



## Stabilnost hematoloških parametara kod krava u uzorcima čuvanim pod različitim temperaturnim režimima

Marko Cincović<sup>a</sup>, Mira Majkić<sup>a</sup>, Jovan Spasojević<sup>a</sup>, Ivica Jožef<sup>a</sup>, Jelena Mitrović<sup>a</sup>,  
Dražen Kovačević<sup>a</sup>, Danijel Kovačević<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Srbija

\*Autor za kontakt: [mcincovic@gmail.com](mailto:mcincovic@gmail.com)

### SAŽETAK

Cilj ovog rada je da se ispita stabilnost rutinskih hematoloških parametara krvne slike u uzorcima krvi koji se čuvaju na sobnoj temperaturi ili temperature frižidera do testiranja, a koji imaju određene preanalitičke karakteristike, odnosno da se utvrdi da li zamrzavanje uzorka pune krvi utiče na stabilnost ispitivanih parametara. U ovom ispitivanju korišćeno je 350 uzoraka pune krvi uzete iz v.coccigea u EDTA vakutajner koji potiču od krava Holštajn-frizijske rase. U ogledu su postojala tri temperaturna režima: temperaturni režim na sobnoj temperaturi tokom 6 dana (18-22°C), temperaturni režim frižidera (3-5°C) i temperaturni režim zamrzivača gde su uzorci bili izloženi tokom 21 dana (-18 do -22°C). Gubitak stabilnosti se procenjuje poređenjem mernih vrednosti dva uzorka dobijena od istog pacijenta i analizirana u različitim vremenskim tačkama – bazalno vreme/uzorak i vreme ispitivanja/uzorak. Na osnovu parametara analitičke varijabilnosti laboratorije određena je maksimalno dozvoljena nestabilnost uzorka. Ona je za parametre crvene krvne loze iznosila 1,65% za MCV, bila je u rasponu od 2,05 do 3,9% za MCH, MCHC, RBC, HGB, HCT. Kada se radi o parametrima bele loze dozvoljena nestabilnost se kretala od 6,15 do 7,0 odnosno 7,45 za limfocite (LYM) odnosno neutrofile (NEU). Najveću maksimalnu dozvoljenu nestabilnost imali su trombociti (PLT) i ona je iznosila 9,19%. Ispitivanje hematoloških parametara izuzoraka na sobnoj temperaturi ukazuje na to da tokom šestodnevno stajanja uzoraka na sobnoj temperaturi neće doći do značajne promene u vrednosti hemoglobina, hematokrina i MCH, te oni pokazuju veoma veliku stabilnost tokom stajanja uzorka. Međutim u ovim uzorcima će doći do opadanja broja eritrocita, porasta vrednosti MCV, opadanja vrednosti MCHC, te opadanja broja leukocita koji je praćen opadanjem vrednosti neutrofila, ali porastom broja limfocita. Broj trombocita značajno opada tokom vremena. Ove promene će preći maksimalno dozvoljeni nivo nestabilnosti već posle drugog i trećeg dana na sobnoj temperaturi. Stavljanje krvni na temperature frižidera stabilizuje navedene procese do petog dana ogleda, tako da parametri variraju do nivoa dozvoljene stabilnosti. Parametar koji se rapidno menja i opada u uslovima čuvanja u frižideru je ukupan broj leukocita, tako da se već posle dva dana stajanja gubi njihova stabilnost. Zamrzavanje značajno utiče na vrednost ispitivanih hematoloških parametara, koji osim što lako prelaze prag dozvoljene nestabilnosti pokazuju i značajno statističko odstupanje srednjih vrednosti. Broj eritrocita opada sa dužinom zamrzavanja, a broj eritrocita je obrnuto proporcionalan intenzitetu hemolize plazme. Nivo hemolize raste linearno sa brojem dana od zamrzavanja. Kratkotrajno zamrzavanje tokom jednog dana nije uticalo na stabilnost broja eritrocita. Svi ostali hematološki parametri su prešli dozvoljenu granicu nestabilnosti već nakon prvog dana od zamrzavanja i pokazali korelaciju sa nivoom hemolize. Stabilnost krvi u uslovima sobnog čuvanja je zavisila od preanalitičkih faktora kojima su uzorci bili opterećeni, pa su male zapremine uzorka, hemoliza uzorka ili transport u nekontrolisanim uslovima smanjivali stabilnost. Prilikom hematološke analize potrebno je poznavati sve preanalitičke faktore kako bi se u laboratoriji adekvatno postupilo sa uzorkom.

### Ključne reči:

goveda, kompletna krvna slika, hematologija, stabilnost, hemoliza, temperatura.

### Uvod

Određivanje hematoloških parametara ima veliki značaj kod različitih životinjskih vrsta i na njih utiče veliki broj faktora (Stojanović i sar., 2021; Obradović i sar., 2021; Nikolić i sar., 2022). Preanalitička faza rada je najveći izvor varijabilnosti parametara i čini oko 70% svih grešaka u laboratoriji (Lippi i Šimundić, 2008; Lippi i sar., 2010; Bowen i sar., 2010; Humann-Ziehank i Ganter, 2012; Braun i sar., 2015). Faktori koji deluju u ovoj fazi mogu na najrazličitije načine da promene vrednosti laboratorijskih parametara koji se mere, što može dovesti do pogrešne interpretacije dobijenih rezultata, što u krajnjoj liniji može ugroziti i život životinje, odnosno tehnološke procedure na farmi. Preanalitički faktori se mogu kategorisati kao tehnički faktori (koji se odnose na način uzorkovanja i organizacijom postupanja sa uzorcima pre same analize, izbor antikoagulansa, skladištenje, transport i čuvanje uzoraka i očuvanje stabilnosti uzorka do analize) i kao biološki faktori (koji se odnose na svojstva jedinke).

Potrebno je u svakoj laboratoriji i za svaku vrstu dobro poznavati tehničke preanalitičke faktore i izvršiti njihovo identifikovanje, kvantifikovanje i kontrolu pomoću stalnih standardnih procedura laboratorije. Biološki faktori čine mnogo šire polje koje se tiče različitih osobina jedinki kao što su starost, zdravstveni status, gladovanje, stres, sedacija, telesna kondicija, reproduktivni status i dr., koji su teži za kontrolu, ali je bitno da budu kvalitetno dokumentovani i uzeti u obzir prilikom interpretacije laboratorijskih rezultata. U uslovima rada sa farmskim životinjama, dešava se da ovaj deo preanalitičke faze nije pod kontrolom stručnjaka iz laboratorije, već zavisi od obaveštenosti i obučenosti veterinara sa terena koji šalje uzorke na ispitivanje. Zbog toga je bitno da farmski veterinari budu obučeni za razumevanje kako tehničkih tako i bioloških preanalitičkih faktora, je rod njih u najvećoj meri zavisi odekvatnost uzorka, njegovog transporta kao i dostupnost podataka o jedinki za koju vršimo određivanje metaboličkog profila.

Uslovi transporta, punjenje vakutajnera i hemoliza utiču na vrednosti parametara, što je potvrđeno našim ranijim istraživanjima. Cilj našeg istraživanja (Kovačević i sar., 2019) bio je da se utvrdi nastanak hemolize u uzorcima krvi krava koje potiču iz vakutajnera sa različitim stepenom napunjenosti krvlju. U ogled je uključeno 100 epruveta napunjene do 1/3 zapremine, 100 epruveta napunjene 1/3-2/3 zapremine i 100 epruveta napunjene maksimalno do linije. U uzorcima krvi koji su napunjeni samo do prve trećine nađeno je sledeće: 10% uzoraka je pokazalo jaku hemolizu, 48% je pokazalo umerenu hemolizu, a 32% nije pokazalo znake hemolize. U uzorcima napunjenih na nivou jedne do dve trećine zapremine nađeno je 6% uzoraka sa jakim hemolizom, 15% uzoraka sa umerenom hemolizom, a 79% uzoraka je bilo bez hemolize. Kod uzoraka koji potiču iz optimalno napunjenih vakutajnera nije bilo nalaza jake hemolize, 11% uzoraka je pokazalo umerenu hemolizu, a 89% uzoraka nije pokazalo nikakve znake hemolize. Navedena istraživanja potvrđuju da se mora voditi računa o optimalnom punjenju serumskih vakutajnera prilikom uzorkovanja krvi od mlečnih krava. U ispitivanjima koje su sprovedi Cincović i sar. (2016) rezultati pokazuju da u hemoliziranim uzorcima opada vrednost hematokrita (HCT), broj eritrocita i njihova srednja zapremina, a raste vrednost MCH i MCHC indeksa kao i broj trombocita. Ukupan broj leukocita pokazuje trend opadanja. Na osnovu dobijenih rezultata zaključujemo da hemoliza ima značajan uticaj na vrednost hematoloških i biohemijskih parametara u krvi krava. Belić i sar. (2014) su ispitivali da li transportovanje na adekvatnoj temperaturi i nalaz hemolize značajno utiču na vrednost krvnih parametara kod krava. Kao indeksi hemolize korišćeni su hemoglobin i MCHC. Izvršena je analiza regresije i korelacije između koncentracije hemoglobina i vrednosti MCHC (koji je pokazatelj postojanja hemolize) i biohemijskih parametara krvi: glukoza, NEFA, BHB, albumin, ukupni proteini, urea, AST, ALT, LDH, CK, bilirubina, holesterol, trigliceridi, Na, K, Mg, Ca.

U dosadašnjim istraživanjima nije ispitana stabilnost hematoloških parametara krvi krava koje su čuvane na različitim temperaturnim uslovima i u različitim vremenskim periodima od ulaska u laboratoriju do momenta merenja. Cilj ovog rada je da se ispita stabilnost rutinskih hematoloških parametara krvne slike u uzorcima krvi koji se čuvaju na sobnoj temperaturi ili temperature frižidera do testiranja, a koji imaju određene preanalitičke karakteristike, odnosno da se utvrdi da li zamrzavanje uzorka pune krvi utiče na stabilnost ispitivanih parametara.

## Materijal i metode

U ovom ispitivanju korišćeni su uzorci pune krvi uzete iz *v.coccigea* u EDTA vakutajner. Krv je uzimana od krava sa različitih farmi u cilju rutinskog određivanja krvnih parametara. U ogledu su postojala tri temperaturna režima: temperaturni režim na sobnoj temperaturi tokom 6 dana (18-22°C), temperaturni režim frižidera (3-5°C) i temperaturni režim zamrzivača gde su uzorci bili izloženi tokom 21 dana (-18 do -22°C). U ovom istraživanju je učestvovalo 300 uzoraka poreklom od mlečnih krava u različitim periodima laktacija. Uzorci su podeljeni u 6 grupa po 50 uzoraka: prema vremenu od uzorkovanja do obrade u laboratoriji (0-4h, 4-8 h i preko 8h) i prema prisustvu preanalitičkih faktora (grupa sa hemolizom plazme, grupa transportovana na ambijentalnoj temperaturi i grupa sa malom zapreminom uzorka do od 1/3 propisanog). Sedma grupa sa 50 uzoraka predstavljaju one uzorke koji su čuvani na temperaturi zamrzivača.

Na osnovu analitičke varijabilnosti koja je dostupna u Laboratoriji za patološku fiziologiju, a prema preporukama koje su dali Gómez-Rioja i sar. (2019) odredili tehničke procedure za merenje stabilnosti. Gubitak stabilnosti se procenjuje poređenjem mernih vrednosti dva uzorka dobijena od istog pacijenta i analizirana u različitim vremenskim tačkama – bazalno vreme/uzorak i vreme ispitivanja/uzorak.

## Rezultati i diskusija

Na osnovu parametara analitičke varijabilnosti laboratorije određena je maksimalno dozvoljena nestabilnost uzorka. Ona je za parametre crvene krvne loze iznosila 1,65% za MCV, bila je u rasponu od 2,05 do 3,9% za MCH, MCHC, RBC, HGB, HCT. Kada se radi o parametrima bele loze dozvoljena nestabilnost se kretala od 6,15 da WBC, do 7,0 odnosno 7,45 za limfocite (LYM) odnosno neutrofile (NEU). Najveću maksimalnu dozvoljenu nestabilnost imali su trombociti (PLT) i ona je iznosila 9,19%. Rezultati su prikazani u Tabeli 1.

Ispitivanje hematoloških parametara izuzoraka na sobnoj temperaturi ukazuje na to da tokom šestodnevog stajanja uzoraka na sobnoj temperature neće doći do značajne promene u vrednosti hemoglobina, hematokrina i MCH, te oni pokazuju veoma veliku stabilnost tokom stajanja uzorka. Međutim u ovim uzorcima će doći do opadanja broja eritrocita, porasta vrednosti MCV, opadanja vrednosti MCHC, te opadanja broja leukocita koji je praćen opadanjem vrednosti neutrofila, ali porastom broja limfocita. Broj trombocita značajno opada tokom vremena. Ove promene će preći maksimalno dozvoljeni nivo nestabilnosti već posle drugog i trećeg dana na sobnoj temperaturi. Stavljanje krvni na temperature frižidera stabilizuje navedene procese do petog dana ogleđa, tako da parametri variraju do nivoa dozvoljene stabilnosti. Parametar koji se rapidno menja i opada u uslovima čuvanja u frižideru je ukupan broj leukocita, tako da se već posle dva dana stajanja gubi njihova stabilnost. Stabilnost uzorka se mnogo lakše gubi ukoliko se radi o uzimanju male zapremine krvi, ili ukoliko je krv transportovana nezaštićena i na sobnoj temperature do laboratorije, a sledeći faktor po značaju je hemoliza, dok dužina transporta krvi do laboratorije u trajanju do 8 časova i u kontrolisanim uslovima nije značajno uticala na stabilnost.

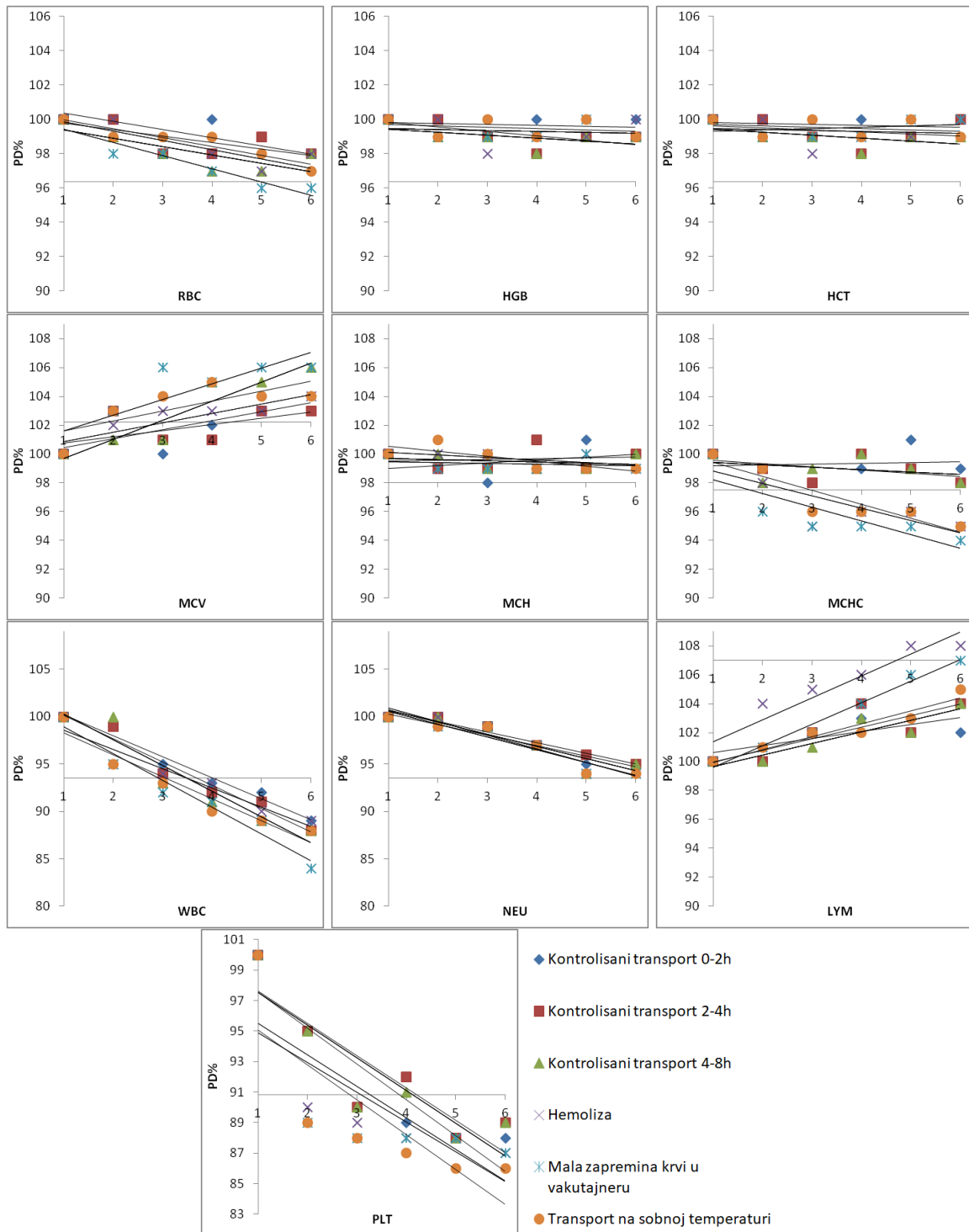
Zamrzavanje značajno utiče na vrednost ispitivanih hematoloških parametara, koji osim što lako prelaze prag dozvoljene nestabilnosti pokazuju i značajno statističko odstupanje srednjih vrednosti. Broj eritrocita opada sa dužinom zamrzavanja, a broj eritrocita je obrnuto proporcionalan intenzitetu hemolize plazme (neprikazani rezultati). Nivo hemolize raste linearno sa brojem dana od zamrzavanja. Kratkotrajno zamrzavanje tokom jednog dana nije uticalo na stabilnost broja eritrocita. Svi ostali hematološki parametri su prešli dozvoljenu granicu nestabilnosti već nakon prvog dana od zamrzavanja i pokazali korelaciju sa nivoom hemolize. Vrednost hemoglobina i hematokrita je najpre opadala, da bi potom rasla i bila najviša poslednjeg dana ogleđa. Vrednost eritrocitnih indeksa je rasla tokom vremena. Vrednost leukocita, neutrofila i limfocita je najpre rasla, a potom značajno opadala od trećeg dana zamrzavanja. Vrednost trombocita je rasla do sedmog dana zamrzavanja, da bi potom opadala do poslednjeg dana. Nestabilnost svih parametara se kretala od 10 do preko 25% prilikom zamrzavanja.

Analiza distribucije ferkvencije na hematološkom brojaču pokazuje da se javljaju određeni artefakti koji su vidljivi tokom zamrzavanja, ali ne i tokom čuvanja pune krvi na sobnoj temperaturi ili u frižideru. Kod zamrznutih uzoraka krvi utvrđeno je sledeće: distribucija frekvencije eritrocita se ne završava na donjoj marginalnoj liniji, već postoji određen broj ćelija koji se nalazi ispod ove marginalne linije, postoji slab odziv leukocita u okviru marginalnih linija, ali je taj odziv mnogo veći u zoni iznad godnje marginalne linije sa skretanjem u desno. Odziv trombocita je veoma slab, ali postoji veoma veliki broj ćelija koje se očitavaju iznad gornje referentne vrednosti za trombocite.

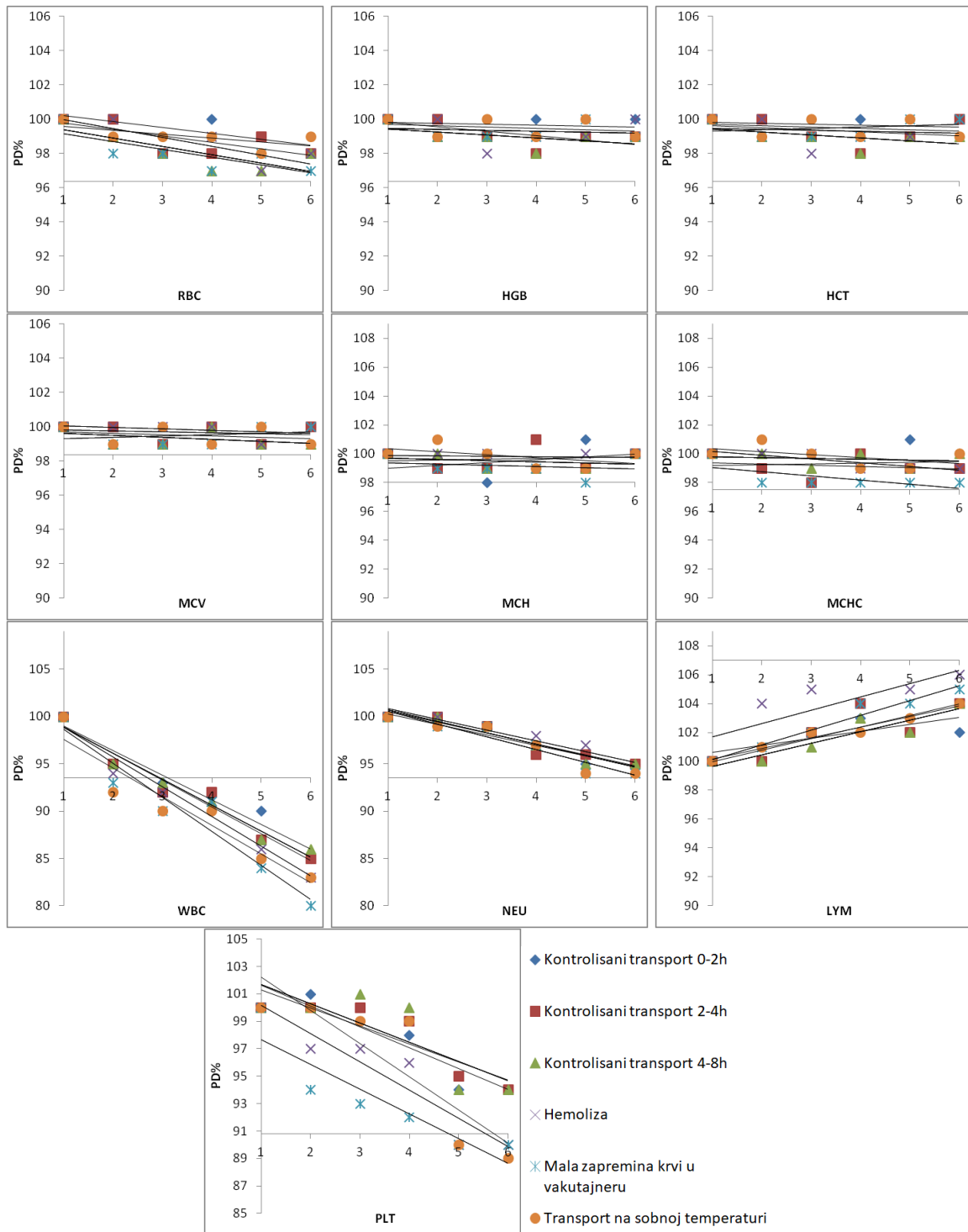
**Tabela 1.** Maksimalno dozvoljena nestabilnost (MPI) hematoloških parametara u krvi krava

**Table 1.** Maximum permissible instability of blood hematology parameters in cows

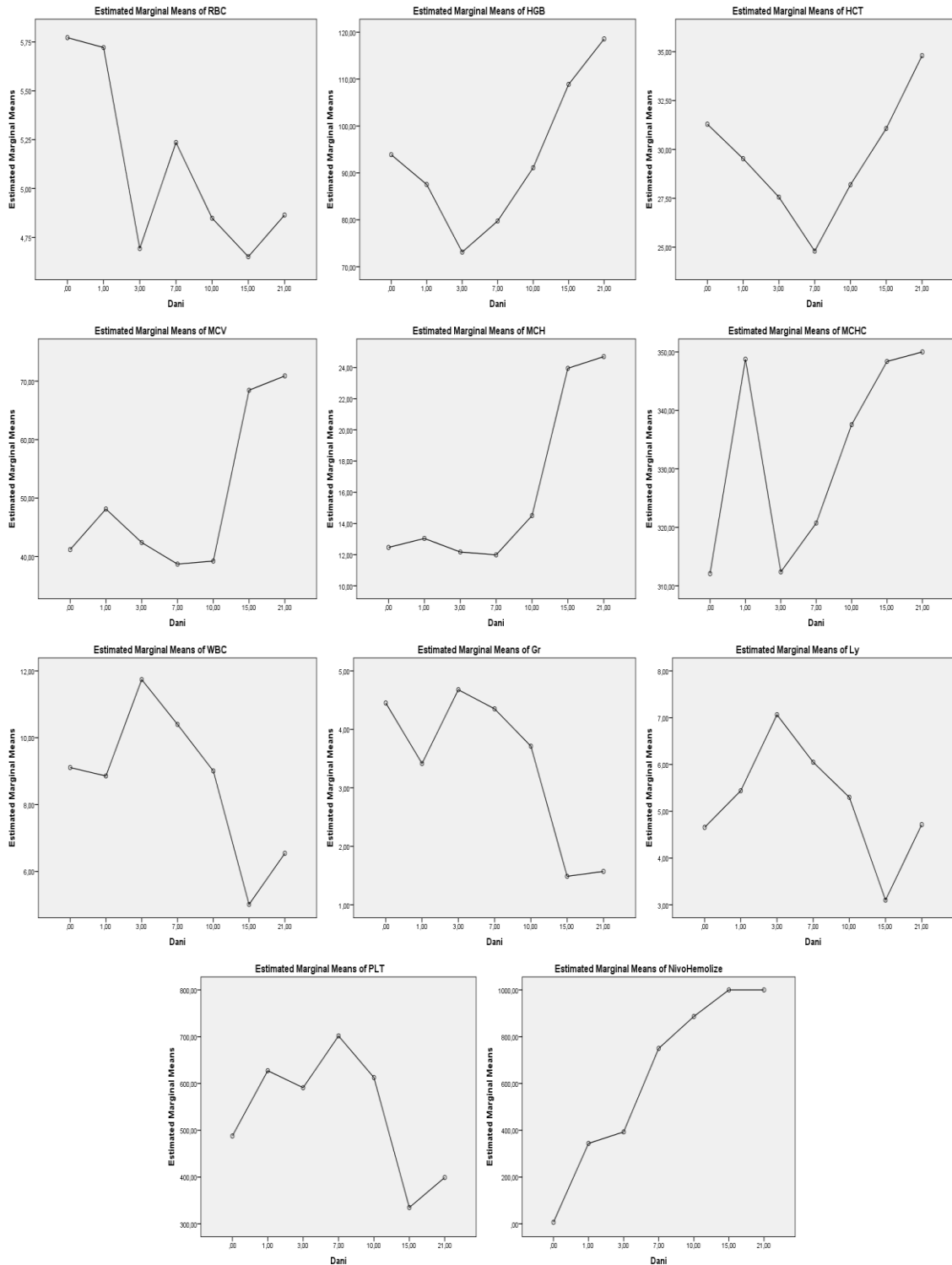
Biohemijski parametar	Maksimalno dozvoljena nestabilnost (MPI)
RBC	3,65
HGB	3,7
HCT	3,9
MCV	1,65
MCH	2,05
MCHC	2,31
WBC	6,15
NEU	7,45
LYM	7,0
PLT	9,19



**Grafikon 1.** Stabilnost hematoloških parametara na sobnoj temperaturi tokom 6 dana  
**Figure 1.** Stability of hematological parameters at room temperature during 6 days



**Grafikon 2.** Stabilnost hematoloških parametara na temperaturi frižidera tokom 6 dana  
**Figure 2.** Stability of hematological parameters at refrigerator temperature during 6 days



**Grafikon 3.** Stabilnost hematoloških parametara na temperaturi zamrzivača tokom 21 dan  
**Figure 3.** Stability of hematological parameters at freezer temperature during 21 days

## Diskusija

U velikom broju dosadašnjih istraživanja vršeno je ispitivanje stabilnosti krvnih parametara i to najčešće u humanism uzorcima, a nešto manje i u uzorcima poreklom od životinja. Kao najčešći temperaturni okviri koji su korišćeni u radovima bile su uključene sobna temperatura, temperatura frižidera na 4°C, kao i temperatura tela na 37°C, dok se u novije vreme ispituju i temperature zamrzavanja (-20°C) ili ultrazamzavanja (-70 do -80°C) (Benfi i Germagnoli, 2008, De la Salle, 2019). Vrlo često je stabilnost ispitivana u funkciji vrste hematološkog analizatora i metoda koje su njegov sastavni deo. Mi smo se opredelili za uobičajenu proceduru ispitivanja stabilnosti krvi na temperature spoljašnje sredine, frižidera i zamrzivača.

Pre ispitivanja stabilnosti potrebno je proanalizirati različite preanalitičke faktore koji mogu da utiču na stabilnost hematoloških parametara, bilo na broj uobličenih elemenata krvi, bilo na njihovu morfologiju. U našem ogledu koristili smo EDTA antikoagulans koji je uobičajeni antikoagulans za hematološka ispitivanja (Banfi i sar., 2007). Međutim, EDTA je izrazito kiseo pa je potrebno koristiti soli EDTA. Soli su hiperosmolarnе, pa izvlače vodu iz ćelija dovodeći do njihove dehidracije i promene u obliku, pa samim tim mogu lako dovesti do opadanja njihove stabilnosti. Prema svetskim preporukama, upotreba Na<sub>2</sub> i K<sub>2</sub> soli EDTA ne utiče značajno na morfologiju ćelija (Narayanan, 1993) pa su ove natrijumove i kalijumove soli preporučene za rutinsku hematološku dijagnostiku (NCCLS, 1989), što smo i mi koristili u ovom ispitivanju. Pored adekvatnog izbora vakutajnera od velikog značaja je njegovo punjenje krvlju. Uzimanje uzoraka krvi je vršeno do optimalne tačke osim u onim epruvetama koje su prema uslovima oglеda trebale da budu napunjene malim zapreminama krvi. Prepunjavanje vakutajnera dovodi do neadekvatnog mešanja sa antikoagulansom kada se javlja lažna policitemija sa trombocitopenijom i leukopenijom (Pewarchuk i sar., 1992), dok neadekvatno punjenje dovodi do opadanja hematokrita i MCV (Chen i sar., 1999). Mešanje uzorka je vršeno kod svih uzoraka neposredno posle uzimanja kako bi se krv što bolje pomešala sa antikoagulansom. U preanalitičkoj fazi je veoma značajno i mešanje uzorka posle uzimanja krvi, jer u uzorcima koji nisu adekvatno promešane postoji smanjenje broja eritrocita, hemoglobina, hematokrita i broja trombocita, dok je srednja zapremina trombocita bila značajno povećana (Lippi i sar., 2007).

Ranija ispitivanja stabilnosti krvi dali su određene sličnosti ali i razlike u odnosu na naše nalaze. U našim okolnostima nije bilo previše istraživanja na temu stabilnosti hematoloških parametara kod goveda. Jedan stariji rad koji je objavljen na malom broju od 6 uzoraka pokazao je da u temperaturnim uslovima na 4°C i 18°C tokom 72h čuvanja uzorka dolazi do porasta broja eritrocita, opadanje vrednosti leukocita, opadanje vrednosti hemoglobina i slaba porast hematokrita, a navedene promene su bile izražene posle 48 časova čuvanja (Hadžimusić i Nuhanović, 2013). U jednoj studiji su utvrđene promene u hematološkim vrednostima na 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 i 96 sati skladištenja u uzorcima venske krvi goveda čuvanim na 4°C i 24°C u vakutajnerima sa EDTA. Uzorci govede krvi čuvani na 4°C dali su pouzdane rezultate za nivoe WBC, RBC, Hb, PCV, MCV, MCH i MCHC sa izuzetkom nivoa PLT pošto su se nivoi PLT smanjili kada se PLT čuvao 24 sata ili duže (Kirmizigul i sar., 2017). Ispitivanje stabilnosti krvnih parametara kod goveda vršili su i Espiritu i sar. (2019), gde su uzorci su čuvani u frižideru na 4°C i analizirani nakon 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 120 h i 192 h čuvanja. Parametri krvne slike ostali su stabilni tokom 192 h, osim za MCHC. NEU i EOS su ostali stabilni 192 sata. Vrednosti WBC, LIM i MONO dale su nedosledna merenja koja su povratila svoje početno merenje nakon 12 h i 24 h skladištenja, respektivno, a zatim su ostala stabilna do 120 h. Ovo istraživanje je pokazalo da se uzorci krvi goveda za CBC analizu mogu čuvati 120 sati na 4°, što se poklapa sa našim rezultatima. U humanism uzorcima utvrđeno je sledeće: crvene krvne ćelije, trombociti, hemoglobin i MCH stabilni tokom skladištenja od 48 sati na 4°C, 10°C ili 23°C; hematokrit i MCV su se povećali, dok su se bela krvna zrnca smanjila za 48 h kada se čuvaju na 23 °C; limfociti, neutrofili, eozinofili i bazofili su pokazali značajne razlike nakon 12 sati skladištenja na 23°C (Unalli i Ozarda, 2021).

Zamrzavanje uzorka je dovelo do razvoja hemolize i značajnog odstupanja vrednosti parametara. U jednom ogledu gde se zamrzavanje vršilo na -70°C tokom 30 dana (Tang i sar., 2019) pronađeno je da srednje vrednosti većine parametara, sa izuzetkom hemoglobina i broja trombocita, značajno su se razlikovale do 15 dana čuvanja, te da je broj belih krvnih zrnaca i širina distribucije crvenih krvnih zrnaca bio najpromenljiviji, a posle 30 dana samo je hemoglobin ostao stabilan i pouzdan, dok ostali parametri krvne slike mereni u uskladištenoj krvi nisu dovoljno pouzdane stabilnosti. Stabilnost je određena kroz koeficijent varijacije parametara. Stalnost hemoglobina se može tumačiti činjenicom da se on meri iz intaktnih eritrocita, pa je zbog toga njihov broj stabilan, dok smo se mi u ogledu bavili dijagnostikom hemoglobina u plazmi, te je njegov broj konstantno rastao kao posledica hemolize. In vitro hemoliza pune krvi značajno utiče na parametre krvne slike. Poređenje uzoraka sa različitim stepenom hemolize pokazalo je smanjenje broja crvenih krvnih zrnaca i hematokrita i povećanje srednje koncentracije korpuskularnog hemoglobina i broja trombocita u uzorcima sa visokim stepenom

hemolize, a ako se analiziraju samo uzorci sa blagim stepenom hemolize pokazali su samo blagi porast srednjeg korpuskularnog hemoglobina, srednje koncentracije korpuskularnog hemoglobina i broja trombocita (de Jonge i sar., 2018). Lippi i sar. (2012) su pokazali da veštački izazvana, umerena do visoka hemoliza dovodi do smanjenja eritrocita i Hct i povećanja srednjeg ćelijskog hemoglobina (MCH) i broja trombocita, u zavisnosti od stepena hemolize. Sa navedenim rezultatima se slažu i naši rezultati istraživanja. Hemoliza pokazuje određeni stepen linearne i druge vrste povezanosti sa ostalim parametrima, što je pokazano i u našim rezultatima, a novija istraživanja pokazuju da je moguće korigovati dobijene vrednosti iz hemolitičkog uzorka pomoću koncentracije slobodnog hemoglobina, kako bi se dobila vrednost koja je približna tačnoj vrednosti u uzorku te se uprkos hemolizi ne mora ponavljati uzorkovanje za rutinske hematološke pretrage (Peng i sar., 2020). Krioglobulini koji se stvaraju ili ostaju posebno stabilni na niskim temperaturama mogu biti značajan uzrok promene u vrednosti uobičenih elemenata krvi. Promene mogu nastati zbog njihovog delovanja na morfologiju ćelija kada će doći do netačnog očitavanja od strane hematološkog aparata, pa će jedan tim ćelija očitati kao drugi tip (Zandecki i sar., 2012). Iako su oni opisani kod ljudi u različitim patološkim procesima, poznato je da se mogu stvoriti i nespecifično, pa su potrebna dalja istraživanja na temu krioglonulina. Krioglobulini mogu podići vrednost leukocita, što se u našem ogledu desilo posle prvog dana zamrzavanja. Pored ovoga, visoka bilirubinemija ili hiperlipidemija mogu uticati na vrednost hematoloških parametara, ali samo ako se radi o vrlo visokim koncentracijama (Zandecki i sar., 2007).

Kada se radi o uzorcima zamrznute krvi primećeno je da postoje brojna odstupanja u morfologiji ćelija koji su rezultirali dobijanjem izmenjenih distribucija frekvencije veličine ćelije i neadekvatnim očitavanjem ćelija na hematološkom brojaču. Poznato je na primer da pseudotrombocitopenija, satelitizam trombocita ili prisustvo trombocita velike zapremine može da interferira sa vrednostima leukocita (Zandecki i sar., 2007a; Bobba i Doll, 2012; Nagler i sar., 2014). Do lažnog povećanja broja leukocita mogu dovesti agregirani trombociti, prisustvo eritrocita sa jedrom ili eritrocita otpornih na liziranje. Pomeranje distribucije trombocita u desno, posebno izvan očekivanog opsega dešava se kao posledica porasta zapremine trombocita i njihovog međusobnog slepljivanja, ali može biti i rezultat prisustva većeg broja fragmenata eritrocita ili krioprecipitata. Međusobno slepljivanje i skupljanje polimorfonukleara dovešće do smanjenja ukupnog broja leukocita (Zandecki i sar., 2007; Matsuo i sar., 2016). Visoke vrednosti leukocita i u manjoj meri prisustvo ogromnih trombocita utiču na vrednosti hemoglobina i na eritrocite. Bilo koje promene u vrednosti direktno merenih vrednosti kao što je broj eritrocita, hemoglobin, hematokrit ili MCV može uticati na vrednosti onih parametara koji se dobijaju kalkulacijom. Poznavanje histograma je od velikog značaja za interpretaciju morfologije ćelije iako se ne može koristiti samostalno (Athanasίου i sar., 2018). Skretanje eritrocitne distribucije histograma u levo označava mikrocitozu, dok skretanje u desno označava makrocitozu. Kada se radi o histogramu leukocita on bi trebao da ima tri pika (za limfocite, monocite/eozinofile i bazofile i neutrofile), a morfološke promene ćelija dovešće do izostanka navedena tri pika, dok će međusobno agregiranje ćelija dovesti do konstatnog porasta krive sa pikom izvan opsega za normalnu veličinu leukocita. Skretanje distribucije trombocita u desno sa pikom izvan opsega govori o većem nalazu šistocita, što se može očekivati u našem istraživanju zbog raspadanja eritrocita usled zamrzavanja.

## Zaključak

Nivo dozvoljene nestabilnosti hematoloških parametara kod krava je nizak, zbog male analitičke i biološke varijabilnosti koje ovi parametri pokazuju. Čuvanje uzoraka u frižideru tokom pet dana daje dobru stabilnost uobičenih elemenata krvi i ostalih hematoloških vrednosti. Čuvanje uzoraka na sobnoj temperaturi daje dobru stabilnost u trajanju od dva do tri dana, ali to značajno zavisi od preanalitičke opterećenosti uzorka. Zamrzavanje uzorka pune krvi u zamrzivaču dovodi do velike nestabilnosti hematoloških parametara uz razvoj morfološke nestabilnosti ćelija i intenzivne hemolize, pa se zamrznuti uzorci ne mogu smatrati stabilnim i kvalitetnim za dalje analize.

## Literatura

- Athanasίου, L. V., Tsokana, C. N., Pardali, D., Moraitou, K. A. 2018. Histograms of Complete Blood Counts in Dogs: Maximizing Diagnostic Information. *Top companion anim med* 33(4): 141-146.
- Banfi G, Salvagno GL, Lippi G. 2007. The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. *Clin Chem Lab Med* 45: 565-576.
- Banfi, G., Germagnoli, L. 2008. Preanalytical phase in haematology. *Journal of Medical Biochemistry* 27(3): 348-353.



- Belić B., Cincović M., Toholj B., Stevančević M., Delić B. 2014. Uticaj uzoraka krvi mlečnih krava na vrednost biohemijskih parametara u uslovima transporta na stabilnoj temperaturi. *Veterinarski žurnal R.Srpske* 14 (2): 217-224.
- Bobba R.K., Doll D.C. 2012 Platelet satellitism as a cause of spurious thrombocytopenia. *Blood* 119(18):4100.
- Bowen R.A.R., Hortin G.L., Csako G., Otanez O.H., Ramaley A.T. 2010. Impact of blood collection devices on clinical chemistry assays. *Clinical Biochemistry* 43, 4-25.
- Braun J., Bourges-Abella N., Geffre A., Concordet D., Trumel C. 2015. The preanalytic phase in veterinary clinic pathology. *Vet Clin Pathol* 44(1): 8-25.
- Chen, B. H., Fong, J. F., & Chiang, C. H. 1999. Effect of different anticoagulant, underfilling of blood sample and storage stability on selected hemogram. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 15(2): 87-93.
- Cincović, M.R., Starić, J., Belić, B., Lakić, I. 2016. Influence of blood sample hemolysis on hematological and biochemical parameters in cows during early lactation. *Contemporary Agriculture* 65 (3-4): 39-43.
- de Jonge, G., Dos Santos, T.L., Cruz, B.R., Simionatto, M., Bittencourt, J.I.M., Krum, E.A., Moss, M.F., Borato, D.C.K. 2018. Interference of in vitro hemolysis complete blood count. *J Clin Lab Anal.* 32(5):e22396.
- De la Salle, B. 2019. Pre-and postanalytical errors in haematology. *International journal of laboratory hematology* 41: 170-176.
- Espiritu, H. M., Faruk, S. A., Lee, G. J., Lopez, B. I. M., Lee, S. S., Cho, Y. I. 2019. Assessment of bovine blood sample stability for complete blood count and blood gases and electrolytes analysis during storage. *Korean Journal of Veterinary Service* 42(4): 265-274.
- Guder, W.G. 2014. History of the preanalytical phase: a personal view. *Biochemia Medica* 24(1): 25-30.
- Hadžimusić, N., Nuhanović, A. (2013). Effects of temperature and storage time on hematological parameters of cows. *Veterinaria* 62(1-2): 39-46.
- Humann-Ziehank, E., Ganter, M. 2012. Pre-analytical factors affecting the results of laboratory blood analyses in farm animal veterinary diagnostics. *Animal* 6: 7.
- Kirmizigul, A.H., Gokce, E., Sozmen, M. 2017. Effects of storage duration and temperature on the values of haematological parameters in bovine and ovine blood samples. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 68(2): 145-154.
- Kovačević, D., Cincović, M., Belić, B., Lakić, I. 2019. Uticaj punjenosti serumskog vakutajnera na nastanak hemolize uzorka krvi poreklom od mlečnih krava. *Zbornik kratkih sadržaja: 24. Godišnje savjetovanje doktora veterinarske medicine Republike Srpske (Bosna i Hercegovina)* 12-15. jun.
- Lippi, G., Musa, R., Avanzini, P., Aloe, R., Pipitone, S., Sandei, F. 2012. Influence of in vitro hemolysis on hematological testing on Advia 2120. *Int J Lab Haematol* 34(2):179-184.
- Lippi, G., Salvagno, G.L., Montagnana, M., Banfi, G., Guidi, G.C. 2007. Evaluation of different mixing procedures for K2 EDTA primary samples on haematological testing. *Labmedicine* 38: 723-725
- Lippi, G., Bonelli, P., Rossi, R., Bardi, M., Aloe, R., Galeffi, A., Bonilauri, E. 2010. Development of a preanalytical errors recording software. *Biochemia Medica* 20(1): 90-95.
- Lippi, G., Simundic, A. 2010. Total quality in laboratory diagnostics. It's time to think outside the box. *Biochemia Medica* 20(1): 5-8.
- Matsuo, S., Fujishima, A., Enomoto, M. et al. 2016. A case of EDTA- induced pseudo-neutropenia. *Jpn J Clin Chem* 45(2):135-139.
- Nagler, M., Keller, P., Siegrist, D., Alberio, L. 2014. A case of EDTA- dependent pseudothrombocytopenia: simple recognition of an underdiagnosed and misleading phenomenon. *BMC Clin Pathol* 14(1):19
- Narayanan, S. 1993. Effect of anticoagulants used for blood collection on laboratory tests. *Proc JCLA* 7: 1-10.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1989. H35-P. Additives to blood collection devices: EDTA. Proposed standard. Villanova, PA, NCCLS 9: 851-74.
- Nikolić, S., Stojanović, D., Cincović, M., Majkić, M., Došenović-Marinković M., Spasojević J., Galić I., Štrbac F., Kovačević, D. 2022. Promene u hematološkim i biohemijskim parametrima krvi pasa prilikom dugotrajne primene ivermektina u cilju lečenja bolesti srčanog crva. *LETOPIS NAUČNIH RADOVA / ANNALS OF AGRONOMY* 46: 1-10.
- Obradović N., Belić B., Cincović M., Majkić M. 2021. Povezanost kortizola i drugih krvnih parametara kod miševa u akutnom stresu. *LETOPIS NAUČNIH RADOVA / ANNALS OF AGRONOMY* 45(1): 104-112
- Peng, Z., Xiang, W., Zhou, J., Cao, J., Li, Z., Gao, H., Zhang, J., Shen, H. 2020. Hemolytic specimens in complete blood cell count: Red cell parameters could be revised by plasma free hemoglobin. *J Clin Lab Anal* 34(6):e23218.
- Pewarchuk, W., VanderBoom, J., Blajchman, M.A. 1992. Pseudopolycythemia, pseudothrombocytopenia, and pseudoleukopenia due to overfilling of blood collection vacuum tubes. *Arch Pathol Lab Med* 116: 90-92.
- Stojanović D., Cincović M., Štrbac F., Petrković K., Cristina R.T., Kovačević Z. 2021. Principal component and correlation analysis of blood routine parameters in experimental sepsis in rats. *LETOPIS NAUČNIH RADOVA / ANNALS OF AGRONOMY* 45 (2): 143-152.
- Tang, O., Selvin, E., Arends, V., Saenger, A. 2019. Short-term stability of hematologic parameters in frozen whole blood. *Journal of Applied Laboratory Medicine* 4(3): 410-414.
- Unalli, O.S., Ozarda, Y. 2021. Stability of hematological analytes during 48 hours storage at three temperatures using Cell-Dyn hematology analyzer. *Journal of Medical Biochemistry* 40(3): 252
- Zandecki, M., Genevieve, F., Gerard, J., Godon, A. 2007. Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part II: white blood cells, red blood cells, haemoglobin, red cell indices and reticulocytes. *Int J Lab Haematol* 29(1):21-41

- Zandecki, M., Genevieve, F., Gerard, J., Godon, A. 2007a. Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part I: platelets. *Int J Lab Haematol* 29(1):4-20.
- Zandecki, M., Genevieve, F., Gérard, J., Godon, A. 2012. Spurious counts and spurious results on hematology analyzers: white blood cells, red blood cells, hemoglobin, red cell indices, and reticulocytes. *Laboratory Hematology Practice* 79-95.

## Stability of hematological parameters of cows in samples stored under different temperature regimes

Marko Cincović<sup>a</sup>, Mira Majkić<sup>a</sup>, Jovan Spasojević<sup>a</sup>, Ivica Jožef<sup>a</sup>, Jelena Mitrović<sup>a</sup>, Dražen Kovačević<sup>a</sup>, Danijel Kovačević<sup>a</sup>

<sup>a</sup>University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Department of veterinary medicine, Novi Sad, Serbia

\*Corresponding author: [mcincovic@gmail.com](mailto:mcincovic@gmail.com)

### ABSTRACT

The aim of this study was to examine the stability of routine hematological blood parameters in blood samples that are stored at room temperature or refrigerator temperature until testing, and which have certain pre-analytical characteristics, i.e. to determine whether freezing a whole blood sample affects the stability of the tested parameters. In this study, 350 samples of whole blood collected from the v.coccige in an EDTA vacutainer originating from Holstein-Friesian cows were used. There were three temperature regimes in the experiment: the temperature regime at room temperature for 6 days (18-22°C), the temperature regime of the refrigerator (3-5°C) and the temperature regime of the freezer where the samples were exposed for 21 days (-18 to -22°C). The loss of stability is evaluated by comparing the measurement values of two samples obtained from the same patient and analyzed in different temperature regimens and times. Based on the analytical variability parameters of the laboratory, the maximum permissible instability of the sample was determined. It was 1.65% for the red blood line parameter for MCV, it was in the range of 2.05 to 3.9% for MCH, MCHC, RBC, HGB, HCT. When it comes to white blood cell parameters, the permitted instability of secretions is from 6.15 for VBC, to 7.0 and 7.45 for lymphocytes (LIM) and neutrophils (NEU). Platelets (PLT) had the highest maximum allowed instability and it amounted to 9.19%. Examination of the hematological parameters of the samples at room temperature indicates that during the six-day storage of the samples at room temperature there will be no significant changes in the values of hemoglobin, hematocrit and MCH, and they show a very high stability during the storage of the samples. However, in these samples there will be a decrease in the number of erythrocytes, an increase in the MCV value, a decrease in the MCHC value, and a decrease in the number of leukocytes, which is followed by a decrease in the neutrophil value, but an increase in the number of lymphocytes. Platelet count drops significantly over time. These changes will be the maximum allowed level of instability already after the second and third day at room temperature. Setting the temperature on the refrigerator stabilizes the mentioned processes until the fifth day of the experiment, so that the parameters change to the level of permitted stability. A parameter that changes rapidly and falls under conditions of storage in the refrigerator is the total number of leukocytes, so that their stability is lost after only two days of storage. Freezing significantly affects the value of the examined hematological parameters, which, in addition to easily exceeding the threshold of permissible instability, also show a significant statistical deviation of the mean values. The number of erythrocytes decreases with the length of freezing, and the number of erythrocytes is inversely proportional to the intensity of plasma hemolysis. The level of hemolysis increases linearly with the number of days since freezing. Short-term freezing during one day did not affect the stability of the number of erythrocytes. All other hematological parameters exceeded the permitted limit of instability already after the first day of freezing and showed a correlation with the level of hemolysis. The stability of blood under room storage conditions depended on the preanalytical factors with which the samples were loaded, so small sample volumes, hemolysis of the sample or transportation in uncontrolled conditions reduced the stability. During the hematological analysis, it is necessary to know all the pre-analytical factors in order to adequately handle the sample in the laboratory.

**KEY WORDS:** cattle, complete blood count, hematology, stability, hemolysis, temperature