

Возможности и особенности современных гелевых технологий в лаборатории

Гильманов Александр Жанович

*Кафедра лабораторной
диагностики ИПО Башкирского
государственного медицинского
университета, г. Уфа*



Код формы по ОКУД _____

Код учреждения по ОКПО _____

Министерство здравоохранения
СССР

Медицинская документация
Форма № 200/у
Утверждена Минздравом СССР
04.10.80 г. № 1030

наименование учреждения

НАПРАВЛЕНИЕ НА АНАЛИЗ № _____

“ _____ ” _____ 19__ г.

дата взятия биоматериала

В лабораторию _____

Фамилия, И., О. _____

Возраст _____

Учреждение _____ отделение _____

Палата _____ участок _____ медицинская карта № _____

Диагноз, группа диспансерного учета _____

Исследовать (указать консервант) _____

нужное вписать

Подпись врача _____

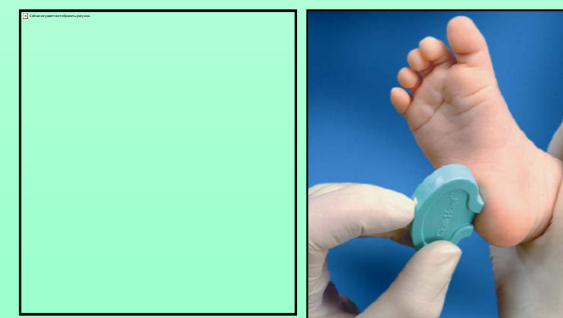
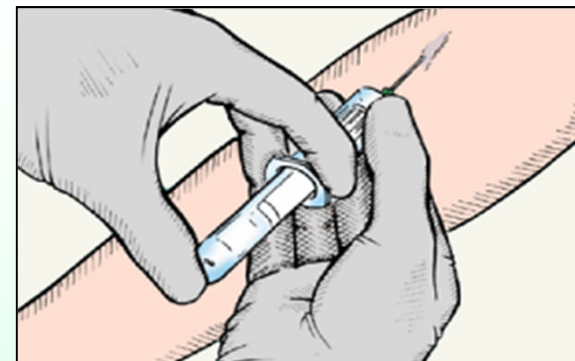
Взятие крови

Для исследования анализов в цельной крови, сыворотке или плазме кровь лучше брать **венозную кровь**

(стандартизация пробы и ее разбавления, меньшая вероятность микросгустков).

Капиллярную кровь берут:

- при обширных ожогах, затрагивающих область пункции,
- при флебитах и склонности к венозному тромбозу;
- у пациентов с труднодоступными венами (при выраженном ожирении);
- у новорожденных и маленьких детей,
- для мониторинга уровня глюкозы, МНО и холестерина (в т.ч. в домашних условиях).



Взятие крови из вены шприцем



При проколе кожи **риск заражения:**

- гепатитом В - 30% (1 случай из 3),
- гепатитом С - 3% (1 случай из 30),
- ВИЧ - 0.3% (1 случай из 300).

При переносе крови под давлением в пробирку **возможен гемолиз.**

Высока **вероятность попадания крови пациента на руки медсестры =>** другому пациенту могут передаваться гемоконтактные инфекции,

+ Медицинский работник может заразиться сам.



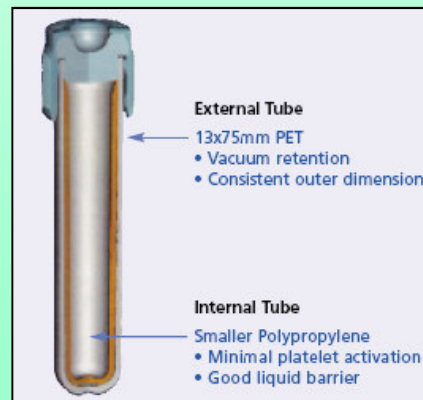
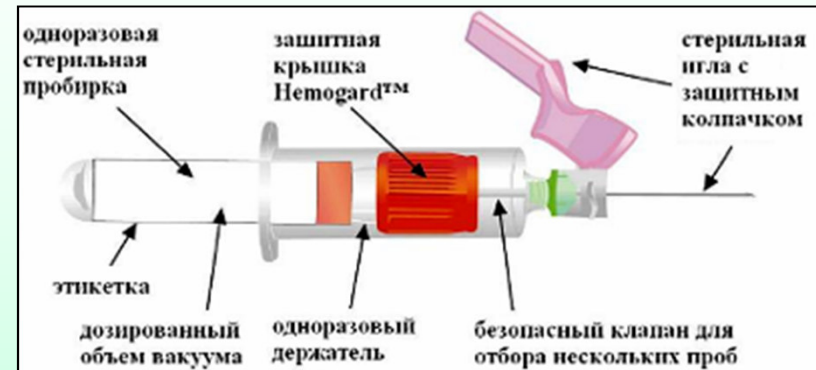
Вакуумные пробирки

Предложены в 1937 г.,

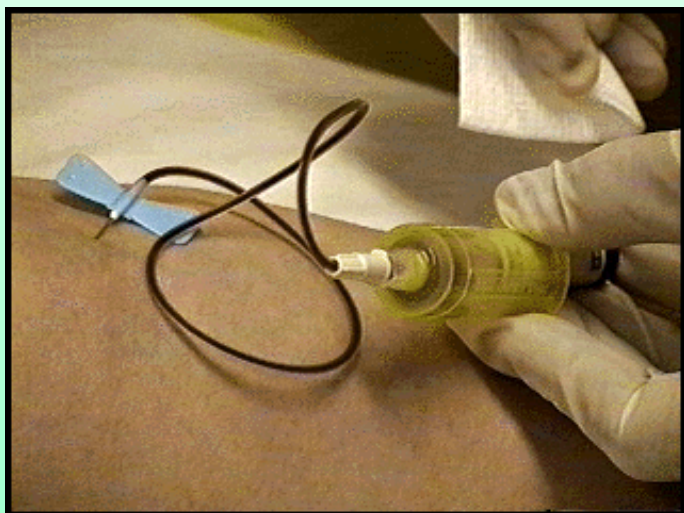
в 1949 г. – торговая марка «BD».

Вакутейнеры, вакуэтты, моноветты и др.
(для всех исследований, кроме газов крови)

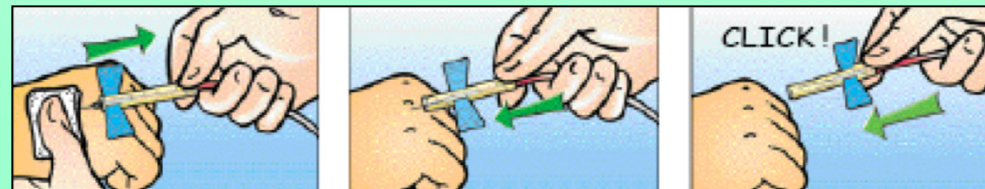
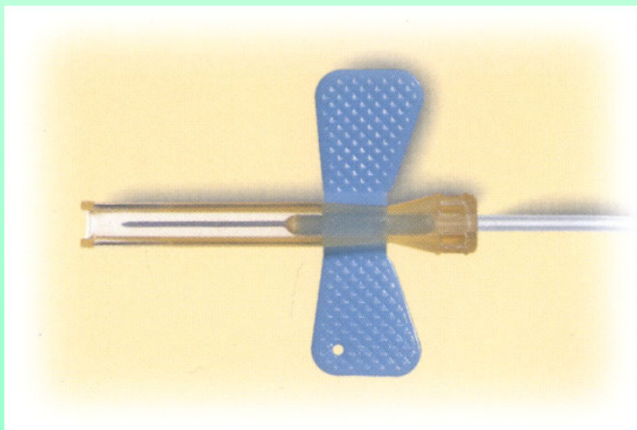
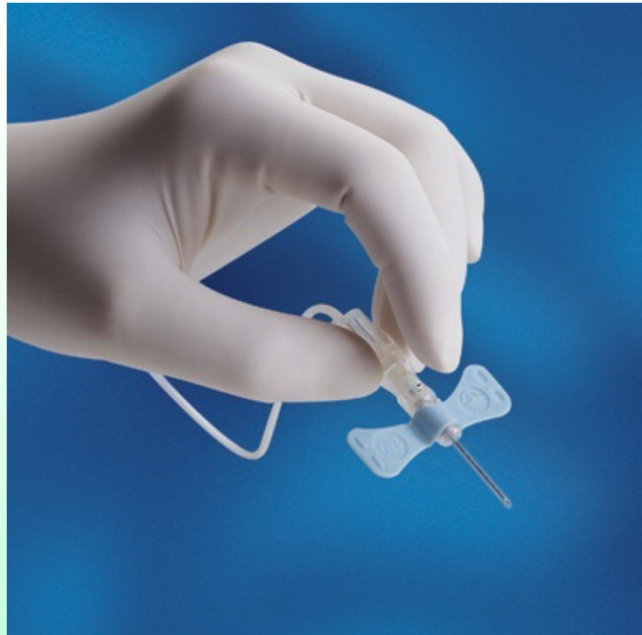
ISO 6710 – международный стандарт
«Вакуумные пробирки для взятия крови».



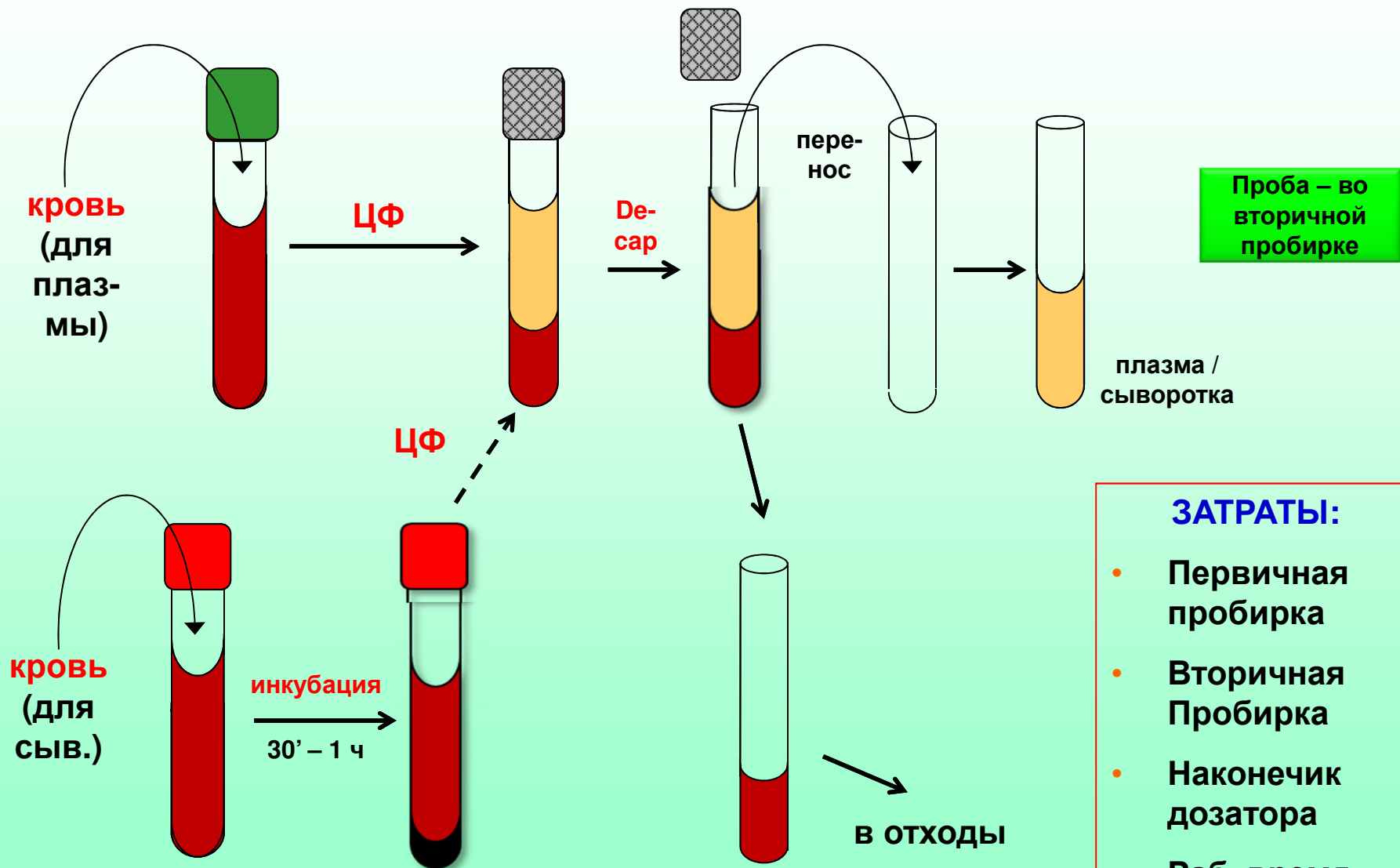
Иглы и держатели



«Безопасные» иглы



Получение плазмы / сыворотки после взятия крови в обычную вакуумную пробирку



ЗАТРАТЫ:

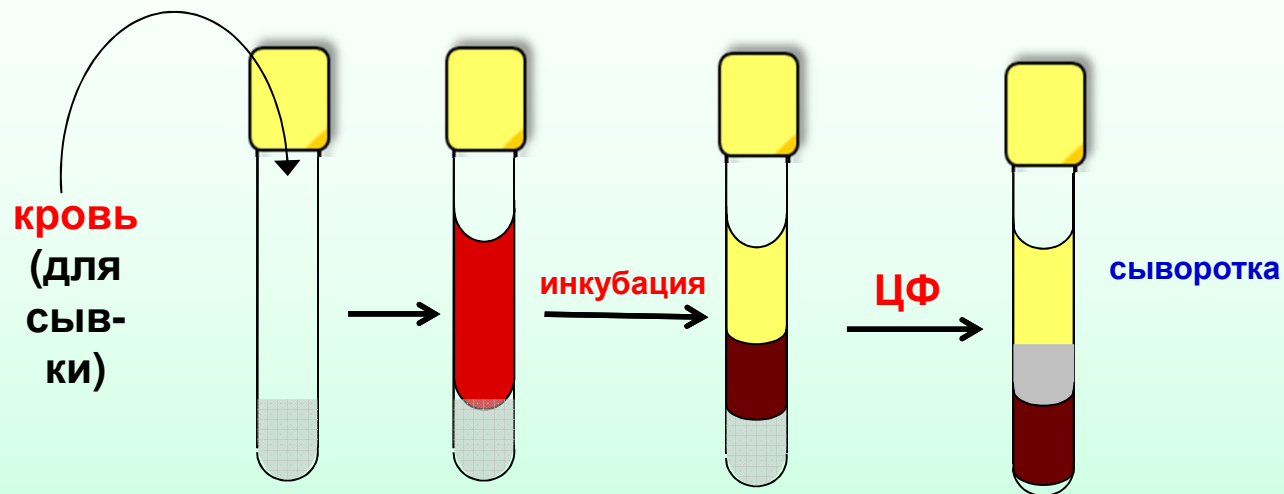
- Первичная пробирка
- Вторичная Пробирка
- Наконечник дозатора
- Раб. время

Современные требования к обработке крови в КДЛ

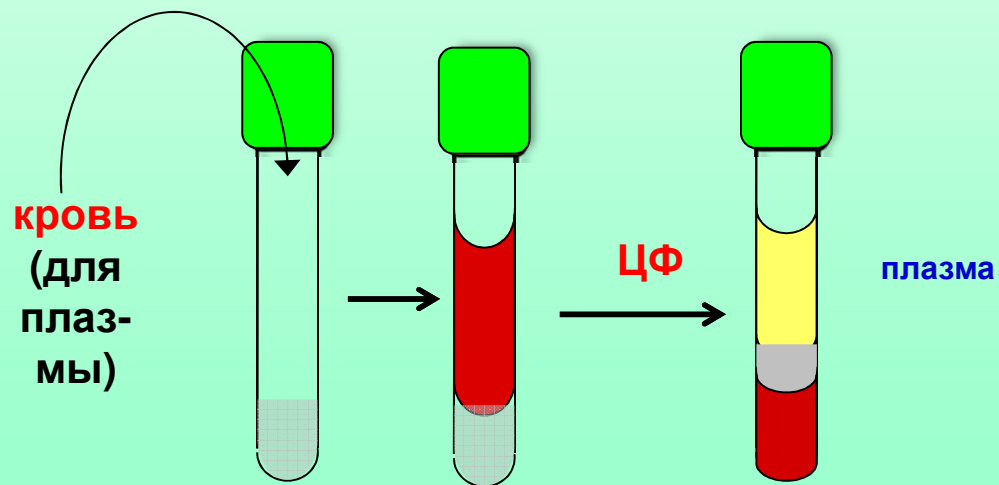
1. Минимальный объем забираемой крови, увеличение выхода сыворотки / плазмы.
2. Легкое и быстрое отделение осадка клеток / сгустка.
3. Получение высококачественной сыворотки / плазмы, не содержащей фибрина, клеток и их компонентов.
4. Возможность хранения и транспортировки сыворотки / плазмы без загрязнения элементами осадка.
5. Экономия финансовых средств и рабочего времени (в т.ч. на пробоподготовке).

Использование обычных вакуумных пробирок не во всем удовлетворяет этим требованиям...

Получение сыворотки / плазмы после взятия крови в вакуумную пробирку с гелем



Проба – в первичной пробирке



- ЗАТРАТЫ:**
- Первичная пробирка
 - Рабочее время

Особенности гелевых пробирок

- На дне пробирки - разделительный инертный гель (акриловый)
- Плотность геля $\sim 1,04 \text{ г/см}^3$ = ниже, чем у кровяного сгустка и осадка клеток ($\sim 1,09 \text{ г/см}^3$), но выше, чем у плазмы ($\sim 1,03 \text{ г/см}^3$).
- При ЦФ гель движется вверх и образует стабильный барьер, между сывороткой / плазмой и сгустком / осадком клеток. Гелевый барьер стабилизирует параметры сыворотки / плазмы *in vitro*.
- После ЦФ гелевые пробирки можно транспортировать, не боясь взмутить осадок, а также замораживать*.
- Вторичная пробирка не нужна => сыворотку / плазму после ЦФ можно отбирать прямо из первичной пробирки (экономия времени на перенос материала и ресурсы. + ↓ кол-ва канц. ошибок).



Гелевые пробирки для получения сыворотки



Формирование гелевого барьера в SST II Advance

ГЕЛЕВЫЙ БАРЬЕР:

- увеличивает выход сыворотки,
- обеспечивает ее высокое качество,
- надежно изолирует сыворотку от попадания клеток и их компонентов.

=> снижается частота ошибок и случаев повторного взятия крови.



Современные пластиковые пробирки для сыворотки

Vacutainer® (активатор свертывания - SiO_2 на стенках) - *просто сывороточная...*

- Переворачивание - 5^x
- Время свертывания – 60 мин



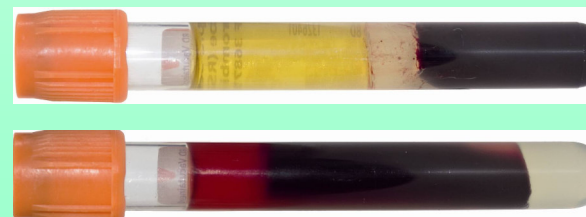
Vacutainer® SST II Advance (активатор свертывания + инертный скошенный гель)

- Переворачивание - 5^x
- Время свертывания – 30 мин
- Прозрачный акриловый гель с четким мениском
- Можно замораживать-оттаивать



Vacutainer® RST с тромбином и инертным гелем

- Переворачивание - 8^x
- Время свертывания – 5 мин
- Минимальный «остаточный фибрин»



**Сдвиги
концентрации
аналитов при
хранении
биоматериала
в гелевых
пробирках
при -80 °C
в течение
года**

Concentrations of analytes related to bone and vitamin metabolism and clinical chemistry, from serum that was stored for 12 mo at -80 °C in cryogenic tubes (no gel contact) or in SST™ tubes in contact with the barrier gel^a.

	No gel contact for 12 mo	Gel contact for 12 mo	% Change
1,25-dihydroxyvitamin D, pmol/L	113 ± 20	154 ± 28*	37 ± 14
25-hydroxyvitamin D, nmol/L	58 ± 9	54 ± 9	-7 ± 9
Alanine transaminase, U/L	17 ± 6	16 ± 6	-3 ± 8
Albumin, g/L	39 ± 1	38 ± 2	-1 ± 4
Alkaline phosphatase, U/L	42 ± 8	42 ± 8	0 ± 3
Alpha(1)-globulin, g/L	2.32 ± 0.39	2.15 ± 0.34	-6 ± 13
Alpha(2)-globulin, g/L	5.62 ± 0.52	5.78 ± 0.42	3 ± 8
Aspartate transaminase, U/L	18.0 ± 4.3	19.0 ± 4.5*	6 ± 4
Beta globulin, g/L	9.9 ± 1.2	9.8 ± 1.0	0 ± 4
Bone-specific alkaline phosphatase, U/L	23 ± 3	23 ± 2	-2 ± 8
Ceruloplasmin, mg/L	244 ± 33	231 ± 32	-5 ± 6
Chloride, mmol/L	105 ± 1	104 ± 1*	-1 ± 1
Cholesterol, mmol/L	4.42 ± 0.54	4.36 ± 0.51*	-1 ± 1
Cortisol, nmol/L	352 ± 64	355 ± 80	0 ± 6
Creatinine, µmol/L	82 ± 8	85 ± 8*	2 ± 2
Ferritin, µg/L	82 ± 34	83 ± 35	2 ± 7
Folate, nmol/L	48 ± 17	43 ± 13	-9 ± 6
Gamma globulin, g/L	10.4 ± 0.7	10.4 ± 0.9	0 ± 5
HDL cholesterol, mmol/L	1.3 ± 0.3	1.3 ± 0.3	1 ± 1
Homocysteine, µmol/L	9.30 ± 1.14	9.38 ± 1.15	1 ± 2
Iron, µmol/L	15.8 ± 1.6	15.6 ± 1.7*	-1 ± 1
LDL cholesterol, mmol/L	2.8 ± 0.5	2.7 ± 0.5	-2 ± 2
Methylmalonic acid, nmol/L	199 ± 31	206 ± 30	4 ± 5
Osteocalcin, µg/L	11.3 ± 2.1	10.1 ± 1.1	-9 ± 10
Osteoprotegerin, pmol/L	2.9 ± 0.6	3.2 ± 0.4*	13 ± 12
Potassium, mmol/L	4.5 ± 0.4	4.5 ± 0.4	1 ± 2
Retinol-binding protein, mg/L	60 ± 18	49 ± 15**	-17 ± 6
Sodium, mmol/L	140 ± 1	139 ± 2	-1 ± 1
Total protein, g/L	67 ± 3	66 ± 3**	-1 ± 1
Transferrin receptors, mg/L	5.97 ± 1.61	6.30 ± 3.01	9 ± 62
Transferrin, g/L	2.39 ± 0.16	2.37 ± 0.15*	-1.0 ± 0.8
Transthyretin, mg/L	286 ± 65	296 ± 63	3.7 ± 3.6
Triglycerides, mmol/L	0.97 ± 0.55	0.96 ± 0.53	-0.8 ± 1.4

СЫВОРОТКА или ПЛАЗМА?

Несовместимые антикоагулянты

АЛТ, АСТ - оксалат

Альбумин - гепарин

α-амилаза - цитрат, ЭДТА, фторид

α₁-антитрипсин - цитрат, ЭДТА, оксалат

Белки (ЭФ) - оксалат

Билирубин - цитрат, фторид, оксалат

Витамин В12 – оксалат

ГБДГ - оксалат

ГГТ - цитрат, фторид, гепарин, оксалат

ГлДГ - фторид

Глюкоза - цитрат, оксалат

Железо сыв. - цитрат, ЭДТА, гепарин, оксалат

Инсулин - оксалат

Калий - оксалат

Кальций - цитрат, ЭДТА, оксалат

Кислая фосфатаза - цитрат, ЭДТА, фторид, гепарин, оксалат

Креатинин - цитрат, ЭДТА, фторид

Креатинкиназа - цитрат, фторид, оксалат

Креатинкиназа-МВ - цитрат, ЭДТА, фторид, гепарин, оксалат

ЛАП - цитрат, ЭДТА, фторид, гепарин, оксалат

ЛДГ - фторид, оксалат

Липаза - ЭДТА

Липопротеиды (ЭФ) - оксалат

Литий - оксалат

Медь - цитрат, ЭДТА, фторид, оксалат

Мочевая к-та - ЭДТА, цитрат, фторид

Мочевина – фторид

Натрий - цитрат, ЭДТА, оксалат

ОЖСС - ЭДТА

Протромбин по Квику - оксалат

СОЭ – гепарин

ТЗ - оксалат

Триглицериды - цитрат, фторид, оксалат

Фосфат - цитрат

Холестерин - цитрат, фторид

Холестерин ЛПВП - цитрат, фторид

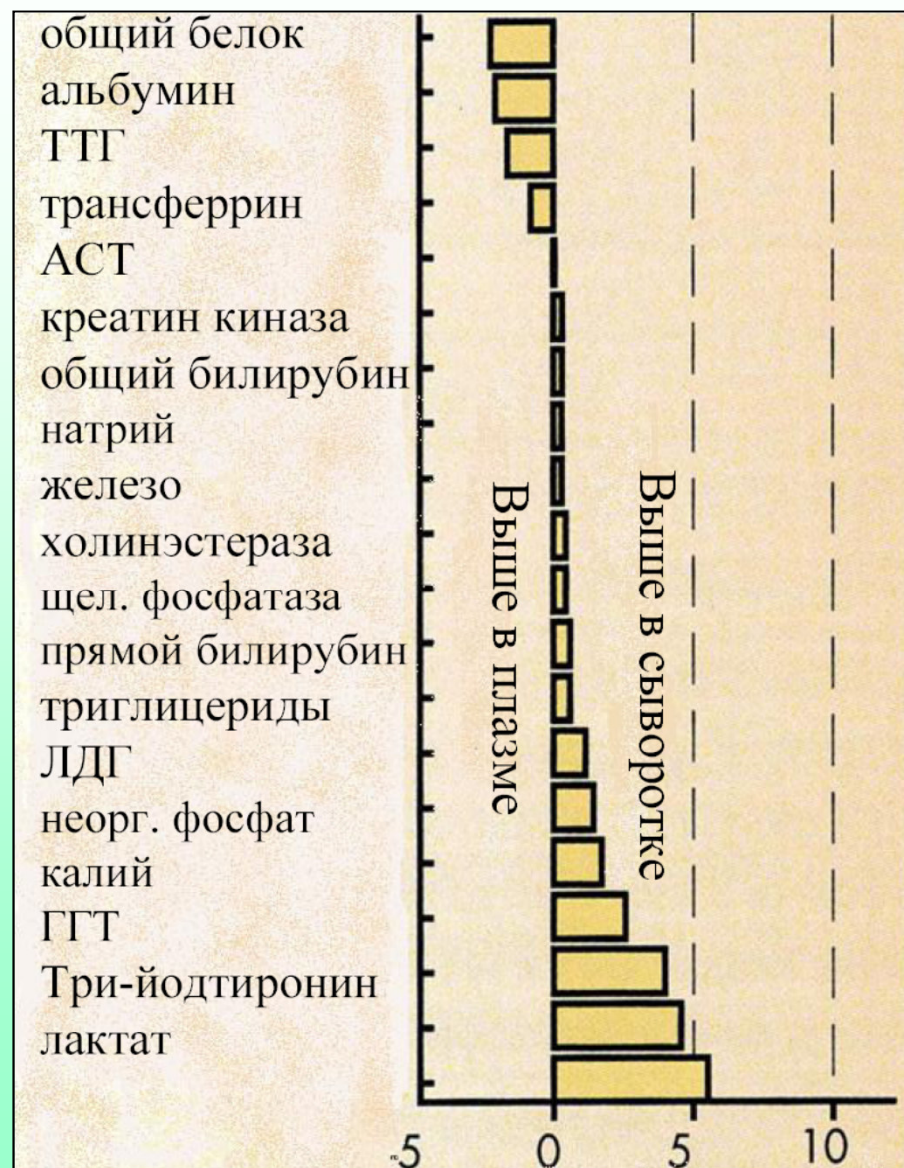
Холестерин ЛПНП – оксалат

Холинэстераза - ЭДТА, фторид, гепарин

Церулоплазмин - ЭДТА

Щел. фосфатаза – цитрат, ЭДТА, фторид, оксалат

Показатели в плазме и сыворотке



Гелевые пробирки для получения плазмы



Формирование гелевого барьера в PST II

ОСОБЕННОСТИ плазменных гелевых пробирок:

- **антикоагулянт** – литий-гепарин ~17 МЕ/мл (или K_2 -ЭДТА),
- **сокращение времени на обработку** – кровь можно центрифугировать сразу после взятия (но <1 ч),
- выход плазмы на 15-20% больше, чем сыворотки,
- гелевый барьер стабилизирует большинство аналитов в плазме на время >24 час (кроме CO_2 и глюкозы).

Гелевые пробирки для получения плазмы



Vacutainer® PST™ II

Гепарин-литий + инертный гель

Стабильность Ca^{2+} >7 ч при +4 - +25 °C

Не для ПЦР !

NEW !



*Стабильность
РНК ВИЧ и HCV -
24-72 часа при комн.
температуре !*

Vacutainer® PPT™ II

K₂-ЭДТА + инертный гель.

Почти нет ТЦ. Годна для ПЦР.

**Можно замораживать до -70 °C
и долго хранить.**

Vacutainer® PPT™



Не нужно отбирать плазму пипеткой и обрабатывать пробирки после ЦФ (безопасность, экономия рабочего времени).

Плазма

Гелевый барьер

Клеточная масса

«Золотой стандарт»
при определении вирусной нагрузки (HIV и др.)

Стабильность биохимических анализов в стеклянных, сывороточных гелевых и плазменных (Li-Heparin) пробирках при хранении биоматериала при 4 и 25 °C в течение 2 – 24 час

Stability of biochemical analytes on serum or plasma.

Analytes	To	Tube	TCL	Mean difference%								Acceptable delays	
				T2h		T4h		T6h		T24h			
				4 °C	25 °C	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C
K ⁺	4.3 mmol/L	Glass tube	± 28%	+0.7	-0.6	+1.0	+1.5	+2.8	-1.0	+20.6 ^a	+0.1	6 h	24 h
		SST		+1.1	+0.6	+1.3	NT	+0.6	+1.3	+0.9	+1.1	24 h	24 h
		Li heparin		+0.8	+1.2	+1.4	-1.8	NT	NT	NT	NT	>4 h	>4 h
Bicarbonate	28.9 mmol/L	Glass tube	± 8.6%	+2.6	+0.3	+1.7	0.0	-6.5	-7.5	-2.0	-5.5	24 h	24 h
		SST		+2.8	+0.6	+2.7	0.0	-7.3	13.0 ^a	-8.8 ^a	-13.2 ^a	6 h	4 h
		Li heparin		+1.0	-0.1	-0.5	-0.8	NT	NT	NT	NT	>4 h	>4 h
Inorganic phosphorous	1.09 mmol/L	Glass tube	± 5.2%	+0.3	+1.9	+0.4	+0.9	-1.8	0.0	-0.4	+7.0 ^a	24 h	6 h
		SST		+0.8	+1.1	+0.5	+2.1	+0.1	-0.8	+2.6	+3.8	24 h	24 h
		Li heparin		+0.6	+0.5	+0.9	+0.7	NT	NT	NT	NT	>4 h	>4 h
Lactate	1.33 mmol/L	Fluoride	± 17.8%	NT	NT	NT	NT	+8.8	+3.1	+11.8	+6.8	24 h	24 h
LD	158 UI/L	Glass tube	± 6.40%	NT	NT	NT	NT	-0.6	+1.5	+1.2	+4.1	24 h	24 h
		SST		NT	NT	NT	NT	+3.8	+5.8	4.2	+6.9 ^a	24 h	6 h
Glucose	4.73 mmol/L	Glass tube ± 4.5%	± 4.5%	-0.5	+1.7	-0.6	0.0	-2.6	-6.6 ^a	-11.9 ^a	-17.7 ^a	6 h	4 h
		SST		+1.2	+0.8	+0.9	+2.0	+0.9	+1.7	+1.1	+0.6	24 h	24 h
		Li heparin		-1.1	0.0	-1.9	-2.8	NT	NT	NT	NT	>4 h	>4 h
Magnesium	0.86 mmol/L	Fluoride	± 5.5%	NT	NT	NT	NT	0.0	0.0	0.0	0.0	24 h	24 h
		Glass tube		-0.3	-0.7	-0.8	-0.1	-0.1	+0.6	+0.5	+2.5	24 h	24 h
		SST		-0.8	-0.6	0.0	-1.0	-0.4	+1.1	+0.1	+1.4	24 h	24 h
		Li heparin		-0.5	-0.6	-0.5	+0.1	NT	NT	NT	NT	>4 h	4 h

Стабильность некоторых аналитов в сыворотке, плазме (Li-Heparin) и плазменных гелевых пробирках в ходе хранения при +4 °C в течение 2 сут

Analyte	Type of Analyte	N	means at 3 times (n)			Statistical Significance at T ₀	RV (%) (T ₄₈ - T ₀)/T ₀	TE (%)	Clinical Significance
			0	24	48				
AST (U/L)	S	40	27.7	27.5	28.2	S-P(n)	1.8	15.2	n
	P	40	27.4	28.6	29.6	P-G(s)	8.0		n
	G	40	26.5	27.3	28.0	S-G(s)	5.7		n
TP (g/L)	S	40	68.0	67.8	69.1	S-P(s)	1.6	3.4	n
	P	40	70.4	72.1	74.6	P-G(n)	6.0		s
	G	40	70.5	70.7	72.8	S-G(s)	3.3		n
ALP (U/L)	S	40	79.6	79.3	80.0	S-P(s)	0.5	11.7	n
	P	40	78.0	75.4	75.6	P-G(n)	-3.1		n
	G	40	78.1	76.5	75.8	S-G(s)	-2.9		n
LDH (U/L)	S	40	183.1	181.4	191.7	S-P(s)	4.7	11.4	n
	P	40	172.8	181.5	204.5	P-G(n)	18.3		s
	G	40	171.1	171.5	189.5	S-G(s)	10.8		n
GLU (mmol/L)	S	40	4.84	4.76	4.82	S-P(s)	-0.4	6.9	n
	P	40	4.74	3.93	3.19	P-G(n)	-32.7		s
	G	40	4.79	4.22	3.80	S-G(n)	-20.7		s
K ⁺ (mmol/L)	S	40	4.45	4.28	4.57	S-P(s)	2.7	5.8	n
	P	40	4.08	4.99	6.48	P-G(n)	58.8		s
	G	40	4.07	4.13	4.40	S-G(s)	8.1		s
Phosphorus (mmol/L)	S	40	1.24	1.31	1.40	S-P(s)	12.9	10.2	s
	P	40	1.19	1.38	1.70	P-G(n)	42.9		s
	G	40	1.20	1.25	1.37	S-G(s)	14.2		s

Особенности работы с гелевыми пробирками

Недозаполнение пробирок кровью



Тип пробы	Последствия
Сыворотка (без добавок)	Нехватка образца (объем забираемой крови д.б. в 2,5 раза > нужного объема сыворотки)
Сыворотка (с гелем)	<u>Плохой гелевый барьер</u>, нехватка образца
Плазма (с цитратом)	<u>Замедление коагуляции</u> (↑ АЧТВ, ПВ / МНО, ↓ ПТИ...)
Плазма (с гепарином / гелем)	<u>Ошибочные результаты</u> из-за избытка гепарина (гормоны, антитела, белки...), <u>плохой гелевый барьер</u>
Цельная кровь (с сухим K₂ЭДТА)	Изменения окрашивания и морфологии клеток, <u>сдвиги MCV, MCH, MCHC...</u>

Гемолиз

Основные причины:

ВЗЯТИЕ КРОВИ

1. слишком тугий турникет
2. слишком тонкая игла
3. место пункции не просушено
4. неаккуратная пункция (гематома, попадание тканевой жидкости)
5. взятие и перенос крови шприцем
6. энергичное встряхивание вместо аккуратного перемешивания

ТРАНСПОРТ ОБРАЗЦОВ

1. Слишком высокая или слишком низкая температура, случайное замораживание образца
2. Тряска / вибрация при перевозке

ОБРАБОТКА КРОВИ

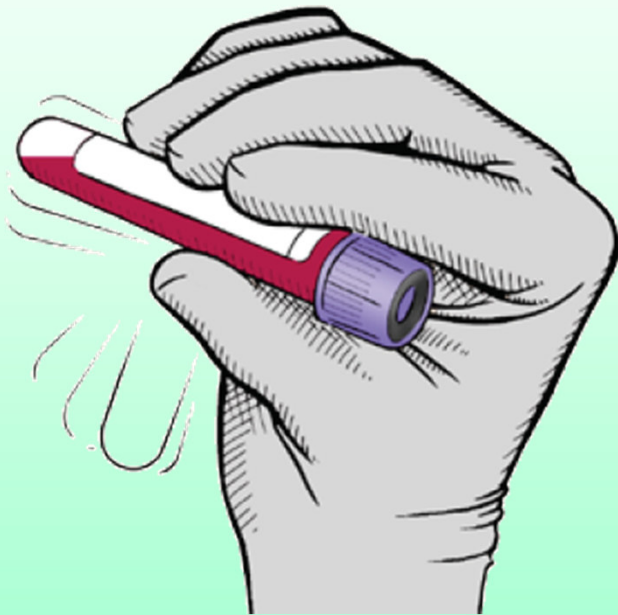
1. слишком большая длительность / скорость центрифугирования
2. задержка отделения плазмы / сыворотки от осадка более чем на 2-3 часа



Риск гемолиза намного выше в сыворотке, чем в плазме

Перемешивание пробирок

- сразу после заполнения кровью !



3 - 4 раза

5 раз

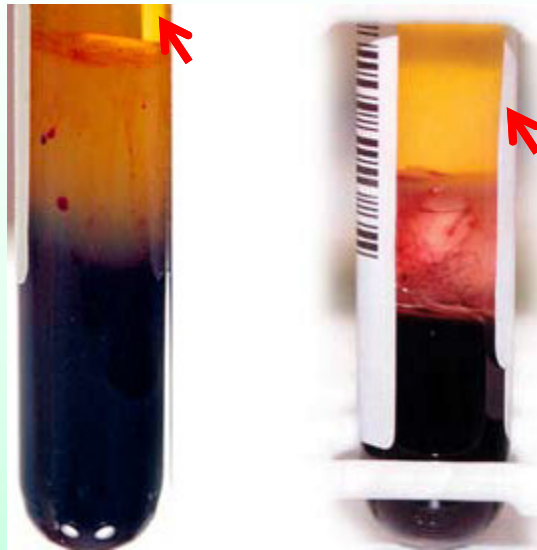
8 раз (!)

необязат.

При плохом перемешивании – сгустки и искажение результатов,

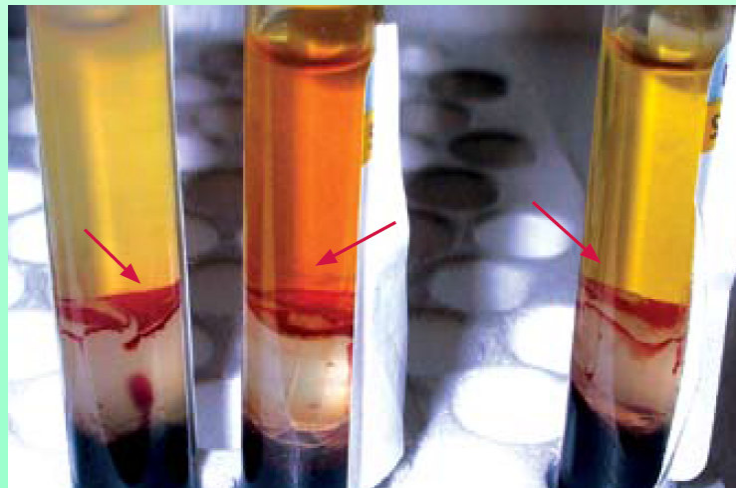
При слишком энергичном перемешивании возможен гемолиз.

Плохое перемешивание образца



Наличие небольшого количества клеток в геле – в норме (слева).

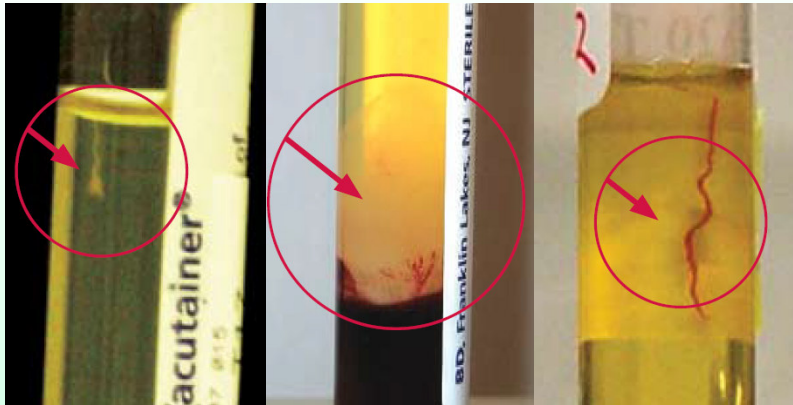
Слишком много клеток в геле (справа) – результат плохого перемешивания крови с активатором свертывания (влияет на уровень калия, ЛДГ и др.)



Много клеток на гелевом барьере

1. Недостаточное перемешивание перед ЦФ
2. Низкая температура ЦФ (opt = +25°C)

Плохое перемешивание / длит. хранение

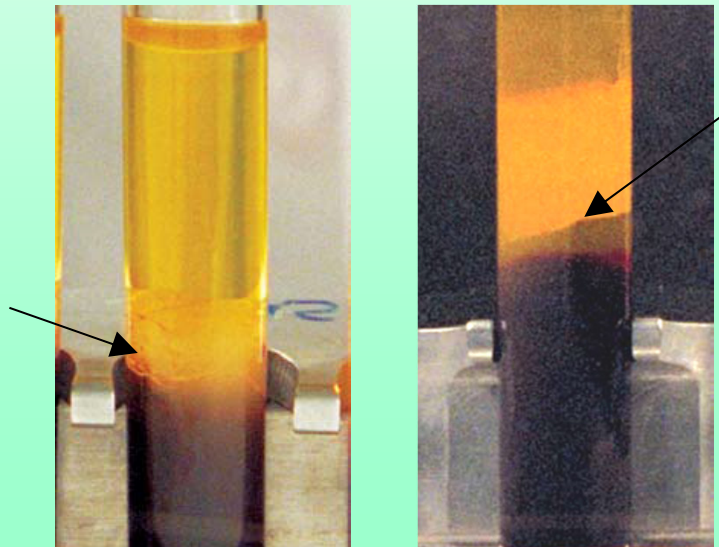


ОБРАЗОВАНИЕ ФИБРИНОВЫХ НИТЕЙ

Может быть причиной серьезных поломок анализаторов.

Причины:

- Недостаточное перемешивание с активатором свертывания
- Недостаточная инкубация для образования сгустка



ОБРАЗОВАНИЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО СЛОЯ СЫВОРОТКИ между гелем и сгустком

- длительное отстаивание после ЦФ сывороточной гелевой пробирки (перед / после тестирования)

Повторное центрифугирование гелевых пробирок недопустимо (сыворотка содержит компоненты сгустка / клеток)

Недостаточная инкубация образца

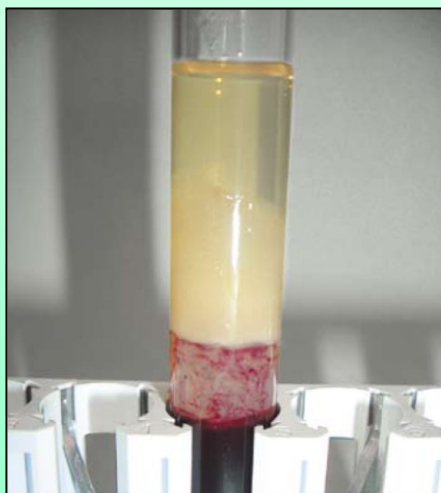


ОБРАЗОВАНИЕ ФИБРИНОВЫХ НИТЕЙ

Может быть причиной серьезных поломок анализаторов.

Причины:

- Недостаточное перемешивание с активатором свертывания
- Недостаточная инкубация для образования сгустка



ОБРАЗОВАНИЕ ФИБРИНА В СЫВОРОТКЕ НАД ГЕЛЕМ

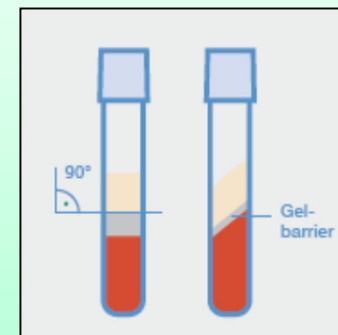
Причина - ЦФ сывороточной гелевой пробирки сразу после взятия крови (не дожидаясь полного свертывания)

Центрифугирование пробирок с кровью

- При комнатной температуре ! (особенно для пробирок с гелем – его свойства меняются при сдвигах температуры).
- ЦФ сывороточных пробирок, в т.ч. гелевых – после образования сгустка !!! (через 30 мин – 1 ч после взятия крови).
- Повторное центрифугирование не рекомендуется (особенно пробирки с гелем).

$$N \text{ (об/мин)} = \sqrt{(100000 * RCF(g) / 1,12 * R(см))}$$

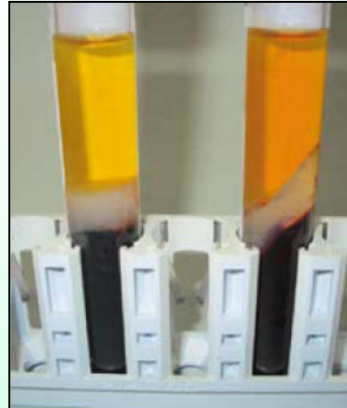
Богатая ТЦ плазма (PRP)	150 – 200 g, 5 мин
Бедная ТЦ плазма (PPP)	1500 – 2000 g, 10-15 мин
Бестромбоцитная плазма (PFP)	1500 – 2000 g, 10 мин (повторно), или 2500 – 3000 g, 20 мин



Ошибки центрифугирования



Вертик. положение пробирки до ЦФ (правильное)



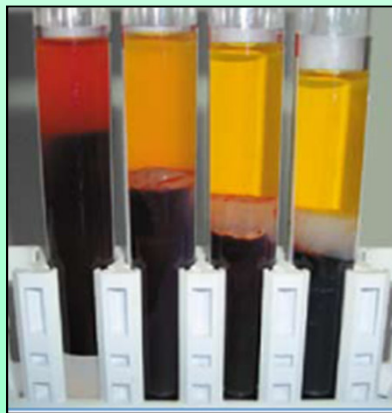
ЦФ в горизонтальном и угловом роторе



Горизонтальное положение пробирки до ЦФ (сгусток по оси пробирки)



Горизонтальное положение пробирки при транспортировании + угловой ротор

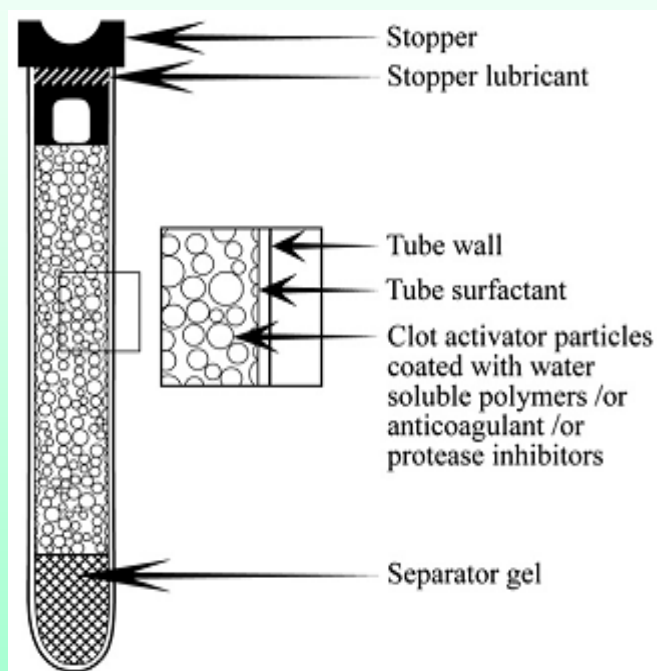


Заниженное время ЦФ (справа - норма)



Заниженная скорость ЦФ (справа - норма)

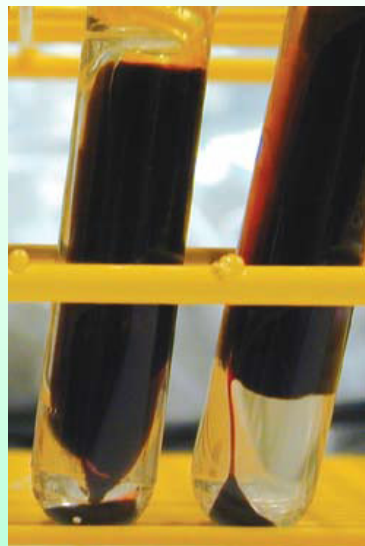
Возможная аналитическая интерференция с компонентами гелевых вакуумных пробирок



ВОЗМОЖНО:

- **Высвобождение интерферирующих веществ** из материала стенки пробирки / пробки / сурфактанта / геля / активатора свертывания / антикоагулянта...
- **Сорбция аналитов** на стенках пробирки / сурфактанте / пробке / геле (TDM, гормоны...)

Нарушение формирования гелевого барьера и отделения плазмы / сыворотки от сгустка / осадка клеток



ВОЗМОЖНЫЕ ПРИЧИНЫ:

- **Высокий удельный вес плазмы** из-за повышенного содержания белков-парапротеинов (миелома, лимфома...) либо нарушения образования фибрина
- **Нарушение режима ЦФ** – «недокрут» (снижение скорости ЦФ), **снижение температуры во время ЦФ** (нарушение свойств геля)...
- **Плохое качество** самого геля / нарушение условий хранения пробирок

ТЕМ НЕ МЕНЕЕ: «ПЛЮСЫ» гелевых технологий

- ✓ После ЦФ гель образует постоянный барьер между сывороткой / плазмой и клетками /сгустком.
- ✓ Можно хранить (и замораживать) и транспортировать сыворотку без влияния компонентов клеток и разрушения генетических маркеров
- ✓ Нет необходимости в аликвотировании, использовании вторичных пробирок, наконечников, дополнительном месте для утилизации
- ✓ Сыворотку можно хранить в первичной пробирке
- ✓ Гелевые пробирки экономичнее, чем обычные пробирки, и дают более качественные результаты





**СПАСИБО
ЗА ВНИМАНИЕ !**

alex_gilm @ mail.ru