

ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЙ ЭТАП ПРОБОПОДГОТОВКА

ПРЕДИСЛОВИЕ	4
НЕУСТРАНИМЫЕ ФАКТОРЫ – ВОЗРАСТ, ПОЛ, РАСА	4
ИЗМЕНЕНИЯ ФИЗИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ	4
Меняющиеся факторы (диета, голодание, физические упражнения, высота над уровнем моря)	4
СТИМУЛЯТОРЫ И ВЫЗЫВАЮЩИЕ ЗАВИСИМОСТЬ ПРЕПАРАТЫ КАК ВЛИЯЮЩИЕ ФАКТОРЫ БИОЛОГИЧЕСКОГО ХАРАКТЕРА.....	6
Влияние кофе, крепких напитков и курения	6
ВРЕМЯ ВЗЯТИЯ ПРОБ.....	8
ВЛИЯНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ И ЛЕЧЕБНЫХ ПРОЦЕДУР	10
ВЛИЯНИЕ ПОЛОЖЕНИЯ ТЕЛА И НАЛОЖЕНИЯ ЖГУТА	12
МЕСТО ВЗЯТИЯ ПРОБЫ КРОВИ	13
СПОСОБЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПРОБ.....	18
СПИННОМОЗГОВАЯ ЖИДКОСТЬ (СМЖ).....	20
МОЧА И СЛЮНА КАК ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПРОБЫ	21
ПЛАЗМА И СЫВОРОТКА.....	23
Различия, которые следует учитывать	23
ДОБАВКИ И ЦВЕТОВАЯ КОДИРОВКА ПРОБИРОК	26
ТРАНСПОРТИРОВКА ПРОБ	28
Влияния времени и температуры при транспортировке	28
ПРАВОВАЯ СТАНДАРТИЗАЦИЯ ПОЧТОВОЙ ПЕРЕСЫЛКИ ПРОБ.....	29
Пробы транзитом	29
ХРАНЕНИЕ ПРОБ В ЛАБОРАТОРИИ.....	31
ОБРАБОТКА, ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ, РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ	33
Что следует сделать при поступлении образцов?	33
ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЙ РАБОЧИЙ ПОТОК И РОБОТИЗАЦИЯ.....	35
ВОПРОСЫ БЕЗОПАСНОСТИ НА ПРЕАНАЛИТИЧЕСКОМ ЭТАПЕ	36
Утилизация образцов, игл, пробирок и химикатов.....	36
ВАЖНЫЕ АСПЕКТЫ ИММУНОГЕМАТОЛОГИИ.....	39
Что необходимо сделать перед переливанием крови?	39
ВАЖНЫЕ АСПЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ ГЕМОСТАЗА.....	40
ВАЖНЫЕ АСПЕКТЫ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА.....	42
ВАЖНЫЕ АСПЕКТЫ КЛИНИЧЕСКОЙ ХИМИИ.....	44
ФАКТОРЫ ПРЕАНАЛИТИЧЕСКОГО ЭТАПА ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ	46
Специальные пробирки для гормонов	46
ВАЖНЫЕ АСПЕКТЫ КЛЕТОЧНОГО АНАЛИЗА	48
Клетки крови могут нести важную информацию	48
ВАЖНЫЕ АСПЕКТЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ.....	50
Как обращаться с генами	50
ВАЖНЫЕ АСПЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ ГАЗОВ КРОВИ И ИОНИЗИРОВАННОГО КАЛЬЦИЯ.....	53
Когда газы испаряются	53
ВАЖНЫЕ АСПЕКТЫ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО МОНИТОРИНГА (ТЛМ)	54
ВАЖНЫЕ АСПЕКТЫ МИКРОБИОЛОГИИ.....	58

БАКТЕРИИ И ВИРУСЫ.....	58
ВЛИЯНИЕ ЛИПЕМИИ	62
Можно ли использовать мутные пробы?.....	62
ОШИБКИ, СВЯЗАННЫЕ С ЭНДОГЕННЫМИ АНТИТЕЛАМИ	63
ВЛИЯНИЯ ГЕМОЛИЗА.....	65
Проба сыворотки выглядит красноватой.....	65
МЕХАНИЗМЫ И УСТРАНЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ИНТЕРФЕРЕНЦИИ	66
ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА НА ПРЕАНАЛИТИЧЕСКОМ ЭТАПЕ.....	68
Все под контролем?	68
СЛОВАРЬ	72

Предисловие

Лабораторные тесты обычно служат более чувствительными показателями состояния пациента, чем его самочувствие. Это обстоятельство лежит в основе все возрастающего значения лабораторных исследований для диагностики и лечения заболеваний пациентов. Важные решения в отношении ведения пациента опираются на небольшие изменения лабораторных данных. Так, решение об изменении дозы лекарственного препарата часто бывает основано на величине его концентрации в плазме.

В лабораториях уже давно сознают, что многие непатологические факторы способны повлиять на результаты лабораторных тестов. Среди этих факторов потенциальное влияние лекарственных средств или за счет их воздействия на физиологические функции различных органов, или вследствие интерференции с аналитическим методом.

В то время как лабораторные специалисты могут быть осведомлены о возможности возникновения аналитической интерференции, клиницисты большей частью не знают о ее влиянии и возможностях предоставления им помощи в интерпретации результатов тестов. Когда такая вспомогательная информация не поступает к клиницисту вместе с лабораторным результатом, клиницист может дать неправильную интерпретацию полученного результата и предпринять в отношении пациента неверные действия.

Клинические решения, основанные на результатах лабораторных тестов, правильны лишь при условии, что образцы крови или других материалов верно идентифицированы и стандартизованы или когда недостаток стандартизации распознан и сделаны необходимые допущения в отношении недостаточной сопоставимости с результатами предшествующих исследований. Тогда как лабораторные специалисты вооружены концепцией внутри- и межиндивидуальной вариации лабораторных данных, многие коллеги не принимают их во внимание, за исключением таких наиболее очевидных причин различий, как пол и возраст.

Понимание внутрииндивидуальной вариации лабораторных результатов важно для принятия правильных клинических решений при оценке последовательных результатов. В настоящее время приобрела важное значение новая концепция критических различий или референтных изменений. Для правильной интерпретации типично малых различий между лабораторными данными в образцах, последовательно полученных от пациента, необходимо, по возможности, провести стандартизацию переменных, влияющих на результаты тестов, но вначале соответствующие переменные требуется выявить.

Правильное применение информации, содержащейся здесь, должно привести к сокращению ненужных анализов, уменьшению расходов и к лучшему пониманию результатов исследований.

Неустраняемые факторы – возраст, пол, раса

Внутренние факторы, такие как раса, пол и возраст, могут влиять на концентрации исследуемых клинико-химических и гематологических аналитов. Эти факторы являются индивидуальными особенностями пациента и поэтому их нельзя устранить. Очень часто внутренние и внешние факторы трудно разграничить.

Изменения физического состояния

Меняющиеся факторы (диета, голодание, физические упражнения, высота над уровнем моря)

Диета

Диета и потребление жидкости служат основными факторами, влияющими на многие аналиты в клинической химии. С практических позиций следует различать немедленные эффекты от наблюдаемых в течение длительного времени. Критический вопрос для повседневной практики влияет ли стандартная пища на искомые аналиты? Изменениями порядка 5% можно пренебречь, поскольку они клинически не значимы. Поэтому взятие проб для исследо-

вания этих анализов не требует строгого ограничения в приеме пищи. Степень вызванных приемом пищи изменений содержания анализов зависит от состава пищи времени, прошедшем от момента приема пищи до взятия пробы. На концентрацию холестерина и триглицеридов в сыворотке оказывают влияние такие факторы, как состав пищи, физическая активность, курение, употребление алкоголя и кофе. Напротив, при диете, богатой белками и нуклеотидами, наблюдается повышение уровней аммиака, мочевины и мочевой кислоты. Изменения, наблюдающиеся после приема стандартного количества углеводов (75 г), используются в диагностике при определении толерантности к глюкозе. С другой стороны, недостаточное питание и голодание могут изменить концентрации анализов клинически значимым образом. Ранними индикаторами бедной белками диеты являются снижение концентрации преальбумина и ретинол-связывающего белка. Метаболический ацидоз со снижением рН и бикарбоната является результатом повышения органических кислот, в основном, кетоновых тел (ацетоуксусной кислоты, бета-гидроксимасляной кислоты).

Голодание

Изменения концентраций анализов, вызванные длительным голоданием (4 недели). Концентрации белка крови, холестерина, триглицеридов, апополипротеинов и мочевины снижены. Наоборот, концентрации креатинина и мочевой кислоты повышены. Последнее связано со снижением клиренса мочевой кислоты в результате кетонемии. Очевидно, что длительное голодание тесно связано со снижением расхода энергии и, как следствие, в сыворотке снижены концентрация T_4 и в еще большей степени T_3 .

Помимо данных изменений, при длительном голодании также изменяется экскреция с мочой многих веществ. Экскреция с мочой аммиака и креатинина повышается, тогда как выделение мочевины, кальция и фосфатов снижается. Изменения концентрации анализов при длительном голодании подобны тем, которые наблюдаются у пациентов после хирургических вмешательств и в катаболическом состоянии.

При количественном измерении уровней мочевой экскреции предпочтительно выполнять определение показателей за сутки, чем на литр, чтобы исключить влияние количества выпиваемой воды и ее выведения.

Механизмы

Изменения могут быть вызваны повышением реабсорбции, измеряемых анализов (триглицериды, глюкоза, аминокислоты), кишечным или печеночным метаболизмом реабсорбированных метаболитов (ЛОНП, мочевина, аммиак) или регуляторными изменениями, связанными с потреблением пищи или голоданием (мочевая кислота, гамма-глутамилтрансфераза, холинэстераза, тироксин, ретинол-связывающий белок, кетоновые тела).

Рекомендации

Во избежание неправильной интерпретации лабораторных результатов в качестве стандартной процедуры взятия образцов рекомендуется производить после 12-часового голодания и при сниженной физической активности.

Физические упражнения

Перед тем, как рассмотреть влияние физических упражнений на исследуемые анализы в клинической химии следует выделить 2 типа упражнений. При упражнениях первого типа – статических или изометрических упражнениях короткой продолжительности и высокой интенсивности – используется энергия, уже запасенная в мышцах (АТФ, креатинфосфат), и при упражнениях второго типа – динамических или изотонических упражнениях малой интенсивности и большой продолжительности (например, бег, плавание, езда на велосипеде) – используется АТФ, образуемый аэробным или анаэробным путем. Кроме того, следует учитывать влияние физической тренированности и мышечной массы. Быстро возникающие изменения анализов во время упражнений обусловлены сдвигами объемов жидкости между внутрисосудистым и интерстициальными пространствами, потерей жидкости в связи с потоотделением и изменением концентрации гормонов (например, повышения концентрации адреналина, норадреналина, глюкагона, СТГ, кортизола, АКТГ и снижения концентрации инсулина). Эти гормоны

могут приводить к изменениям числа лейкоцитов более чем до 25 г/л, а также повышению концентрации глюкозы.

Наблюдаемые изменения (например, повышение альбумина) могут отчасти объясняться вышеупомянутым смещением объема жидкости из внутрисосудистого пространства в интерстициальное или потерей жидкости с потом. Повышение концентрации мочевой кислоты в сыворотке является следствием снижения ее экскреции с мочой из-за повышения концентрации лактата. Опосредованный гипоксией прирост креатинкиназы зависит от состояния тренированности и, следовательно, показывает высокую степень индивидуальной вариабельности. У физически менее тренированного человека увеличение содержания креатинкиназы более выражено. Тренировка повышает количество и размер митохондрий, что сочетается с повышенной емкостью окислительной ферментной системы. Это, в свою очередь, повышает способность мышц потреблять глюкозу, жирные кислоты и кетоновые тела по путям аэробного окисления. Как следствие, доля митохондриального изофермента КК-МВ возрастает до 8% от общей активности креатинкиназы без признаков нарушения функции миокарда. Хорошо тренированные люди имеют более высокий процент КК-МВ в скелетных мышцах по сравнению с нетренированными. Некоторые другие анализы также зависят от степени тренированности и мышечной массы. Так, содержание креатинина в плазме, в моче и его экскреция повышены, а образование лактата снижено после выполнения физических упражнений у тренированных людей по сравнению с нетренированными. Чрезмерная физическая нагрузка может вызвать появление в моче эритроцитов и других клеток крови. Тем не менее, вызванные физической нагрузкой изменения обычно исчезают в течение нескольких дней.

Высота над уровнем моря

Содержание некоторых компонентов крови подвержено значительным изменениям в зависимости от высоты над уровнем моря. С увеличением высоты значительное повышение наблюдается в отношении, например С-реактивного белка (до 65% на высоте 3600 м), 3 в сыворотке (до 43% на высоте 5400 м), гематокрита и гемоглобина (до 8% на высоте 1400 м) и мочевой кислоты. Адаптация к высоте занимает недели, а возвращение к значениям на уровне моря происходит в течение нескольких дней. Значительное снижение величин с ростом высоты над уровнем моря обнаружено в отношении мочевого креатинина, клиренса креатинина, эстриола (до 50% на высоте 4200 м), осмоляльности сыворотки, ренина плазмы и трансферрина сыворотки.

Стимуляторы и вызывающие зависимость препараты как влияющие факторы биологического характера

Влияние кофе, крепких напитков и курения

Кофеин

Кофеин содержится во многих компонентах повседневной пищи. Несмотря на его широкое распространение, влияние кофеина на различные клинико-химические анализы детально не исследовано. Кофеин ингибирует фосфодиэстеразу и, следовательно, расщепление циклического АМФ. Циклический АМФ усиливает гликогенолиз, тем самым увеличивая концентрацию глюкозы в крови. Кроме того, концентрация глюкозы возрастает из-за стимуляции глюконеогенеза под влиянием адреналина. Активация триглицеридлипазы ведет к троекратному повышению этерифицированных жирных кислот. Количественное определение гормонов и лекарственных веществ, связанных с альбумином, затрудняется из-за вызванного жирными кислотами эффекта замещения. Через 3 часа после приема 250 мг кофеина повышается активность ренина плазмы и концентрация катехоламинов. Следовательно, при исследовании данных анализов потребление кофеина должно учитываться.

Влияние курения

Курение вызывает множество острых и хронических изменений концентраций анализов, причем хронические эффекты скорее умеренные. Курение повышает концентрации в

плазме или сыворотке жирных кислот, адреналина, свободного глицерина, альдостерона и кортизола. Эти изменения наблюдаются в пределах 1 часа при курении 1-5 сигарет. Изменения, вызванные хроническим курением, касаются числа лейкоцитов, липопротеинов, активности некоторых ферментов гормонов, витаминов, опухолевых маркеров, тяжелых металлов.

Механизм, лежащий в основе этих изменений, полностью не выяснен. В табачном дыме обнаружено большое количество соединений пиридина, цианистый водород и тиоцианаты. Их прямое и непрямое влияние может учитываться применительно к возникающим изменениям концентрации. Снижение активности ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) у курильщиков признается результатом деструкции клеток легочного эпителия с последующим снижением высвобождения АПФ в системе легочного кровообращения и/или ингибированием фермента. Степень изменений также зависит от количества, вида (сигареты, сигары, трубки) и техники курения (с вдыханием дыма или без этого). Кроме того, вызванные курением изменения зависят от возраста и пола.

Алкоголь

Употребление алкоголя в зависимости от его продолжительности и степени может влиять на многие анализы. Эти изменения частично используются для диагностики и терапевтического мониторинга. Среди обусловленных алкоголем изменений следует выделять остро и хронически возникающие изменения.

Остро возникающие изменения (в течение 2-4 часов) при употреблении этилового спирта проявляются снижением глюкозы в сыворотке и повышением лактата в плазме в результате торможения глюконеогенеза в печени. Этанол превращается в ацетальдегид и затем в ацетат. Это повышает образование в печени мочевой кислоты (67). Вместе с лактатом ацетат снижает содержание бикарбоната в сыворотке, вызывая метаболический ацидоз. Повышенный уровень лактата снижает экскрецию с мочой мочевой кислоты. Как следствие, после острого употребления алкоголя концентрация мочевой кислоты в сыворотке возрастает. Хронические изменения, возникающие при употреблении этилового спирта включают повышение в сыворотке активности печеночных ферментов, повышение активности гамма-глутамилтрансферазы вызывается индукцией фермента. Активность глутаматдегидрогеназы, как и аминотрансфераз (АСТ, АЛТ), повышается вследствие прямого влияния на печень. Повышение в крови десаилированных белков (например, углевод-дефицитного трансферрина) связано с торможением ферментативного гликозилирования в пост-трансляционной стадии образования этих белков в печени. При хроническом алкоголизме содержание сывороточных триглицеридов возрастает вследствие снижения расщепления триглицеридов в плазме. Повышение MCV может быть связано с прямым токсическим влиянием на кроветворные клетки или в связи с дефицитом фолиевой кислоты.

Препараты, вызывающие зависимость

Вызывающие зависимость вещества, такие как амфетамин, морфин, героин, марихуана и кокаин, могут оказывать влияние на результаты лабораторных тестов.

Таблица 4-1. Биологические эффекты вызывающих зависимость веществ на концентрации в плазме некоторых аналитов.

Вызывающее зависимость вещество	Повышение/понижение в плазме
Амфетамин	Повышение: свободные жирные кислоты
Морфин	Повышение: альфа-амилаза, липаза, АСТ, АЛТ, ЩФ, билирубин, гастрин, ТСГ, пролактин Снижение: инсулин, норадреналин, нейротензин, панкреатические полипептиды
Героин	Повышение: рСО ₂ , Т ₄ , холестерин, калий с тяжелым рабдомиолизом Снижение: рО ₂ , альбумин
Конопля	Повышение: натрий, калий, мочевина, инсулин, хлорид Снижение: креатинин, глюкоза, мочевая кислота

Морфин вызывает спазм сфинктера Одди, что приводит к повышению таких ферментов, как амилаза и липаза. В таблице 4-1 приведены биологические эффекты вызывающих зависимость препаратов на отдельные лабораторные тесты.

Время взятия проб

Происходящие в образцах изменения, обусловленные фактором времени, должны учитываться на преаналитическом этапе. В этом контексте существенны три вопроса:

- Когда следует брать пробу?
 - Время дня
 - Промежуток времени после взятия последней пробы
 - Промежуток времени после последнего приема пищи
- Когда мне нужен результат исследования пробы, взятой сейчас?
- Сопоставимы ли результаты с результатами того же пациента или референтной популяции, полученными в различные периоды суточного, месячного и годового ритмов?

Влияние циркадного ритма

Некоторые анализы обнаруживают тенденцию к колебаниям их концентрации в плазме в течение суток (табл. 5- 1). Так, концентрация калия ниже после полудня, по сравнению с утренней, тогда как содержание кортизола возрастает в течение дня и снижается ночью. Ритм кортизола является причиной недостоверных результатов теста на толерантность к глюкозе, проводимого во второй половине дня. По этой причине референтные интервалы обычно устанавливаются при исследованиях между 7 и 9 часами утра. На циркадном ритме могут отражаться влияния индивидуальных ритмов – еды, сна, физической активности. Эти влияния не следует путать с действительно циркадными колебаниями. В некоторых случаях следует учитывать сезонные влияния. Так, содержание трийодтиронина (Т₃) на 20% ниже летом, чем зимой, тогда как 25-ОН-холекальциферол обнаруживается в большей концентрации летом.

Аналиты могут изменяться в течение менструального цикла

Статистически значимые изменения аналитов могут быть вызваны колебаниями уровня гормонов при менструации. Так, концентрация альдостерона в плазме определяется в два раза выше перед овуляцией, чем в фолликулярной фазе. Подобным образом, ренин может проявить преовуляторное повышение. даже холестерин существенно снижается при овуляции. Наоборот, фосфаты и железо снижаются при менструации.

Пробу крови следует брать через 12 часов после последнего приема пищи

Как было указано выше под влиянием диеты содержание отдельных продуктов обмена в венозной крови может повышаться или подвергаться изменениям в результате пост абсорб-

ционных гормональных эффектов. Определение других анализов может затрудняться вследствие мутности, вызванной хиломикронемией в послеобеденных пробах крови.

Чтобы исключить влияние данных факторов, рекомендуется соблюдать 12-часовой период голодания перед взятием проб для исследования этих анализов. (табл. 5-1).

Выбор времени по отношению к диагностическим и лечебным процедурам

Как описано в следующей главе, многие диагностические процедуры способны оказывать влияние на результаты лабораторных исследований. Чтобы предотвратить такое влияние, взятие проб необходимо производить до выполнения диагностических процедур, способных оказать влияние на результаты теста. Точно так же введение лекарственных препаратов, способных оказать влияние на результаты исследований, следует назначать пациенту после взятия у него проб крови.

С другой стороны, при проведении лекарственного мониторинга точное время взятия пробы становится очень важным для правильной интерпретации результата исследования уровня лекарственного вещества.

Важные правила выбора времени взятия проб биоматериалов:

- По возможности, пробы следует брать между 7 и 9 часам утра.
- Взятие проб должно выполняться через 12 часов после последнего приема пищи.
- Взятие проб должно выполняться до проведения диагностических и лечебных процедур, способных оказать влияние на результаты теста.
- В случае проведения лекарственного мониторинга следует учитывать наличие пика концентрации после введения лекарственного препарата и фазу устойчивого состояния перед введением следующей дозы препарата.
- Всегда следует отмечать точное время взятия пробы в соответствующих документах (журнале, бланке запроса на анализ).

НО:

- Анализ пробы, взятой не во время, может быть хуже, чем отсутствие анализа вообще.
- Проба, результат анализа которой поступает слишком поздно, взята напрасно.

Таблица 5-1. Суточные колебания некоторых анализов (С = сыворотка; М = моча).

Аналиты	Максимум (время дня)	Минимум (время дня)	Амплитуда (% от средней за сутки)
АКТГ	6-10	0-4	150-200
Кортизол (С, М)	5-8	21-3	180-200
Тестостерон	2-4	20-24	30-50
ТСГ	20-2	7-13	5-15
T ₄	8-12	23-3	10-20
Соматотропин	21-23*	1-21	300-400
Пролактин	5-7	10	80-100
Альдостерон	2-4	12-44	60-80
Ренин	0-6	10-12	120-140
Адреналин	9-12	2-5	30-50
Норадреналин	9-12	2-5	50-120

Гемоглобин	6-18	22-24	8-15
Натрий (М)	4-6	18-20	30-40
Железо (С)	14-18	2-4	50-70
Калий (С)	14-16	23-1	5-10
Фосфат (С)	2-4	0-42	30-40
Натрий (М)	4-6	12-16	60-80
Фосфат (М)	18-24	4-8	60-80
Объем (М)	2-6	12-16	60-80
Температура тела	18-20	5-7	0.8-1.0°C

*) Начало фазы сна

Влияние диагностических и лечебных процедур

На результаты лабораторных исследований как *in vivo* (часто), так и *in vitro* (менее часто) могут оказывать влияние следующие диагностические и лечебные мероприятия.

- Оперативные вмешательства
- Вливания и переливания
- Пункции, инъекции, биопсии, пальпация, общий массаж
- Эндоскопия
- Диализ
- Физическое напряжение (например, эргометрия, физические упражнения, ЭКГ)
- Функциональные тесты (например, пероральный тест на толерантность к глюкозе)
- Иммуносцинтиграфия
- Прием рентгеноконтрастных и лекарственных веществ
- Психический стресс
- Ионизирующее излучение

Хирургические вмешательства

Вызванные хирургическими вмешательствами изменения активности органоспецифических ферментов в сыворотке часто настолько велики, что прицельное исследование органов с их помощью становится невозможным. Повышение белков острой фазы (например С-реактивного белка, фибриногена) в начале послеоперационного периода сопровождается снижением альбумина. Это не может быть объяснено влиянием одной только гемодилюции.

Преходящие повышения концентрации мочевины в сыворотке/плазме (до 10 ммоль/л), как и снижение холестерина, очень часто наблюдаются в первые дни послеоперационного периода, тогда как концентрация креатинина остается нормальной. Это может быть вызвано расщеплением белка, являющимся результатом операции на желудочно-кишечном тракте, а так же, кровотечением в просвет кишки, например, в случае возникновения острой язвы.

Таблица 6-1. Вливания/ переливания как факторы интерференции и/или загрязнения лабораторных диагностических тестов.

Вливания/ переливания	Аналиты, подверженные влиянию	Тенденция	Комментарии Механизмы
Декстран	Тромбиновое время Рептилазное время Фактор фон Виллебранда	↓ ↓	На 5-10 с медленнее
	Общий белок в сыворотке, плазме Мочевина в сыворотке Серологические исследования групп крови	↑ ↓	Биуретовый метод (мутность, образование хлопьев, зеленоватое окрашивание) Псевдоагглютинация
Гамма-глобулин	Серологические исслед. при вирусных и бактериальных инфекциях		Ложно-положительный
Электролиты	Калий, натрий, магний	↑	Загрязнение
Глюкоза	Глюкоза	↑	Загрязнение
Глюкоза	Неорг. фосфат, калий Амилаза, билирубин	↓ ↓	Инсулин До 15% случаев, особенно у новорожденных
Фруктоза	Мочевая кислота	↑	Метаболический эффект
Цитрат (переливание крови)	pH крови	↓	
	Тесты свертывания	↓↑	Торможение

Вливания, переливания

Гемолиз и, следовательно, концентрация свободного гемоглобина и калия, а так же активность лактатдегидрогеназы в плазме, полученной из консервированной крови, повышается со сроком хранения переливаемого консервированного материала.

Загрязнение лабораторных проб инфузионными растворами является самой обычной и часто встречаемой формой преаналитической интерференции в больницах (табл. 6-1).

Пробу крови никогда не следует брать из сосуда, расположенного проксимально месту инфузии. Пробы следует брать из другой руки, в вены которой не проводится вливание. Перед тем, производить взятие пробы после инфузионной терапии следует выждать определенный период времени. (таблица 6-2).

Таблица 6-2. Рекомендации по отсрочке взятия пробы после вливаний

Вливания	Наикратчайший срок взятия пробы после прекращения вливания (в часах)
Эмульсия жира	8
Богатый углеводами раствор	1
Аминокислоты и гидролизаты белков	1
Электролиты	1

Рекомендуется информировать лабораторию о том, когда и какое вливание было проведено пациенту, и когда была проба крови.

Взятие пробы из катетера

Если пробы берут из венозных или артериальных инфузионных катетеров, канюлю следует промыть изотоническим солевым раствором в объеме, соизмеримом с объемом катетера. Прежде чем взять пробу, выбросить первые 5 мл крови, полученной из катетера. Взятие проб для исследований свертывающей системы из катетеров, обработанных гепарином, неприемлемо. Для гепарин-зависимых методов (тромбиновое время, АЧТВ) рекомендуется предварительно отбросить объем крови, вдвое превышающий объем катетера; первая порция взятой затем крови может быть использована для выполнения исследований, не относящихся к системе гемостаза; последующая порция цитратной крови может использоваться только для определения нечувствительных к присутствию гепарина аналитов: протромбинового времени, рептилазного времени, фибриногена по Clauss, AT III, мономеров фибрина. Важно, чтобы перед взятием крови в пробирку с раствором цитрата натрия не было длительной паузы, в течение которой кровь в катетере может «заставаться».

Психический стресс

Степень влияния психического стресса (страх перед взятием крови, предоперационный стресс и т.д.) на лабораторные результаты часто недооценивается. Между тем, под его влиянием может наблюдаться увеличение секреции гормонов (альдостерона, ангиотензина, катехоламинов, кортизола, пролактина, ренина, соматотропина, ТСГ, вазопрессина) и повышение концентрации альбумина, фибриногена, глюкозы, инсулина, лактата и холестерина.

Влияние положения тела и наложения жгута

Положение тела

Хорошо известно, что положение тела влияет на концентрации компонентов крови. Это вызвано различными механизмами. Во-первых, при переходе из положения лежа в положение стоя в ногах возрастает эффективное фильтрационное давление (например, разница между капиллярным давлением и коллоидно-осмотическим давлением в плазме). Как следствие, вода движется из внутрисосудистого пространства в интерстициальное; это приводит к понижению объема плазмы примерно на 12% у здоровых людей. Частицы с диаметром более 4 нм задерживаются мембранами и не могут следовать за жидкостью. Перемена положения стоя на положение лежа ведет к снижению эффективного фильтрационного давления и, следовательно, к сдвигу объема жидкости в обратном направлении.

Изменение объема плазмы ведет к заметному изменению концентрации клеток, макромолекул и связано с белками малых молекул. Большинство низкомолекулярных веществ не проявляют видимых изменений своей концентрации при переходе из положения стоя в положение лежа. Поскольку осмоляльность в основном определяется этими веществами, эти аналиты лишь незначительно изменяются при изменении объема плазмы (1–2%). Вследствие частичного связывания белком концентрации свободного и связанного кальция меняются различным образом. Тогда как концентрация свободного кальция не зависит от положения тела, содержание общего кальция возрастает на 5–10% при переходе из положения лежа в положение стоя. Другие изменения связаны с измененным артериальным давлением, что, в свою очередь, вызывает секрецию вазоактивных веществ. Кроме того, метаболические последствия регуляторных изменений, вызванных изменениями положения тела, могут изменять состав жидкостей тела.

Влияние положения тела на аналиты в крови, взятой из локтевой вены: на основании вышеописанных механизмов концентрации большинства клеточных и макромолекулярных аналитов у пациентов, у которых пробы взяты в положении стоя, повышены от 5 до 15% по сравнению с пробами, взятыми в положении лежа. Данные изменения могут быть более выражены у пациентов с тенденцией к отекам (сердечно-сосудистая недостаточность, цирроз печени). Уменьшение объема плазмы вызывает снижение артериального давления, что, в свою очередь, ведет к повышению секреции ренина, альдостерона, норадреналина и адреналина. Падение давления крови вызывает повышенную секрецию предсердного натрийуретического пептида, что ведет к повышению его концентрации в плазме.

Жгут

Что происходит, когда жгут накладывается на весь период времени при взятии пробы? Обычно жгут накладывают, чтобы облегчить поиск соответствующей вены для ее пункции. При использовании давления ниже уровня систолического, внутри капилляров поддерживается эффективное фильтрационное давление. Как следствие, жидкость и низкомолекулярные соединения перемещаются из внутрисосудистого пространства в интерстициальное. Макромолекулы, вещества, связанные с белками, и клетки крови не проникают через стенку капилляров, таким образом, их концентрация заметно возрастает, тогда как концентрации низкомолекулярных веществ не изменяются.

Изменения концентрации различных аналитов. Изменения концентраций низкомолекулярных соединений, наблюдаемые в течение 6 минут после сужения просвета сосуда под воздействием жгута составляют 3% и поэтому находятся в пределах аналитической погрешности. Тем не менее, было показано, что сокращение мышц предплечья вызывает повышение концентрации калия в сыворотке. Различия в концентрации калия в образцах, взятых при обычной процедуре венепункции, и в образцах, взятых из поверхностной вены другой руки с исключением повторного сжимания и разжимания кулака, составили до 0,8 ммоль/л. различия в концентрации были более выражены в случае взятия крови из глубокой вены и при интенсивной работе мышц предплечья. Поэтому при пункции вены для определения концентрации калия следует избегать повторного сжимания и разжимания кулака и рекомендуется пунктировать поверхностную вену. Веностаз в течение 2 мин не изменяет концентрацию пактата в крови (среднее значение +2,2%), однако значительно снижает концентрацию пирувата (среднее значение -18%). Степень изменений содержания высокомолекулярных аналитов зависит от продолжительности сдавления вены. Изменения активности лактатдегидрогеназы и концентрации общего белка. Наиболее выраженные изменения наблюдаются на 5-ой минуте, после этого отмечаются лишь небольшие сдвиги. Сужение просвета вены в течение 1 мин последующим снятием жгута не оказывает влияния на концентрации аналитов в сыворотке и плазме и на факторы свертывания.

Для уменьшения внутри- и межиндивидуальной вариации результатов лабораторных исследований необходимым условием является стандартизация процедуры взятия пробы. должны быть по возможности соблюдены следующие условия: взятию пробы должна предшествовать фаза отдыха и голодания; положение тела, время дня и длительность наложения жгута должны быть одинаковыми, следует избегать повторного сжимания и разжимания кулака. длительность наложения жгута не должна быть более одной минуты. При проведении влияния следует проводить флеботомию на другой руке и, во всяком случае, не проксимально от места вливания. Если необходимо по какой-либо причине повторить взятие крови, флеботомию также следует проводить на другой руке.

При сравнении результатов лабораторных исследований референтные величины должны быть установлены в идентичных условиях в отношении положения тела.

Место взятия пробы крови

Место взятия пробы – вена, капилляры или артерия – определяет процедурные аспекты. Документы Национального комитета клинических лабораторных стандартов (США) относят процедуры взятия образцов крови к венепункциям, пункции кожи и пункции артерии.

Флеботомия

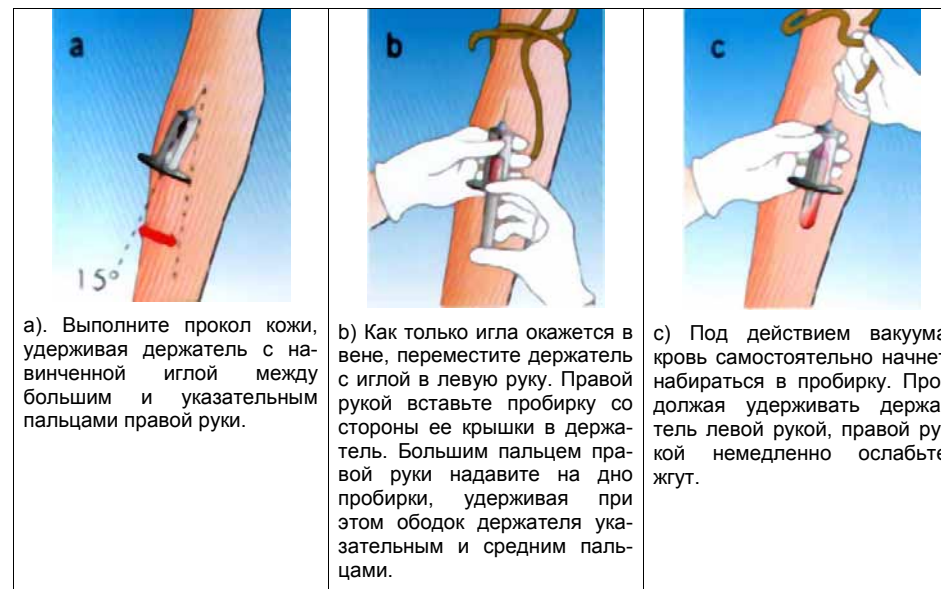
Подготовка пациента к флеботомии включает несколько этапов. Важное значение имеют не только собственно подготовка пациента к процедуре взятия у него образца крови и правильное проведение самой процедуры взятия образца, но и другие этапы, в частности, правильно проведенная идентификация пациента. Это позволяет избежать путаницы пациентов и обеспечивает их безопасность. На рис. 8-1 представлены стадии взятия образца крови с использованием вакуумных пробирок.

- **Идентификация:** Сверьте бланк запроса на анализ с номером пациента, штрих-кодом или номером браслета.

- **Положение:** Положение пациента (сидя или лежа) для венепункции.
- **Материалы:** Убедитесь, что все необходимое оборудование (игла, пробирки, держатель) находится под рукой.
- **Осмотр:** Осмотрите руку пациента, выбор вены осуществляется при сжатом кулаке пациента.
- **Дезинфекция:** Продезинфицируйте предполагаемое место пункции вены.
- **Выделение вены:** Наложите жгут.
- **Взятие образца крови:** См. рис. 8-1.
- **Перемешивание:** Перемещайте кровь в пробирке, содержащей наполнители (антикоагулянты, консерванты) или активаторы свертывания.
- **Предотвращение кровотечения:** В момент удаления иглы приложите тампон к месту венепункции. Наложите давящую повязку на место венепункции.
- **Утилизация использованных материалов:** Поместите иглу в безопасную емкость для использованных материалов.

При взятии нескольких проб крови у пациента необходимо соблюдать определенный порядок наполнения различных пробирок (таблица 8-1).

Рис. 8-1. Этапы взятия крови.





* Если кровь ее поступает пробирку, следует повернуть иглу, так как возможно ее кончик упирается в стенку вены. Если это ее дает результат, возможно игла не попала в вену. Перед тем, как извлечь иглу, отсоедините пробирку, чтобы предотвратить потерю вакуума и использовать пробирку повторно. Повторите все манипуляции, начиная с этапа a. Обязательно используйте резиновые перчатки.

Качество пробы:

Проверьте, достаточно ли заполнены и не переполнены ли пробирки.

Переполнение пробирок, предназначенных для гематологических исследований, может вызвать получение ложных результатов из-за отсутствия пузырька воздуха сверху пробирки, что может препятствовать правильному смешиванию образца с использованием качающихся перемешивающих устройств.

Для определенных исследований точное соотношение между объемом крови и объемом антикоагулянта является решающим.

В случае последовательного взятия у пациента нескольких проб крови в разные пробирки, рекомендуется соблюдать следующий порядок их наполнения (рис. 8-1):

Таблица 8-11. Рекомендуемая последовательность взятия различных образцов крови

1. Гемокультивирование	Кровь
2. Пробирка без наполнителей	Сыворотка
3. Цитрат	Плазма
4. Гепарин	Кровь
5. ЭДТА	Кровь/Плазма
6. Ингибитор гликолиза	Глюкоза/лактат

Если первой должна быть набрана пробирка с голубой крышкой, предназначенная для исследований свертывающей системы и содержащая цитрат, первые 5 мл крови следует набрать в пустую пробирку и выбросить, чтобы предотвратить попадание в пробу тканевого тромбопластина из места венепункции.

Сколько крови следует взять?

Объем крови, взятой у пациента, должен быть сведен к минимуму, чтобы избежать такой ее потери, которая могла бы привести к анемии. Термин «исследовательская анемия»

был введен для обозначения потерь крови, вызванных повторными венепункциями. Часто крови берут слишком много, что демонстрирует исследование, проведенное в клинике Mayo. В данном исследовании сообщалось, что для рутинных исследований взятый объем крови в среднем в 45 раз (от 2 до 102 раз) превысил требуемый, тогда как при взятии микрообъемов крови взятый объем крови превысил требуемый в среднем в 7 раз (от 1 до 20 раз). В более раннем исследовании сообщалось, что у 47% пациентов, которым потребовалось переливание крови, отмечалась связанная с флеботомией потеря эритроцитов, объемом более 180 мл, что равноценно 1 единице эритроцитарной массы.

Рекомендуется брать вдвое больше крови, чем нужно для анализа. Необходимое количество крови может быть рассчитано, исходя из необходимой для анализа порции крови, мертвого пространства аналитической системы и пробирки для взятия пробы крови, используя следующую формулу:
 необходимый объем крови = 2 x [повторных тестов x (аналитический объем + мертвое пространство аналитической системы) + мертвое пространство вторичной пробирки] + мертвое пространство первичной пробирки. Эта формула основана на предположении, что 50% объема крови может быть использовано непосредственно для анализа.

Взятие проб крови из артерии

При взятии пробы из артерии следует проявлять особую осторожность (158). Обычное место пункции для взятия артериальной крови – бедренная, плечевая, лучевая артерии. Среди других мест – артерии головы у младенцев и пупочные артерии в течение первых 24-48 часов жизни.

Пункция артерии становится необходимой, когда в венозной крови нельзя измерить соответствующую концентрацию требуемого аналита (например, газы крови, pH). Пункция артерии может быть проведена путем одномоментного введения в артерию или центральной вены с коротким срезом. Шприц может быть присоединен к игле или непосредственно, или при помощи катетера с адаптером, таким же, каким снабжен набор для взятия крови с иглой-бабочкой. Кровь может быть взята без аспирации с использованием игл 23G или игл большего диаметра, обеспечивающим поступление крови в шприц под действием силы артериального давления.

Взятие проб через катетер

Постоянное или повторное взятие проб артериальной крови может быть осуществлено путем оставления иглы, канюли или катетера в артерии или центральной вене. Необходимо следить, чтобы на конце или в просвете катетера не образовался сгусток. В перерывах между взятием отдельных проб следует промывать иглу антикоагулянтом (предпочтительнее гепарином).

При взятии пробы через венозный катетер пробирку с цитратом натрия, предназначенную для исследований свертывающей системы, следует наполнить после заполнения пробирки, содержащей гепарин. Первые несколько миллилитров крови, составляющие 1-2 объема катетера, следует выбросить, чтобы предотвратить попадание антикоагулянта из катетера в пробу.

Взятие пробы капиллярной крови

Пункция кожи является процедурой выбора, в случае если требуется взять небольшое количество крови у ребенка. У взрослых капиллярная кровь используется для исследования газов крови, глюкозы и лактата. Между содержанием аналитов в венозной и капиллярной крови существует разница, особенно при исследовании на толерантность к глюкозе. Полученная при пункции кожи кровь представляет собой смесь крови, полученной из артериол, венул и капилляров, она также может быть разбавлена интерстициальной и внутриклеточной жидкостью.

Относительный состав крови, полученной при пункции кожи, (более распространенное название – капиллярная кровь) зависит от таких факторов, как ток крови через кожу во время пункции. Согревание места прокола перед взятием крови вызывает артериализацию капиллярной крови. Места для взятия капиллярной крови изображены на рис. 9-3. Они включают

ладонную поверхность дистальной фаланги пальца и латеральную или медиальную часть подошвенной поверхности пятки.

Пункция пальца не должна производиться у младенцев, так как это может привести к повреждению кости. Между объемом получаемой крови и глубиной прокола имеется прямая зависимость. В связи с этим скарификатор должен выбираться в соответствии с местом прокола и необходимым количеством крови.

Глубина прокола пятки младенцев является решающей, поскольку прокол подошвенной поверхности пятки маленького ребенка глубже 2.4 мм может привести к повреждению пяточной кости. Этого можно избежать, используя полуавтоматические одноразовые скарификаторы. После выбора места пункции его следует продезинфицировать 70% водным раствором изопропилового спирта. Место пункции необходимо просушить стерильным тампоном для удаления остатков спирта (поскольку он может вызвать гемолиз), пункция кожи выполняется с помощью одноразового скарификатора. Следует избегать использования других дезинфицирующих средств для очистки места прокола, так как они могут ложно завышать результаты исследования мочевой кислоты, фосфата и калия.

Первую каплю крови, полученную после прокола кожи, следует удалить тампоном, поскольку эта капля вероятно с примесью тканевой жидкости.

Капли крови должны свободно вытекать, для этого используйте незначительное давление, но не выдавливайте кровь и не массируйте зону вокруг прокола. Собирайте стекающие капли крови, прикасаясь к ним краем коллектора, и позволяя им течь благодаря капиллярному эффекту в предварительно маркированную пробирку.

На рис. 9-3 показана обычная техника взятия пробы капиллярной крови. В случае, если капли не текут свободно от верха коллектора в пробирку, по ней можно осторожно постучать, чтобы облегчить сток капель крови в пробирку. После завершения сбора крови пробирку следует плотно закрыть. После взятия пробы в пробирку с наполнителями (антикоагулянтами и др.) ее необходимо хорошо перемешать, осторожно переворачивая пробирку примерно 10 раз.

Взятие проб капиллярной крови в пробирку с гепарином для исследования газов крови следует выполнять после согревания места пункции полотенцем, смоченным в горячей проточной воде с температурой не выше 42°C с целью артериализации места прокола. Пробирка с набранной капиллярной кровью не должна содержать никаких пузырьков воздуха.

По завершении взятия на место прокола следует наложить стерильный тампон и удерживать его там, пока не прекратится кровотечение. В качестве мер безопасности не накладывайте лейкопластырь на место прокола у младенцев и детей, не столько из-за возможности возникновения раздражения, сколько из-за опасности, что лейкопластырь может отклеиться и ребенок может его проглотить.

Одноразовые скарификаторы, используемые для прокола кожи, следует собирать в специально предназначенные для этого контейнеры, стенка которых не может быть проколота.

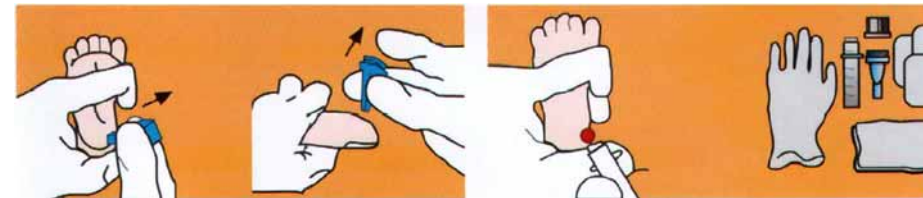
Рис. 9-3. Взятие капиллярной крови с помощью типичного устройства (пробирки) для микрообъемов крови.



а) Подберите весь необходимый материал и подготовьте б) Выберите место для прокола, согрейте, продезинфицируйте и высушите на воздухе (см. места для прокола обозначены на

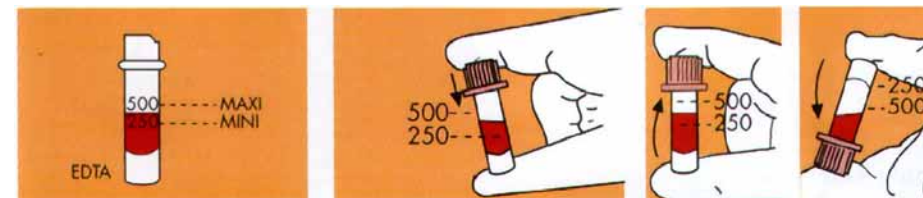
пациента.

рисунке выше).



в) Выполните пункцию: крепко удерживая палец или палец, приложите скарификатор к намеченному месту пункции. Нажмите на кнопку. Поместите в контейнер для утилизации острых предметов.

г) Удалите тампоном первую каплю крови. Расположите пробирку у места прокола и направьте ток крови при помощи коллектора. Не сдавливайте зону вокруг места пункции.



д) Наполните пробирку с ЭДТА до уровня расположенного между отметками 250 и 500 мкл.

е) Закройте пробирку пробкой и нажмите на нее до слышимого щелчка.

ж) Немедленно перемещайте пробирку 10 раз. Не встряхивайте.

Способы идентификации проб

Каждый, кто имеет отношение к диагностическим процедурам, сознает существование проблемы идентификации проб. Путаница имен пациентов, запросов на пробы, самих проб или результатов исследований может серьезно повлиять на лечение больных и это будет расценено, как плохое обращение с пациентами. В этой главе кратко суммированы сведения о современном состоянии дела идентификации пациента и его проб на преаналитическом этапе.

Имя или номер?

При поступлении в больницу пациент должен быть идентифицирован многими людьми, включая медицинских сестер, врачей, лабораторных техников и др. Это справедливо и для любой пробы, взятой у пациента и перенесенной в собственную или внешнюю лабораторию. Как можно видеть на рис. 10-1, связи между всеми составляющими диагностического процесса требуют переноса идентификации пациента. Было показано, что использование только имени для идентификации личности является недостаточным. Наиболее часто используемой комбинацией информации для идентификации является фамилия, имя и дата рождения. Чтобы уменьшить количество используемой информации, во многих больницах применяют номер пациента. Идеально, когда этот номер печатается вместе с именем пациента на любом запросе, пробе или бланке с результатом и дополнительно могут быть использованы номер отделения, палаты или постели. Это особенно полезно, когда взятие пробы осуществляется другим лицом не тем, кто назначил исследование. Поскольку столь большое количество информации не может быть включено в небольшую по размеру этикетку на пробирке, всю основную информацию о пациенте вместе с назначением определенных лабораторных тестов обычно содержит отдельная форма запроса, связанная с пробой только номером или кодом. На рис. 10-2 показан пример формы запроса, содержащей достаточное количество этикеток для всех возможных

проб, которые могут быть нанесены на пробирки. В качестве альтернативы при поступлении пациента в больницу вместе с ним может быть предоставлена упаковка заранее напечатанных самоклеющихся этикеток с идентификационным номером пациента (рис. 10-3).

Техника идентификации

По прибытии в лабораторию проба пациента должна быть идентифицирована на основании предоставленной информации. Это может быть сделано визуально путем прочтения имени пациента и названия отделения на форме запроса и этикетке пробирки с пробой, перенесения этой информации вручную в лабораторную карту и на этикетки всех порций, на которые должна быть разделена проба для проведения отдельных исследований. Последнее требует образования системы субнумерации, которая должна быть связана с индивидуумом и днем анализа (обычно не более, чем трехзначное число).

Многие учреждения, однако, используют электронные средства переноса идентификационных сведений: это может быть осуществлено в оперативном режиме с использованием большой информационной системы, которая переносит все основные сведения о пациенте вместе с запросом на назначенные ему лабораторные тесты прямо в лабораторный компьютер. В этом случае поступающие в лабораторию пробы должны быть связаны с запросом с помощью штрих-кода или альтернативной системе кодирования, нанесенных на этикетки.

В примере, приведенном на рис. 10-2 номер пробы идентичен номеру формы запроса, которая затем электронным путем привязывается к данным о пациенте в лабораторном компьютере (рис. 10-3).

Недавно были предложены более совершенные системы, которые будут широко использоваться в дальнейшем: двумерный штрих-код (рис. 10-4) или электронные чипы, фиксированные на пробе, которые смогут содержать всю необходимую информацию о пациенте и запросе на лабораторные тесты для этого пациента.

Как минимум поступающая в лабораторию проба должна сопровождаться следующей информацией: фамилия, имя; дата рождения; номер пробы или идентификационный номер пациента или запроса; номер отделения (кто послал пробу, имя врача, назначившего анализы, время взятия пробы (день, час, минуты)).

Прямая или непрямая идентификация проб в лаборатории

Установление личности пациента однозначно связано с проводимой на месте взятия пробы идентификацией пробирки, в которой первичная проба хранится в течение его аналитического процесса. Это обстоятельство потребовало применения разделительных элементов для сыворотки и плазмы, обеспечивающих сохранение аналитической пробы (плазмы или сыворотки) в первичной пробирке, этом случае идентификация может производиться считывающим устройством аналитического инструмента.

Если такого устройства в анализаторе нет или первичная проба должна быть разделена на отдельные порции, то может быть использовано дозирующее распределительное устройство для автоматического определения позиции каждой пробы в каждом используемом анализаторе. Этот вид идентификации называется непрямой идентификацией (по месту). Тогда как техника прямой идентификации позволяет идентифицировать пробу в любом месте и в любое время, непрямая идентификация по положению пробы может быть осуществлена только с помощью позиционного списка или компьютерной системы. Вдобавок, любое разделение первичной пробы на порции несет опасность внесения дополнительной путаницы в пробы.

- Любая проба должна быть однозначно идентифицирована перед ее анализом.
- Применение прямой идентификации из первичной пробы предпочтительнее непрямой идентификации и разделения на порции в интересах уменьшения возможности возникновения ошибок.
- Любая проба, чья принадлежность и происхождение недостаточно документированы, должна быть переведена в стабильную форму (сыворотка, плазма, помещена в холодильник).

ник), и до проведения анализа вся недостающая информация о ней должна быть получена.

Рис. 10-4. Двумерный штрих-код в сравнении с одномерным штрих-кодом.

Рис. 10-2. Номер запроса на этикетках, наклеенных на пробирки с пробами.

Рис. 10-3. Предоставление пациенту при поступлении этикеток с идентификационным номером пациента и их использование в лаборатории. Надписи на поле рисунка слева направо по направлению стрелок: приемное отделение. Клиническое отделение. (Идентификационная информация на этикетке: Хирургия 06.85. Джон Смит. 0001. Глюк. Мочев. Хлор.) Прием проб в лабораторию. дополнительный номер. Лабораторное рабочее место.

Спинномозговая жидкость (СМЖ)

Как взять пробу спинномозговой жидкости?

Рис. 11-1. Взятие пробы спинномозговой жидкости.

Место пункции.

Спинномозговая жидкость и сыворотка в современной диагностике рассматриваются как единое целое, поэтому пробы СМЖ и сыворотки должны быть взяты с минимально возможным интервалом времени, одна за другой. Обычное место пункции – поясничная область, но также может быть использованы вентрикулярный и субокципитальный доступы или шунт; точное место взятия пробы должно быть указано.

Место пункции следует отметить и эту зону дезинфицировать. Для пациента желательное применение местной анестезии. Прокол проводится сагитально и с наклоном вверх (20°) (рис. 11-1).

Требуемое количество.

Количество забираемой СМЖ зависит от клинической ситуации и не столь критично у взрослых; СМЖ очень быстро восполняется (у взрослых 500 мл в день). При поиске опухолевых клеток важно получить настолько много жидкости, насколько это возможно (у взрослых оптимально до 30 мл) (таблица 11-1). Чтобы избежать головных болей после пункции, длительность процедуры взятия пробы должна быть максимально возможной, а игла как можно более тонкая.

Какие особенности взятия пробы СМЖ наиболее важны?

Пациент должен сидеть или лежать на боку на ровной поверхности. Спина пациента должна быть согнута вперед, и положение тела должно быть фиксировано ассистентом. Мышцы должны быть расслаблены настолько это возможно (рис. 11-1). Необходимо указать время взятия пробы, а так же внести информацию о любом предшествующем лечении (например, при бактериальном менингите).

Рекомендуется использовать атравматичную «карандашеобразную» иглу (внешний диаметр 0,7 мм), вместо иглы 22G со срезом Quincke, во избежание постпункционного синдрома (головных болей).

Чтобы избежать контаминации СМЖ, для взятия и транспортировки пробы следует использовать закрытые пробирки.

Пробу СМЖ нужно поместить с соблюдением правил асептики в бесцветные полистироловые пробирки с пробками (в стерильные – для микробиологического исследования, и в свободные от частиц пыли – для цитологического или клинико-химического исследования). В пробах для цитологического исследования должно быть исключено использование таких добавок, как ЭДТА или фторид. После взятия пробы иглу нужно удалить, а ранку заклеить пластырем. Пациент должен быть оставлен лежать на животе в течение 30 минут, чтобы предотвратить последующее вытекание жидкости из места прокола.

Таблица 11-1. Рекомендуемые последовательность и объемы проб СМЖ

Фракция	Взрослые	Дети
	Удалить первые 0,5 мл и всю СМЖ с примесью крови	
Микробиология*	~2 мл	~1 мл
Цитология Супернатант, используемый для клинической химии	>10 мл (Клетки опухоли)	>1 мл (Клетки опухоли)
Общее количество	12 мл	2 мл

*) Перед началом химиотерапии или через 2-3 дня после ее окончания.

Хранение и транспортировка

Важнее всего: После взятия пробы как можно быстрее отправить ее с курьером в лабораторию. В пробах СМЖ плохо сохраняются клетки. Возможна транспортировка в ледяной бане на расстояние до 200 км на автомобиле (примерно 3 часа). Данные о стабильности отдельных компонентов приведены в Приложении. Другие рекомендации даны в таблице 11-2.

Таблица 11-2. Рекомендации по транспортировке и хранению СМЖ.

до 1 часа	Не охлаждать!
до 3 часов	Перевозить на льду Никогда не замораживать Не добавлять консервантов Не фиксировать
Длительное хранение	После отделения клеток с помощью центрифугирования немедленно заморозить до -70°C в стеклянном или полипропиленовом сосуде, который должен быть тщательно закупорен.

Для цитологических исследований в лабораторию отсылают не исходную пробу СМЖ, а ее препараты, полученные при цитоцентрифугировании. Препарат должен быть приготовлен непосредственно после взятия пробы у пациента с помощью специальной центрифуги (центрифугировать 20 мин при 180g). Такие препараты стабильны в течение 4-6 дней при комнатной температуре, а при фиксации в ацетоне – до 3-12 месяцев при -70°C (при определении антигенов иммуноцитологическими методами).

Особые советы для взятия проб СМЖ

- Взятие нескольких порций проб означает, что градиенты концентраций, которые всегда существуют (например, для альбумина и IgG), не приняты во внимание. Чтобы этого избежать, следует сначала весь объем пробы собрать в одну пробирку, хорошо перемешать, а затем разделить на отдельные порции.
- При взятии проб СМЖ не следует использовать перчатки, посыпанные тальком, поскольку при этом результаты цитологического исследования будут недействительны.
- Присутствие до 6000 лейкоцитов в микролитре не влияет на концентрацию лактата в течение 3 часов при комнатной температуре.
- Глубоко замороженные пробы СМЖ лучше хранить при температуре -70°C , чем при -20°C , например, при хранении более 6 месяцев при -20°C медленно исчезают цепи олигоглобулина.

Моча и слюна как диагностические пробы

Моча

Рассмотрение 10 наиболее часто встречающихся ошибок при исследовании мочи выявляет, что некоторые из этих проблем имеют преаналитическое происхождение: пробы длительно хранились, емкости для сбора проб были загрязнены, пробы не были гомогенными и

факторы преаналитического этапа не были приняты во внимание при интерпретации результатов. В этом контексте наиболее важным фактором является качество посуды для сбора мочи. Идеальным контейнером для любого образца мочи может служить соответствующего размера бутылка с широким горлом. Контейнер для мочи должен быть или одноразовым, или из него перед использованием должны быть надежно удалены детергенты. Если назначено микробиологическое исследование мочи, контейнер должен быть стерильным. При исследовании белков и гормонов следует предотвратить абсорбцию аналитов на стенках сосуда. В таблице 12-1 приведены различные типы проб мочи и их использования в лаборатории.

Для сбора проб мочи у новорожденных и детей применяются мешки с гипоаллергенным приклеивающимся к коже покрытием. Прежде всего, область лобка и промежности должны быть вымыты с мылом. Затем, мешок приклеивают вокруг вагины или фиксируют вокруг пениса и оставшуюся часть прикрепляют к промежности на промежности. Мешок следует проверять каждые 10 мин.

Пробы утренней мочи имеют существенные преимущества. Высокая степень осмоларности указывает на неповрежденную концентрационную способность почек. Утренняя моча представляет особую ценность для идентификации микробактерий. Отклонения, вызванные диетой, физической активностью и положением тела минимальны.

Таблица 12-1: Различные типы проб мочи и их применение в лаборатории.

1. Случайная проба мочи	Качественные и/или количественные химические исследования
2. Первая утренняя порция мочи	Клеточные компоненты и слепки
3. Вторая утренняя порция мочи (7-10 часов утра)	Количественное определение по отношению к выделению креатинина
4. Суточная моча	Количественные определения

Рис. 12-3 представляет пример влияния диеты на экскрецию с мочой электролитов и некоторых субстратов. 5 здоровых добровольцев получали только дистиллированную воду в течение 4-х-дневного голодания. Экскреция большинства аналитов у них снизилась. Лишь экскреция аммиака была повышена вследствие ацидоза, вызванного голоданием.

Для количественного анализа используют мочу, собранную за определенное время, предпочтительно за сутки. Для бактериологических исследований рекомендуется использовать пробы мочи, взятые с помощью катетера или путем надлобковой пункции.

На рис. 12-4 схематично представлен сбор пробы средней порции мочи. Содержание бактерий $<10^5$ в средней порции мочи является показателем значительной бактериурии. В идеале анализ мочи следует проводить в течение одного часа после взятия пробы (за исключением исследования суточной мочи). Быстрота использования имеет существенное значение для морфологической оценки нестабильных компонентов мочевого осадка. Так, стабильность эритроцитов и лейкоцитов в моче зависит от pH и осмоларности. Значения pH выше 7,5 и осмоларности ниже 300 мосм/кг приводят к быстрому разрушению этих клеток.

Другие аналиты имеют тенденцию образовывать кристаллы при физиологическом значении pH (кальций, оксалат, мочевая кислота) или распадаться при недостаточной стабилизации (глюкоза, мочевина, цитрат). На рис. 12-5 представлены изменения (в %) различных аналитов после хранения в течение 2, 4 и 6 дней при комнатной температуре без консервантов. Цитрат, глюкоза, оксалат и магний нестабильны. Добавление азида натрия в конечной концентрации 10 ммоль/л мочи при том же сроке и температуре хранения стабилизирует все аналиты до 6 дней. В таблице 12-2 представлены консерванты, которые используются для стабилизации компонентов мочи. Не существует какого-то одного консерванта, способного стабилизировать все группы соединений в моче.

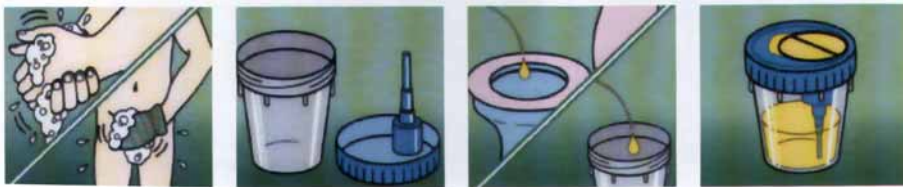
Для количественных исследований рекомендуется хранение проб при комнатной температуре с добавлением стабилизаторов. Если пробы хранятся при температуре $4-6^{\circ}\text{C}$, то для определения кальция, магния, оксалата и фосфатов требуется кислая среда (pH 1,5 – 2,5), а

для определения мочевой кислоты – щелочная (рН>8,0). Для отдельных анализов необходимы специальные виды консервантов (табл. 12-2).

Таблица 12-2: Консерванты для мочи.

Консерванты	Стабилизированные анализы
Тимол 5 мл в 10% растворе 2-пропанола	Большинство компонентов
Азид натрия, 10 ммоль/л мочи	Глюкоза, мочевины, мочевая кислота, цитрат, калий, кальций, оксалат
Соляная кислота, 25 мл 6 моль/л на объем суточной мочи	Катехоламины и их метаболиты, 5-гидроксииндолуксусная кислота, кальций, магний, фосфаты
Карбонат натрия, 2 г на литр мочи	Порфирины, уробилиноген
рН мочи >8	Мочевая кислота

Рис. 12-4. Сбор и взятие пробы средней порции мочи.



Слюна

Слюна может быть использована для анализа различных соединений, таких, как стероиды и лекарственные вещества. Полученные пробы могут содержать слюну, выделенную только одной железой (слюна специфичная для одной железы) или быть смесью продуктов различных желез (смешанная слюна) (рис. 12-6). Образцы смешанной слюны используются для рутинных исследований. Слюна из полости рта может быть получена различными способами. В целях стандартизации сбора слюны для исследований гормонов и лекарственного мониторинга были разработаны различные устройства.

Не существует устройства, идеально подходящего для любой цели. Устройства, использующие абсорбирующие слюну материалы, или контаминируются различными компонентами, оказывающими влияние на процедуру изменения, или само лекарственное средство абсорбируется материалом в различной степени в зависимости от типа устройства. Недавно было показано, что возможность определения лекарственных веществ составляет 59–107%.

Слюна имеет ряд преимуществ перед кровью при проведении лекарственного мониторинга. По данным Gorodisher 85% родителей и 50% детей отдадут предпочтение сбору слюны перед взятием крови из вены. Легкость сбора слюны делает этот способ идеальным для использования в домашних условиях и в случаях, когда взятие крови затруднено (например, у новорожденных). Ограничения в сборе слюны связаны с ее вязкостью и иногда с трудностями получения достаточного объема материала. Существует обзор данных об отношении слюна/плазма при определении содержания наркотических веществ.

Плазма и сыворотка

Различия, которые следует учитывать



Сыворотку получают из цельной крови путем центрифугирования после завершения процесса коагуляции тромбоцитов и факторов свертывания. Поэтому сыворотку рассматривают как артефакт. По определению, она лишена факторов свертывания, но обогащена клеточными компонентами тромбоцитов и продуктами метаболизма.

Плазма – это практически свободный от клеток супернатант, полученный после центрифугирования цельной крови, свертыванию которой препятствует добавление антикоагулянтов немедленно после взятия пробы. Антикоагулянты препятствуют образованию сгустка за счет различных механизмов. Необходимая концентрация антикоагулянтов и их состав описаны в международных нормативных документах.

Для некоторых анализов существует диагностически значимая разница между результатами, полученными при исследовании сыворотки и плазмы (таблица 13-1).

На рис. 13-2 показана линейная корреляция между различиями концентраций калия и фосфатов в сыворотке и плазме и числом тромбоцитов в крови. Некоторые компоненты, содержащиеся в высокой концентрации в тромбоцитах, не могут в связи с этим быть точно определены в сыворотке, например, активность кислой фосфатазы, нейрон-специфическая энзолаза, дофамин и серотонин.

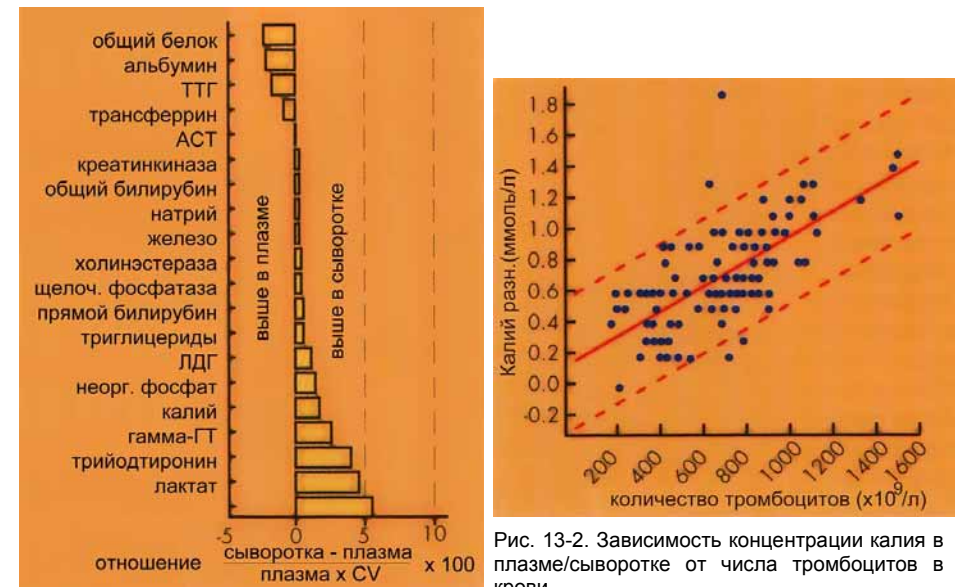


Рис. 13-2. Зависимость концентрации калия в плазме/сыворотке от числа тромбоцитов в крови.

Рис. 13-1. Различия между сывороткой и плазмой, полученные при взятии крови в пробирки с разд. гелем.

Различия между значениями анализов в сыворотке и плазме вызваны следующими физиологическими и техническими причинами:

- Аналит может участвовать в образовании сгустка: фибриноген, тромбоциты, глюкоза.
- Аналит может высвобождаться из клеток в процессе свертывания: калий, лактатдегидрогеназа, фосфаты, аммиак, лактат.

- Антикоагулянт может оказывать влияние в результате интерференции при анализе или искажать истинную концентрацию исследуемого аналита: гамма гл юта м илтрансферазы, определение лития методом пламенной фотометрии в условиях калибровки литием.
- Методология соответствующего способа определения, например, тип измерительного инструмента (монохроматическое или бихроматическое измерение) (80) может вызывать интерференцию.
- При некоторых гетерогенных иммунологических методах исследования может возникать интерференция из-за фибриногена. Фибриноген может интерферировать при некоторых гомогенных иммуноисследованиях.

Таблица 13-1: Аналиты с диагностически значимой разницей концентраций в сыворотке и гепаринизированной плазме и основные причины различий (226).

Аналит	% изменений по сравнению со средней величиной в плазме	Основные причины различий между сывороткой и плазмой
Калий	+6,2	Лизис клеток особенно тромбоцитов*
Неорганические фосфаты	+10,7	Выход из клеток
Общий белок	-5,2	Влияние фибриногена
Аммиак	+38	Лизис тромбоцитов, гидролиз глутамина
Лактат	+22	Выход из клеток

Помимо тромбоцитоза на высокое содержание калия влияют также гемолиз и выраженный лейкоцитоз (когда число лейкоцитов >50 г/л). Оценивая влияние числа тромбоцитов в цельной крови, следует учесть, что повышение их числа на 100 г/л означает средний прирост разницы между величинами калия в сыворотке и плазме на 0,11 ммоль/л.

Каковы преимущества плазмы перед сывороткой?

В рекомендациях, опубликованных Рабочей группой по качеству преаналитического этапа, описаны преимущества и недостатки использования плазмы по сравнению с сывороткой:

1. *Экономия времени.* Исключается ожидание свертывания крови. Время центрифугирования может быть значительно сокращено за счет увеличения скорости вращения.
2. *Большой выход материала для исследования.* Из цельной крови может быть получено плазмы на 15 – 23 % больше, чем сыворотки.
3. *Практически отсутствует интерференция, связанная с последующим свертыванием.* В сыворотке может произойти свертывание после центрифугирования. Этого не происходит в плазме.
4. Результаты исследования плазмы более точно отражают состояние *in vivo*, чем анализ сыворотки.
5. *Меньший риск гемолиза и тромбоцитоза.* У здоровых людей содержание в плазме свободного гемоглобина почти в 10 раз меньше, чем в сыворотке. В плазме тромбоциты остаются интактными *in vitro*, и следовательно, отсутствует ложная гиперкалиемия, как это имеет место в сыворотке.

Каковы недостатки плазмы по отношению к сыворотке?

1. Картина разделения белков при электрофорезе изменена. Фибриноген появляется в виде пика в районе расположения гамма-глобулинов и может маскировать M-градиент.
2. *Метод-зависимая интерференция.* Антикоагулянты в качестве потенциальных комплексообразующих веществ и ингибиторов ферментов могут вызывать метод-зависимую ин-

терференцию. Поэтому каждая новая методика должна быть изучена на предмет возможности интерференции антикоагулянта.

3. *Интерференция катионов.* При использовании солей гепарина может возникать интерференция лития и аммиака с методами их определения. В Приложении суммированы современные данные относительно использования антикоагулянтов при исследовании отдельных аналитов. При использовании пробирок с разделительным гелем для сыворотки или плазмы необходимо исключить повторное центрифугирование после хранения проб в холодильнике, которое ведет к заметному повышению концентрации компонентов клеток, таких как калий, неорганический фосфат, лактатдегидрогеназа.

Типы плазмы

В настоящее время рекомендуется использовать различные типы плазмы при определении отдельных аналитов и проведении аналитических процедур. Так, забуференный цитрат натрия рекомендуется для исследований свертывающей системы. При этом используются различные типы плазмы, полученной из цитратной крови (табл. 13-2):

Таблица 13-2. Различные типы плазмы.

Плазма	Относительная центрифужная сила	Время центрифугирования (минуты)
Богатая тромбоцитами	150—200	5
бедная тромбоцитами	1000—2000	10
Без тромбоцитов	2000-3000	15-30

K₂-ЭДТА рекомендуется для гематологических исследований клеток и аналитов, чувствительных к расщеплению металлопротеиназами. Гепаринизированная плазма рекомендуется для исследований практически всех внеклеточных компонентов.

При взятии пробы крови особое внимание следует уделить при ее смешивании с антикоагулянтом, при этом необходимо предотвратить образование пены. Интервал между началом стаза крови и смешиванием ее с антикоагулянтом не должен превышать двух минут.

Добавки и цветовая кодировка пробирок

Добавки

Помимо антикоагулянтов, таких как ЭДТА, гепарин, цитрат и оксалат, при взятии проб крови применяются другие добавки.

Чтобы предотвратить возникновение ошибок при выборе нужной пробирки флeботомистом, используется цветовое кодирование крышек и пробок пробирок, содержащих антикоагулянты или другие добавки. Так, для пробирок с антикоагулянтами фиолетовый цвет пробки означает наличие ЭДТА, зеленый цвет – гепарина, голубой – цитрата. Пробирки с ингибиторами гликолиза (фторид, йодоацетат) как в комбинации с антикоагулянтами (ЭДТА или гепарин), так и без них, кодируются пробкой серого цвета. данное цветовое кодирование было включено в приложение к нормам, утвержденным Международной организацией стандартизации (ISO). В таблице 14-1 суммированы сведения о содержимом пробирок с цветовым кодом. Пробирки, содержащие кислоту цитрат-декстрозу (ACD, формула А и В) используются для сохранения клеток и кодируются бледно-желтым цветом.

Гепарин

Гепарин, удобный для применения в пробирках для взятия крови, действует путем усиления ингибирующего влияния антитромбина III на фактор Ха. В отличие от препаратов низкомолекулярного гепарина обычный высокомолекулярный гепарин, используемый в пробирках для взятия крови, также обладает антитромбиновой активностью.

Наряду с широко применяемой при получении плазмы для клинико-химических исследований литиевой солью гепарина пробирки с натриевыми или аммониевыми солями гепарина также предлагаются на рынке. Следует иметь в виду, применение аммониевой соли гепарина ограничено при исследовании азота мочевины крови, поскольку в этом анализе измеряется содержание ионов аммония.

ЭДТА (этилендиаминотетраацетат)

Это соединение действует как антикоагулянт, связывая кальций. Применение ЭДТА обсуждается в главе о гематологических исследованиях.

Цитрат

Цитрат натрия также действует как антикоагулянт, образуя хелатные комплексы с кальцием. Применение цитрата натрия обсуждается в главе об исследованиях свертывающей системы.

Ингибиторы гликолиза

Как фтористый натрий, так и йодоацетат лития используются в пробирках для взятия крови с целью предотвращения расщепления глюкозы. Также предлагалось использовать маннозу и фторид. В случае комбинации с антикоагулянтами, такими как динатриевая соль ЭДТА (1 мг/мл крови) или оксалат калия (2 мг/мл крови) номинальная концентрация фторида для торможения гликолиза должна составлять 2,5 мг/мл крови (60 ммоль/л).

Таблица 14-1. Добавки в пробирках с цветовой кодировкой.

Пробирка	Применение	Цвет крышки
1. Пустая; без добавок, для сыворотки	Клиническая химия. серология	Красный/белый
2. Гепарин (12-30 ед/мл)	Плазма для клинической химии	Зеленый
3. K ₂ или K ₃ -ЭДТА (1,2-2,0 мг/мл)	Гематология и отдельные химические анализы в плазме	Фиолетовый
4. Цитрат натрия (0,105 – 0,129 моль/л)	Коагулология	Голубой
5. натрия (2-4 мг/мл), оксалат калия (1-3 мг/мл)	Глюкоза, лактат	Серый

Фтористые соединения ингибируют фермент энлазу в цепи гликолиза и, тем самым, предотвращают расщепление глюкозы.

В отличие от фторида йодоацетат воздействует на глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу. После первоначальной потери глюкозы в течение первых 3 часов после взятия крови (в среднем потери составляют 9 мг/дл у здоровых людей), и фторид, и йодоацетат эффективно предотвращают расщепление глюкозы по меньшей мере в течение 3 дней. Следует, однако, иметь в виду, что в образцах крови с высоким содержанием лейкоцитов, эритроцитов или тромбоцитов происходит более быстрое потребление глюкозы прежде, чем скажется ингибирующее влияние фторида и йодоацетата. У новорожденных в связи с высокими значениями гематокрита потребление глюкозы в пробах крови, взятых без добавления ингибиторов гликолиза и хранившихся при комнатной температуре в течение 5 часов, может составить до 68%. Для разрешения этой проблемы было предложено использовать ингибиторы первого фермента в цепи гликолиза – гексокиназы. Таким ингибитором является манноза, которая применяется вместе с фторидом для лучшей сохранности глюкозы. Ингибирующее влияние маннозы, которая является конкурентным ингибитором, длится короткое время и способно предотвращать гликолиз в течение не более 4 часов после взятия крови. Однако, по истечении 3 часов после взятия крови проявляется ингибирующее действие фторида; таким образом, смесь маннозы (2 мг/мл) и фторида натрия (2 мг/мл) позволяет сводить к минимуму потерю глюкозы,

которая произошла бы при взятии крови в присутствии одного фторида натрия или йодоацетата лития.

Сохранение клеток

Смеси антикоагулянта с добавками, например, АСД (антикоагулянт- цитрат-декстроза или кислота-цитрат-декстроза) используются в пробирках для взятия крови с целью предотвращения распада эритроцитов. АСД используется в двух вариантах – формулах А и В. Различия между ними состоит в разных соотношениях между объемом крови и объемом добавок.

Таблица 14-2. Состав вариантов АСД

	АСД А	АСД В
Цитрат натрия	2,2 г	1,32 г
Безводная лимонная кислота	0,73 г	0,44 г
декстроза (глюкоза)	2,45 г	1,47 г
АСД/кровь (соотношение объемов)	1/5,67	1/3
pH	5,05	5,10

В формуле АСД А отношение объема добавок к объему крови составляет 1:5,67, тогда как в формуле АСД В это отношение равно 1:3. АСД обеспечивает сохранение эритроцитов в течение 21 дня, при условии хранения пробы при температуре от 1 до 6°C.

Транспортировка проб

Влияния времени и температуры при транспортировке

Передача проб в лабораторию может осуществляться различными путями. Обычно пробы передаются за короткий срок, если лаборатория расположена поблизости или в самой клинике и при этом не возникает никаких проблем. Однако интервал времени от момента взятия пробы крови до ее центрифугирования не должен превышать час. Выполнение некоторых аналитических процедур требует использования специальных добавок, например, фторид натрия! оксалат для количественного определения лактата или натрий борат серина ЭДТА для определения аммиака. Определение свободного гемоглобина в плазме требует осторожного обращения с пробой ЭДТА крови. Передача проб в лабораторию может быть осуществлена с курьером или использованием пневматической почты. Лучшие системы последнего типа обеспечивают бережную транспортировку проб, не вызывающую гемолиза. Такие пробы могут быть использованы для определения аналитов в клинической химии, гематологии или для проведения анализа газов крови. Если по техническим причинам требуется транспортировка проб на большие расстояния, (например, по почте или через лабораторного курьера), то использование проб цельной крови должно быть исключено. На рис. 15-1 представлены примеры влияния температуры и продолжительности хранения проб свернувшейся крови на результаты определения некоторых аналитов.

Высвобождение калия из эритроцитов при комнатной температуре минимально вследствие температурной зависимости активности Na⁺K⁺-АТФ-азы. Этот эффект усиливается при 4°C и выше 30°C. Концентрация глюкозы с повышением температуры снижается, тогда как в отношении неорганического фосфата наблюдается противоположное явление, поскольку его концентрация повышается под влиянием активности фосфатаз в сыворотке и эритроцитах. Как показано на рис. 15-1 продолжительность хранения при заданной температуре также является влияющим фактором. Если проба цельной крови хранится в течение двух часов при температуре 23°C, концентрация глюкозы снижается примерно на 10%.

В пробах крови, полученных от пациентов с выявленной патологией, могут наблюдаться отклонения в изменениях, обычно наблюдаемых под влиянием времени и температуры. При лейкоцитозе зависимое от фактора времени снижение концентрации глюкозы еще более выражено. Аналогично, зависимое от времени повышение концентрации аммиака усиливается в пробах с повышенной активностью γ-глутамилтрансферазы. Изменение количества кле-

ток крови под действием антител испытывает влияние зависимости самих антител от температуры.

Содержание многих клинико-химических анализов, таких как электролиты, субстраты или ферменты, может не изменяться при пересылке проб по почте длительностью до 4 дней. Концентрация гемоглобина и количество эритроцитов так же остаются стабильными.

Большие различия наблюдаются в отношении гематокрита, среднего объема эритроцита и билирубина. Для достоверного дифференциального подсчета лейкоцитов мазок крови должен быть подготовлен в пределах трех часов после взятия крови. Дополнительные детали относительно стабильности анализов в цельной крови и сыворотке/плазме можно найти в Приложении "Качество диагностических проб".

В отличие от многочисленных исследований стабильности клинико-химических анализов стабильности параметров гемостаза посвящены немногие работы. По данным исследований Neil и др., стабильность факторов свертывания в пробах пациентов зависит от того, проводится ли пациентам лечение гепарином или нет. Причины изменения стабильности многочисленны, например, потеря буферной системы гемоглобина после отделения плазмы от эритроцитов, фибринолитический эффект *in vitro*, влияние лекарственных веществ на тромбозиты. Результаты этого исследования могут быть суммированы следующим образом: пробы цитратной крови пациентов, не получавших лечения гепарином, для определения протромбинового времени, АЧТВ, тромбинового времени, протеина С и фактора V стабильны в течение восьми часов при комнатной температуре вследствие того, что плазма не отделена от эритроцитов. Это не относится к фактору V и протеину S. Для общих исследований свертывающей системы и определения отдельных факторов свертывания стабильность проб пациентов, которым проводится лечение гепарином, сохраняется менее восьми часов при хранении в холодильнике или при комнатной температуре. В связи с этим все пробы пациентов следует анализировать в пределах четырех часов после взятия при хранении при комнатной температуре. Если это оказывается невозможным, бедную тромбоцитами плазму следует хранить при -20°C.

Правовая стандартизация почтовой пересылки проб

Пробы транзитом

При пересылке крови или других биологических жидкостей, взятых от человека, в отделенную лабораторию должны соблюдаться строгие правила безопасности. Кроме того, должна быть обеспечена целостность пробы для того, чтобы результат анализа был бы правильным. Образцы, пересылаемые по почте, должны "быть устойчивыми к протеканию содержимого, ударам, изменениям давления и другим воздействиям, которые могут возникнуть при обычной транспортировке".

Лица, отправляющие диагностические пробы должны быть уверены, что содержимое упаковано таким образом, что обеспечена его доставка в неизменном состоянии. При транспортировке не должно возникнуть риска ни для людей, ни для животных, ни для окружающей среды.

Нормы, регулирующие транспортировку по почте, содержатся в национальных стандартах. Согласно правилам, пробы, содержащие инфекционно опасные вещества, должны обрабатываться иначе, чем пробы с относительно небольшим риском инфицирования (подобно большинству проб крови, сыворотки, мочи, кала, тампонам, мазкам и фильтровальным бумажкам). диагностические образцы, если они не испаряются через упаковку, могут пересылаться в письмах. Упаковки с инфекционными материалами должны быть помечены надписью: ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ПРОБА / ИНФЕКЦИОННАЯ ОПАСНОСТЬ.

Для международных перевозок автотранспортом и по почте необходима надпись на французском языке "Matières Biologiques Périssables". Ответственность за пересылку по почте инфекционных материалов несет врач-отправитель.

В Европе аккредитована стандартная упаковка EN 829. Не разрешается использовать стекло в качестве упаковочного материала при транспортировке проб, потому что оно может разбиться и травмировать лиц, участвующих в транспортировке.

Упаковка для биологического материала состоит из следующих частей:

- внутренней упаковки для материала пробы,
- абсорбирующего материала,
- наружной упаковки, содержащей информацию об образце и лабораторные формы,
- коробки или почтовой сумки.

Вместо внешней упаковки несколько контейнеров с образцами объемом до 500 мл могут быть упакованы в один ящик из картона, дерева, подходящего пластика или металла в соответствии с правилами транспортировки биологически опасных материалов.

Примечание: В любом случае, при транспортировке инфекционного материала необходимо использовать дополнительный вторичный контейнер для предотвращения любого протекания материала при каком-либо механическом повреждении.

При пересылке по почте систем для взятия крови инъекционные иглы должны быть обязательно удалены.

Упаковка стеклянных слайдов должна обеспечивать их предохранение от повреждения при ударе падением или внешнем давлении.

Образцы кала должны пересылаться в водонепроницаемом контейнере с завинчивающейся крышкой.

При пересылке по почте высушенных образцов крови на фильтровальной бумаге, они должны быть обернуты в прочный бумажный пакет и затем помещены в опечатанный пластиковый почтовый мешок, содержащий мягкую защитную прокладку. Это должно обеспечить защиту от возможного контакта с потенциально инфицированным сухим образцом крови и сохранить целостность образца во время транспортировки. Для пересылки замороженных и охлажденных образцов достаточно использовать изолирующий материал, например, полистироловый контейнер. Для замораживания следует использовать сухой лед.

При упаковке контейнера с сухим льдом необходимо обеспечить возможность для выхода углекислого газа наружу. Иначе он будет скапливаться внутри упаковки, что может привести к взрыву.

В документе H18-A2 Национального комитета клинических лабораторных стандартов (США) описаны процедуры обработки и транспортировки диагностических образцов и этиологических веществ.

В Европе детали регулируются Европейским стандартом prEN 829 для диагностических систем *in vitro*. В нем можно найти подробную информацию относительно требований и процедур проверки транспортных упаковок, проб, абсорбирующих материалов и защитных контейнеров.

Хранение проб в лаборатории

10 правил и некоторые рекомендации

- Процедура определяется стабильностью компонентов пробы. Наиболее важные причины нарушения качества образца следующие:
 - Метаболизм клеток крови
 - Испарение/сублимация
 - Химические реакции
 - Разрушение микробами
 - Осмотические процессы
 - Воздействие света
 - Диффузия газа
- Быстрая транспортировка и короткий срок хранения улучшают достоверность результатов лабораторных исследований.
- Образцы и пробы сохраняются тем лучше, чем ниже температура их хранения (но, заметьте, существуют исключения!).
- Образцы и пробы всегда должны храниться в закрытых сосудах (испарение!).
- Опасность испарения существует и в холодильниках (конденсация влаги на охлаждающих элементах).
- Проблемы хранения уменьшаются при использовании одноразовых систем для сбора проб.
- Разделительные элементы (например, разделительные гели) улучшают выход сыворотки/плазмы и позволяют оставлять сыворотку в первичных пробирках над густком.
- Избегайте встряхивания сосудов с пробами (системы пневматической доставки пробирок риск гемолиза).
- Всегда храните сосуды с кровью в вертикальном положении; процесс свертывания ускоряется.
- Маркируйте инфицированный материал и обращайтесь с ним с особой осторожностью.

8 специальных правил и несколько особенно полезных рекомендаций

- Избегайте хранения цельной крови. Информация о чувствительных анализтах представлена в «списке анализтов (см. приложение). Пробы крови должны быть доставлены в лабораторию в течение 45 минут после взятия крови, чтобы центрифугирование и разделение пробы было выполнено течение 1 часа.
- Избегайте влияния гликолиза для сохранения стабильности глюкозы, лактата и pH. Гликолиз может быть предотвращен добавлением ингибитора в комбинации с антикоагулянтом.
- Избегайте воздействия света, в противном случае происходит падение уровня билирубина, витамина С, порфиринов, креатинкиназы и фолиевой кислоты.
- Предотвратите, насколько это возможно, контакт с воздухом. Если это условие не выполняется, испарение/сублимация приведет к заметному повышению концентрации/активности всех нелетучих компонентов. Это особенно выражено, когда объем пробы относительно небольшой, а площадь поверхности относительно велика.
- Цельную кровь не следует хранить в холодильнике. При охлаждении мочи из раствора могут выпадать в осадок соли (фосфат кальция и магния, мочевая кислота).

- Для исследований определенных анализтов образцы/пробы, не должны замораживаться. Несоблюдение этого правила может привести к отклонению результатов исследований следующих анализтов (табл. 17.1):
- Правильное оттаивание. Очень частым источником ошибки является неадекватное перемешивание глубокомороженных проб после их оттаивания. При оттаивании создаются градиенты концентраций, поскольку концентрированные растворы оттаивают первыми и затем опускаются вниз по стенкам сосуда. (см. рис. 17-1)
 После оттаивания сосуд с пробой следует перевернуть несколько раз, избегая при этом образования пены. Исследуйте пробу на возможное наличие нерастворенного материала, и, при необходимости, осторожно нагрейте пробу до достижения гомогенности раствора.
- Храните пробы после проведения анализа таким образом, чтобы в случае необходимости можно было подтвердить результаты, проверить идентичность проб или провести дополнительные тесты по медицинским или правовым показаниям.

Рис. 17-1. Образование градиентов концентрации кальция в пробах.

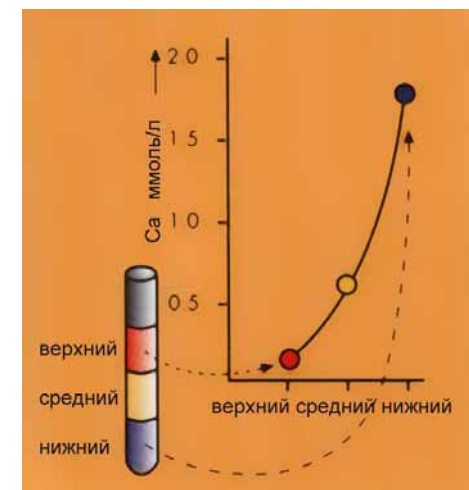


Таблица 17-2: Примеры компонентов крови и мочи, которые не должны храниться замороженными.

Проба	Аналиты
Сыворотка/ Плазма	Электрофорез липопротеинов Аполипопротеин А-1 и В ЛПНП (стабилизируется добавлением глицерина) Плазма, позитивная по мономеру фибрина*.
ЭДТА-кровь	Гематологические исследования
Моча	IgG Осадок Мочевая кислота (преципитация!)

* Отрицательный результат теста, удлиненное протромбиновое время, укороченное тромбиновое время, укороченное рептилазное время.

Таблица 17-2: Рекомендуемые время и условия хранения проб для анализов

Пробы для	Время хранения	Температура
Клиническая химия	1 неделя	Холодильник
Иммунология	1 неделя	Холодильник
Гематология	2 дня	Комнатная температура
Коагулология	1 день	Холодильник
Токсикология	6 недель	Холодильник
Группы крови	1 неделя 1 неделя (по меньшей мере)	Холодильник

Обработка, центрифугирование, распределение образцов

Что следует сделать при поступлении образцов?

Центрифугирование

Центрифугирование свернувшейся крови с целью получения сыворотки следует выполнять, только убедившись в том, что кровь полностью свернулась. В нормальных условиях время, отводимое на свертывание крови, составляет около 30 мин. Однако, у пациентов, получающих лечение антикоагулянтами или имеющих нарушения свертывания, время свертывания может быть удлинено.

Центрифугирование свернувшейся крови для получения сыворотки или крови с антикоагулянтами для получения плазмы обычно производится в течение 10 – 15 минут при ускорении от 1000 до 1200 g. Для получения плазмы, свободной от тромбоцитов, требуется центрифугирование в течение 15-30 мин при 2000-3000 g. (см. табл. 13-2). При исследованиях свертывания цитратную цельную кровь следует центрифугировать при 2000g в течение 15мин.

Относительная центробежная сила может быть рассчитана с помощью эмпирического уравнения или по номограмме, представленной на рис. 18-1. для расчета относительной центробежной силы (rcf) используется следующее уравнение:

$$= 1,118 \times 10^{-5} \times R \times n^2,$$

где R – средний радиус от оси вращения (см), а n – скорость вращения (об./мин). $1,118 \times 10^{-5}$ это константа, учитывающая ускорение силы тяжести.

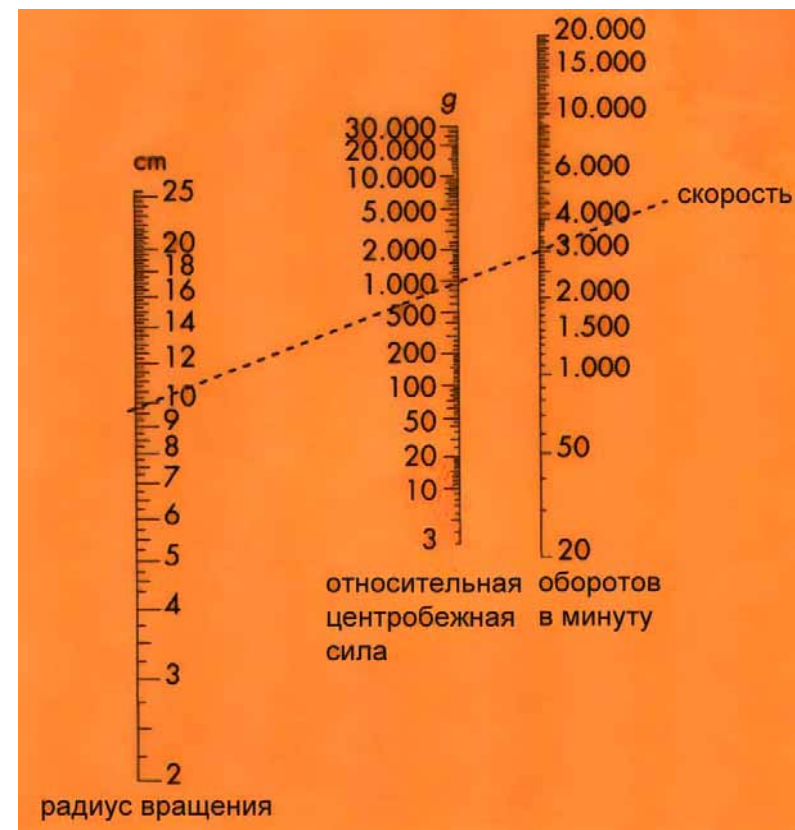
Центрифугирование обычно проводят при температуре от 20°C до 22°C. Однако, если аналиты проявляют нестабильность при изменении температуры в процессе центрифугирования, особенно если при центрифугировании температура повышается, их следует центрифугировать при температуре холодильника (4°C). Тем не менее, охлаждение может привести к выходу калия из клеток, что вызовет ложное повышение значений его концентрации (см. табл. 15-1).

Образцы не должны подвергаться повторному центрифугированию после отбора проб сыворотки или плазмы. Изменение отношения содержания воды в плазме и клетках может повлиять на значения концентраций аналитов, внося ошибку. Образцы, взятые в пробирки с разделительным гелем, никогда не следует подвергать повторному центрифугированию.

Время центрифугирования и центробежная сила, требуемые для получения осадка гепаринизированной крови должны быть такими, чтобы в готовой плазме не осталось тромбоцитов. Неполное осаждение тромбоцитов приведет к ложному повышению концентрации калия, лактатдегидрогеназы, кислой фосфатазы и неорганического фосфата за счет их выхода из тромбоцитов в плазму пробы (рис. 18-2). На рис. 18-3 представлен внешний вид плазмы после центрифугирования при разных скоростях вращения.

Пробирки для взятия капиллярной крови с антикоагулянтами или без них могут центрифугироваться для получения сыворотки или плазмы в микроцентрифуге при наличии адаптера, который приспособлен для таких пробирок.

Рис. 18-4. Номограмма для расчета относительной центрифужной силы.



Центрифугирование пробирок для взятия капиллярной крови производится при ускорениях в диапазоне от 6000 до 15000 x g в течение минимум 90 с. Программы профилактического обслуживания центрифуг должны включать график периодической проверки скорости вращения с помощью тахометров.

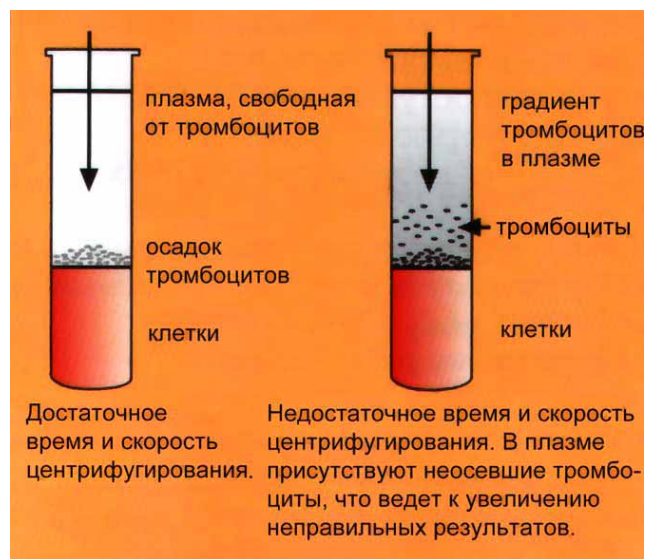
Обработка проб после центрифугирования

После центрифугирования пробы могут быть перенесены непосредственно в анализатор. В идеале проба должна забираться путем прокалывания пробки закрытой пробирки иглой анализатора, выполняемого после перемешивания пробы. В большинстве лабораторий, тем не менее, пробку удаляют и пробы распределяют (по вторичным пробиркам). для предупреждения испарения, это должно производиться непосредственно перед анализом. Аликвоты из первичной пробы должны обрабатываться в соответствии с теми же правилами, что и первичная проба, в отношении к идентификации, условий хранения и правил безопасности.

Для предупреждения контакта с кровью, содержащей потенциально инфекционные вещества, разделения первичной пробы следует избегать, насколько это возможно.

Процесс обработки проб облегчается при использовании пробирок с разделительным гелем. В качестве альтернативы, распределение проб может осуществляться механическими устройствами (рис. 19-1, стр 44).

Рис. 18-2. Влияние примеси тромбоцитов, вызванное недостаточным временем центрифугирования и центробежной силой, применительно к гепаринизированной крови.



Преаналитический рабочий поток и роботизация

Рабочий поток может быть определен как последовательность действий, выполняемых с момента поступления образца в лабораторию до момента сообщения результата врачу. Их последовательное выполнение, в свою очередь, определяет время оборота результатов лабораторных исследований. Более широкое определение рабочего потока включает этапы от момента назначения врачом лабораторного теста до момента получения им результатов этого теста.

Важность преаналитического этапа в общем времени оборота результатов лабораторных исследований можно оценить, приняв во внимание исследование Godolphin (62), сведения из которого приведены в таблице 19-1.

Таблица 19-1: Доля преаналитического этапа в общем времени оборота результатов лабораторных исследований

Преаналитический этап	57,3%
Аналитический этап	25,1%
Постаналитический этап	17,5%

В последние годы для уменьшения рабочей нагрузки в больших референтных лабораториях используются автоматические системы сортировки проб, а в качестве альтернативы трудоемкой и длительной по времени процедуре ручного приготовления аликвот внедряются автоматические системы разделения на аликвоты. На рис. 19-11 представлена автоматическая система сортировки проб.

Консолидация рабочих мест – для рутинных анализов, специальных химических и гематологических исследований – облегчает рабочий процесс. Эффективность рабочего потока

зависит от выстроенных в единую цепь стадий обработки проб, разделения на аликвоты и их распределения по анализаторам.

Прерывистые процессы, такие как центрифугирование и маркировка проб, неблагоприятно влияют на общее время оборота результатов лабораторных исследований.

Роботизация

Роботы представляют собой устройства, которые могут быть запрограммированы на выполнение определенных заданий. Отсюда, роботика – это термин, описывающий использование роботов для выполнения определенных повторяющихся механических задач, которые могут быть запрограммированы и выполняться под электронным и компьютерным контролем.

Существуют роботы различной степени гибкости. Роботы с тремя степенями свободы, которые могут перемещаться в трехмерном пространстве, но не способны к вращению, называются Картезианскими роботами и имеют самое различное применение: от забирающих пробы устройств в автоматических анализаторах до дозирующих жидкости станций.

Роботы с четырьмя степенями свободы называются цилиндрическими роботами и способны двигаться как по плоскости, так и с поворотом. С использованием роботизированных рук эти цилиндрические роботы применяются для проведения подготовки проб, например, при определении групп крови, или во множественных этапах аналитической процедуры, таких, как экстракция пробы, разделение водной и органической фаз и впрыскивание пробы при высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Обладающие высокой степенью гибкости роботы с пятью степенями свободы называются суставными роботами. Они являются универсальными в связи с их способностью совершать вращательные движения, аналогичные движениям запястья, и возможностью достигать отдаленных точек прибора. Роботы также применяются для транспортировки образцов в лабораторию по ленточным устройствам.

М. Сэзэки, пионер в использовании роботов, применил конвейерную ленточную систему для транспортировки проб к роботизированным анализаторам, которые, в свою очередь, были соединены с конвейерным полотном. М. Сэзэки использовал роботизированные анализаторы для выполнения различных тестов, включая серологические агрегационные тесты на СПИД, тесты для переливания крови, в том числе определение групп крови по системе АВО, совместимости крови и резус фактора, а также исследования гормонов.

В настоящее время разработаны и внедрены в лабораторную практику различные варианты передовых аналитических систем, использующих робототехнику.

Поскольку роботика способна повысить эффективность рабочего потока, по своей природе она требует особых предосторожностей. Это связано с тем, что движения роботизированных рук находится под контролем сложных электронных цепей. Всякие колебания напряжения в электросети могут нарушить деятельность робота. Следовательно, необходимо предусмотреть наличие неподверженных колебаниям напряжения источников питания с запасными батареями.

Наконец, при принятии решения об использовании роботики клинической лаборатории должны быть приняты во внимание необходимые расходы и потребность в пространстве для размещения роботизированной техники.

Вопросы безопасности на преаналитическом этапе

Утилизация образцов, игл, пробирок и химикатов

Меры обеспечения безопасности чрезвычайно важны для защиты здоровья медицинских работников. документ GP 17-Т Национального комитета клинических лабораторных стандартов США регламентирует правила безопасности в клинической лаборатории. Этот документ очерчивает меры по содержанию и инспектированию лаборатории, общие требования по безопасности персонала и лаборатории в целом, необходимые предупреждающие знаки и этикетки, меры противопожарной, электрической и радиационной безопасности и контроля,

правила обращения со сжатыми газами, канцерогенами, химически и микробиологически опасными веществами и утилизации опасных отходов. В этом разделе специально обсуждаются вопросы утилизации образцов, игл, пробирок и химикатов.

Удаление одноразовой иглы в контейнер для острых предметов.

- а) Взятие пробы с помощью безопасной иглы.
- б) При нажатии на кнопку держателя происходит высвобождение иглы и игла сбрасывается в контейнер для острых предметов. Держатель затем может быть подготовлен для повторного использования.
- в) Одноразовый держатель: немедленно после взятия пробы держатель вместе с иглой сбрасывается в контейнер для острых предметов.
- д). Контейнер.

Утилизация игл и других острых предметов

Утилизация всех острых предметов, например, игл, осуществляется путем помещения их в непроницаемые контейнеры с прочной стенкой, имеющие соответствующую маркировку и цветовую кодировку.

Не вынимайте иглу из защитного чехла, а также избегайте сгибания и ломки игл. Тем не менее, если надевание колпачка на иглу становится необходимым, это можно делать или при помощи только одной руки, вставляя иглу в лежащий колпачок, или с использованием защитного устройства для съема игл. Существуют простые устройства для этой цели, которые позволяют флеботомисту закрыть иглу защитным чехлом с минимальным риском возможного укола иглой. Специальные защитные приспособления также были разработаны для утилизации наборов для взятия крови с «иглой-бабочкой».

Система Safety Lock для защиты "иглы-бабочки" (набор для взятия крови).

- а) Удерживая крылышко одной рукой, другой рукой возьмитесь за основание защитного чехла.
- б) наденьте защитный чехол на иглу до ощущения легкого щелчка. Это означает, что игла полностью закрыта безопасным чехлом.
- в) Выбросите набор для взятия крови в соответствующий контейнер.

Утилизация пробирок и проб

Пробирки с пробами крови, которые подлежат утилизации, должны складываться а специальные мешки для биологически опасных отходов, которые могут автоклавироваться. Эти мешки должны быть помещены в непроницаемый контейнер, и затем герметично закрыты. Биожидкости, такие как моча, рвотные массы, кал и другие, могут быть утилизированы путем смывания в унитазе. Емкости для жидкостей, например, мешки для крови, должны сжигаться после помещения в контейнеры для биологически опасных отходов.

Химикаты

Отходы химикатов могут быть воспламеняющимися, коррозионными, реактивными и токсичными. Воспламеняющимися химическими отходами являются легковоспламеняющиеся жидкости, такие как органические растворители (например, спирты, ацетон, ксилол, толуол и т.д.), окислители, такие как перекиси, соли нитратов. и воспламеняющиеся газы, такие как бутан, силан и водород. Эти вещества должны быть маркированы соответствующими этикетками химической опасности, представленными на рис. 20-4.

Отходы воспламеняющихся растворителей не рекомендуется сливать в канализацию. Если данные вещества быстро растворяются в воде, они могут быть в небольших количествах слиты в раковину с последующим промыванием раковины таким же объемом воды.

Более правильно собирать воспламеняющиеся растворители в безопасные сосуды и хранить в отдельном помещении до их сбора специализированной организацией. Эфир и хлорированные растворители следует собирать в отдельные сосуды. Другие виды растворителей могут быть слиты в один сосуд.

Представителями коррозионных веществ являются сильные кислоты, например, серная, соляная и фосфорная кислоты и основания, например, аммиак (гидроокись аммония).

Токсические, коррозионные и воспламеняющиеся химикаты не должны использоваться в качестве консервантов на преаналитическом этапе.

Никогда нельзя добавлять мочу к концентрированной кислоте. Такие кислоты должны быть разведены в процессе медленного добавления их по стенкам сосуда с мочой. Отходы сильных кислот и коррозионных веществ предпочтительнее удалять путем сливания в раковину с последующим промыванием большим количеством проточной холодной воды из крана.

Когда моча собирается в соляной кислоте, первая порция мочи должна быть собрана перед добавлением кислоты.

Токсические химические отходы, например, токсические металлы, могут представлять опасность для грунтовых вод.

Агентство охраны окружающей среды США (EPA) указывает химикалии, которые дают токсические отходы. Существует также Европейский перечень максимально допустимых концентраций химикатов в воздухе, воде и пищевых продуктах.

Наконец, для полноты знаний об опасных отходах химикатов каждая лаборатория должна иметь списки данных по безопасности материалов, в которых должны содержаться сведения об опасных свойствах каждого химиката и к которым легко обратиться в случаях опасности или когда существуют сомнения в отношении характера опасных отходов.

Рис. 20-4. Этикетки безопасности, применяемые в США и Европе.



Важные аспекты иммуногематологии

Что необходимо сделать перед переливанием крови?

Удостовериться в идентичности пробы и пациента

Согласно данным Воопе и др. 41% наблюдавшихся ошибок при переливании крови и ее компонентов относится к преаналитическому этапу, 55% – к постаналитическому этапу и только 4% связано с ошибками на этапе анализа. Группа наивысшего риска представлена больными, получающими в течение суток 10 и более единиц крови.

Большинство гемолитических реакций при переливании крови вызвано несоответствием идентичности пробы и пациента. Частота проведения неправильных переливаний по причине путаницы проб составляет 1:60000 переливаний. Поэтому форма запроса на переливание крови должна содержать сведения об имени и фамилии пациента, дате его рождения и, по возможности, его собственный идентификационный номер.

Перед взятием пробы крови должен быть проведен тщательный контроль идентичности пациента путем выяснения у него его имени и фамилии и даты рождения. Пробы крови должны быть собраны в правильно помеченные пробирки. Должна быть зафиксирована также фамилия сотрудника, взявшего пробу.

Правильно взятая проба

- для иммуногематологических тестов используется сыворотка. Антикоагулянты (ЭДТА, цитрат) предупреждают активацию системы комплемента. Следовательно, активируемые системой комплемента антитела не могут быть обнаружены в плазме.
- Использование гемолизированных проб не допускается, поскольку это может замаскировать вызванный антителами гемолиз.
- Взятие пробы крови у пациента для проведения исследования перед переливанием крови должно производиться не менее, чем за 72 часа до теста.
- Каждая проба, взятая у пациента для иммуногематологического исследования, должна храниться при температуре 4 – 6°C в течение одной недели после теста.
- Проба для определения холодовых агглютининов до отделения сыворотки должна храниться при температуре 37°C.
- Если идентификация связанных с эритроцитами антител требует разведения, необходимо использовать цитратную кровь.
- Для определения *in vivo* комплемента, связанного эритроцитами, используются пробы крови с ЭДТА. Для специального исследования антигенов эритроцитов должна использоваться цитратная кровь.
- Пробы крови, контаминированные вартоновым студнем, могут спонтанно агглютинировать. Клетки должны быть отделены путем троекратного промывания 0,9% раствором хлористого натрия.
- Интерференция реакции агглютинации может быть вызвана псевдо- или полиагглютинацией. Псевдоагглютинация (образование монетных столбиков) может быть связана с эндогенными или экзогенными причинами.
- Экзогенными факторами являются вливания декстрана, поливинил-пирролидона или фибриногена; среди эндогенных факторов – диспротеинемии при плазмцитоме, циррозе печени или гиперфибриногенемии. Полиагглютинация представляет собой состояние, при котором эритроциты агглютинируются большей частью группосовместимых сывороток. Такое же явление, наблюдаемое *in vitro*, называется полиагглютинацией (28). Это может быть вызвано бактериемией или вирусемией, или экзогенной бактериальной контаминацией эритроцитов, т.е. в первичной пробирке. Микробно-индуцированная полиагглютинация возникает в результате изменения антигенной структуры эритроцитов под влиянием

микробных ферментов. Т-полиагглютинация вызывается микробной нейраминидазой, ТК-полиагглютинация – β-галактозидазой или приобретенным β-антигеном под действием деацетилазы. Известна также немикробная полиагглютинация. Она возникает в результате соматической мутации плюрипотентной гемопоэтической стволовой клетки (Тп) или при наличии врожденных генетических дефектов.

- Рассмотрение и интерпретация результатов всех иммуногематологических исследований должны выполняться двумя независимыми исследователями, которые обязаны поставить свои подписи, подтверждающие проведения исследования.

Хранение крови для переливания

Порции крови для переливания должны храниться в специальных холодильниках, оборудованных автоматической системой слежения за температурой и оптической и звуковой системой сигнализации. Для поднятия тревоги нижняя граница диапазона температуры должна быть установлена на уровне $3,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$, а верхняя граница – на уровне $5,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Поверхность контейнера для крови должна быть чистой и сухой. Любые предметы, которые могут повредить контейнер с кровью, должны быть удалены из зоны хранения. Материалы для трансфузии должны храниться отдельно от реактивов и использованных пробирок. Холодильник для хранения крови должен поддерживаться в чистоте. Стандартная процедура для очистки холодильника-хранилища является обязательной.

Что должно быть сделано перед переливанием

Как при выдаче порции крови, так и перед ее переливанием, должна быть проверена идентичность всей информации на контейнере и в форме, сопровождающей контейнер. АВО-статус донора должен быть проверен непосредственно перед переливанием с помощью быстрого теста. В случае аутологичной трансфузии уточнение АВО-статуса с использованием быстрого теста должно быть выполнено как для порции крови, так и для реципиента. Остаток крови после переливания должен храниться по меньшей мере 24 часа после переливания при температуре 2-8°C.

Важные аспекты исследований гемостаза

Взятие проб

Результаты скрининговых коагуляционных тестов, таких как протромбиновое время (ПВ, тест Квика) и активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), существенно зависят как от использованных антикоагулянтов, их концентрации, соотношения их объема с объемом пробы крови, так и от способа, каким взяты и обрабатываются пробы. Цитрат является стандартным антикоагулянтом при взятии образцов, предназначенных для проведения этих тестов.

Концентрация антикоагулянта

Протромбиновое время, выраженное через международное нормализованное отношение (INR), чувствительно к концентрации цитрата. Значения INR особенно при использовании таких реагентов для ПВ, как тромбопластин ВОЗ, при международном индексе чувствительности (ISI) равном 1 и концентрации цитрата натрия 0,129 моль/л (3,8 %) обычно выше, чем при концентрации цитрата натрия 0,109 моль/л (3,2 %) (2, 142). Разница, выраженная в INR, между двумя концентрациями цитрата может варьировать от 0,7 до 2,7 единиц INR (2).

Следовательно, лаборатория не должна менять концентрацию цитрата, если результаты определения ПВ у больных, получающих пероральные антикоагулянты, выражаются в единицах INR.

Помимо необходимости поддержания номинального отношения объема антикоагулянта и крови (1+9) размер пространства над кровью также является фактором, который может повлиять на результат определения АЧТВ. По-видимому, увеличение площади поверхности в пробирке способствует активации тромбоцитов с последующим выделением тромбоцитарного

фактора 4, который, в свою очередь, нейтрализует часть гепарина, приводя к укорочению показателя АЧТВ.

Рекомендуемая концентрация цитрата 0,105 моль/л (3,2%). Цитрат, забуференный до рН 5,5, предпочтительнее незабуференного раствора, поскольку в забуференном растворе рН образца ближе к физиологическим значениям.

Если значение гематокрита у пациента превышает 0,55, требуется внесение поправок, даже при отношении антикоагулянта к крови 1+9 (1:10). Причина этого в том, что уменьшение пространства плазмы из-за увеличения объема эритроцитов приводит к избытку цитрата в контейнере с образцом. Избыточный цитрат в плазме связывает часть кальция, добавляемого в процессе измерения протромбинового времени и активированного тромбoplastинового времени, вызывая удлинение времени свертывания.

Обработка образца

После тщательного перемешивания пробы (для этого пробирку с образцом необходимо несколько раз осторожно перевернуть) и проверки правильного соотношения объемов антикоагулянта и крови закрытая пробирка с образцом подвергается центрифугированию при 2000g в течение 10 мин. Образец не должен подвергаться обработке при видимом наличии микросгустков или гемолиза, поскольку при этом возможна активация факторов свертывания. Также не следует использовать хилезные и иктеричные пробы из-за возможной интерференции при фотооптических измерениях.

Образцы для проведения скрининговых коагуляционных тестов (ПВ и АЧТВ) должны доставляться в лабораторию в закрытом виде при комнатной температуре (22-24°C), а не на льду.

При использовании нескольких пробирок для взятия образцов венозной крови, пробирка для исследований свертывающей системы должна быть второй или третьей, чтобы уменьшить возможную контаминацию тканевым тромбопластином.

При проведении теста активированного тромбопластинового времени и других скрининговых коагуляционных тестов рекомендуется поддерживать точное соотношение объемов раствора цитрата в крови 1+9.

Таблица в Приложении содержит детальные сведения относительно стабильности образцов, предназначенных для различных исследований свертывающей системы.

Следует руководствоваться следующими основными принципами.

- Если тест выполняется немедленно, образец хранится при комнатной температуре. Плазму можно оставить поверх осадка клеток после центрифугирования.
- Сосуд для сбора крови следует хранить закрытым для предотвращения изменений рН, связанных с испарением летучих карбоновых кислот.
- Любой ценой следует избегать воздействия высокой температуры (включая прямые солнечные лучи).
- Образцы не следует хранить в холодильнике (от +2 до 8°C), поскольку холодная активация фактора VII, а также факторов X и XII может вызвать укорочение времени свертывания в соответствующих скрининговых тестах.
- для тестов, которые должны проводиться в последующие дни, следует приготовить аликваты свободной от тромбоцитов (<5000/мкл) цитратной плазмы и заморозить в закрытых пробирках.
- Замороженные образцы следует быстро размораживать на водяной бане при +37°C и тщательно перемешивать, добиваясь, чтобы все криопреципитаты полностью растворились. Повторное замораживание и размораживание не рекомендуется.

Хранение образцов

Плазму следует оставить над осадком клеток и использовать для анализа в пределах от 2 до 6 часов (детали см. в Приложении). Если период хранения будет превышать 4 часа, образцы плазмы могут храниться в холодильнике при -20°C до 4 недель, а при быстром замораживании до -70°C срок хранения можно продлить до 6 месяцев.

Факторы V и VIII являются нестабильными. Определение активности фактора VIII (VIII.C) в пробах замороженных при -20°C, должно быть выполнено в пределах 2 недель хранения. В образцах, замороженных при температуре -70°C, фактор VIII стабилен в течение одного года.

Оценка фибринолиза и мониторинг фибринолитической терапии

После осуществления замораживания и оттаивания идентичные результаты могут быть получены лишь при условии, что до замораживания плазма не содержала мономеров фибрина, продуктов деградации фибрина или гепарина.

В пробах плазмы, содержащих мономеры фибрина, образующийся после оттаивания гель может привести к отрицательному результату при определении мономера фибрина, удлинению АЧТВ, тромбинового и рептилазного времени. В пробах плазмы со значительно удлиненным тромбиновым временем (гепарин, продукты деградации фибрина) вызванная оттаиванием нестабильность может привести к укорочению и даже к нормализации показателей тромбинового времени и АЧТВ после оттаивания.

Образцы для мониторинга фибринолитической терапии, осуществляемой введением стрептокиназы или урокиназы, следует собирать в пробирки, содержащие смесь ЭДТА с аprotинином, поскольку эта комбинация немедленно ингибирует вызванную стрептокиназой и урокиназой активацию плазмина. Для этого используют аprotинин в концентрации 150 кМЕ/мл крови в комбинации либо с тринатрий цитратом (10 ммоль/л), либо с ЭДТА (4,2 ммоль/л).

В отличие от определения продуктов деградации фибрина, для чего кровь следует собирать в пробирку со смесью, содержащей 10 единиц тромбина и 1835 единиц соевого ингибитора трипсина на 1 мл крови, исследование Д-димера, отражающего фибринолитическую активность, может производиться в цитратной плазме.

Активность rt-PA (рекомбинантного тканевого активатора плазминогена) крови может быть эффективно заторможена смесью 5 ммоль/л Д-фенилаланин-пролин-аргинин-хорметипкетона и 10 ммоль/л цитрата, или 4,2 ммоль/л ЭДТА.

Для исследования единичных факторов, особенно фактора VIII, проводить центрифугирован не пробы крови следует по возможности сразу после ее взятия, при охлаждении (+4°C), после чего плазму следует заморозить при температуре от -20°C до -70°C.

Измерения ПВ и АЧТВ в наименьшей степени подвержены влияниям, если плазма исследуется в течение 2 часов при комнатной температуре.

Важные аспекты гематологического анализа

Оптимальный антикоагулянт

Международный комитет по стандартизации в гематологии (ICSH) рекомендовал двукалиевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (K₂-ЭДТА) в качестве антикоагулянта выбора для сбора образцов крови, предназначенных для подсчета клеток крови и определения их размера.

K₂-ЭДТА было отдано предпочтение перед Na₂-ЭДТА из-за большей растворимости калиевой соли по сравнению с натриевой солью. При применении всех солей ЭДТА клетки сокращаются в объеме, что влияет на центрифужный, но не на расчетный гематокрит. Однако, поскольку рН Na₂-ЭДТА и K₂-ЭДТА меньше по сравнению с K₃-ЭДТА клетки разбухают, что компенсирует осмотически вызванное сморщивание клеток. Калибровка электронных счетчиков клеток крови для среднего объема эритроцитов (MCV) с использованием величины микро-

гематокрита, полученной при исследовании образцов крови как с Na_2 -ЭДТА, так и с K_2 -ЭДТА, дала одинаково приемлемые результаты; в противовес неприемлемым результатам, полученным на основе значения микрогематокрита в образцах крови с K_3 -ЭДТА при исследовании коммерческого контрольного материала.

В связи с разнообразием технологий, используемых в новых автоматических анализаторах для подсчета, определения размера и проведения дифференциального подсчета 5 видов лейкоцитов возникает вопрос о том, является ли какая-нибудь соль ЭДТА адекватным антикоагулянтом для гематологических исследований.

Под воздействием ЭДТА тромбоциты изменяют свою форму диска на сферическую, что приводит к возникновению ошибки при определении среднего объема тромбоцитов (MPV).

Влияние ЭДТА на стабильность различных популяций лейкоцитов (лимфоциты относительно более стабильны, тогда как нейтрофилы и моноциты скорее более подвержены влиянию ЭДТА при хранении крови в ее присутствии) приводит к изменениям, которые могут сказаться на кластерном анализе, выполняемом с помощью пакетов программ, которыми оснащены анализаторы для дифференциального подсчета лейкоцитов.

Отношение антикоагулянта к объему крови

Объем взятой крови должен обеспечить поддержание рекомендованного диапазона концентрации соли ЭДТА 1,2-2,0 мг/мл. Поскольку концентрация ЭДТА влияет на морфологию нейтрофилов, качество мазка периферической крови может пострадать, если не обратить внимания на соотношение объемов антикоагулянта и крови и на промежутки времени между взятием образца крови и приготовлением мазка.

При концентрации ЭДТА до 1,50 г/л в образцах крови, взятых не более часа назад, возникают очень незначительные изменения морфологии нейтрофилов. При более высокой концентрации ЭДТА уже в течение первого часа происходят более серьезные изменения, такие как потеря мостиков между сегментами ядер, потеря цитоплазматических связей и раннее разделение.

Влияние повышения концентрации ЭДТА сверх установленного значения снижает величину центрифужного микрогематокрита, причем снижение более выражено при использовании K_3 -ЭДТА по сравнению с K_2 -ЭДТА.

Однако, при использовании автоматических анализаторов показатель среднего корпускулярного объема не зависит от концентрации ЭДТА, вплоть до 10 кратного ее изменения относительно номинального значения; также было показано, что результаты измерений, полученные с K_2 -ЭДТА зависят от применяемого прибора.

При использовании рекомендованных концентраций солей ЭДТА (K_2 - и K_3 -ЭДТА) и при проведении анализа в пределах от 1 до 4 часов после взятия крови существенных различий результатов между образцами, взятыми с этими двумя антикоагулянтами не наблюдалось.

Взятие и обработка образца

Необходимым условием является тщательное смешивание крови с антикоагулянтом, выполняемое путем переворачивания пробирки в течение нескольких раз. Тип миксера (качающийся или ротационный) может влиять на степень смешивания, особенно при пере пробики, что может привести к неточным результатам исследования.

Транспортировка, хранение и стабильность аналитов

Вследствие существующих различий между новыми автоматизированными инструментами, включая реагенты, было рекомендовано проводить исследование крови с ЭДТА не позже 6 часов после взятия образца. Однако в некоторых случаях этот период времени оказывается слишком продолжительным для обеспечения достоверным результатов. Только гемоглобин и число тромбоцитов стабильны в течение этого времени. Стабильность при температуре холодильника зависит от типа анализатора (см. детальные сведения в Приложении). По из-

ложенным выше причинам мазок крови следует приготовить в течение 1 часа после взятия крови. Более продолжительное хранение до 24 часов не рекомендуется.

Псевдотромбоцитопения

Слипание или агрегация тромбоцитов и их прилипание к нейтрофилам (сателлизм тромбоцитов) иногда наблюдаются в крови, собранной с ЭДТА, причем эти явления прогрессируют по мере увеличения времени, прошедшего после взятия крови. При этом феномене возрастают значения подсчета числа лейкоцитов, а показатели числа тромбоцитов снижаются. Данное явление может быть обнаружено при изучении мазка периферической крови а также на основании сигналов тревоги, подаваемых автоматическим анализатором. Точный подсчет числа тромбоцитов у лиц с вызванным ЭДТА сателлизмом тромбоцитов может быть осуществлен при разведении крови, полученной из пальца, или путем взятия крови с цитратом в качестве антикоагулянта.

Если пробирка для взятия крови наполнена на половину от ее номинального объема, фактическая концентрация ЭДТА окажется не подходящей для приготовления мазка периферической крови, предназначенного для дифференциального подсчета лейкоцитов.

Примерно 20% объема пробирки для взятия крови должно оставаться заполненным воздухом, чтобы облегчить перемешивание крови с антикоагулянтом.

Особые предосторожности при измерении содержания тромбоцитов

Чтобы оценить *in vivo* активацию тромбоцитов путем измерения компонентов α -гранул тромбоцитов, таких как фактор IV тромбоцитов (PF4), β -тромбоглобулин, фибронектин и тромбоцитарный ростовой фактор, необходимо свести к минимуму активацию тромбоцитов после взятия образца крови. Это может быть достигнуто или предотвращением образования тромбосана A_2 или поддержанием высокого уровня циклического АМФ в тромбоцитах. Смесь добавок, используемая для этой цели, состоит из 0,11 моль/л лимонной кислоты, 15 ммоль/л теофиллина, 3,7 ммоль/л аденозина и 0,198 ммоль/л дипиридамола при окончательном значении pH до 5,0. Уровни PF4 в крови, собранной с этой смесью добавок, называемой STAD, почти в 10 раз меньше, чем в крови, собранной в обычной пробирке с цитратом.

Важные аспекты клинической химии

В клинической химии следует принимать во внимание наличие проблем, связанных с реагентами или с анализаторами. Так, влияние многих факторов зависит от реагентов. Кроме того, существуют различия между анализаторами и аналитическими принципами (например, «сухая» и «мокрая» химия, прямая и непрямая потенциометрия). В этой главе рассмотрены лишь некоторые примеры.

Важные аспекты использования так называемой «сухой химии»

Когда используется анализатор, в котором реагент связан с носителем, точное дозирование проб капиллярной крови приобретает решающее значение для достоверности результатов. Производители системы глюкометров рекомендуют: «Когда образуется большая свободно-висящая капля, ее следует нанести на зону приема пробы носителя, избегая прямого соприкосновения носителя с пальцем. Для дополнительных измерений необходимо проколоть палец в другом месте».

Результаты, полученные с помощью анализатора цельной крови, могут зависеть от гематокрита пробы, так как количество плазмы, нанесенной на зону приема пробы на тестовой полоске, может варьировать в зависимости от объема массы эритроцитов.

Методология «сухой химии», с одной стороны, предоставляет возможность отделения аналита от множества других компонентов матрикса. С другой стороны, в процедурах «мокрой химии» матрикс более разведен, что приводит к понижению концентраций и аналита, и возможных факторов, вызывающих интерференцию.

Методов с депротеинизацией и без нее

Молекулы белка в сыворотке и плазме занимают определенный объем, зависящий от концентрации и размера молекул белка. Вследствие этого концентрация низкомолекулярных растворимых веществ (например, глюкозы, электролитов) в свободных от белка филтратках приблизительно на 5% выше, чем в необработанных пробах сыворотки и плазмы без депротеинизации. Влияние депротеинизации на определение низкомолекулярных веществ, растворенных в воде сыворотки или плазмы, представлено на рис. 24-1. Влияние белков на смещение объема особенно важно для определения электролитов методом прямой потенциометрии, по сравнению с непрямыми методами, а также для определения аналитов депротеинизированной цельной крови (например, глюкозы).

Рис. 24-1. Изменение концентрации низкомолекулярных веществ после депротеинизации.

Влияние липидов на смещение объема

Подобное явление смещения объема наблюдается в крови в отношении триглицеридов. При концентрации триглицеридов 5000 мг/дл (57 ммоль/л) применение метода прямой потенциометрии дает на 5% более высокие (и более правильные) результаты определения электролитов по сравнению с пламенной фотометрией или непрямой (после разведения) потенциометрией.

Глюкоза в цельной крови или в плазме

При сравнении содержания глюкозы в цельной крови и в плазме наблюдаются подобные, но более значительные различия. Поскольку в клетках крови содержание белка и липидов больше, а глюкоза неравномерно распределена между внутриклеточным и внеклеточным пространствами, результаты определения глюкозы в плазме приблизительно на 15% выше по сравнению с цельной кровью применительно к одинаковому объему. Поэтому критерии ВОЗ и Американской диабетической ассоциации для диагностики сахарного диабета по исследованию глюкозы в цельной крови и плазме различны.

Электролиты (Na⁺, K⁺, Cl⁻, HCO₃⁻)

Если во время транспортировки и хранения цельной крови концентрация глюкозы падает ниже критического значения, клетки теряют их внутриклеточный калий и замещают его на натрий. Если из пробы крови происходит выделение CO₂ клетки теряют бикарбонаты и замещают их хлоридами из окружающей плазмы (хлористый сдвиг). Это ограничивает стабильность цельной крови для анализа электролитов в плазме и сыворотке. Интересно, что прирост калия в плазме выше в охлажденных пробах крови по сравнению с пробами, хранившимися при комнатной температуре. Это объясняется торможением активности клеточной АТФазы под воздействие холода.

Рис. 24-2. Перемещение электролитов между клетками крови и плазмой/сывороткой при хранении цельной крови.

Микроэлементы

При исследовании микроэлементов значительную роль играет контаминация пробы. Поэтому кровь для этого исследования следует собирать с помощью соответствующей системы, в которой производителем заявлено отсутствие микроэлементов.

Липиды

В процессе хранения концентрация триглицеридов меняется под действием эндогенных липаз. Концентрация триглицеридов в образце падает, тогда как содержание свободного глицерина растет. Степень этих изменений варьирует от человека к человеку и не связана с первоначальной концентрацией триглицеридов. Кроме того, состав липидов плазмы определяет их поведение при центрифугировании. Хиломикроны и их остатки имеют тенденцию собираться в верхнем слое плазмы, тогда как другие липопротеины остаются равномерно распределенными. Это следует принимать во внимание, когда в анализаторе используются первичные пробирки.

Креатинин

Концентрация некреатининовых хромогенов возрастает при комнатной температуре, этот эффект более выражен в цельной крови, чем в сыворотке/плазме (чем выше температура, тем более выражено эффект). Данное повышение концентрации хромогенов – которое варьирует от человека к человеку и не зависит от первоначальной концентрации креатинина – наблюдается, когда креатинин определяют методом Jaffe.

Рекомендации:

При клинико-химическом анализе должны приниматься во внимание специфичные для метода и для анализатора факторы преаналитического этапа. Результаты, полученные с помощью одной системы, нельзя переносить на другую систему без экспериментального подтверждения. Детальная информация может быть получена от производителей реагентов и анализаторов.

Факторы преаналитического этапа иммунологических исследований

Специальные пробирки для гормонов

Взятие, хранение и транспортировка проб для проведения исследований иммунохимическими методами

Чувствительные иммунохимические методы сделали возможным измерение следовых количеств нестабильных гормонов, белков и других аналитов в крови. Поскольку при помощи иммунологических исследований определяется большое количество показателей, в данной главе основное внимание будет уделено некоторым типичным анализам.

Положение тела и время взятия пробы

При взятии пробы крови должны быть приняты во внимание такие факторы, как положение тела и суточные колебания аналитов.

Положение тела существенно влияет на ренин, повышение активности фермента наблюдается при перемещении из положения лежа в положение стоя.

Пик содержания кортизола наблюдается между 4 часами ночи и 6 часами утра. Такие гормоны, как соматотропный, лютеинизирующий и фолликулостимулирующий высвобождаются порциями, и поэтому несколько проб крови, взятых в близкие временные интервалы должны быть оценены по значению медианы.

Охлаждение и замораживание

Многие гормоны, например, инсулин, проинсулин и С-пептид могут быть стабилизированы только помещением контейнера с образцом на лед немедленно после взятия крови. Такие образцы должны быть быстро подвергнуты центрифугированию, предпочтительно в центрифуге с охлаждением при 4°C, и сыворотка должна храниться замороженной до исследования. Перед исследованием замороженные образцы конечно должны быть полностью разморожены. Также очень важно предотвратить возникновение гемолиза, поскольку при этом снижаются значения и инсулина, и проинсулина.

Проведение обработки крови сразу после ее после свертывания и замораживание сыворотки при -70°C позволяет сохранить длительную стабильность таких аналитов, как гастрин, пепсиноген-1 и инсулин.

Взятие крови с подходящим антикоагулянтом

Большинство аналитов, исследуемых с помощью иммунохимических методов, может определяться в сыворотке и/или гепаринизированной плазме.

Взятие крови с использованием ЭДТА и последующее быстрое замораживание плазмы признано адекватным способом сохранения нестабильных гормонов белковой природы: эндорфина, вазоактивного интестинального пептида, вещества P и панкреатического пептида.

В связи с ингибирующим влиянием на металлопротеиназы ЭДТА плазма рекомендует- ся также для исследований АКТГ, паратиреоидного гормона и глюкагона.

Взятие крови с ингибитором протеолитического фермента

Ингибитор протеиназы, называемый апротинин (известный также под торговым названием трасилол»), добавляемый к антикоагулянту (ЭДТА или гепарину), нашел применение для стабилизации нестабильных гормонов белковой природы и ферментов. Поскольку апротинин ингибирует калликреин, его активность выражается в калликреин ингибирующих единицах (КИЕ). Для сохранения нестабильных гормонов и ферментов используется концентрация апротинина в диапазоне от 500 до 2000 КИЕ/мл. Таким образом, смесь ЭДТА с апротинином используется для стабилизации глюкагона, АКТГ, ренина и некоторых желудочно кишечных гормонов: β-эндорфина, секретина, нейротензина, кишечного глюкагона, соматостатина и вазоактивного интестинального пептида.

В одном из исследований было показано, что уровень глюкагона, измеренный с помощью РИА в плазме с ЭДТА, был приблизительно на 26% выше, чем в плазме содержащей 1,5 мг ЭДТА и 2000 КИЕ апротинина на миллилитр крови (таблица 25-1). Высокий уровень глюкагона в пробах, собранных без апротинина, был обусловлен наличием фрагментов молекул гормона, образовавшихся в процессе расщепления под действием протеолитического фермента и распознанных антителами как целые молекулы. Кроме того, некоторые гормоны, меченые радиоактивными метками и подвергшиеся протеолитическому расщеплению, таким образом ограничивают количество радиоактивных меток, способных конкурировать с гормоном в плазме за связывающие места на антителе.

Таблица 25-1. Влияние апротинина на определение глюкагона в плазме с ЭДТА

	ЭДТА+апротинин	ЭДТА
n	21	21
Среднее пг/мл	386	518
% различия	-25.5	

Смесь литиевой соли гепарина с апротинином также использовалась для стабилизации иммунореактивного соматостатина, секретина, глюкагона, С-пептида и холецистокинин-панкреозимина.

Взятие крови со смесью антикоагулянта с добавками

В некоторых случаях использование только одного ЭДТА не достаточно для стабилизации аналита. Так, даже когда кровь собирается с ЭДТА, плазма быстро отделяется и хранится в идеальных условиях, происходит активация комплемента. Однако, добавление к ЭДТА синтетического ингибитора протеазы нафамостат мезилата значительно улучшает стабильность компонентов комплемента (C_{3a}, C_{4a} и C_{5a}). Более того, в то время как активность компонентов комплемента проб крови взятой только с ЭДТА удваивается с каждым циклом замораживания-оттаивания, то в пробах, собранных с ЭДТА и нафамостат мезилатом, такого явления не наблюдается.

Традиционные антикоагулянты – ЭДТА и гепарин – не эффективны в стабилизации таких нестабильных компонентов, как связанный с паратиреоидным гормоном протеин (PTH-RP) Этот опухолевый маркер настолько нестабилен, что после 16 часов хранения при комнатной температуре в образцах крови, собранных с гепарином или ЭДТА, от его первоначальной активности остается менее 10%. Оптимальный состав смеси для взятия крови включает ЭДТА (1,5 мг/мл крови), апротинин (500 КИЕ/мл), леупептин (2,5 мг) и пепстатин (2,5 мг). С этой смесью добавок PTH-RP стабилен до 1 часа при комнатной температуре и до 24 часов в холодильнике при 4°C.

Для определения катехоламинов в плазме кровь следует собирать со смесью антикоагулянта (EGTA, 90 мг/мл) с метабисульфитом натрия или глутатионом (60 мг/мл). Даже собранную с такой смесью кровь следует хранить на ледяной бане и центрифугировать в охлаждаемой центрифуге. Плазму затем следует перенести в пластиковый сосуд, закрыть и хранить в морозильной камере при температуре -20°C непосредственно до анализа. В замороженной плазме, приготовленной в соответствии с вышеуказанными требованиями, катехоламины сохраняются до 3 месяцев.

Важные аспекты клеточного анализа

Клетки крови могут нести важную информацию

Выделение клеток аз периферической крови для клеточного анализа

Для взятия и транспортировки проб крови пациентов, предназначенных для анализа клеток, необходимо использовать пробирки из пропилены, поскольку на стекле и полиэтилене клетки адсорбируются.

Выделение чистой популяции клеток, например, лимфоцитов, из периферической крови необходимо для проведения таких тестов, как типирование антигенов лейкоцитов человека (HLA). Если препарат клеток значительно загрязнен гранулоцитами и тромбоцитами, они могут связываться с некоторыми HLA-антителами и, таким образом, приводить к ложно отрицательным результатам.

Ложно отрицательные результаты HLA типирования могут привести к серьезным последствиям при исследовании пациента или донора трансплантата органа на HLA совместимость.

Как выделить лимфоциты

Лимфоциты можно выделить с помощью процедуры центрифугирования со смесью фиколл-гипак. Типичная смесь фиколл-гипак состоит из 10 частей 33,9% гипака с плотностью 1,2 кг/л и 24 частей 9% водного раствора фиколла. Растворы гипака и фиколла следует смешивать при комнатной температуре. Окончательная концентрация фиколла в смеси должна быть 6,4% и плотность смеси 1,077 кг/л.

По процедуре разведенная цельная кровь наслаивается на смесь фиколл-гипак и центрифугируется при комнатной температуре (20°C) в течение 40 мин. Центробежная сила, достигаемая на границе раздела, составляет 400g.

Поскольку плотность среды фиколл-гипак меньше, чем плотность эритроцитов и гранулоцитов, но больше, чем плотность мононуклеаров (лимфоцитов и моноцитов) и тромбоцитов, мононуклеары остаются на границе раздела плазма-фиколл-гипак. Последующее промывание удаляет тромбоциты от шариков лимфоцитов.

Недавние исследования описывают применение пробирок для взятия крови, содержащих в качестве антикоагулянта или гепарин или забуференный цитрат, барьер из полиэфирного геля и жидкую среду с градиентом плотности. Центрифугирование в течение 20 минут при 1500 и температуре окружающей среды приводит к изоляции мононуклеаров периферической крови над гелевым барьером и их отделению от эритроцитов и гранулоцитов, заключенных под гелем.

Влияние антикоагулянтов на выделение гранулоцитов

Гранулоциты можно выделить при центрифугировании с фиколл-гипаком и последующим удалением фракции, расположенной выше слоя фиколл-гипака.

Затем к этой фракции добавляют 0,4 мл 4,5% декстрана и 1 мл гепаринизированной плазмы. Оставшиеся эритроциты оседают при 4°C в течение 40 мин. Декстран способствует образованию «монетных столбиков» эритроцитов и благоприятствует осаждению. Таким образом, супернатант обогащается гранулоцитами. Воуит нашел, что ЭДТА обеспечивает луч-

шее выделение гранулоцитов (в среднем 59%, пределы от 43% до 71%), по сравнению с гепарином (в среднем 49%, пределы от 38% до 61%).

Относительные достоинства антикоагулянтов и нутриентов для отделения клеток и их стабильности

ACD (кислота, цитрат, декстроза), гепарин и ЭДТА – все применялись для выделения мононуклеаров. Однако, несмотря на то, применялись ли в качестве антикоагулянта ЭДТА, ACD или гепарин, было отмечено, что по истечению 14 часов после взятия пробы фракция лимфоцитов была контаминирована гранулоцитами. Контаминация эритроцитами является проблемой 2-х дневной ЭДТА крови.

Другие исследователи отмечают, что мононуклеары, выделенные из проб ЭДТА крови при помощи градиентной среды с фиколлом, подвергаются контаминации нейтрофилами, лейкоцитами и эритроцитами.

Питательная среда для разведения также влияет на качество выделения лимфоцитов с использованием смеси фиколл-гипак. Так, кровь, собранная с гепарином и с добавлением глутамина и гентамицина обеспечивает хорошее разделение клеток в градиенте фиколл-гипак при хранении крови при комнатной температуре до 3 дней.

Лизис цельной крови для применения в проточной цитометрии

Методика лизиса цельной крови для проведения иммунофенотипирования на проточном цитофлюориметре благодаря своей скорости вытесняет требующую большого расхода времени методику разделения клеток в градиенте фиколл-гипак. В свою очередь методика лизиса развивается от оригинального метода гипотонического лизиса в направлении предлагаемых в настоящее время на рынке негипотонических методов.

При исследовании влияния различных антикоагулянтов на методы лизиса и процедуру разделения клеток в градиенте фиколл-гипак было показано, что если анализ производился в тот же день, то ACD, ЭДТА и гепарин давали равноценные результаты. Однако, после 24 часов хранения происходило значительное снижение жизнеспособности гранулоцитов в пробах с ЭДТА. Более того, было отмечено, что применение K_3 -ЭДТА связано с нарушением активации лимфоцитов под влиянием митогенов. Жизнеспособность гранулоцитов была выше в пробах с гепарином. Лимфоциты сохранялись в равной степени при использовании, как гепарина, так и ACD. Хотя ACD может применяться в качестве альтернативы гепарину, при использовании ACD отмечается тенденция к агрегации тромбоцитов, особенно, если образцы не могут быть быстро проанализированы.

Если исследование лейкоцитов методом проточной цитометрии не может быть выполнено в течение 6 часов после взятия крови, то подсчет числа клеток следует провести тотчас же после взятия пробы крови с ЭДТА. Это также необходимо, если иммунофенотипирование выполняется из гепаринизированной крови (50 МЕ гепарина на мл пробы). С другой стороны, ЭДТА кровь обладает тем преимуществом, что снижает потерю зрелых клеток миелоидного ряда в результате их адсорбции на стенке пробирки и агрегацию тромбоцитов. Несмотря на некоторые недостатки, для исследования функции тромбоцитов методом проточной цитометрии рекомендуется использование цитратной крови. Применения ЭДТА и гепарина следует избегать в связи с тем, что они оказывают влияние на структуру гликопротеинов и оказывают влияние искусственную активацию тромбоцитов.

Важные аспекты молекулярной биологии

Как обращаться с генами

Полиморфизм длины рестриционных фрагментов

Для того чтобы облегчить понимание некоторых проблем преаналитического этапа, мысленно представим себе человека, чью ДНК исследуют на полиморфизм длины рестриционных фрагментов (ПДРФ) с целью обнаружения генетического дефекта или генной перестройки. Когда ДНК расщепляется рестриктазами, образуются фрагменты различной длины в зависимости от того, присутствует ли полиморфизм в месте расщепления рестриционным ферментом.

Сообщалось, что аберрантные или неожиданные рестриционные фрагменты ДНК были получены при исследовании перестройки генов Т и В клеток в пробах крови взятых с гепарином. Такие аберрантные фрагменты не были обнаружены при расщеплении ДНК рестриктазой в крови, взятой с ЭДТА или ACD. Поскольку эти аберрантные фрагменты, обнаруживаемые при использовании гепаринизированной крови, могут быть перепутаны с генными перестройками, выбор антикоагулянта при взятии крови для молекулярно-биологических исследований является критически важным.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Было обнаружено, что гепарин даже в столь низкой концентрации как 0,05 Ед на реакционную смесь может замедлять или даже полностью тормозить амплификацию ДНК при полимеразной цепной реакции. Тем не менее, обработка гепаринизированной крови гепариной с целью расщепления гепарина или отделение лейкоцитов с помощью центрифугирования с последующим по меньшей мере двукратным промыванием соленым буфером позволяет преодолеть влияние гепарина. Фактически, другие антикоагулянты (ЭДТА и ACD) также ингибируют рестриционные ферменты. Однако, стандартный метод осаждения ДНК этанолом удаляет оба эти антикоагулянта, тогда как гепарин не удаляется.

Гепарин в качестве антикоагулянта не должен применяться при молекулярно биологическом исследовании крови.

Если гепарин присутствует в пробе, предназначенной для анализа, его следует удалить до начала проведения чувствительной обратной-транскриптазной ПЦР. Это может быть достигнуто применением гепариназы или осаждением иРНК с помощью LiCl.

Эритроциты также способны ингибировать таq ДНК-полимеразу путем образования гематина.

Эритроциты могут быть удалены путем селективного лизиса буферной смесью, состоящей из 155 ммоль/л хлорида аммония, 10 ммоль/л бикарбоната калия и 0,1 ммоль/л ЭДТА при pH, доведенной до 7-4.

В другом варианте цитоплазматические мембраны всех клеток могут быть растворены с помощью буферной смеси, содержащей неионный детергент Тритон-X100, оставляющий после себя ядра лейкоцитов, из которых может быть извлечена ДНК. Однако эта методика приводит к потере внеядерной ДНК и РНК за счет их выхода в супернатант, и поэтому митохондриальная ДНК не может быть экстрагирована.

Рис. 27-4. Влияние антикоагулянта на полиморфизм длины рестриционных фрагментов:

Размышления относительно изоляции ДНК и РНК

Классические методы основаны на лизировании клеток с помощью лизоцима, щелочи или детергентов. Удаление белков и других примесей достигается путем инкубации с протеазой и/или экстракции фенолом или хлороформом.

Экстракт концентрируется за счет оса этанолом в присутствии ацетата натрия или ацетата аммония. Если необходимо, РНК можно удалить с помощью РНК-азы, свободной от ДНК-азы.

Преимущество применения протеиназы К состоит в том, что помимо высвобождения ДНК из хроматина она также разрушает нуклеазы, которые иначе уменьшили бы среднюю молекулярную массу ДНК (140). Тем не менее, протеиназа К должна быть удалена прежде, чем изолированная ДНК подвергнется обработке рестрикционным ферментом. Аналогично, Тая полимеразы может быть разрушена протеазами. Протеиназа К также может быть инактивирована путем нагревания лизата клеток или очищенной ДНК до 95°C в течение 10 мин.

Остаточный фенол может ингибировать Таq-полимеразу. Следовательно, после обработки фенолом должна быть проведена окончательная экстракция хлороформом и изоамилаколом (49:1) для удаления остатков фенола в водной фазе.

Соли, используемые для последующего осаждения ДНК, должны быть удалены путем промывания шариков ДНК 80% этанолом.

Тип детергента, применяемого для лизиса клеток, может влиять на амплификацию ДНК при ПЦР. Как правило, неионные детергенты типа Твин 20 и Тритон X-100 в концентрации менее 5% об. не ингибируют Таq-полимеразу.

Однако, ионные детергенты, такие как додецилсульфат натрия (SDS), обычно применяемые в концентрации до 2% (вес/объем), могут оказывать ингибирующее воздействие на Таq-полимеразу поскольку концентрация выше 0,01% (вес/объем) уже является ингибирующей.

Было показано, что другие ионные детергенты, такие как саркозил и дезоксихолат натрия способны ингибировать Таq-полимеразу при концентрации выше 0,02% (вес/объем) и 0,06% (вес/объем), соответственно. Поэтому важно, чтобы ионные детергенты эффективно удалялись путем экстракции фенолом/хлороформом и осаждением этанолом с последующим промыванием шариков ДНК.

Даже неионный детергент нонидет Р40 (NP40), который при концентрации 1% (об.) не оказывает влияния на фермент обратную транскриптазу, при концентрации 0,1% (об.) может ингибировать Таq-полимеразу.

Следовательно, важно предварительно экспериментальным путем установить эффективные концентрации детергентов и других известных реагентов, способных оказывать ингибирующий эффект, которые могут повлиять на амплификацию ДНК при ПЦР.

Хаотропные агенты, такие как гуанидин изотиоцианат, часто используются для экстракции ДНК или РНК. Преимущества использования 5 моль/л гуанидин изотиоцианата для изоляции РНК состоят в том, что это соединение способно не только отделить белки от РНК, но и денатурировать рибонуклеазу, которая в противном случае может разрушить РНК.

Стабилизация РНК при транспортировке, хранении и подготовке проб

На стабильность РНК оказывают влияние многие факторы. Было показано, что быстрое снижение чувствительности обратной-транскриптазной ПЦР связано с наличием в пробе РНКаз, ограничивающих срок обработки первичной пробы двумя часами. При использовании 5 моль/л гуанидин изотиоцианата стабилизация пробы за счет денатурации РНКазы достигается примерно на 1 неделю в случае хранения при комнатной температуре.

При изоляции неразрушенной РНК следует устранить контаминацию рибонуклеазой. Эти ферменты настолько стабильны при широком диапазоне pH и устойчивы даже к кипячению, что источником возможной контаминации могут стать реагенты, стеклянная посуда и даже пальцы исследователя. Стеклянная посуда должна обрабатываться 1% раствором диэтилпирикарбоната (DEPC), который является ингибитором РНКазы. Оставшийся DEPC следует, тем не менее, тщательно удалить путем автоклавирования стеклянной посуды, в результате которого DEPC разлагается на диоксид углерода и в и проведении последующей сухожаровой обработки при 250°C в течение 4 часов.

Даже стерильная пластиковая одноразовая посуда не всегда свободна от РНКазы!

В случае контаминации таких материалов, как наконечники дозаторов и пробирки, перед употреблением их следует автоклавировать.

Контроль контаминации

Обычными источниками контаминации экзогенной ДНК являются волосы и кожа людей, дверные ручки, лабораторная мебель, пыль, реагенты, термоциклер и наконечники дозаторов. Идеальным средством создания чистой беспылевой окружающей среды являются ламинарно-поточные шкафы с системой фильтрации воздуха. Обработка проб должна проводиться в отдельной комнате или зоне.

Недавно Neumaier и соавторы опубликовали рекомендации по обеспечению качества молекулярно-биологических диагностических исследований, включая аспекты преаналитического этапа.

Образцы: ПЦР анализ может быть проведен в пробах крови с ЭДТА и цитратом, высушенной крови (на фильтровальной бумаге), костного мозга, светлого слоя кровяного сгустка, мокроты, смывов из полости рта, бронхиального лаважа, спинно-мозговой жидкости, мочи, кала, биопсийного материала, культуры клеток, фиксированной или парафинированной ткани и т. д. В зависимости от исследуемого материала, перед стабилизацией может потребоваться предварительная обработка пробы, например, разжижение мокроты.

Взятие проб: взятие проб лучше всего производить в закрытые одноразовые системы, подобно взятию материала для других клинических тестов. Новые одноразовые расходные материалы из пластика должны быть свободны от нуклеаз. При использовании незакрытых систем для взятия проб следует, по меньшей мере, надевать одноразовые перчатки.

Стабилизация проб: стабилизация исследуемого материала является необходимой, поскольку нуклеиновые кислоты быстро распадаются. Это особенно важно для исследования РНК. Быстрая инактивация ДНКаз и РНКаз надежно достигается с помощью хаотропных веществ (особенно эффективны гуанидин-изотиоцианат, ГИТЦ). Параллельно можно добавить органические растворители, например, фенол. Системы для экстрагирования с включением подобных добавок доступны для приобретения. Следует учитывать ограниченную стабильность восстанавливающих веществ (в данном случае: β-меркаптоэтанола) и их влияние на стабильность пробы. Пользователь должен иметь в виду, что партии готовых к применению экстракционных растворов имеют ограниченный срок годности из-за нестабильности отдельных компонентов, например, β-меркаптоэтанола. Обогащенные клетки или чистые образцы отдельных компонентов лизируются добавлением ГИТЦ. Конечная концентрация ГИТЦ в стабилизированной пробе должна быть не ниже, чем 4 моль/л. Стабилизированный таким способом материал не должен охлаждаться. При температуре ниже комнатной может произойти кристаллизация ГИТЦ. ЭДТА кровь для экстракции ДНК из лейкоцитов не требует дополнительной стабилизации.

Транспортировка проб: должным образом стабилизированные пробы могут пересылаться почтой при комнатной температуре. Это относится также к пробам цельной крови с Трис, 1 ммоль ЭДТА для препаратов ДНК и к пробам, стабилизированным ГИТЦ, для выявления РНК. Охлаждения не требуется, но в зависимости от назначения, длительное хранение пробы при комнатной температуре приведет к критическому снижению чувствительности. Пробы должны пересылаться в небульющихся контейнерах. Нестабильные пробы должны быть немедленно заморожены и после этого могут пересылаться в сухом льду. Охлаждение должно поддерживаться непрерывно.

Хранение проб: Образцы для анализа ДНК должны храниться в 10 ммоль Трис, 1 ммоль ЭДТА, pH 7,5-8,0 при 4°C. Образцы для анализа РНК следует хранить в забуференном растворе предпочтительно при -20°C. Стабилизированные ГИТЦ пробы РНК могут храниться примерно 7 дней при комнатной температуре.

В заключение, понимание ошибок на преаналитическом этапе применительно к молекулярно биологическим методам и сведение их к минимуму или их устранение являются обязательным условием успешного применения таких методов.

Важные аспекты исследований газов крови и ионизированного кальция

Когда газы испаряются

Влиянию факторов преаналитического этапа при исследованиях газов крови, кислотно-основного состояния и электролитов недавно были посвящены рекомендации МФКХ.

Антикоагулянты

В качестве антикоагулянта при определении газов крови и электролитов в цельной крови рекомендуется гепарин. Сухой гепаринат натрия может повысить содержание натрия, снизить pH, бикарбонат и избыток оснований. В дополнение содержание ионизированного кальция снижается, если связывающие места гепарина оказываются не занятыми. Рекомендуемые конечные концентрации гепарина в крови различны для стеклянных и пластиковых пробирок.

Рекомендации по применению гепарина при анализе газов крови и электролитов

Раствор гепарина может быть добавлен в конечной концентрации 8-12 МЕ/мл в стеклянные и 4-6 МЕ/мл в пластиковые пробирки. Диапазоны конечной концентрации забуференных растворов гепарина должны быть (в ммоль/л):

Натрий: 120—150

Калий 3,3—4,5

Ионизированный кальций 1,2—1,4

Хлор 100—130

Значение pH раствора гепарина должно быть между 6 и 8.

Взятие образцов

Между артериальной и венозной кровью существуют различия в содержании газов крови и кислотно-основном состоянии, вызванные обменом веществ в соответствующей конечности или ткани. Обычно в ходе артериовенозного тока крови в результате дыхательных и метаболических компонентов происходит потребление кислорода, выделение CO₂ и снижение pH. Поэтому взятие артериальной и капиллярной крови предпочтительнее для выяснения системных показателей кислотно-основного состояния и газов крови. Если для взятия крови используется постоянный катетер или канюля, следует убедиться, что вводимые жидкости или промывающие растворы полностью удалены из системы путем выпуска троекратного объема крови по отношению к объему системы катетера перед взятием образца крови для анализа. Пробу крови следует брать анаэробно, чтобы предотвратить газообмен с окружающим воздухом. Пережатие вены жгутом не должно длиться дольше 2 минут. Следует предотвратить образование пузырьков. Места, рекомендуемые для взятия образцов крови, описаны в разделе, посвященном взятию артериальной и капиллярной крови.

Рекомендации по взятию капиллярной крови

При взятии капиллярной крови, первую каплю следует удалить и предоставить крови стекать в гепаринизированный капилляр без сдавливания области пункции. Кончик капилляра следует погрузить глубоко в каплю и наполнять капилляр безо всякого давления удерживая его горизонтально или слегка наклоненным вниз. Капилляр после наполнения следует немедленно закрыть пластмассовым колпачком и поместить в него металлический шарик для перемешивания («flea»). Противоположный конец капилляра следует затем закупорить. Кровь с гепарином перемешивают путем перемещения шарика с помощью магнита от одного конца капилляра до другого 5 раз:

Хранение и транспортировка

Образцы, предназначенные для исследования газов крови и электролитов, во время хранения могут подвергаться воздействию ряда процессов:

- **Метаболизм клеток крови:** гликолиз, преимущественно в эритроцитах, вызывает образование молочной кислоты и сдвиг pH, бикарбонатов и избытка оснований в сторону метаболического ацидоза. Поглощение кислорода лейкоцитами и тромбоцитами снижает рО₂ и повышает рСО₂. Падение рО₂ ускоряется, если рО₂ в исходной пробе было повышено. Метаболические процессы могут быть замедлены при охлаждении пробы. Если проба не может быть исследована в течение ближайших 15 минут, ее необходимо охладить.
- **Высвобождение ионов из клеток:** продолжительное хранение, вибрация при транспортировке пробы и выраженный тромбоцитоз являются факторами, которые могут привести к повышению содержания калия и снижению содержания ионизированного кальция в плазме. В течение первого часа хранения пробы в воде со льдом повышение концентрации калия в плазме составляет в среднем 0,1 ммоль/л. Ионизированный кальций может быть стабилизирован до 8 часов после отделения плазмы путем центрифугирования.
- **Газообмен:** Как указывалось выше, пластиковые материалы не являются абсолютно газонепроницаемыми. Было отмечено, что при хранении пластиковых пробирок в холодильнике наблюдалась более выраженная утечка газов через их стенки, чем при комнатной температуре. В качестве компромисса было принято, что хранение пробы в пластиковой пробирке в воде со льдом не должно превышать 30 минут. Капилляры и шприцы из стекла остаются газонепроницаемыми в течение нескольких часов.

Приготовление проб

При поступлении проб, предназначенных для исследований газов крови и кислотно-основного состояния, их необходимо осторожно перемещать перед проведением анализа. Пробы в стеклянных капиллярах должны быть перемешаны с помощью металлического шарика, перемещаемого из одного конца капилляра в другой в течение 5-10 с. Стеклянные или пластиковые шприцы следует перевернуть 10 раз и затем вращать горизонтально в течение 10 с. При перемешивании следует предотвратить образование пузырьков или мертвого пространства. Смешивание пробы особенно важно, если одновременно будет проводиться определение гемоглобина.

Важные аспекты терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ)

Выбор пробы для терапевтического лекарственного мониторинга

Благодаря высокой корреляции между концентрацией лекарственного вещества и терапевтическим эффектом, для лекарственного Мониторинга чаще всего используются кровь, плазма или сыворотка.

Кроме того, проведение лекарственного мониторинга с использованием сыворотки/плазмы удобно для предотвращения токсических эффектов лекарственных средств при их передозировке или замедлении выведения из организма (метаболизме).

В отдельных случаях в качестве образца используется моча; слюна и спинномозговая жидкость исследуются реже, хотя они в некоторых случаях могут дать лучшее представление о концентрации свободного лекарственного вещества.

Оптимальное время суток для взятия пробы

Выбор оптимального времени суток для взятия пробы зависит от типа лекарственного вещества и схемы его дозировки. (см. таблицу 29-1).

При установлении интервала между двумя измерениями, следует учесть, что для достижения в организме равновесия между поглощением и выведением лекарственного вещества необходимо примерно пять периодов его полувыведения, т.е. для определения дозировки

следует выждать, по крайней мере, один такой интервал прежде, чем проводить измерение концентрации лекарственного препарата.

В таблице 29-1 приведены данные о максимальной концентрации лекарственных препаратов в крови, т.е. время, в которое необходимо взять образец для исследования. Минимальные концентрации наблюдаются перед принятием очередной дозы лекарственного препарата.

Таблица 29-1: Правила взятия проб крови для терапевтического лекарственного мониторинга

Время, в которое должна быть взята проба крови	
Длительное лечение	В основном в любое время суток после достижения постоянной концентрации препарата в крови (после примерно 5 периодов полувыведения).
Внутривенное введение	Следует выждать до завершения фазы распределения (примерно 1-2 часа после окончания инфузии). Исключения: Дигоксин 6-8 часов Дигитоксин 6-8 часов

Относительно дальнейших деталей – смотрите документ Национального комитета клинических лабораторных стандартов по терапевтическому лекарственному мониторингу.

Важные аспекты терапевтического лекарственного мониторинга

Кровь не следует брать из той руки, в которую вводили лекарственный препарат или трансфузионную жидкость.

В качестве антикоагулянтов могут быть использованы гепарин, ЭДТА или оксалат калия. Однако, гепарин вызывает изменение связывания белков с некоторыми лекарственными веществами. ЭДТА является оптимальным антикоагулянтом и лучше всего подходит при определении концентрации трициклических антидепрессантов, т.к. препятствует окислению этих препаратов благодаря своей способности связывать двухвалентные катионы.

Для определения концентрации циклоспорина образцы гемолизированной крови предпочтительнее, чем образцы сыворотки или плазмы, потому что на взаимодействие циклоспорина с кровью/плазмой влияет множество факторов (температура, гематокрит, концентрация липопротеинов). В качестве антикоагулянта также рекомендуется ЭДТА.

На некоторые иммунологические исследования лекарственных препаратов могут влиять неспецифические перекрестные реакции с эндогенными факторами интерференции. Так, дигоксико-подобные вещества (стероиды, липиды) могут влиять на определение дигоксина, приводя к ложному завышению результатов.

Взятие образцов мочи необходимо проводить, по крайней мере, после 7-10 периодов полувыведения лекарственных препаратов. В этом случае в образце будет содержаться более 99% лекарственных препаратов.

Образцы слюны берутся в то же время суток, что и кровь. Перед взятием образца следует тщательно прополоскать ротовую полость водой. Во взятой слюне не должно содержаться остатков пищи и принятого перорально лекарственного препарата.

Хранение и транспортировка образцов

Во избежание возможной контаминации для сбора образцов следует использовать одноразовые контейнеры. На результаты исследования могут влиять некоторые, выделяющиеся из стенок пластиковых шприцев или резиновых пробок стеклянных контейнеров.

Для получения достоверных результатов образцы следует отправлять в лабораторию как можно скорее после взятия. Во избежание гемолиза и деструкции анализов следует направлять для анализа только плазму, сыворотку, мочу или спинномозговую жидкость. Было показано, например, что нитразепам, хлоразепам и кокаин в пробах крови распадаются во время хранения при температуре 4°C.

При мониторинге циклоспорина А, который быстро поступает в эритроциты после взятия крови и ее охлаждения от температуры тела (37°C) до комнатной температуры (20°C), лучшим образцом для исследования является цельная кровь. Предпочтительный антикоагулянт в данном случае – ЭДТА.

Отношение содержания циклоспорина G в плазме к содержанию его в крови составляет 0,8, тогда как для циклоспорина А этот показатель составляет 0,6 (при условии отделения плазмы при комнатной температуре).

Стабильность образцов в зависимости от температуры

Данные о стабильности образцов для терапевтического лекарственного мониторинга приведены в «Перечне анализов» (см. Приложение). Рекомендуется строго следовать инструкциям производителей наборов реактивов. Замораживание крови для определения циклоспоринов должно быть категорически исключено. Образцы для определения флюороурацила необходимо собирать, поместив контейнер на лед, т.к. флюороурацил нестабилен при комнатной температуре. Замороженные пробы предпочтительно размораживать при комнатной температуре. Слишком быстрое размораживание путем нагревания пробы может вызвать перегрев и разрушение исследуемого лекарственного вещества. Очень важно перед проведением анализа тщательно перемешивать пробы для обеспечения их гомогенности.

Таблица 29-2: Терапевтический лекарственный мониторинг: Фармакокинетические свойства с рекомендациями по взятию проб. Данные по взрослым.

Лекарственный препарат	Время достижения максимальной концентрации	Время достижения постоянной концентрации	Период полувыведения	Связывание с белком	Рекомендуемое время взятия образцов
АНТИАРИТМИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА					
Амиодарон	3-7 ч (внутри) 15 мин (в/в)		4 ч-25 сут (однократная доза в/в) 7-80 ч (внутри) в период постоянной концентрации: 20-100 сут.	>90%	
Хинидин	1-3ч	2сут	6-7 ч	80-90%	Не позднее чем через 8 ч после введения препарата с постоянной экскрецией
Дизопирамид	2-3 ч	1-2 сут	4-9 ч	10-65%	Связывание с белком лекарственного препарата зависит от его концентрации
Лидокаин	В конце введения начальной дозы	30-90 мин	70-200 мин	60-70%	Во время инфузии; связывание с белком зависит от концентрации. Образуется активный метаболит.
Прокаинамид/ N-ацетилпрокаинамид	1-4ч(внутри) 15-30 мин (в/в)	15-25ч	3-5ч 6-10 ч	Примерно 15%	Немедленно после приема последней дозы внутри; пероральная абсорбция крайне вариабельна.

АНТИБИОТИКИ					
гентамицин Тобрамицин Нетилмицин Амикацин	Через 1 ч после в/м введения; через 30 мин после в/в	<30 лет: 2,5-15 ч >30 лет: 7,5-75 ч	1,5-6 ч 0,5-3,0 ч 2-3 ч 1,5-15 ч	<10 %	Через 1 ч, после введения. Минимальный уровень - непосредственно перед последующей инъекцией
Ванкомицин	30 мин	20-30 ч	4-10 ч	30-55%	Пик через 30 мин после введения
Стрептомицин	1-2 ч	10-15 ч	2-3 ч	30%	Пик через 1-2 ч после в/м введения
ПРОТИВОСУДОРОЖНЫЕ СРЕДСТВА					
Карбамазелин	6-18 ч	2-6 сут	10-25 ч	65-80%	В интервале между приемами препарата; точное время взятия образца не существенно.
Клоназепан	1-2 ч		20-60 ч	83-87%	
Этосуксммид	2-4 ч	7-14 ч	10-60 ч	0%	
Фенобарбитал	6-18 ч	10-25 сут	50-120 ч	50%	Точное время взятия образца не существенно
фенитоин	15-30 ч	8-50 сут	25-200ч	92%	В интервале между приемами препарата; точное время взятия образца не существенно.
Препараты фенитоина постоянного выведения		3-9 ч			
Примидон	0,5-7 ч	2-4 сут	6-8 ч	35%	
Фенобарбитал		10-25 сут	48-120 ч		То же
Вальпроевая кислота	2-8 ч	2-3 сут	8-15 ч	90%	
БРОНХОСПАЗМОЛИТИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА					
Лекарственный	1-4 ч	2 сут	3-12 ч	55-65%	Примерно через 4 ч для препаратов с постоянной экскрецией
СЕРДЕЧНЫЕ ГЛИКОЗИДЫ					
Дигитоксин	3-6ч	30 сут	6-8 сут	90-97%	8-24 ч после приема
Дигоксин	60-90 мин	6-7 сут	40 ч	20-40%	8-24 ч после приема
ИММУНОДЕПРЕССАНТЫ					
Циклоспорин А	2-6 ч	Около 2 сут	10-27 ч	90%	Непосредственно перед приемом следующей дозы

Такролимус	1-2 ч	3 сут.	6 ч	99%	Использовать цельную кровь с ЭДТА
ПСИХОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА					
Амитриптилин	2-6 ч	3-8 сут	11-40 ч	90%	Не существенно
Дезипрамин	2-6 ч	2-11 сут	12-54 ч	75-90%	В период постоянной концентрации, но перед приемом очередной дозы.
Имипрамин	1-6 ч	2-5 сут	9-24 ч	63-95%	
Нортриптилин	2-6 ч	4-20 сут	18-58 ч	81-93%	
Литий	1-3 ч	3-7 сут	14-33 ч	0%	через 12 ч после последнего введения
ЦИТОСТАТИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА					
Метотрексат	1-2 ч	12-24 сут	2-4 ч	50-60%	Индивидуально для каждого пациента

* У новорожденного биологический период полувыведения составляет около 8 часов.

Важные аспекты микробиологии

Бактерии и вирусы

Диагностическая значимость микробиологических тестов подвержена влиянию многих факторов преаналитического этапа. Важнейшие из них:

- Точность поставленного диагноза
- Место взятия образца
- Корректность способа и времени взятия образца
- Соответствующие системы для транспортировки
- Наименьшая продолжительность транспортировки
- Правильные условия хранения образцов перед исследованием

Виды контейнеров для сбора и транспортировки образцов, предназначенных для микробиологических исследований, и требования к таким контейнерам представлены в таблице 30-1.

Даже наиболее совершенная транспортная система не может служить заменой быстрой транспортировке и немедленному исследованию образца.

Таблица 30-1: Требования к контейнерам для транспортировки микробиологических образцов.

1. Стерильность
2. Устойчивость к коррозии
3. Достаточные размеры
4. Прочность закупоривания
5. Небьющийся контейнер
6. Наличие транспортной среды без стимуляторов роста или питательной среды для определенных микроорганизмов.

Бактерии

При сборе образцов для бактериологических исследований особое внимание должно быть уделено предотвращению контаминации. Перед аспирацией кожу следует тщательно продезинфицировать. Если возможно, образцы гнойного материала лучше забирать путем аспирации через кожу, т.к. ее легче дезинфицировать, чем слизистые оболочки. Жидкий материал удобнее подвергать микробиологическому исследованию, чем образцы на тампонах. Аспираты доставляют в лабораторию в шприце, предварительно удалив иглу и прочно закупорив канюлю. При взятии образца с открытой раны следует предварительно удалить поверхностный секрет, который содержит вторичные микроорганизмы. Затем с краев раны тампоном собирают образец для исследования. Тампон с образцом следует предохранять от высыхания во время транспортировки. Для этого тампон помещают в жидкий бульон или транспортную среду. При небольшом количестве микроорганизмов объем пробы должен быть максимально возможным. Образцы для гемокультивирования. Лучше собирать в период повышения температуры тела. При подозрении на септический эндокардит следует брать не менее десяти образцов для гемокультивирования.

Быстрая транспортировка и различный температурный режим при транспортировке и хранении важны по нескольким причинам. Охлаждение и изменение pH образца и воздействие кислорода снижает выживаемость многих организмов, таких, как менингококки, гонококки, пневмококки, холерный вибрион, анаэробные организмы, Haemophilus, Bordetella, Salmonella, Shigella, Helicobacter pylori. В то время как в процессе транспортировки жизнеспособность этих чувствительных к окружающей среде микроорганизмов снижается, при слишком длительной транспортировке начинают размножаться другие микроорганизмы. Это затрудняет количественную оценку культуры (мочи). Искомый организм могут «заглушить» другие организмы. Поэтому доставка в лабораторию любого образца, предназначенного для микробиологического исследования, должна длиться не более двух часов после сбора материала. Требования к транспортировке и хранению бактериологических проб приведены в табл. 30-2. Если соблюдение этих условий не может быть обеспечено, рекомендуется инокуляция во флакон с питательной средой или, например, для проб мочи, использование погружных слайдов.

Таблица 30-2. Условия транспортировки и хранения различных образцов для бактериологических исследований.

Образец	Транспортировка	Температура хранения
Кровь	Флакон для гемокультивирования	Комнатная температура или 37°C
Гнойный материал Спинальная жидкость Плевральная, перикардиальная, перитонеальная, синовиальная жидкость Секреты носовых пазух	Быстрая транспортировка: оставить образец в шприце (закупоренном) в анаэробных условиях. Отсроченная транспортировка: использовать транспортную среду	Комнатная температура, не инкубировать, защищать от охлаждения
Бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) Мокрота, другие секреты Кал	Быстрая транспортировка (2-3 час)	Охлаждать
Моча	Погружные слайды	Комнатная температура или 37°C
Тампон с образцом из: Глаз Ушей Рта Гортани Носа Уретры Шейки матки Прямой кишки	Тампон в транспортной среде (время транспортировки >4 час)	Комнатная температура не инкубировать

Раневой поверхности		
Биопсийный материал	Быстрая транспортировка в стерильном изотоническом (физиологическом) растворе	Охлаждать

Грибы

Взятие образцов для микологических исследований производят путем соскобов с зон активного поражения кожи, выполняемых с помощью скальпеля после тщательной дезинфекции участка кожи. Кожу, волосы (взятые с помощью эпиляционной пипетки или остриженные в случае отложений на волосах) и срезы ногтей отсылают лабораторию сухими в стерильных контейнерах. Соскобы с нижней части ногтей используют для культивирования. При определении дрожжей в моче случайный образец мочи немедленно отсылают в лабораторию в стерильном контейнере. Так же поступают при определении дрожжей или грибов в образцах мокроты, для чего предпочтительнее использовать утренний образец мокроты. Образцы тканей для микологических исследований, подобно бактериологическим образцам, пересылают в лабораторию настолько быстро, насколько это возможно, помещенными в изотонический раствор. При микологических исследованиях влагалища, верхних дыхательных путей или кала рекомендуется брать образец на два тампона и поместить их в стерильный контейнер. Микологические образцы можно транспортировать на близкие расстояния при комнатной температуре.

При транспортировке на дальние расстояния рекомендуется охлаждение образцов (для образцов на тампонах это не обязательно) чтобы предотвратить подавление бактериями медленно растущих грибов. При подозрении на заражение фикомицетами (например, Mucor) необходима быстрая транспортировка образца без охлаждения.

Таблица 30-3: Сбор, обработка и транспортировка образцов для паразитологических исследований (H) – немедленное исследование.

Исследуемый материал	Тип образца и условия транспортировки	Паразиты (прямая и непрямая детекция)
Сам паразит или его компоненты	Изотон. р-р NaCl (эндопаразиты) 70% спирт (эктопаразиты)	Например, Ascaris, proglottides Например, fleas, lice
Кал (отсроченное исследование)	Пробирка для кала Для окраски Lawless фиксировать в сублимате спирт (спирт/HgCl ₂)	Яйца или личинки кишечных трематод, легочных трематод, печеночных трематод. Цисты простейших: амеб, жгутиков, ресничных, кокцидий, микроспоридий. Vegetативные формы простейших (особенно амебы, Gardia)
Кал (немедленное исследование)	При комнатной температуре для прямого исследования (H)	Vegetативные формы простейших (особенно амебы, Gardia)
Дуоденальная жидкость	При комнатной температуре для прямого исследования (H)	Vegetативные формы Gardia
Моча	Суточная моча	Schistosoma heamatobium
Кровь	Тонкий мазок, толстый мазок, гепаринизированная кровь	Плазмодии, трипаносомы, микрофиллярии
Костный мозг	Мазок, стерильный костный мозг	Лейшмания
Мокрота	Пробирка для мокроты	Яйца Paragonimus, личинки кишечных нематод, в некоторых случаях Echinococcus hooklets

Кожа	Срезы кожи в изотоническом NaCl (Н) Стерильные биоптаты кожи	Onchocerca (микрофиллярия) Лейшмания
Обнаружение яиц или взрослых особей на коже перианальных складок	Липкая лента	Острицы

Паразиты

При диагностике паразитарных инфекций исследуют образцы крови (плазмодии, трипаносомы, лейшмании, микрофиллярии, Loa loa (р. Нематоды), кал (Gardia, ресничные, гельминты, цестоды), образцы тканей пораженных органов (Trichinella spiralis larvae, Echinococcus) или сами паразиты (членистоногие: клещи, насекомые). При исследованиях кала следует учитывать нестабильность вегетативных форм паразитов. Эти формы можно обнаружить только в свежих образцах кала при температуре тела хозяина. Цисты стабильны, для концентрирования паразитов и их сохранения в образцах кала обычно применяют растворы. MIF (мертиолят-йод-формалин) и SAF (ацетат натрия-формалин). В отношении большинства образцов транспортировка не влияет на результаты исследования и специальные условия транспортировки не обязательны.

Охлаждение образцов применяется редко, если вообще оно необходимо. Членистоногих пересылают в лабораторию в 70% спирте. В табл. 30-3 приведен краткий перечень факторов преаналитического этапа, имеющих значение при паразитологических исследованиях.

При направлении образца на паразитологическое исследование необходимо подробное описание путешествия, после которого возникли симптомы болезни (место, время и продолжительность пребывания), и информация о начальных симптомах лечения и о том, был ли у пациента подавлен иммунитет. Назначение «тест на паразиты» неприемлемо.

Таблица 30-4. Случаи, в которых образец может исследоваться только после консультации с врачом, направившим образец для исследования.

1. Отсутствие метки, идентификации
2. Слишком длительный срок транспортировки
3. Несоответствующий или поврежденный контейнер
4. Несоответствующий образец
5. Направление одного и того же образца материала с одним и тем же вопросом или назначением в течение 24 часов (за исключением проб крови)

Вирусы

При выделении и идентификации вирусов решающее значение имеет время взятия образца. Обычно материал собирают немедленно после появления симптомов заболевания (если возможно – в первые три дня). Как общее правило, образцы должны быть доставлены в лабораторию быстро, при температуре 4°C в отдельном контейнере. В этих условиях вирусы обычно остаются стабильными в течение 2-3 дней. Для анализа используют образцы на тампонах (нос, горло, глаза), смывы из глотки, везикулярную жидкость при кожных поражениях, кал, мочу и спинномозговую жидкость.

Образцы для микробиологических исследований, которые не отвечают определенным стандартам (см. табл. 30-4) исследованию не подлежат или могут быть проанализированы только после консультации с врачом, направившим образец для исследования.

Влияние липемии

Можно ли использовать мутные пробы?

Рис. 31-1. Пробы с различной степенью мутности.

Липемическая проба

Пробы плазмы и сыворотки иногда бывают мутными в той или иной степени вследствие повышенного содержания липопротеинов (рис. 31-1). Почти во всех случаях мутность вызвана повышенной концентрацией триглицеридов. Мутность может быть легкой, (часто называемой опалесцирующей), полупрозрачной, густой или молочно-белой. Степень мутности зависит не только от количества триглицеридов, но также в большей степени от присутствия макромолекулярных частиц липопротеинов. Поэтому мутные пробы называют липемическими.

Диагностическое значение мутности

Поскольку нормальные пробы не обладают мутностью, за исключением взятых после приема жирной пищи, мутность пробы всегда клинически значима и должна быть оценена, документирована и отмечена в бланке лабораторного результата. Она может указывать на гипертриглицеридемию, вызванную повышением содержания хиломикрон, липопротеинов очень низкой плотности (ЛОНП) или тех, и других. Как описано в руководствах, эти формы можно дифференцировать, наблюдая флотацию липопротеинов при центрифугировании и хранении пробы. Отчетливый сливкообразный слой, плавающий над прозрачным слоем после центрифугирования и хранения свыше 12 часов в холодильнике, указывает на наличие хиломикрон. Наоборот, более гомогенная мутность в большинстве случаев вызвана присутствием в повышенной концентрации ЛОНП.

Концентрация триглицеридов, приводящая к появлению мутности, зависит от состава липопротеинов. Хиломикроны, благодаря их размеру, преломляют свет в определенном диапазоне даже при концентрации триглицеридов ниже 300 мг/дл (3,4 ммоль/л). Однако, липопротеины промежуточной и низкой плотности могут оставаться невидимыми даже при концентрации триглицеридов 800 мг/дл или выше. Различной степени мутность наблюдается при наличии ЛОНП в зависимости от их размера и состава.

Значение мутности как фактора интерференции

Поскольку степень гиперлипидемии имеет диагностическое значение, при определении липидов и других компонентов крови интерференция липопротеинов должна рассматриваться как искажающий фактор, влияния которого следует, насколько это возможно, избегать.

Механизмы интерференции

Причинами ошибочно заниженных или завышенных результатов лабораторных исследований могут быть следующие механизмы:

- **Негомогенность:** Богатые триглицеридами липопротеины флотируют при центрифугировании и хранении сыворотки/плазмы. В случае проведения анализа после такой обработки (центрифугирования) без тщательного перемешивания триглицериды и другие компоненты могут оказаться неравномерно распределенными в пробе. Это может вызвать непропорционально высокую концентрацию липидов в верхнем слое и помешать точному определению других аналитов, например общего белка. С другой стороны, липиды могут вытеснить воду в верхней фазе пробы, чтобы приведет к мнимой низкой концентрации водорастворимых компонентов, таких как, электролиты и метаболиты.
- **Вытеснение воды** также является причиной более высокой концентрации натрия и калия, определяемой при прямом измерении с помощью ионо-чувствительных электродов по сравнению с пламенной фотометрией. В исключительных случаях липиды могут вытеснить до 10% объема воды в пробе сыворотки/плазмы.
- **Интерференция за счет мутности:** Фотометрические процедуры чувствительны к мутности практически на всех длинах волн. Это ведет к различной степени поглощения света.

- **Интерференция за счет физико-химических механизмов:** Липопротеины в пробе могут включать липофильные компоненты, тем самым снижая их доступность для антител. Таким же образом липопротеины могут исказить результаты электрофоретических и хроматографических процедур.

"Диагностика" и "лечение" интерференции, вызванной мутностью

Явная мутность может быть легко замечена невооруженным глазом. В другом случае, мутность в каждой пробе может быть измерена в автоматическом анализаторе, с применением специфической длины волны (660-700 нм). Степень интерференции применительно к каждому методу может быть количественно оценена путем различных количеств материала пробы пациента с гиперлипемией к прозрачной пробе последующим определением концентрации в каждой пробе отдельно. Когда известно, что на исследование оказывают влияние любые из приведенных выше механизмов, следует удалить триглицериды из пробы, что возможно сделать либо с помощью ультрацентрифугирования, либо осаждения, и повторить анализ, используя осветленную пробу.

Следует иметь в виду, что процедура осветления пробы сама может быть источником интерференции.

В некоторых случаях изменение методологии может быть полезно для устранения интерференции, вызванной липидами. Так, измерение на второй длине волны может компенсировать мутность. В качестве альтернативы, измерение бланка может быть выполнено без добавления соответствующего реактива, но при соблюдении всех прочих условий анализа. В каждом случае сведения о степени и типе мутности должны быть документированы и включены в отчет лаборатории, а аликвота необработанной пробы должна быть сохранена для последующего исследования с целью подтверждения полученных результатов.

Процедуры обработки липемических проб должны быть приведены в "Руководстве по качеству" в каждой лаборатории. Производители наборов реактивов должны указывать в инструкциях к своей продукции о проведенных исследованиях интерференции липемических проб и приводить соответствующую информацию.

Ошибки, связанные с эндогенными антителами

Холодовые агглютинины

Значением антител как факторов интерференции в клинической химии часто пренебрегают, поскольку определение этого фактора затруднительно в условиях повседневной рутинной работы.

Влияние антител может сказаться на аналитических процедурах в клинической химии, гематологии и иммуногематологии. Антитела могут оказывать влияние на подсчет числа эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов. При высоком титре холодных агглютининов, направленном против эритроцитов происходит агглютинация. Такая агглютинация нарушает электронный подсчет клеток следующим образом: определяется низкое общее число эритроцитов при нормальной концентрации гемоглобина; значительно повышенный показатель MCV и низкое расчетное значение гематокрита, что приводит к высоким значениям MCH и MCHC. Число лейкоцитов и тромбоцитов ложно повышено, поскольку агглютинаты в зависимости от их размера подсчитываются либо в канале для лейкоцитов, либо в канале для тромбоцитов. В мазке крови определяется агглютинация эритроцитов. Процедуры определения групп крови и перекрестной совместимости могут испытывать влияние холодных агглютининов двояко. Во-первых, панагглютинация, вызванная антителами, может повлиять на правильную трактовку антигенов групп крови и процедуры перекрестной совместимости. Во-вторых, холодные агглютинины могут маскировать другие виды антител, которые способны повлиять на аналитические процедуры различным образом.

Криоглобулины

Криоглобулины кристаллизуются в пробах, сохраняемых при комнатной температуре. Образующиеся частицы имеют разнообразную форму и могут имитировать лейкоциты, приводя таким образом к ложному завышению результатов подсчета числа лейкоцитов (рис. 32-2). Более того, высокая концентрация криоглобулинов может повлиять на результаты подсчета эритроцитов, определения гемоглобина (явление флоккуляции) и подсчета тромбоцитов (псевдотромбоцитоз). В мазке крови видны хлопьевидные кристаллы синего цвета, при этом общее число лейкоцитов не повышено. Явление псевдолейкоцитоза зависит от длительности контакта, температуры, концентрации криоглобулинов и взаимодействия криоглобулинов с другими белками плазмы. Это сказывается при всех определениях числа клеток, основанных на методе подсчета частиц.

ЭДТА-зависимые антитела

Вызванное антителами ложное понижение результатов подсчета тромбоцитов (без геморрагического диатеза) может быть связано с холодowymi агглютиниными или антителами, активизирующимися в присутствии ЭДТА.

В обоих случаях агглютинация требует некоторого времени. Поэтому, продолжительная отсрочка между взятием пробы и подсчетом тромбоцитов приводит к более выраженной псевдотромбоцитопении. Поскольку в мембранах тромбоцитах у пациентов с тромбастенией отсутствуют гликопротеины IIb и IIIa, такие тромбоциты не реагируют с ЭДТА зависимыми антителами. Данное наблюдение позволяет предполагать, что эти гликопротеины активно участвуют в связывании антител. В зависимости от их формы и размера агрегаты тромбоцитов могут быть подсчитаны как лейкоциты. В дополнение к тромбоцитопении, может наблюдаться завышение результатов подсчета лейкоцитов. Обнаружение в лейкоцитарной гистограмме частиц, размером соответствующим лимфоцитам, свидетельствует об ошибочном подсчете числа лейкоцитов. Окрашивание периферической крови позволяет обнаружить агрегаты тромбоцитов. Другими причинами ложного снижения числа тромбоцитов являются прилипание тромбоцитов к лейкоцитам (сателлитизм тромбоцитов), гигантские тромбоциты, или проведение анализа частично свернувшейся пробы крови, взятой с нарушением правил.

"Макроферменты"

Возможность образования комплексов с иммуноглобулинами (макроферменты) была показана для всех диагностически значимых ферментов. Вследствие этого явления увеличивается биологический период полураспада таких ферментов. Увеличение периода полураспада может, в свою очередь, привести к усилению активности ферментов, что может повлечь за собой проведение дальнейших диагностических мероприятий. Появление макроферментов первоначально было обнаружено у пожилых пациентов с хроническими заболеваниями. Хорошо описанными примерами являются макрокреатинкиназы I и II типов. МакроКК типа I является комплексом иммуноглобулина с КК-BB. Тип II представляет собой полимеры митохондриальной КК, которые могут быть обнаружены с помощью электрофореза. Оба типа макроКК могут оказывать влияние на точность количественного определения КК-MB посредством ингибирующих КК-MB антител, что приводит к ложному повышению значения активности КК-MB. Другим примером является макроамилаза, для которой характерно повышение активности амилазы в сыворотке при неизменной экскреции с мочой.

Аутоантитела

На результаты иммунологических исследований могут оказывать влияние аутоантитела и гетерофильные антитела. Хорошо описанными примерами являются аутоантитела к трийодтиронину и тироксину. Очевидно, концентрации тиреоидных гормонов завышаются вследствие того, что метка связывается не только с рецептором антитела, добавленного к пробе, но и с аутоантителом.

Антифосфолипидные антитела в плазме приводят к повышению результатов определения активированного частичного протромбинового времени, поскольку антитела связывают фосфолипиды, используемые в качестве реагентов при этом анализе.

Гетерофильные антитела

Гетерофильные антитела определяются в некоторых пробах сыворотки человека, механизм их образования неизвестен. В некоторых случаях интерференция вызванная гетерофильными антителами, может иметь диагностическое значение. В случае если гетерофильные антитела имеют антимишиную специфичность, может возникнуть интерференция при использовании в иммунологическом исследовании иммунных антител мыши (мышинных моноклональных антител). В литературе представлено несколько сообщений, описывающих ошибочные лечебные мероприятия, ставшие следствием аналитических ошибок, вызванных такими антителами. В этом случае причиной интерференции были моноклональные антитела. Однако, антитела были описаны как вызывающие интерференцию. Только при последнем условии они могут быть классифицированы как гетерофильные в узком смысле слова.

Влияния гемолиза

Проба сыворотки выглядит красноватой

Отсутствие красной окраски, однако, не всегда исключает наличие гемолиза, поскольку гемоглобин видим невооруженным глазом только при достижении им уровня примерно 300 мг/л или выше.

Рис. 33-1. Пробы плазмы с различной степенью гемолиза.

Рис. 33-2. Изменения различных аналитов с усилением гемолиза при определении с помощью рутинного анализатора на двух длинах волн.

Кровь состоит из клеток и плазмы. Многие компоненты, определяемые в плазме, содержатся в довольно высокой концентрации в клетках крови. Поэтому для получения достоверных результатов следует предотвратить возникновение гемолиза.

Что такое гемолиз?

Гемолиз определен как «высвобождение компонентов клеток крови в плазму/сыворотку. Наличие гемолиза обычно распознают по появлению более или менее выраженного красноватого окрашивания плазмы/сыворотки после центрифугирования (рис. 33-1), связанного с высвобождением гемоглобина из эритроцитов. По существу интерференция может возникнуть даже при низких концентрациях гемоглобина, неразличимых невооруженным глазом.

Гемолиз не всегда сопровождается высвобождением гемоглобина (например, если кровь хранится при низкой температуре, но не в замороженном состоянии). Источники интерференции также могут возникать при лизисе как тромбоцитов, так и гранулоцитов.

Механизмы интерференции

Влияния гемолиза могут быть классифицированы соответственно следующим механизмам:

- *Повышение содержания внутриклеточных компонентов во внеклеточной жидкости.* Выход внутриклеточных компонентов может возникать как *in vivo*, в процессе взятия крови, так и на всех стадиях преаналитического этапа. Соответственно, гемолиз может быть диагностически важным наблюдением, будучи определенным как фактор влияния *in vitro* в случае его возникновения при взятии пробы или на других стадиях преаналитического этапа, поскольку он приводит к изменению состава пробы.
- *Оптическая интерференция* может быть вызвана цветом гемоглобина, который может меняться в процессе хранения пробы благодаря преобразованию гемоглобина. Направление и степень интерференции различаются не только в зависимости от длины (длин) волн, но и от типа бланка и используемых реагентов. Недавно для использования в терапевтических целях были представлены искусственные переносчики кислорода, имеющие в основе структуру гемоглобина (HbOC). Их применение в концентрации до 50 г гемоглобина на литр вызывает оптическую интерференцию, практически неотличимую от вызванной натуральным гемоглобином.

- *Влияние внутриклеточных компонентов на механизм реакции проводимого исследования (химическая, биохимическая, иммунологическая интерференция).* В этом случае наблюдается метод зависимая интерференция, которая не связана с оптической интерференцией гемоглобина. Так, высвобождающаяся из клеток крови аденилаткиназа оказывает влияние на большинство стандартных методов определения активности креатинкиназы, при этом интерференция зависит от концентрации ингибиторов аденилаткиназы, добавленных к реакционной смеси.

Как "диагностировать", предупредить и "лечить" интерференцию, вызванную гемолизом

Явный гемолиз легко устанавливается при визуальном контроле пробы перед анализом. Гемолиз *in vivo* и *in vitro* может быть дифференцирован путем сравнения различных проб от одного и того же пациента и путем исследования чувствительных маркеров гемолиза *in vivo*, например, гаптоглобина, и анализа клинической информации. При любом подозрении на гемолиз *in vivo* консультация клинициста является обоснованной. Кроме того, любое неожиданное повышение содержания "чувствительных" аналитов следует рассматривать как вызванное гемолизом *in vitro*, до тех пор, пока его вероятность не будет исключена. В этом случае наблюдается параллельное повышение содержания свободного гемоглобина, калия и активности лактатдегидрогеназы.

В случае подтверждения гемолиза и ожидаемой интерференции, результаты, полученные при исследовании гемолизированной пробы, не должны учитываться (или проба не должна подвергаться исследованию). Если новая проба не может быть получена, клиницист должен получить информацию относительно возможной степени искажения результатов анализа. Корректировочная формула, предложенная Saigawa, может быть применена только в том случае, если гемолиз *in vitro* с параллельным выделением всех компонентов мог быть установлен. Оценка возможных причин гемолиза безусловно поможет предотвратить его влияние.

Гемолиз *in vitro* можно предупредить путем стандартизации преаналитического этапа. Использование стандартных игл, закрытых пробирок и калиброванных центрифуг существенно помогает уменьшить гемолиз. Использование плазмы вместо сыворотки также позволяет свести к минимуму возникновение гемолиза, особенно за счет предотвращения высвобождения клеточных компонентов из тромбоцитов. На рис. 13- 2 показана зависимость различных концентраций калия в сыворотке и плазме от числа тромбоцитов.

Лаборатория должна быть осведомлена о влиянии гемолиза на специфические тесты. Пользователю следует ожидать, что новые реагенты и тест-системы будут протестированы производителем в отношении влияния гемолиза и что соответствующая информация будет приведена в инструкции по использованию данной продукции.

В "Руководстве по качеству" каждой лаборатории должны содержаться документы относительно работы с гемолизированными пробями. Лаборатория может нести ответственность за диагностическую достоверность результатов исследований только при условии, если приняты строгие меры для предупреждения неправильной интерпретации результатов, обусловленных гемолизом.

Механизмы и устранение лекарственной интерференции

Механизмы интерференции лекарственных веществ

Влияние лекарственных веществ на лабораторные исследования настолько широко распространено из-за многочисленности как лекарственных веществ, так и лабораторных тестов, что наилучшим источником доступной информации об этом может служить электронный справочник. Однако, в основном, лекарственная интерференция может быть подразделена на биологическую и химическую. Фармакологический эффект возникает в результате метаболизма лекарственного вещества в организме и последующего влияния метаболита на результаты лабораторных исследований. Например, в то время как исходное вещество пропранолол не оказывает влияния на результаты определения билирубина ни методом Jendrassik-Grof,

ни методом Evelyn Malloy, его метаболит 4-гидроксипропранолол влияет на оба указанных выше метода определения билирубина.

Другой фармакологический эффект связан со способностью лекарственного вещества повышать уровень связывающих белков. Это может приводить к повышению уровня аналитов, связанных с такими белками. Например, оральные контрацептивы повышают концентрацию в плазме тироксин-связывающего глобулина, церулоплазмينا, трансферрина и транскортина, что вызывает повышение уровня связанных с этими белками аналитов (тироксина, меди, железа и кортизола).

Лекарственная интерференция, классифицируемая как техническая, с другой стороны связана с интерференцией *in vitro*, которая может иметь химический или физический механизм, подобно гемолизированным или иктеричным пробам. В таблице 34-1 приведены некоторые другие виды воздействия наиболее распространенных лекарственных веществ на результаты лабораторных исследований.

Таблица 34-11: Влияния лекарственных веществ и интерференция; механизмы и изменения аналитов.

Категория	Механизм	Пример лекарственного вещества	Аналиты	Изменения в плазме
	Индукция фермента	Фенитоин	γ-глутамилтрансфераза	Завышение результатов
Биологические влияния <i>in vivo</i>	Торможение фермента в печени	Аллопуринол	Мочевая кислота	
	Торможение фермента в плазме	Циклофосфамид	Холинэстераза	
	Повышение уровня связывающих белков	Оральные контрацептивы	Медь (церулоплазмин)	
	Конкуренция с эндогенными компонентами за глюкуронизацию	Новобиоцин	Билирубин свободный	
	Антивитаминный эффект	Варфарин, фенпрокумон	Протеин С, протромбин	
	Цитотоксичность - печень - почки	Бигуаниды Гентамицин Цис-платинум	Лактат АЛТ Креатинин	
Химическая и физическая перекрестная интерференция <i>in vitro</i>	перекрестная реактивность при иммунологических исследованиях	Спиринолактон	Дигоксин	кажущееся
	Химическая реакция с реактивом Jaffe	Цефалотин	Креатинин	
	образование атипичных гемоглобинов	Салицилаты	гемоглобин A ₁	

Связывание лекарственных веществ с белком

Связывание лекарственных веществ с белками может меняться в зависимости или от присутствия других лекарственных веществ, конкурирующих за те же места связывания на молекуле белка, или из-за повышения уровня жирных кислот. Вообще, слабо связанные с белками лекарственные вещества имеют тенденцию к вытеснению со своих мест связывания

на молекуле белка конкурирующим лекарственным веществом или жирной кислотой. В этих условиях уровни свободных лекарственных препаратов могут быть повышены. Более того, если вытесненное лекарственное вещество не метаболизируется достаточно быстро, у пациента могут возникнуть явления отравления при терапевтическом уровне дозировки.

Низкие уровни альбумина, наблюдаемые у пациентов с заболеваниями печени и почек, влияют на связывание с белком. В том случае, когда пациенту назначено несколько лекарственных веществ, конкуренция за места связывания на альбумине может стать значимой. Например, когда вальпроевая кислота назначается совместно с фенитоином, конкуренция за места связывания белка может привести к вытеснению фенитоина вальпроевой кислотой, что вызовет снижение общего уровня фенитоина, поскольку вытесненный фенитоин быстро трансформируется в неактивный метаболит.

Способность белков к связыванию определенных лекарственных веществ может значительно изменяться при таких состояниях как уремия, когда, например, связывание белком фенитоина может варьировать от 70% до почти 0%.

Широкий спектр лекарственной интерференции в ходе лабораторных исследований рассмотрен во многих обзорах и книгах. Используя эти сведения, следует принимать во внимание зависимость от метода многих описанных в них явлений. Как и в отношении других типов интерференции, сравнение результатов, полученных с помощью двух не зависящих друг от друга методов исследования, может указать на механизм интерференции. Чтобы предотвратить возможность неправильной интерпретации результатов исследований, обусловленной лекарственной интерференцией, рекомендуется консультироваться по этому вопросу с клиницистами.

Обеспечение качества на преаналитическом этапе

Все под контролем?

Обычно, качество результатов лабораторных исследований оценивается путем определения их точности и неточности по отношению к стандартам качества. Эти стандарты устанавливаются либо экспертами, определяющими их на основе собственного опыта, либо устанавливаются органами внешнего контроля качества. Для определения качества преаналитического этапа такие стандарты не существуют. Тем не менее, исходя из существующих знаний, отдельно взятые критерии могут быть использованы как критерии качества для каждой индивидуальной лаборатории.

Определяя качество

Смысл анализа пробы, взятой у пациента, состоит в том, чтобы получить результат, отображающий состояние пациента посредством концентрации аналита в крови или другой биологической жидкости. Данный результат помогает клиницисту поставить диагноз и влияет на принятые им решения. Адекватность запроса на проведение лабораторного исследования, тип пробы и время ее взятия должны соответствовать индивидуальной потребности в каждой конкретной клинической ситуации. В отличие от аналитического результата, который часто характеризуют как «продукт», преаналитический этап может быть определен как смесь процессов и материалов. В таблице 35-1 суммированы многочисленные примеры материалов и процедур (процессов), используемых во время преаналитического этапа.

Таблица 35-1: Процессы и материалы преаналитического этапа, которые могут быть объектами обеспечения качества.

Этап	Процесс	Материалы
Подготовка пациента	Информация о диете, положении тела и процедурах взятия образца	Контейнеры для мочи
Подготовка к процедуре взятия образца	Уточнить запрос на анализы, ввести запрос, пометить пробирку	Бланк запроса, программа запроса, система идентификации пациента и образца

Взятие образца	Идентификация пациента, учет времени, наложение жгута, дезинфекция места взятия образца, выбор места взятия крови из вены, артерии или капилляров, положение иглы, смена пробирок	Иглы, пробирки, дезинфицирующие средства
Транспортировка	Взятие образцов и их транспортировка	Контейнеры для образцов, система пневматической почты, система охлаждения
Обработка образцов	Регистрация, центрифугирование, распределение, смешивание, идентификация, экстракция	
Хранение	Время хранения, выбор места и температуры, завершение хранения, повторное перемешивание после хранения	Устройства для хранения и замораживания, температурный контроль

Кто определяет качество?

Жалобы, предположения и предложения участников преаналитического этапа являются основными источниками информации, на основе которой может быть введена программа обеспечения качества на преаналитическом этапе. Определение качества продуктов и процессов должно осуществляться, исходя из медицинских потребностей. Это может быть выполнено группой экспертов в "кругах качества" или посредством внешнего аудита. Могут также быть использованы местные, национальные и международные стандарты и рекомендации.

Результаты этой деятельности публикуются в виде предварительного руководства по качеству, которое после его оценки может быть использовано в виде основы будущих схем обеспечения качества. Характеристика результатов этой оценки и целей программы обеспечения качества должна содержаться в руководстве по качеству.

Качество пробы

Адекватность взятия пробы должна быть рассмотрена с позиций пациента, врача и лаборатории.

Критерии пациента:

Безболезненное взятие пробы является предпочтительным, по сравнению с причиняющим боль. Меньшее количество взятой крови лучше, чем ее избыточно взятое количество. Недавно была рекомендована формула, для определения оптимального объема пробы с учетом технических и биологических переменных. Если следовать этим правилам, можно обеспечить взятие минимального объема пробы для назначенного анализа. Быстрая процедура взятия пробы лучше, чем растянутая во времени (например, небольшая или случайная проба мочи по сравнению с пробой мочи, собираемой за 24 часа, если только последняя процедура не является абсолютно необходимой).

Критерии клинициста:

Предпочтительно получить из одной пробы как можно больше информации. Быстрая процедура взятия пробы является предпочтительной, по сравнению с длительной по времени. Быстрый тест лучше медленного. Идеальная процедура взятия пробы представляет наименьший риск как для пациента, так и для флеботомиста.

Критерии лаборатории:

Лучше иметь больший объем пробы, чем действительно нужно, в противовес недостаточному ее количеству. должен быть установлен адекватный объем. Нормальная проба является предпочтительной, по сравнению с пробой, содержащей потенциальные факторы интерференции (гемолизированная, липемическая) или факторы риска (инфицированная). Стандартный объем пробы и стандартное отношение объема антикоагулянта к объему крови являются предпочтительными, чем нестандартизованные пробы.

Качество расхода времени

Преаналитический этап занимает больше времени, чем аналитический. Поэтому расход времени имеет критическое значение для всей диагностической процедуры. На рис. 35-1а представлены примеры распределения времени, затрачиваемого на долабораторной и внутрिलाбораторной стадиях преаналитического этапа. На рис. 35-1б показано, как много различных участников вовлечено в преаналитический этап; все они должны принимать во внимание необходимость улучшения качества преаналитического этапа.

Как можно документировать и контролировать расход времени

Чтобы четко рассчитать время проведения лабораторного теста, следует при оценке качества проследить за временем выполнения трех основных этапов:

1. Время взятия пробы.
2. Время доставки пробы в лабораторию.
3. Время, необходимое на распечатку результата.

Разница между временем 1 и 2 этапов даст продолжительность долабораторной стадии преаналитического этапа, интервал времени между 2 и 3 этапами составит продолжительность внутри лабораторной стадии преаналитического этапа плюс длительность аналитического и постаналитического этапов. Если вычесть продолжительность аналитического этапа, то можно в дальнейшем рассчитать длительность различных этапов преаналитической фазы. В результате такого расчета выясняется, что доля преаналитического этапа в общем времени оборота результатов лабораторных исследований составляет более 50% в большинстве лабораторий. На рис. 35-2 приведены примеры учета времени преаналитического этапа с помощью лабораторной информационной системы.

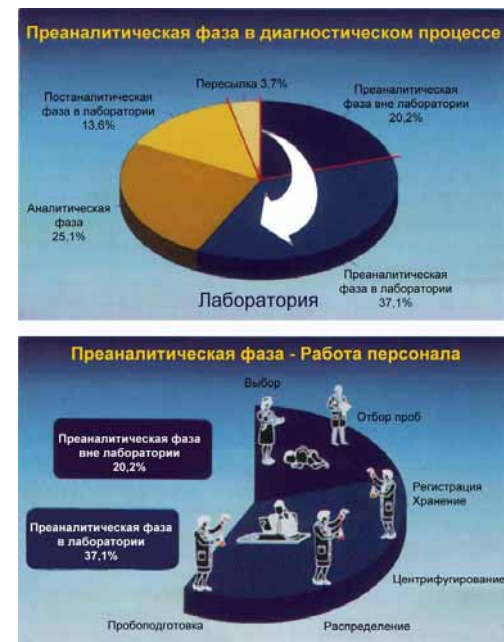


Рис. 35-1а. Относительная доля преаналитического этапа в общем обороте времени (от назначения врачом до им результата анализа) диагностического теста.

Рис. 34-1б. Участники преаналитического этапа.

Журнал качества преаналитического этапа

Процедуры и стандарты, используемые в отдельной лаборатории, должны быть отражены в «Руководстве по качеству», которое должно быть доступно всем сотрудникам, посетителям лаборатории и организаторам внешнего контроля качества. В таблице 34-2 приведен пример возможного содержания такого «Руководства по качеству». В соответствии с документами по стандартам качества серии ISO 9000 каждый отдельный случай может быть описан посредством стандартной операционной процедуры, которая, подобно описанию аналитических процедур, содержит всю информацию, необходимую для соблюдения стандартов, включая ответственность, используемые материалы и последствия в случае несоответствия стандарту. Рабочей группой по качеству преаналитического этапа были опубликованы рекомендации, которые могут служить основой для установления стандартов качества.

Таблица 34-2. Содержание "Руководства по качеству" для преаналитического этапа

1. Процедуры запроса
 - а. Формы
 - б. Идентификация пациента
2. Взятие образца

Материалы

 - а. Иглы
 - б. Пробирки
 - в. Контейнеры для образцов биоматериалов (помимо крови)

Процедуры

 - а. Венозная кровь
 - б. Капиллярная кровь
 - в. Артериальная кровь
 - г. Сбор мочи за определенное время
 - д. Отдельная порция мочи
 - е. Спинальная жидкость
 - ж. Мокрота
 - з. Асцитическая и плевральная жидкость
 - и. Образцы других биоматериалов
3. Транспортировка
4. Регистрация
5. Центрифугирование
6. Идентификация образцов
7. Хранение
8. Интерференция
 - а. Гемолиз
 - б. Липемия
 - в. Билирубинемия
 - г. Лекарственные вещества и примеси
9. Утилизация остатков образцов
10. Учет времени преаналитического этапа
11. Документация
12. Ответственность.

Словарь

Определения понятий, использованных в этом словаре, соответствуют ("Словарю референтных методических процедур и материалов в лабораторной медицине", подготовленному R.Dybkaer).

Аналит:

- Компонент пробы, указанный в названии измеряемой величины.

Аналитическая интерференция:

- Систематическая погрешность измерения, вызванная аналитическим интерферентом.

Аналитическая порция:

- Порция материала, взятая из аналитической пробы, в которой производится измерение соответствующей измеряемой величины.

Аналитическая проба:

- Проба, подготовленная из лабораторного образца, из которой может быть взята аналитическая порция.

Аналитическая чувствительность:

- Угол наклона аналитической калибровочной функции. Термин «аналитическая чувствительность» не является синонимом предела измерения.

Аналитическая специфичность:

- Свойство метода определять только ту величину, которая является целью измерения.

Биологическая влияющая величина:

- См. влияющий фактор.

Биологическое референтное значение; референтное значение:

— Значение измерения у индивидуума, принадлежащего к определенной референтной группе индивидуумов. Термин «биологическое референтное значение» не является синонимом обычно употребляемого термина «нормальное значение», поскольку индивидуумы референтной группы могут страдать определенным заболеванием.

Величина:

- См. Измеряемая величина.

Венепункция:

- Все этапы получения соответственно идентифицированного образца крови из вены пациента.

Взятие пробы:

- Процесс изъятия или образования проб, охарактеризованный процедурой их взятия (ISO 3534-2).

Влияние, влияющий фактор:

- Биологическое (in vivo и vitro влияние на концентрацию измеряемой величины в системе (например, в венозной крови).

Внутренний контроль качества

— Оперативные технологии и деятельность в месте производства, которые используются для удовлетворения требований по качеству.

Внутрииндивидуальная вариация:

- Распределение значений аналита у данного индивидуума. Обычно приписывается вариации, происходящей во времени, как независимой переменной.

Воспроизводимость измерения (precision):

- Близость совпадения между результатами измерений, полученными в оговоренных условиях (ISO 3534-1).

Диагностическая чувствительность:

- См. нозографическая чувствительность.

Диагностическая специфичность:

- См. нозографическая специфичность.

Доступ:

- Все меры, необходимые для обеспечения безошибочной идентификации данного образца крови и сопутствующих ему форм (документов) с конкретным лицом.

Единица измерения, единица:

- Отдельная измеряемая величина, определенная и принятая по соглашению, с которой сравниваются другие измеряемые величины того же рода, чтобы выразить их размеры по отношению к этой величине.

Значение измеряемой величины:

- Размер измеряемой величины, обычно выражаемый как единица измерения, умноженная на число.

Измерение:

- Совокупность операций, имеющих своим объектом определение значения измеряемой величины.

Измеряемая величина:

- Подлежащее измерению количество

Измеряемая величина, величина:

- Присущее явлению, телу или веществу свойство, которое можно отличить качественно и определить количественно.

Интерференция:

- Систематическая погрешность измерения, вызванная компонентом пробы, который сам не вызывает сигнала в измерительной системе (СЕН). Влияние вещества на стадию определения концентрации или каталитической активности аналита.

Компонент:

- Очерченная часть системы. В аналитической химии компоненты системы иногда подразделяют на «аналиты», «конкомитанты» и «растворители»; последние два часто обозначают как «матрикс».

Матрикс:

- Все компоненты материальной системы, исключая аналит.

Матриксный эффект:

- Влияние свойства пробы, отличного от измеряемой величины, на измерение и тем самым на значение измеряемой величины.

Международная система единиц (SI):

- Согласованная система единиц измерения, принятая и рекомендованная Всеобщим конгрессом мер и весов (CGPM). SI в настоящее время основывается на семи основных единицах измерения: метр (м), килограмм (кг), секунда (с), ампер (А), кельвин (К), моль (моль) и кандела (к).

Мезюрэнд:

- Измеряемая величина, подлежащая измерению.

Метрология:

- Наука об измерениях.

Невоспроизводимость измерения:

- Дисперсия независимых результатов измерений, полученных в специфицированных условиях. Невоспроизводимость измерений, когда она касается группы результатов измерений, зависит исключительно от дисперсии случайных погрешностей измерения и не связана с истинным значением измеряемой величины. Воспроизводимость обычно выражается численно

стандартным отклонением повторяемости, стандартным отклонением повторяемости, Клинически истинно положительно промежуточной воспроизводимости, или стандартным отклонением воспроизводимости результатов измерения.

Неправильность измерения:

- Расхождение между результатом измерения и истинным значением измерения. Неправильность измерения может быть описана комбинацией систематических и случайных эффектов, которые выступают в качестве индивидуальных компонентов погрешности измерения.

Неспецифичность:

- Влияния компонентов пробы, отличающихся от аналита, которые вызывают сигнал в измерительной системе.

Нозографическая специфичность (не диагностическая специфичность):

- Число лиц, правильно классифицированных по результатам измерения, как не находящихся в определенном состоянии, деленное на число всех лиц, не находящихся в определенном состоянии. Клинически число истинно отрицательно классифицированных, деленное на сумму клинически правильно отрицательно классифицированных плюс клинически ложно положительно классифицированных.

Нозографическая чувствительность (не диагностическая чувствительность):

- Число лиц, точно классифицированных по результатам измерений, как находящихся в определенном состоянии, деленное на число всех лиц в этом состоянии.

классифици деленные на сумму клинически истинно положительно классифицированных плюс клинически ложно отрицательно классифицированных.

Обеспечение качества:

— Вся планируемая и систематическая деятельность, осуществляемая в системе качества и представленная насколько необходимо, чтобы создать соответствующую уверенность, что удовлетворяются требования по качеству (ISO 8402-3.5). В клинических лабораторных науках обычно имеется в виду системы внутреннего и внешнего контроля качества, как дополняющие, но не исчерпывающие части обеспечения качества. Термин «внешний контроль качества» используется также для обозначения деятельности, обеспечивающей переносимость результатов измерений.

Погрешность измерения, ошибка:

- Результат измерения, отклоняющийся от истинного значения измеряемой величины.

Правильность:

- Близость результата измерения к истинному значению измеряемой величины.

Предел определения:

- Минимально определяемое значение. Результат измерения, полученный при помощи определенной процедуры измерения, для которой

- вероятность аналитически ложноотрицательного результата, а α - вероятность аналитически ложноположительного результата. (IUPAC рекомендует предельные значения α и β равные 0,05). (International Union of Pure and Applied Chemistry – Международный союз теоретической и прикладной химии).

Проба:

— Одна или более частей, взятых из системы с целью получения информации о системе, которая часто может использоваться в качестве основы для принятия решения о системе или ее деятельности. Часть, взятую из системы, иногда называют «образцом». Может быть полезно различать между «первичной пробой» (взятой из оригинальной системы), «лабораторной пробой» (полученной в лаборатории) и «аналитической пробой», из которой берут «аналитическую порцию». См. также аналитическая проба, проба пациента (образец).

В отечественной литературе используются следующие термины:

Образец — Количество биологического материала, поступившее в лабораторию для исследования.

Опытная проба — Проба биологического материала, подвергшаяся обработке в процессе обнаружения, определения.

Проба пациента (образец):

- Часть образца, которая была соответственно собрана, транспортирована и обработана в лаборатории для подготовки материала, предназначенного для специфического лабораторного теста.

Процедура взятия пробы:

- Оперативные требования и/или инструкции, относящиеся к применению плана взятия специальных проб. То есть, запланированная процедура отбора, изъятия и подготовки одной или нескольких проб из инспектируемого лота для выяснения характеристик этого лота (ISO 3534-2).

Примечание: В лабораторной медицине инспектируемый лот – это обычно человек.

Процедура измерения:

- Совокупность специфически описанных операций, используемых при выполнении измерений в соответствии с методом измерения.

Реагент:

- Вещество, используемое для осуществления химической реакции, чтобы измерить величину, присущую другому веществу или превратить одно вещество в другое.

Референтная популяция, референтный индивидуум:

- Референтные индивидуумы

- это лица, отобранные на основании критериев включения и исключения из здоровой популяции для формирования референтной популяции, референтные значения, полученные в которой, используются для сравнения с индивидуумом, страдающим специфическим заболеванием. Референтная популяция должна быть подобна, насколько это возможно, с обследуемыми лицами, за исключением болезни, которая исследуется.

Референтный интервал, референтные значения:

- Не следует использовать выражение «нормальные значения» из-за обыденного смысла слова «нормальный». Референтный интервал определяет 95%-ный предел референтных значений, полученных в референтной популяции.

Референтный материал:

- Материал или вещество, одно или более значений свойств которого достаточно гомогенны и хорошо установлены, чтобы быть использованными для калибровки измерительной системы, оценки процедуры измерения результатов последовательных или приписывания значения материалам (ISO-Guide 30-2.1).

Референтный предел:

- Верхний или нижний предел референтного интервала, не идентичный с порогом клинического решения.

Система качества:

- Организационная структура, процедуры, процессы и ресурсы, необходимые для осуществления управления качеством (ISO 8402-3.6)

Систематическая погрешность измерения, систематическая ошибка:

- Отличие средней бесконечно большого числа измерений одной и той же измеряемой величины (мезюранда), выполненных в повторяющихся условиях, от истинного значения измеряемой величины (мезюранда).

Случайная погрешность измерения, случайная ошибка:

- Результат измерения, отклоняющийся от средней бесконечного числа измерений одной и той же измеряемой величины, выполненных в повторяющихся условиях.

Смещение измерения:

- Смещение представляет собой разницу между ожидаемым результатом измерения и истинным значением измеряемой величины.

Стабильность:

- Способность системы, содержащейся в определенных условиях, поддерживать установленное значение свойства в определенных пределах в течение определенного времени.

Сходимость результатов измерений:

- Близость соответствия измерений одной и той же измеряемой величины, выполненных в повторяющихся условиях.

Фактор интерференции:

- Вещество или компонент матрикса пробы, который отличается от аналита и интерферирует в аналитической процедуре, вызывая ложный сигнал измерения. Фактор интерференции называется влияющей величиной по Дубкаег, который определяет ее как измеримую величину, не являющуюся измеряемой величиной, но влияющую на результат измерения.

Хорошая лабораторная практика (Good Laboratory Practice, GLP):

- Организация процесса и условия, в соответствии с которыми лабораторные исследования планируются, выполняются, их результаты отслеживаются, регистрируются и сообщаются.

Экзогенный:

- Любой фактор или механизм, добавленный к пробе или in vivo (например, лекарство), или in vitro (например, контаминант).

Эндогенный:

- Любой фактор или механизм, действующий или производный из системы, из которой взята аналитическая проба. См. также фактор интерференции.