

Predanalitički čimbenici u analizi ekstravaskularnih uzoraka

Alen Vrtarić, mag. med. biochem., spec. med. biokem. i lab. med.
Klinički zavod za kemiju, KBC Sestre milosrdnice

Uvod

- Predanalitička faza u analizi ekstravaskularnih uzoraka predstavlja izvor varijabilnosti jer se takvi uzorci često prikupljaju invazivnim postupcima
- Uzorci su dostupni su u ograničenim volumenima te za njih ne postoji razina standardizacije uzorkovanja kakva je p standardne uzorke



Zahtjev za pretragama

- Pretrage ekstrasvaskularnih uzoraka trebaju se tražiti temeljem specifičnih kliničkih indikacija, što znači da bi svaki zahtjev za analizom trebao biti usmjeren imajući na umu specifično kliničko pitanje
- Opravdanost pretrage!

Laboratory tests that matter are those that produce actionable results that bring a positive outcome benefit for the patient. Thus, to assess the appropriateness of laboratory test

Lundberg GD. Adding outcome as the 10th step in the brain-to-brain laboratory test loop. Am J Clin Pathol. 2014;141:767-9.

Priprema za uzorkovanje – serozne i zglobna tekućina

- Za analizu seroznih tekućina ne postoje specifični zahtjevi za pripremu bolesnika i vrijeme uzorkovanja
- pH pleuralne tekućine može varirati ovisno o mjestu uzorkovanja, što može imati klinički značajne posljedice, osobito kod komplikacija parapneumoničnih izljeva
- Podatak o terapiji diureticima je bitan jer utječe na povećanje koncentracije biokemijskih parametara mjerenih u uzorku pleuralne tekućine
- Ako se u uzorku zglobne tekućine određuje glukoza, prije uzorkovanja bolesnik bi trebao biti natašte barem 6 sati

Priprema za uzorkovanje-stolica

- Primjena inhibitora protonske pumpe i nesteroidnih protuupalnih lijekova može dovesti do lažno povišenih koncentracija fekalnog kalprotektina
- Za dokazivanje okultnog krvarenja fekalnim imunokemijskim testom uzorke stolice nije poželjno prikupljati tijekom mjesečnice, u slučaju hemoroida koji krvare te kod pojave krvi u mokraći
- Alkohol, aspirin i drugi lijekovi koji se uzimaju u prekomjernim količinama mogu rezultirati lažno pozitivnim nalazom hemoglobina u stolici
- Njihovu primjenu treba ukinuti najmanje 48 sati prije prikupljanja uzorka stolice

Priprema za uzorkovanje – kloridi u znoju

- Analiza klorida u znoju se preporučuje kod terminskog novorođenčeta koje je staro barem dva tjedna, tjelesne mase više od 2 kg u vrijeme testiranja, normalno hidrirano i bez značajne sistemske bolesti
- Test treba odgoditi kod edematoznih pacijenata ili kod onih koji primaju topiramat ili 9-alfa fludrokortizon te kod pacijenata koji su dehidrirani, pothranjeni, nestabilnog kliničkog statusa ili imaju ekcem na mjestu stimulacije znojenja
- Test klorida u znoju se ne preporučuje u slučaju oksigenoterapije primjenom maske sa rezervoarom

Uzorkovanje ekstravaskularnih uzoraka

- Postupci uzorkovanja nisu standardizirani poput venepunkcije te se ne odvijaju pod izravnim nadzorom laboratorijskih djelatnika
- Neprikladno uzorkovanje može dovesti do traumatske punkcije čime se narušava kvaliteta uzorka, otežava analiza i tumačenje rezultata

Uzorkovanje stolice

- Uzorci stolice se trebaju prikupljati u jednokratne, čiste, suhe spremnike s čepom i ne smiju biti zagađeni mokraćom, vodom ili sredstvima za čišćenje toaleta
- Koncentracija analita može varirati u različitim dijelovima uzorka; stoga se preporučuje uzorkovanje s više mjesta ili temeljita homogenizacija
- Konzistencija stolice također može utjecati na rezultate
- Tekući ili proljevasti uzorci mogu razrijediti koncentracije analita, što je posebno važno kod određivanja fekalne elastaze, gdje razrjeđenje može dovesti do lažno sniženih vrijednosti

Rukovanje ekstravaskularnim uzorcima

- Za analizu stanica u seroznim tekućinama treba koristiti spremnike s etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA), dok uzorke serozne tekućine za biokemijske analize treba uzorkovati u epruvete s heparinom
- Uzorak zglobne tekućine za biokemijske analize treba uzorkovati u spremnike bez antikoagulansa
- Uzorke zglobne tekućine za analizu stanica, viskoznosti te analizu kristala treba uzorkovati u spremnike s EDTA
- Alternativno su za tu svrhu prihvatljivi i spremnici bijelog čepa bez aditiva

Rukovanje ekstravaskularnim uzorcima

- Epruvete namijenjene određivanju biokemijskih pretraga treba centrifugirati prethodno analizi koristeći iste uvjete kao i za serum
- Epruvete koje sadrže oksalat, litijev heparin ili liofilizirani oblik EDTA se ne preporučuju za zglobnu tekućinu jer mogu stvarati čestice slične kristalima koje se mogu pogrešno svrstati u kristale natrijevog monourata ili kalcijevog oksalata, što može dovesti do lažno pozitivnih rezultata

Transport

- Uzorke treba transportirati u laboratorij na sobnoj temperaturi odmah nakon uzorkovanja, a najkasnije unutar jednog sata kako bi se spriječila razgradnja stanica i promjene biokemijskih parametara

Analiza	Spremnik	Preporuka
pH vrijednost*	Heparinizirana štrcaljka	Uzorkovanje treba provesti u anaerobnim uvjetima, analizirati hitno na analizatoru namijenjenom određivanju acidobazične ravnoteže
Ukupni i diferencijalni broj stanica	EDTA antikoagulans	Dobro promiješati epruvetu nakon uzorkovanja
Biokemijske pretrage	Heparin ili epruveta bez aditiva	Omogućiti potpuno zgrušavanje uzoraka prikupljenih u epruvetama bez aditiva na sobnoj temperaturi; krvave i zamućene serozne tekućine mogu biti neprikladne za analizu
Glukoza, laktat	Inhibitor glikolize	Uzorak za laktat treba hladiti i dostaviti u smjesi leda i vode

Transport - stolica

- Ako analiza nije moguća neposredno nakon prikupljanja, za mnoge se pretrage preporučuje pohrana uzorka pri 2–8 °C, pri čemu prihvatljivo trajanje pohrane ovisi o analitu i korištenom analitičkom sustavu
- Odgođena obrada uzorka stolice može rezultirati promjenama sastava uzorka zbog djelovanja proteolitičkih enzima i bakterijskog metabolizma

Procjena kvalitete uzorka

- Kvalitetu uzorka serozne i zglobne tekućine treba vizualno provjeriti prije analize kako bi se izbjegli kvarovi uređaja i moguće pogreške u mjerenju
- Izrazito hemolitični i zgrušani uzorci mogu utjecati na točnost rezultata i trebaju se smatrati neprikladnim za analizu

Stabilnost uzoraka

- Proizvođači reagensa koji se koriste za određivanje analita od interesa uglavnom ne deklariraju stabilnost za ekstravaskularne uzorke ili je deklaracija opisana na manje detaljan način u usporedbi sa standardnim uzorcima
- Stoga je nužno provesti ispitivanje stabilnosti u okviru rutinskog laboratorijskog rada

Stabilnost seroznih tekućina

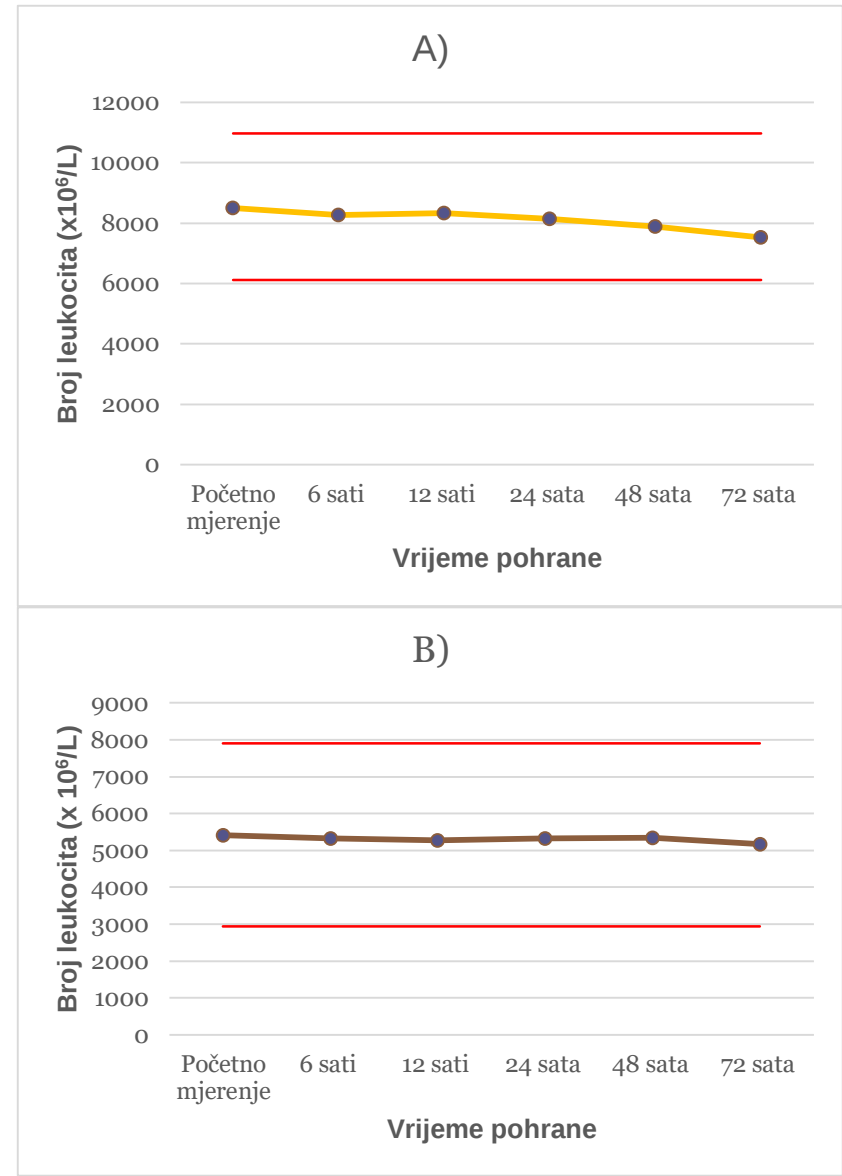
Analit	Stabilnost u standardnom uzorku (serum)*	Stabilnost u uzorcima pleuralne i peritonealne tekućine†
Glukoza	20 do 25 °C 2 dana 2 do 8 °C 7 dana -20 °C 3 mjeseca	~ 25 °C do 6 sati - 20 °C do 3 dana
Laktat dehidrogenaza	20 do 25 °C 3 dana 2 do 8 °C 3 dana -20 °C 8 tjedana	~ 25 °C do 6 sati - 20 °C do 3 dana

*Prilagođeno prema proizvođaču reagensa Abbott Laboratories, Abbott Park, Sjedinjene Američke Države. †Prilagođeno prema Milevoj Kopcinovic L, Brcic M, Vrtaric A, Unic A, Bozovic M, Nikolac Gabaj N, et al. Long-term stability of clinically relevant chemistry analytes in pleural and peritoneal fluid. Biochem Med (Zagreb). 2020;30:020701.

- Istraživanje stabilnosti analita u uzorcima pleuralne i peritonealne tekućine pokazalo je da su ukupni proteini, albumin, kolesterol, trigliceridi, kreatinin, ureja i amilaza stabilni na sobnoj temperaturi tijekom 6 sati
- Uzorci ispitanih seroznih tekućina mogu se pohraniti do 30 dana na -20 °C bez utjecaja na stabilnost koncentracije/aktivnosti ukupnih proteina, albumina, kolesterola, triglicerida, kreatinina, ureje i amilaze

Stabilnost zglobne tekućine

- Uzorak zglobne tekućine prethodno pohranjen u hladnjaku nije prikladan za analizu kristala jer hlađenjem može doći do taloženja istih *in vitro*
- Kraćim stajanjem na +4 (Slika A) i 25°C (Slika B) ne dolazi do ugrožavanja integriteta uzorka za potrebe analize stanica što je korisno ako je zglobnu tekućinu potrebno transportirati u suradni laboratorij
- Slike preilagođene prema: Giovanni B, Fiamma B, Tiziana A, Paola P, Enrico F, Alessandro T, et al. Synovial Fluid Cell Counts Remain Stable for 72 Hours Regardless of Storage Temperature: Implications for PJI Diagnosis. EJIFCC. 2026;37:78-83.



Stabilnost stolice



- Kratkotrajna pohrana native stolice (do 3 dana) je moguća u hladnjaku, dok dugotrajnija (dulje od 10 dana) često zahtijeva zamrzavanje na -20°C ili -80°C .
- Uzorak je nakon provedene ekstrakcije stabilan do 6 mjeseci na -20°C ako se analiza ne izvodi unutar 1 sata od pripreme za imunokromatografsko dokazivanje krvi u stolici (prema CoproHemoGnost, BioGnost, Zagreb, Hrvatska)
- Za određivanje fekalne elastaze, uzorak je nakon ekstrakcije stabilan 8 dana na temperaturi $< 28^{\circ}\text{C}$, 12 dana na $2-8^{\circ}\text{C}$ i najmanje 3 mjeseca na temperaturi od -20°C (prema Bühlmann, fPELA Turbo, Schönenbuch, Švicarska)
- Za fekalni kalprotektin je uzorak nakon ekstrakcije stabilan do 7 dana na temperaturi od 23°C , 15 dana na $2-8^{\circ}\text{C}$ i najmanje 23 mjeseca na temperaturi od -20°C (prema Bühlmann, fCAL Turbo, Schönenbuch, Švicarska)
- Stabilnost fekalne elastaze na sobnoj temperaturi, $+4^{\circ}\text{C}$ te -20°C je zadovoljavajuća do 29 dana, što omogućuje fleksibilno rukovanje uzorcima u rutinskoj laboratorijskoj praksi (npr. transport uzoraka bez potrebe za očuvanjem hladnog lanca)



Stabilnost znoja

- Znoj prikupljen komercijalnom opremom može se čuvati 3 dana na 2-8 °C u dobro zatvorenom spremniku
- Znoj skupljen filter papirom ili gazom može se čuvati maksimalno 3 dana u dobro zatvorenom spremniku na 2-8 °C

Utjecaj interferencija

- Zahvaljujući napretku automatizacije, danas je moguće detektirati interferencije u nestandardnim uzorcima na isti način kao i za standardne uzorke, koristeći automatizirane metode
- Budući da se radi o nestandardnim uzorcima, proizvođači obično ne deklariraju specifične granice za prisutnost interferencije, stoga svaki laboratorij samostalno treba utvrdi i definirati kriterije u skladu s vlastitim protokolima i standardima

Conclusions

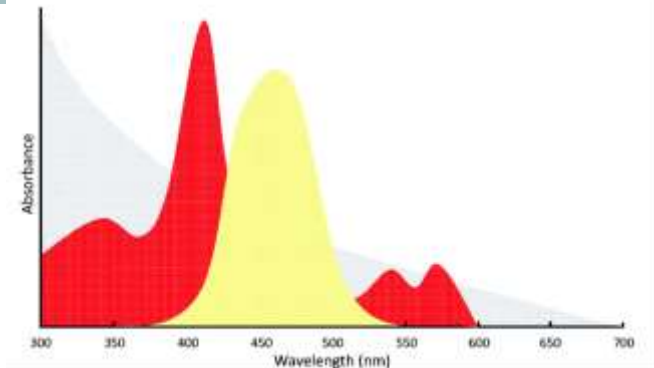
In conclusion, since manufacturer's IFU often provide incomplete and various information about managing interference. Clinical laboratories should validate hemolysis indices and establish acceptance criteria for the thresholds of interference on their own analyzers to improve quality of laboratory routine work and reliability of obtained results.

Since hemolysis is prevalent preanalytical error that can lead to sample rejection, resampling and delay of the result, evaluation of it is crucial to avoid misinterpretation of patient results.

Because of variability and the limitations in manufacturer instructions for use, clinical laboratories must therefore adopt a proactive role in validating and interpreting hemolysis data to meet both clinical and regulatory standards. A harmonized approach that integrates manufacturer data, published research, and local validation will be best for maintaining good laboratory practice and quality assurance.

Vrtaric A, Miler M, Nikolac Gabaj N, Celap I, Vidranski V, Bocan M, Filipi P, Kocijancic M. Hemolysis index. Can we uncritically trust manufacturer declarations? Clin Chem Lab Med. 2025;64:698-705.

Utjecaj interferencija



- Hemoliza u uzorcima pleuralne tekućine značajno utječe na vrijednosti LD kod $H=0,6$ što je usporedivo s dobivenom serumskom granicom interferencije
- Za ukupne proteine u uzorcima pleuralne tekućine najveći prihvatljivi H indeks je veći od serumskog
- Ikterija u uzorcima pleuralnog izljeva najizraženije utječe na određivanje triglicerida, kolesterola, amilaze i kreatinina, dok je najveći prihvatljivi I indeks za LD, proteine, kreatinin i glukozu u uzorcima pleuralnog izljeva usporediv sa serumskom granicom interferencije
- Najizraženiji utjecaj lipemije (L) očitovao se na određivanje ukupnih proteina u uzorcima pleuralne tekućine pri čemu je utvrđena granična vrijednost $L=1$
- Ako se u uzorku pleuralne tekućine utvrdi interferencija iznad definirane prihvatljive granice, rezultat pretrage treba smatrati nepouzdanim, odnosno neprikladnim za izdavanje te interferenciju treba jasno dokumentirati na laboratorijskom nalazu

Utjecaj interferencija

Analit	Kriteriji proizvođača za standardni uzorak (serum) *			Ispitani kriteriji za standardni uzorak (serum) †			Ispitani kriteriji za pleuralni punktat†		
	H	I	L	H	I	L	H	I	L
LD	/	855	5	0,5	1026	10	0,6	950	9
TP	1,5	513	12	1,5	312	1	2,5	339	1
AMY	10	1026	5	10	1026	10	2,5	149	9
ALB	7,5	1026	10	7,5	1026	10	2,5	397	4
CHOL	10	188	/	10	86	10	2,5	58	7
TRIG	10	257	/	10	168	/	2,5	13	/
CREA	10	177	6	10	168	10	2,5	164	9
GLC	20	1026	7	20	1026	10	2,5	871	9

*Deklarirani kriteriji za analitički sustav Alinity ci (Abbott Laboratories, Abbott Park, Sjedinjene Američke Države). †Kriteriji ispitani u Kliničkom zavodu za kemiju na analitičkom sustavu Alinity ci (Abbott Laboratories, Abbott Park, Sjedinjene Američke Države). LD – laktat dehidrogenaza. TP – ukupni proteini. AMY – amilaza. ALB –albumini. CHOL – kolesterol. CREA – kreatinin. TRIG – trigliceridi. GLC – glukoza. H – indeks hemolize. I – indeks ikterije. L – indeks lipemije. / – nije deklarirano.