

SEED Hematologie



Preanalytická fáze: vytvoření správných podmínek k dosažení vysoce kvalitních výsledků analýz – část I.

Klinické laboratoře jsou významnou oporou v péči o pacienta. Laboratorní výsledky, přes veškerou automatizaci klinických laboratoří, stále ovlivňuje mnoho proměnných. Správná interpretace výsledků vyžaduje, aby všechny fáze – preanalytická, analytická a postanalytická – obsahovaly co nejméně chyb. Chyby v preanalytické fázi tvoří až 70 % laboratorních chyb [1]. Protože kvalita závisí na množství vzájemně propojených faktorů, přesnost a správnost nejsou jedinou zárukou kvality. Od samého začátku musejí být všechny tři fáze monitorovány a kontrolována kvalita. Cílem kontroly kvality je minimalizace laboratorních chyb. Minimalizací chyb v každém kroku preanalytické fáze může laboratoř zlepšit kvalitu analytických výsledků, snížit počet znovu odebíraných vzorků, a tím zkrátit čas odezvy a zlepšit celkovou péči o pacienta.

Co je preanalytická fáze?

Preanalytická fáze zahrnuje všechny procesy předcházející samotné laboratorní analýze. Faktory preanalytické fáze, jako je odběr vzorku, nakládání se vzorkem, interferující substance a vliv ze strany pacienta, jsou běžnými příčinami nepřesných výsledků.

Tabulka 1 Vlivy ze strany pacienta podle doby trvání

Trvalé	Dlouhodobé	Krátkodobé
populace	věk	tělesná poloha
pohlaví	těhotenství	fyzická zátěž
	nadmořská výška	duševní stres
	nikotin	cirkadiální variace
	alkohol	dieta
	drogy	
	dieta	

Některé z preanalytických proměnných, jako je variabilita kvality vzorku, můžeme ovlivnit. Musíme si ale být dobře vědomi těch proměnných, které ovlivnit nemůžeme, abychom byli schopni oddělit jejich účinky ovlivňující laboratorní výsledky od změn způsobených chorobami. Hematologické výsledky mohou být ovlivněny některými z uvedených proměnných [2]:

Populace

Mezi populacemi mohou být významné rozdíly. Například obě pohlaví afroamerické populace mají oproti bělošské populaci výrazně nižší počet leukocytů (WBC) nebo jejich subpopulací.

Pohlaví

Kromě pohlavně specifických proměnných, jako jsou hormony, je počet erytrocytů (RBC) a množství hemoglobinu (HGB) u žen nižší než u mužů.

Věk

Mnoho měřitelných parametrů nedosahuje před pubertou hodnot pro dospělé. Počty subpopulací bílých krvinek, jako jsou lymfocyty a neutrofilny, se u dětí do 6 let významně liší ve srovnání s referenčními hodnotami u dospělých osob [6].

Těhotenství

Během těhotenství, ačkoliv nepůsobí většinou problémy, se mohou vyskytnout některé hematologické abnormality. Během bezproblémového těhotenství se zvyšuje průměrný objem plazmy z 2,6 na 3,9 l, s pravděpodobně malou změnou během prvních deseti týdnů. Potom následuje výrazný vzestup do 35. týdne, kdy se hodnoty stabilizují [2].

Nadmořská výška

Některé krevní parametry vykazují významné změny ve vysokých nadmořských výškách. Významné nárůsty s nadmořskou výškou jsou pozorovány například u hematokritu (HCT) a hemoglobinu (HGB), až o 8 % ve výšce 1 400 m.n.m. [2].

Tělesná poloha

Existují výrazně rozdílné výsledky mezi sedící a ležící polohou těla. Při změně z ležící polohy do vzpřímeného postoje může dojít u pacienta ke snížení objemu plazmy až o 12 %. Změna v objemu plazmy vede ke zjevné změně koncentrace buněk, makromolekul a malých molekul [2].

Fyzický a duševní stres

Během fyzického a duševního stresu mohou být počty leukocytů vyšší oproti normálu [7, 8].

Nikotin

Je důležité se pacienta zeptat, zda kouří. Chronická konzumace nikotinu zvyšuje počty leukocytů, hemoglobin i hematokrit [4].

Drogy

Návykové drogy, jako jsou amfetamin, morfin, heroin, THC a kokain, mohou ovlivnit výsledky laboratorních testů [9]. Kromě toho případové zprávy a několik formálních epidemiologických studií tvrdí, že drogy mohou být etiologií pro agranulocytózu a aplastickou anémii [10]. Také cytotoxické drogy používané při chemoterapii mohou svým vedlejším účinkem [11] snižovat počty leukocytů.

Dieta

Dieta může ovlivnit výsledky analýz. Anémie byla dlouho považována za hlavní medicínský problém ovlivňující značnou část světové populace všech věkových kategorií. Bylo vypočteno, že asi 24,8 % světové populace trpí anémií [5]. Přibližně 50 % případů anémie je způsobeno nedostatkem železa. Anémie z nedostatku železa způsobeného nedostatečnou výživou anebo ztrátou krve stále zůstává nejčastější léčitelnou anémií na světě. Koncentrace hemoglobinu a ekvivalent hemoglobinu v retikulocytech (RET-H₂) jsou v těchto případech [6] nižší než referenční hodnoty pro příslušný věk a pohlaví.

Kdy je vhodná doba pro odběr krevního vzorku?

Pro porovnatelnost výsledků je nezbytné, aby podmínky odběru krevních vzorků byly pokud možno konstantní. Počty buněk značně závisí na cirkulaci krve, což znamená, že by vzorky krve měly být odebírány vždy ve stejný čas. V průběhu dne se musí organismus přizpůsobit podmínkám prostředí i individuálním podmínkám.

Doporučení [2] týkající se načasování odběru:

- pokud je to možné, vzorky odebírejte mezi 7.–9. hodinou ranní
- odběr vzorku provádějte 8–16 hodin po posledním jídle (ideálně 12 hodin)
- vzorky odebírejte ještě před diagnostickými a terapeutickými procedurami
- při lékovém monitoringu vezměte v potaz vrchol po podání léku a stabilní fázi před další dávkou léku
- vždy zaznamenejte přesný čas odběru

Jak ovlivňuje odběr vzorku hematologické výsledky?

Účelem každé prohlídky je získat vzorek, který charakterizuje stav pacienta a je pouze minimálně ovlivněn procedurou odběru, aditivem, transportem a skladovacími podmínkami.

Pokud je vzorek krve špatně odebrán, výsledek může být nepřesný, pro klinika zavádějící a pacient musí projít celou proceduru odběru znovu. Chyby při odběru způsobují především hemolýzu, kontaminaci, nesprávné označení zkumavek a shlukování trombocytů.

Tabulka 2 Doporučené pořadí odběru pro vybrané odběrové zkumavky

Pořadí použití	Typ zkumavky	Aditivum
1	krevní kultura	směs bujónu
2	bez aditiva	–
3	koagulace	citrát sodný
4	aktivátor srážení	aktivátor srážení
5	separátor séra	–
6	heparin sodný/lithný	heparin sodný/lithný
7	zkumavka pro separaci plasmy	heparin lithný, antikoagulant a gelový separátor
8	EDTA	EDTA
9	krev	kyselina-citrát-dextróza (ACD, ACDA, ACDB)
10	oxalát-fluorid	fluorid sodný a oxalát draselný

Faktory zvyšující riziko hemolýzy:

- použití jehly příliš malého průměru (pod 23 G)
- přílišný tlak na píst odběrové stříkačky, zvyšující stříhové síly na buněčných membránách erytrocytů
- odběr krevních vzorků z nitrožilní nebo centrální kanyly
- nedostatečné naplnění zkumavky a nesprávný poměr krve a antikoagulantu
- opětovné používání zkumavek, které byly znovu ručně plněny nevhodnými množstvími antikoagulantů
- příliš nešetrné promíchávání zkumavky
- nedostatečné zaschnutí alkoholu nebo dezinfekce
- použití velkého podtlaku, např. příliš velkou zkumavkou u pediatrického pacienta, nebo použitím zbytečně velké stříkačky (10–20 ml) [12]

Podle testů, které musejí být provedeny, by měl být typ vzorku identifikován [12]:

- venózní krev pro hematologické rutinní vyšetření a různé terapeutické účely
- kapilární krev (z prstu nebo paty) pro krevní analýzu u novorozenců, malých dětí a za určitých podmínek u dospělých, např. pacienti se špatnými žilami, popáleninami nebo jizvami v místech odběru krve, s vysokou koncentrací tuku, s častými odběry krve, katetry v obou pažích nebo rukách, testování u lůžka pacienta a ti, kteří mají intravenózní medikaci nebo chemoterapii jsou vhodní pro kapilární odběr krve
- arteriální krevní plyny u pacientů na mechanické ventilaci a k monitorování oxyličení krve

Co je potřeba zvážit při odběru krevního vzorku?

- Odběrová zkumavka by neměla být použita po datu expirace, abychom zajistili použitelnost vzorku pro klinickou analýzu. U vakuových zkumavek na odběr krve, které obsahují aditivum, by použití po datu expirace mohlo znamenat nenatažení dostatečného objemu krve do zkumavky [13].
- Odběrové zkumavky používejte v daném pořadí, aby nedošlo ke kontaminaci aditiv mezi zkumavkami. Tabulka 2 ukazuje doporučené pořadí použití odběrových zkumavek nebo stříkaček a jehel [12].

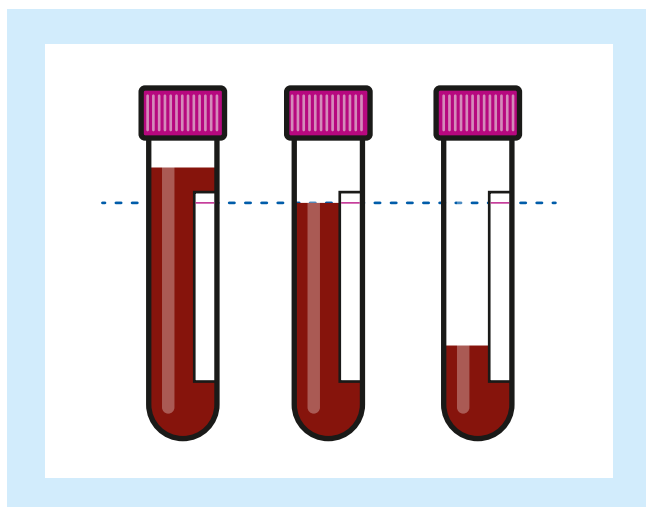
Vliv odběrových zkumavek a aditiv

Odběrové zkumavky nejsou inertní obaly na krev, ale mají několik složek včetně antikoagulantů, které mohou potenciálně interferovat s chemickou analýzou. U komponentů používaných k výrobě odběrových zkumavek pro žilní a kapilární krev a odběrové techniky používané k naplnění těchto zkumavek je předpoklad, že se nepodílejí na celkové chybě měření a neovlivňují výkonost chemických analýz. Laboratoře by si měly ověřit v klinické literatuře a u výrobců odběrových zkumavek, zda je tento předpoklad stále platný.

K zabránění srážení krve se používají antikoagulanty. Nejčastěji používané antikoagulanty pro analýzu plné krve jsou etylen-diamintetraoctová kyselina (EDTA), heparin, citrát. Antikoagulanty přidané do vzorků v koncentracích vhodných k zachování panelu měřených parametrů mohou interferovat s chemickými analýzami jiných parametrů, často s vazbou nebo precipitací komplexu antigen-protilátka.

EDTA

EDTA je chelátové činidlo vázající vápník a zabraňující tvorbě sraženiny. Jedná se o antikoagulant první volby v hematologii. Dostupný je ve třech formách: K2-EDTA je antikoagulant doporučený mezinárodní radou pro standardizaci v hematologii (ICSH). Díky svým chelačním schopnostem může EDTA interferovat s některými chemickými analýzami. Například může vázat kovové ionty, jako je europium nebo zinek a magnézium, které jsou kofaktory enzymů. Díky tomu je poměr EDTA a krve klíčový pro optimální výsledky. EDTA může ve vysokých koncentracích hypertonicky smršťovat erythrocyty a zmenšovat jejich velikost, a ovlivňovat tak jejich morfologii.



Obr. 1 EDTA zkumavky zleva doprava: přeplněná, správně naplněná, nedostatečně naplněná

Heparin

Heparin jako antikoagulant je běžně používán v chemické analýze. Heparin působí primárně přes komplex, který tvoří s antitrombinem III. Heparin může interferovat s některými reakcemi antigen-protilátka. Použití heparinu snižuje rychlost reakce některých protilátek, obzvláště v precipitačním kroku [14]. Heparin lithný je doporučenou formou heparinu, protože jeho interference při vyšetření ostatních iontů je nejméně pravděpodobná. Heparin je jediný antikoagulant, který by měl být používán při stanovení pH, krevních plynů, elektrolytů, ionizovaného vápníku a v cytogenetice. Heparin by se neměl používat pro koagulační nebo hematologické testování.

Citrát trojsodný

Citrát trojsodný, pufrovaný nebo nepufrovaný, je standardním antikoagulantem pro koagulační testování. V současnosti jsou dostupná pouze kapalná aditiva. Pro koagulační vyšetření je doporučené zachování poměru 9:1 (krev:citrát).

U některých jedinců může EDTA způsobit nepřesné výsledky trombocytů. Tyto anomálie, shlukování destiček a satellitismus destiček, mohou být výsledkem změn v membránové struktuře, způsobených odstraněním iontu vápníku chelačním činidlem, což umožňuje vazbu dříve vytvořených protilátek. V takovém případě se někdy používají zkumavky s citrátem sodným, aby bylo dosaženo přesnějších výsledků počtu trombocytů [2].

Ovlivňuje plnění EDTA zkumavek výsledky?

Správná laboratorní praxe vyžaduje pro správnou analýzu i správně naplněné zkumavky. Obecně by zkumavky měly být naplněny doporučeným objemem. Nedostatečně naplněné EDTA zkumavky mohou vést k nesprávnému střednímu objemu buňky (MCV), koncentraci hemoglobinu v buňce (MCHC), distribuční šířky erythrocytů (RDW) a počtu erythrocytů (RBC). Mohou také způsobit morfologické změny u erythrocytů i leukocytů. EDTA je hypertonická, což vede k výskytu echinocytů. Přeplněná zkumavka vede k výrazně snížené koncentraci EDTA, což má za následek srážení vzorku.

Přeprava a skladování

Správné převzetí krevního vzorku hraje v preanalytické fázi důležitou roli. Transport a skladování vzorků jsou v preanalytickém procesu občas podceňovány. ICSH navrhuje [15], že materiál pro hematologické vyšetření by měl být skladován při 4 °C. Tabulka 3 ukazuje stabilitu hematologických parametrů.

Tabulka 3 Stabilita hematologických parametrů u vzorků odebraných do EDTA

Parametr	Skladování při 4 °C	Účinek opožděného zpracování
HGB	stabilní až 72 h	
RBC	stabilní až 72 h	
MCV	stabilní až 6–12 h	tendence ke zvýšení
HCT	stabilní až 6–12 h	tendence ke zvýšení
PLT	stabilní až 24 h	
RET	stabilní až 72 h	
WBC	stabilní až 72 h	

Stabilita hematologických parametrů se může lišit v závislosti na analytické metodě, technologii a reagentech použitých analytickým systémem. Je důrazně doporučeno dodržovat návod výrobce.

Vzorky musí být transportovány ve vhodných označených taškách nebo kontejnerech při pokojové teplotě a v co nejkratším čase do laboratoře. Rychlý transport vzorků z odběrové místnosti je zvlášť důležitý, pokud je teplota vyšší než 22 °C, což může způsobit poškození některých složek krve [16].

Souhrn

Souhrn faktorů, které přispívají k obtížím při analýze vzorku v hematologické laboratoři:

- chyby při přípravě pacienta
- chybějící nebo nesprávná identifikace pacienta
- chybějící čas a datum na vzorku
- příliš málo odebraného materiálu
- nesprávná aditiva
- nesprávný poměr aditiva a testovaného materiálu
- nevhodné skladování
- příliš starý materiál
- zamražení plné krve
- nesprávná transportní nebo skladovací teplota
- nedostatečné promíchání
- nevhodný typ vzorku
- vliv interferencí, jako jsou hemolýza, ikterický vzorek, lipémie
- špatná komunikace mezi laboratoří a lékařem/personálem

Závěr

Znalost preanalytických proměnných a jejich vlivu na hematologickou analýzu je prvním krokem k zajištění výsledků, které jsou trvale správné. Minimalizací vzniku preanalytických chyb může být optimalizována péče o pacienta, sníženy náklady laboratoře a zlepšen vztah mezi lékařem a laboratoří.

Ve druhé části našeho článku poskytujeme návod pro odběr krevních vzorků a vysvětlujeme pravidla akceptovaná pro odběr krevních vzorků.

Literatura

- [1] **Abdollahi A et al.** (2014): Types and Frequency of Errors during Different Phases of Testing at a Clinical Medical Laboratory of a Teaching Hospital in Tehran, Iran. *N Am J Med Sci.* 6 (5) : 224–228.
- [2] **Guder WG et al.** (2009): *Samples: From the patient to the laboratory; The impact of preanalytical variables on the quality of laboratory results.* 4th updated edition. Wiley-Blackwell.
- [3] **Gregory GA, Andropoulos DB** (2011): Appendix B: Pediatric Normal Laboratory Values, *Gregory's Pediatric Anesthesia. Fifth edition.* 1300–1314.
- [4] **Anandha Lakshmi S et al.** (2014): Effect of Intensity of Cigarette Smoking on Haematological and Lipid Parameters. *J Clin Diagn Res.* Vol 8 (7) : BC11–BC13.
- [5] **WHO global database on anaemia, de Benoist B et al.** (2008): World-wide prevalence of anaemia 1993–2005. http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241596657_eng.pdf?ua=1 (accessed on 16.03.2016).
- [6] **Urrechaga E et al.** (2013): Erythrocyte and reticulocyte indices in the assessment of erythropoiesis activity and iron availability. *Int J Lab Hematol* Vol. 35. Issue 2 : 144–149.
- [7] **Carrington College:** <http://carrington.edu/blog/medical/researchers-discover-link-mental-stress-physical-health> (accessed on 18.04.2016).
- [8] **Carraro P et al.** (2015): Complete blood count at the ED: preanalytic variables for hemoglobin and leukocytes. *Am J Emerg Med.* 33 (9) : 1152–1157.
- [9] **Buchanan JA et al.** (2010): A Confirmed Case of Agranulocytosis after Use of Cocaine Contaminated with Levamisole. *J Med Toxicol.* 6 : 160–164.
- [10] **Kaufman DW et al.** (1996): Drugs in the aetiology of agranulocytosis and aplastic anaemia. *Eur J Haematol Suppl.* 60 : 23–30.
- [11] **Han ZT et al.** (1998): 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced increase in depressed white blood cell counts in patients treated with cytotoxic cancer chemotherapeutic drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol 95 : 5362–5365.
- [12] **WHO guidelines on drawing blood: best practices in phlebotomy** (2010): http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44294/1/9789241599221_eng.pdf (accessed on 09.02.2016).
- [13] **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)** (2010): *H01–A6: Tubes and additives for venous and capillary blood specimen collection; Approved Standard – Sixth Edition.* Vol 30 No 26.
- [14] **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)** (2010): *GP34–A: Validation and Verification of Tubes for Venous and Capillary Blood Specimen Collection; Approved Guideline.* Vol 30 No 25.
- [15] **Editorial** (2014): Stability of complete blood count parameters with storage: toward defined specifications for different diagnostic applications. *International Journal of Laboratory Hematology.* 36 : 111–113.
- [16] **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)** (2010): *GP44–A4: Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guideline – Fourth Edition.*