

# СТАНДАРТИЗОВАННАЯ ТЕХНОЛОГИЯ «ИССЛЕДОВАНИЕ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПРОТОЧНЫХ ЦИТОФЛЮОРИМЕТРОВ- АНАЛИЗАТОРОВ» (ПРОЕКТ)

Хайдуков С.В.<sup>1,2</sup>, Байдун Л.А.<sup>3</sup>, Зурочка А.В.<sup>4</sup>,  
Тотолян Арег А.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ Федеральный Научно-Клинический Центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва

<sup>2</sup> ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

<sup>3</sup> ФГБУ Российская Детская Клиническая Больница, Москва

<sup>4</sup> Учреждение РАН НИИ иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург

<sup>5</sup> ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

## 1. Цель исследования

Стандартизованная технология устанавливает единые требования к выполнению исследований субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением многопараметровых проточных цитофлюориметров-анализаторов в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений.

Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови является одним из наиболее широко применяемых методов клинической лабораторной диагностики, который позволяет оценить состояние иммунной системы и ее нарушения при первичных и вторичных иммунодефицитных состояниях, аутоиммунных заболеваниях, воспалительных процессах, аллергических реакциях и в целом ряде других патологий. Любые отклонения результатов лабораторного анализа от нормативных зна-

чений тракуются как патологические и требуют более тщательного клинического и функционального обследования пациента. Все результаты лабораторного анализа должны быть сопоставлены с клинической картиной заболевания.

В последнее время широкое применение многопараметровых проточных цитофлюориметров-анализаторов начинает вытеснять флюоресцентную микроскопию в анализе субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови при иммунологических исследованиях. Это происходит за счет более высокой производительности, скорости анализа и меньших трудозатрат. Многопараметровые проточные цитофлюориметры-анализаторы позволяют автоматизировать процесс анализа лейкоцитов периферической крови, повысить производительность труда в лабораториях, улучшить качество, статистическую достоверность, точность измерения и получить дополнительные, высокоинформативные характеристики субпопуляционного состава клеток периферической крови.

Цель настоящей стандартизованной технологии, в соответствии с положениями системы менеджмента качества в медицинской лаборатории (ГОСТ Р ИСО15189-2009) [1], состоит в установлении единых правил доставки материала в лабораторию, требований к качеству образцов крови;

## Адрес для переписки:

Хайдуков Сергей Валерьевич,  
Институт биоорганической химии  
им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской Академии Наук  
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.  
Тел.: (985) 923-41-62.  
E.mail: khsergey54@mail.ru

порядка калибровки проточных цитофлуориметров-анализаторов, выполнения исследования, контроля качества, регистрации и оценки результатов исследования с учетом аналитических характеристик конкретных моделей проточных цитофлуориметров-анализаторов. Стандартизация и соблюдение указанных правил обеспечивает получение правильной информации о субпопуляционном составе клеток периферической крови.

## 2. Обозначения, термины, определения, сокращения

### 2.1. Употребляемые сокращения

**ВИЧ** – вирус иммунодефицита человека

**CD** – кластер дифференцировки (The Cluster of Differentiation)

**ДНК** – дезоксирибонуклеиновая кислота

**ИКК** – иммунокомпетентные клетки

**НК, или NK (Natural killers)**, – натуральные (естественные) киллеры

**ПЦ** – проточная цитофлуориметрия (цитометрия)

**СПИД** – синдром приобретенного иммунодефицита

### 2.2. Термины и определения

**Проточная цитофлуориметрия** – современная технология быстрого измерения характеристик клеток при помощи моноклональных антител или других зондов, позволяющая судить об их типе (по наличию того или иного набора клеточных маркеров) и их функциональном состоянии (по изменению протекающих в них процессах).

**Иммунный статус** – оценка состояния иммунной системы, включающая в обязательном порядке исследование основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови пациентов. Анализ клеточных элементов иммунного статуса пациентов определяют при помощи иммунофенотипирования.

**Имунофенотипирование** – характеристика клеток при помощи моноклональных антител или других зондов, позволяющая судить об их типе и функциональном состоянии по наличию того или иного набора клеточных маркеров.

**Собственные параметры клетки** – морфологические параметры (размер и гранулярность), определяемые характеристиками светорассеяния (прямого и бокового).

**Внешние параметры клетки** – параметры, полученные в результате анализа клеток после флуоресцентного окрашивания поверхностных маркеров.

**CD-Маркеры** – поверхностные молекулы клеточной мембраны лейкоцитов и тромбоцитов, соответствующие кластерам дифференцировки и определяемые при помощи моноклональных антител. Могут служить маркерами различных клеточных популяций и их функций.

**Гейтинг** – логически ограниченная зона клеток с определенными характеристиками на гистограммах распределения клеток по морфологическим или флуоресцентным параметрам. В дальнейшем используется для анализа конкретной популяции клеток.

**Лимфоцитарный гейт** – логически ограниченная зона клеток по морфологическим или флуоресцентным параметрам, характерным исключительно для лимфоцитов.

**Гомогенный гейтинг**: основан на определении двух собственных клеточных параметров или двух внешних параметров.

**Гетерогенный гейтинг**: основан на сочетании собственного клеточного и внешнего параметров (морфологической характеристики и флуоресцентного окрашивания).

**Двух-платформенная технология**: в подсчете абсолютного количества клеток задействованы 2 прибора – проточный цитофлуориметр и гематологический анализатор. Результат гематологического анализа вводится в программу обсчета цитофлуориметра, и в результате обсчета получается значение абсолютного количества определенных клеток в единице объема.

**Одно-платформенная технология**: подсчет абсолютного и относительного количества клеток осуществляется исключительно на проточном цитофлуориметре относительно специальных реагентов.

**Стандарты настройки (выравнивания)**: частицы с высокой однородностью и высокой интенсивностью флуоресценции, используемые для верификации оптической настройки и оптимизации системы потока жидкости.

**Разрешение** – способность прибора различать сигналы разной интенсивности и, таким образом, обеспечивать хорошее разделение популяций клеток в исследуемых образцах. Разрешение зависит от правильности оптической настройки прибора.

**Стандарты калибровки**: содержат набор частиц с разной интенсивностью флуоресценции, окрашенные разными флуорохромами. Используются для оценки параметров состояния системы: линейности, чувствительности, а также оценки динамического диапазона.

**Линейность** – способность прибора давать результат прямо пропорциональный количеству исследуемого параметра в образце.

**Чувствительность** – минимальная флуоресценция, которую способен определять прибор.

**Динамический диапазон** – спектр интенсивности флуоресценции, который может быть измерен прибором.

**Референсные стандарты** – частицы, окрашенные флуорохромами, с интенсивностью флуоресценции, близкой к интенсивности флуорес-

ценции клеток в исследуемых образцах, которые используются для установки окна анализа.

**Окно анализа** — спектр интенсивности флюоресценции, измеряемой прибором при определенных настройках.

**Коэффициент вариации (CV):** отражает вариативность значения показателя при определении его одним и тем же методом несколько раз. Определяется по формуле:  $CV = SD/MEAN \times 100\%$ , где SD — стандартное отклонение, MEAN — среднее значение.

**Целевой канал** — положение пика (MEAN) внутри окна анализа при исследовании референсных стандартов. Используется для стандартизации настроек прибора.

### 3. Требования к обеспечению выполнения технологии

#### 3.1. Требования к специалистам и вспомогательному персоналу

Перечень специалистов с высшим и средним образованием, участвующих в выполнении технологии:

- врач клинической лабораторной диагностики;
- биолог;
- лабораторный техник со средним медицинским образованием.

#### Требования к образованию специалистов

Цитофлуориметрические исследования субпопуляционного состава клеток периферической крови имеют право проводить врачи клинической лабораторной диагностики и биологи, прошедшие специализацию и повышение квалификации в установленном законом порядке. Врачи или биологи должны иметь Сертификат специалиста по специальности «Клиническая лабораторная диагностика». Знания и умения должны подтверждаться Сертификатом фирмы-производителя оборудования, результатами тестирования, записями в журнале инструктажа ответственным сотрудником лаборатории. Подготовительную работу выполняет лабораторный техник со средним медицинским образованием, имеющий соответствующий сертификат (медицинского технолога, медицинского лабораторного техника, фельдшера-лаборанта или лаборанта).

Работа по выполнению указанной методики в лаборатории распределяется следующим образом:

Медицинские технологи и фельдшеры-лаборанты имеют допуск к иммунологическим исследованиям методом ПЦ на этапе пробоподготовки при наличии Сертификата специалиста по «Клинической лабораторной диагностике».

а) Персонал со средним медицинским образованием проводит: прием, регистрацию полученного биологического материала, пробоподготовку и регистрацию результатов;

б) Врачи клинической лабораторной диагностики и биологи проводят исследование на проточном цитофлуориметре-анализаторе. По результатам исследования дают заключение об отклонениях от референтных значений, оценивают возможные патологические процессы, вызвавшие отклонения от нормы, дают рекомендации о необходимости дополнительных исследований (повторное проведение измерения, расширение спектра исследуемых маркеров и т.д.), а также о срочном информировании врачей клинических отделений. Врачи клинической лабораторной диагностики консультируют клиницистов и помогают в интерпретации результатов исследований.

Требования к знаниям и умениям специалистов должны соответствовать образовательным стандартам по специальности «Клиническая лабораторная диагностика».

#### 3.2. Требования к обеспечению безопасности труда медицинского персонала

Требования по безопасности труда при выполнении технологии соответствуют общим правилам безопасности при работе в клинко-диагностической лаборатории согласно ГОСТ Р 52905 — 2007 [2]. Должны соблюдаться правила биологической безопасности, правила сбора, хранения и удаления отходов различных классов [3], правила работы с электроприборами и химическими реактивами, пожарной безопасности.

Все образцы, содержащие биологический материал (образцы периферической крови), являются потенциальными источниками инфекции. Для соблюдения биологической безопасности выполняют следующие правила: распаковка присланного в лабораторию биологического материала проводится в индивидуальных средствах защиты (халаты, резиновые перчатки, очки); после окончания работы в резиновых перчатках проводят дезинфекцию использованных расходных материалов, рабочих мест и помещений лаборатории. Для обеззараживания используются средства, рекомендуемые для дезинфекции согласно СанПин.

Все сотрудники должны выполнять инструкции и правила техники безопасности, изложенные в технических паспортах к применяемым в технологии проточных цитофлуориметрических анализаторов.

Все сотрудники лаборатории, работающие с реактивами, должны быть обучены обращению с ними, использовать средства персональной защиты, соблюдать правила личной гигиены.

Для предупреждения пожаров необходимо соблюдать правила пожарной безопасности в соответствии с действующими нормативными документами.

### 3.3. Материальные ресурсы, необходимые для выполнения технологии: приборы, средства измерения, лабораторное оборудование

1. Проточный цитофлуориметр-анализатор, соединенный с рабочей станцией (компьютером) и принтером;

ПРИМЕЧАНИЕ 1. Должны использоваться только приборы, прошедшие регистрацию в установленном порядке.

2. Холодильник бытовой (t 2-8 °С);

3. Холодильник фармацевтический со звуковой сигнализацией для хранения антител;

4. Вихревой встряхиватель (шейкер типа «Вортекс»);

5. Центрифуга лабораторная (до 3000 об/мин);

6. Комплект одноканальных дозаторов механических или электронных полуавтоматических со сбрасывателем наконечника. *Повторное использование наконечников категорически не допускается;*

7. Реактивы, контрольные и расходные материалы;

8. Пластиковые одноразовые пробирки (для цитофлуориметрических исследований, 75 × 12 мм) с крышками. *Повторное использование пробирок категорически не допускается;*

9. Вакуумные пробирки (в составе вакуумной системы) для венозной крови с К<sub>2</sub>ЭДТА (1,5-2,2 мг/мл крови) или с другими антикоагулянтами объемом 2-5 мл;

10. Устройство для перемешивания образцов крови;

11. Штативы для пробирок;

12. Транспортные изотермические контейнеры (при наличии неблагоприятных условий транспортировки образцов);

13. Резиновые перчатки;

14. Дезрастворы.

### 3.4. Реактивы для окрашивания лимфоцитов

**3.4.1.** Для цитофлуориметрических исследований в качестве зондов, позволяющих локализовать клетки мишени, используют моноклональные антитела. Для исследований в медицинских целях следует использовать моноклональные антитела со следующей маркировкой:

**In Vitro Diagnostic (IVD)** – эти продукты могут использоваться для клинической диагностики.

**CE-marked (CE) “Conformit Europeenne”** – продукты, утвержденные Советом Европы для *in vitro* диагностики, могут быть свободно использованы повсюду на территории ЕС.

**Analyte Specific Reagents (ASR)** – применение данных реагентов допускается в лабораторных исследованиях, однако ответственность за их использование и полученные с их помощью результаты полностью лежит на лаборатории.

Для исследований в медицинских целях не следует использовать моноклональные антитела со следующей маркировкой:

**Research Use Only (RUO)** – эти продукты не могут быть использованы для клинического анализа, прогноза или терапевтического диагноза.

### 3.4.2. Реагенты для лизиса эритроцитов и фиксации окрашенных клеток

Реагенты должны иметь маркировку **IVD**.

Все реактивы должны быть сертифицированы в установленном порядке, а исполнители технологии обязательно должны учитывать спецификации изготовителя, которые должны соответствовать требованиям точности методики.

### 4. Характеристика методик выполнения состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов

Технология исследования субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов:

а) доставка, прием и регистрация биологического материала;

б) приготовление аналитических проб из доставленных образцов;

в) калибровка проточных цитофлуориметров-анализаторов и создание протокола анализа;

г) подсчет и исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов в соответствии с инструкцией к прибору;

д) оценка результатов подсчета и исследования субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови;

е) оценка правильности исследования (контроль качества исследования);

ж) регистрация заключений.

### 4.1. Правила взятия образцов крови

На точность и правильность результатов оказывает влияние техника взятия крови, используемые при этом инструменты (иглы, скарификаторы и др.), а также пробирки, в которые берется, а в последующем хранится и транспортируется кровь.

Кровь для клинического анализа берут у пациента из вены, у новорожденных – из пятки.

ПРИМЕЧАНИЕ. Использование капиллярной крови нежелательно, так как результаты исследования в капиллярной крови могут отличаться от венозной из-за сложности перемешивания образца, примеси тканевой жидкости и т.д.

Кровь следует брать натощак (после примерно 12 часов голодания, воздержания от приема алкоголя и курения), между 7 и 9 часами утра, при минимальной физической активности непо-

средственно перед взятием (в течение 20–30 мин), в положении пациента лежа или сидя.

Взятие материала следует проводить в резиновых перчатках, соблюдая правила асептики.

#### 4.2. Венозная кровь

Венозная кровь считается лучшим материалом для исследования субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов. При стандартизации процессов взятия, хранения, транспортировки венозной крови, удастся добиться минимальной травматизации и активации клеток, примеси тканевой жидкости, имеется возможность повторить и/или расширить анализ за счет окрашивания некоторых других клеточных маркеров.

Достоверность и точность цитофлуориметрических исследований, проводимых из венозной крови, во многом определяется техникой взятия крови. Подготовка пациента к взятию крови из вены включает несколько этапов.

Место венепункции нужно продезинфицировать марлевой салфеткой или специальной безворсовой салфеткой, смоченной 70° спиртом, и подождать до полного высыхания антисептика (30–60 секунд). Применение ватных тампонов и других волокнистых материалов подобного рода может привести к засорению волокнами счетной и гемоглобиновой камер, что влечет за собой снижение точности и воспроизводимости измерения. Не рекомендуется использовать 96° спирт, так как он дубит кожу, поры кожи закрываются, и стерилизация может быть неполной.

Не рекомендуется вытирать и обдуть место прокола, пальпировать вену после обработки. Рука пациента должна покоиться на твердой поверхности, быть вытянута и наклонена немного вниз так, чтобы плечо и предплечье образовывали прямую линию. Необходимо следить, чтобы в момент взятия крови кулак пациента был разжат. Жгут следует накладывать не более чем на 1–2 минуты, тем самым обеспечивается минимальный стаз, при котором клетки крови не повреждаются. Игла (стерильная одноразового использования) должна быть достаточно большого диаметра и иметь короткий срез, чтобы не травмировать противоположную стенку вены во избежание тромбоза. После взятия крови необходимо приложить сухую стерильную салфетку к месту венепункции, а затем наложить давящую повязку на руку или бактерицидный пластырь.

**ПРИМЕЧАНИЕ.** Кровь для цитофлуориметрических исследований должна поступать свободным током непосредственно в пробирку, содержащую антикоагулянт. Взятие крови шприцом без антикоагулянта с последующим переливанием в пробирку не допускается из-за формирования микросгустков и гемолиза.

Рекомендуется применение вакуумных пробирок для взятия венозной крови небольшого объема (2–5 мл) с размером диаметра и высоты пробирки 13 × 75 мм. Под влиянием вакуума кровь из вены быстро поступает в пробирку, что упрощает процедуру взятия и сокращает время наложения жгута.

Вакуумная система состоит из трех основных элементов, соединяющихся между собой в процессе взятия крови: стерильной одноразовой пробирки с крышкой и дозированным содержанием вакуума, стерильной одноразовой двусторонней иглы, закрытой с обеих сторон защитными колпачками, и одно- или многоразового иглодержателя. Пробирки, входящие в закрытую вакуумную систему, содержат различные добавки и антикоагулянты, в том числе и для проведения гематологических исследований. Метод взятия крови с помощью закрытых вакуумных систем имеет ряд преимуществ, основными из которых являются обеспечение высокого качества пробы и предотвращение любого контакта с кровью пациента, а значит, обеспечение безопасности медицинского персонала и других пациентов за счет существенного снижения риска заражения гемоконтактными инфекциями.

В качестве антикоагулянта для сбора образцов крови, предназначенных для подсчета клеток крови и определения их размера, международный комитет по стандартизации в гематологии (ICSH) рекомендовал соль этилендиаминтетрауксусной кислоты ( $K_2$ -ЭДТА,  $K_3$ -ЭДТА).

Необходимо учитывать, что все соли ЭДТА вызывают сокращение клетки в объеме, что влияет на центрифужный, но не на расчетный гематокрит. Поскольку при применении ( $K_2$ -ЭДТА) клетки разбухают больше, то происходит компенсирование, осмотически вызванное сморщивание клеток. Следует отметить, что лимфоциты более стабильны по отношению к ЭДТА, чем нейтрофилы и моноциты. Это необходимо учитывать при хранении крови и использовании для подсчета формулы крови на гематологических и цитофлуориметрических проточных анализаторах.

При концентрации ЭДТА 1,5-г/л в образцах крови, взятых не более часа назад, возникают очень незначительные изменения морфологии нейтрофилов. Однако при более высоких концентрациях уже в течение первого часа происходит потеря мостиков между сегментами ядер, потеря цитоплазматических связей и раннее разделение.

**При использовании рекомендованных концентраций солей ЭДТА ( $K_2$ - и  $K_3$ -ЭДТА) и при проведении анализа в пределах 1–4 часов после взятия крови существенных изменений не происходит.** Объем взятой крови должен соответствовать количеству антикоагулянта, для обеспечения концентрации

антикоагулянта в образце. Для ЭДТА оптимальная концентрация составляет  $1,5 \pm 0,15$  мг/мл, для гепарина – 20 МЕ на мл.

Необходимо строго соблюдать объем взятой крови, который должен соответствовать указанной отметке на пробирке. Несоблюдение этого условия, а также недостаточно тщательное перемешивание крови приведет к изменению конечной концентрации антикоагулянта во взятой крови, что может повлечь за собой появление микросгустков, неточное определение концентрации клеточных элементов, искажение морфологической структуры клеток.

**ПРИМЕЧАНИЕ 1.** Запрещается использовать пробирки с выпаренным раствором  $K_2$ ЭДТА, приготовленные в условиях лаборатории. При испарении на дне пробирки образуются крупные кристаллы  $K_2$ ЭДТА, которые очень медленно растворяются в крови. Это может приводить к образованию фибриновых нитей в верхней части пробирки.

**ПРИМЕЧАНИЕ 2.** Технология приготовления пробирок с сухим напылением  $K_2$ ЭДТА (или  $K_3$ ЭДТА) обеспечивает равномерное распределение  $K_2$ ЭДТА (или  $K_3$ ЭДТА) по стенкам пробирки.

Сразу после заполнения пробирки кровью до указанного на ней объема пробу следует осторожно перемешать плавным переворачиванием и вращением пробирки в течение не менее 2 минут (переворачивание 8-10 раз). Пробирки нельзя встряхивать – это может вызвать пенообразование и гемолиз, а также привести к механическому лизису эритроцитов.

#### 4.3. Диагностические и лечебные мероприятия

На результаты лабораторных исследований могут оказывать влияние следующие диагностические и лечебные мероприятия: внутривенное введение лекарственных препаратов, переливание крови, оперативные вмешательства, диализ, пункции, прием рентгеноконтрастных и лекарственных веществ, эндоскопия, функциональные тесты, ионизирующее излучение.

Загрязнение лабораторных проб инфузионными растворами является самой обычной и часто встречаемой формой преаналитической интерференции в больницах.

**ТАБЛИЦА 1. СРОКИ ВЗЯТИЯ ПРОБ ПОСЛЕ ПРЕКРАЩЕНИЯ ВЛИВАНИЯ**

Вид вливания	Время до взятия пробы
Аминокислоты и гидролизаты белков	1 час
Электролиты	1 час
Растворы, богатые углеводами	1 час
Эмульсии жиров	8 часов

#### 4.4. Последовательности диагностических и лечебных процедур

Пробу крови никогда не следует брать из вены, расположенной проксимально месту инфузии. Пробы следует брать из другой руки, в вены которой не проводилось вливание. Перед тем, как производить взятие пробы после проведенной инфузионной терапии, следует выждать определенный период времени (табл. 1).

В направлении, при отправке образца в лабораторию, необходимо указывать: какую процедуру получил данный пациент, когда и какое вливание произведено пациенту.

#### 4.5. Взятие пробы из катетера

При взятии пробы из катетеров канюлю следует промыть изотоническим солевым раствором (физиологическим раствором) в объеме, соизмеримом с объемом катетера. Первые 5 мл крови удалить и только затем взять основную пробу.

На пробирке с образцом должны быть указаны идентифицирующие данные пациента и точное время забора крови. В сопроводительных документах должны быть указаны фамилия, имя и отчество пациента, возраст, пол, дата и время забора крови. При наличии установленного диагноза необходимо его указать для правильной последующей интерпретации полученных результатов. В случае если в момент обследования пациент принимает лекарственные препараты (антибиотики, гормоны, цитостатики), в сопроводительных документах должны быть сделаны соответствующие пометки.

#### 4.6. Правила доставки, хранения и подготовки проб к исследованию

Для обеспечения качественного результата исследований нужно четко контролировать время и условия хранения проб до выполнения анализа.

При транспортировке и хранении образцы должны находиться в контейнерах в вертикальном положении.

Образцы проб должны храниться в закрытых сосудах, чтобы избежать испарения и попадания микроорганизмов. Для этого необходимо использовать одноразовые системы для сбора проб. При хранении очень важно соблюдать температурный режим. Температура при транспортировке, хранении и обработке образцов должна быть  $18-23^{\circ}$ .

Высокие температуры оказывают влияние на количество клеток венозной крови. В летний период времени, когда уличная температура колеблется в диапазоне  $30-32^{\circ}$ , наблюдается дегрануляция гранулоцитов и, как следствие этого, значительное снижение их количества.

**Для иммунофенотипирования нельзя хранить образцы крови с антикоагулянтами в холодильнике!**

Непосредственно перед исследованием кровь должна быть тщательно перемешана в течение нескольких минут для равномерного распределения форменных элементов в плазме. Длительное

постоянное перемешивание образцов до момента их исследования не рекомендуется вследствие возможного травмирования и распада патологически измененных клеток.

Проводить исследование образцов крови с К<sub>3</sub>-ЭДТА рекомендуется не позднее 6 часов после взятия образца, так как при более длительном хранении происходит слипание и агглютинация тромбоцитов и их прилипание к нейтрофилам, эти явления прогрессируют по мере увеличения времени с момента взятия крови. При этом происходит увеличение показателя общего количества лейкоцитов и снижение количества тромбоцитов.

Имунофенотипирование лимфоцитов рекомендуется проводить не позднее 48 часов при условии правильного хранения образца.

#### **4.7. Пригодность образцов крови**

Прежде чем приступить к анализу образца, необходимо осмотреть пробирку с кровью сразу после того, как ее доставили в лабораторию. Если пробирка холодная или горячая на ощупь, но кровь в ней не заморожена и не имеет явных признаков гемолиза, исследование образца допускается, однако в этом случае необходимо сделать соответствующую отметку в регистрационном журнале и отчетном документе. Однако образец не должен подвергаться быстрому охлаждению или нагреванию, так как это может негативно повлиять на результаты иммунофенотипирования.

**Исследование образца не производится в следующих случаях:**

1. Если кровь гемолизирована или заморожена.
2. Если кровь имеет видимые сгустки.
3. Если с момента забора крови прошло более 48 часов.

Во всех перечисленных случаях необходимо запросить новый образец.

#### **4.8. Подготовка аналитических проб из доставленных образцов**

##### **4.8.1. Выбор панелей моноклональных антител для иммунофенотипирования**

Для исследования субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов существует несколько вариантов выбора панелей моноклональных антител для иммунофенотипирования.

Однако, прежде всего, надо отметить, что для исследования субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови недопустимо использование одноцветных протоколов и панелей моноклональных антител.

Для мониторинга пациентов используют панели моноклональных антител первого уровня. С их помощью выявляют относительное и абсолютное количество следующих субпопуляций лимфоцитов: общие Т-клетки, Т-хелперы,

Т-цитотоксические, общие В-клетки, НК-клетки, НКТ-клетки и активированные Т-клетки. Наиболее распространенной для этих целей является панель моноклональных антител с двухцветной комбинацией флуорохромов. В данном случае для локализации области лимфоцитов используют морфологические параметры этих клеток (светорассеяние под малыми углами и светорассеяние под углом 90°) [7, 8]. Как правило, для определения состояния клеточного звена иммунитета для одного пациента готовят и анализируют 7 пробирок. В таблице 2 приведен пример панели моноклональных антител с двухцветной комбинацией флуорохромов.

Однако в результате лизиса эритроцитов при безотмывочной технологии достаточно часто возникают проблемы с корректным выбором зоны анализа лимфоцитов. Это связано с тем, что не всегда удается полностью лизировать эритроциты при различных патологиях, что приводит к перекрыванию областей лимфоцитов и нелизированных эритроцитов. Следствием этого является некачественный результат анализа. Для исключения подобных проблем необходимо использовать трехцветный анализ с выбором зоны анализа лимфоцитов по экспрессии CD45. В этом случае сокращается и количество анализируемых образцов до 5-ти для одного пациента [9]. В таблице 2 приведен пример панели моноклональных антител с трехцветной комбинацией флуорохромов.

При наличии проточных цитофлуориметров-анализаторов, позволяющих регистрировать четыре цвета, необходимо использовать четырехцветные комбинации моноклональных антител. В этом случае количество анализируемых образцов сокращается до трех для одного пациента. В таблице 2 приведен пример панели моноклональных антител с четырехцветной комбинацией флуорохромов.

Таким образом, выбор панели первого уровня для исследования субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови пациентов во многом зависит от наличия соответствующего оборудования и опыта персонала.

В тех случаях, когда в результате анализа наблюдаются отклонения от референтных значений, для оценки возможных патологических процессов, вызвавших эти отклонения, рекомендуется провести дополнительное исследование. В данном случае необходимо использовать панели моноклональных антител второго уровня, включающие в себя расширенный спектр исследуемых маркеров (табл. 3) [11].

##### **4.8.2. Подготовка образцов для цитофлуориметрического анализа**

1. Поместить раствор моноклональных или поликлональных антител, меченых флуорохромом, в количестве, рекомендованном фирмой

производителем, в пробирку для цитофлуориметрического анализа (12 × 75 мм).

**ПРИМЕЧАНИЕ.** Как правило, добавляют объемы, равные 5-20 мкл. В случаях многоцветного анализа допускается смешение нескольких моноклональных антител, конъюгированных с различными флуорохромами в одной пробирке.

2. Добавить в пробирку для цитофлуориметрического анализа (12 × 75 мм) 100 мкл периферической крови.

**ПРИМЕЧАНИЕ.** В случае попадания капель крови на стенки пробирки следует немедленно их удалить.

3. Аккуратно перемешивать при помощи вихревого встряхивателя 1-3 сек и инкубировать в защищенном от света месте в течение времени, рекомендованного фирмой-производителем.

4. Провести лизис эритроцитов при помощи лизирующих растворов согласно инструкции фирмы-производителя.

**ПРИМЕЧАНИЕ.** Как правило, лизис производится без отмывки с последующим анализом. В тех случаях, когда фирмой-производителем антител рекомендована отмывка образца, необходимо осадить окрашенные клетки центрифугированием (1000 g, 5 мин), а затем ресуспендировать в 1 мл фиксирующего раствора.

5. Провести анализ полученного образца на проточном цитофлуориметре.

**ПРИМЕЧАНИЕ.** Фиксированные образцы, возможно сохранять в холодильнике при +4 °С в течение 24 часов до анализа.

#### 4.9. Калибровка проточных цитофлуориметров-анализаторов и создание протокола анализа

##### 4.9.1 Создание протокола анализа

Данный этап состоит в следующем: настройка дискриминатора, настройка параметров светорассеяния, настройка параметров чувствительности фотоэлектронных умножителей (ФЭУ) для флуоресценции, введение коэффициентов компенсации.

**Настройка дискриминатора.** Современные цитофлуориметры обладают высокой чувствительностью по малоугловому светорассеянию, т.е. по размерам исследуемых частиц (чувствительность достигает 0,2 мкм), поэтому они регистрируют множество объектов, которые не являются клетками. Особенно это проявляется на образцах, приготовленных по так называемой безотмывочной технологии. Наличие в образце «теней» от эритроцитов, тромбоцитов и множества других объектов приводит к тому, что цитофлуориметр «захлебывается» от обилия данных и это приводит к получению недостоверных результатов. Чтобы избежать этого эффекта, необходимо ввести ограничения по отображаемым на гистограмме событиям, т.е. задать границы чувствительности цитофлуориметра.

Для этих целей служит дискриминатор. Оператор должен ввести такие значения, которые позволяют видеть все основные популяции клеток анализируемого образца, а дебрису не попадать в зону анализа. Как правило, это ограничение ставится на канал малоуглового рассеяния света. Следует отметить, что слишком завышенные значения дискриминатора могут убрать из анализа часть популяции клеток, интересующих исследователя, поэтому к этому этапу настройки цитофлуориметра необходимо подходить со всей ответственностью.

**Настройка параметров светорассеяния.** Современные цитофлуориметры используют два канала светорассеяния: регистрируются сигналы от малоуглового светорассеяния и рассеяния света под углом 90°. Малоугловое светорассеяние (Forward Scatter, FS) представляет собой рассеяние света от поверхности клеток под малыми углами (1-19°) и пропорционально диаметру исследуемого объекта. В свою очередь, канал бокового светорассеяния или рассеяния света под углом 90° (Side Scatter, SS) регистрирует весь свет, рассеянный как самой клеткой, так и ее органеллами, т.е. характеризует структуру и гранулярность объекта.

**ТАБЛИЦА 2. ПАНЕЛЬ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ С ДВУХ-, ТРЕХ- И ЧЕТЫРЕХЦВЕТНОЙ КОМБИНАЦИЕЙ ФЛЮОРОХРОМОВ**

Анализируемые субпопуляции лимфоцитов периферической крови	Панель моноклональных антител		
	с двухцветной комбинацией флуорохромов	с трехцветной комбинацией флуорохромов	с четырехцветной комбинацией флуорохромов
Изотипический контроль	IgG/IgG	нет	нет
Выбор зоны анализа для лимфоцитов	CD45/CD14	нет	нет
Общие Т- и В-клетки	CD3/CD19	CD3/CD19/CD45	CD3/CD19/ (CD56±CD16)/CD45
НК-клетки и НКТ-клетки	CD3/(CD56±CD16)	CD3/(CD56±CD16)/CD45	
Т-хелперы	CD3/CD4	CD3/CD4/CD45	CD3/CD4/CD8/CD45
Т-цитотоксические	CD3/CD8	CD3/CD8/CD45	
Активированные Т-клетки	CD3/HLA-DR	CD3/HLA-DR/CD45	CD3/HLA-DR/CD45

**ТАБЛИЦА 3. ПАНЕЛЬ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ РАСШИРЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ С ЧЕТЫРЕХЦВЕТНОЙ КОМБИНАЦИЕЙ ФЛЮОРОХРОМОВ**

Популяции и субпопуляции	Комбинация моноклональных антител
В1-клетки (CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> )	CD19/CD5/CD27/CD45
В2-клетки (CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> )	
В-клетки памяти (CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> )	
NK-клетки цитолитические (CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>dim</sup> CD45 <sup>+</sup> )	CD3/CD16/CD56/CD45
NK-клетки цитокин-продуцирующие (CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>bright</sup> CD45 <sup>+</sup> )	
Т-хелперы активированные / памяти (CD4 <sup>+</sup> CD45R0 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> )	CD4/CD45R0/CD45RA/CD45
Т-хелперы наивные (CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CD45R0 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> )	
αβТ-клетки (CD3 <sup>+</sup> αβТcR <sup>+</sup> γδТcR <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> )	CD3/αβТcR/γδТcR/CD45
γδТ-клетки (CD3 <sup>+</sup> γδТcR <sup>+</sup> αβТcR <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> )	
Т-клетки активированные (CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> ) «ранний» маркер активации	CD3/HLA-DR/CD25/CD45
Т-клетки активированные (CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> ) «поздний» маркер активации	
Регуляторные Т-клетки (CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>bright</sup> CD127 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> )	CD4/CD25/CD127/CD45

Таким образом, два вида светорассеяния позволяют регистрировать два морфологических параметра клеток.

Использование двух этих параметров позволяет локализовать в гетерогенной популяции клеток все входящие в нее компоненты. Примером могут служить лейкоциты периферической крови, состоящие из лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов. При ее анализе необходимо соблюдать следующее правило: все основные популяции клеток периферической крови должны быть отображены на гистограмме распределения клеток по двум светорассеяниям, что в последующем значительно облегчит работу.

**Настройка параметров фотоэлектронных умножителей (ФЭУ) для флюоресценции.** После настройки каналов светорассеяния можно приступать к настройке чувствительности каналов флюоресценции. Этот процесс начинают с анализа негативного контроля, который представляет собой клетки, окрашенные неспецифическими антителами, мечеными теми же флуорохромами, с которыми предстоит работать в дальнейшем (изотипический контроль). В настоящее время принято, что негативные клетки должны попадать в первую декаду на логарифмической шкале интенсивности флюоресценции по всем задействованным каналам. Следовательно, необходимо добиться того, чтобы клетки контроля легли, по возможности, в центре первой декады. Следует сразу отметить, что неспецифическое взаимодействие антител различных классов с поверхностью клеток мишеней не одинаково. Исходя из этого, антитела для контрольного образца должны быть того же изотипа, что и специфические антитела, используемые для анализа.

Следует отметить, что если клетки контроля попадают во вторую декаду, это, в конечном счете, может привести к ложно-положительным результатам, а слишком низкая чувствительность приводит к занижению реальных значений. И то и другое при клинико-диагностических исследованиях недопустимо.

**Введение коэффициентов компенсации.** После настройки чувствительности прибора в случае многоцветного анализа специалист может столкнуться с неприятным сюрпризом. Даже в случаях использования для анализа панклеточных маркеров, таких как CD19 и CD3, можно увидеть дубль-положительные клетки, хотя они в природе не встречаются. Данный парадокс связан с тем, что спектры, испускаемые флуорохромами, не бывают точечными, а имеют свое распределение в определенном диапазоне. Практически невозможно избежать дополнительной «засветки» всех ФЭУ, не предназначенных для регистрации данного флуорохрома, даже если использовать различные наборы барьерных светофильтров.

Таким образом, специалист сталкивается с необходимостью провести вычитание из интенсивности флюоресценции каждого ФЭУ дополнительного сигнала генерируемого другими флуорохромами. Данное вычитание называется введением в программу анализа коэффициентов компенсации. Пожалуй, это самый сложный и трудоемкий этап работы в процессе подготовки протоколов исследования и настройки цитофлуориметра.

Существуют правила введения коэффициентов компенсации, следование которым позволяет провести данную процедуру каждому оператору, работающему с цитофлуориметрами.

В процессе анализа оператор получает ряд статистических параметров, среди которых есть такое значение, как MEAN. Этот параметр отражает среднестатистическое положение максимума пика распределения частиц на гистограммах в выбранном канале флюоресценции или светорассеяния. Для процедуры введения коэффициентов компенсации необходимо использовать клетки, окрашенные антителами, связанными с разными флуорохромами, и проанализировать их в двухпараметрическом режиме. Антитела для этой процедуры подбирают таким образом, чтобы они относились к двум не пересекающимся кластерам дифференцировки (например, CD3-FITC и CD19-PE). Затем необходимо разбить гистограмму на четыре квадранта, где мы можем определить значение MEAN для каждого типа флюоресценции. Первое правило введения коэффициентов компенсации гласит: коэффициенты компенсации введены правильно, если MEAN квадранта 1 равен MEAN квадранта 3 по оси X, а MEAN квадранта 4 равен MEAN квадранта 3 по оси Y (рис. 1).

Сразу следует подчеркнуть, что компенсации следует вводить с использованием комбинации маркеров, обладающих самой высокой экспрессией (рис. 2). Если использовать протокол исследования, компенсации которого настроены при слабо экспрессируемых маркерах, всегда есть вероятность получить псевдодубль-позитивные события. Данный артефакт связан с тем, что иммунологические исследования, как правило, проводятся с использованием логарифмической шкалы, и чем выше экспрессия маркеров, тем большее количество событий попадает в зону двойного окрашивания. Таким образом, приходится проводить дополнительную компенсацию, чтобы исключить «псевдопозитивные» сигналы.

Существует и второе правило. Оно гласит: если мысленно нарисовать линии из центров областей позитивных клеток, то они должны быть приблизительно параллельны осям X и Y или должен образоваться прямоугольник (рис. 3).

Также следует обратить внимание на следующий факт, что между напряжением на ФЭУ и коэффициентами компенсации существует взаимосвязь. В некоторых случаях, когда специалисты переходят на реагенты других фирм-производителей, но продолжают использовать старый протокол для анализа, возникает необходимость изменить чувствительность по одному из каналов флюоресценции. Эта процедура приводит к тому, что изменяется и отображение флюоресценции на двухпараметрических гистограммах. Повышая чувствительность по одному из каналов, необходимо изменить и соответствующий этому каналу коэффициент компенсации. Например, в двухпараметрическом анализе FITC против PE задействованы два канала флюорес-

ценции (FL1 и FL2). Для повышения чувствительности по каналу флюоресценции FL2 поднимают напряжение на ФЭУ. При этом наблюдается дополнительный вклад интенсивности флюоресценции FITC в канал FL2, который необходимо вычесть за счет увеличения коэффициента компенсации (рис. 4).

Исходя из всего изложенного выше, алгоритм настройки рабочего протокола выглядит следующим образом: проверка работы цитофлуориметра; настройка дискриминатора; настройка каналов светорассеяния; настройка каналов флюоресценции; введение коэффициентов компенсации [10].

#### **4.9.2. Калибровка проточных цитофлуориметров-анализаторов**

Для калибровки, проверки оптического выравнивания источника света и контроля его мощности в проточных цитофлуориметрах используют латексные частицы, рекомендованные фирмами-производителями приборов. Это референтный материал с приемлемыми значениями коэффициентов распределения латексных частиц как по каналам регистрации светорассеяния, так и по каналам регистрации флюоресценции.

Эта процедура проводится, как правило, один раз в день или в случаях получения не корректных результатов.

#### **4.10. Аналитические процедуры**

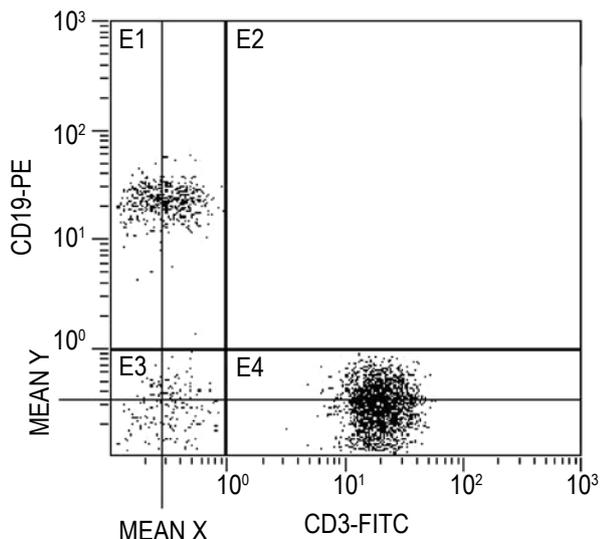
**4.10.1.** Лаборатория должна иметь перечень выполняемых аналитических процедур. Все аналитические процедуры должны проводиться в соответствии с инструкциями к диагностическим наборам, реактивам, оборудованию и утвержденными соответствующими СОП-ами.

Лаборатория должна применять зарегистрированные в установленном порядке реагенты, в частности для цитофлуориметрии (класса IVD – продукция для диагностики *in vitro* (*in vitro diagnostic products*), рекомендованные к применению в клинических исследованиях международными соглашениями, такими как СЕ (Conformite Europeenne – официальные рекомендации Европейского Союза, Директива 98/79/ЕС от 27 октября 1998 года), и прошедшими сертификацию в России.

Использование в клинической диагностике незарегистрированных продуктов недопустимо.

Лаборатория должна иметь папку с Инструкциями к использованию всех применяемых реагентов и оборудования (подробные инструкции прилагаются фирмами-производителями к приборам, реагентам и тест-наборам), которые должны храниться у заведующего лабораторией.

Подсчет абсолютного количества ИКК должен производиться либо методом проточной цитофлуориметрии с применением частиц для абсолютного счета (одноплатформенный метод),



**Рисунок 1.** Первое правило введения коэффициентов компенсации: коэффициенты компенсации введены правильно, если MEAN квадранта 1 равен MEAN квадранта 3 по оси X, а MEAN квадранта 4 равен MEAN квадранта 3 по оси Y

либо по результатам гематологического анализа (двухплатформенный метод).

**4.10.2. Обеспечение качества аналитических процедур**

Лаборатория должна применять зарегистрированные в установленном порядке реагенты. Все приборы должны проходить обязательную регистрацию в Минздраве РФ. Лаборатория должна соблюдать правила проверки состояния

прибора в соответствии с инструкцией производителя, учитывающие порядок его калибровки и частоту ее проведения.

**5. Контроль качества исследования субпопуляционного состава клеток периферической крови на проточных цитофлуориметрах-анализаторах**

**5.1. Порядок проведения контроля качества**

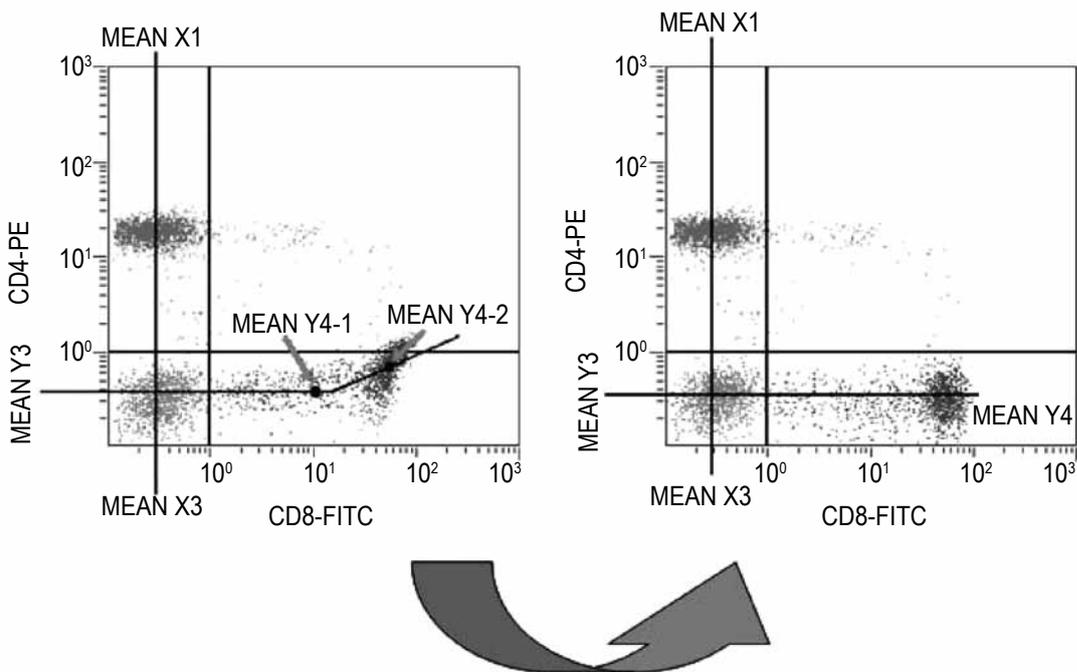
Комплексная система контроля качества клинических лабораторных исследований осуществляется путем:

- установления единых требований к аналитическому качеству количественных методов;
- выполнения процедур внутрилабораторного контроля качества с каждой серией реагентов и использованием контрольных материалов (оперативный контроль качества);
- регулярного участия в программах внешней оценки качества (ГОСТ Р 53133.1 2008) [4].

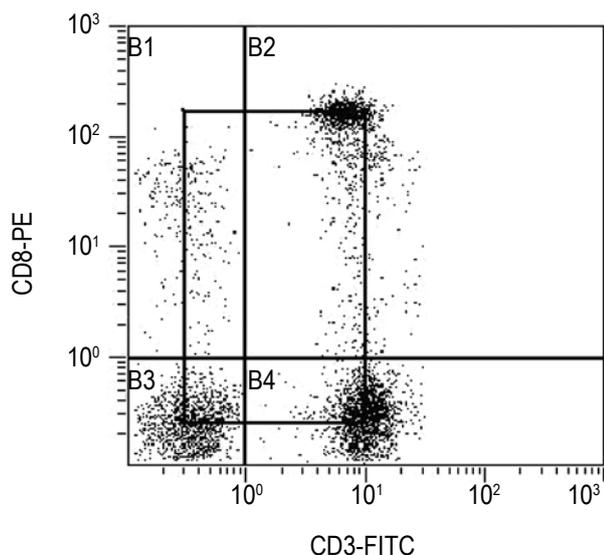
**5.1. Внутрилабораторный контроль**

В лаборатории должны быть утверждены правила проведения внутрилабораторного контроля с использованием аттестованного контрольного образца и учета его результатов в соответствии с инструкцией фирмы-производителя контрольного образца и/или согласно нормативным документам и положениям приказа № 45 от 07.02.2000 МЗ РФ «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации».

Внутрилабораторный контроль качества представляет собой систему повседневного слежения за точностью получаемых на цитофлуоримет-



**Рисунок 2.** Взаимосвязь между плотностью экспрессии маркеров клеточной поверхности и коэффициентами компенсации при иммунологических исследованиях



**Рисунок 3. Второе правило: если мысленно нарисовать линии из центров областей позитивных клеток, то они должны быть приблизительно параллельны осям X и Y или должен образоваться прямоугольник**

тре-анализаторе результатов для поддержания стабильности аналитической системы, выявления и устранения недопустимых случайных и систематических погрешностей и заключается в сопоставлении результатов исследования проб с результатами исследования контрольного материала и измерении величины отклонения.

Проводится в соответствии с инструкцией к прибору и инструкцией к используемым контрольным материалам и требованиями стандарта ГОСТ Р 53133.2 2008 [5].

Внутрилабораторный контроль качества должен:

- быть систематическим, повседневным, проводиться по единым правилам, т.е. анализ контрольных проб должен включаться в обычный ход работы лаборатории;

- производиться в реальных условиях работы лаборатории (так же как обычные пробы пациентов, т.е. тем же персоналом и в тех же условиях).

Принцип проведения внутреннего контроля достаточно прост: периодически нужно проводить измерение одного и того же контрольного материала, а результаты этих измерений заносить на контрольную карту.

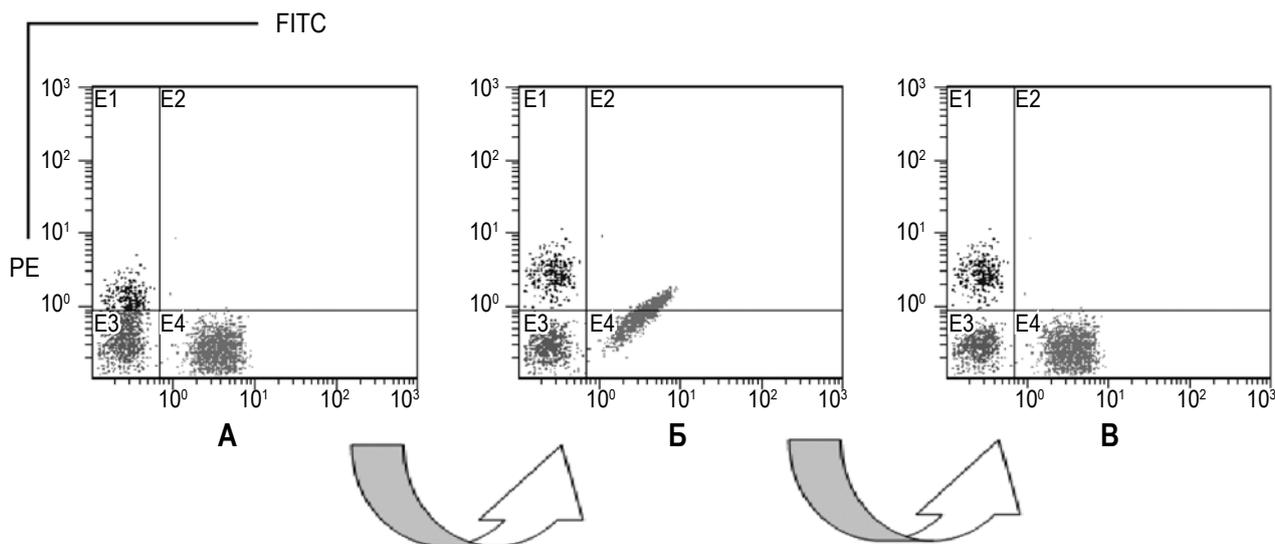
Хорошо организованная система внутреннего контроля качества позволяет достаточно эффективно выявлять ошибки, связанные с:

- внешними варьирующими факторами (реактивы, калибраторы, расходные материалы);

- внутренними варьирующими факторами (использование в лаборатории «домашних реактивов», обучение персонала, обслуживание приборов, ведение документации, реакция персонала на возникающие проблемы).

Результаты проводимых исследований должны контролироваться и анализироваться для подтверждения их достоверности для каждого пациента, в том числе при фенотипировании клеток, путем учета суммы процентного содержания лимфоцитов различного фенотипа и их соотношений.

В качестве аналитического контроля при фенотипировании клеток крови должны служить суммы:



**Рисунок 4. Оптимизация двухпараметрического анализа FITC (FL1) против PE (FL2) при изменении чувствительности одного из каналов флуоресценции: А – низкая чувствительность по FL2; Б – повышение чувствительности по каналу флуоресценции FL2 за счет увеличения напряжения на ФЭУ; В – вычитание дополнительного вклада интенсивности флуоресценции FITC за счет увеличения коэффициента компенсации**

**ТАБЛИЦА 4. ТРУДОЗАТРАТЫ В УЕТ НА ВЫПОЛНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ «ИССЛЕДОВАНИЕ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПРОТОЧНЫХ ЦИТОФЛЮОРИМЕТРОВ-АНАЛИЗАТОРОВ»**

Код услуги	Вид исследования	Трудозатраты в УЕТ	
		Специалиста со средним образованием	Врача клинической лабораторной диагностики
	Регистрация	0,5	
	Раскапывание крови в пробирки (на одну пробирку)	0,05	
	Раскапывание антител в пробирки (на одну пробирку)	0,05	
	Инкубация клеток с антителами	1,5	
	Лизис эритроцитов	3	
	Подсчет клеток в проточном цитофлюориметре-анализаторе (на одну пробирку)		0,1
	Оценка результата и подготовка заключения		1

**Примечание.** Анализ субпопуляционного состава клеток периферической крови проводят, как правило, не в одной пробирке, а от 2-х до 7-и пробирках. Исходя из этого, следует рассчитывать трудозатраты в зависимости от принятого в конкретной лаборатории протокола.

Общее количество лимфоцитов: Т-клетки (CD3<sup>+</sup>) + В-клетки (CD19<sup>+</sup>) + NK-клетки (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> и/или CD16<sup>+</sup>) = 100±5%.

Общее количество Т-клеток: %CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> + %CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> = %CD3<sup>+</sup>±5%

При использовании моноклональных антител новой серии должна осуществляться параллельная постановка реакции с реактивами старой и новой серии. Результаты параллельной постановки должны быть зарегистрированы.

Результаты каждого исследования по внутреннему контролю качества должны регистрироваться в специальном журнале.

### 5.2. Внешний контроль

Лаборатория должна принимать участие в соответствующем разделе ФСВОК (Федеральная Система Внешней Оценки Качества).

Лаборатории могут также принимать участие в Международных Системах Внешней Оценки Качества в соответствующих разделах.

Руководство лаборатории должно оперативно отслеживать результаты внешней оценки качества и регистрировать принятые меры исправления в случаях, когда контрольные критерии не достигнуты.

### 6. Постаналитические процедуры

Результаты иммунологических исследований методом ПЦ должны регистрироваться в установленном в лаборатории порядке и согласно правилам, изложенным в соответствующем разделе Общих требований.

В случае получения некорректного результата измерений, руководитель обязан немедленно связаться с лечащим врачом с целью выяснения клинической ситуации относительно пациента

(осложнения, прием БАД-ов и т.д.). Одновременно лаборатория осуществляет повторный анализ с параллельным использованием дополнительных референтных реагентов и образцов.

Результаты проведенного цитометрического исследования должны быть представлены в виде как относительных (%), так и абсолютных единиц.

Результаты исследований пробы пациента должны выдаваться с указанием референтных пределов для каждого показателя.

В каждой лаборатории должны быть утверждены референтные интервалы допустимых значений определяемых показателей с указанием порядка их установки и ссылок на соответствующие документы

Порядок хранения первичных и других лабораторных данных должен быть утвержден и оформлен документально в виде протоколов и журналов исследований.

При исследовании клеточного звена иммунитета хранение проб с целью перестановки или уточнения полученных показателей допустимо при комнатной температуре не более 24 часов.

Безопасное удаление проб, которые не требуются для дальнейших исследований, должно проводиться в соответствии с установленными правилами или рекомендациями руководства по удалению отходов.

### 7. Требования к режиму труда и отдыха, диетическим назначениям и ограничениям при подготовке пациента к взятию крови

Взятие крови из вены проводится натощак (см. п. 4.1). Другие требования – см. ГОСТ Р 53079.4 2008 [6].

### 8. Регистрация результатов

В лаборатории должен быть установлен порядок выдачи результатов исследования, включающий:

- утвержденный бланк выдачи результата;
- указание лиц, уполномоченных получать и использовать медицинскую информацию.
- способ передачи результатов в случае поступления пробы из другого медицинского учреждения.

Если качество полученной первичной пробы было непригодным для исследования или могло сделать результат сомнительным, это должно быть отмечено в отчете.

Копии или файлы сообщенных результатов должны храниться в лаборатории таким образом, чтобы было возможно быстрое востребование информации. Длительность периода хранения может варьировать, однако сообщенные результаты должны храниться так долго, как это диктуется медицинскими потребностями, национальным, региональным или местным регламентами.

Лаборатория должна иметь процедуру немедленного извещения врача (или другого клинического персонала, ответственного за лечение больного), когда результаты исследования по своим критическим свойствам значительно не совпадают с референтными интервалами.

В лаборатории должно быть установлено время выполнения каждой процедуры в зависимости от клинических потребностей и вида исследования методом ПЦ в соответствии с существующими нормативными документами

### 9. Трудозатраты на выполнение исследования клеточного состава крови

Трудозатраты (табл. 4) рассчитаны в условных единицах трудозатрат (УЕТ) на исследование образца крови, 1 УЕТ = 10 мин.

## Список литературы

1. ГОСТ Р ИСО 15189 – 2009 Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности.
2. ГОСТ Р 52905 – 2007 (ИСО 15190:2003) Лаборатории медицинские. Требования безопасности.

3. Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений. СанПиН 2.1.1.728-99., Москва, 1999 г.

4. ГОСТ Р 53133.1 – 2008 Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 1. Пределы допускаемых погрешностей результатов измерения аналитов в клинико-диагностических лабораториях.

5. ГОСТ Р 53133.2 – 2008 Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 2. Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов.

6. ГОСТ Р 53079.4 – 2008 Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4 Правила ведения преаналитического этапа.

7. Guidelines for the performance of CD4+ T-cell determinations in persons with human immunodeficiency virus infection. // MMWR Recomm. Rep. – 1992. – Vol. 41 (RR-8). – P. 1-17.

8. 994 revised guidelines for the performance of CD4+ T-cell determinations in persons with human immunodeficiency virus (HIV) infections. Centers for Disease Control and Prevention. // MMWR Recomm. Rep. – 1994. – 43 (RR-3), – P. 1-21.

9. Mandy F.F., Nicholson J.K., McDougal J.S. CDC. Guidelines for performing single-platform absolute CD4+ T-cell determinations with CD45 gating for persons infected with human immunodeficiency virus. // Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm. Rep. – 2003. – Vol. 52 (RR-2). – P. 1-13.

10. Хайдуков С.В. Подходы к стандартизации метода проточной цитометрии для иммунофенотипирования. Настройка цитометров и подготовка протоколов для анализа. // Медицинская иммунология. – 2007. – 9 (6). – С. 569-574.

11. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Тотолян Арег А., Черешнев В.А. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормативные значения (методом многоцветного цитометрического анализа). // Медицинская иммунология. – 2009. – 11 (2-3). – С. 227-238.