

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

1-ECCLS. Standards for specimens Collection. Part 1. Blood

Containers: Berlin, Köln: 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 mikroepuvete 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 mikroepruvetu s odgovarajućim antikoagulansom
- Nakon završenog uzorkovanja mjesto uboda prekriti jastučićem od vate
- Nakon uzorkovanja u mikroepruvetu s antikoagulansom, mikroepruvetu dobro začepiti i nježno, bez treskanja okrenuti 10 puta

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)

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

- Odjel 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
- Odjel ima pravila za ne prihvaćanje neadekvatnih ili krivo obilježenih uzoraka
- Vrijeme prijema uzoraka evidentira se na Odjelu, 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

¹Hamer-Plećaš A, Čvorišćec D, Stavljenić-Rukavina A.. Priručnik o unutarnjoj kontroli kvalitete medicinsko-biokemijskog laboratorija, Bichem Med 1994;123-40

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

- Odjel 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

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 slijepe 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-glutamiltransferaza (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 značajna, dok je u višem patološkom području zanemariva.

Potrebno je ponoviti uzorkovanje pod standardnim uvjetima !