

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

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 возможностью 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°) [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. Ruitenberг J. J., Mulder C. B., Maino V. C., Landay A. L., Ghanekar S. A. VACUTAINER R 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.