

Predanalytika – kľúčový faktor pre úspešnú diagnostiku

Ako by prebiehala naša diagnostika bez laboratórných testov? Či už ide o krvný obraz, detekciu patogénov alebo patológiu – úspešná diagnostika je bez laboratórných vyšetrení ťažko predstaviteľná.

Často sa však zabúda, ako veľmi dôležité je to, čo sa deje so vzorkou predtým, ako príde do laboratória. Chceme z vašich vzoriek získať čo najviac, pomôžte nám s tým!

ZÁKLADY

Anamnéza nám pomôže pomôcť vám.

Diagnostická otázka je obzvlášť dôležitá, najmä pri krvných náteroch, cytológii, histopatológii a detekcii patogénov kultiváciou. Čím viac vieme o pacientovi a o probléme, tým presnejšie môžeme hľadať konkrétne zmeny a interpretovať vám nálezy.

Presné laboratórne hodnoty získame zo správneho materiálu.

Ak sa parameter stanoví z nesprávneho materiálu, môže byť pre diagnostiku nepoužiteľný. Materiál, ktorý potrebujete, je zaznačený na žiadanke na vyšetrenie.

Prosíme, dajte nám vedieť, aký materiál ste poslali. Plazmu je možné získať z citrátovej, EDTA a heparínovej krvi. Moč, plazma, sérum a likvor vyzerajú veľmi podobne. Správne označenie skúmaviek pomôže vyhnúť sa omylom.

V moderných laboratóriách je mnoho vecí zautomatizovaných.

Nesprávne nalepené alebo chýbajúce barkódy a popisky vyžadujú úsilie a čas navyše. To zvyšuje časové nároky diagnostického procesu.



Nesprávne nalepené barkódy



Správne nalepený barkód

Spôsob zabalenia vzorky môže byť rozhodujúci pre analýzu a môže mať dôsledky pre kolegov v laboratóriu.

Je potrebné **vyhýbať sa** nasledovnému: zatváranie striekačiek ihlami namiesto vhodných uzáverov, vzorky na patológiu v sklenených nádobách a vzorky trusu v rukaviciach. Vzniká riziko poranenia, kontaminácie a straty vzorky.

Preprava kuriérskymi službami je povolená len pre správne zabalené a označené vzorky. Používajte nami poskytované obaly, pozostávajúce z primárnej odberovej skúmavky,

sekundárnej ochrannej nádoby a vonkajšieho obalu. Pri tekutých vzorkách musí byť medzi primárnym a sekundárnym obalom absorpčný materiál a skúmavky musia byť chránené proti rozbitiu.

VYŠETRENIA KRVI

Miera naplnenia skúmavky má významný vplyv na merané parametre!

Pokiaľ je v skúmavke príliš málo krvi, antikoagulantu je nadbytok. To môže, okrem iného, mať vplyv na morfológiu buniek a viesť k falošne predĺženým časom koagulácie. Preplnenie skúmavky môže tiež spôsobovať problémy, napr. koaguláciu vzoriek krvi určených na získanie plazmy.



Ideálny objem naplnenia sa líši skúmavka od skúmavky (pozri šípky na dvoch skúmavkách vpravo, kde je označená hladina, ktorú je potrebné dodržať).

Zdroj: Laboklin

Poradie skúmaviek pri odbere krvi môže mať obrovské následky.

EDTA skúmavky by mali byť plnené posledné. Už minimálna kontaminácia ihly EDTA môže viesť k významným chybám pri meraní vápnika a draslíka. Pokiaľ je potrebné vyšetrenie koagulácie, prvých pár kvapiek krvi je potrebné buď nechať odtečť alebo je vhodné začať odber inou skúmavkou (na sérum).

Typ skúmavky ovplyvňuje plynulosť práce v laboratóriu.

Obľúbené sú malé skúmavky so zaklápacími sa uzávermi. Tie však môžu byť zdrojom problémov. Po prvé, viečka sa často nezatvoria úplne, takže vzorka vytečie. Po druhé, ihly analyzátorov ich

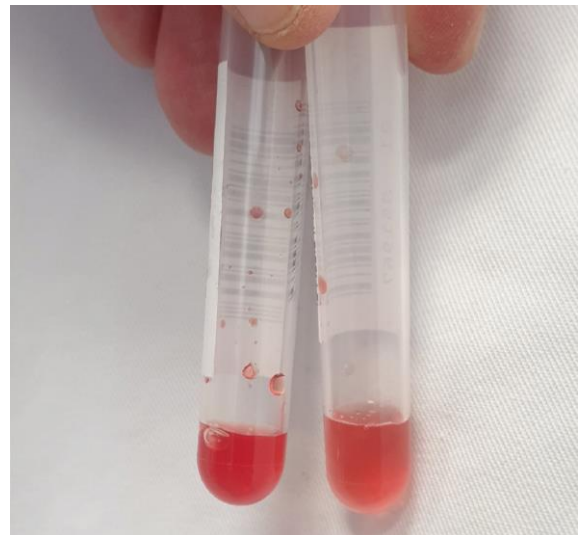
nedokážu prepichnúť. Vzorky je potrebné ručne prepipetovať. To spôsobuje zdržanie.

Stav vzorky je rozhodujúci pre jej využiteľnosť v diagnostike.

Ideálne by mala byť vzorka chladená a chránená pred svetlom až do odoslania. Už v praxi by sa mala venovať pozornosť správne skladovaniu materiálu vzorky. Vzorka krvi, ktorá ležala celý deň pri izbovej teplote za plného denného svetla, poskytne nesprávne výsledky pri určitých vyšetreniach (napr. bilirubín). Chyby sú v detailoch!

Centrifugácia a pipetovanie sú únavné, ale potrebné!

Keď sa posielajú plná krv, dôjde k hemolýze a bunkovému metabolizmu. To vedie k nesprávnym meraniam, čo môže mať ďalekosiahle dôsledky pre klinické rozhodnutia. Umiestnite vzorku vzpriamene (neprepravujte ju naležato pred centrifugáciou) a čo najskôr po odbere oddelíte sérum/plazmu (najskôr nechajte sérum zraziť pri izbovej teplote). Uistite sa, že ste supernatant pred prepravou odpipetovali. Samotné odstredovanie bez prepipetovania nepomôže!



Vzorky, ktoré neboli pred prepravou centrifugované, sú skoro vždy hemolytické

Zdroj: Laboklin

Krvný náter je súčasťou krvného obrazu.

Aj krátky čas transportu vedie k zásadným zmenám v bunkách. Už v praxi pripravený náter fixuje neporušené bunky na podložnom sklíčku a dáva nám tak príležitosť na dobré vyhodnotenie.

MOLEKULÁRNA BIOLÓGIA – PCR PÔVODCOV

DNA patogénu sa množí polymerázovou reťazovou reakciou (PCR) a deteguje sa optickými metódami. Je to priama metóda dôkazu patogénu. Avšak, deteguje sa aj DNA mŕtvych pôvodcov. Na druhej strane, negatívny výsledok nevylučuje infekciu.

Čas odberu vzorky môže byť rozhodujúci.

Dokázať patogén v krvi sa dá najpravdepodobnejšie počas virémie, bakteriémie a parazitémie alebo počas horúčky. Ak sa patogény vylučujú trusom intermitentne (napr. *Tritrichomonas foetus*), musí sa poslať zberná vzorka trusu za 3 dni.

Je potrebné zvážiť materiál vzorky a manipuláciu so vzorkou.

Na PCR je EDTA krv vhodnou vzorkou na detekciu patogénov z krvi. Lítium heparín inhibuje PCR, preto má len limitované využitie. Pre patogény, ktoré sú vylučované sliznicami (napr. u respiračných ochorení), posielajte prosíme **sterilné výterové tampóny** bez média. Transportné médium môže mať vplyv na PCR. Vzorky trusu by mali mať veľkosť lieskového orecha. Detekcia equinného koronavírusu je možná len z trusu (stery slizníc nie sú vhodné). Trus obsahuje prirodzené inhibítory PCR (napr. žľčovú kyselinu). Ak dôjde k inhibícii, test zopakujeme so zriedenou vzorkou. To tiež zriedi patogén a žiaľ zvyšuje pravdepodobnosť falošne negatívnych výsledkov. V závislosti od diagnostického problému a príznakov sa môžu použiť aj **iné materiály vzorky** (napr. biopsia kože, lymfatické uzliny, moč). Tieto vzorky sa posielajú v sterilných nádobách bez činidiel. Fixačný roztok môže zničiť DNA a zapríčiniť falošne negatívne výsledky. Vzorky nie je potrebné posielat' chladené, ale do odoslania by mali byť skladované v chladničke. Je potrebné vyhýbať sa opakovanému zmrazovaniu a rozmrazovaniu.

Prosíme, majte na pamäti, že po vykonaní PCR testu nie je možné vytvoriť antibiogram!

MIKROBIOLÓGIA – kultivácia pôvodcov

Odber vzorky

Nedezinfikujte zmenené miesto pred odberom vzorky, iba odstráňte povrchové sekréty a vrstvy (ak sú prítomné) sterilným tampónom a zlikvidujte ich. Dbajte na to, aby ste odobrali čo najviac materiálu a zabránili kontaminácii fyziologickou flórou zdravého okolia.

Správny čas

Na zistenie patogénov, ktoré sú schopné sa množiť, je potrebné odobrať vzorku čo najskôr po nástupe klinických príznakov a rozhodne pred začiatkom antibiotickej liečby. Ak bola antibiotická liečba už podaná, odporúča sa odobrať vzorku najskôr týždeň po ukončení podávania antibiotika. Ak liečba nie je úspešná alebo sa pacientov stav počas liečby zhorší, diagnostiku možno začať aj pri liečbe antibiotikami. Účinok liečby antibiotikami však môže zabrániť rastu patogénu in vitro, aj keď sú in vivo stále prítomné životaschopné baktérie.

Správne miesto odberu

Pri výbere miesta je dôležité zvážiť, kde patogén očakávame. V závislosti od suspektnej diagnózy by sme mali uprednostniť napr. tieto miesta: pri **kachu** koní (*Streptococcus equi equi*) hlboký nosný výter alebo výplach vzdušných vakov; v prípade **pneumónie** je bronchoalveolárna laváž lepšia ako výter z nosa; pri **dermatofilóze** (*Dermatophilus congolensis*) kožné chrasty alebo odtlačok čerstvých lézií so seróznou tekutinou na mikroskopickom sklíčku, ale nie ostrihané chlpy; pri **pyodermii** výter z lézie alebo vytrhané chlpy; pri **abscese** výter z vnútornej strany puzdra abscesu je lepší než hnis; pri **cystitide** moč odobraný cystocentézou alebo katetrizáciou má vyššiu výpovednú hodnotu ako moč zo spon-tánnej mikcie, ktorý môže byť kontaminovaný baktériami.

Načo potrebuje laboratórium vedieť miesto odberu?

Podľa toho, odkiaľ bola vzorka odobratá, použijeme špeciálne kultivačné médiá alebo prispôbime kultivačné podmienky (teplota, kyslík, inkubačná doba) na detekciu typických patogénov. Pri kultivácii bez dostatočných informácií môže dôjsť k nedetegovaniu dôležitých infekcií.

Veľmi dôležité: Vyhodnotenie antibiogramu podľa medzinárodných smerníc (CLSI) možno správne vykonať len vtedy, ak je známe, odkiaľ bol príslušný patogén izolovaný. Ak nie je špecifikované miesto, nemôžeme vytvoriť antibiogram podľa moderných štandardov!

CYTOLOGIA

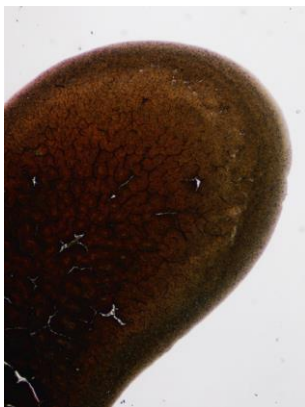
Ako pripraviť vzorky na cytológiu:

Tekutiny rozotierame ako krvný náter, zatiaľ čo stery/cytologické kefky rolujeme po sklíčku.

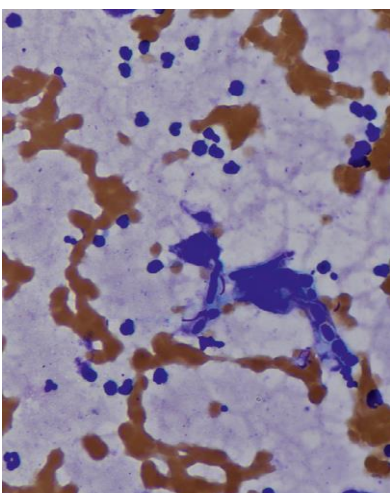
Tekutiny, ktoré obsahujú málo buniek, je dobré najprv scentrifugovať a potom urobiť náter sedimentu (prosím uveďte „sediment“ na žiadanku a vzorku).

Čo je potrebné dodržať, aby bolo možné preparáty dobre vyhodnotiť:

Aby sa predišlo autolýze, mali by byť cytologické sklíčka zhotovené už v praxi. Množstvo artefaktov sa zníži, ak náter nie je príliš hrubý a rozotrie sa malým tlakom. Nátery vždy vysušte na vzduchu, nefixujte ich (teplom) a neprikrývajte.



Preparát príliš hrubý – bunky nie je možné diferencovať



Dobrý náter – vyhodnotenie je možné (hýfy húb)

Suché podložné sklíčka je bezpodmienečne nutné poslať v obaloch na sklíčka, aby sa bunky nepoškodili. Formalínové výpary spôsobia, že preparáty budú nepoužiteľné, preto posielajte histologické, formalínom fixované vzorky v samostatnom prepravnom vrecku. Cytologické vzorky by sa nemali uchovávať v chladničke, pretože voda môže kondenzovať. V neposlednom rade je veľmi dôležitá klinická anamnéza, aby vám patológ mohol poskytnúť správnu a nápomocnú interpretáciu.

HISTOPATOLÓGIA

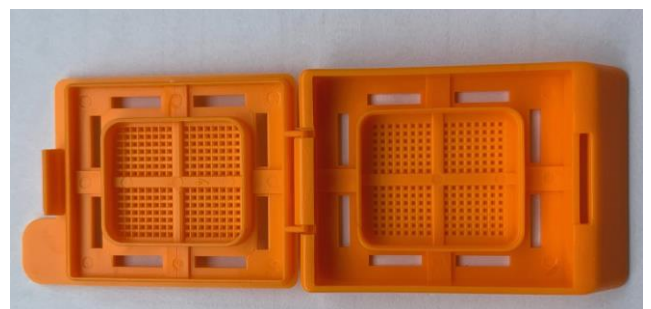
Ako pripraviť vzorky na histológiu:

Pre reprezentatívnu vzorku odoberte materiál z rôznych lokalít. Vyhýbajte sa nekrotickému tkanivu. Nádory by sa mali resekovať čo najkompletnejšie, aby bolo možné vyhodnotiť okraje. Ideálna veľkosť vzorky sa pohybuje od 0,4 do 1,0 cm v priemere. Najmä pri malých vzorkách dbajte na dostatočný počet vzoriek. Počas odberu sa vyhýbajte artefaktom, ktoré vznikajú napríklad elektrokoaguláciou, roztrhnutím alebo pomliaždením. Pre fixáciu formalínom používajte 10 % formalín (= 4 % formaldehyd) v pomere tkanivo: formalín 1:10 alebo lepšie 1:20, nepoužívajte iné fixatíva (ako alkohol). V mínusových teplotách pri preprave je možné pridať do formalínu trošku alkoholu na prevenciu zmrznutia.

Čo je potrebné dodržať, aby bolo možné preparáty dobre vyhodnotiť:

Nezabudnite na prepravu použiť nepriepustné a nerozbitné nádoby. Na veľmi malé biopsie je možné použiť špeciálne kazety, ktoré zabránia znehodnoteniu vzorky. Dôkladná anamnéza pomôže patológovi sústrediť sa na relevantné zmeny. Pre správnu interpretáciu je nevyhnutnosťou!

Dr. Jennifer von Luckner



Kazeta na biopsie

Zdroj: Laboklin