

ОСОБЕННОСТИ ПРЕАНАЛИТИЧЕСКОГО ЭТАПА ДЛЯ ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЯ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Серебровская Л.В.¹, Иванова Л.А.¹, Хайдуков С.В.^{2,3}

¹ ФГУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

² Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

³ ФГУ Федеральный Научно-Клинический Центр детской гематологии, онкологии и иммунологии Минздравсоцразвития, Москва

Резюме. Использование метода проточной цитофлуориметрии, значительно расширило возможности анализа клеток иммунной системы, диагностики иммунодефицитных состояний, аутоиммунных и лимфопролиферативных заболеваний и т.д.

Процедура лабораторного исследования подразделяется на несколько этапов: преаналитический, аналитический и постаналитический. В настоящее время разработаны критерии включения различных параметров клеток для практического использования и алгоритмы оптимизации работы на проточных цитофлуориметрах. Однако процент ошибок остается достаточно высоким и на преаналитический этап приходится более половины от их общего количества.

Выполнение изложенных в данной статье рекомендаций, несомненно, должно сказаться на качестве проведения лабораторных исследований, улучшении диагностики нарушений функционирования иммунной системы и адекватности назначаемой терапии.

Ключевые слова: проточная цитометрия, иммунофенотипирование, преаналитический этап.

Serebrovskaya L.V., Ivanova L.A., Khaidukov S.V.

CHARACTERISTICS OF PRE-ANALYTICAL STAGE IN IMMUNOPHENOTYPING OF PERIPHERAL BLOOD CELLS

Abstract. Application of flow cytometry (FC) techniques has considerably expanded the opportunities for evaluation of immune cells, aiming for better diagnostics of immunodeficiency disorders, autoimmune and lymphoproliferative diseases, etc.

A procedure of laboratory testing is subdivided into several stages, i.e., pre-analytical, analytical and post-analytical. At present, some strict criteria are developed for inclusion of various cell parameters into a diagnostic set, along with operational algorithms, in order to optimize the FC procedures. However, the percentage of errors in FC assays still remains high. More than a half of the errors originate from pre-analytical stage.

The recommendations listed in this article should definitely influence quality of laboratory investigations and improve diagnostics of immune functional disorders, thus providing adequacy of therapeutic prescriptions. (*Med. Immunol.*, 2011, vol. 13, N 6, pp 639-646)

Keywords: flow cytometry, immunophenotyping, pre-analytical stage.

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

Благодаря развитию метода проточной цитофлуориметрии, значительно расширились возможности анализа клеток иммунной системы, диагностики иммунодефицитных состояний, аутоиммунных и лимфопролиферативных заболеваний и т.д. Появилось много клинических лабораторий и диагностических центров, где проводятся исследования иммунного статуса па-

циентов. В свою очередь, процедура лабораторного исследования подразделяется на несколько этапов: преаналитический, аналитический и постаналитический. К сожалению, большая часть усилий по стандартизации иммунофенотипирования сосредоточена именно на аналитическом этапе. В настоящее время разработаны алгоритмы оптимизации работы на проточных цитофлюориметрах и критерии включения тех или иных параметров исследований клеток для практического использования [5, 6, 10]. Опубликованы рекомендации [2] и организована общероссийская программа контроля качества лабораторных исследований по разделу «проточная цитометрия». Однако процент ошибок остается достаточно высоким. В результате врач может неправильно интерпретировать полученный результат и сделать неверные назначения для терапии.

По данным многих исследований, на преаналитический этап приходится более половины от общего количества ошибок, оказывающих существенное влияние на конечный результат исследования. Поэтому, как врачам клинической и лабораторной диагностики, так и врачам клиницистам необходимо знать, какие факторы могут влиять на качество проводимых исследований [1, 4].

Необходимо учитывать, что показатели иммунограммы во многом зависят от факторов, влияющих на количество популяций лейкоцитов периферической крови. Эти факторы подразделяются на не устранимые и вариабельные. Не устранимыми факторами являются: возраст,

климат, циркадные ритмы. К факторам, которые могут варьировать, относятся: прием пищи и лекарственных препаратов, физические нагрузки, стресс, голодание, курение, высота над уровнем моря.

Внелабораторная часть преаналитического этапа начинается с направления конкретного пациента на лабораторное исследование в зависимости от стоящих перед врачом задач: диагностика, контроль, мониторинг лечения. Именно врач должен объяснить пациенту, как подготовиться к венопункции и в какое время прийти в процедурный кабинет.

Далее следуют: регистрация, забор материала на исследование, транспортировка, регистрация полученных образцов в лаборатории, хранение образцов и выполнение назначенных лабораторных исследований.

Остановимся на всех этапах несколько подробнее.

Возраст

Относительное и абсолютное количество клеток в популяциях лимфоцитов варьирует в зависимости от возраста (рис. 1). Особенно сильно оно отличается у детей, так как иммунная система у них до конца не сформирована. Общее количество лейкоцитов у них гораздо больше, чем у взрослого человека (рис. 2). У новорожденных и детей, особенно до года, преобладают В-лимфоциты и натуральные киллеры. По мере формирования иммунной системы количество клеток этих популяций уменьшается и увеличивается количество Т-лимфоцитов. С возрастом,

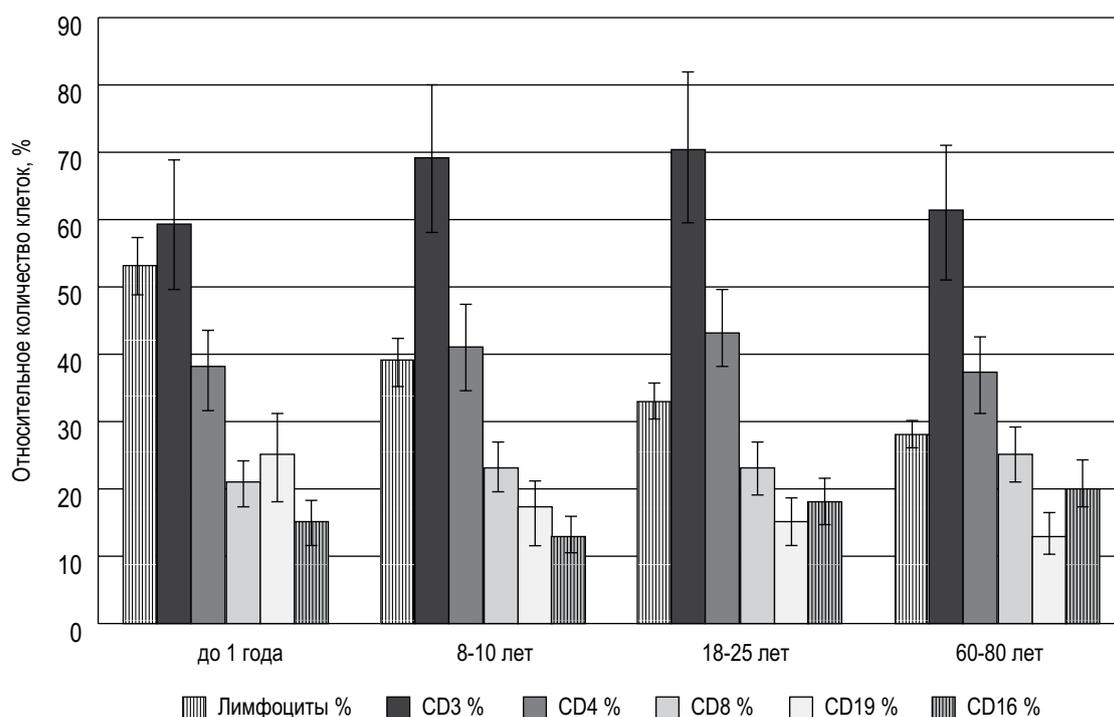


Рисунок 1. Параметры клеточного иммунитета в разных возрастных группах. Средние значения по популяции

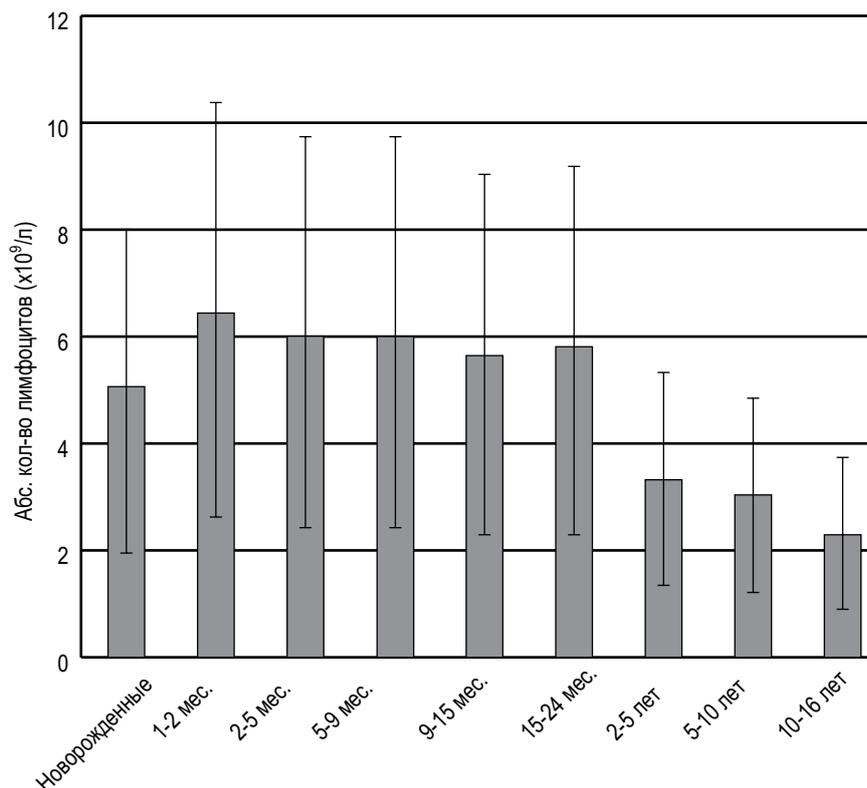


Рисунок 2. Значения абсолютного количества лимфоцитов ($\times 10^9/\text{л}$) у детей разного возраста

после 55–60 лет, количество Т-лимфоцитов вновь снижается и увеличивается количество натуральных киллеров [3, 4, 5].

Циркадные ритмы и место проживания

Количество клеток венозной крови меняется в зависимости от времени суток. Общее количество лейкоцитов повышается к 15 и 22 часам.

Относительное содержание лимфоцитов имеет наивысшее значение между 12 и 15 часами, что происходит за счет увеличения популяции Т-лимфоцитов, и снижается к 18 часам. В то время как относительное содержание В-лимфоцитов понижено в районе 12 часов дня и повышается к 18 часам.

Снижение количества лимфоцитов и их основных популяций происходит в середине месяца. В летние месяцы снижается общее количество лейкоцитов, а относительное содержание лимфоцитов и их популяций (Т- и В-лимфоцитов) увеличивается. Наиболее высокие показатели содержания лимфоцитов крови и Т-лимфоцитов в частности наблюдаются в весенние и зимние месяцы, тогда как В-лимфоцитов – в летне-осенний период (рис. 3).

Изменение количества клеточных популяций и субпопуляций лимфоцитов наблюдают и в зависимости от географического места проживания и воздействия на организм различных неблагоприятных экологических факторов [3, 4].

Прием пищи, лекарственных препаратов, курение

Прием пищи, особенно жирной, влечет за собой значительное увеличение общего количества лейкоцитов (пищевой лейкоцитоз). Длительное голодание, прием большого количества алкоголя, наркотиков, курение, прием антибиотиков и гормональных препаратов оказывают свое влияние на общее число, как лейкоцитов периферической крови, так и популяций лимфоцитов. Длительный прием антибиотиков или гормональных препаратов вызывает снижение популяции Т-лимфоцитов, а у курящих людей снижается количество Т-хелперов [1, 2, 3, 4].

Физическая нагрузка и стресс

Физические нагрузки оказывают непосредственное влияние на содержание как лейкоцитов, так и лимфоцитов в крови индивидуумов. Так, под влиянием физической нагрузки, например, 50 приседаний, наблюдается уменьшение общего количества лейкоцитов, относительного содержания лимфоцитов, Т-лимфоцитов и увеличение В-лимфоцитов.

Возникающие изменения во время физических упражнений, бега и т.д. обусловлены сдвигами объемов жидкости между внутри сосудистым и интерстициальным пространствами, потерей жидкости в связи с потоотделением и изменением концентрации гормонов.

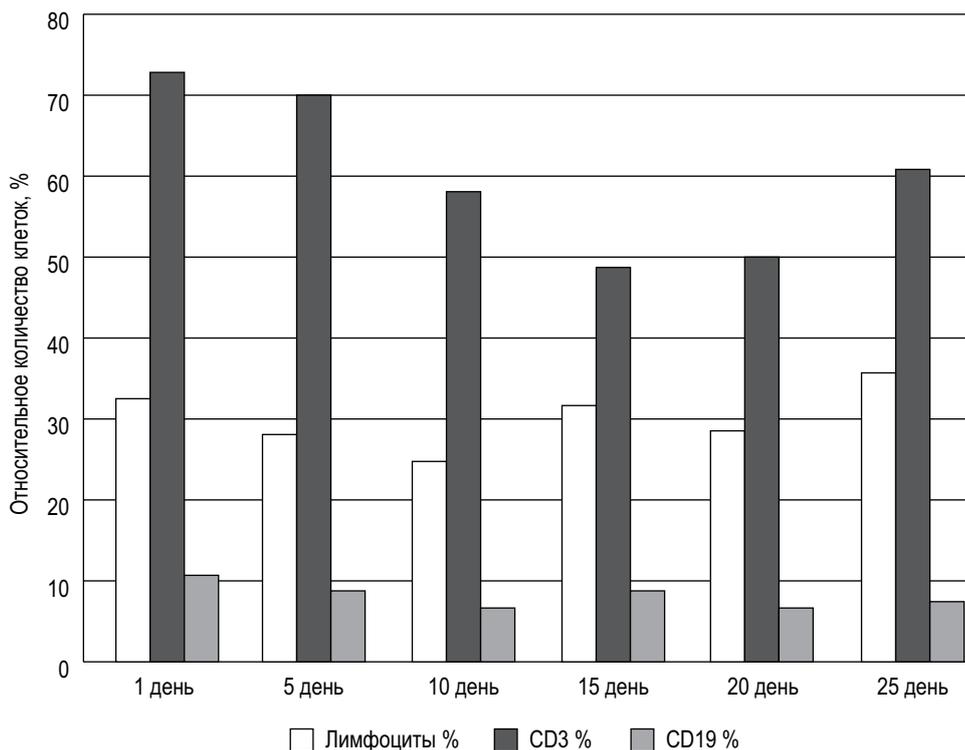


Рисунок 3. Динамика изменений относительного количества лимфоцитов, Т- и В-клеток, в зависимости от дней месяца

Влияние психологического стресса (страх перед взятием крови, предоперационный стресс и т.д.) также оказывает влияние на результаты, полученные в последствии. Это может быть обусловлено увеличением секреции гормонов, которое наблюдается под влиянием психологического стресса, что, в свою очередь, ведет к изменению количества клеток и клеточных популяций. Например, у студентов после экзамена увеличивается количество лейкоцитов за счет лимфоцитов и их субпопуляций [1, 4].

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 лекар-

ственных веществ, эндоскопия, функциональные тесты, ионизирующее излучение.

Загрязнение лабораторных проб инфузионными растворами является самой обычной и часто встречаемой формой преаналитической интерференции в больницах [1, 4].

Последовательности диагностических и лечебных процедур

Пробу крови никогда не следует брать из сосуда, расположенного проксимально месту индустрии. Пробы следует брать из другой руки, в вены которой не проводилось вливание. Перед взятием пробы после проведенной инфузионной терапии следует выждать определенный период времени (табл. 1).

В сопроводительном направлении образца в лабораторию необходимо указывать: какую процедуру получил данный пациент, когда, и какое вливание произведено пациенту [1].

Взятие пробы из катетера

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

Влияние положения тела и наложение жгута на качество пробы

Положение тела, в котором находится пациент, также влияет на концентрации компонентов крови. При переходе из положения «лежа»

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

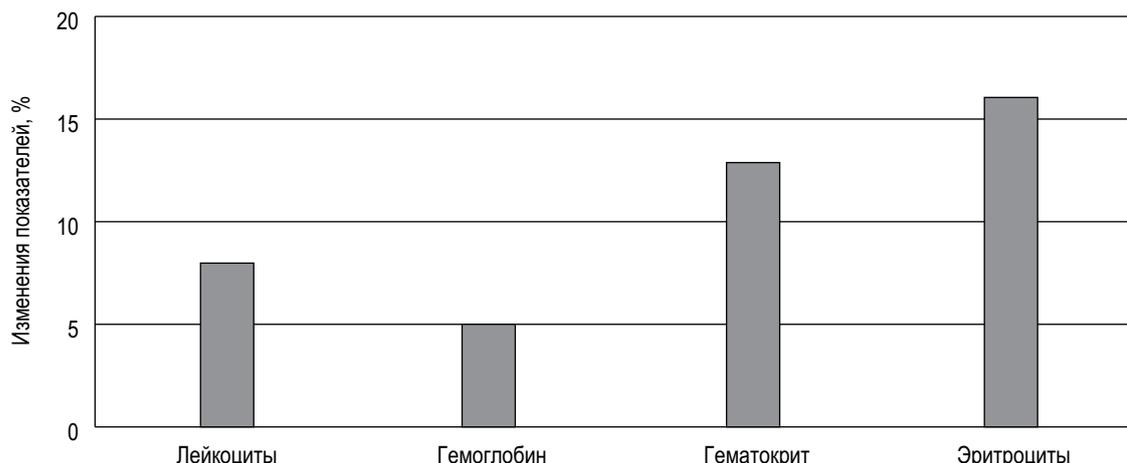


Рисунок 4. Повышение значений (%) некоторых показателей в периферической крови при переходе из положения «лежа» в положение «стоя»

в положение «стоя» у одного и того же пациента наблюдают некоторые изменения клеточного состава. Это связано, во-первых, с возрастанием эффективного фильтрационного давления (например, разница между капиллярным давлением и коллоидно-осмотическим давлением в плазме). Во-вторых, как следствие, вода движется из внутрисосудистого пространства в интерстициальное, что приводит к понижению объема плазмы примерно на 12% у здоровых лиц. Изменение объема плазмы ведет к заметному изменению абсолютного количества клеток (рис. 4).

Что происходит, когда жгут накладывается на весь период времени взятия крови?

Жгут накладывают для облегчения поиска вены для пункции. При длительном наложении жгута внутри капилляров нарушается эффективное фильтрационное давление и как следствие этого, жидкость и низкомолекулярные соединения перемещаются из внутрисосудистого пространства в интерстициальное. Макромолекулы, вещества, связанные с белками и клетки крови не проникают через стенку капилляров. Таким образом, это приводит к заметному изменению отдельных показателей крови, и, в частности, концентрации лейкоцитов (рис. 5) [1].

Для уменьшения внутри- и межиндивидуальной вариации результатов лабораторных исследований необходимым условием является стандартизация процедуры взятия крови.

Системы для взятия венозной крови у пациентов

Чтобы обеспечить безопасный и комфортный забор крови у пациента, безопасность медицинского персонала, повысить точность результатов анализа и снизить количество повторных заборов крови необходимо использовать одноразовые вакуумные системы. Системы состоят из трех элементов: стерильная двусторонняя игла, держатель пробирки и пластиковая пробирка с круглым дном и предохранительными заглушками.

Ток крови прекращается, как только прекращается действие вакуума. Пробирки имеют разноцветные крышки, в зависимости от внесенного туда антикоагулянта и одновременно являются центрифужными, а также сосудами для хранения и пересылки материала в другие лаборатории.

Системы обеспечивают стандартизированное получение венозной крови в стерильных условиях, визуальный контроль забираемого объема, что, в свою очередь, предотвращает нарушение пропорции между антикоагулянтом и кровью. Обеспечивается безопасность персонала [1].

При заборе крови обычным шприцем и сливании ее в пробирку с антикоагулянтом через иглу может произойти гемолиз и, как следствие этого, будет необходим повторный забор крови для анализа.

Антикоагулянты

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). Поскольку для цитофлуориметрического анализа необходимым условием является наличие суспензии клеток, то эти антикоагулянты вполне подходят для скрининга иммунного статуса пациентов.

Однако необходимо учитывать, что все соли ЭДТА вызывают сокращение клеток в объеме. 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 ее для подсчета абсолютного количества лейкоцитов.

При концентрации ЭДТА 1,5 г/л в образцах крови, взятых не более часа назад, возникают

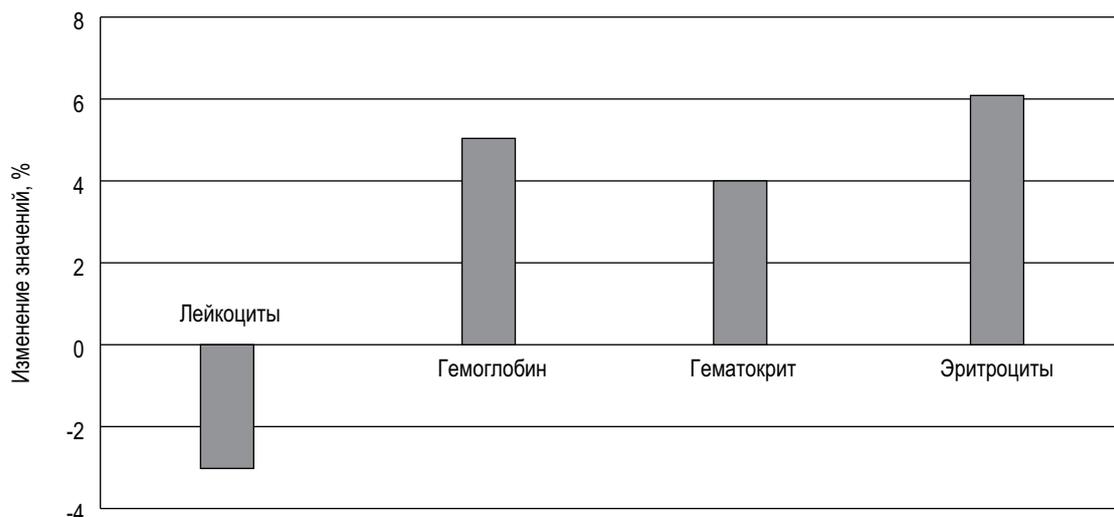


Рисунок 5. Изменения значений некоторых показателей в периферической крови после наложения жгута в течение 6 мин

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, что влияет на морфологические параметры (рис. 6).

При использовании рекомендованных концентраций солей ЭДТА (K_2 - и K_3 -ЭДТА) и проведении анализа в пределах 1-4 часов после взятия крови существенных изменений не происходит [9].

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.

Для иммунофенотипирования клеток крови также рекомендуется гепарин в концентрации 20 МЕ гепарина на мл крови. В случаях, когда в дальнейшем планируются исследования функциональной активности клеток, именно гепарин, как антикоагулянт, необходимо использовать при заборе образцов крови.

Если исследования проводились в один и тот же день, то ЭДТА и гепарин давали равноценные результаты. Но по прошествии 24 часов происходило снижение жизнеспособности нейтрофилов в пробах с ЭДТА [8].

Подготовка пациента и процедура забора крови

Одним из основных источников ошибок на преаналитическом этапе является подготовка пациента. Очень важно, чтобы врач, направляющий пациента на исследование клеточных популяций периферической крови, подготовил его к процедуре забора крови и объяснил, как себя вести перед взятием пробы.

Взятие проб должно проводиться до проведения диагностических и лечебных процедур. Взятию пробы должна предшествовать фаза отдыха. Пробы следует брать между 7-9 часами утра и не ранее, чем через 12 часов после последнего приема пищи. Положение тела, при взятии крови – сидя или лежа. Длительность наложения жгута не более 1 минуты. Жгут следует снять сразу же после попадания иглы в вену. В тех случаях, когда проводилось вливание или возникла необходимость повторного взятия крови в тот же день, флеботомию необходимо проводить на другой руке.

Во избежание образования сгустков, необходимо хорошо перемешивать кровь с антикоагулянтом. Перемешивание осуществляется путем переворачивания пробирки не менее 8 раз. Применение миксеров и встряхивание пробирок недопустимо, так как это приводит к гемолизу и получению неверных результатов. Необходимо соблюдать правильное соотношение крови и антикоагулянта. Недостаточное количество крови или переполнение пробирки может привести к искажению результатов иммунофенотипирования.

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. Если в момент обследования пациент принимает лекарственные препараты (антибиотики, гормоны, цитостатики), в сопроводительных документах должны быть сделаны соответствующие пометки [1].

Хранение и транспортировка образцов

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

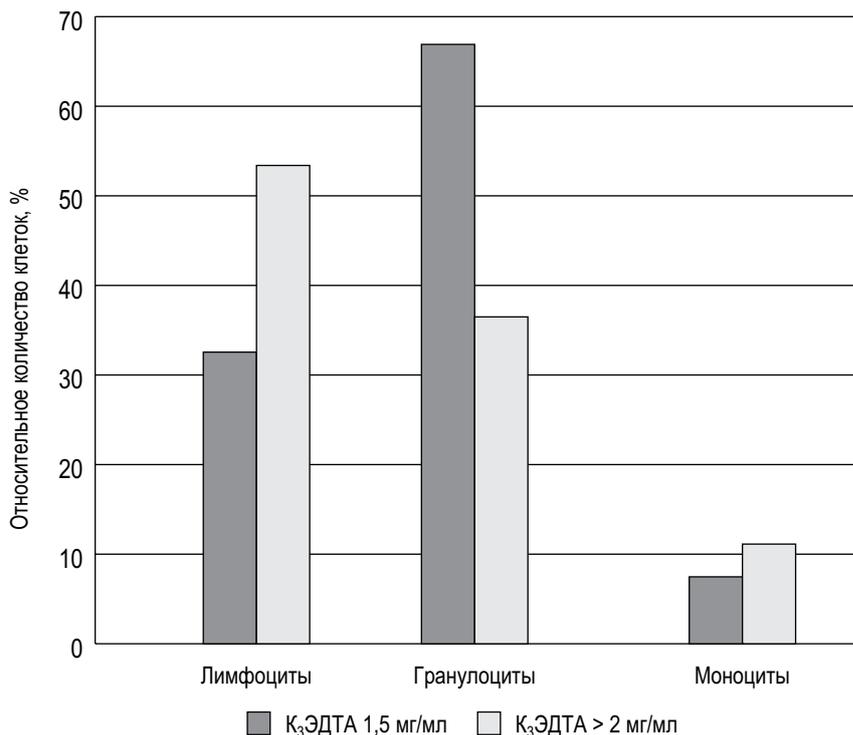


Рисунок 6. Изменение структуры популяционного состава клеток периферической крови при различной концентрации антикоагулянта в образце

Образцы проб должны храниться в закрытых сосудах, чтобы избежать испарения и попадания микроорганизмов. Для этого необходимо использовать одноразовые системы для сбора проб [1, 12, 13]. При хранении очень важно соблюдать температурный режим. Температура при транспортировке, хранении и обработке образцов должна быть 18-23 градуса [1, 12].

Для иммунофенотипирования нельзя хранить образцы крови с антикоагулянтом в холодильнике! После хранения образцов крови в холодильнике в течение 6 часов наблюдается снижение относительного количества Т-хелперов.

Высокие температуры также оказывают влияние на количество клеток венозной крови. В летней период времени, когда уличная температура колеблется в диапазоне 30-32 градусов, наблюдается дегрануляция гранулоцитов и, как следствие этого, значительное снижение их количества (рис. 7).

Проводить исследование образцов крови с К₃-ЭДТА рекомендуется не позднее чем через 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

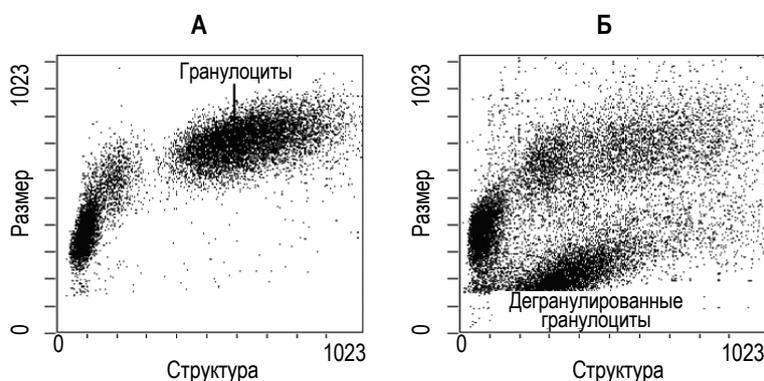


Рисунок 7. Изменение морфологических параметров клеток периферической крови при неправильном хранении исходного образца. Дегрануляция и уменьшение размеров гранулоцитов

Примечание. А – анализ образца свежей периферической крови. Б – анализ образца периферической крови после неправильного хранения.

увеличения времени с момента взятия крови. При этом происходит увеличение показателя общего количества лейкоцитов и, как следствие этого, неправильное определение абсолютного количества клеток в единице объема [1, 10, 11]. Однако иммунофенотипирование только лимфоцитов возможно проводить на более длительном отрезке времени, но не позднее 48 часов при условии правильного хранения образца.

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. Образец не должен подвергаться быстрому охлаждению или нагреванию, так как это может негативно повлиять на результаты иммунофенотипирования [7, 10, 11].

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.
- 4) Во всех перечисленных случаях необходимо запросить новый образец.

Выполнение изложенных выше рекомендаций, несомненно, должно сказаться на качестве проведения лабораторных исследований, интерпретации полученных результатов, улучшении диагностики нарушений функционирования иммунной системы и адекватности назначаемой терапии.

Список литературы

1. Гудер В.Г., Нарайнан С., Виссер Г., Цафта Б. Влияние факторов преаналитического этапа на качество результатов лабораторных исследований // Russian Version by Becton Dickinson & Co. – 2003. – 106 с.
2. Серебровская Л.В., Ситдыкова Ю.Р., Покровский В.В., Буравцова Е.В. Рекомендации: Определение количества CD4 Т-лимфоцитов у пациентов, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), на проточном цитометре // Медицина для вас. – М., 2004.
3. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Истамов Х.И. Экологическая иммунология. – М.: Издательство ВНИРО, 1995. – 219 с.
4. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Ярилин А.А. Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний иммунной системы: Руководство для врачей. – ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 352 с.

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

6. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Вопросы современной проточной цитометрии. Клиническое применение. – Челябинск: Челябинская государственная медицинская академия, 2008. – 195 с.

7. Badley A., Baxter-Robinson J., Bergeron M., Chabot C., Conway B., Ding T., Faucher S., Freedman J., Gilbert L., Houle G., Kardish M., Keeney M., Lapointe N., Luider J., MacPherson M., Mandy F., Minkus T., Phaneuf S., Read S., Solajic Z., Soucy N., Tsang A., Tsoukas C. Canadian Guidelines for Flow Cytometric Immunophenotyping. – National Laboratory for HIV Immunology, 2001. – 49 p.

8. Carter P.H., Resto-Ruiz S., Washington G.C., Ethridge S., Palini A., Vogt R., Waxdal M., Fleisher T., Noguchi P.D., Marti G.E. Flow cytometric analysis of whole blood lysis, three anticoagulants, and five cell preparations // Cytometry. – 1992. – Vol. 13 (1). – P. 68-74.

9. Goossens W., Van Duppen V., Verwilghen R.L. K2- or K3 – EDTA: The anticoagulant of choice in routine haematology // Clin. Lab. Haemat. – 1991. – Vol. 13 (3). – P. 291-295.

10. 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. – 52 (RR-2). – P. 1-13.

11. Nicholson J.K., Green T.A. Selection of anticoagulants for lymphocyte immunophenotyping. Effect of specimen age on results // J. Immunol. Methods. – 1993. – Vol. 165 (1). – P. 31-35.

12. Paxton H., Bendele T. Effect of time, temperature and anticoagulant on flow cytometry and haematological value // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 1993. – Vol. 677. – P. 440-443.

13. Shield C.F., Marlett P., Smith A., Gunter L., Goldstein G. Stability of human lymphocyte differentiation antigens when stored at room temperature // J. Immunol. Methods. – 1983. – Vol. 62 (3). – P. 347-352.

поступила в редакцию 26.05.2011
отправлена на доработку 05.06.2011
принята к печати 22.06.2011