

SEED Hematologia



Faza przedanalityczna: prawidłowe warunki do uzyskania wyników o wysokiej jakości (cz. I)

Laboratoria medyczne są fundamentem prawidłowej diagnozy i opieki nad pacjentem. Pomimo dużej automatyzacji, w laboratoriach medycznych nadal istnieje wiele zmiennych wpływających na wyniki laboratoryjne. Wydanie odpowiedniego wyniku wymaga, aby wszystkie fazy – przedanalityczna, analityczna i postanalityczna – były w jak największym stopniu wolne od błędów. Błędy dotyczące fazy przedanalitycznej stanowią nawet 70 % [1]. Jakość zależy od wielu powiązanych ze sobą czynników, precyzja i dokładność nie są więc jej jedyną gwarancją. Od samego początku wszystkie trzy fazy muszą być monitorowane i kontrolowane pod względem jakości. Celem kontroli jakości jest zminimalizowanie błędów laboratoryjnych. Minimalizując błędy na każdym etapie fazy przedanalitycznej, jesteśmy w stanie poprawić wiarygodność wyników analitycznych, zmniejszyć liczbę pobrań, a tym samym polepszyć czas realizacji i zarządzanie wynikami pacjentów.

Czym jest faza przedanalityczna?

Faza przedanalityczna obejmuje wszystkie czynności wykonywane przed właściwą analizą laboratoryjną. Wpływa na nią wiele czynników, takich jak pobranie próbki, postępowanie z próbką, obecność substancji interferujących i czynniki zależne od pacjenta, które mogą stanowić źródło wydania nieprawidłowego wyniku.

Czynniki zależne od pacjenta mogą zostać podzielone w sposób przedstawiony poniżej:

Tabela 1 Czynniki wpływające na wynik badania laboratoryjnego

Stać	Długoterminowe	Krótkoterminowe
populacja	wiek	pozycja ciała
płeć	ciąża	wysiłek fizyczny
	wysokość nad poziomem morza	stres
	nikotyna	wahania dobowe
	alkohol	dieta
	leki	
	dieta	

Niektóre czynniki przedanalityczne mogą być kontrolowane (np. zmienne dotyczące próbki). Natomiast niezbędna jest wiedza o zmiennych niekontrolowanych, wpływających na otrzymane wyniki laboratoryjne, aby móc je oddzielić od zmian związanych z chorobą. Niektóre z wymienionych zmiennych mogą wpływać na wyniki hematologiczne [2]:

Populacja

Znaczne różnice występują u obu płci populacji afrykańskiej w porównaniu do populacji kaukaskiej. Na przykład osoby czarnoskóre mają znacznie niższy poziom krwinek białych (WBC) oraz ich poszczególnych rodzajów.

Płeć

Poza różnicami charakterystycznymi dla płci, takimi jak hormony, u kobiet niższa jest liczba krwinek czerwonych i stężenie hemoglobiny.

Wiek

Wiele parametrów ma różne wartości u dzieci i osób dorosłych. U dzieci do 6 roku życia populacje białych krwinek (WBC) takie jak limfocyty i neutrofile mają inny zakres referencyjny niż dorośli [3].

Ciąża

W czasie ciąży, nawet przy braku powikłań, niektóre parametry hematologiczne mogą się zmieniać. Podczas zdrowej ciąży średnia objętość osocza wzrasta z około 2,6 l do 3,9 l. Niewielkie zmiany w objętości zachodzą przez pierwsze 10 tygodni, natomiast znacznie większe do 35 tygodnia ciąży, a następnie się stabilizują [2].

Wysokość nad poziomem morza

Niektóre składniki krwi zmieniają się w zależności od wysokości nad poziomem morza. Znacząco zwiększa się wartość hematokrytu i hemoglobiny (do 8% przy 1400 m n.p.m.) [2].

Nikotyna

Ważne jest aby zapytać pacjenta czy pali papierosy. Przewlekłe palenie nikotyny powoduje wzrost liczby WBC, HGB oraz HCT [4].

Dieta

Dieta może wpływać na wyniki uzyskane z analizatorów. Niedokrwistość od dawna jest uznawana za poważny problem medyczny, dotyczący znaczną część światowej populacji i dotyczy osób w każdym wieku. Obliczono, że około 24,8% [5] światowej populacji cierpi na niedokrwistość. Około 50% wszystkich niedokrwistości jest spowodowanych niedoborem żelaza, czego powodem jest nieodpowiednia dieta i / lub utrata krwi. Jest to najczęściej występująca, uleczalna anemia. Stężenia HGB i ekwiwalent hemoglobiny w retikulocytach (RET-He) w tych przypadkach [6] są niższe niż wartości referencyjne, zależne od płci i wieku.

Pozycja ciała

Wyniki badań mogą się różnić w zależności czy badanie jest wykonywane w pozycji siedzącej czy leżącej. Jeżeli pozycja zostaje zmieniona z pozycji leżącej do siedzącej, to objętość osocza u pacjenta może być zmniejszona nawet o 12%. Zmiana tej objętości prowadzi do zmian w stężeniu komórek, makrocząsteczek oraz małych cząsteczek [2].

Stres fizyczny i psychiczny

W stanie stresu fizycznego czy psychicznego, liczba WBC może być wyższa niż normalna wartość u danego pacjenta [7, 8].

Leki

Leki uzależniające, takie jak: amfetamina, morfina, heroina, konopie indyjskie i kokaina mogą wpływać na wyniki badań laboratoryjnych [9]. Ponadto opisy przypadków i niektóre udokumentowane badania wskazują, że leki mogą być przyczyną agranulocytozy i niedokrwistości aplastycznej [10]. Ubocznym skutkiem działania leków cytotoksycznych, stosowanych podczas chemioterapii, może być występowanie niskiej liczby krwinek białych [11].

Jaki jest najlepszy czas na pobranie próbki?

Aby otrzymać porównywalne wyniki, sposób pobierania próbek powinien być stały. Liczba komórek jest zależna od krążenia krwi co oznacza, że próbki krwi powinny zostać pobrane zawsze o tej samej porze dnia. W ciągu dnia organizm przystosowuje się zarówno do czynników środowiskowych jak i czynników indywidualnych.

Zalecenia [2] dotyczące czasu pobierania:

- Próbki należy pobierać pomiędzy 7 a 9 rano, około 8-16 godzin po ostatnim posiłku (najlepiej 12 godzin).
- Pobranie krwi najlepiej przeprowadzić przed wykonaniem innych zabiegów.
- Przy monitorowaniu leczenia należy zwrócić szczególną uwagę na moment największego stężenia leku po podaniu oraz na stan stabilizacji przed kolejną dawką.
- Dokumentacja powinna zawierać dokładny czas pobrania krwi.

Jak sposób pobrania krwi wpływa na wynik badanie hematologicznego?

Celem każdego badania jest otrzymanie próbki odzwierciedlającej stan pacjenta, odpowiedniej do badania oraz niezmienionej przez sposób pobrania (użyte antykoagulanty, transport i warunki przechowywania).

Jeśli próbka krwi jest źle pobrana, wyniki mogą być niedokładne i mylące dla lekarza. W konsekwencji pacjent może być niepotrzebnie poddany powtórnym badaniom. Głównymi problemami wynikającymi z błędów przy pobieraniu krwi jest hemoliza, zanieczyszczenia, niedokładne etykietowanie i agregacja płytek.

Czynniki zwiększające ryzyko hemolizy:

- użycie igły o zbyt małej średnicy (23G lub mniej),
- zbyt duża siła nacisku strzykawki przy pobieraniu krwi do próbki, która powoduje rozerwanie krwinek czerwonych i zmniejszenie ich ilości,
- pobranie próbki krwi z kaniuli dożylnnej (wenflon) lub wkłucia centralnego,

- niewystarczająca ilość pobranej krwi, powodująca nieprawidłowy stosunek antykoagulantu do pobranego materiału,
- zbyt energiczne mieszanie próbek,
- nieodczekanie do wyschnięcia alkoholu lub środka dezynfekującego,
- używanie zbyt dużej próżni, np. użycie zbyt dużej próbówki dla pacjenta pediatrycznego lub zbyt dużej strzykawki (10-20 ml) [12].

Należy wybrać odpowiedni rodzaj próbówki w zależności od badań, które mają zostać wykonane:

- krew żylna do rutynowych badań hematologicznych i celów terapeutycznych,
- krew włóścikowa (pobierana z pięty lub palca) do analizy krwi noworodków, niemowląt i w niektórych przypadkach dorosłych pacjentów ze słabą kondycją żył, oparzeniami i bliznami w miejscach, skąd pobiera się krew, otyłość, częste badania krwi, pacjenci przed chemioterapią lub podaniem dożylnie leków,
- gazometria krwi tętniczej u pacjentów wentylowanych mechanicznie oraz do monitorowania utlenowania krwi.

Wskazówki – pobieranie krwi żylniej

- Próbówki do pobierania krwi nie należy używać po upływie jej daty ważności w celu zapewnienia, że próbka nadaje się do badań. W próbkach z antykoagulantem, który jest przeterminowany bardzo możliwe jest, że wymagana ilość krwi nie zostanie pobrana do próbówki i wyniki będą nieprawidłowe.
- Krew należy pobierać w odpowiedniej kolejności aby uniknąć reakcji krzyżowej między antykoagulantami.

Tabela 2 Zalecana kolejność pobierania wybranych próbek krwi

Kolejność	Typ próbówki	Dodatek
1	Posiew krwi	Płynne podłoże hodowlane
2	Bez antykoagulantu	
3	Koagulacja	Cytrynian sodu
4	Aktywator krzepnięcia	Aktywator krzepnięcia
5	Separator surowicy	Brak
6	Heparyna sodowa/litowa	Heparyna sodowa lub litowa
7	Próbówka do oddzielenia osocza	Antykoagulant heparyny litowej i separator żelowy
8	EDTA	EDTA
9	Krew	Kwaśny cytrynian dekstrozy
10	Fluorek szczawianu	Fluorek sodu i szczawian potasu

Znaczenie próbek i ich zawartości

Próbówki nie są biernym narzędziem do przechowywania krwi. Zawierają różne składniki, m.in. antykoagulanty, które mogą zakłócać analizę. Materiały zastosowane do produkcji próbek dla krwi żylniej i kapilarnej oraz technika pobierania zostały zaprojektowane tak, aby nie wpływały na całkowity błąd w analizie lub nie zmniejszały efektywności badania, do którego zostały przeznaczone. Aby upewnić się, że mierzone wartości są prawidłowe, laboratoria powinny zapoznać się z literaturą kliniczną oraz informacjami o producencie próbek.

Aby zapobiec wykrzepianiu się krwi, wewnątrz próbek pokryte jest antykoagulantem. Najczęściej stosowane antykoagulanty w pełnej analizie krwi to: kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA), heparyna oraz cytrynian. Antykoagulanty, które dodawane są do próbek w celu zachowania pewnych wartości mierzonych, mogą powodować powstawanie nieprawidłowości w pomiarze innych parametrów. Często dzieje się tak na skutek interferencji w wiązaniu lub wytrącania się kompleksu antygen-przeciwciała.

EDTA

EDTA jest związkem chelatującym, który wiąże wapń i zapobiega krzepnięciu krwi. Jest to antykoagulant najczęściej stosowany w hematologii. Z trzech występujących form, zalecanym przez International Council for Standardization in Haematology (ICSH) jest K2-EDTA. Z uwagi na swoje właściwości chelatujące, K2-EDTA może interferować w niektóre badania np. wiążąc jony metali (tj. cynk i magnez), które są katalizatorami dla enzymów. Z tego powodu stosunek krwi do EDTA jest ważny dla uzyskania optymalnych wyników badania. EDTA w wysokich stężeniach może hipertonicznie obkurczać RBC i wpływać na wielkość krwinek czerwonych powodując ich zmiany morfologiczne.

Heparyna

Heparyna jako antykoagulant stosowana jest powszechnie w biochemii oraz specjalnych badaniach biochemicznych. Główne działanie heparyny odbywa się poprzez połączenie z antytrombiną III. Związek ten może zakłócać niektóre reakcje przeciwciała-antygen. Zastosowanie heparyny zmniejsza szybkość reakcji przeciwciała, szczególnie w etapie wytrącania w układzie przeciwciała drugorzędowych. Rekomendowaną formą heparyny jest heparyna litowa, ponieważ jest najmniej prawdopodobne, że zakłóci badania innych jonów. Heparyna jest jedynym antykoagulantem, który służy do oznaczania pH, gazometrii, elektrolitów, zjonizowanego wapnia i cytogenetyki. Nie powinna być używana do badań koagulologicznych i hematologicznych.

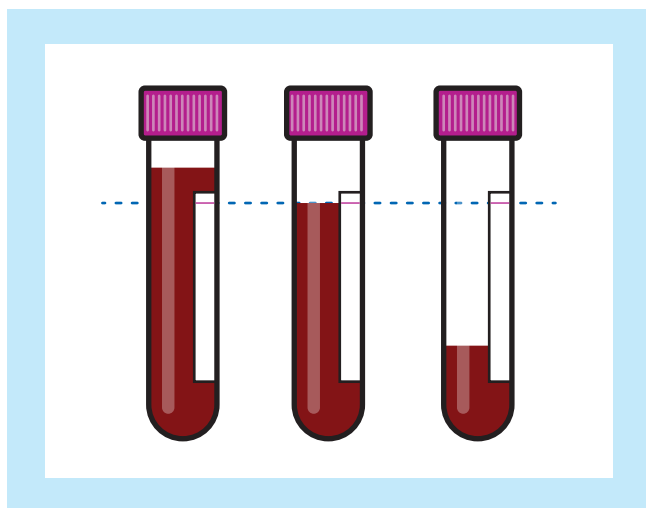
Cytrynian sodu

Cytrynian sodu, zbuforowany lub nie, to standardowy antykoagulant używany do badania krzepnięcia krwi. Dostępny jest jedynie w formie płynnej. Umożliwia to zachowanie stosunku 9:1 (krew: cytrynian), co zalecane jest w diagnostyce krzepnięcia krwi.

U niektórych osób EDTA może powodować niedokładne pomiary wartości płytek krwi. Powstające anomalie tj. agregowanie płytek i satelityzm płytek krwi mogą być wynikiem zmian w strukturze błony, które powstają gdy jon wapnia usuwany jest przez środek chelatujący. Umożliwia to wiązanie się wcześniej uformowanych przeciwciał z płytkami krwi. W takim przypadku czasami stosuje się próbkówki z cytrynianem sodu, aby uzyskać dokładniejszą liczbę płytek krwi [2].

Prawidłowa objętość próbki

Odpowiednie wypełnienie próbkówki materiałem jest wymagane do przeprowadzenia prawidłowej analizy. Niewystarczające wypełnienie próbkówki EDTA może prowadzić do nieprawidłowych wyników objętości krwinek lub średniej objętości komórek (MCV), średniej zawartości hemoglobiny w krwince czerwonej (MCHC), rozpiętości rozkładu objętości erytrocytów (RDW) i wartości RBC. Może również przyczynić się do zmian w morfologii krwinek białych i czerwonych. EDTA jest hipertoniczny i powoduje występowanie echinocytów. W przypadku pobrania zbyt dużej objętości krwi, w próbkówce będzie zbyt mało EDTA i może dojść do wykrzepiania.



Ryc. 1 Próbkówki EDTA od lewej do prawej: przepełniona, prawidłowa i niedopełniona

Transport i przechowywanie

Prawidłowe pobranie próbki krwi odgrywa ważną rolę w procesie przedanalitycznym. Transport i przechowywanie pobranego materiału odgrywa raczej drugorzędą rolę w procesie przedanalitycznym. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) zaleca [15] aby próbki przechowywane były w temperaturze 4°C. W tabeli 3 opisana została trwałość poszczególnych parametrów.

Trwałość parametrów hematologicznych zależy od rodzaju badania, użytej metody, technologii oraz odczynników wykorzystanych w analizie. Zaleca się zatem przestrzeganie instrukcji dostarczonej przez producenta.

Tabela 3 Stabilność parametrów hematologicznych próbki krwi pobranej na EDTA

Parametr	Przechowywanie w temperaturze 4°C	Skutek nieprawidłowego przechowywania
HGB	Stabilność do 72 h	
RBC	Stabilność do 72 h	
MCV	Stabilność do 6-12 h	tendencja do wzrostu
HCT	Stabilność do 6-12 h	tendencja do wzrostu
PLT	Stabilność do 24 h	
RET	Stabilność do 72 h	
WBC	Stabilność do 72 h	

Próbki należy przynosić w specjalnych pojemnikach, w temperaturze pokojowej i w jak najkrótszym czasie. Czas transportu jest bardzo ważny w przypadku, gdy temperatura otoczenia wynosi ponad 22°C, ponieważ może spowodować pogorszenie jakości pobranego materiału [16].

Podsumowanie

Czynniki utrudniające analizę próbki:

- błędy w przygotowaniu pacjenta do badania
- brakujące lub błędne informacje o pacjencie
- mylnie podany czas pobrania materiału
- nieprawidłowa ilość pobranego materiału
- nieprawidłowe przechowywanie próbek
- nieprawidłowo dobrany antykoagulant
- niewłaściwie dobrany rodzaj/wielkość próbkówki
- nieprawidłowe proporcje między antykoagulantem a pobranym materiałem
- przestarzałe próbki
- zamrożenie próbek
- nieprawidłowy sposób transportu próbki lub zła temperatura przechowywania
- niedostatecznie wymieszana próbka
- czynniki interferujące tj. hemoliza, żółtaczką, lipemia
- niedokładna komunikacja pomiędzy laboratorium, lekarzami i personelem medycznym

Wniosek

Wiedza o zmiennych przedanalitycznych i ich wpływie na badania hematologiczne jest pierwszym krokiem do zapewnienia wiarygodnych wyników. Poprzez minimalizację częstotliwości występowania błędów przedanalitycznych opieka nad pacjentem może być zoptymalizowana, koszty laboratoryjne obniżone, a współpraca lekarzy z laboratorium ulepszona.

W części II „Faza przedanalityczna: prawidłowe warunki do uzyskania wyników o wysokiej jakości” – znaleźć można wskazówki oraz zasady poprawnego pobierania materiału.

Źródła

- [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): Worldwide 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.