

UPUTE ZA UZIMANJE UZORAKA BIOLOŠKOG MATERIJALA

Epruvete za uzimanje uzoraka biološkog materijala

Standardizirane epruvete za uzimanje venske krvi

- Uzorak krvi se uzima u standardizirane epruvete s podtlakom. Epruvete mogu sadržavati različite dodatke (antikoagulanse, konzervanse), a vrsta dodatka razlikuje se po boji čepa
 - **crveni, žuti** čep (bez antikoagulansa) – biokemijske pretrage/serum sa ili bez polistirenske smole za odjeljivanje seruma od stanica, aktivator zgrušavanja¹
 - **zeleni** čep; litij- heparin – biokemijske pretrage/plazma
 - **sivi** čep; fluorid – za određivanje glukoze
 - **ljubičasti** čep; EDTA – hematološke pretrage
 - **crni** čep; citrat – sedimentacija
 - **plavi** čep, natrij citrat 105-109 mmol/L – koagulacijske pretrage²

¹ECCLS. Standards for specimens Collection. Part 1. Blood Containers:Berlin,Koln:Beuth Verlag. ECCLS doc 1984;1(1):1-6

²Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Coagulation Testing and General Performance of Coagulation Assays:Approved Guideline-Third Edition.1998.NCCLS document H21-A3

Standardizirane mikroepruvete za uzimanje uzorka kapilarne krvi:

- Biokemijske pretrage/serum (bez antikoagulansa; polistirenska smola; aktivator zgrušavanja; **crveni, žuti** čep)
- Biokemijske pretrage/plazma (litij-heparin; **zeleni** čep)
- Za određivanje glukoze (kalij-oksalat/kalcij-oksalat+fluorid; **sivi** čep)
- Hematološke pretrage (EDTA, **ljubičasti** čep)
- Koagulacijske pretrage (natrij-citrat; **plavi** čep)

Redosljed uzimanja uzorka krvi

- Krv za hemokulturu
- Biokemija (serum)
- Krv s antikoagulansom (citrat, heparin, EDTA)
- Epruvete koje sadrže dodatne stabilizatore (npr. inhibitore glukoze)

Upute za uzimanje uzorka venske krvi

➤ Standardizirani postupak

- uzorak krvi uzeti ujutro između **7 i 10 sati**
- Od dolaska u laboratorija do uzimanja krvi bolesnik treba mirovati 15 do 30 minuta
- Provjeriti podatke na uputnici (ime, prezime, datum, tražene pretrage)
- Identificirati bolesnika
- Za izravnu identifikaciju koristiti bolesnikovo ime, datum rođenja ili neki drugi podatak, a odgovor treba usporediti s podatkom koji je prethodno upisan na uputnici
- Upisati vrijeme uzorkovanja
- Položaj tijela za vrijeme uzimanja krvi je sjedeći
- Tražiti bolesnika da stisne šaku i tražiti mjesto uboda
- Dezinficirati ubodno mjesto 70%-im izopropilnim alkoholom
- Podvezu koristiti najdulje **1 minutu**, za lipide i <1 minute, a ako će se određivati kalcij, magnezij i željezo **NE** koristiti podvezu
- Nakon uzimanja uzorka krvi na mjesto uboda staviti jastučić od vate
- Ako uzimanje nije uspjelo, postupak ponoviti nakon 15 minuta iz druge ruke
- Na epruvete naljepiti naljepnice s crtičnim kodom (barkodom)
- Epruvete bez antikoagulansa ili sa smolom staviti u uspravan položaj, **NE** miješati
- Epruvete s antikoagulansom promiješati lagano nekoliko puta, bez pjene

Nacionalne preporuke za uzorkovanje venske krvi – Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (prema CLSI smjernicama H3-A6 2010, WHO ili Svjetske zdravstvene organizacije), Zagreb, ožujak 2014 (01-2014/v.1)

- Dezinfekcija ruku
- Provjera uputnice
- Identifikacija bolesnika
- Provjera pripreme bolesnika
- Priprema pribora za uzorkovanje
- Označavanje spremnika-epruvete
- Postavljanje bolesnika u odgovarajući položaj
- Stavljanje rukavica
- Stavljanje podveze
- Odabir mjesta uboda
- Dezinfekcija mjesta uboda
- Izvođenje uzorkovanja
- Vađenje prvog spremnika-epruvete
- Otpuštanje podveze, vađenje ostalih spremnika-epruveta poštujući redosljed vađenja
- Odbacivanje igle u propisani kontejner
- Miješanje spremnika
- Obrada mjesta nakon uzorkovanja
- Uklanjanje rukavica
- Zabilježba dodatnih informacija

Upute za uzimanje uzorka kapilarne krvi

- Uzimanje uzorka kapilarne krvi preporučuje se iz nedominantne ruke, iz prstenjaka, ženama i djeci srednji prst, a maloj djeci iz pete
- Prije uzimanja uzorka mjesto uboda treba očistiti 70% -om vodenom otopinom izopropanola, a zatim obrisati jastučićem vate
- Ubod izvršiti lancetom tako da je oštrica položena okomito na otisak prsta
- Prvu kap krvi odstraniti jastučićem od vate i pustiti da se kapljica slobodno stvara
- Uzorak krvi navući u kapilaru ili skupiti u mikroeprevetu s odgovarajućim antikoagulansom
- Nakon završenog uzorkovanja mjesto uboda prekriti jastučićem od vate
- Nakon uzorkovanja u mikroeprevetu s antikoagulansom, mikroeprevetu dobro začepiti i nježno, bez treskanja okrenuti 10 puta

Standardizirane mikroeprevete za uzimanje uzorka kapilarne krvi:

- Biokemijske pretrage/serum (bez antikoagulansa; polistirenska smola; aktivator zgrušavanja; **crveni**, **žuti** čep)
- Biokemijske pretrage/plazma (litij-heparin; **zeleni** čep)
- Za određivanje glukoze (kalij-oksalat/kalcij-oksalat+fluorid; **sivi** čep)
- Hematološke pretrage (EDTA, **ljubičasti** čep)
- Koagulacijske pretrage (natrij-citrat; **plavi** čep)

Prijenos uzoraka biološkog materijala

- U prijenosu uzoraka s dislociranih jedinica sudjeluje osoblje iz zdravstvene ustanove, a **NE** sami bolesnici
- Uzorci se prenose u odgovarajućim spremnicima, a ako to zahtijeva priroda uzorka, treba se pridržavati posebnih uputa (temperatura, svjetlost)
- Uzorci se prenose u posebnim sustavima u uspravnom položaju
- Uputnice se nose odvojeno od uzoraka
- Pri prijenosu potrebno je izbjegavati zagrijavanje i mehaničke utjecaje¹

Prijem i raspodjela uzoraka biološkog materijala

- Služba za laboratorijsku dijagnostiku prima uzorke ujutro¹
- Za hitne pretrage uzorci se primaju tijekom 24 sata
- Preporučeno vrijeme od uzorkovanja do dostave u laboratorij za sve opće medicinsko-biokemijske pretrage je 2 sata
- Služba ima pravila za ne prihvatanje neadekvatnih ili krivo obilježenih uzoraka
- Vrijeme prijama uzoraka evidentira se u Službi, u laboratorijskom dnevniku prijema
- Nezgode u vezi uzorkovanja, transporta i rukovanja uzorcima upisuje se u laboratorijski dnevnik prijema
- Po dolasku u laboratorij uzorci se raspoređuju prema unaprijed utvrđenoj organizacijskoj shemi
- Za svako radno mjesto postoje radne liste

Prijem uzorka

1. Svaki uzorak koji dolazi u laboratorij, mora imati čitko i pravilno ispisanu uputnicu s točnim vremenom uzimanja krvi, imenom i prezimenom osobe koja je ordinirala pretrage i imenom i prezimenom osobe koja je uzorkovala
2. Bolesnik mora biti pravilno pripremljen.
3. Krv se mora uzeti u odgovarajuće epruvete (ovisno o pretragama), pri čemu treba paziti na količinu uzete krvi (do oznake).

Neprihvatanje uzoraka

1. Uzorak biološkog materijala neće se prihvatiti za analizu **ako bolesnik nije pravilno pripremljen za uzimanje uzorka**
2. Uzorak koji je dostavljen i/ili se uzima u laboratoriju neće se prihvatiti ako nije **pravilno označen** ili nema odgovarajuću **pravilno ispisanu uputnicu** s istom oznakom i točnim vremenom uzimanja uzorka.
3. **NE** prihvaćaju se **zgrušani uzorci** za hematološke i koagulacijske pretrage, epruvete za biokemiju moraju biti u odgovarajućem položaju, okomito, krv ne smije dodirivati čep; ne smije se miješati epruveta (hemoliza).
4. Mokraća ne smije biti u epruvetama s gelom.
5. Ne prihvaćaju se uzorci kod kojih **je prošlo vrijeme od uzimanja** do dostave u laboratorij (**više od 6 sati**)
6. Ne prihvaćaju se **hemolizirani** uzorci za određivanje **K, Mg, LDH, AST, ALP, CK, GGT, kolesterola, triglicerida, bilirubina, ukupnih proteina.**
7. Ne prihvaćaju se uzorci za koje je naknadno utvrđeno da su uzeti iz infuzijskog sustava.
8. Ne prihvaćaju se **lipemični uzorci** za određivanje **amilaze, Ca, Cu, Fe, laktata, ukupnih proteina, hemoglobina, te K, Na** ako se određuju plamenom fotometrijom ili indirektnom potenciometrijom.

Priprava i pohrana uzoraka za opće medicinski-biokemijske pretrage

- Služba propisuje u opisu svakog mjernog postupka način tretiranja uzorka kako bi se spriječilo zagađenje i propadanje uzorka, osobito uzoraka koji se skupljaju kroz određeno razdoblje
- Opisani su uvjeti čuvanja i navedeno najduže vrijeme pohrane uzoraka kod mogućih naknadnih mjerenja i dodatnih ispitivanja
- Za opće medicinsko-biokemijske pretrage serum/plazma mogu se pohraniti:
 - 4 sata na sobnoj temperaturi
 - 24 sata na 4 °C
 - Nekoliko dana ili mjeseci na -20 °C

Upute za centrifugiranje krvi i mokraće

Centrifugiranje uzorka krvi:

- centrifugiranje uzorka krvi bez antikoagulansa provodi se najmanje 30 minuta nakon uzorkovanja, 10 minuta na 3500 o/minuti
- centrifugiranje uzorka krvi s antikoagulansom provodi se odmah nakon uzorkovanja, 10 minuta na 3500 o/minuti
- centrifugiranje krvi za koagulacijske pretrage tj, dobivanje plazme siromašne trombocitima provodi se 15 minuta na 4000 o/min ili 2x10 minuta na 3000 o/min

Centrifugiranje uzorka mokraće:

- Za analizu sedimenta preporučuje se centrifugiranje 5-15 ml mokraće 5 minuta na 1500 o/min

Hemoliza

Hemoliza je oslobađanje staničnih sastojaka iz eritrocita, trombocita i leukocita u izvanstaničnu tekućinu, tj. serum ili plazmu.

Vidljiva je kao crveno obojenje plazme ili seruma nakon centrifugiranja uzorka, kad je koncentracija hemoglobina veća od 0.3 g/L

Trombocitoliza i granulocitoliza također mogu utjecati na rezultate pretraga bez vidljive hemolize².

Trombocitoliza je odgovorna za višu koncentraciju brojnih staničnih sastojaka u serumu u usporedbi s plazmom.

Unutar-vaskularno razaranje leukocita može dovesti do povećane koncentracije lizozima u mijeloidnoj i monocitnoj leukemiji.

VRSTE HEMOLIZE

IN VITRO hemoliza je čimbenik interferencije, nastaje za vrijeme ili nakon uzimanja uzorka

IN VIVO hemoliza je biološki čimbenik

A. UZROCI HEMOLIZE IN VITRO

Uzroci hemolize tijekom uzimanja krvi

- Jaka aspiracija (upotreba tankih igala rjeđe dovodi do hemolize nego upotreba debljih; turbulencije, količina i brzina protoka su manji)
- Djelomična opstrukcija venskog ili arterijskog katetera
- Uzimanja uzorka štrcaljkom i zatim razdvajanje u nekoliko epruveta

Uzroci hemolize nakon uzimanja krvi

- Presnažno miješanje krvi
- Centrifugiranje krvi prije potpunog ugrušavanja
- Centrifugiranje djelomično zgrušanih uzoraka bolesnika koji su na terapiji antikoagulansima
- Pozitivan ili negativan tlak u epruvetama
- Razrjeđivanje krvi hipotoničnom otopinom
- Zamrzavanje i odmrzavanje pune krvi
- Čuvanje ili transport krvi na temperaturi okoline

B. UZROCI HEMOLIZE IN VIVO

- Protutijela
- Lijekovi
- Toksične tvari
- Nasljedni čimbenici (npr. hemoglobinopatije)
- Enzimske greške
- Infekcije (npr. malarija)

C. OTKRIVANJE HEMOLIZE

- Hemoliza je vidljiva makroskopski, okom, ako uzorak nije ikteričan, kao crveno obojenje seruma i plazme: ako je koncentracija slobodnog hemoglobina iznad 0.3 g/L
- U ikteričnim serumima granica otkrivanja značajno je viša
- Koncentracija slobodnog hemoglobina niža od 0.3 g/L može se odrediti imunonefelometrijski ili spektrofotometrijski (bikromatska metoda)
- Gornja granica referentnog intervala za slobodni hemoglobin u plazmi je 0.02 g/L, a u serumu 0.05 g/L

D. POKAZATELJ HEMOLIZE

- Crveno obojena plazma/serum
- ↑ Neočekivano povećanje kalija, laktat dehidrogenaze –LD, aspartatdehidrogenaze-AST, kisele fosfataze-KF, neuron specifične enolaze-NSN,
- ↓ Smanjenje koncentracije haptoglobina
- ↑ Povećanje koncentracije indirektnog bilirubina
- ↑ Porast retikulocitnog indeksa

E. PROMJENE U PLAZMI/SERUMU UZROKOVANE HEMOLIZOM

- Značajan porast koncentracije sastojaka čije su unutarstanične koncentracije 10 puta veće od izvanstaničnih
- Naročito se **povisuju kalij, LD i AST – koncentracija je lažno povećana kod hemolize *in vitro***, dok je kod hemolize *in vivo* povećanje stvarno
- Stanični sastojci čije su koncentracije niže od izvanstaničnih dovode do razrjeđenja plazme/seruma, te su analitički rezultati lažno sniženi
- Mjereni sastojci čije su koncentracije veće u serumu nego u plazmi, potječu iz trombocita (npr. kalij, neuron-specifična enolaza i kiselu fosfatazu)

F. RAZLIKOVANJE HEMOLIZE IN VIVO I IN VITRO

- **IN VITRO** – paralelno povećanje hemoglobina (crveno obojenje plazme/seruma), kalija, LD i AST, ali su hemoglobin i retikulociti indeksi normalni
- Povećanje kalija, ali bez crvenog obojenja plazme/seruma, LD u referentnom intervalu (npr. ako se puna krv čuva nekoliko dana)
- **IN VIVO** – paralelno povećanje hemoglobina (crveno obojenje plazme/seruma), LD, ali ne i paralelno povećanje kalija
- Bez crvenog obojenja plazme/seruma, ali smanjenje haptoglobina i mogućeg povećanja LD, nekonjugiranog bilirubina i/ili retikulocitnog indeksa (u izrazitoj hemolizi promjene LD, nekonjugiranog bilirubina i haptoglobina dogodit će se unutar 24 sata, porast retikulocitnog indeksa događa se 2 dana kasnije; povećanje nekonjugiranog bilirubina mjerljivo je ako stupanj hemolize poraste iznad 5%)
- Serum/plazma bez crvenog obojenja, ali povećanje LD, kalija i kisele fosfataze u serumu; u plazmi ne postoji povećanje tih parametara - to se zapaža u trombocitozi

Hemoliza in vivo istovremeno s odgovorom akutne faze (porast CRP) ili s hipersplenizmom.

Koncentracija hemoglobina može biti u referentnom intervalu.

G. HEMOLIZA KAO ČIMBENIK INTERFERENCIJE

- Povećanje ili smanjenje koncentracije sastojaka u plazmi/serumu radi koncentracijskog gradijenta između stanice i plazme
- Interferiranje staničnih sastojaka u kemijskim i biokemijskim reakcijama (npr. pseudoperoksidazna aktivnost hemoglobina smeta određivanju bilirubina, adenilat-kinaza određivanju CK)
- Optička interferencija hemoglobina u spektrofotometrijskim mjerenjima

H. ANALITI KOJI PODLIJEŽU INTERFERENCIJI UZROKOVANOJ HEMOLIZOM UZORKA

Aspartat-aminotransferaza (AST)

Katalitička koncentracija AST u eritrocitima je 40 puta veća nego u plazmi. U bolesnika s aktivnostima AST u referentnom intervalu, hemoliza s koncentracijom hemoglobina od 1.5 g/L, uzrokuje značajno povećanje katalitičke koncentracije.

Bilirubin

Lažno niska koncentracija se izmjeri metodom Jendrassik-Groff-a ako je koncentracija slobodnog hemoglobina u serumu veća od 0.8 g/L. Naime, pseudoperoksidazna aktivnost hemoglobina inhibira stvaranje azo-boje.

Kreatin-Kinaza (CK)

Otpuštanje eritrocitne adenilat-kinaze lažno povećava katalitičke koncentracije CK i CK-MB, ukoliko je hemoglobin >2.5 g/L.

Željezo (Fe)

Premda je hemoglobin golem izvor željeza, učinak željeza u hemolitičnom uzorku nije značajan, jer je vezanje željeza na porfirin jače od vezanja na transferin, a metode za određivanje željeza mjere samo željezo otpušteno s transferina.

Ukupni proteini

Učinak hemoglobina iz hemoliziranog uzorka na ukupne proteine je malen, ali značajan.

Koncentracija hemoglobina veća od 6.6 g/L i uz primjenu slijepa probe uzorka dovesti će do povećanja koncentracije proteina od 7%.

Mokraćna kiselina

Samo visoke koncentracije hemoglobina >6.6 g/L dovode do snižavanja koncentracije mokraćne kiseline u serumu/plazmi. U Trinderovoj reakciji uz dvije valne duljine, koncentracije hemoglobina do 13 g/L ne utječe na rezultat.

Kalij

Koncentracija kalija u eritrocitima je oko 25 puta veća nego u plazmi. Koncentracija kalija je povećana čak ako hemoliza *in vitro* nije vidljiva kao crveno obojenje, što se može uočiti ako se uzorak pune krvi s niskom koncentracijom glukoze čuva nekoliko sati na sobnoj temperaturi.

Anorganski fosfati

Prelazak organskih fosfatnih estera iz krvnih stanica u serum može dovesti do oslobađanja anorganskih fosfata te lažno povećati njihovu koncentraciju. Iz tog razloga serum treba odvojiti od stanica unutar 2 sata nakon uzorkovanja.

Elektroforeza serumskih proteina

Kompleksi hemoglobin-haptoglobin kreću se između alfa-2 i beta-globulinske frakcije, uzrokujući promjene u elektroforetskoj slici (elferogramu), a time i na interpretaciju nalaza. Slobodni hemoglobin migrira kao difuzna crvenkasta vrpca u beta-globulinskoj frakciji. Koncentracija hemoglobina već od 1.5 g/L dovodi do promjena u elektroforezi.

Imunoanalize

Farmaceutske tvrtke koje proizvode reagense često za evaluaciju interferencije hemolize samo dodaju hemoglobin (uglavnom se koristi humani methemoglobin) u uzorke, međutim krvne stanice sadrže i druge komponente osim hemoglobina, koja mogu ometati imunoanalize. Stoga treba upitati proizvođača reagensa kako je provedeno ispitivanje učinka hemolize.

Laktat-dehidrogenaza (LD)

Katalitička koncentracija LD je oko 160 puta viša u eritrocitima nego u serumu/plazmi, stoga i lagana hemoliza (0.2 g/L) interferira u velikoj mjeri. Učinak je značajan i kod patoloških vrijednosti enzima.

Gama-glutamilttransferaza (GGT)

Kod hemolize dolazi do oslobađanja glicina iz leukocit i trombocita, koji je inhibitor GGT. Katalitička koncentracija GGT se smanjuje kod koncentracija hemoglobina viših od 3.0 g/L. U graničnom području greška je začajna, dok je u višem patološkom području zanemariva.

ZAKLJUČAK

- Učestalost hemolize u uzorcima koji se dnevno pošalju u laboratorij je oko 3%
- O hemolizi *in vivo* radi se samo u oko 3% svih hemoliziranih uzoraka
- Hemoliza *in vitro*, hemolizirani uzorak ne prihvaća se za analizu:
 - **K⁺**
 - **Mg²⁺**
 - **LD**
 - **AST**
 - **ALT**
 - **ALP**
 - **GGT**
 - **kolesterola**
 - **triglicerida**
 - **bilirubina**
 - **ukupnih proteina**

Potrebno je ponoviti uzorkovanje pod standardnim uvjetima !