

# Priporočila za ravnanje s krvnimi vzorci

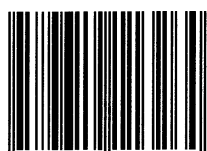
8

Marija PRÉZEŠIČ



SLOVENSKO ZDRUŽENJE  
ZAKLINIČNOKEMIČARJEV

ISBN 961-91132-6-8



9 789619 113264

Ta priporočila izdaja in priporoča Slovensko združenje za klinično kemijo (SZKK). Priporočila so v skladu s predpisi Republike Slovenije, priporočili Mednarodnega združenja za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (IFCC - "International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine") in Inštituta za klinične in laboratorijske standarde CLSI ("Clinical and Laboratory Standards Institute").

Uredniški odbor: Saša Bratož (predsednik)  
Pika Meško Brguljan  
Evgenija Homšak

## PRIPOROČILA ZA RAVNANJE S KRVNIMI VZORCI

Pripravila: Marija Prezelj

Recenzent: Milan Skitek

Lektorica: Blanka Husu

Predstavitev priporočenih postopkov za delo v kliničnokemijskih laboratorijih Republike Slovenije ima namen, da se z obvezno uporabo le-teh doseže visoka stopnja kakovosti dela, upoštevajoč sistematizacijo dela, pribora in prostorov.

"Priporočeni postopki za transport krvnih in drugih diagnostičnih vzorcev" so namenjeni vsem sodelavcem v klinično kemijskih laboratorijih, zdravstvenim delavcem ter študentom in učencem zdravstvenih šol.

Priporočila je pregledal in odobril Razširjeni strokovni kolegij za laboratorijsko diagnostiko pri Ministrstvu za zdravje Republike Slovenije in se uporabljajo za delo v vseh medicinskih laboratorijih.

CIP - Kataložni zapis o publikaciji  
Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

616-074

PREZELJ, Marija, 1948-

Priporočila za ravnanje s krvnimi vzorci / Marija Prezelj. -  
Ljubljana : Slovensko združenje za klinično kemijo, 2006

ISBN 961-91132-6-8

225647616

## Vsebina

1. UVOD .....	4
2. PREDPISANI VARNOSTNI UKREPI .....	4
3. RAVNANJE Z VZORCEM VENSKE KRVI .....	5
3.1 Priprava seruma in plazme iz polne krvi .....	5
3.2 Dejavniki, ki vplivajo na rezultate .....	5
3.2.1 Antikoagulant .....	5
3.2.2 Čas .....	6
3.2.3 Lega epruvete .....	7
3.2.4 Temperatura .....	7
3.2.5 Inhibitorji in stabilizatorji presnove .....	8
3.2.6 Pretresanje vzorcev in hemoliza .....	8
3.2.7 Svetloba .....	9
4. PRIPRAVA VZORCA ZA CENTRIFUGIRANJE .....	9
5. CENTRIFUGIRANJE .....	10
5.1 Čas centrifugiranja in relativna centrifugalna sila .....	10
5.2 Hladilna centrifuga .....	12
5.3 Ponovno centrifugiranje .....	12
6. PRIPOMOČKI ZA LOČEVANJE SERUMA/PLAZME .....	12
6.1 Pripomočki, ki jih uporabljamo med centrifugiranjem .....	12
6.1.1 Epruvete z gelom .....	12
6.1.2 Ločitveni pripomočki brez gela .....	13
6.2 Pripomočki, uporabljeni po centrifugiranju .....	13
7. SHRANJEVANJE VZORCEV .....	14
8. RAVNANJE Z VZORCI OB SPREJEMU V LABORATORIJ .....	15
9. MERILA ZA ZAVRNITEV VZORCA .....	15
10. LITERATURA .....	17

## **Beseda recenzenta**

Pravilno ravnanje z biološkimi vzorci (v katerega je vključen tudi hiter in učinkovit transport le-teh) je temeljni kamen celostnega zagotavljanja kakovosti v vsakem medicinskem laboratoriju. Še pred nekaj leti zapostavljeno področje dobiva v dobi digitalizacije in avtomatizacije poseben pomen in predstavlja pomemben delež k realni dodani vrednosti laboratorijskih testov. Obstoja več smernic in priporočil za ravnanje s krvnimi vzorci na svetovni in evropski ravni, v to mrežo pa se vključujejo tudi nacionalna priporočila, ki ob upoštevanju mednarodnih smernic vsebujejo še specifične zahteve in merila v skladu z zakonodajo posameznih držav.

Tako so pred nami slovenska »Priporočila za ravnanje s krvnimi vzorci« in »Priporočila za transport krvnih in drugih diagnostičnih vzorcev«, ki predstavljajo v celostni in povezani obliki kamenček v mozaiku prizadevanj za izboljšanje našega, laboratorijskega dela v svrhu čimboljše, zanesljive in varne oskrbe bolnikov. Priporočila predstavljajo tudi proces usklajevanja v globalnem svetu z nacionalnimi možnostmi v naši stroki. Ta proces se nadaljuje in nas obvezuje, da budno spremljamo in vgrajujemo v sistem vsa nova spoznanja na hitro se spreminjajočem področju laboratorijske medicine.

*Recenzent doc.dr. Milan Skitek, spec. med.biok.*

# 1 UVOD

Namen kliničnokemijskega laboratorija je celovita dejavnost, ki zagotavlja zanesljive rezultate; zdravniki jih upoštevajo pri nadaljnjih odločitvah v diagnostiki in pri terapiji. Veliko truda je vložena za pripravo novih, sodobnih in zahtevnih analiznih tehnik, s katerimi pridemo do zanesljivejših in hitreje dostopnih podatkov. Prepogosto pa premalo pozornosti namenjamo postopkom pred analitiko. Predanalitičnih postopkov ne smemo zanemarjati (omaloževati), saj dogajanje v tem času vpliva na vzorec in s tem na pravilne rezultate. Skrbna priprava bolnika, pravilen odvzem vzorca, ustrezno ravnanje s pridobljenim vzorcem in njegov transport so prvi pogoji za doseganje zanesljivih rezultatov. Vzorec mora biti za analizo pravilno pripravljen in kakovosten.

V priporočilu navajamo postopke za pravilno vzdrževanje krvnih vzorcev do laboratorija, kjer bo vzorec analiziran. Za neoporečno analizo tega vzorca je potrebno pravilno pakiranje, označevanje, etiketiranje, ustrezna in pravočasna dostava v laboratorij. Priporočila so namenjena vsem, ki odvijajo krvne vzorce za analizo seruma in/ali plazme ter polne krvi in jih pošiljajo v laboratorij zdravstvene ali raziskovalne ustanove.

# 2 PREDPISANI VARNOSTNI UKREPI

Ker pogosto ni mogoče vedeti, kateri vzorec je kužen (infektiven), moramo zato z vsakim ravnati enako previdno, skrbno in varno, kot da bi bili okuženi vsi vzorci. Z vsakim vzorcem ravnamo kot s kužno snovjo v skladu s "standardnimi varnostnimi ukrepi" (1).

Biti moramo pazljivi, da z vzorci ne onesnažimo zunanje stene epruвет, zbirne posodice in okolice. Če vzorec polijemo, moramo površino takoj očistiti in razkužiti z ustreznim razkužilom. Naročniški list za laboratorijske preiskave ne sme priti v stik z vzorcem. Upoštevati moramo lokalne varnostne predpise; napisani morajo biti razumljivo in vsem dostopni.

# 3 RAVNANJE Z VZORCEM VENSKE KRVI

Potem ko odvijamo kri po priporočenih navodilih za odvzem venske krvi, moramo s takimi vzorci ravnati skrbno in po spodaj navedenih navodilih (2).

## 3.1 Priprava seruma in plazme iz polne krvi

### Serum

Serum je supernatant (krvna tekočina), ki ga dobimo po centrifugiranju vzorca polne krvi, odvzete v epruveto brez dodanih antikoagulantov.

Kri centrifugiramo po končani koagulaciji.

### Plazma

Plazma je supernatant, ki ga dobimo po centrifugiranju polne krvi, odvzete v epruveto z dodanim antikoagulantom.

Antikoagulanti na različne načine preprečijo (inhibirajo) nastanek strdka. Vzorec, odvzet v epruveto z antikoagulantom, lahko centrifugiramo takoj po odvzemu.

Vse epruvete z dodatki, razen epruvete z natrijevim citratom, moramo po odvzemu krvi rahlo obrniti najmanj pet- do desetkrat, da premešamo vsebino. Epruvete z dodanim natrijevim citratom pa obrnemo tri- do štirikrat. Upoštevati moramo tudi navodila proizvajalca epruвет.

## 3.2 Dejavniki, ki vplivajo na rezultate

Najpomembnejši in najpogostejši dejavniki, ki lahko med ravnanjem s krvnim vzorcem in njegovim transportom vplivajo na rezultat analize, so antikoagulant, čas, lega epruветe, temperatura, inhibitorji in stabilizatorji, pretresanje vzorcev, svetloba.

### 3.2.1 Antikoagulant

Za nekatere analize je zelo pomembno, da je kri odvzeta v epruveto z antikoagulantom, za druge analize pa brez njega. Razlike med vrednostmi za posamezne analite v serumu ali plazmi se lahko pojavijo, ker:

- se analit porablja med koagulacijo: fibrinogen, trombociti, glukoza;
- se analit sprošča iz celic med koagulacijo: kalij, laktat dehidrogenaza (LDH), fosfat, amoniak, laktat;



- antikoagulant moti pri nekaterih določitvah: gama-glutamil transferaza (GGT), litija s plamensko fotometrijo;
- fibrinogen moti pri nekaterih analiznih metodah.

### 3.2.2 Čas

Priporočilo: dokler se dokončno ne ugotovi, ali dalj trajajoči stik prispeva k nepravilnosti rezultatov, naj se serum ali plazma čim prej ločita od krvnih celic. Vzorec moramo prinesiti v laboratorij v najkrajšem možnem času. Pravočasna ločitev seruma ali plazme od krvnih celic je izredno pomembna, še posebej pri temperaturah nad 22 °C, ko lahko hitreje nastopijo spremembe nekaterih analitov.

**Priproča se, da serum/plazmo ločimo od krvnih celic najkasneje v dveh urah po odvzemu krvi.** Če določujemo v serumu ali plazmi kalij, adrenokortikotropni hormon (ACTH), kortizol, kateholamine, laktat ali homocistein, mora biti kri centrifugirana prej kot v dveh urah po odvzemu (3,4).

Številne študije podpirajo priporočilo o **časovni omejitvi dveh ur.**

Pri 17 analitih se koncentracije v serumu ne spremenijo, tudi če je kri centrifugirana šele po 48 urah po odvzemu krvi. Ti analiti so: albumin, alkalna fosfataza, alanin aminotransferaza (ALT), bilirubin, kalcij, holesterol, kreatin kinaza (CK), kreatinin, magnezij, fosfat, natrij, proteini, trigliceridi, trijodtironin ( $T_3$ ), tiroksin ( $T_4$ ), sečnina ter sečna kislina. Za našteje analite velja, da stik med serumom in celico pri sobni temperaturi v 48 urah ne vpliva na rezultat.

Po dveh urah se značilno zmanjša glukoza, zvečata pa kalij in LDH.

Po osmih urah se poveča koncentracija železa.

Že po dveh urah se aktivnost aspartata aminotransferaze (AST) rahlo poveča in koncentracija klorida rahlo zmanjša (5).

Analiti, ki so obstojni (stabilni) 48 ur, ostanejo taki pri sobni temperaturi še nadaljnjih 24 ur (skupaj 72 ur). Obstojni so še amilaza, bikarbonat, kortizol in GGT. Nasprotno se zmanjša koncentracija glukoze in folata, poveča pa koncentracija kalija, fosfata, kreatinina in vitamina  $B_{12}$ . Le malo se poveča aktivnost LDH in koncentracija feritina, zmanjša pa koncentracija klorida, kalcija in natrija (6).

Pri preverjanju stabilnosti 63 analitov v serumu, ki ni bil odlit 24 ur, je bilo sklenjeno, naj bi bil serum ločen v treh urah za določitev glukoze, kalija in fosfata ter v 6 urah za določitev albumina, bikarbonata, klorida, C-peptida, holesterola HDL in LDL, železa ter proteinov. Vsi ostali analiti so bili v neodlitnem serumu obstojni 24 ur (7).

Na stabilnost vpliva tudi **temperatura.**

V neločenem serumu se je po 24 urah pri sedmih različnih temperaturah (3,10,15, 22, 25, 30 in 38 °C) določila stabilnost lipaze, globulina, ki veže tiroksin (TBG) in tirotropni hormon (TSH). Na splošno velja, da je temperatura med 22 in 25 °C sobna temperatura. Pri 22 °C je bilo opaziti spremembe: zmanjšana je bila koncentracija glukoze, povečana pa koncentracija kalija, fosfata, ALT, AST in kreatinina. Pri višjih temperaturah je sprememba še izrazitejša (8).

Pri temperaturah, višjih od sobne (30 °C), se koncentracija glukoze zmanjša v štirih urah, koncentracija fosfata se poveča v šestih urah, aktivnost **ALT** in **AST** se poveča v osmih urah, koncentracija kalija se poveča v 24 urah. Po pričakovanju je bilo povečanje koncentracije kalija pomembno pri temperaturah pod 15 °C (9).

Ionizirani kalcij je v neodlitnem serumu obstojen pri 25 °C samo dve uri, pri 4 °C pa kar štiri dni (10,11). Ionizirani magnezij je stabilen pri sobni temperaturi več kot 6 ur, pri 4 °C pa pet dni (12).

### 3.2.3 Lega epruvete

Po odvzemu krvi postavimo epruveto v stojalo pokonci, z zamaškom navzgor. Tak položaj omogoča popolno koagulacijo, manj se pretresa vsebina epruvete in manjše je tveganje za nastanek hemolize. Poleg tega je manjša verjetnost, da se zamašek izmuzne z epruvete.

V preteklosti je bil zamašek, ki je prišel v stik s krvjo, vir onesnaženja pri toksikoloških testih in pri testih za določanje koncentracije zdravil v krvi (Therapeutic Drug Monitoring, TDM) Spojina tris-butoksietil fosfat (TBEP) moti pri določitvah TDM tako, da izpodrine osnovno zdravilo s proteina. Posledica je prerazporeditev zdravila v eritrocite, zmanjša pa se količina zdravila, ki ostane v serumu ali plazmi in ga določamo. Proizvajalci epruvet so iz zamaškov odstranili TBEP.

Obstajajo tudi posebne epruvete za določevanje elementov v sledovih (cinka, bakra, kroma in selen). Njihovi zamaški najmanj onesnažijo vzorce. Zato se za odvzem krvi za analizo elementov v sledovih priporočajo te epruvete.

### 3.2.4 Temperatura

Če laboratorijski analizni postopek zahteva ohlajeno kri, moramo epruveto s krvjo postaviti v posodo z ledom ali mešanico ledu in vode. Pomemben je dober stik med hladilnim sredstvom in vzorcem. Veliki kosi ledu namesto vode niso primerni, ker ne pride do zadostnega stika med hladilnim sredstvom in vzorcem v epruveti. Hladilno sredstvo mora prekrivati večji del površine epruvete. Pri ohlajenih vzorcih je presnova krvnih celic upočasnjena in nekateri proti toploti neodporni analiti so s tem stabilnejši. Ohlajevanje polne krvi za več kot dve uri je napačno za vzorce, v katerih se potem določa kalij. Glikoliza daje energijo celicam za črpanje kalija v celice, a je pri nizkih temperaturah upočasnjena. Brez te energije kalij zapusti celice in posledica so lažno višji rezultati. Vzorec, v katerem bomo določili elektrolite,

ne smemo pred centrifugiranjem in ločitvijo seruma/plazme od celic shranjevati pri temperaturi pod 8°C. Pri ravnanju z vzorcem se moramo izogibati temperaturam nad 35 °C. Z zvišanjem temperature se pogosteje pospeši spreminjanje sestavin (13).

Hladiti moramo vzorce za določanje: kateholaminov, amoniaka, laktata, piruvata, gastrina in paratiroidnega hormona (PTH) ter homocisteina.

Ne smemo hladiti krvnega vzorca, če bomo v njem določali krioglobuline, saj se temperatura vzorca po odvzemu ne sme spustiti pod 37 °C.

Ne smemo vzorca polne krvi postaviti v okolje s temperaturo pod 0 °C, ker nastopi hemoliza.

Če se zahteva zamrznjen serum ali plazma, moramo poskrbeti, da ostane serum/plazma ves čas pri zmrzišču.

Nekatere sestavine seruma ali plazme so pri sobni temperaturi izredno neobstoje, zato morajo biti serumi pred analizo zamrznjeni. Pri nekaterih vzorcih je temperatura kritični dejavnik (npr. pri reninu). Takrat mora biti vzorec krvi odvzet v ohlajeno epruveto in centrifugiran v hladilni centrifugi.

Ne uporabljajmo hladilnikov, ki se avtomatizirano odmrzujejo (samočistilni hladilniki). Pogosto segrevanje in hlajenje v takem hladilniku lahko poslabša kakovost vzorca. Zamrznjeni vzorci se med transportom najbolje vzdržujejo pri nizki temperaturi s suhim ledom.

### 3.2.5 Inhibitorji in stabilizatorji presnove

V nekaterih epruvetah so dodatki, ki preprečijo spremembo koncentracije določene analita v vzorcu. Natrijev fluorid (NaF) preprečuje glikolizo in se uporablja kot stabilizator glukoze v prisotnosti krvnih celic. Stabilizira jo pri sobni temperaturi za 24 ur, pri 2 do 8°C pa za 48 ur.

Glikoliza se ne prepreči dovolj, če je število eritrocitov, levkocitov ali trombocitov zelo veliko. Pri novorojenčkih glikolizo zelo težko preprečimo. Tako moramo iz krvnih vzorcev novorojenčkov ločiti plazmo od celic, kakor hitro je mogoče. Za pediatrične namene uporabljamo pripomočke za mikro odvzem, ki imajo primerne antiglikolitične snovi.

### 3.2.6 Pretresanje vzorcev in hemoliza

Z odvzetim vzorcem moramo ravnati skrbno, saj le tako preprečimo poškodbo eritrocitov in nastanek hemolize. Hemoglobin v hemoliziranem vzorcu lahko moti določevanje nekaterih analitov. Plazma se obarva rahlo rožnato že pri koncentraciji hemoglobina 0,2 g/L. Plazma, ki vsebuje 1 g/L hemoglobina, pa je rdeče barve. Povečana koncentracija bilirubina lahko zakrije hemoglobin. Tako ne moremo s prostim očesom zaznati hemoglobina (2 g/L), če je v plazmi bilirubin v koncentracijah nad 342 µmol/L.

Hemoliza močno poveča aktivnost LDH in AST ter koncentracijo kalija in hemoglobina v plazmi.

Hemoliza poveča koncentracijo železa, ALT in T<sub>4</sub>.

Hemoliza samo rahlo poveča koncentracijo fosfata, proteinov, albuminov, magnezija, kalcija in aktivnosti kisle fosfataze.

Tehnološki napredek je omogočil, da lahko določujemo nekatere analite tudi v polni krvi (natrij, kalij, klor, glukozo, sečnino, kreatinin, ionizirani kalcij...). Če je polna kri hemolizirana, tega s prostim očesom ne opazimo in lahko dobimo napačne rezultate. Zato velja priporočilo, da se v laboratoriju preveri vpliv hemolize pri vseh rezultatih zunaj referenčnih vrednosti (npr. kalija nad 5,5 mmol/L). Vzorec krvi moramo centrifugirati in pregledati obarvanost plazme.

### 3.2.7 Svetloba

Vzorcev ne smemo za dalj časa izpostavljati sončni svetlobi. Bilirubin, analit v serumu/plazmi, je zelo občutljiv za UV-svetlobo. Tudi vitamin A, vitamin B<sub>6</sub>, beta-karoten in porfirini so občutljivi za svetlobo. Vzorec, v katerem določamo zgoraj omenjene analite, moramo zaviti v aluminijasto folijo ali jih shraniti v temni škatli.

Mnogim analitom še ni bil določen vpliv različnih dejavnikov.

## 4 PRIPRAVA VZORCA ZA CENTRIFUGIRANJE

Vzorce najprej uredimo in pripravimo za centrifugiranje. Pustimo jih v originalni (primarni) epruveti in predvidimo dovolj časa za popolno koagulacijo. **Spontana in popolna koagulacija poteče običajno v 30 do 60 minutah pri sobni temperaturi (22 do 25°C).** Če čas koagulacije ni zadosti dolg, lahko latentni fibrin povzroča težave v analiznih instrumentih (13,14).

Koagulacijo pospešimo z aktivatorjem. Če za to uporabimo trombin, lahko kri centrifugiramo po približno 2 do 5 minutah, če pa vzamemo steklene delce, lahko centrifugiramo po 15 do 30 minutah po odvzemu.

Kri z antikoagulantom lahko takoj centrifugiramo.

Nekateri testi zahtevajo polno, necentrifugirano kri (npr. za določitev svinca v krvi, ciklosporina, hemoglobina A<sub>1c</sub>). Teh vzorcev ne centrifugiramo. Prav tako ne centrifugiramo epruvete s krvjo, ki jo potrebujemo za analizo krvnih celic.

Čas koagulacije se spreminja, če ima bolnik antikoagulantno terapijo.

Ohlajene vzorce (2 do 8°C) moramo vzdrževati pri tej temperaturi do centrifugiranja. Priporoča se centrifugiranje v hladilni centrifugi.

Epruveta s krvjo mora biti ves čas zamašena, tudi med centrifugiranjem. Če epruveto odpremo, so lahko nekateri rezultati napačni, ker se zaradi izgubljanja ogljikovega dioksida poveča pH. Tako se zmanjša aktivnost kisle fosfataze in ioniziranega kalcija. Če je epruveta zaprta, preprečimo zunanjo onesnaženje vzorca, izhlapevanje, razlitje in s tem nastanek aerosola.

## 5 CENTRIFUGIRANJE

### 5.1 Čas centrifugiranja in relativna centrifugalna sila

Pri centrifugiranju moramo upoštevati pisno priporočilo proizvajalca epruвет in navodila za analizni postopek. Napredek v tehnologiji omogoča, da za posebno pripravo vzorca uporabimo različno hitrost in čas centrifugiranja.

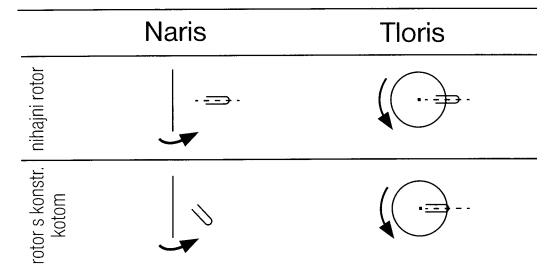
Za centrifugiranje je bolje uporabljati pojem relativne centrifugalne sile (Relative Centrifugal Force, RCF) kot hitrost centrifugiranja, izražena s številom obratov na minuto (revolution per minute, rpm). Podatek o hitrosti centrifugiranja (rpm) ni dovolj, dodati je treba še podatke o rotorju (nihajnem ali kotnem) in o efektivnem radiju. Efektivni radij ( $r$ ) je razdalja v centimetrih, izmerjena od osi rotorja do dna vodoravno postavljene epruvete ali do dna tekočine v epruveti v najdaljši vodoravni razdalji od osi rotorja (13).

a) Izračun RCF:  $RCF = 1,118 \times 10^{-5} \times r \times (\text{rpm})^2$

RCF = relativna centrifugalna sila (g)

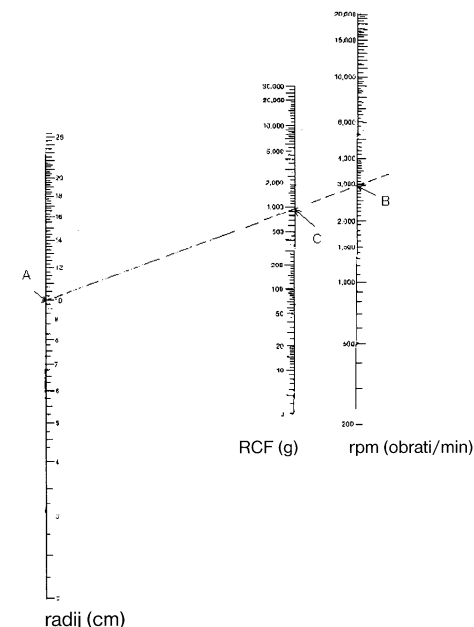
rpm = hitrost centrifugiranja (obratov/min)

$r$  = radij je horizontalna razdalja od središča rotorja do dna epruvete (cm).



Slika 1. Radij pri različni vrsti rotorja. Razdalja od osi rotorja do dna epruvete v najbolj vodoravni legi ročice rotorja

b) RCF lahko odčitamo iz nomograma (slika 2).



Slika 2. Nomogram za odčitavanje relativne centrifugalne sile. RCF odčitamo na srednji skali nomograma, tako da potegnemo premico med točkama, ki spajata radij ( $r$ ) s številom obratov (rpm). Npr., če je radij 10 cm (točka A), hitrost 3 000 obratov/min (točka B), odčitamo v točki C velikost RCF 1 000 g. Ko želimo pri določeni RCF dobiti število obratov/min (rpm), povežemo s premico radij in želeno RCF ter odčitamo potrebno hitrost centrifugiranja. V zgornjem primeru je pri centrifugi z dolžino ročice  $r=10$  cm za RCF= 1 000 g potrebna centrifugalna hitrost 3 000 obratov/minuto.

## 5.2 Hladilna centrifuga

Vzorci naj bi se centrifugirali v centrifugi z možnim nadzorovanjem temperature. Centrifuge se med obratovanjem segrevajo in oddajajo toploto in ta je lahko neprijemna za obstojnost nekaterih analitov. Če niso navedene posebne zahteve glede temperature, centrifugiramo pri sobni temperaturi. Določene analite, občutljive za toploto, naj bi ločili pri 4 °C (ACTH, ciklični AMP).

## 5.3 Ponovno centrifugiranje

**Vzorec centrifugiramo samo enkrat.** Če kri v originalni epruveti, potem ko s pipeto predenemo serum/plazmo v drugo epruveto, ponovno centrifugiramo, pridobimo majhno dodatno količino supernatanta. Če bi v tem supernatantu določili katerikoli analit, bi dobili napačen rezultat, ker bi se po drugem centrifugiranju spremenilo razmerje med plazmo in eritrociti v primerjavi s prvim centrifugiranjem.

Če se zaradi majhne količine dobljenega supernatanta odločimo še za drugo centrifugiranje, moramo prvi in drugi supernatant združiti in pomešati. Šele tako dobljeni serum/plazmo analiziramo.

Vzorcev v originalni epruveti, v kateri je pripomoček za ločenje, npr. gel, ne smemo nikoli centrifugirati več kot enkrat!

Pri odpiranju epruвет in pri pipetiranju vzorca moramo biti pazljivi, da ne pride do razlitja ali aerosola.

# 6 PRIPOMOČKI ZA LOČEVANJE SERUMA/PLAZME

Za ločenje seruma lahko uporabimo različne pripomočke med centrifugiranjem ali po njem (14).

## 6.1 Pripomočki, ki jih uporabljamo med centrifugiranjem

### 6.1.1 Epruvete z gelom

Serum: epruvete imajo dodano inertno gelsko snov. Gel ima kontrolirano viskoznost, vrednost njegove relativne gostote je med vrednostjo seruma in strdka. Poleg tega so v epruveti še aktivatorji za strjevanje krvi (stekleni delci). Stene epruвет in zamaški so obdelani tako, da celice ali strdek ne ostanejo na zgornjem delu epruветe. Epruветam ni potrebno odstranjevati zamaška, dokler se en alikvot seruma ne izloči za testiranje ali shranjevanje. V epruveti je gel lahko različnih količin.

Ko kri pride v epruveto, aktivator koagulacije sproži koagulacijo. Da je koagulacija popolna in hitrejša, epruveto z odvzeto krvjo pet- do desetkrat previdno obrnemo. Med centrifugiranjem tvori gelska snov neprepustno pregrado med serumom in strdkom. Relativna centrifugalna sila (RCF) in čas centrifugiranja sta določena za epruveto z gelom, ki jo uporabljamo. Boljša pregrada nastane pri centrifugiranju v centrifugi z nihajnim rotorjem. Če uporabljamo centrifugo s kotnim rotorjem in če moramo shranjevati serum na gelu, moramo preveriti, ali je pregrada celovita.

Plazma: epruvete z gelom za plazmo so enake serumskim gelskim epruветam, le da vsebujejo antikoagulant namesto aktivatorja koagulacije. Antikoagulant prepreči koagulacijo. Popolno inhibicijo dosežemo tako, da epruveto s krvjo obrnemo do desetkrat. Vloga ločenja z gelom je enaka kot pri serumu.

Proučeni so bili vplivi gela na določevanje koncentracije in aktivnosti določenih analitov. Ugotovitve:

- statistično značilno povečane aktivnosti encima LDH, ki pa klinično ni pomembna;
- pripomočki z gelom se ne smejo uporabljati za zbiranje vzorcev za določitev ioniziranega kalcija ali progesterona;
- epruvete z gelskimi pripomočki se ne priporočajo za zbiranje krvi za določevanje koncentracij nekaterih zdravil (tricikličnih antidepresivov, antiepileptikov, srčnih aminoglikozidov in aminoglikozidnih antibiotikov);
- gelski pripomoček se ne uporablja za zbiranje krvi za direktni antiglobulinski test, ker lahko gel zlepi eritrocite, podobno kot pri aglutinaciji.

### 6.1.2 Ločitveni pripomočki brez gela

Narejeni so iz različnih snovi, npr. iz stekla, plastike, steklenih vlaken in ne vplivajo na kemijske procese. Uporabljene snovi imajo vrednosti relativne gostote med serumom in krvnimi celicami ali strdka. Te pripomočke vgradi v epruveto proizvajalec ali pa se vložijo v epruveto po odvzemu krvi in postanejo pomembne šele pri centrifugiranju. Pripomoček moramo vložiti previdno, da ne povzročimo hemolize eritrocitov. Epruveto pred centrifugiranjem zamašimo in jo pustimo zaprto, dokler po centrifugiranju ne odstranimo alikvota vzorca za testiranje. Tak pripomoček je npr. zbiralnik, ki se vloži na vrh epruветe in služi tudi kot zamašek. Centrifugalna sila povzroči, da pripomoček zdrsne med celice in serum ter tvori pregrado. Ta je bolj prepustna kot gelska pregrada, zato moramo serum odliti v eni uri po centrifugiranju.

### 6.1.3 Pripomočki, ki jih uporabljamo po centrifugiranju

Obstajajo tudi pripomočki, ki jih vstavimo v epruveto po centrifugiranju, da ločimo serum od krvnih celic. Običajno so to potopni bati, narejeni kot plastična epruveta s filtrskim dnom. Po centrifugiranju vzorca vstavimo plastični bat s filtrom v serum

in potiskamo batek navzdol do krvnih celic. Izogibati se moramo stika s celicami, da ne pride do hemolize.

**Preden izberemo pripomoček, moramo ne glede na vrsto le-tega pregledati proizvajalčeva navodila in proučiti znanstveno literaturo.**

## 7 SHRANJEVANJE VZORCEV

Na splošno velja, da so mnogi analiti obstojni pri sobni temperaturi 24 do 72 ur, če so epruvete med stikom seruma s celicami zamašene (5,6,8,9). Obstajajo tudi študije o stabilnosti odločenega seruma. Velja, da so nekateri analiti obstojni od 2 do 14 dni pri temperaturi 2 do 8 °C in sobni temperaturi (15,16,17). Vendar pa včasih sobna temperatura nad 22 °C že ni neprimerna za stabilnost (8).

Analit, ki je obstojen pri sobni temperaturi v neločenem serumu/plazmi, je prav tako obstojen v ločenem vzorcu in enakem časovnem obdobju pri isti temperaturi. V strokovni literaturi se priporoča:

- naj odločeni serum/odločena plazma ne ostane pri temperaturi 22 °C dlje kot osem ur. Če analiza ni končana v osmih urah, shranjujemo serum/plazmo v hladilniku pri 2 do 8 °C;
- če določitev ni zaključena v 48 urah ali če moramo serum/plazmo shranjevati dlje kot 48 ur, potem serum/plazmo zamrznemo pod -20 °C.

Vzorcev seruma/plazme ne smemo večkrat zamrzniti in odmrzniti, ker lahko povzročimo spremembe analita. **Vzorce lahko odmrznemo samo enkrat.** Pri večkratnem zamrzovanju in odmrzovanju vplivajo temperaturne spremembe na vrednosti določitev analizov v vzorcu.

Na splošno velja, da lahko serum na gelu shranjujemo pri 4 °C do 24 ur. Preverjala se je obstojnost analizov v plazmi nad gelom. Za posebne primere se morajo zahtevati od proizvajalca podatki o značilnostih gela v epruvetah.

Če moramo shranjevati serum ali plazmo v epruvetah nad gelom, moramo pazljivo pregledati, ali je gelska pregrada cela. Epruvete shranjujemo v pokončni legi, z zamaški na zgornji strani.

## 8 RAVNANJE OB SPREJEMU VZORCEV V LABORATORIJ

Laboratorij, ki sprejema vzorce, mora imeti napisan postopek za ohranjanje trajnosti vzorca. Pošiljatelj mora na paketu navesti naslov analiznega laboratorija, vrsto vzorca ter morebitni dodani stabilizator v vzorcu (19).

Po sprejemu vzorca mora laboratorij poskrbeti, da so upoštevani predpisi za sprejem vzorcev, in to dokumentirati. Predlagan je seznam vprašanj, na katere naj bi odgovorili ob sprejemu vzorca. Hkrati so ta vprašanja tudi merila za zavrnitev vzorca. Vprašanja so naslednja:

- Ali so ime in priimek ter številka na epruveti enaki kot na spremnem naročilnem listu?
- Ali je vzorec po dostavi nespremenjen?
- Ali je prispelo dovolj vzorca?
- Ali je vrsta vzorca pravilna?
- Ali je vzorec pravilno izbran (serum ali plazma)?
- Ali je na voljo diagnoza preiskovanca, če je potrebna za laboratorijsko analitiko?

Če katerikoli odgovor pri sprejemu vzorca ne ustreza, mora sprejemni laboratorij takoj obvestiti pošiljatelja ali če je potrebno, ustrezno zdravstveno organizacijo. Laboratorijsko osebje mora imeti napisano priporočilo, kako ukrepati, če je prejeta pošiljka poškodovana (13,18,20,21).

## 9 MERILA ZA ZAVRNITEV VZORCA

V nadaljevanju opisani primeri, ko se v laboratoriju ne sme sprejeti vzorec v analizo. Zavrnjene vzorce je treba zabeležiti. Poleg navedenih meril je pomembna tudi strokovna ocena kliničnega kemika (21).

### • Neprimerno označen vzorec

Vsaka bolnišnica mora določiti najnujnejše podatke o bolniku; navedeni morajo biti v laboratorijskem naročniškem listu in epruveti.

Primer: Epruveta s krvjo nima vseh predpisanih podatkov.

### • Nepravilna količina krvi

Volumen dodatka v epruveti je namenjen za točno določen volumen odvzete krvi. Če je odvzeta količina krvi manjša ali večja od predpisane, lahko preveč ali premalo dodatka vpliva na rezultat.

Primeri:- natrijev citrat pri določanju protrombinskega časa;

- EDTA pri določanju hematokrita s centrifugiranjem, števila krvnih celic, morfologije celic, lipidov;
- heparin: pri določanju CK, aminoglikozidov (gentamicina, tobramicina).

### • Uporaba nepravilnih epruвет

Vsaka analizna metoda zahteva ustrezno vrsto vzorca. Dodatek lahko moti analizne postopke.

Primeri:- natrijev fluorid interferira z ureazo pri določitvi sečnine;

- napačni vrstni red pri odvzemu krvi lahko povzroči napačne rezultate zaradi kontaminacije z dodatki.

### • Hemoliza

Hemoliza je lahko posledica zahtevnega odvzema krvi ali pa nepravilnega ravnanja z že odvzetim vzorcem. Nastopi, če je kri odvzeta iz katetra s konektorji, ki imajo različne notranje premere. Sprememba notranjega premera lahko povzroči turbulenco in posledica je poškodba celic s hemolizo.

Hemolizo povzroči lahko bolezen razpada eritrocitov znotraj ožilja. Nekateri testi bodo nepravilni, če nastopi dodatno še hemoliza in vitro.

### • Nepravilno shranjevanje krvnega vzorca in neprimeren transport

Primeri:- vzorec krvi, ki mora biti ohlajen (na 2 do 8 °C), pride v laboratorij neohlajen;

- vzorec seruma ali plazme, ki naj bo zamrznjen, pride v laboratorij nezamrznjen;
- vzorec za določitev krioglobulinov, ki mora priti v laboratorij v toplem (37 °C), je ohlajen na sobno temperaturo.

# 10 LITERATURA

1. NCCLS Approved Guideline M29-A. Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue. Villanova, Pennsylvania: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999.
2. Piskar M. Priporočeni postopek za odvzem venske krvi. Ljubljana: Slovensko združenje za klinično kemijo, 1999.
3. Adams PC; Woodhouse, KW, Adela M, Parnham A. Exaggerated hypokalemia in acute myeloid leukemia. Brit. Med. J. 1981; 282;1034-1035.
4. Winsten S, Gordesky SE. Transportation of specimens. In: Selected Methods of Clinical Chemistry, W.R. Faulkner; S. Meites (eds.), Vol. 9. AACC, 1982, pp. 11-15.
5. Laessig RH, Indrikson AA, Hassemmer DJ, Paskey TA, Schwartz TH. Changes in serum chemical values as a result of prolonged contact with the clot. Am J Clin Path 1976: 66; 598-604.
6. Chu SY, MacLeod J. Effect of three-day clot contact on results of common biochemical tests with serum. Clin Chem 1986: 32;2100.
7. Zhang DJ, Elswick RK, Miller WG, Bailey JL. Effect of serum-clot contact time on clinical chemistry laboratory results. Clin Chem 1998: 44; 1325-1333.
8. Rehak NN, Chiang BT. Storage of whole blood: Effect of temperature on the measured concentration of analytes in serum. Clin Chem 1988: 34; 2111-2114.
9. Ono T; Kitabuchi K; Takehara M; Shiiba M; Hayami K. Serum-constituents analyses: Effect of duration and temperature of storage of clotted blood. Clin Chem 1981: 27; 35- 38.
10. Toffaletti J; Blosser N, Kirvan K. Effect of storage temperature and time before centrifugation on ionized calcium in blood collected in plain vacutainer tubes and silicone-separator (SST) tube. Clin Chem 1984: 30; 553-556.
11. Larsson L, Ohman S. Effect of silicone-separator tubes and storage time on ionized calcium in serum. Clin. Chem 1985: 31; 169-170.
12. Greenway DC, Hinmarsh JT, Wang J, Khodadeen JA, Hebert PC. Reference interval for whole blood ionized magnesium in a healthy population and the stability of ionized magnesium under varied laboratory conditions. Clin Biochem 1996; 29: 515-20.
13. NCCLS Approved Guideline H18-A3. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens. Villanova, Pennsylvania: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2005.



14. Guder WG, Narayama S, Wisser H, Zawta B. *Samples: From the Patient to the Laboratory*. Darmstadt: GIT Verlag, 1996.
15. Leassig RH, Hassemer DJ, Westgard JO, Carey RN, Feldbruegge DH, Schwartz TH. Assessment of the serum separator tube as an intermediate storage device within the laboratory. *Am J Clin Pathol* 1976;66:653-657.
16. Narayana S, Hassemer DJ, Leassig RH, Habig RL, Butts WC, Borkowski JD. Control of blood collection and processing variables to obtain extended (greater than five days) stability in serum constituents. *Clin Chem* 1979; 25: 1086.
17. Bailey DN, Coffee JJ, Brigs JR. Stability of drug concentrations in plasma stored in serum separator blood collection tubes. *Ther Drug Monit* 1988; 10: 352-4.
18. ECCLS, IFCC, WHO. *Patient and Sample*. Dybkaer R, Martin DV, Rowan RM. Good practice in decentralized analytical clinical measurement. Copenhagen: ECCLS, IFCC WHO, 1992: 29-40.
19. NCCLS Approved Guideline H5-A3. *Procedures for Handling and Transport of Diagnostic Specimens and Etiologic Agents*. Villanova, Pennsylvania: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999.
20. WHO/EMC/97.3. *Guidelines for the safe transport of infectious substances and diagnostic specimens*. World Health Organization, 1997.
21. Pickard NA. Collection and handling of patient specimens. In Kaplan Pesce Editor, The C.V. Mosby Company 1989 St.Louis, *Clinical Chemistry. Theory, analysis, and correlation*. 44-47.

**BELEŽKE**

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

