

CHYBY PŘI ODBĚRECH A ZPRACOVÁNÍ BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU

Poznámka: předložený text má poskytnout pouze informaci o možných nepříznivých ovlivněních laboratorních stanovení a to odběry, ev. prvotním zpracováním biologického materiálu. V každém případě není text určen k bezesbytkovému naučení, ale k zamyšlení nad vztahem klinických oddělení k laboratorním oborům. Pro budoucí praxi lékaře má být určitým vodítkem pro jeho dohled na práci personálu na klinickém oddělení, ev. ukazatelem možných zdrojů nevěrohodných výsledků.

PAMATUJ:

KVALITA SAMOTNÉHO LABORATORNÍHO VÝSLEDKU NIKDY NEMŮŽE BÝT LEPŠÍ NEŽ KVALITA DODANÉHO VZORKU !

Každé zdravotnické zařízení a jeho laboratoře mají svá specifika. Při jakýchkoliv pochybnostech se proto obraťte na pracovníky příslušných laboratorních oborů!

Možné zdroje chyb

1. záměna

K identifikaci vzorků pro biochemická stanovení používáme dohodnuté úpravy štítku na zkumavce (zpravidla stačí příjmení a číselný kód pacienta). Požadováno bývá také smluvené označení positivity HBsAg a HIV.

2. kontaminace

a/ infuzí, transfuzí (viz též bod 6)

b/ alfa-amylázou (AMS): sliny obsahují značnou aktivitu AMS (kýchání, kašláni, slinění štítku zkumavky)

c/ laboratorního skla: nejčastěji mycími prostředky - Na_3PO_4 + detergenty, dezinfekční prostředky

d/ bakteriální kontaminace moči: k prevenci může být do nádoby ke 24h sběru moče přidáno 1/2 Wassermannovy zkumavky (= cca 5 ml) 10 % thymolu v isopropylalkoholu. Konzervaci je možno použít téměř pro všechna b i o c h e m i c k á stanovení (výjimka: 17-ketosteroidy)

e/ kontaminace moče krví (menses)

3. špatná příprava pacienta

a/ obecně: odběr nalačno zpravidla vsedě a v ranních hodinách (viz dále "zdůvodnění standardního odběru")

b/ triacylglyceroly + cholesterol: 12 h lačnění, povoleny jen neslazené nápoje

c/ clearance endogenního kreatininu: pacient během sběru moče nesmí být vystaven těžké tělesné námaze (běžný pohyb povolen)

d/ moče chemicky + močový sediment: požadavek ranní moče - ranní moč je dostatečně koncentrovaná (měrná hmotnost > 1010) a kyselá

e/ stolice na okultní krvácení: 3 dny dieta bez masa a špenátu

f/ žaludeční chemismus: alespoň jeden den předem vysadit léky, ovlivňující sekreci (anticholinergika, antacida, ev. glukokortikoidy)

4. hemolýza

Okem je patrna od koncentrace 0,2 g Hb /l séra.

Nejčastější příčiny hemolýzy:

a/ kůže pacienta ještě vlhká, když prováděn vpich (vniknutí desinfekčního roztoku do jehly a do vzorku krve → osmotická hemolýza)

b/ násilné nasávání krve, vytvoření velkého podtlaku v inj. stříkačce (špatně nabodnutá céva, příliš úzká jehla, příliš malá céva). Nasávat zvolna - příliš velký podtlak → hemolýza

c/ odběr samotnou jehlou (bez stříkačky), kdy do vzorku krve byla "sesbírána" také část krve, která přišla do kontaktu s povrchem kůže

d/ vystřikovávání krve ze stříkačky do zkumavky: vždy sejmout jehlu, krev vypouštět po stěnách a to p o m a l u . Zvýšení tlaku + náraz krve o stěnu + vytváření pěny → hemolýza

e/ nevhodná koncentrace protisrážlivého činidla: doplněním špatného objemu krve, ale též špatným promícháním vzorku - mícháme vždy pouze n a k l á n ě n í m a otáčením zkumavky, tj. opatrným přeléváním krve. Nikdy netřepeme! Třepání → pěna → hemolýza. Dbáme rovnoměrného promíchání celého obsahu (jinak → částečné srážení + osmotická hemolýza).

- Základní údaje o antikoagulačních prostředcích budou uvedeny níže.

f/ zkumavka obsahuje stopy hemolyzujícího činidla (detergenty..)

g/ po odběru nechat krev v klidu, ve svislé poloze zkumavky alespoň 15 min za pokojové teploty = nerušený začátek srážení krve. Třepáním krve ihned po odběru vzniká hemolýza (platí i po centrifugaci neúplně sražené krve !)

h/ nevhodné skladování plné krve: vliv nadměrného tepla (blízkost ústředního topení), úplné zmrznutí krve.

Hemolýza vadí téměř pro všechny druhy biochemických stanovení:

a/ u stanovení látek, které jsou v erythrocytech ve větší koncentraci než v plazmě - jsou to zejména:

Fe - 550krát víc

ACP - 67krát víc

K⁺ - 23krát víc

LD - 160krát víc

AST - 40krát víc

b/ hemoglobin zvyšuje absorbanci mezi 300 - 500 nm, tj. jeho zbarvení ruší prakticky u všech biochemických stanovení. (Pro vysoký molární absorpční koeficient se významně uplatňuje i nízký stupeň hemolýzy)

c/ přímá interference Hb s určitými chemickými reakcemi (inhibuje např. diazotaci bilirubinu spotřebou dusitanu)

Hemolýza naprosto znemožní stanovit v séru: Fe a K⁺, prakticky nehodnotitelná jsou stanovení: bilirubinu, AST, ACP, cholesterolu, LD a bromsulfoftaleinového testu.

5. lipemie

Okem je patrna od dvojnásobku horní hranice normy triacylglycerolů, tj. od 4,6 mmol/l séra.

- samotné zkalení séra znemožňuje většinu biochemických stanovení a to zvyšováním měřených hodnot. Vzhledem k tomu, že u zdravých jedinců se lipemie vyskytuje při odběrech, které nebyly provedeny nalačno (tedy za předepsaných standardních podmínek - viz dále "zdůvodnění"), laboratoř zpravidla lipemická (= chylózní) séra vyloučí ze stanovení příslušných biochemických parametrů.

6. nedodržení časových limitů - viz též *příprava pacienta*

a/ infuze, transfuze: odběr má následovat minimálně v odstupe 30 min od skončeného podávání roztoků. (Jinak stanovíme poměry nikoliv v krvi pacienta, ale v kapalině blízke složením podávanému roztoku).

Výjimečně lze odběr uskutečnit během infuze (transfuze) z druhé končetiny nebo (nejhůře) z místa podávání roztoku po důkladném odkapání zbytku roztoku a krve z infuzní soupravy. Zásadně jímáme vzorek z proudící krve (nestlačená končetina).

b/ doprava vzorku do laboratoře OKB:

- pro stanovení parametrů acidobazické rovnováhy (= ABR) ihned nebo do 4 hod, pokud je materiál uchovávan v ledové tříšti. Vždy označit dobu odběru!

- pro stanovení iontů (minerálů) v krevním séru: do 30 min musí být v laboratoři centrifugací odděleno sérum od krevních elementů. (Přestup K+ z Erys do plazmy probíhá i při skladování plné krve v chladničce). V opačném případě bude nalezena vysoká hyperkalemie a hypochloremie (= výsledky stanovení iontů jsou pak zcela nepoužitelné !)

- běžné vzorky krve pro ostatní biochemická stanovení mají být v laboratoři centrifugovány do 1 - 2 hod po odběru. I za tuto dobu však může nastat až zvýšení hodnot ALT a LD v séru až o 10 % .

Uvedené změny nastávají, aniž dochází k hemolýze. Takto je zdůvodněna též výjimečnost zasílání vzorků plné krve mezi laboratořemi. Zásadně je nutno vyžadovat odesílání krevního séra. Takový požadavek nebývá mnohdy splněn při pohotovostních službách, kdy může být vzorek zasílán mimo vlastní zdravotnické zařízení. - Je tedy v zájmu lékaře klinického oddělení, aby se informoval i o těchto provozních skutečnostech, které mohou ovlivnit hodnoty výsledků.

c/ moče na sediment močový: do 2 hod do laboratoře (rozpad buněčných elementů) - pozor na moče, přinesené pacientem z domova!

d/ kreatininová clearance: sběr moče musí být proveden s minutovou přesností - nikoliv např. 6 - 6 hod, ale vyznačit skutečnou dobu sběru: 6:04 – 5:47 h. Laborať si časové údaje přepočítá - filtrace se vyjadřuje v ml za sekundu, proto je minutová přesnost nutná.

e/ denní doba odběrů: standardní odběry se provádějí v ranních hodinách - většina biochemických parametrů vykazuje denní rytmus změn svých hodnot.

7. nepřesná měření objemů

- u sběru moči nutno změřit celkové 24 h množství moče s chybou menší než 2 % (clearance, odpady iontů, katabolický dusík, ..). Znamená to měřit v odměrném válci s dostatečně hustě dělenou objemovou stupnicí (alespoň po 20, lépe po 10 ml), mezihodnoty odhadnout.

Je možné též **použít vážení vzorku moče** v plastických sáčcích. (Chyba, vzniklá zanedbáním hustoty bývá zpravidla menší než chyba vzniklá nepřesným měřením objemu).

JE NAPROSTO NEPŘÍPUSTNÉ odhadovat objem moče podle orientačních stupnic na džbánkách neb sáčcích. Takové nevhodné údaje i jakékoliv ztráty moče (při stolici a pod.) činí příslušná biochemická stanovení zcela bezcennými ! (Výsledek analýzy - tj. koncentrace je násobena tímto "rádoby objemem").

Důležité je poučení pacienta: sběrné období začíná okamžikem, kdy se pacient vymočil do záchodu - od tohoto okamžiku je dočasně sběrnou nádobou jeho močový měchýř. - Sběrné období končí posledním vymočením do sběrné nádoby.

8. nedostatečné promíchání vzorku

Koncentrace moče a tím i množství vylučovaných látek se během dne mění. 24 h-množství moče je proto nutno před odebráním průměrného vzorku k odeslání do laboratoře OKB dobře promíchat. **(Zanedbáním promíchání sběru moče může být dosaženo i několikanásobné chyby ve stanovovaném parametru!).** Na zkumavku s průměrným vzorkem vždy vyznačíme objem moče za 24 h (diurézu).

9. vliv světla

Dlouhodobé stání vzorku krve neb moče na světle (zvl. přímé sluneční paprsky) snižuje koncentraci např. bilirubinu + porfyrinů (tj. fotosenzitivních látek).

10. dlouhodobé skladování v chladničce

U otevřených zkumavek vede k vymrznání vody z krevního séra a tím k zahušťování jednotlivých komponent. - Při několikedenním skladování vzorků je nutno zkumavky vždy zazátkovat.

11. jiná ovlivnění biochemických hodnot

Ovlivnění podávanými léky, tělesnou zátěží, pohlavními a věkovými rozdíly, biologickými cykly, graviditou a pod. - Tento okruh problémů patří převážně do problematiky interpretace výsledků, na některá fakta je však nutno laboratoř předem upozornit.

ANTIKOAGULAČNÍ PROSTŘEDKY

Dnes je v praxi používán pro odběry systém předem připravených vakuovaných zkumavek, různobarevně označených. V jednotlivých druzích zkumavek je zvoleno vakuum tak, aby umožnilo odebrat určité objemy krve, vhodné k získání správné výsledné koncentrace antikoagulačního prostředku.

Níže uvedený způsob odběrů je uveden jen z didaktických důvodů jako příklad postupů, kdy by nebylo používáno komerčně připravených, zpravidla vakuovaných zkumavek.

Obecně je nutno zachovat optimální poměr mezi krví a antikoagulačním prostředkem, tedy je nutno vědět, pro jaký objem krve je antikoagulační prostředek určen. V daném zdravotnickém zařízení je třeba se s touto skutečností seznámit.

Pro všechna množství níže uvedených antikoagulačních prostředků platí, že se doplňují krví do celkového objemu 2 ml.

Výjimka: odběr na stanovení prothrombinového času dle Quicka (5 ml).

1/ CHELATONÁT DRASELNÝ

(K₂EDTA = draselná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové, odparek z 0,1 ml roztoku = 3 mg K₂EDTA).

(Nevhodný pro stanovení koncentrace K⁺ - současné systémy proto používají nikoliv draselnou, ale lithnou sůl.

Li⁺ však může způsobovat problémy u plamenové fotometrie, kde je používáno lithné soli jako tzv. vnitřního standardu).

Odparek chelatonátu ve zkumavce doplníme cca 2 ml krve. Promícháme nakláněním zkumavky - nikoliv třepáním (viz bod 4f).

2/ ISOTONICKÝ CITRÁT SODNÝ (trojsodná sůl, 3,8 % roztok)

a/ rekalcifikační čas plazmy: 0,2 ml citrátu doplnit krví do 2 ml

b/ sedimentace (FW): 0,4 ml citrátu doplnit krví do 2 ml

Způsob promíchání krve ve stříkačkách: stříkačku válet mezi dlaněmi obou rukou za současného otáčení roviny dlaní.

3/ HEPARIN

Pro stanovení parametrů acidobazické rovnováhy se stříkačka vypláchne nabráním a vystříknutím heparinu tak, že heparin tvoří tenký film na stěnách stříkačky a po vypuzení ze stříkačky zůstává v jejím krčku (konusu).

Do takto připravené stříkačky se **a n a e r o b n ě** naberou 2 ml krve. Promíchá se, jak shora uvedeno, po předchozím uzavření stříkačky (zabodnutí jehly do **g u m o v é** zátky).

ODBĚR NA STANOVENÍ PROTHROMBINOVÉHO ČASU DLE QUICKA

0,5 ml 1,34 % roztoku šťavelanu (oxalátu) sodného doplnit krví do **5 ml**. Promíchat shodně, jak uvedeno pod bodem 2, tj. netřepat!

ZDŮVODNĚNÍ STANDARDNÍHO ODBĚRU

1/ ODBĚR NALAČNO

Většina "normálních hodnot" je stanovena nalačno. Tedy srovnatelné jsou jediné ty hodnoty, které stanovujeme u pacienta rovněž nalačno.

Sérum nebo plazma zdravých jedinců nejsou nalačno lipemické (= chylózní) - lze takto vyloučit závažnou překážku pro většinu biochemických stanovení (viz bod 5). Navíc potravou jsou značně ovlivněny zejména hodnoty triacylglycerolů, fosfátů a glukosy v séru krevním.

Výjimku z odběrů nalačno tvoří pouze sledování rizikových faktorů (glukosa, lipidy, kyselina močová, ...) za poměrů obvyklých pro pacienta nebo po metabolické "zátěži" známé velikosti (např. oGTT = orální glukosový toleranční test).

2/ POLOHA PACIENTA PŘI ODBĚRU

Odběr provádíme opakovaně za stejné polohy pacienta, tj. zpravidla vsedě. - Rozdíl v odběru u sedícího a ležícího jedince může způsobit až 10 % odchylku v těch stanovovaných parametrech, které jsou závislé na vysokomolekulárních látkách - bílkovinách (= lipidy, hormony, bilirubin, Fe, ...) nebo na elementech krevních (Hb, hematokrit, počet Erys + Lkcs, ...). U stanovení enzymů je tento rozdíl nepodstatný (vysoký variační koeficient metodik na stanovení enzymů).

Rozdíl, závislý na poloze vyšetřovaného jedince, je způsoben únikem intravazální tekutiny do mezibuněčného prostoru ve stoje neb vsedě. U ležícího najdeme tedy vždy nižší hodnoty uvedených parametrů. (Falešný dojem "spontánního zlepšení" hyperlipoproteinemií po hospitalizaci, ...).

3/ ROZDÍLY RŮZNÝCH VZORKŮ KRVE

(kapilární, venózní, arteriální), rozdíly vzniklé stanovením v plné krvi a v séru neb plazmě

Některé parametry (glukosa, parametry acidobazické rovnováhy, ...) jsou srovnatelné pouze za zachování některých shodných podmínek shora jmenovaných.

(Glykemie z venózní krve může mít proti kapilární krvi až o 2,8 mmol/l nižší hodnotu, u ABR nelze z venózní krve hodnotit respirační komponentu, ale pouze metabolickou.

Glukosa v plazmě neb v séru má vyšší koncentraci oproti plné krvi, protože v plné krvi je část objemu vzorku vyplněna Erys a Lkcs, které "nemají" glukosu.)

POUŽITÉ ZKRATKY

a. = arteriální
ABR = acidobazická rovnováha
ACP = (acid phosphatase) kyselá fosfatáza
ALT = alaninaminotransferáza
AMS = alfa-amyláza
AST = aspartataminotransferáza
bi = bilirubin
BSP = bromsulfoftaleinový test
chol = cholesterol
dU- = (daily urine) (předpona) v moči za den
Erys = erythrocyty

Fe = (ferrum) železo
Hb = hemoglobin
het = hematokrit
K⁺ = (kalium) draslík
LD = laktatdehydrogenáza
Lkcs = leukocyty
oGTT = orální glukosový toleranční test
OKB = oddělení klinické biochemie
P- = (předpona) v plazmě
S- = (předpona) v séru krevním
v. = venózní