

ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЙ ЭТАП ИММУНОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ.

Клинические рекомендации

Авторы: О.Я. Волкова, М.Г. Вершинина, М.Т. Носовская, В.Л. Эмануэль, М.В. Маяцкая, Т.Н.Короткова, Н.А. Стериополо.

Клинические рекомендации включают в себя основные правила проведения преаналитического этапа иммуногематологических исследований в ЛПУ, которые имеют существенное значение в обеспечении их качества.

**Преаналитический этап иммуногематологических исследований.
Клинические рекомендации.**

Содержание:

	Список сокращений	4
1.	Введение.	5
2.	Основные составляющие преаналитического этапа иммуногематологических исследований.	5
2.1	Назначение исследования.	6
2.2.	Составление заявки на лабораторное исследование и оформление бланка-направления.	7
2.3.	Подготовка к исследованию.	8
2.4.	Идентификация пациента или донора.	9
2.5.	Заготовка и маркировка образца крови.	9
2.6.	Первичное определение групповой (по системе ABO) и резус (D) принадлежности образца крови.	11
2.7.	Хранение материала и его доставка в лабораторию.	12
3.	Внутрилабораторный преаналитический этап иммуногематологических исследований.	12
3.1.	Прием, регистрация и маркировка образцов биоматериала, доставленных в лабораторию.	12
3.2.	Подготовка образцов крови для иммуногематологических исследований.	13
3.3	Оценка пригодности крови, плазмы и сыворотки для исследования.	14
3.4.	Заготовка образцов крови у пациентов со спонтанной холодовой агглютинацией эритроцитов.	14
4.	Заключение	15
5.	Рекомендуемая литература	15

Список сокращений

ЛПУ – лечебно-профилактическое учреждение

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат (соль этилендиаминтетрауксусной кислоты)

СОП – стандартная операционная процедура

Rh(D) – антиген D системы Резус

ABO/Rh – группа крови по системе ABO и антиген D системы Резус

RH/K –антигены эритроцитов D, C, c, E, e, K

ЛИС –лабораторная информационная система

СОГЛАСОВАННЫЙ ВАРИАНТ

1. ВВЕДЕНИЕ

Преаналитический этап - это комплекс мероприятий (процессов и действий), выполняемый от момента назначения лабораторных исследований до начала проведения аналитического процесса (загрузки проб в анализаторы и т.д.).

Основная цель преаналитического этапа – обеспечить стабильность компонентов биоматериала, взятого на исследование, и свести к минимуму воздействие различных факторов, влияющих на полученный результат.

Преаналитический этап имеет большое значение в обеспечении качества всех лабораторных исследований. Иммуногематологическая диагностика не является исключением. Определение группы крови по системе ABO, Резус (D) - принадлежности, типирование антигенов эритроцитов других систем, выявление антиэритроцитарных антител, а также выполнение проб на совместимость крови донора и реципиента по антигенам эритроцитов обязательно предшествует переливанию гемокомпонентов. Более чем в 50% случаев ошибки в результатах иммуногематологических исследований связаны с несоблюдением правил проведения преаналитического этапа, тем самым подвергая опасности жизнь и здоровье пациентов.

Исключение ошибок на преаналитическом этапе может быть обеспечено максимальной стандартизацией всех процедур получения, транспортировки и хранения биологического материала, используемого для анализа.

Настоящие рекомендации обобщают основные требования к условиям и процедурам ведения преаналитического этапа иммуногематологических исследований в ЛПУ с целью исключения или ограничения влияния эндогенных, экзогенных, ятрогенных и иных факторов, мешающих получению правильных результатов этих исследований.

2. Основные составляющие преаналитического этапа иммуногематологических исследований

Преаналитический этап можно разделить на внелабораторный и лабораторный раздел.

Преаналитический этап иммуногематологических исследований. Клинические рекомендации.

Внелабораторный преаналитический этап, регламентируемый соответствующими нормативными документами, включает:

1. Назначение исследования лечащим (дежурным) врачом или врачом приемного отделения для пациентов и врачом, проводящим медицинское освидетельствование перед донацией для доноров.
2. Составление заявки на лабораторное исследование и оформление бланка-направления для пациентов.
3. Подготовку донора или пациента к исследованию.
4. Идентификацию пациента или донора.
5. Процедуру взятия и маркировки образца крови для исследования;
6. Первичное определение групповой (по системе ABO) и резус (D) принадлежности образца крови с отражением полученных результатов в компьютерной программе или погрупповых листах для доноров, в бланке-направлении (результаты первичного определения ABO/Rh с подписью врача, диагноз, анамнез, штрих-код) для пациентов.
7. Хранение материала в отделении и его доставка в лабораторию.

Внутрилабораторный преаналитический этап состоит из процедур:

8. Регистрация и маркировка доставленного в лабораторию образца крови
9. Пробоподготовка образца крови к исследованиям (центрифугирование, аликвотирование и маркировка, доставка биоматериала на рабочие места)
10. Хранение пробирки с материалом до исследования (при необходимости) – до 72 часов при температуре $+2^{\circ}$ - $+8^{\circ}$ C.

2.1. Назначение исследования

Объем иммуногематологического обследования доноров, реципиентов и беременных женщин определяется действующими нормативными документами.

Иммуногематологические исследования (определение группы крови по системе ABO и Резус (D) – принадлежности крови и определение антиэритроцитарных аллоантител) назначаются всем донорам крови и гемокомпонентов при каждой донации. Типирование эритроцитов по антигенам Rh/K выполняют донорам не менее двух раз в

образцах крови от разных донаций. При совпадении результатов Rh/K – фенотип донора считается установленным.

Иммуногематологические исследования назначаются по мере необходимости всем потенциальным реципиентам гемокомпонентов в стационарах, а также беременным женщинам при наблюдении за ними в амбулаторном учреждении. В записанном в историю болезни назначении должны быть четко обозначены иммуногематологические параметры, которые необходимо определить в биологическом материале.

Для пациентов хирургического профиля, поступающих в стационар на оперативное лечение, требуется назначение определения группы крови по системе ABO и Резус(D) – принадлежности крови, антиэритроцитарных антител.

Гематологическим и онкологическим пациентам, детям до 18 лет, женщинам детородного возраста, реципиентам с отягощенным трансфузионным анамнезом, реципиентам, нуждающихся в многократных (в том числе повторных) трансфузиях (переливаниях) донорской крови и (или) ее компонентов, пациентам перед плановым переливанием гемокомпонентов, наряду с назначением определения ABO/Rh, требуется назначить определение антиэритроцитарных аллоантител и типирование эритроцитов по антигенам C, c, E, e, C^w, K и k.

Беременным при первичном визите назначают определение ABO/Rh и антиэритроцитарных аллоантител. Если антитела не выявлены, контрольное исследование проводят на 28 неделе и, при повторном отрицательном результате, определяют вместе с ABO/Rh перед родами. Если антитела выявляются на любом этапе обследования беременной, то их определение, включая выявление титра обнаруженных аллоантител, проводят со следующей периодичностью:

- 1 раз в 4 недели от выявления до срока 32 недели;
- 1 раз в 2 недели после 32 недель.

2.2. Составление заявки на лабораторное исследование и оформление бланка-направления

Преаналитический этап начинается с назначения исследования, на основании чего составляют заявку на его проведение.

Преаналитический этап иммуногематологических исследований. Клинические рекомендации.

Биологический материал отправляется в лабораторию вместе с бланком-направлением, оформленным согласно требованиям с заполнением всех граф: дата и время взятия крови, фамилия, имя отчество больного, возраст, пол, отделение, палата, № истории болезни (амбулаторной карты), перечень требуемых исследований, подпись специалиста, проводившего взятие образца крови.

Факторы, способные повлиять на результаты назначенного исследования, должны быть указаны в направлении. К таковым относятся акушерский и трансфузионный анамнез, срок беременности в неделях, дата введения иммуноглобулина анти-Резус, дата последней трансфузии эритроцитов, особенности образцов крови (пуповинная кровь, донорские гемокомпоненты из пластиковых пакетов и т.д.), диагноз, проводимая гемокомпонентная терапия и пр.

Направления и пробирки с биоматериалом должны быть идентично маркированы в присутствии пациента. В направлении должны содержаться результаты первичного определения группы крови по системе ABO, Резус(D) – принадлежности, с указанием серий и сроков годности используемых диагностических реагентов, а также стоять дата, фамилия и разборчивая подпись врача, проводившего определение.

У доноров образец крови для иммуногематологических исследований берется и маркируется непосредственно перед началом донации. Маркировка пробирки должна быть идентичной с маркировкой всех гемокомпонентов, заготовленных от данного донора.

2.3. Подготовка к исследованию

Для получения достоверных результатов анализов важное значение имеет подготовка пациента к лабораторным исследованиям.

Брать кровь у пациента для исследований рекомендуется в ранние утренние часы после 12-часового ночного голодания (базовое состояние). Целый ряд факторов способны вызвать изменения в базовом состоянии пациента: диета, физические упражнения, эмоциональный стресс, суточные колебания некоторых показателей, положение тела при взятии крови, принимаемые пациентом лекарственные средства. Необходимо максимально стандартизировать условия взятия проб крови.

Общим правилом для пациентов и доноров, у которых должна быть взята кровь на исследования, должно быть воздержание от физических нагрузок, приема алкоголя и лекарств изменений в питании в течение 24 ч до взятия крови. Пациент не должен принимать пищу после ужина, ему необходимо лечь спать накануне в обычное для него время и встать не позднее, чем за час до взятия крови. Для донора перед донацией рекомендуется воздержание от курения и легкий завтрак.

От 7 до 10 часов утра - оптимальное время для взятия проб крови на лабораторные анализы.

Если пациенту требуется экстренное переливание гемокомпонентов и соблюдение перечисленных условий невозможно, иммуногематологические исследования проводят в доступном образце крови. Если этот образец гемолизирован, содержит хиломикроны и другие, искажающие результат факторы, исследования по возможности повторяют в плановом порядке из нового образца крови.

2.4. Идентификация пациента или донора

Необходимо убедиться, что взятие крови будет проведено у пациента, указанного в направлении. Для идентификации пациента и донора необходимо:

- спросить его фамилию, имя, отчество, дату рождения и сравнить полученную информацию с указанной в направлении для пациентов и в донорской карте для доноров;
- для пациентов без сознания информация направления проверяется по данным истории болезни.

2.5. Заготовка и маркировка образца крови

Для иммуногематологических исследований венозная кровь с помощью вакуумной системы заготавливается в отдельную пробирку с K_2 /ЭДТА/ K_3 /ЭДТА/ Na_2 /ЭДТА, цветовая кодировка пробирки – фиолетовая (рис. 1, 2). Объем взятой крови должен строго соответствовать объему пробирки для соблюдения правильного соотношения кровь/антикоагулянт. Для выполнения иммуногематологических исследований достаточно 3-5 мл крови.

Преаналитический этап иммуногематологических исследований. Клинические рекомендации.



Рис. 1. Вакуумная пробирка с K_2 ЭДТА



Рис. 2. Вакуумная система для отбора проб крови

Непосредственно после взятия крови образец обязательно перемешать. Не встряхивать! Пробирку необходимо только плавно перевернуть на 180° 8-10 раз (рис.3). Интенсивное перемешивание с образованием пены может вызвать гемолиз, недостаточное перемешивание ведет к образованию сгустков. Пробирки с видимыми сгустками крови для исследования не принимаются.

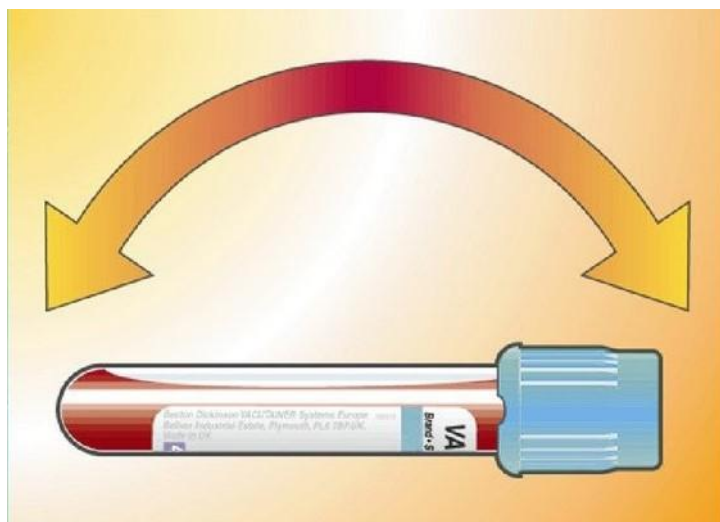


Рис. 3. Правильное перемешивание пробы крови

При взятии крови из катетера, находящегося в сосуде, с помощью шприца или пустой вакуумной пробирки необходимо отобрать и удалить 3- 5 мл крови, смешанной с последним вводившимся раствором или гепарином, во избежание контаминации образца этими растворами.

Преаналитический этап иммуногематологических исследований. Клинические рекомендации.

В исключительных случаях для одиночных иммуногематологических исследований, проводимых в ручных методиках, возможно использование образцов крови, заготовленных в пробирку с другим антикоагулянтом или без него. Категорически запрещается применение для иммуногематологических исследований образцов крови, взятых в пробирки с разделительным гелем, а также использование в качестве антикоагулянта гепарина.

Взятие образца крови для выполнения лабораторного этапа иммуногематологических исследований должно быть проведено до трансфузий пациенту эритроцитсодержащих гемокомпонентов.

Сбор всех видов биологического материала для исследований должен осуществляться с соблюдением правил санитарно-эпидемиологического режима в соответствии с действующими нормативными документами Роспотребнадзора и инструкциями, утвержденными Главным врачом ЛПУ, с целью защиты пациента, донора и медицинского персонала от инфицирования.

Биологический материал для исследований должен быть взят обученным медицинским персоналом (венозная и капиллярная кровь, образцы донорских гемокомпонентов, костный мозг или гемопоэтические стволовые клетки). Все пробирки с биоматериалом должны быть стандартно маркированы и содержать следующую информацию: фамилия, имя, отчество донора или пациента, отделение, номер истории болезни или карты донора, дата получения материала. Маркировка должна быть устойчива к механическим и другим видам повреждений и полностью соответствовать содержанию пунктов бланка – направления. Штрих-кодирование дополняет, но не заменяет маркировку пробирки и направления.

Биоматериал в пробирках, маркировка которых не соответствует требованиям, не должен приниматься лабораторией к исследованиям.

2.6. Первичное определение групповой (по системе ABO) и резус (D) принадлежности образца крови

В соответствии с требованиями приказа МЗ РФ № 183н от 02.04.2013г. «Об утверждении правил клинического использования донорской крови и (или) ее компонентов», при поступлении реципиента, нуждающегося в проведении трансфузии

(переливания) донорской крови и (или) ее компонентов, врачом клинического отделения, прошедшим обучение по вопросам трансфузиологии, проводится первичное исследование групповой и резус-принадлежности крови реципиента. Объем исследования, проводимого лечащим (дежурным) врачом (осуществляется с использованием реагентов, содержащих анти-А-, анти-В- и анти-D-антитела соответственно):

- определение группы крови системы АВО по антигенам эритроцитов прямой реакцией;
- определение антигена D системы Резус.

Результат записывается в дневнике медицинской карты больного и в направлении в подтверждающую лабораторию с обязательным указанием серий и сроков годности используемых реагентов, даты, фамилии и подписи врача, проводившего определение.

Подтверждающее определение АВО/Rh, а также фенотипирование по антигенам С, с, Е, е, С^w, К, k и определение антиэритроцитарных антител осуществляется в клинко-диагностической лаборатории врачом/биологом, прошедшим обучение по иммуногематологии.

Первичное определение группы крови по системе АВО и резус(D) крови донора проводится из образца капиллярной крови перед донацией. Результат определения отражается в соответствующем групповом листе.

Образцы крови пациентов без результатов первичного определения АВО/Rh не могут быть приняты в лабораторию.

Первичное определение группы крови по системе АВО и Резус(D) – принадлежности не требуется, только для пациентов амбулаторно-поликлинических учреждений.

2.7. Хранение материала и его доставка в лабораторию

Биологический материал (кровь, костный мозг и т.д.) должен быть доставлен в лабораторию не позднее двух часов после получения. Для срочных исследований и прямого антиглобулинового теста (прямой пробы Кумбса) кровь в лабораторию доставляется непосредственно после взятия. Недопустимо замораживание биологического материала. Транспортировка должна осуществляться только в специальных

Преаналитический этап иммуногематологических исследований. Клинические рекомендации.

маркированных небьющихся контейнерах. Образцы доставляются вместе с оформленными по правилам направлениями, которые должны быть в упаковке, исключающей возможность их контаминации кровью.

Срок доставки заготовленных образцов крови для плановых иммуногематологических исследований не должен превышать 2-х часов. Если доставить образец в течение указанного промежутка времени невозможно (кровь взята в ночное время, выходные и праздничные дни и т.д.), его необходимо хранить в холодильнике при температуре +2-8 °С. Срок хранения материала до исследования не должен превышать 48 часов.

3. Внутрिलाбораторный преаналитический этап иммуногематологических исследований

3.1. Прием, регистрация и маркировка образцов биоматериала, доставленных в лабораторию

В лаборатории проводятся регистрация, центрифугирование, аликвотирование биоматериала и последующая его передача сотрудникам для проведения назначенных исследований.

Регистрация образцов биологического материала в лаборатории производится путем занесения данных образцов в журнал или электронный журнал в лабораторной информационной системе – ЛИС. При необходимости дополнительной лабораторной маркировки, ее данные указываются на пробирке с образцом, направлении и в журнале (электронном журнале в ЛИС).

Критерии для отказа в приеме лабораторией биоматериала на исследования:

- отсутствие маркировки (штрих-кода, надписи на емкостях, контейнерах, пробирках и т.д.);
- неправильная маркировка (несоответствие маркировки бланка-направления и пробирки);
- неправильно заполненный бланк-направление (нет сведений в некоторых графах) или его отсутствие;
- неправильно заготовленный образец крови (малый объем, наличие сгустков и т.п.);

Преаналитический этап иммуногематологических исследований. Клинические рекомендации.

- несоблюдение сроков и условий хранения материала до момента доставки в лабораторию (замораживание, перегрев, утрата части материала при опрокидывании пробирки и т.д.);
- видимые повреждения емкости с биоматериалом.

В указанных случаях исследование биоматериала не производится.

Сотрудник лаборатории заносит информацию о причине отказа в выполнении исследования в компьютер (журнал), оперативно информирует лечащего врача по телефону и фиксирует эту информацию в бланке-направлении, который отправляется в отделение.

3.2 Подготовка образцов крови для иммуногематологических исследований

Основным биоматериалом для иммуногематологических исследований является венозная кровь, взятая в пробирки с антикоагулянтом K_2 /ЭДТА/ K_3 /ЭДТА/ Na_2 /ЭДТА (в исключительных случаях используются образцы с другим антикоагулянтом). После регистрации и лабораторной маркировки образец крови подвергается обязательному центрифугированию в течение 10 минут при 1300 g для разделения плазмы и эритроцитов. Если плазма пациента предназначена для индивидуального подбора гемокомпонентов по антигенам эритроцитов, часть ее (1-2 мл) отбирают в дополнительную пробирку, которую после маркировки подвергают еще одному этапу центрифугирования. Режим центрифугирования 10 минут при 1300 g или 5 мин при 2000 g.

Если образец венозной крови заготовлен в пробирку без антикоагулянта (этой ситуации следует избегать), его оставляют при комнатной температуре (15-25°C) в течение 20-60 минут для спонтанного образования сгустка. После ретракции сгустка образец обязательно центрифугируют 10 минут при 1300 g. К паспорту центрифуги должна быть приложена таблица, указывающая связь между числом оборотов и величиной центробежной силы (g).

3.3 Оценка пригодности крови, плазмы и сыворотки для исследования

Плазма (сыворотка) с признаками гемолиза непригодна для анализа. При наличии признаков гемолиза запрашивается новый образец крови для анализа. Если гемолиз

вызван не нарушениями на этапе взятия и транспортировки образца, а обусловлен особенностями состояния больного, иммуногематологические исследования гемолизированного образца выполняют с обязательной отметкой о гемолизе в направлении и компьютере (журнале). Гемолиз в образце крови может вызвать ложноположительный результат иммуногематологических исследований.

При липемии происходит помутнение сыворотки или плазмы вследствие высокого содержания хиломикронов. Для удаления хиломикронов возможно поместить пробирку на 18-24 часа в холодильник (+2-8 °C), после отстаивания сыворотки удалить хилезный слой пипеткой. Отметка о «хилезе» в направлении и компьютере (журнале) обязательна.

Мутность плазмы (сыворотки) может быть вызвана ростом бактерий, попавших в пробу, особенно при несоблюдении временных и температурных условий транспортировки и хранения биоматериала. В этих случаях образец непригоден для анализа.

3.4 Заготовка образцов крови у пациентов со спонтанной холодовой агглютинацией эритроцитов.

Образцы крови пациентов с аутоиммунной гемолитической анемией, вызванной холодовыми антителами, при охлаждении дают спонтанную агглютинацию эритроцитов. При этом выполнение иммуногематологических исследований становится невозможным. Образцы крови таких пациентов должны быть заготовлены в предварительно промаркированную и прогретую до 37°C в термостате пробирку. Пробирка немедленно помещается в водяную баню (контейнер с водой), нагретую до температуры 46°C и сразу же доставляется в лабораторию. При поступлении в лабораторию образец помещается в термостат на 37°C.

Соблюдение для таких образцов неразрывной тепловой цепочки, исключаящей даже кратковременное охлаждение ниже 37°C, является единственной возможностью выполнить у них иммуногематологические исследования.

4. Заключение

Отсутствие единых стандартов преаналитического этапа иммуногематологических исследований является источником большого количества ошибок в результатах этих

Преаналитический этап иммуногематологических исследований. Клинические рекомендации.

анализов как для доноров, так и реципиентов гемокомпонентов.

Залогом уменьшения количества ошибок на преаналитическом этапе иммуногематологических исследований является:

- правильная идентификация пациента (донора);
- правильная маркировка пробирки;
- разработка и внедрение максимально информативных бланков направления на исследование;
- обучение среднего медицинского персонала работе с вакуумными системами для взятия крови;
- обучение врачей технике определения группы крови по системе ABO и резус(D) – принадлежности;
- соблюдение правил хранения и доставки биоматериала в лабораторию;
- разработка, внедрение и неукоснительное соблюдение лабораторных СОП для преаналитического этапа.

Предложенные рекомендации по правильной организации в ЛПУ преаналитического этапа иммуногематологических исследований будут способствовать сокращению количества ошибок, улучшению качества результатов выполненных тестов и, таким образом, обеспечению безопасности гемокомпонентой терапии.

5. Рекомендуемая литература

1. В. В. Кузьменко/ Управление качеством лабораторных исследований в клинических лабораториях: учебное пособие/ В.В. Кузьменко, Р.Г. Скворцова. - Иркутск, 2008.
2. Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 52623.4-2015. «Технологии выполнения простых медицинских услуг инвазивных вмешательств». Введен в действие 01.03.2016г.
3. Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 53079.4—2008. «Технологии медицинские лабораторные. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа». Введен в действие с 01.01.2010 года.
4. Организация преаналитического этапа лабораторных исследований: методические рекомендации/ А.Г. Кочетов [и др.]. – М, 2012. – 251с.
5. Организация преаналитического этапа при централизации лабораторных исследований: методические рекомендации МЗ РФ/А.А. Кишкун [и др.]. – М, 2013. – 68с.
6. Обеспечение качества сбора первичных биологических образцов для лабораторных исследований при оказании экстренной и неотложной помощи. Методические рекомендации/ А.Ж. Гильманов [и др.].– М, 2016. -25с.
7. «Правила и методы исследований и правила отбора образцов донорской крови, необходимые для применения и исполнения технического регламента о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии», утверждены постановлением Правительства Российской Федерации от 31 декабря 2010 г., № 1230.
8. Приказ МЗ РФ от 2 апреля 2013 г. N 183н «Об утверждении правил клинического использования донорской крови и (или) ее компонентов».
9. Письмо Минздравсоцразвития РФ от 10.10.2008 N 15-4/3118-09 "О порядке проведения иммуногематологических исследований у беременных, рожениц, плодов и новорожденных"
10. Применение антикоагулянтов в диагностических лабораторных исследованиях//Всемирная организация здравоохранения. - М.: Лабора, 2008. – 79 с.