15. ВРСТЕ БИОЛОШКОГ МАТЕРИЈАЛА, ФАЗЕ БИОХЕМИЈСКОГ ИСПИТИВАЊА И УТИЦАЈ ФИЗИОЛОШКИХ ФАКТОРА НА РЕЗУЛТАТЕ БИОХЕМИЈСКИХ АНАЛИЗА

Савремена медицина је незамислива без клиничко-биохемијске дијагностике. Биохемијске анализе телесних течности врше се у циљу дијагностике болести (70-80% целокупне дијагностике заснива се на лабораторијским налазима), праћења тока болести, процене учинка примењених терапијских поступака и процене исхода лечења различитих стања пацијената. Осим тога, биохемијске анализе имају примену и у здравој популацији, као скрининг тестови са циљем откривања постојања фактора ризика за настанак одређеног поремећаја (нпр. рутинско одређивање гликемије код свих трудница у циљу откривања гестацијског дијабетеса).

Клиничка биохемија проучава промене до којих долази у телесним течностима (како квалитативне тако и квантитативне) у различитим болестима, као и аналитичке методе које се користе у тим испитивањима. Због свега наведеног, значај биохемијског испитивања у клиничкој пракси је веома велики. Све гране медицине се у дијагностичком смислу, али и у праћењу ефеката лечењау великој мери ослањају на резултате биохемијских анализа. Значај клиничке биохемије је и у откривању нових маркера који омогућују постављање дијагнозе различитих болести или њихово праћење.

Лабораторијско испитивање треба да буде засновано на следећим принципима:

* циљани приступ – тражити анализе у зависности од клиничке слике пацијента
* прво треба користити једноставније, брже и јевтиније анализе, па ако оне не дају тражене клиничке одговоре може се прибегнути сложенијим претрагама

***Врсте биолошког материјала***

У биохемијским лабораторијама анализирају се различити узорци пацијената. Најчешће се испитују следећи узорци:

* серум и плазма који се добијају из крви
* урин
* ликвор
* садржаји телесних шупљина (плеуралне или перитонеалне)
* фецес

Често је постављање дијагнозе потребно испитивање више различитих узорака.

***Фазе клиничко-биохемијског испитивања***

Клиничко-биохемијско испитивања састоји се из три фазе:

* преаналитичка
* аналитичка
* постаналитичка

Преаналитичка фаза обухвата све активности до момента почетка анализирања узорка на анализатору и то:

* припрема пацијента
* узимање материјала
* издвајање узорка из сакупљеног материјала
* транспорт узорка
* чување узорка
* претретман узорка

Најчешћи узорак који се користи у клиничко-биохемијском испитивању је венска крв, али се такође користе капиларна, и, ређе артеријска крв (за анализе гасова крви на пример). Венска крв се најчешће добија пункцијом кубиталне вене, капиларна крв пункцијом прста или пете код новорођенчади, а артеријска крв пункцијом радијалне, брахијалне или феморалне артерије. Венску крв је најбоље узорковати помоћу вакутајнера, док се за артеријску крв користе специјални шприцеви. За узорковање крви користе се различите епрувете у зависности од тога да ли потребно добити серрум или плазму. Епрувете за издвајање серума не садрже антикоагулантно средтво, али могу садржати средтва за убрзавање коагулације као и гел сепараторе. За добијање плазме користе се епрувете које садрже антикоагулантно средство. Епрувете се разликују по затварачима који су различитих боја у зависности од адитива који је присутан (слика 1)



Слика 1. Различите врсте епрувета

При узорковању крви мора се водити рачуна и о редоследу коришћења епрувета у које се сакупља крв. Ако је потребно узети крв за хемокултуру онда се она узима у одговарајуће бочице пре узорковања за остале анализе. Серум је најчешће коришћени узорак за биохемијске анализе (гликемија, уеа, креатинин, липиди, хепатограм, јонограм, параметри статуса гвожђа, макроелементи...) али и имунохемијске анализе (хормони, витамини, туморски маркери, специфични маркери).Цитратна плазма се користи за одређивање фактора коагулације (протромбинско време –РТ, активирано парцијално тромбопластинско време – АРТТ, фибриноген, D-димер). За одређивање крвне слике користе се епрувете са антикоагулансометилен диамино тетраацетатом - EDTA.Приликом узорковања битан је и редослед узимања крви ако је потребно више различитих епрувета. Препоручени редослед и број окретања најчешће коришћених епрувета су приказани у табели 1.

Табела 1. Препоручени редослед узимања крви

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Боја затварача епрувете | Антиокоагуланс/адитив | Узорак који се добија | Број окретања |
| плава | Антикоагуланс - Na-цитрат | плазма - коагулација | 3-4 пута (епрувета мора бити пуна) |
| црна | Na-цитрат | узорак за седиментацију | 8-10 пута |
| црвена | / | серум - биохемија | 8-10 пута |
| жута | адитив - серум сепаратор | Серум | 5-6 пута (епрувета мора бити пуна) |
| зелена | хепарин | плазма | 8-10 пута (епрувета мора бити пуна) |
| љубичаста | EDTA | Узорак за крвну слику (може се добити и плазма) | 8-10 пута (епрувета мора бити пуна) |
| сива | флуорид | плазма | 8-10 пута (епрувета мора бити пуна) |

Процес лабораторијске дијагностике се састоји од низа поступака почевши од одабира анализе према клиничкој слици пацијента, затим поступка узорковања, транспорта, припреме и чувања узорка, анализе и на крају издавања и интерпретације резултата. На резултате лабораторијског испитивања могу утицати фактори везани за било који од наведених поступака, а који нису везани за болест. Из тог разлога се сви фактори који утичу на резултате лабораторијске анализе деле на преаналитичке, аналитичке и постаналитичке. Најчешћи извор грешака у лабораторијском тестирању дешава се у преаналитичкој фази (око 2/3 свих грешака) и битно је водити рачуна о њима пошто се неки од њих могу предупредити и допринети на тај начин тачности добијених резултата.

Преаналитички фактори који утичу на резултате лабораторијских анализа могу бити физиолошки и методолошки. Физиолошки фактори уичу на биохемијски састав телесних течности, док се методолошки чиниоци односе на поступак узимања узорка и третман узорка пре анализе.

Биолошки фактори могу бити променљиви и непроменљиви, односно краткотрајни и дуготрајни. У Табели 2 приказани су преаналитички фактори који утичу на резултате лабораторијских анализа

Табела 2. Преаналитички фактори

|  |  |
| --- | --- |
| Дуготрајни биолошки фактори | |
| Генетски | Пол, раса, наследне грешке, склоност према болести |
| Старост | Новорођенчад, деца до пубертета, одрасли, стари, репродукцијски циклус |
| Еколошки | Начин исхране, општи животни услови, физички, хемијски и биолочки фактори околине |
| Навике | Пушење, алкохолизам и друга средства зависности |
| Ктаткотрајни биолошки и методолошки фактори | |
| Биолошки | Метаболички (гладовање, стрес, телесни напор), положај тела, дневни ритам |
| Методолошки | Узимање крви (врста узорка, поступак узимања, прибор, антикоагуланси), начин транспорта узорка, центрифугирање, чување узорка |

***Физиолошки фактори који утићу на резултате лабораторијских анализа***

***Биолошки фактори***

***Исхрана***

За већину претрага крв треба узорковати након завршене апсорпције хране, 4-5 сати након оброка. Међутим, за састојке, као што су на пример липиди, чији се пораст у серуму јавља пола сата након оброка, крв треба узимати након 12 сати ноћног гладовања. Највеће промене после оброка показују глукоза, гвожђе и алкална фосфатаза. При одређивању концентрације урата битно је три дана пре узорковања крви не конзумирати храну богату пуринима, алкохол и лекове најмање два дана пре вађења крви. Унос хране доводи и до метаболичких и хормоналних промена, тако да је најсигурније узорковати крв ујутру наташте.

***Стрес***

Стрес је одговор организма на изненадну промену. Стерс који настаје при узимању крви доводи до ослобађања хормона катехоламина и кортикостероида који узрокује промене у метаболизму угљених хидрата, масти и протеина. Ментални стрес који пацијент може да доживи при вађењу крви мозе утицати на резултате хормонских анализа, па је за одређене анлизе неопходно мировати 20 минута пре самог узорковања крви.

***Положај тела***

Положај тела при узорковању крви утиче на концентрацију различитих састојака крви. У стојећем положају волумен плазме код одраслих је око 600-700ml мањи него у лежећем положају. Смањен волумен плазме имаће за резултат пораст концентрације протеина плазме, пораст хематокрита, пораст активности ензима, пораст концентрације калцијум, гвожђа, хормона и свих аналита везаних за протеине плазме, као што су лекови у распону 5-11%. Ако након стајања пацијент легне, потребно је око 15 минута да да би се течност прерасподелила у крвоток.

***Телесни напор***

Утицај напора може бити дуготрајан, као што је случај код тренирања или активности везаних за рад, или краткотрајан, као што је на пример шетња пре узоковања крви. Телесни напор се одражава на резултате аналита који су присутни у скелетним мишићима, па тако на пример концентрација лактата се може удвостручити. Физички напор даје пораст активнсти ензима скелетних мишића – креатин киназе (СК), аспартат-аминотрансферазе (AST) и лактат дехидрогеназе (LDH). Након напорног физичког вежбања среће се пролазна протеинурија.

***Цикличне промене***

Најизразитјим цикличним променама подлежу хормони, зато је за интерпретацију резултата лабораторијског испитивања хормона неопходно знати време узорковања. Дневним варијација подлеже хормон коре надбубрежне жлезде кортизол, који се максимално лучи око 8 сати ујутру, да би након тога његова концентрација у крви постепено падал и достигла минимум око поноћи. С обзиром да је кортизол хормон стреса, код узорковања крви пацијент треба бар 20 минута да мирује, а за узорковање се користи браунила. Неки хормони се излучују у скоковима што отежаава интерпретацију њихових резултата (нпр. хормон раста, FSH, LH, пролактин).Резултате женских полних хормона треба интерпретирати у зависности од фазе менструалног циклуса у тренутку узорковања. Концентрација гвожђа у току дана показује велике варијације.

***Лекови и фармаколошки активне супстанце***

Алкохол, кофеин, никотин, орални контрацептиви могу утицати на резултате различитих анализа. Лекови и етанол могу индуковати ензиме јетре, нарочито гама-глутамил трансферазу (GGT) и узроковати пораст њене активности. Такође различити састојци хране могу утицати на рзултате лабораторијских анализа.

***Терапијски и други поступци***

Свака мишићна траума, било хируршка интервенција, масажа или чак интрамускуларна инјекција доводе до пораста активности креатин кинзе (СК). Дигитални преглед простате доводи до пораста концентрације простата специфичног антигена (PSA), тако да узорковање крви за његову анализу не треба вршити након ове манипулације.

***Методолошки фактори***

***Припрема пацијента***

Да би се добили тачни резултати лабораторијских анализа неопходно је да пацијент буде правилно припремљен. На резултате може утицати храна коју је пацијент узимао пре узорковања, тај утицај може бити промена концентрације биолошких састојака узорка, или неки састојак хране може интерферирати са методом одређивања неког аналита. Лекови које пацијент користи такође могу утицати на резултате лабораторијских тестова, па то треба имати у виду при тумашењу резултата. Када се ради о терапијском праћењу концентрације лека важно је знати када је пацијент узео последњу дозу лека. Узорковање крви за ову сврху требало би да буде непосредно пре наредне дозе лека.

***Утицај начина узорковања крви***

Пре него ђто се приступи узорковању крви неопходно је припремити одговарајући прибор – једнократне стерилне вакуум епрувете, стерилне игле одговарајуће величине, повеску, материјала за дезинфекцију места пункције. Треба одабрати оптимално место убода. При узорковању након инфузије, узорак се узима из друге руке тек након што прође довољно времена од примене инфузије, или дистално од места примене инфузије.

При узорковању у више епрувета треба водити рачуна о редоследу узорковања како би се спречила контаминација узорка адитивом из претходне епрувете.

***Хемолиза***

Хемолиза *in vitro*се релативно чест узрок грешака у клиничко-биохемијским лабораторијама. Хемолиза је видљива голим оком када је концентрација хемоглобина већа од 0,5g/L. Постоји више узрока хемолизе:

-може бити последица отежаног вађања крви због лоших вена

- узорковање крви иглама неодговарајућег промера

- предуго држање повеске

- прејако мешање узорка

- одложено одвајање серума или плазме од ћелија

- неадекватни температурни услови чувања узорка пре центрифугирања

Хемолиза је ретко последица разарања еритроцита интраваскуларно, што се може срести у неким патофизиолошким стањима. Проблем са хемолизираним узорцима је што ће вредности анализа које су у еритроцитима присутне у високим концентрацијама бити лажно повишене и не треба их ни радити, што за последицу има потребу за поновним узорковањем крви пацијента и одложено добијање резултата.

***Грешке у обележавању***

Погрешно обележавање епрувета је груб пропуст који може довести до низа нежељених последица, како за пацијента тако и за особље које их је учинило или тумачи резултате. Поступак обележавања узорка мора бити тачно стандардизован, и пожељно је користити више података за идентификацију пацијента (име и презиме, датум рођења, матични број), а кад год је могуће питати пацијента за податке.

***Промене у узорку након вађења крви***

Промене у узорку после вађења крви могу настати због неадекватне температуре чувања узорка, времена одвајања узорка од ћелија, неправилног центрифугирања или неадекватног транспорта. Серум се може одвојити од ћелија након завршеног процеса згрушавања (око 30 минута), док се за добијање плазме узорак може одмах центрифугирати. Узорак крви за гасне анализе (артеријска или артеријализирана капиларна крв) потребно је анализирати у року од 15 минута од тренутка узорковања. Ако те није могуће, узорак се оставља на хладном. Исто важи и за узорке за одређивање јонизованог калцијума.

***САКУПЉАЊЕ УЗОРАКА УРИНА***

У урину се могу одређивати различити параметри, али није сваки узорак урина адекватан за све анализе. Постоје више различитих врста узорака урина:

* појединачни узорак урина
* насумични узорак урина
* узорак урина скупљеног у тачно одређеном временском периоду

Први јутарњи урин је најчешће коришћени појединачни узорак урина и користи се највише за квалитативно испитивање урина. То је урин који сакупља након ноћног гладовања и служи за откривање присуства патолошких састојака, као што су глукоза или протеини. Добијање адекватног узорка подразумева одговарајућу хигијену пацијента и стерилну посуду за узорковање.

За анализирање урина у одређеном временском периоду најчешће се користи 24-часовно скупљање. При нормалној исхрани и уобичајеном уносу течности дневно се излучи 1200-1500ml урина. Пре почетка скупљања урина пацијенту треба објаснити о поступку скупљања, као и о начину исхране и уносу течности током периода скупљања урина. Првог дана скупљања одбацује се прва јутарња мокраћа, а све остале мокраће у току дан и ноћи, закључно са првом јутарњом мокраћом наредног дана у исто време као и првог дана се скупљају у боцу која се обележава подацима пацијента.

***САКУПЉАЊЕ УЗОРАКА ФЕЦЕСА***

Фецес је мешавина неапсорбованих и несварљивих састојака хране који у дебелом цреву подлежу дејству бактерија, затим жучних пигмената, жучних соли и осталих секрета који се луче у лумен танког црева, десквамираних епителних ћелија гастроинтестиналног тракта и воде.

За испитивање се користе различити узорци фецеса:

* појединачни узорак (користи се за испитивање постојања окултног крварења)
* целокупна столица (24-часовни узорак) у коме се тражени састојци одређују квантитативно
* столица која се скупља 72 сата и користи се за метаболичка испитивања

Литература

1. Tопић Е, Приморац Д, Јанковић С. Медицинска биокемија и лабораторијска медицина у клиничкој пракси, 2. Издање. Медицинска наклада; 2018.
2. Петровић М. Лабораторијска хематологија. Наша књига; 2016.