

Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP

Preanalytika v hematologické laboratoři

Zpracovali: P. Šigutová, I. Fátorová, I. Hrachovinová, J. Juráňová, M. Matýšková, D. Mikulenková, S. Vytisková

Recenzent: Členové LS ČHS JEP

Schváleno Laboratorní sekcí ČHS ČLS JEP: 11. 6. 2021

Schváleno výborem ČHS ČLS JEP: 17.6.2021

Verze: 1

Platnost od: 18.6.2021

Přechodné období (platí i nahrazovaný dokument) do: 18.9.2021

Poznámky:

Doporučení se týká preanalytické fáze u hematologických metod (analýza krevního obrazu, vyšetření hemostázy, vyšetření kostní dřeně) a je určeno pro všechna pracoviště, která provádí odběry a/nebo hematologická vyšetření.

Doporučení nahrazuje dokument „Stabilita a transport primárních vzorků biologického materiálu do hematologické laboratoře“, verze 2, platnost od 11. 12. 2019; a “Pořadí zkumavek při odběru krve“, verze 1, platnost od 1. 5. 2017.

Obsah

OBSAH2

| | | |
|-------|--|-----------|
| 1 | ÚVOD | 3 |
| 2 | PREANALYTIKA PŘED PŘÍJMEM VZORKU DO LABORATOŘE..... | 3 |
| 2.1 | Příprava pacienta před odběrem..... | 3 |
| 2.2 | Označení zkumavky identifikačními údaji pacienta a vyplnění průvodního listu (žádanky) | 3 |
| 2.3 | Pořadí zkumavek při odběru žilní krve | 4 |
| 2.4 | Odběr vzorku | 4 |
| 2.5 | Množství vzorku | 5 |
| 2.6 | Doporučení pro odběry | 6 |
| 2.6.1 | <i>Krev pro vyšetření krevního obrazu</i> | <i>6</i> |
| 2.6.2 | <i>Krev pro vyšetření primární hemostázy a pro koagulační vyšetření</i> | <i>6</i> |
| 2.6.3 | <i>Aspirát kostní dřeně a trepanobioptický váleček.....</i> | <i>6</i> |
| 2.7 | Stabilita vzorku..... | 6 |
| 2.8 | Transport primárních vzorků biologického materiálu do hematologické laboratoře | 7 |
| 2.9 | Transport zpracovaných vzorků..... | 8 |
| 3 | PREANALYTIKA V LABORATOŘI | 8 |
| 3.1 | Preanalytika před analýzou krevního obrazu..... | 8 |
| 3.2 | Preanalytika vyšetření hemostázy | 8 |
| 3.3 | Skladování vzorků | 9 |
| 4 | CHYBY V PREANALYTICKÉ ČÁSTI..... | 10 |
| 4.1 | Chyby v preanalytické části analýzy krevního obrazu | 10 |
| 4.1.1 | <i>Chyby v preanalytické části analýzy krevního obrazu způsobené interferencí.....</i> | <i>10</i> |
| 4.1.2 | <i>Chyby před analýzou krevního obrazu v rámci odběru.....</i> | <i>11</i> |
| 4.2 | Chyby před a při odběru kostní dřeně..... | 11 |
| 4.3 | Chyby v preanalýze u vyšetření hemostázy | 11 |
| 5 | ZKRATKY | 12 |
| 6 | LITERATURA..... | 13 |

Preanalytika v hematologické laboratoři

1 Úvod

Preanalytická fáze je nedílnou součástí laboratorních vyšetření, která je nejvíce závislá na lidském faktoru a nemusí být tedy pod přímou kontrolou laboratoří. Chyby v preanalytické fázi představují až 70 % všech laboratorních chyb, často se projeví až v analytické či postanalytické fázi vyšetření. Zatímco analytické standardy jsou široce dostupné a podléhají uznávaným kritériím kontroly kvality, jednotné standardy preanalytické fáze chybí.

Vytvoření manuálu preanalytických postupů je nezbytné pro celkovou kontrolu kvality laboratorního vyšetření.

2 Preanalytika před příjmem vzorku do laboratoře

2.1 Příprava pacienta před odběrem

Plánovaný žilní, případně kapilární odběr se u ambulantních pacientů provádí ráno po přiměřené hydrataci, po lehké netučné snídani či nalačno. Pacient by měl večer před odběrem vynechat tučná jídla, před vlastním odběrem by neměl pít černou kávu, alkohol, kouřit ani být po výrazné fyzické zátěži. Zdravotnický personál pacienta poučí o prováděném odběru. Během odběru by pacient neměl jíst ani žvýkat. Dle pokynů indikujícího lékaře by měl upravit i léčbu (např. odběr krve ke stanovení aktivity antiXa/LMWH pro kontrolu účinnosti léčby nízkomolekulárním heparinem by měl být 4 hodiny po podkožním podání léku).

Odběr kostní dřeně se řídí zvyklostmi pracoviště; je vhodné, pokud je v místě odběru zvýšené ochlupení, místo oholit. Indikující lékař by měl před odběrem vzorku přihlídnout k aktuální antikoagulační léčbě vzhledem k vysokému riziku obtížně stavitelného krvácení v místě odběru. K tomuto odběru biologického vzorku je nutné mít informovaný souhlas pacienta.

2.2 Označení zkumavky identifikačními údaji pacienta a vyplnění průvodního listu (žádanky)

Pro jednoznačnou identifikaci vzorku musí klient, který požaduje laboratorní vyšetření, označit biologický materiál jménem a příjmením pacienta a číslem pojištěnce, nebo jedinečným identifikačním číslem (např. u pacienta v bezvědomí bez dokladů, u novorozence). Vždy je nutné zajistit nezaměnitelnost materiálu a žádanky. Materiál musí být zřetelně, čitelně a nerasmazatelně označen. Nalepený štítek musí umožnit kontrolu obsahu zkumavky (kontrola stavu a množství materiálu, posouzení hemolýzy, iktericity a chylozity plazmy). Žádanky musí být transportovány odděleně od vzorků, aby nedošlo k jejich znehodnocení (potřísnění biologickým materiálem).

Náležitosti průvodního listu jsou specifikovány v normě ISO 15189 v její aktuální verzi. V rámci vyšetření hemostázy je nutné na žádance uvést antitrombotickou, protidestičkovou či substituční terapii.

2.3 Pořadí zkumavek při odběru žilní krve

Pořadí odběrů se řídí doporučením EFLM (European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine).

V souladu s normou ISO 6710:1995 by měla být druhá v pořadí zkumavka s 3,2 % citrátem sodným pro koagulační vyšetření; první je odběr hemokultury do sterilní zkumavky, případně lze předřadit jakoukoliv z jiných odběrových zkumavek bez aditiv nebo zkumavku pro vyšetření sedimentace erytrocytů; náběr do zkumavky s K₃EDTA/K₂EDTA zařadit jako předposlední.

Doporučené pořadí – zkumavka na:

- odběr hemokultury
- odběr koagulačního vyšetření s citrátem sodným
- biochemické a sérologické vyšetření s aktivátorem srážení či bez něj (vyšetření ze séra)
- biochemické vyšetření s heparinem (vyšetření z plazmy)
- vyšetření krevního obrazu a biochemické vyšetření s K₃EDTA či s K₂EDTA
- vyšetření glukózy a laktátu s fluoridem sodným či s oxalátem draselným.

. Toto doporučení neplatí, nabírá-li se pacientovi jediná zkumavka pro vyšetření protrombinového testu PT („Quickův“ test). Tehdy je přípustné nabrat tuto zkumavku jako jedinou.

2.4 Odběr vzorku

Odběry biologického materiálu se provádějí do řádně označených zkumavek v souladu s ošetřovatelskými standardy a s pokyny uvedenými v Odběrovém manuálu/Laboratorní příručce příslušné laboratoře za dodržení zásad hygienického režimu.

Při odběru žilní krve je nutno správně použít turniket (škrtidlo), dlouhodobé zaškrcení paže a cvičení se zataženou paží vedou k nevhodné aktivaci hemostázy. Nedoporučuje se odběr krve z paže, na které je připevněna manžeta tlakoměru. Odběr kapilární krve se provádí u novorozenců a pacientů se špatným žilním přístupem.

Je nutno dbát, aby při náběru nedošlo k hemolýze erytrocytů ve vzorku, protože tato interferuje s fotometrickým stanovením. Hemolýzu může způsobit:

- použití vlhké odběrové soupravy,
- znečištění jehly nebo pokožky stopami ještě tekutého dezinfekčního roztoku (dezinfekce musí na kůži před vpichem zaschnout),
- použití příliš úzké jehly, kterou se pak krev násilně nasává (ideální průměr jehly je 21 gauge, doporučený je 19-22 gauge),
- prudké třepání krve ve zkumavce a nešetrný transport krve ihned po odběru,
- fyzikální vlivy (chladová hemolýza při uskladnění vzorku plné krve v lednici; vzorek blízko tepelného zdroje),
- nedodržení doby transportu do laboratoře,
- použití nesprávné koncentrace protisrážlivého činidla,

Preanalytika v hematologické laboratoři

Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP

- opakovaný odběr krve z jiné žíly do stejné zkumavky.

Vzorky krve odebrané do zkumavek s antikoagulačním činidlem je nutné bezprostředně po odběru promíchat 3 až 6násobným šetrným kompletním převrácením. Přílišné třepání vzorku může vést k hemolýze nebo k aktivaci destiček a koagulačních faktorů, a tím ke zkrácení koagulačních časů nebo falešnému zvýšení koagulační aktivity (např. FVII).

Biologický materiál nedoporučujeme centrifugovat okamžitě po odběru; pokud je náběrová místnost vedle laboratoře, je potřeba vzorky nechat cca 15 minut „stabilizovat“.

Není přípustné přelévat krev ze zkumavky do zkumavky nebo odebírat krev do injekční stříkačky a odtud přenášet do náběrových zkumavek (s výjimkou vzorku pro konzumaci protrombinu).

Odběry žilní krve z kanyly nebo jiných žilních vstupů mohou být zdrojem kontaminace nebo hemolýzy vzorků, proto musí být vždy odebráno a zlikvidováno určité množství krevního objemu. Pro koagulační vyšetření je to šestnásobek mrtvého objemu odběrového systému nebo 5 mL. Pro jiná hematologická vyšetření je to dvojnásobek mrtvého objemu odběrového systému. Pokud je kanyla používána k infuzi heparinu, či je uzavřena heparinovou zátkou, neměla by být používána na odběr koagulačních vzorků vůbec. Není-li jiný žilní přístup, musí být kanyla před odběrem důkladně promyta fyziologickým roztokem. Pokud je proveden odběr z kanyly, je třeba toto uvést na žádance o vyšetření.

Je potřeba dodržovat expiraci zkumavek určenou výrobcem.

Kostní dřev u dospělých se odebírá z hrudní kosti z druhého mezižebří či z lopaty kosti kyčelní po místním umrtvení, k odběru se používají speciální aspirační či trepanobioptické jehly.

Vyšetření z arteriální krve je možné pouze po domluvě s laboratoří.

2.5 Množství vzorku

Při odběru krve do zkumavky s protisrážlivým činidlem musí odběrový pracovník dbát i na správný poměr antikoagulačního činidla a odebrané krve. Při použití zkumavek s vakuem musí být dodržen náběr „po rysku“ nebo v rozmezí „mezi ryskami“. Laboratoř toleruje maximálně $\pm 10\%$ odchylku objemu; k výsledku měření u nepřesného odběru uvede poznámku do komentáře. Při odchylkách větších než $\pm 10\%$ laboratoř biologický materiál nevyšetřuje.

U pacienta s hematokritem $> 0,55$, jehož vzorek krve se vyšetřuje v koagulační laboratoři, je potřeba před odběrem upravit množství citrátu v odběrové zkumavce, aby byla zachována standardní cílová koncentrace v plazmě, jinak dochází ke změnám koagulačních časů. Množství antikoagulancia se upravuje podle vzorce:

$$V_{\text{citrátu}} = [1,85 \times 10^{-3}] \cdot [100 - \text{Hct} (\%)] \cdot [V_{\text{krve}} (\text{mL})].$$

Pro cytologické zhodnocení aspirátu kostní dřevě se požaduje cca 0,3 mL tekuté kostní dřevě, která se ihned po nasátí rozetře na připravená podložní skla. V indikovaných případech lze použít vzorek kostní dřevě v antikoagulačním (EDTA) roztoku s definovanou dobou stability jako u KO.

Trepanobioptický váleček kostní dřevě by měl být cca 1-3 cm dlouhý; po odběru trepanobioptickou jehlou je váleček vložen do předem připraveného fixačního roztoku dle

Preanalytika v hematologické laboratoři

Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP

pokynů histologické laboratoře. Fixační tekutiny musí být dostatečné množství, pouhé ponoření vzorku nestačí.

2.6 Doporučení pro odběry

2.6.1 Krev pro vyšetření krevního obrazu

- odběr krve provést přímo z periferní žíly; u novorozenců či pacientů se špatným stavem periferních žil je možné nabrat kapilární krev, tento způsob odběru však musí být vyznačen na žádance a rovněž na výsledkovém listě laboratoře.
- použít zkumavky se správným poměrem antikoagulačního činidla – soli EDTA. (K_3EDTA , popř. K_2EDTA). Poměr EDTA /krev je $1,5 \pm 0,3$ mg EDTA/1 mL krve.
- krev odebrat po rysku označenou na zkumavce (tolerance odchylky max. ± 10 %)
- ihned po odběru zkumavku několikrát jemně převrátit.
- při podezření na pseudotrombocytopenii lze využít odběrovou zkumavku s ionty magnézia (např. ThromboExact).

2.6.2 Krev pro vyšetření primární hemostázy a pro koagulační vyšetření

- použít originální zkumavky určené pro koagulační vyšetření.
- zkumavky musí obsahovat jako antikoagulans pufovaný 106-109 mmol/L citrát sodný (odpovídá 3,2 % citrátu sodnému); případně 129 mmol/L citrát sodný (odpovídá 3,8 % citrátu sodnému),
- turniket je potřeba uvolnit ihned jakmile začne krev vtékat do první zkumavky (<1 minuta),
- ihned po odběru zkumavku několikrát (3 – 6x) jemně převrátit,
- dodržet přesné naplnění zkumavky, tj. dodržet požadovaný poměr antikoagulans a krve (1:9 znamená 1 díl citrátu a 9 dílů krve).

2.6.3 Aspirát kostní dřeně a trepanobioptický váleček

Odběr aspirátu kostní dřeně provádí lékař speciální punkční jehlou z hrudní kosti či z lopaty kosti kyčelní. První porce aspirované kostní dřeně se co nejdříve po odběru nanese na podložní skla a rozetře roztěrovým sklem (optimálně alespoň 6 skel pro možná cytochemická vyšetření). Nátěr musí být stejnorodý, přiměřeně tenký; musí mít dlouhé, rovné okraje; na konci (před okrajem sklíčka) by měl přecházet do ztracena. Po zaschnutí nátěrů se nátěry kostní dřeně v ochranném pouzdře spolu se žádankami dopraví do hematologické laboratoře.

Odběr trepanobioptického válečku se provádí z lopaty kosti kyčelní u pacienta v analgosedaci či v celkové anestezii. K odběru se používají speciální trepanobioptické jehly či vrtačky.

2.7 Stabilita vzorku

Stabilitou vzorku se rozumí doba, která uplyne od odběru primárního vzorku do jeho vyšetření a ve které nenastávají zjištěitelné změny měřeného parametru. Laborať při příjmu

Preanalytika v hematologické laboratoři

Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP

vzorku sleduje čas odběru biologického materiálu uvedeného na žadance; při překročení doby stability vzorku laboratoř na výsledkovém listě uvede poznámku o možném ovlivnění výsledku. Stabilita biologického materiálu pro hematologická vyšetření musí být uvedena v laboratorní příručce pracoviště; musí zohledňovat údaje výrobců zkumavek a diagnostických souprav.

- krevní obraz (KO), retikulocyty, diferenciální počet leukocytů – 5 hodin při teplotě +15 až +25 °C.
- nátěr periferní krve či aspirátu kostní dřeně – nenabarvené, nefixované preparáty zpracovat do 5 hodin; fixované nátěry a nabarvené nátěry – stabilita po neomezenou dobu.
- trepanobioptický váleček kostní dřeně – odebraný materiál dostatečně ponořený ve fixační tekutině je z hlediska času kvalitativně neměnný až do doby zpracování.
- vzorek na vyšetření hemostázy – stabilita je dle typu vyšetření – viz kapitola 3.2.

Dodatečné provedení analýzy ze vzorku již odeslaného do laboratoře je možné jen při dodržení doby stability vzorku.

2.8 Transport primárních vzorků biologického materiálu do hematologické laboratoře

Doprava vzorků do laboratoře je zajišťována osobním předáním zdravotnickým pracovníkem, řidičem svozové služby, potrubní poštou, či ve výjimečných případech přímo pacientem (pouze jeho vlastní biologický materiál).

Za bezpečnou přípravu biologického materiálu k transportu je odpovědný zdravotnický pracovník, který materiál odesílá.

Primární vzorek musí být transportován a skladován ve vertikální poloze tak, aby docházelo, k co nejmenší traumatizaci vzorku (otřesy, třepání, aj.).

Odběrové zkumavky s biologickým materiálem musí být zabezpečeny, aby nedošlo k jejich rozbití, vylití či jiné události znamenající uvolnění rizikového materiálu do okolí. Obal nesmí být materiálem potřísněn.

Nátěry aspirátu kostních dření se transportují v uzavíratelných krabičkách; trepanobioptické válečky v odběrových nádobách s fixační tekutinou dle požadavků histologické laboratoře.

Při transportu primárních vzorků musí laboratoř sledovat a dokumentovat následující parametry:

1) **Teplota** během přepravy

Teplota musí být po celou dobu transportu udržována v rozmezí +15 až +25°C. Při přepravě materiálu je teplota v transportních boxech monitorována; měřidlo teploty musí být pravidelně kalibrováno.

2) **Doba transportu** primárního vzorku

Doba transportu primárního vzorku do laboratoře nesmí trvat déle než 1–2 hodiny; u pacientů léčených heparinem musí být primární vzorek dodán do 1 hodiny.

Laboratoř zaznamenává dobu od odběru vzorku do příjmu vzorku laboratoři.

Preanalytika v hematologické laboratoři

Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP

Potrubní pošta smí být pro přepravu vzorků k funkčnímu vyšetření destiček a pro koagulační vyšetření použita pouze tehdy, má-li laboratoř otestovaný vliv transportu konkrétní potrubní poštou na výsledky měření (viz Laboratorní příručka příslušné laboratoře).

2.9 Transport zpracovaných vzorků

Nelze-li dodržet doporučenou dobu transportu primárního vzorku, lze do laboratoře zaslat i vzorky již zpracované (centrifugace). Množství vzorku je v takových případech určeno individuálně.

Zpracované vzorky musí být vedle jednoznačné identifikace pacienta označené i typem biologického materiálu – čerstvý nebo zamražený (citrátová plazma, EDTA plazma; sérum atd.) a doručené s řádně vyplněnou žádankou, včetně údajů o datu odběru a způsobu úpravy primárního vzorku, s identifikací laboratoře provádějící úpravy vzorku. Během transportu musí být dodržena požadovaná teplota, v případě zamraženého vzorku je tedy nutný transport na suchém ledu.

3 Preanalytika v laboratoři

3.1 Preanalytika před analýzou krevního obrazu

Vzorky je potřeba před vyšetřením důkladně a šetrně promíchat (ne déle než 10 minut); netřepat. Měření neúplně rozmíchaného vzorku se znehodnotí jak část vzorku v analyzátoru, tak i zbylá část ve zkumavce. Míchání vzorku lze ukončit až po úplném rozmíchání sedimentovaných krvinek. S výjimkou vitálních indikací není doporučeno vyšetřovat parametry krevního obrazu ihned po odběru vzorku; je nutné nechat vzorek krve stabilizovat (cca po 15 minut od odběru) tak, aby došlo k vyrovnání koncentračních gradientů po styku s antikoagulantem ve zkumavce.

3.2 Preanalytika vyšetření hemostázy

Skladování vzorků citrátové krve před vyšetřením nebo zpracováním musí být při teplotě +15 až +25°C.

Vyšetření hemostázy probíhá:

1. z plné krve (PFA, ROTEM, TEG, Multiplate, ACT); krev musí být vyšetřena dle doporučení výrobce (zpravidla 1-2 hodiny od odběru).
2. z plazmy získané z citrátové krve (většina koagulačních vyšetření).

Plazma se připravuje centrifugací vzorku plné krve. Separaci plazmy pro koagulační vyšetření nutno provést do 2 hodin od odběru; získaná plazma má být zpracována (vyšetřena, popř. šokově zamrazena) nejdéle do 4 hodin od odběru (výjimka je odběr na FVIII nebo PT).

- Plazma bohatá na destičky (PRP, platelet-rich plasma) se připravuje centrifugací citrátové krve při 200–250 g po dobu 5-10 minut a bez použití brzdy. Testování musí proběhnout do 2 hodin od odběru krve a suspenzi destiček nelze skladovat (zamrazit).

Preanalytika v hematologické laboratoři

Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP

- Plazma chudá na destičky (PPP, platelet-poor plasma) – centrifugace primárních vzorků při 2000-2500 g 15 minut. Po centrifugaci může zůstat plazma s buňkami do doby analýzy i při analýze v uzavřených primárních zkumavkách nebo může být přenesena do další zkumavky (plast, silikonované sklo) bez porušení buffy coatu. Při přenosu je potřeba dbát na to, aby byla zachována návaznost na primární vzorek.
- Bezdestičková plazma (PFP, platelet-free plasma, s počtem trombocytů $<10 \times 10^9/L$) – centrifugace 2x jako PPP. PFP je nezbytná pro vyšetření lupus antikoagulans a pro dlouhodobé uchování zamražené plazmy. Plazma se následně rozpipetuje do mikrozkuvek, šokově zamrazí (na teplotu nižší než $-70\text{ }^\circ\text{C}$).

Zmražená plazma se skladuje při teplotě nižší než $-70\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 1 roku, při teplotě $-20\text{ }^\circ\text{C}$ pouze 2 týdny. Před vyšetřením se plazma rozmrazí 5-10 min při teplotě $+37\text{ }^\circ\text{C}$ ve vodní lázni a šetrně se v ruce promíchá. Plazma se nesmí rozmrazovat při teplotě $+15$ až $+25\text{ }^\circ\text{C}$; rozmražená plazma se nesmí znovu zmrazit!

Podmínky stability vzorků pro vyšetření koagulace:

- *protrombinový test (PT)* – stabilita primárního vzorku a plazmy je 6 hodin; teplota skladování nesmí klesnout pod $+15\text{ }^\circ\text{C}$, při ochlazení se aktivuje FVII a dochází ke zkrácení času PT.
- *APTT* – stabilita primárního vzorku i plazmy bez heparinu je 4 hodiny od odběru.

Vzorek s nefrakcionovaným heparinem se musí centrifugovat do 1 hodiny po odběru. Není-li na žádance uveden druh antikoagulační léčby, laboratoř posuzuje stabilitu vzorku, jako by byl pacient heparinizován.

- *FVIII* – stabilita primárního vzorku i plazmy 2 hodiny od odběru.
- *ostatní koagulační stanovení* (trombinový test, fibrinogen, protein C, FV atd.) – stabilita 4 hodiny od odběru.

Centrifugace:

k oddělování plazmy nebo PRP od ostatních buněčných komponent je nutno používat validované centrifugy s výkyvným rotorem, centrifugace by měla probíhat za teploty $+15$ až $+25\text{ }^\circ\text{C}$.

3.3 Skladování vzorků

1. Krevní obraz – vzorek lze skladovat do 5 hodin po odběru.
2. Koagulace
 - Skladování vzorků plné krve se nedoporučuje; nevhodné skladování v chladu ($+2$ až $+8\text{ }^\circ\text{C}$) může způsobit aktivaci krevních destiček, aktivaci FVII, pokles aktivity vWF a FVIII, a může vést k falešnému podezření na diagnózu hemofilie A nebo von Willebrandovy choroby.
 - Skladování čerstvé plazmy se nedoporučuje; skladování při teplotě $+15$ až $+25\text{ }^\circ\text{C}$ je pouze po dobu stability vyšetřovaných parametrů.

Preanalytika v hematologické laboratoři

Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP

3. Nátěry aspirátu kostní dřeně – fixované lze uchovat dlouhodobě, nefixované nelze skladovat.

4 Chyby v preanalytické části

4.1 Chyby v preanalytické části analýzy krevního obrazu

4.1.1 Chyby v preanalytické části analýzy krevního obrazu způsobené interferencí

Vzorky krve na vyšetření krevního obrazu mohou obsahovat složky nebo látky, které brání přesnému stanovení parametrů krevního obrazu na hematologických analyzátoch. Tyto rušivé jevy (interference) mohou být původu:

- **plazmatického** (např. kryoproteiny, paraproteiny, lipidy, aj.)
- **buněčného** (např. normoblasty, erytrocyty rezistentní na lýzu, velké trombocyty, aj.)

Mezi nejčastější interference patří:

- **Falešná trombocytopenie** (pseudotrombocytopenie) z důvodu zvýšené agregace trombocytů, destičkového satelitismu, či přítomnosti makrotrombocytů. Přítomnost agregátů (shluků) trombocytů falešně snižuje počty trombocytů na analyzátoru; v některých případech mohou shluky trombocytů ovlivnit i počty leukocytů a erytrocytů. Shlukování může být způsobeno přítomností (chladových) protilátek proti trombocytům, fenoménem EDTA (změny na membráně trombocytů vyvolané přítomností antikoagulačního činidla EDTA), v rámci autoimunitních onemocnění, po některých infekcích. Snížení počtu trombocytů může způsobit i jev zvaný destičkový satelitismus (soli EDTA ovlivní membránu neutrofilů, která pak může vázat krevní destičky na svém povrchu po celém obvodu). Pseudotrombocytopenii lze v některých případech eliminovat využitím odběrové zkumavky s ionty magnézia (např. ThromboExact); i přesto v některých případech ale nelze zcela tento jev eliminovat, proto je nutná u vstupních vzorků s trombocytopenií mikroskopická kontrola.
- **Aglutinace erytrocytů se snížením RBC a zvýšením MCHC** – shlukování erytrocytů je způsobeno přítomností protilátek proti antigenům na povrchu erytrocytů, což je podkladem pro vznik dg. AIHA. Zralé erytrocyty aglutinují, jsou-li potaženy protilátkami. Může se jednat o protilátky chladové (nejčastěji) a/nebo tepelné. Při analýze vzorku dochází k snížení počtu erytrocytů a k zvýšení střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytech (MCHC). Tento jev je možné u chladových protilátek eliminovat zahřátím vzorku na teplotu +37 °C.
- Zvýšené hodnoty hemoglobinu při **hyperlipémii a hyperbilirubinémii**.

Preanalytika v hematologické laboratoři

4.1.2 Chyby před analýzou krevního obrazu v rámci odběru

- **Problémy spojené s exspirovanými zkumavkami**

Vyšetření krevního obrazu se provádí z nesrážlivé krve (zkumavka s protisrážlivým činidlem EDTA, ta vyvazuje vápník a krev se stává nesrážlivou). U exspirované zkumavky dochází ke změně poměru EDTA/krev. V krevním vzorku se tak vytvoří sraženina, důsledkem je pokles výsledných hodnot krevního obrazu (nejčastěji hemoglobinu a počtu trombocytů).

- **Výskyt sraženiny v krevním vzorku při špatném odběru**

Sraženinu může způsobit traumatický odběr, nesprávné množství krve „nad rysku“ vyznačenou na zkumavce nebo nedostatečné promíchání vzorku s antikoagulačním činidlem. Krevní sraženina vždy ovlivní výsledek krevního obrazu; takový výsledek není validní a je nutné provést nový odběr.

- **Nesprávně odebrané množství**

Vzorek musí být odebrán po rysku vyznačenou na zkumavce. Při nesprávném odběru dojde ve zkumavce ke změně poměru EDTA/krev, což ovlivní výsledek krevního obrazu.

- **Krev naředěná infuzí nebo ovlivněná transfuzními přípravky**

Není vhodné odebírat krev ze žíly, do které je zavedena infuze; je vhodné odebrat krev z druhé paže. Infuze či transfuzní přípravek ovlivňuje hodnoty krevního obrazu.

- **Překročení doby stability vzorku krve**

Po překročení doby stability dochází ke změnám metabolismu a rozpadu krevních buněk. Tyto změny se pak mohou promítnout do výsledku vyšetření; hlavně u vzorků s patologickými hodnotami

4.2 Chyby před a při odběru kostní dřeně

Nejčastější chybou při odběru aspirátu kostní dřeně je nedodržení požadovaného objemu vzorku (cca 0,3 mL), a tedy kontaminace velkým množstvím periferní krve; nátěry zhotovené z tohoto naředěného vzorku jsou znehodnocené buňkami periferní krve a nález pak neodpovídá skutečnému stavu hematopoézy v kostní dřeni. Dále může dojít ke kontaminaci vzorku prostředkem, který se používá k dezinfekci kůže; přítomnost dezinfekce v aspirátu pak znemožňuje správně nabarvit buňky v aspirátu.

4.3 Chyby v preanalýze u vyšetření hemostázy

- **Nedodržení snížené fyzické aktivity pacienta před odběrem** může mít za následek zkrácení APTT, ovlivnění záhytu vWCH (zvýšení vWF, FVIII) nebo zvýšenou fibrinolýzu; může ovlivnit i funkci krevních destiček
- **Chybějící informace o léčbě**, která ovlivňuje hemostázu (antitrombotika všech typů), znemožní interpretaci výsledků.

Preanalýza v hematologické laboratoři

Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP

- **Použití nevhodného průměru jehly na odběr** (<19 gauge) může způsobit hemolýzu, (>22 gauge) oxidaci buněk a aktivaci koagulace.
- **Dlouhý, případně opakovaný odběr ze stejné žíly** (případně do stejné odběrové nádoby) způsobuje hemolýzu vzorku a abnormálně vysoké hodnoty D-dimerů.
- **Neodpovídající antikoagulans** (např. heparin, EDTA) při vyšetřování koagulace a ACD při agregaci neumožní vyšetření. Je nutné číst, co je na odběrové zkumavce, a neorientovat se barvou víčka (výrobci mají různé barvy víček pro stejné antikoagulans).
- **Nedostatečné promíchání vzorku s antikoagulanciem** (<3× úplné obrácení tam a zpět) způsobuje vznik mikrotrombů a utajeného srážení plazmy v průběhu měření (obtížně zjistitelné).
- **Nedostatečné doplnění vzorku po rysku náběrové zkumavky** způsobí zvýšenou koncentraci antikoagulancia ve vzorku, která ovlivní APTT, případně PT.
- **Odběr z kanyly** ovlivní koagulaci
 - přítomným heparinem (kontaminace z heparinové zátky) a významně se tak prodlouží APTT a trombinový test;
 - při naředění vzorku infuzí, případně podávaným transfuzním přípravkem (FFP) či koncentrátem (nejen FVIII) dojde ke zkreslení výsledků.
- **Odběr arteriální krve** ovlivní výsledky APTT.
- **Skladování a doprava primárního vzorku krve při teplotě nižší než +15 °C** způsobí aktivaci krevních destiček a FVII, FXI a FXII.
- **Prodloužená doprava vzorku do laboratoře** způsobuje degradaci FVIII, FV a aktivaci kontaktních faktorů vnitřní cesty koagulace.
- **Nedostatečná centrifugace plazmy** může způsobit kontaminaci zmražené plazmy zbytky krevních destiček a tím ovlivnit vyšetření faktorů vnitřní cesty a vyšetření na lupus antikoagulans.

5 Zkratky

| | |
|------|---|
| ACD | kyselina citrónová a dextróza |
| ACT | aktivovaný čas srážení |
| APTT | aktivovaný parciální tromboplastinový test |
| AIHA | autoimunitní hemolytická anémie |
| EDTA | kyselina etylendiamintetraoctová |
| F... | koagulační faktory (např. FVIII – koagulační faktor VIII) |
| INR | mezinárodní normalizovaný poměr |

Preanalytika v hematologické laboratoři

Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP

| | |
|-------|--|
| LA | lupus antikoagulans |
| LMWH | nízkomolekulární heparin |
| MCHC | střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytech |
| PFA | platelet function analyzer |
| PFP | plazma bezdestičková |
| PPP | plazma chudá na destičky |
| PRP | plazma bohatá na destičky |
| PT | protrombinový test |
| RBC | červené krvinky |
| ROTEM | rotační tromboelastograf |
| TEG | tromboelastograf |
| vWF | von Willebrandův faktor |
| vWCH | von Willebrandova choroba |

6 Literatura

1. Adcock DM, Hoefner DM, Kottke-Marchant K, et al. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing of Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline. Fifth Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008:28. CLSI Document H21-A5.
2. ČSN EN ISO 15189:2013, Zdravotnické laboratoře – Požadavky na kvalitu a způsobilost
3. Kitchen S, Adcock DM, Dauer R et al. International Council for Standardisation in Haematology (ICSH) recommendations for collection of blood samples for coagulation testing. *Int J Lab Hematol*. 2021;00:1-10, <https://doi.org/10.1111/ijlh.13584>
4. Maarten T.M. Raijmakers, PhD, Carolien H.F. Menting, Huib L. Vader, PhD, and Fedde van der Graaf, PhD Collection of blood specimens by venipuncture for plasma-based coagulation assays. Necessity of a discard tube. *Am J Clin Pathol* 2010; 133: 331-335
5. Magnette A., Chatelein M., Chatelain B., Ten Cate H., Mullier F Pre-analytical issues in the haemostasis laboratory: guidance for the clinical laboratories. *Thrombosis Journal* (2016) 14:49
6. Lippi G., et al Preanalytical variability: the dark side of the moon in laboratory testing. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44(4): 358-365
7. Plebani M., Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? *Clin Chem Lab Med* 2006; 44(6): 750-759
8. Walker ID. Blood collection and sample preparation: pre-analytical variation. In: Jespersen J, Bertina RM, Haverkate F, eds. *Laboratory Techniques in Thrombosis: A Manual: The Second Revised Edition of the ECAT Assay Procedures*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2000:21-28

Preanalytika v hematologické laboratoři