

Актуальные вопросы преаналитического этапа гематологических исследований*

В.А. Крюкова

технолог-аналитик отдела преаналитики и клинической биохимии

Медицинская компания ООО "ОМБ", Москва

В первой части статьи были разобраны причины, ухудшающие качество результатов гематологических исследований. При этом в клиническом примере предшествующего раздела публикации не рассматривался не соответствовавший клинической картине заболевания результат определения СОЭ больного.

Исследование СОЭ имеет свою специфику и требует отдельного обсуждения.

Оценка качества выполнения определения СОЭ на преаналитическом этапе исследования

С целью выяснения причин низкого результата СОЭ у пациента лабораторией был выполнен расчет среднего значения результатов определения СОЭ двух дней месяца за последний квартал и сравнение результатов, полученных при выполнении анализа по методике лаборатории и по методу Вестергрена (референсный метод определения СОЭ, подтвержденный Международным комитетом по стандартизации в гематологии (ICSH) и ВОЗ).

Было установлено, что с июня значения СОЭ в данной лаборатории не только стали ниже в среднем, но при этом уменьшилось и число проб с высокой скоростью оседания эритроцитов.

В этот период времени была модифицирована методика выполнения данного анализа за счет введения в работу автоматического гематологического анализатора. В соответствии с требованиями пробоподготовки для геманализатора существенные изменения претерпел порядок осуществления преаналитического этапа гематологических анализов. Вместо взятия капиллярной крови была организована доставка в лабораторию из процедурных кабинетов проб венозной крови в пробирках с антикоагулянтом (K_3 -ЭДТУК). Специальные пробирки для анализа СОЭ с цитратом натрия (1 : 4) в практику работы не вводились. Венозную кровь получали шприцем и переносили в пробирку открытого типа, содержащую K_3 -ЭДТУК. Отклонения взятого объема крови в пробирках составляли более 15%. Кровь в лабораторию транспортировали в обычных штативах. Время с момента взятия

* Окончание. Начало см.: Справочник заведующего КДЛ. 2007. № 8.

крови до начала аналитической стадии гематологических исследований составляло от 2 до 2,5 часов. Следует также отметить, что в июне была высокая температура окружающей среды (28–35 °С), но пробы крови при транспортировке и хранении не охлаждались. До начала анализа пробы крови согласно инструкции помещали на цилиндрический гематологический миксер. Сначала проводили измерения во всех пробах на анализаторе, затем анализ СОЭ и изготовление препарата для микроскопии.

При изменении традиционной схемы взятия крови у фельдшеров-лаборантов возникли методологические сложности, в частности, затруднения вызывала процедура заполнения капилляра Панченкова кровью из пробирки. Чтобы ускорить работу и не использовать отдельные пробирки для смешивания каждой пробы крови с цитратом, была изменена методика выполнения теста. Перед набором крови каждый капилляр опускали в 14 мл пробирку с 5% цитратом натрия и, не удаляя раствор из капилляра, опускали его в пробирку с кровью, как показано на рис. 1. При помощи резиновой груши капилляр Панченкова заполняли кровью из пробирки до метки “0” и устанавливали в штатив с резиновой заглушкой. Далее измерение СОЭ проводили традиционным способом в течение 1 часа.

Схема отрицательного влияния различных факторов изображена на рис. 1.

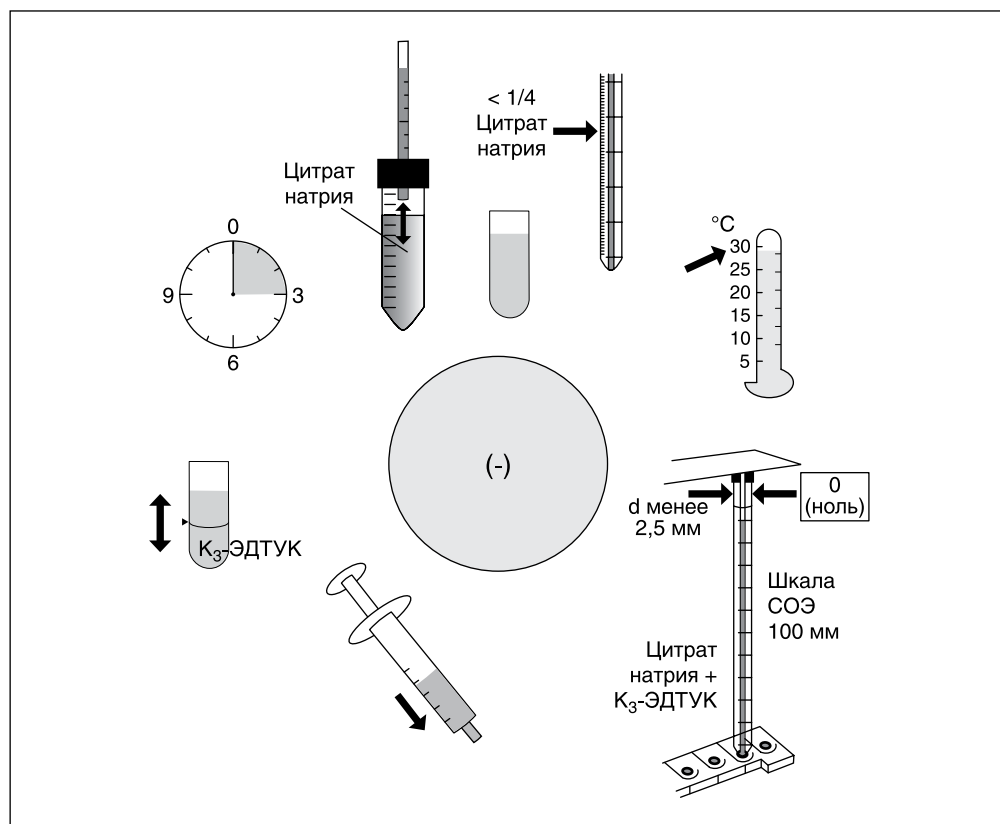


Рис. 1. Отрицательное влияние различных факторов на преаналитическом этапе

Сравнение результатов метода измерения СОЭ в лаборатории с методом Вестергрена

При проведении контрольного сравнения с референсным методом лаборант выполнял анализ СОЭ, как описано выше. Из каждой пробы крови после перемешивания покачиванием 1,2 мл крови автоматическим дозатором переносили в пробирку с 0,3 мл 109 ммоль/л цитрата натрия, где она смешивалась с ним в соотношении 1 : 4 согласно регламенту. Измерение в этой пробе проводили методом Вестергрена при помощи коммерческой ручной системы открытого типа, состоящей из пробирки с цитратом натрия (1 : 4) и градуируемой пластиковой пипетки, устанавливаемой в пробирку на специальном штативе. После заполнения СОЭ системы и ее установки на штатив измеряли уровень оседания столбика эритроцитов за 1 час. Присутствие K_3 -ЭДТУК в пробе являлось отклонением от стандартов для метода Вестергрена, но было в данном случае необходимо для сравнения результатов исследования с методом лаборатории. Результаты в капиллярах Панченкова оказались существенно ниже, чем в системе Вестергрена.

Ухудшение качества исследований в данной лаборатории было вызвано следующими факторами:

- ~ присутствие в пробах крови антикоагулянтов K_3 -ЭДТУК и цитрата натрия, что могло сказаться на свойствах и агрегации эритроцитов и привести к изменению скорости реакции;
- ~ несоблюдение регламентированного унифицированным методом соотношения 1 : 4 для разведения пробы крови цитратом натрия;
- ~ превышение (существенно больше положенных 60 мин) времени хранения проб до выполнения анализа, включая транспортировку и исследование проб на анализаторе;
- ~ взятие крови шприцем (механическое повреждение клеток крови);
- ~ нарушение температуры хранения.

Особо следует отметить, что диаметр капилляра также играет существенную роль в возникновении эффекта замедления скорости этой реакции. Чем уже капилляр, тем сильнее будут влиять вышеназванные факторы на снижение скорости оседания клеток за счет поверхностных явлений. Диаметр капилляров Панченкова в три раза меньше диаметра системы определения СОЭ Вестергрена, что определило, при прочих равных условиях, более низкие средние значения СОЭ в капиллярах.

При переходе на новый метод гематологических исследований в лаборатории не было проведено обучение сотрудников, что и привело к ухудшению качества результатов исследования.

Механизмы действия на СОЭ различных факторов

Осаждение эритроцитов в вертикально стоящем узком сосуде обладает существенными отличиями от физиологических процессов и имеет достаточно сложный механизм. По мере оседания клеток и их агрегатов в замкнутой системе образуется обратный ток плазмы крови вверх. Скорость оседания не является линейной, и ее график представляет собой варианты сигмовидной кривой (рис. 2). Условно можно выделить три фазы цикла измерения СОЭ. Разные преаналитические и аналитические факторы будут иметь преимущественное влияние на разные фазы теста СОЭ.

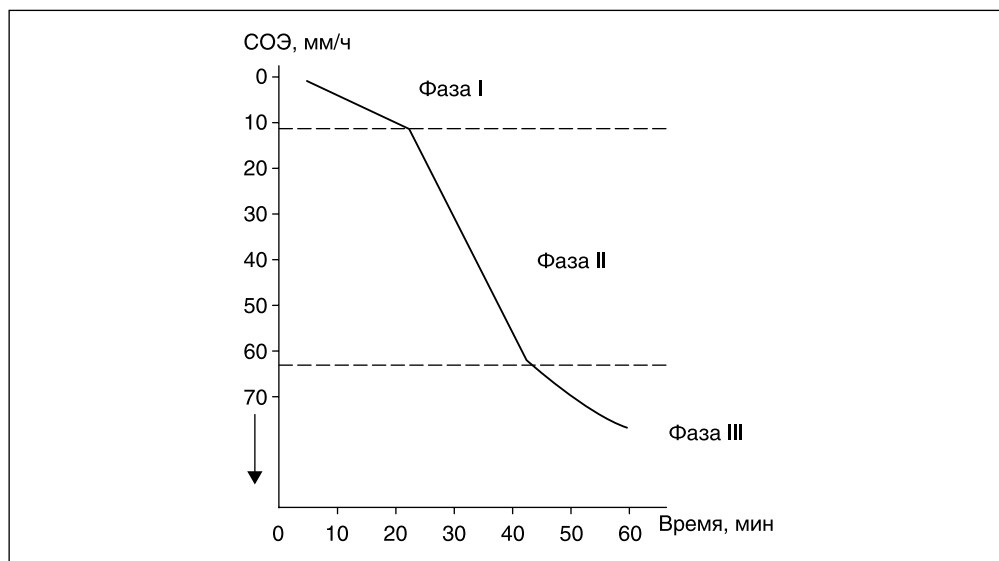


Рис. 2. Фазы анализа СОЭ в норме

I. Агрегационная (гемагглютинационная) фаза и оседание отдельных клеток с уменьшением расстояния между ними (условно 0–10 мин), во время которой в норме эритроциты ассоциируются в физиологические агрегаты типа монетных столбиков.

Скорость на этой фазе может быть увеличена за счет ряда причин:

- ~ **агрегация эритроцитов:** при патологических изменениях в крови уже могут присутствовать эритроцитарные агрегаты, связанные с изменением их заряда и поверхностных свойств или образованием связей при участии положительно заряженных белков. В этих случаях кривая может уходить резко вниз по сравнению с нормальным типом;
- ~ **свойства эритроцитов:** патология формы и размера эритроцитов (эхиноцитоз, микроцитоз и анизоцитоз), изменения в клетках при хронической гипоксии и других процессах, снижение заряда эритроцитов;
- ~ **свойства крови:** гипопроотеинемия, гематокрит ниже 30%, избыток фибриногена, лейкоцитоз.

Скорость реакции на этой стадии уменьшена за счет:

- ~ **свойств крови:** гемолиз, избыток хиломикронов и липопротеидов очень низкой плотности (гипертриглицеридемия);
- ~ **свойств эритроцитов:** макроцитоз, осмотическое и субгемолитическое разбухание клеток, оксигенация эритроцитов.

II. Фаза увеличения числа и плотности эритроцитарных агрегатов, приводящая к ускорению процессов оседания (от 10 до 40 мин).

Все механизмы, описанные для первой фазы, актуальны и здесь. Свойства патологических агрегатов (размер, подвижность, плотность, заряд, включение в них белков) имеют большое значение для этой фазы. К определенному моменту скорость СОЭ может существенно снизиться, если агрегаты образуют крупные конгломераты, которые перекрывают движение восходящих потоков плазмы и нисходящих потоков клеток в системе.

В этих условиях важными становятся правила выполнения теста и свойства капилляра. Чем уже просвет СОЭ капилляра, тем большее значение приобретает поверхностное связывание агрегатов со стенкой, приводящее к замедлению процессов оседания. Материал и свойства поверхности капилляра, поверхностно-активные вещества (ПАВ) (при повторном использовании системы) также влияют на процесс. В связи с этим Международным комитетом по стандартизации в гематологии было рекомендовано не использовать для определения СОЭ капилляры с диаметром менее 2,5 мм. Этим также может быть объяснена более низкая чувствительность метода Панченкова в патологических пробах по сравнению с методом Вестергрена.

Высокий гематокрит и температура выше 20 °С способствуют усилению этих процессов, поэтому и производится существенное разведение пробы крови цитратом натрия 1 : 4 и не рекомендуется проводить исследование СОЭ при температуре выше 18 °С.

III. Фаза концентрации и упаковки эритроцитов на дне сосуда (эта стадия начинается в промежуток с 30 до 40 мин от начала теста в зависимости от концентрации эритроцитов в пробе). Скорость оседания эритроцитов на этой стадии существенно замедляется.

В этой фазе опять увеличивается влияние свойств эритроцитов на результаты теста. Нормальные эритроциты обладают выраженным отрицательным зарядом поверхности и свойством отталкиваться друг от друга, поэтому существует некоторый предел упаковки эритроцитов для данной пробы крови, после которого процесс оседания клеток может даже остановиться. Кроме патологических изменений, связанных с состоянием пациента, на свойства упаковки эритроцитов будут влиять также факторы:

- ~ деструкция и деградация клеток крови;
- ~ длительное хранение проб при низких температурах;
- ~ снижение заряда клеток вследствие действия K_3 -ЭДТУК.

Участок кривой при более плотной упаковке патологически измененных эритроцитов будет более крутым, чем в случае нормальных эритроцитов.

Рекомендации по оптимизации выполнения анализа СОЭ

Ситуация с диагностическим тестом СОЭ в нашей стране в настоящий момент требует коррекции методологии для приведения ее в соответствие с международной практикой. Унифицированный метод определения СОЭ, известный в нашей стране как “микрометод определения СОЭ Панченкова”, фактически является модификацией классического метода Вестергрена – Фахрауса (1924 г.), в котором специальная стеклянная пипетка Вестергрена с обратной градуировкой была заменена капилляром Панченкова, являвшимся одновременно: устройством для взятия крови, дозирующим устройством для крови и цитрата и измерительной системой.

При немедленном разведении цитратом взятой капиллярной крови и быстрой постановке реакции воздействие отрицательных факторов на результат метода Панченкова было небольшим. Но с переходом клинических лабораторий на новые технологии метод становится неэффективным. Основными недостатками метода Панченкова являются:

- ~ капиллярные и поверхностные эффекты (не отвечает международным рекомендациям по диаметру просвета более 2,5 мм);

- ~ влияние ПАВ при отмывке капилляров для повторного использования;
- ~ отсутствие стандартизации качества цитрата натрия для разведения крови, возможностей для точного дозирования и соблюдения соотношения объемов крови и цитрата;
- ~ шкала для измерения в 100 мм вместо 200 мм по международным рекомендациям (стадия упаковки эритроцитов наступает быстрее);
- ~ оксигенация пробы и вероятность попадания пузырьков воздуха в капилляр с возможностью снижения СОЭ;
- ~ использование открытой системы работы с кровью и опасность инфицирования персонала;
- ~ отсутствие референсных методов и стандартизации процессов, узкий диапазон получаемых значений, отсутствие возможности автоматизации.

Использование специальных закрытых вакуумных систем для взятия венозной крови, являющихся одновременно аналитическими пробирками для определения СОЭ как при ручном, так и при автоматическом способе его проведения, – оптимальный современный способ выполнения данного анализа. Метод является полностью закрытым на всех стадиях от взятия крови до утилизации системы, что предотвращает контакт с внешней средой, контаминацию и оксигенацию проб. Метод безопасен для персонала и пациента. Точно выполняется соотношение между объемом крови и цитратом натрия (1 : 4). Цитрат в пробирках стерилен, стабилизирован по рН, сохраняет концентрацию и объем во время всего заявленного срока хранения пробирок. Конструкция пробирки обеспечивает оптимальное перемешивание проб вручную и на специальном миксере. Размеры пробирки по диаметру и длине полностью соответствуют требованиям ICSH для метода Вестергрена. Пробирки для выполнения измерения могут устанавливаться в специальный градуированный штатив или в ячейки автоматического анализатора. Все этапы проведения анализа СОЭ строго стандартизируются производителем. Преимуществом автоматического метода измерения СОЭ в закрытых системах являются: коррекция значений с прогнозированием на температуру 18 °С; автоматическая маркировка и распознавание проб, сохранение данных на компьютере или в памяти прибора, стандартизация укороченных (30 мин) циклов измерения.

В настоящее время в практику отечественных клинико-диагностических лабораторий внедряются современные методы гематологических исследований. Это требует четкого соблюдения правил выполнения анализа с использованием современных разработок, не только улучшающих качество результатов теста, но и существенно повышающих безопасность пациента и персонала при взятии проб крови.