

# СОВРЕМЕННАЯ ПРЕАНАЛИТИКА ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ, МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ: РЕАЛЬНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ РОССИЙСКОЙ МЕДИЦИНЫ

Т. И. Долгих

Омская государственная медицинская академия, г. Омск

**Резюме.** В статье рассмотрена проблематика проведения таких исследований, как иммунологические, молекулярно-биологические и молекулярно-генетические в условиях стандартизации клинико-диагностических лабораторий, а также возможность повышения качества лабораторных анализов.

**Ключевые слова:** преаналитический этап, стандартизация, венепункция, венозная кровь, молекулярно-генетические исследования, молекулярно-биологические исследования, иммунология, вирусные заболевания, вакуумные системы забора крови.

## Modern preanalytics in immunological, molecular biological and molecular genetic investigations: real possibilities of Russian medicine

T.I. Dolgikh

State budget educational institution of higher professional education «Omsk State Medical Academy», Ministry of Health Care of Russian Federation, Omsk

**Summary.** The article considers the problems of clinical tests in standardization of laboratory as immunology, molecular biology and molecular genetic and the ability of improvement of quality of these clinical tests.

**Key words:** preanalytical phase, standardization, venipuncture, venous blood, molecular genetics, molecular biology, immunology, viral diseases, evacuated tube systems.

**Данные для корреспонденции:** Долгих Татьяна Ивановна, доктор мед. наук, профессор кафедры эпидемиологии, заведующая Центральной научно-исследовательской лабораторией, руководитель Академического центра лабораторной диагностики Омской государственной медицинской академии, e-mail: [prof\\_dolgih@mail.ru](mailto:prof_dolgih@mail.ru)

В настоящее время в условиях модернизации здравоохранения России важное значение придается стандартизации лабораторных исследований, направленных на повышение качества и эффективности работы [1, 2]. Значительному улучшению качества рутинных гематологических, биохимических и серологических исследований способствовало внедрение в медицинскую практику требований национального стандарта (ГОСТ Р 53079.4-2008) [3] в части ведения преаналитического этапа в соответствии с рекомендациями ВОЗ [4]. Эти документы регламентируют проводить сбор образцов венозной крови в одноразовые контейнеры «при наличии строго определенных добавок» в зависимости от назначенного вида исследования (ИСО 6710:1995) [5].

Вместе с тем, как показывает мировая практика, современная преаналитика имеет достаточно мощный потенциал для улучшения качества «проблемных» ключевых исследований, который в России реализуется далеко не в полную меру. К ним следует отнести: иммунологические и молекулярно-биологические методы (работа с культурой клеток, определение уровня внутриклеточных цитокинов, фенотипа лимфоцитов с использованием проточной цитофлюориметрии), а также широко используемые молекулярно-генетические исследования, прежде всего ПЦР-анализ. Результативность работы лаборатории и эффективность этих методов (порой — высокотехнологичных, уникальных и финансово-затратных, требующих длительной подготовки специалистов) нередко снижается, если не учитывается влияние внешних долабораторных факторов, к которым относится и преаналитика [6]. С проблемой качества преаналитической фазы напрямую связаны все иммунологические и ПЦР-лаборатории, в том числе лаборатории специализированных учреждений, инфекционных больниц и центров по профилактике и борьбе со СПИД, а также научные центры, занимающиеся молекулярной диагностикой.

Наряду с этим, рост частоты инфицирования популяции вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) и вирусом гепатита С, развитие молекулярной медицины, мониторинга, лечения и прогнозирования ставят новые задачи перед нами как в формате качества, так и в плане обеспечения безопасности пациента и медицинского персонала, что достигается использованием закрытых систем забора крови и пробирок однократного применения.

Надо признать, что во многих лабораториях, особенно в условиях централизации исследований и аутсорсинга (нередко с транспортировкой биоматериала в другие города), преаналитика остается «слабым звеном». Это снижает эффективность работы, поскольку приводит:

- ✓ к недостоверным данным (высокая погрешность и низкая воспроизводимость анализа, например, при определении вiremии и «вирусной нагрузки»);
- ✓ к увеличению частоты ложно-положительных и ложно-отрицательных результатов, требующих дополнительных исследований и, соответственно, финансовых затрат и увеличения нагрузки на персонал;
- ✓ к моральным издержкам и конфликтам из-за ошибки в постановке диагноза, особенно базирующегося на результате лабораторного исследования (например, при вирусных гепатитах В и С, ВИЧ-инфекции);
- ✓ к неправильной тактике ведения пациента и существенным затратам при назначении необоснованной терапии (например, при остаточной миеломной болезни или инфекциях);
- ✓ к некорректной оценке риска развития определенных заболеваний из-за генетической предрасположенности (например, рак молочной железы) или влияния генетических факторов на патогенез заболевания (например, при оценке состояния системы гемостаза у пациентов с сердечно-сосудистой патологией или тромбофилиями).

В настоящее время следует провести корректирующие мероприятия по стандартизации долабораторной преаналитики в следующих направлениях медицины:

- ✓ скрининг, арбитраж, мониторинг на ВИЧ-инфекцию и вирусные гепатиты (детекция ДНК или РНК, определение вiremии, вирусной нагрузки, оценка эффективности противовирусной терапии);

- ✓ диагностика оппортунистических, в том числе СПИД-индикаторных инфекций (туберкулез, цитомегаловирусная инфекция, герпетическая инфекция, токсоплазмоз и др.);
- ✓ диагностика перинатальной патологии (в том числе перинатальных инфекций);
- ✓ состояние и функциональная оценка иммунного статуса;
- ✓ выявление опухолевых клеток и их типирование;
- ✓ определение чувствительности к лекарственным препаратам;
- ✓ определение генов-маркеров наследственных заболеваний;
- ✓ оценка риска развития заболеваний при наличии генетической предрасположенности (например, рак молочной железы, колоректальный рак);
- ✓ фармакогенетика и фармакогеномика.

Во всех случаях в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 15189-2009 и ГОСТ Р 53079.4-2008 [1, 3] специалисты лаборатории должны дать (с учетом специфики учреждения) четкие указания (в письменном виде) медицинским (научным) работникам, формирующим заказ и осуществляющим флеботомию, в какие пробирки следует осуществлять забор крови для планируемых исследований с целью получения сыворотки, плазмы или лимфоцитарно-моноцитарной взвеси (указать цвет крышки в соответствии с международным кодификатором, наполнитель, необходимый объем, количество перемешиваний, условия хранения и доставки).

Система эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией предъявляет жесткие требования к качеству исследований как в референс-лабораториях, так и в скрининговых лабораториях. Однако это невозможно обеспечить без должного уровня преаналитики в учреждениях первичного звена (взятие крови закрытыми системами в пробирки с соответствующими наполнителями). Практически во всех городах России идет перемещение большого количества пробирок с образцами крови в централизованные лаборатории, в том числе для скрининга на ВИЧ-инфекцию, основанного в соответствии с СП 3.1.5.2826-10 [7] на выявлении антител к ВИЧ и вирусных антигенов, а в особых случаях — на выявлении провирусной ДНК ВИЧ и вирусной РНК ВИЧ (у детей первого года жизни).

Высокие требования предъявляются и к донорству (тестирование донорской крови на наличие антигена/антител и генетического материала ВИЧ; необходимость длительного хранения образца крови (архивирование биоматериала)). Более того, увеличивается количество ВИЧ-инфицированных лиц и пациентов с хроническими вирусными гепатитами В и С, требующих систематического (длительного) мониторинга состояния иммунной системы и оценки эффективности противовирусной терапии.

Все шире проводится обследование на ВИЧ-инфекцию в различных медицинских учреждениях с использованием быстрых тестов. В соответствии с СП 3.1.5.2826-10 «Профилактика ВИЧ-инфекции» (п. 4.8.2) [7] каждое исследование на ВИЧ с применением простых/быстрых тестов (область их применения изложена в п. 4.8.1) должно сопровождаться параллельным тестированием той же порции крови классическими методами ИФА и ИБ. Поскольку на ранних стадиях ВИЧ-инфекции выявление антигена ВИЧ p24 имеет важное значение, особенно на фоне отсутствия или ограниченного с высокой вероятностью сохранения антигена/антитела длительного хранения образца в первичной пробирке (для исключения ошибки при аликвотировании). Наилучшим

вариантом для обеспечения качества пробы с исключением (снижением риска) гемолиза [8] и, главное, с сохранением не только уровня антител, но и уровня антигенов ВИЧ (p24), вирусов гепатита В и С, является взятие крови в вакутейнеры со скошенным гелем — BD Vacutainer® SST II Advance [9]. Такая же проблема стоит и в донорстве.

Какие же пробирки необходимо использовать в конкретных случаях?

1. В тех случаях, когда исследованию будет подвергнута плазма, для ее получения, особенно в случае транспортировки биоматериала, целесообразно проводить забор крови в вакутейнеры с гепарином лития и разделительным гелем (светло-зеленая крышка) — BD Vacutainer® PST™ II.

2. В тех случаях, когда необходимо выделить мононуклеары, вполне обосновано использование вакутейнеров BD Vacutainer® CPT™, которые были нами отобраны в поиске решения проблемы стандартизации преаналитического и аналитического этапов с приоритетом безопасности. В отличие от традиционного способа выделения мононуклеаров, отличающегося трудоемкостью, отсутствием стандартизации и возможностью контакта сотрудника с кровью, BD Vacutainer® CPT™ представляет собой закрытую одноэтапную систему для сбора, выделения мононуклеарных клеток, транспортировки с возможностью длительного хранения. Это стеклянные пробирки с сине-черной пробкой (наполнитель — цитратнатрия/фиколл/гель) или с красно-зеленой пробкой (наполнитель — гепарин натрия/фиколл/гель). Разделение клеток в градиенте плотности фиколла при центрифугировании в таких пробирках с гелевым барьером значительно ускоряет исследование: прямое выделение мононуклеарных клеток из крови происходит за 20 минут с гарантией высокого выхода лимфоцитов и моноцитов (независимо от уровня подготовки специалиста лаборатории). Преимуществом использования вакутейнеров BD Vacutainer® CPT™ является не только увеличение количества анализируемых проб, но и их уникальность в части сохранности мононуклеарных клеток после хранения при низких температурах (не менее 90% при температуре до  $-80^{\circ}$ ) [10].

3. Для молекулярно-генетических методов (в том числе для ПЦР диагностики) целесообразно забирать кровь в вакутейнеры BD Vacutainer® PPT™, в производстве которых для стандартизации используется сухой распыленный K2ЭДТА. Наличие гелевого барьера устраняет необходимость использования вторичных пробирок, что менее трудоемко в работе, позволяет увеличить производительность труда и стабилизацию образцов при транспортировке и хранении. Образцы, собранные в пробирки BD Vacutainer® PPT™, могут храниться в течение 6 часов при комнатной температуре, а также в замороженном виде без влияния на результаты анализов на ВИЧ [11].

Они предназначены для молекулярной диагностики ВИЧ-инфекции и вирусных гепатитов В и С, в том числе для выявления генетического материала вирусов и генотипирования (в качественном варианте ПЦР), а также для определения вирусной нагрузки и выявления резистентности к лекарственным препаратам (в количественном варианте — формат «реального времени»). Эти пробирки также нашли свое применение при создании банка крови (возможность анализа и длительного хранения пробы крови в архиве в первичной пробирке, что исключает ошибку при идентификации проб).

Таким образом, мировой опыт обеспечения стандартизации преаналитического этапа иммунологических и молекулярно-генетических исследований может успешно применяться в медицинской практике России, что способствует повышению качества

работы, достоверности анализа и обеспечивает безопасность медицинских работников и научных сотрудников.

### **Литература**

1. ГОСТ Р ИСО 15189-2009 Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности.
2. Меньшиков В. В. Зачем клинической лаборатории нужна стандартизация?// Учебно-методическое пособие. М.: Лабора, 2012:71.
3. ГОСТ Р 53079.4-2008 Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4.Правила ведения преаналитического этапа.
4. ВОЗ. Применение антикоагулянтов и стабильность проб крови, сыворотки, плазмы. Женева, 2002.
5. ИСО 6710:1995 Контейнеры одноразовые для сбора образцов венозной крови.
6. Долгих Т. И. Снижение профессиональной заболеваемости обеспечение безопасности труда медицинских работников //Справочник заведующего КДЛ. 2011; 8: 11–15.
7. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.5.2826-10Профилактика ВИЧ-инфекции.
8. Mensel B., Wenzel U., Roser M., Lüdemann J., Nauck M.Considerably Reduced Centrifugation Time without Increased Hemolysis: Evaluation of the New BD VacutainerRSST™II Advance //Clinical Chemistry. 2007; 53 (4).
9. Gobin E., Desruelle J. M., Vigier J. P. Evaluation of the analytic performance of blood collection tubes (BD Vacutainer SST) for the screening of anti-HIV, anti-HTLV, anti-HCV, anti-HBc, anti-CMV antibodies, and of HBs, P24 HIV antigens, and of alanine aminotransferase// Transfus Clin Biol. 2001 Feb; 8 (1): 44–50.
10. Ruitenberg J. J., Mulder C. B., Maino V. C., Landay A. L., Ghanekar S. A. VACUTAINER CPT™ and Ficoll density gradient separation perform equivalently in maintaining the quality and function of PBMC from HIV seropositive blood samples //BMC Immunology. 2006; 7: 11.
11. Fernandes H., Morosyuk S., Abravaya K., Ramanathan M., Rainen L. Parameters for Plasma Preparation Tubes on Viral Load Measurements Obtained by Using the Abbott Real Time HIV-1 Load Assay // Journal of Clinical Microbiology. July 2010; 48 (7): 2464–2468.