

# Биолошки узорци и извори варијација

- 1. Преаналитичке грешке
- 2. Аналитичке грешке
- 3. Постаналитичке грешке

- Узимање крви
  - венепункција
  - пункција коже
  - артеријска пункција
  - антикоагуланси и конзерванси
  - значај присуства хемолизе у узорцима
- Сакупљање мокраће
- Сакупљање фецеса
- Сакуљање спиналне течности
- Руковање узорцима за анализу
  - идентификација узорака
  - транспорт узорака
  - чување узорака

# Сакупљање узорака

- Током сакуљања, обраде и транспорта биолошких узорака могу да се јаве многе грешке.
- Смањивање ових грешака на минимум доприноси добијању поузданије информације за здравственог радника.
- У клиничкој лабораторији могу да се анализирају следећи биолошки узорци:
  - крв, серум, плазма, урин, фецес, салива, спинална, синовијална, амнионска, плеурална, перикардијална течност и течност асцитеса.

# Венепункција

деф= сви кораци укључени у добијање адекватно обележеног узорка крви из вене пацијента.

- Припрема:
  - потврдити идентитет пацијента
  - 3 врсте информација (име, датум рођења, број собе)
  - флеботомиста треба да буде адекватно заштићен (заштитна одећа и наочаре)
  - уколико је пацијент у изолацији, маска и наочаре

# Венепункција

- Пацијент треба удобно да седи или лежи, и треба да буде у тој позицији 20 минута пре узимања узорка.
- Ова стандардизација смањује разлике у концентрацијама конституената крви проузроковане варијацијама у волумену крви (хемоконцентрација или хемодилуција).
- Било која рука треба да буде испружена у праву линију од рамена до шаке.

# Венепункција

- Руку са постојећем интравенском линијом треба поштедети, као и руку са екстензивним ожиљцима или хематомима.
- Уколико је жена имала мастектомију, не треба користити руку на тој страни јер може да настане лимфостаза услед операције, утичући на састав крви.
- Уколико је жена имала обострану мастектомију, крв треба извадити на оној страни на којој је процедура прво обављена.
- Уколико је процедура на обе стране изведена у 6 месеци, треба користити вене на дорзуму шаке или стопала.

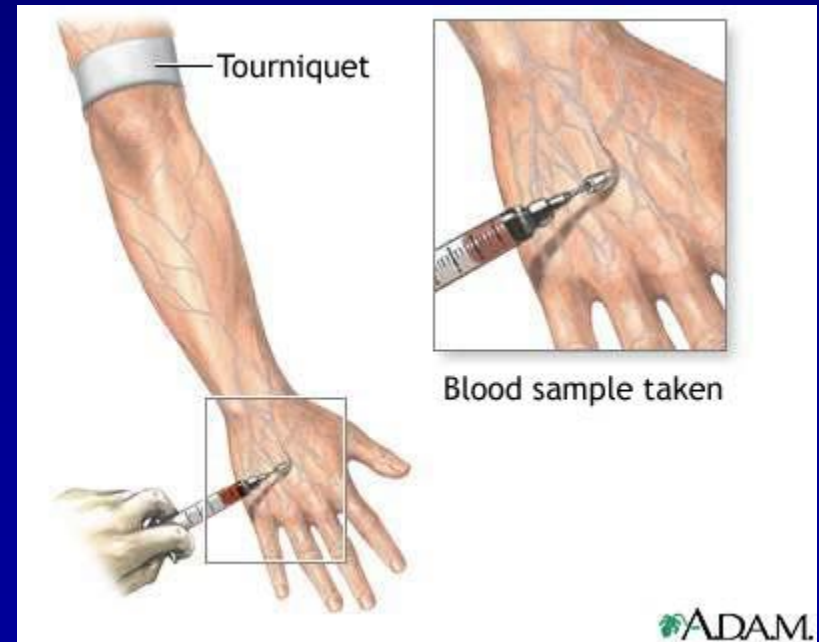
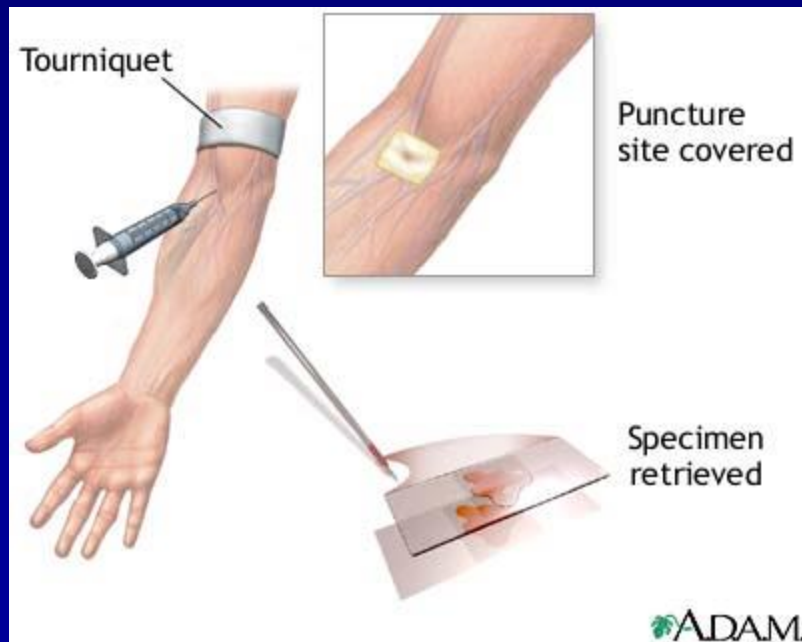
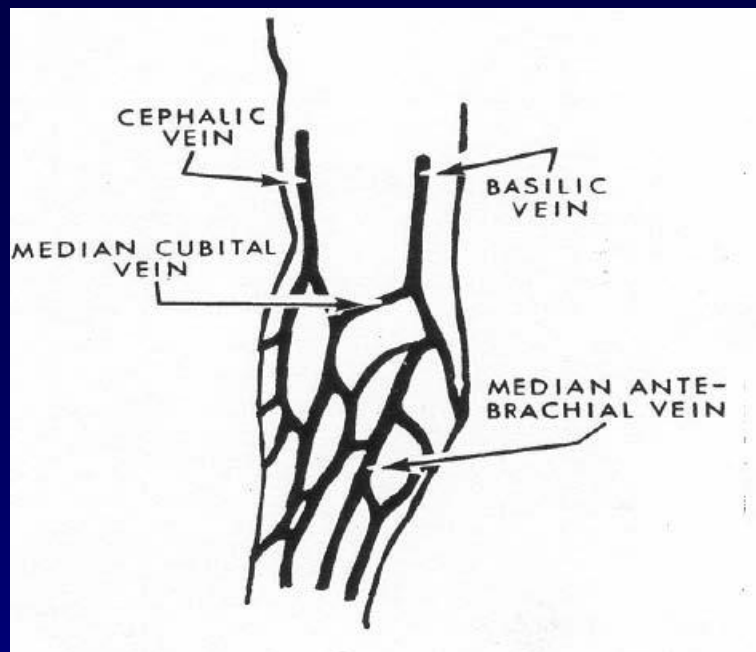
# Венепункција

- Пре венепункције:
  - проценити запремину крви
  - изабрати одговарајући број и врсту епрувета за крв, серум или плазму
  - изабрати одговарајућу иглу (19-22G)
  - што је већи број G, то је мањи промер игле
  - за одрасле се најчешће користи G20, ако вене лако колабирају G21
  - за волумен крви од 30 до 50 ml, треба узети иглу од 18G, како би проток крви био адекватан



# Локација

- v. mediana cubiti
- дорзум шаке и чланак (избегавати код дијабетичара и особа са слабом циркулацијом)
- када је канила стављена по први пут ради дуготрајног давања инфузије, може се користити за узимање крви, како би се избегао још један убод
- код пацијената који имају канилу или артериовенску фистулу, та рука се може користити само након консултације са лекаром
- уколико се у ту руку даје интравенски инфузија, треба обуставити течност на 3 минута пре добијања узорка и записати у картон (узорак није погодан за анализу глукозе или ектролита).



## Припрема места пункције

- Очистити 70% алкохолом, сачекати да се осуши јер присуство алкохола може да доведе до хемоллизе
- Очистити кружним покретима од унутра ка споља
- Када се узима узорак за одређивање алкохола, кожу треба очистити раствором бензалкомијум хлорида који је без алкохола.
- Повидон јод треба избегавати јер може да утиче на резултате
- Када се коже очисти, не треба је дирати до венипункције.

## Време узимања узорка

- важно за оне параметре крви који подлежу дневним варијацијама (кортикостероиди и гвожђе) и који се користе за праћење терапије
- код одређивања алокохола у крви или концентрације лекова

## Венска оклузија

- након чишћења коже, ставити манжетну или повеску 10 до 15 cm изнад места пункције
- постиже се опструкција крви у срце и дистензија вена
- прва узета крв непосредно испод повеска је најрепрезентативнији узорак и треба је користити за оне анализе као што је нпр. калцијум који су важни за критичне медицинске одлуке
- касније узети узорци показују веће ефекте венске стазе
- тако прва епрувета може да покаже 5% пораст протеина, док трећа епрувета може да има промену од 10%

# Венска оклузија

- на концентрацију конституената везаних за протеине такође утиче венска стаза
- продужена стаза може да повећа концентрацију протеина или метаболита везаних за протеине и до 15%
- пораст у активности креатин киназе и аспартат аминотрансферазе може да настане услед хемоконцентрације, благе трауме ткива након убода игле или стазе крви у ткиву.
- пумпање шаком пре венепункције не треба радити зато што доводи до повећања концентрације калијума, фосфата и лактата.
- снижење рН крви услед присуства лактата доводи до пораста концентрације јонизованог калцијума. Концентрација јонизованог калцијума се враћа на нормалу 10 минута након отпуштања повеске.

Промене у саставу серума код продужене венске оклузије у трајању од 1 до 3 минута

Пораст		Снижење	
Укупни протеини	4.9%	Калијум	6.2%
Гвожђе	6.7%		
Укупни липиди	4.7%		
Холестерол	5.1%		
AST	9.3%		
Билирубин	8.4%		

## Узимање крви вакутајнером

- Вауктајнери се сматрају јефтинијим и лакшим за употребу од шприцева
- Постоји неколико врста вакутајнера за сакупљање крви венепункцијом
- Варирају у зависности од врсте адитива и запремине епрувете
- Различите врсте се идентификују на основу боје чепа
- Неке стаклене епрувете су пресвучене силиконом ради смањења адхезије угрушака по зидовима или чепу чиме се смањује ризик од хемолизе



# Узимање крви вакутајнером

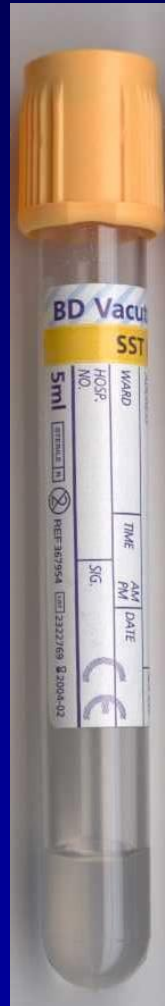
- Крв узета у једном вакутајнеру никад не треба да се пребацује у друге вакутајнере јер први адитив може да интерферира са анализама које су специфичне за другу адитив.
- Тромбин се додаје у неке епрувете ради убрзавања коагулације.
- Међутим, и силиконски зидови могу да активирају и убрзају механизам коагулације.





Врста епрувете	Адитив	Боја затварача	Алтернативна боја
гел сепарациона епрувета	полимер гел/силика активатор полимер гел/силика активатор/литијум хепарин	црвена/црна зелена/сива	златна светло сива
епрувета за серум (без адитива)	обложена силиконом необложена	црвена црвена	црвена роза
епрувета за серум (са адитивом)	тромбин (у праху) активатор коагулације тромбин (у праху)	зелена/жута жута/црвена светло плава	наранџаста црвена светло плава
цела крв/плазма	K <sub>2</sub> EDTA (у праху) K <sub>2</sub> EDTA (течан) Na <sub>2</sub> EDTA (у праху) trinatrijum citrat (коагулација) trinatrijum citrat (стопа седиментације) natrijum fluorid (antikoagulans) heparin, Li (у праху/течан) kalijum oksalat litijum jodoacetat	лила  светло плава црна  сива зелена светло сива светло сива	лила  светло плава црна  светло сива зелена светло сива светло сива

# Гел сепарационе епрувете



# Узимање крви шприцем

- шприцеви се обично користе код пацијената са осетљивим венама
- узету крв треба брзо пренети у одговарајуће епрувете, њих затворити и промешати инвертовањем 5 до 10 пута
- нагла сукција шприца током узимања крви или насилан трансфер из шприца у епрувете може да доведе до хемолизе крви.
- хемолиза је обично мања код игли са мањим промером, јер је турбуленција крви мања него код игли са већом пречником.

## Завршетак узимања крви

- рећи пацијенту да држи суву газу на месту убода, са подигнутом руком
- може се ставити фластер који ће да држи газу 15 мин након чега може да се скине
- флеботомиста треба да скине иглу са шприца и одложи је у контејнер за оштре предмете
- флорбеотомиста баца рукавице

# Венепункција код деце

- чешћи неочекивани покрети код деце – помоћ у држању
- могу се користити и шприц и вакутајнер
- шприц: туберкулински или 3 ml, игла 21-23G

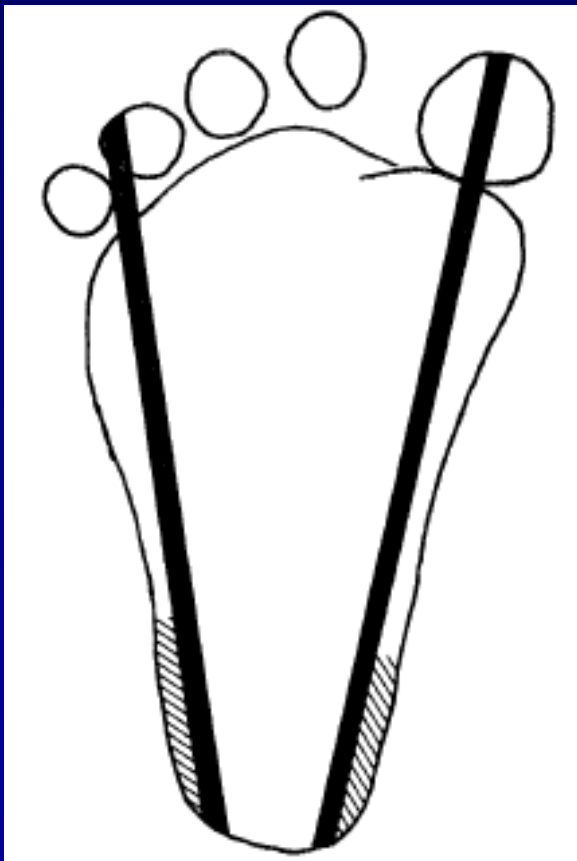
# Пункција коже

- Отворена техника сакупљања крви код које су коже пробуши ланцетом и мала запремина крви сакупи микроуређајем, као што је капилара.
- Користи се у ситуацијама када:
  - је ограничена запремина узорка (код деце)
  - су честе венепункције довело до оштећења вена
  - пацијенти имају опекотине или су бандажирани због чега вене нису доступне
  - се узорак директно тестира (на лицу места, нпр. глукоза или хемоглобин



## Пункција коже

- најчешће се узима крви из прста, затим ушне ресице, пети или палцу деце



Side-to-side limits of calcaneus marked by line extending posteriorly from point between the 4th and 5th toes and running parallel to lateral aspect of heel and line extending posteriorly from the middle of the great toe and running parallel to the medial aspect of the heel.

# Артеријска пункција

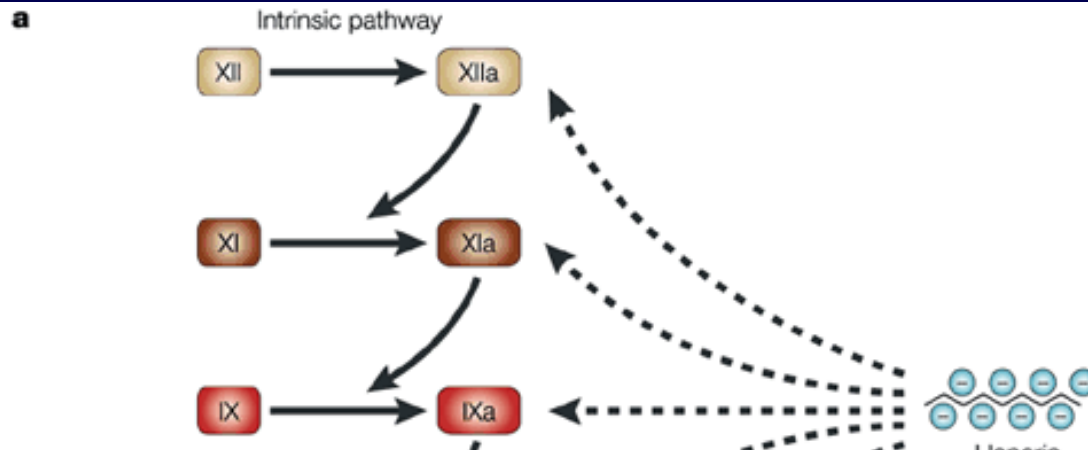
- a. radialis
- a. brachialis
- a. femoralis
- a. umbilicalis

# Антикоагуланси и конзерванси

- серум- узорак избора
- плазма
- крв

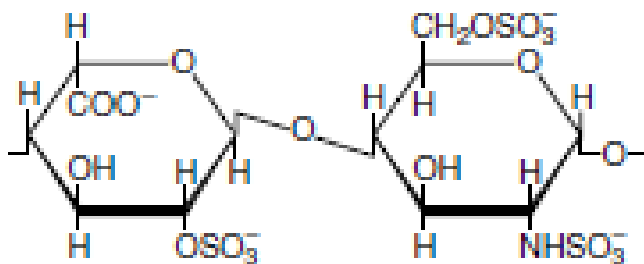
# Хепарин

- најчешће се налази у хепатинским ћелијама
- најмање је присутан у еритроцитима
- = мукополисахарид



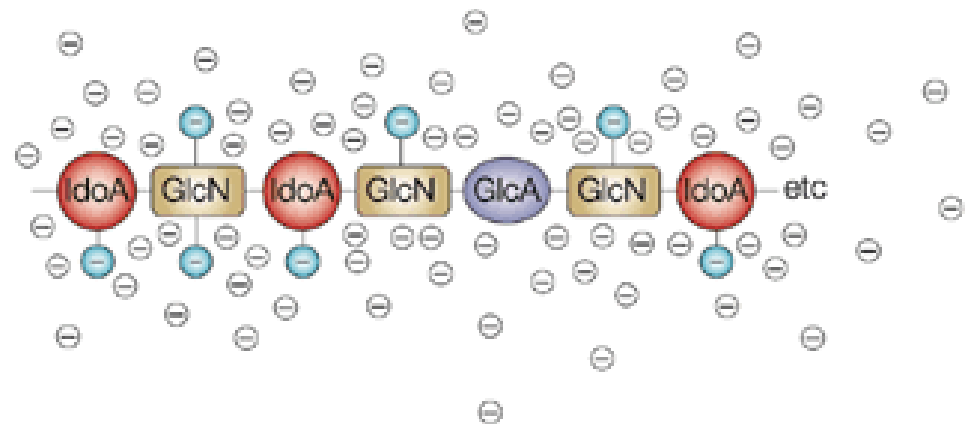
лова,

**Хепарин**

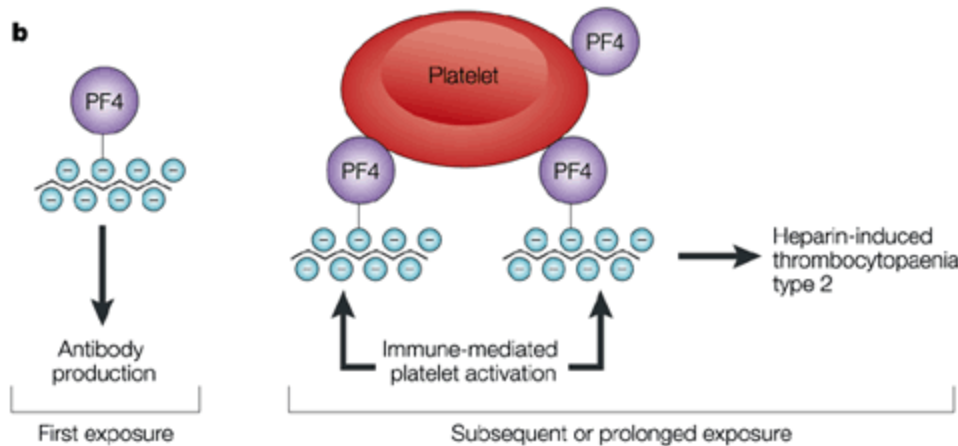
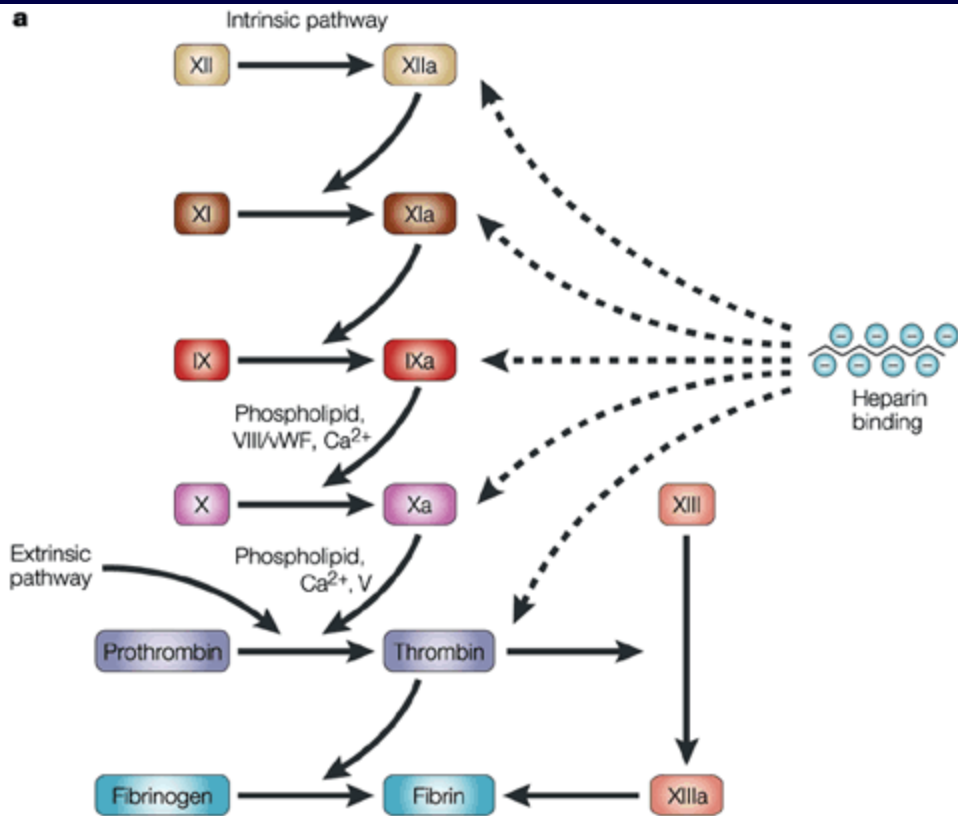


Glucuronic acid  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  Glucosamine

**b** Heparin



брзо се раствара



a | Heparin modulates blood coagulation through inhibition of the serine-protease factors XIIa, XIa, Xa, IXa and IIa (thrombin), either directly, or through potentiation of the plasma serine-protease inhibitor antithrombin. Heparin also inhibits platelet activation, an effect that is, in part, secondary to it binding to thrombin, a potent platelet-activating substance. b | A considerable percentage of patients receiving heparin therapy go on to develop the serious adverse reaction of heparin-induced thrombocytopenia type 2. This arises when antibodies are raised against a complex of heparin and platelet factor 4 (PF4). Subsequent binding of platelet-surface PF4 by heparin results in immune-mediated platelet activation and possible thrombosis. Therefore, heparin chains with insufficient length to bind PF4 are considered to be less immunogenic. V, factor V; VIII, factor VIII; vWF, von Willebrand factor.

# Хепарин

- скуп, тренутно дејство, ствара плаву позадину у размазу крви бојеном Рајтовом бојом
- инхибира дејство киселе фосфатазе
- интерферира у везивању EDTA са Ca у аналтичким методама где је то неопходно
- утиче на везивање тријодтирониона и тироксина за протеинске транспортере, чиме се добија већа слободна концентрација ових хормона

# EDTA

- хелирајући агенс посебно користан у хематолошким испитивањима јер чува ћелијске компоненте крви
- користи се као натријумова и калијумова со
- ефективна је при финалној концентрацији од 1-2 g/L
- веће концентрације доводе до хипертоничног смежуравања еритроцита
- спречава коагулацију везивањем калцијума, који је неопходан за процес коагулације
- епрувете се припремају додавањем 0.1% раствора EDTA након чега се епрувете оставе да испари вода на собној температури

# EDTA

- највероватније хелирањем кофактора метала, инхибира алкалну фосфатазу, креатин киназе и леуцин аминопептидазе
- због тога што хелира калцијум и гвожђе, EDTA није погодан за одређивање калцијум и гвожђа фотометријским или титрационим техникама.
- као антикоагуланс мало утиче на друге анализе, мада је показано снижење холестерола 3-5%



# NaF

- слаби антикоагуланс, али се често користи као конзерванс за одређивање глукозе у крви
- као конзерванс, заједно са још неким антикоагулансом као што је нпр. калијум оксалат, делује у концентрацији од приближно 2 g/L.
- испољава своје дејство антикоагуланса инхибирањем ензима гликолизе
- већина узорака се чува на 25C 24h или на 4C 48h.
- без конзерванса, концентрација глукозе у крви пада приближно 100mg/L (0.56 mmol/L) по сату на 25C.
- стопа опадања је бржа код новорођенчади због повећане метаболичке активности леукоцита.
- тешко се раствара и крв мора добро да се промеша како би се постигла блокада гликолизе

# NaF

- када се користи сам како антикоагуланс, потребне 3-5 веће концентрације него обично
- ова већа концентрација и инхибиција гликолизе могу да доведу до промене концентрације неких метаболита
- флуорид је такође потентан инхибитор многих серумских ензима и у високим концентрацијама такође утиче на уреазу

# Цитрати

- раствор натријум цитрата у концентрацији од 34-38 g/L у односу 1 према 9 (крв), често се користи у тестовима коагулације зато што се лако врши реверзија дејства додавањем калцијума
- зато што цитрати хелирају калцијум, узорак није адекватан за његово одређивање
- такође инхибира аминотрансферазе и алкалну фосфатазу, али стимулише киселу фосфатазу када је супстрат фенилфосфат
- гради комплекс са молибдатом, тако да смањује интензитет боје при мерењу фосфата

# Оксалати

- натријум, калијум, амонијум и литијум оксалати инхибирају коагулацију грађењем нерастворних комплекса са јонима калцијума
- калијум оксалат у конц. од 1-2g/L се најчешће користи
- при већим концентрацијама од 3g/L долази до хемолизе
- комбинација амонијум/калијум оксалата не доводи до смежувања еритроцита
- међутим други оксалати могу да доведу до смежувања еритроцита
- смањење хематокрита може да буде и до 10%, узрокујући смањење саставних делова плазме и до 5%
- инхибирају неколико ензима укључујући киселу и алкалну фосфатазу, амилазу и лактат дехидрогеназу и могу да доведу до таложења калцијума у виду соли оксалата

# Јодоацетат

- натријум јодоацетат при концентрацији од 2 g/L је ефикасан инхибитор гликолизе и замена за флуорид
- зато што не делује на уреазу, може да се користи када се глюкоза и уреаса одређују у истом узорку
- инхибира креатин киназу, али изгледа да нема дејство на друге тестове

# Утицај места узимања крви на њен састав

- крв добијена са различитих места се разликује у саставу
- крв из прста (пункција коже) наликује артеријској крви
- нема значајних клиничких разлика између слободног протока капиларне крви и артеријске крви у рН,  $PCO_2$ ,  $PO_2$  и засићености кисеоником
- $PCO_2$  венске крви је до 6-7 mm Hg (0.8-0.9 kPa) већи
- глукоза у венској крви је до 70 mg/L (0.39 mmol/L) нижа у односу на глукозу у капиларној крви
- крв добијена пункцијом коже је до одређене мере контаминирана интерстицијалном и интраћелијском течностју

# Узимање крви интравенском или артеријском линијом

- када се крв сакупља преко централног венског катетера или артеријске линије, неопходно је да се осигура да на њен састав не утиче течност инфузије
- инфузија се стопира, и аспирира се 10 ml крви која се одбацује, након чега се узима крв за анализу
- крв истовремено добијена преко централног венског катетера и венепункцијом се разликује
- крв која се узима венепункцијом испод интравенске линије не интерферира са инфузијом зато што у венама нема ретроградног протока

# Хемолиза

- пуцање мембране еритроцита услед чега долази до отпуштања хемоглобина
- серум показује визуелно присуство хемолизе када концентрација хемоглобина превазилази 200 mg/L
- блага хемолиза нема утицаја већину тестова
- екстензивна хемолиза узрокује благи дилуциони ефекат на она једињења која су у еритроцитима присутна у нижим концентрацијама него у плазми
- међутим ефекат је изразит на концентрацију оних једињења који су у еритроцитима присутни у високој концентрацији тако да је повећана активност алдолазе, укупне киселе фосфатазе, LDH, изоцитрат дехидрогеназе, калијума, магнезијума и фосфата
- одређивање слободног хемоглобина ради израчунавања корекционог фактора – ретко се ради



# Урин

- који се узорак урина узима зависи од жељене анализе
- узорак урина узет насумично је подесан само за понеке тестове
- обично, узорци урина морају да се сакупљају у унапред детерминисаним временским интервалима, као што су на 1, 4 или 24 сата
- чист, јутарњи урин је обично најконцентрованији узорак због чега је узорак избора за микроскопска испитивања и детекцију абнормалне количине појединих једињења као што су протеини или специфичних једињења као што је хорионски гонадотропин.

# Урин

- бактеријско испитивање првих 10 ml урина је адекватно за дијагнозу уретритиса, док се средњи млаз користи за испитивање поремећаја мокраћне бешике.
- за узорке на 2 сата довољна је флаша од 1L
- за узорке на 12 сати, довољна је флаша од 2L
- за узорке на 24 сати, обично је довољна 3-4L флаша
- Једна флаша омогућава адекватно мешање узорка и спречава могуће губитке узорка уколико друга флаша евентуално не стигне у лабораторију.
- урин не треба да се сакупља у исто време за два или више теста који захтевају различите конзервансе

# Урин

- аликвоте за анализе као што је микроскопско испитивање не треба узимати док траје 24-часовно сакупљање узорака
- екскреција микроједињења се мења током дана тако да ни евентуална корекција запремине не оправдава узимање аликвота
- узимање урина код деце: очистити и осушити скроталну или периналну површину (уклонити било коју крему)
- за насумични узорак ставити пластину кесу и сачекати да се напуни урином
- за временски одређене узорке се користи метаболички кревет
- за добијање стерилног узорка, супрапубична пункција

# Конзерванси за урин

- обично се стављају ради смањивања бактеријског дејства или хемијског распадања или растворљивости једињења која могу да преципитирају у раствору
- смањење оксидације нестабилних једињења
- неки узорци не смеју да имају конзервансе због могућности интерферирања са аналитичким тестовима
- најприхватљивији облик презервације је стављање урина у фрижидер одамх након узимања узорка
- за хемијска и микроскопска испитивања се користе конзерванси у виду таблета који садрже мешавину различитих хемикалија као што су хидрогенкалијум фосфат, натријум бензоат, бензоева киселина, хексаметилен тетрамин, натријум бикарбонат
- због присуства натријумових и калијумових соли, не користе се код анализе ових метаболита

# Конзерванси за урин

- формалин се такође користи као конзерванс, али у великим количинама доводи до преципитације урее и инхибира одређене реакције
- ацидификација испод рН 3 (10 ml HCl, 6 mol/L, за 24-часовни урин) се често користи за чување 24 часовног узорка и посебно је корисна за одређивање калцијума, стероида и VMA међутим долази до преципитације урата
- за ацидификацију се такође користе и сулфанилна киселина (10g/L urina) и борна киселина (5mg/30 ml)
- толуен је једини органски растварач који се и даље користи као конзерванс-у великим количинама представља баријеру између ваздуха и површине узорка; не спречава раст микроорганизама
- благе базе као што су натријум бикарбонат и натријум хидроксид се користе за презервацију порфирина, уробилиногена и мокраћне киселине: треба додати довољну количину да рН буде између 8 и 9

# Фецес

- окултно крвављење (чир или малигнитет гит-а)
- код деце- активност трипсина
- код одраслих- фекални азот и 72-часовни узорци ради процене тежине малапсорпције
- фекални порфирини ради одређивања врсте порфирије
- обично се не додаје конзерванс, али узорак треба чувати у фрижидеру

# Спинална течност

- прва епрувета – хемијски и серолошки тестови
- друга епрувета – микробиолошке анализе
- трећа епрувета – микроскопске и цитолошке анализе
- симултано - крв

# Синовијална течност

- артроцентеза
- ради типизације врсте артритиса и диференцијације неинфламаторне ефузије од запаљенске течности
- стерилна епрувета за културу и мерење протеина и глукозе
- EDTA епрувета за укупне леукоците и број еритроцита



- амнионска течност
- плеурална и перикардијална течност
- асцитес
- пљувачка
- брис
- чврсто ткиво
- коса и нокти

## Чување узорака

- идентификација
- презервација узорака током транспорта
  - неки узорци морају да се чувају на 4C (амонијак, PCO<sub>2</sub>, PO<sub>2</sub>, pH)
  - узорке ставити у ледену воду
  - узорке за киселу фосфатазу, лактате и пирувате, гастрин и ренин
  - систем пнеуматских цеви

## Издавање и чување узорака

- плазма и серум треба да одвоје од ћелија што пре могуће а најкасније након 2 сата
- прерано издавање серума може да доведе до дањег стварања фибрина што може да узрокује опструкцију у опреми
- коагулација је обично комплетна након 20 до 30 min у стакленим епруветама, а дуже траје у пластичним
- уколико није могуће центрифугирати узорак у року од 2 сата, боље је да се чува на собној темп него у фрижидеру ради смањивања хемоллизе
- чување узорака до анализе
- епрувете центрифугирати затворене!!!

# Транспорт узорака

- полипропиленске и полиетиленске епрувете
- избегавати стакло
- полистирен неодговарајући, може да напукне када је замрзнут
- затварач мора да онемогући цурење и не сме да се опусти под разним температурним условима
- материјали морају да буду инертни
- секундарно паковање
- замрзнути узорци