ISBN 978-80-246-2186-9.

**BIO-RAD.** (2009). Návod k použití % CDT by HPLC (2009, 195-6660). In: *Bio-Rad Laboratories GmbH* [online]. 12.12.2016 [cit.12.12.2016]. Dostupné z: [http://www.qcnet.com/Portals/66/cdt/CDT\\_by\\_HPLC-cz-2009.pdf](http://www.qcnet.com/Portals/66/cdt/CDT_by_HPLC-cz-2009.pdf)



- BRŮHA, R. et al.** (2009). Alkoholové poškození jater. *Medicina pro praxi* [online]. 2009, 6(3), 144-146 [cit. 2017-01-10]. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2009/03/06.pdf>
- CYLWIK, B., L. CHROSTEK a M. SZMITKOWSKI.** (2006). New methods for the determination of transferrin isoforms in the diagnostics of alcohol abuse. *Postepy Hig Med Dosw.* [online]. 2006, 1(60), 101-109 [cit. 2017-02-20]. ISSN 1732-2693. Dostupné z: [www.phmd.pl](http://www.phmd.pl)
- EHRMANN, J. et al.** (2003). *Ikterus. Diferenciální diagnostika.* Praha: Grada Publishing, 2003. ISBN 80-247-0506-0.
- EHRMANN, Jiří a Petr HŮLEK et al..** (2010). *Hepatologie.* Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-3118-6.
- EHRMANN, J. a P. SCHNEIDERKA.** (2006). *Alkohol a játra.* Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1048-X.
- FRIEDECKÝ, B. et al.** (2011). Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. 2011, 19(40), 36-44 [cit. 2017-04-23]. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2011/2011-1/dop-validace.pdf>
- HELANDER, A. et al.** (2001). Interference of transferrin isoform types with carbohydrate-deficient transferrin quantification in the identification of alcohol abuse. *Clinical Chemistry* [online]. 2001, 47(7), 1225-1233 [cit. 2017-01-14]. Dostupné z: <http://clinchem.aaccjnls.org/content/clinchem/47/7/1225.full.pdf>
- HOFFMANN, F.** (2016). Cobas® 8000. *Roche Diagnostics.cz* [online]. 2016 [cit. 2016-10-25]. Dostupné z: [http://www.roche-diagnostics.cz/home/produkty/cobas\\_8000.html](http://www.roche-diagnostics.cz/home/produkty/cobas_8000.html)
- HORÁK, J. a J. EHRMANN.** (2014). *Hepatologie do kapsy.* Praha: Mladá fronta, 2014, 28-29. Aeskulap. ISBN 978-80-204-3299-5.
- KVASNICOVÁ, V.** (2007). Aspartátaminotransferáza. *Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi* [online]. 2007 [cit. 2017-03-26]. Dostupné z: [http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/C/\\_KOMP\\_201412091600AST.htm](http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/C/_KOMP_201412091600AST.htm)

- KVASNICOVÁ, V.** (2007). Gama-glutamyltransferáza. *Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi* [online]. 2007 [cit. 2017-03-26]. Dostupné z: [http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/C/ KOMP\\_201412091600GGT.htm](http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/C/ KOMP_201412091600GGT.htm)
- LATA, J. a V. PŘÍBRAMSKÁ.** (2011). Nealkoholická steatohepatitida, možnosti diagnostiky keratinovými fragmenty a léčba. *Medicina pro praxi* [online]. 2011, 8 (7 a 8), 321-324 [cit. 2017-01-05]. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2011/07/04.pdf>
- LOUČKA, P., (2016).** *Stanovení karbohydrát-deficientního transferinu (CDT) metodou HPLC s UV/VIS detekcí.* Ostarva, 2016. Standardní operační postup. Diagnost. Lab. Spadia
- LUKÁŠ, K., A. ŽÁK et al.** (2007). *Gastroenterologie a hematologie: učebnice.* Praha: Grada, 2007. ISBN 978-80-247-1787-6.
- MAČÁK, J. a J. MAČÁKOVÁ.** (2004). *Patologie.* Praha: Grada, 2004. ISBN 978-80-247-0785-3.
- MASOPUST, J.** (1998). *Klinická biochemie: Požadování a hodnocení biochemických vyšetření.* I. část. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-7184-648-1.
- MERKUNOVÁ, A. a M. OREL.** (2008). *Anatomie a fyziologie člověka pro humanitní obory.* Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-1521-6.
- PECKA, M.** (2006). *Laboratorní hematologie v přehledu: Fyziologie a patofyziologie krevní buňky.* Český Těšín: FINIDR, 2006. ISBN 80-86682-003.
- PENKA, M., E. TESAŘOVÁ et al.** (2011). *Hematologie a transfuzní lékařství I.* Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.
- PŘÍBRAMSKÁ, V. a H. TRUMPEŠOVÁ.** (2008). Nealkoholická steatohepatitida – součást metabolického syndromu. *Medicina pro praxi* [online]. 2008, 5(5), 193-195 [cit. 2017-01-13]. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2008/05/03.pdf>
- RACEK, J. et al.** (1999). *Klinická biochemie.* Praha: Galén, 1999. ISBN 80-7262-023-1.
- REYNAUD, M., F. SCHELLENBERG, M.N. LOISEQUX-MEUNIER et al.** (2000). Objective Diagnosis of Alcohol Abuse: Compared Values of Carbohydrate-Deficient Transferrin (CDT),  $\gamma$ -Glutamyl Transferase (GGT), and Mean Corpuscular Volume

(MCV). *Alcoholism: clinical and experimental research*. 2000, 24(9), 1414-1419. doi:10.1111/j.1530-0277.2000.tb02111.x

**ROBERTSOVÁ, A.** (2012). *Kompletní lidské tělo*. Praha: Knižní klub, 2012. ISBN 978-80-242-2958-4.

**ROCHE DIAGNOSTICS.** (2014). Příbalový leták ASTPM (02/2014, V7, CZ). In: *Roche Diagnostics* [online]. 15.9.2016 [cit.15.9.2016]. Dostupné z: <http://objednavky.roche-diagnostics.cz/objednavky/info/05531446190pc.pdf>

**ROCHE DIAGNOSTICS.** (2014). Příbalový leták GGT-2 (02/2014, V5, CZ). In: *Roche Diagnostics* [online]. 15.9.2016 [cit.15.9.2016]. Dostupné z: <http://objednavky.roche-diagnostics.cz/objednavky/info/03002721122pc.pdf>

**TORRENTE, M.P., W.M. FREEMAN a K.E. VRANA.** (2012). Protein biomarkers of alcohol abuse. *Expert review of proteomics* [online]. 2012, 9(4), 425-436 [cit. 2016-11-22]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3535006/>

**VALAŠTOVÁ, M. a E. LIBČINSKÁ.** (2010). Stanovení karbohydrát-deficientního transferinu kapilární elektroforézou. *Fons* [online]. 2010, 3(1), 12-13 [cit. 2016-12-20]. Dostupné z: <http://www.bulletinfons.cz/32010/labo2.pdf>

**WOHL, P., P. TRUNEČKA a J. ŠPIČÁK.** (2003). Diagnostika abúzu alkoholu u nemocných s podezřením na alkoholovou závislost. *Česká společnost hepato-pankreato biliární chirurgie* [online]. 2003, 11(3), [cit. 2016-12-04]. Dostupné z: <http://www.hpb.cz/index.php?pId=03-3-04>