

**МЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА МЕТОДИК КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ЭРИТРОЦИТСОДЕРЖАЩИХ КОМПОНЕНТОВ КРОВИ****Наталья Сергеевна НИКУЛИНА, Елена Николаевна КАЛИНИНА***Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА  
610027, г. Киров, ул. Красноармейская, 72*

**Цель исследования** – оценить пригодность методик контроля качества эритроцитсодержащих компонентов крови. **Материал и методы.** С целью оценки метрологических характеристик методик осуществлен анализ 46 образцов эритроцитсодержащих компонентов крови: 5 образцов эритроцитной массы, 5 образцов эритроцитной массы лейкофильтрованной, 32 образца эритроцитной взвеси лейкофильтрованной и 4 образца тромбоцитного концентрата лейкофильтрованного. При определении содержания гемоглобина в качестве отрицательного контроля (образец «плацебо») использовали «Натрия хлорид, раствор для инфузий 0,9 %». Содержание гемоглобина (общего и свободного) измеряли тремя методами: гемиглобинцианидным методом, бесцианидным SLS-методом с использованием гематологического анализатора «Sysmex XT-4000i-1», фотометрическим методом с использованием портативного анализатора «HemoCue Hb 201+». Для определения гематокрита использовали два метода: унифицированный метод центрифугирования в гематокритных капиллярах и кондуктометрический метод с использованием гематологического анализатора «Sysmex XT-4000i-1». Количество остаточных лейкоцитов подсчитывали тремя методами: в камере Горяева, проточной цитометрией с использованием гематологического анализатора «Sysmex XT-4000i-1» и анализатора «FACS Canto™II». **Результаты и их обсуждение.** Максимальные значения коэффициентов вариации методик анализа общего гемоглобина и степени гемолиза гемиглобинцианидным методом, гематокрита унифицированным методом составили 3,03, 20,71 и 1,83 % соответственно. При использовании анализатора «Sysmex XT-4000i-1» коэффициенты вариации методик определения содержания гемоглобина составили от 0,29 до 0,54 %, гематокрита – от 0,58 до 1,87 %. В ходе сопоставления трех методик определения количества остаточных лейкоцитов в лейкофильтрованных компонентах крови сделан вывод о целесообразности использования метода проточной цитометрии на анализаторе «FACS Canto™II». Приписанная характеристика методики составила 19,8 %. **Заключение.** Для контроля общего гемоглобина и степени гемолиза рекомендованы гемиглобинцианидный метод и бесцианидный SLS-метод с использованием гематологического анализатора «Sysmex XT-4000i». Определение гематокрита следует проводить с использованием унифицированного метода и с использованием гематологического анализатора «Sysmex XT-4000i». Количество остаточных лейкоцитов в лейкофильтрованных компонентах рекомендовано определять методом проточной цитометрии на анализаторе «FACS Canto™II».

**Ключевые слова:** валидация, эритроцитсодержащие компоненты крови, контроль качества, методики анализа, метрологические характеристики.

Основной задачей учреждений службы крови является заготовка донорской крови и ее компонентов надлежащего качества. В приложении № 1 к Техническому регламенту о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии, утвержденному постановлением Правительства Российской Федерации № 29 от 26.01.2010 г. (далее – Технический регламент), приведен перечень показателей биологической полноценности, функциональной активности и лечебной эффективности донорской крови и ее компонентов [3]. Однако методики анализа указанных показателей в этом документе не представлены. В связи

с этим важной задачей является составление перечня и валидация рекомендуемых к применению методик контроля качества крови донорской и ее компонентов, и определение их метрологических характеристик.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ**

Перечень предлагаемых методик контроля качества эритроцитсодержащих компонентов крови и допустимые коэффициенты вариации представлены в табл. 1. Все испытания проведены в течение срока годности анализируемых образцов компонентов крови.

*Никулина Н.С. – младший научный сотрудник лаборатории препаратов крови, e-mail: nikulina@niigpk.ru  
Калинина Е.Н. – начальник отдела обеспечения качества, e-mail: kalininaen@niigpk.ru*

Таблица 1

Допустимые коэффициенты вариации CV методик контроля качества эритроцитсодержащих компонентов крови

Показатель качества	Метод	Критерий приемлемости	Нормативный документ
Содержание общего гемоглобина	1. Гемиглобинцианидный метод 2. Бесцианидный SLS-метод с использованием гематологического анализатора «Sysmex XT-4000i-1» 3. Фотометрия с использованием портативного анализатора HemoCueHb 201+	$CV \leq 4,0 \%$	Приказ МЗ РФ от 26.05.2003 № 220 «Об утверждении отраслевого стандарта «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов»
Степень гемолиза	1. Гемиглобинцианидный метод 2. Бесцианидный SLS-метод с использованием гематологического анализатора «Sysmex XT-4000i-1» 3. Фотометрия с использованием портативного анализатора HemoCueHb 201+	$CV \leq 23,3 \%$	Приказ МЗ РФ от 07.02.2000 № 45 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения РФ»
Гематокрит	1. Кондуктометрия с гидродинамическим фокусированием с использованием гематологического анализатора «Sysmex XT-4000i-1» 2. Унифицированный метод центрифугирования в гематокритных капиллярах	$CV \leq 2,4 \%$	Приказ МЗ РФ от 07.02.2000 № 45 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения РФ»
Количество остаточных лейкоцитов	1. Метод подсчета в камере Горяева 2. Проточная цитометрия с использованием гематологического анализатора «Sysmex XT-4000i-1» 3. Проточная цитометрия с использованием анализатора FACSCanto™ II	Не установлен	—

Содержание гемоглобина (общего и свободного) в эритроцитсодержащих компонентах крови определяли тремя разработанными методами:

1. Гемиглобинцианидным методом с использованием наборов реагентов «Гемоглобин-1000-«С-Пб» или «Гемоглобин-200-«С-Пб» (ТУ 9398-279-11149567-02, ООО «Фирма Синтакон», Россия). Оптическую плотность измеряли относительно трансформирующего раствора при длине волны 540 нм в кюветках с толщиной оптического слоя 10 мм [4] с использованием спектрофотометра PV1251C (ЗАО «Солар», Беларусь).

2. Бесцианидным SLS-методом с использованием гематологического анализатора «Sysmex XT-4000i-1» (Roche, Швейцария) и комплекта реагентов для него: CELPACK (разбавитель, готовый к использованию), STROMATOLYSER-FB (разбавитель, готовый к использованию), STROMATOLYSER-4DL (разбавитель, готовый к использованию), STROMATOLYSER-4DS (краситель, готовый к использованию), RET SEARCH II (готовый набор, состоящий из разбавителя и

красителя), SULFOLYSER (реагент без цианидов, используется для определения гемоглобина, готовый к использованию), CELLCLEAN (детергент для очистки прибора, удаления остатков лизирующих реагентов, клеток и белков крови из рабочих узлов анализатора), контрольные материалы для анализаторов Sysmex серии X (XS, XT, XE) СВС-XE (уровень 1 – низкий, уровень 2 – норма, уровень 3 – высокий).

3. Фотометрическим методом с использованием портативного анализатора для определения уровня гемоглобина «HemoCue Hb 201+» («HemoCue AB», Швеция) и микрокувет «HemoCue Hb 201» («HemoCue AB»).

Для определения гематокрита использовали два метода:

1. Метод кондуктометрии с гидродинамическим фокусированием с применением гематологического анализатора «Sysmex XT-4000i-1» и комплекта реагентов для него.

2. Унифицированный метод определения общего объема эритроцитов путем центрифуги-

рования в гематокритных капиллярах (ТУ 9464-001-52876351-2000, ООО «МиниМед», Россия) на центрифуге медицинской «MPW-215» («MPW Med.Instruments», Польша) при 8000 об/мин в течение 5 мин. Значение гематокрита считывали с использованием ридера гематокритного круглого («MPW Med.Instruments»).

Количество остаточных лейкоцитов подсчитывали тремя методами:

1) унифицированным методом подсчета в 2-сеточной камере Горяева с использованием светового микроскопа «Микмед-1» («ЛОМО», Россия);

2) с использованием гематологического анализатора «Sysmex XT-4000i-1» и комплекта реагентов для него;

3) методом проточной цитометрии с использованием анализатора «FACS Canto™ II» («BD Biosciences», США) с использованием набора реагентов BD Leuco Count (BD).

Содержание гемоглобина и количество лейкоцитов в дозе рассчитывали исходя из извлекаемого объема компонента крови, определенного с помощью калиброванного мерного цилиндра.

С целью оценки метрологических характеристик методик осуществлен анализ гематокрита унифицированным методом, а также определение содержания гемоглобина и степени гемолиза гемиглобинцианидным методом в 8 единицах эритроцитсодержащих компонентов крови, заготовленных с использованием антикоагулянта CPDA: в 5 образцах эритроцитной массы и в 3 образцах эритроцитной взвеси с ресуспендирующим раствором фильтрованной (ресуспендирующий раствор – SAG-M). При определении содержания гемоглобина в качестве отрицательного контроля (образец «плацебо») использовали «Натрия хлорид, раствор для инфузий 0,9 %». В ходе исследования двумя аналитиками проведено по 10–12 определений каждого показателя в каждом образце. Полученные данные подвергли статистической обработке. В аттестационном эксперименте при определении содержания гемоглобина и гематокрита с использованием анализатора «Sismex XT-4000i-1» исследовали образцы эритроцитной взвеси с ресуспендирующим раствором фильтрованной (ресуспендирующий раствор – SAG-M): содержание гемоглобина определяли в 4 образцах, гематокрита – в 2 образцах. Каждую пробу исследовали десятикратно. С целью сравнения результатов, полученных параллельно разными методиками определения общего гемоглобина, гематокрита и степени гемолиза, проводили контроль 5 образцов эритроцитной массы лейкофильтрованной и 17 образцов

эритроцитной взвеси лейкофильтрованной. Пробы анализировали в дублях.

Проведенный анализ нормативной документации не позволил установить критерии приемлемости при определении остаточных лейкоцитов. В связи с этим установление метрологической характеристики проводили на основе экспериментальной оценки. В аттестационных испытаниях по установлению приписанных характеристик методик определения остаточных лейкоцитов анализировали 10 образцов лейкофильтрованных компонентов крови (6 образцов эритроцитной взвеси с ресуспендирующим раствором лейкофильтрованной, 4 образца тромбоцитного концентрата лейкофильтрованного) методом подсчета в камере Горяева с использованием анализаторов «FACS Canto™ II» и «Sismex XT-4000i».

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе метрологической оценки гемиглобинцианидного метода определения содержания общего гемоглобина при анализе отрицательного контроля значение оптической плотности составило  $0,000 \pm 0,001$ . Содержание гемоглобина в образце «плацебо» было принято равным нулю, что соответствует критерию специфичности. Максимальные значения коэффициентов вариации методик анализа общего гемоглобина и степени гемолиза гемиглобинцианидным методом, гематокрита – унифицированным методом составили 3,03, 20,71 и 1,83 % соответственно. При использовании анализатора «Sismex XT-4000i-1» коэффициенты вариации методик определения содержания гемоглобина составили от 0,29 до 0,54 %, гематокрита – от 0,58 до 1,87 %. По результатам проведенного исследования анализируемая характеристика сходимости во всех случаях не превышала установленных ранее нами критериев приемлемости (см. табл. 1).

Значимость различий результатов определения содержания общего гемоглобина различными методиками оценивали с использованием дисперсионного анализа ANOVA. Значение  $p = 0,0642$  в тесте Левена свидетельствовало об обоснованности проведения дисперсионного анализа для полученных экспериментальных данных. Рассчитанное в модуле ANOVA значение  $p = 0,0741$  подтверждало гипотезу об отсутствии различий между группами [2], следовательно, результаты определения содержания общего гемоглобина с использованием «HemoCue Hb 201+» статистически эквивалентны результатам, полученным на анализаторе «Sismex XT-4000i-1» и гемиглобинцианидным методом.

Таблица 2

Значения коэффициентов вариации результатов определения количества остаточных лейкоцитов в лейкофильтрованных компонентах крови

Метод подсчета в камере Горяева	Анализатор SismexXT-4000i	Анализатор FACSCanto™ II
От 6,8 до 447,2 %	От 34,6 до 129,1 %	От 0,9 до 19,8 %

Затем проводили сравнение методик определения степени гемолиза с применением анализаторов «Sismex XT-4000i-1» и «HemoCue Hb 201+» с референсной методикой – гемиглобинцианидным методом с приписанной характеристикой сходимости, установленной на предыдущем этапе настоящего исследования [1]. Проверку гипотезы о статистической значимости различий осуществляли с использованием *t*-критерия Стьюдента. Данные, полученные с использованием гематологического анализатора «Sismex XT-4000i-1», были статистически эквивалентны данным референсной методики ( $p = 0,19076$ ). Вместе с тем результаты, полученные на портативном анализаторе «HemoCue Hb 201+», значительно отличались ( $p = 0,00000$ ), при этом наблюдалось занижение значений степени гемолиза. В связи с этим сделан вывод о нецелесообразности применения портативного анализатора «HemoCue Hb 201+» для контроля степени гемолиза и содержания общего гемоглобина в эритроцитсодержащих компонентах крови.

Результаты определения гематокрита различными методиками анализировали с использованием *t*-критерия Стьюдента. Рассчитанное значение  $p = 0,14629$  свидетельствовало об отсутствии значимых различий результатов сравниваемых методик определения гематокрита. Следовательно, обе методики (метод центрифугирования в гематокритных капиллярах и метод кондуктометрии с гидродинамическим фокусированием на гематологическом анализаторе «Sysmex XT-4000i-1») пригодны для определения показателя гематокрита в эритроцитсодержащих компонентах крови.

Результаты статистической обработки данных, полученных при определении количества остаточных лейкоцитов различными методиками, представлены в табл. 2, из которой видно, что приемлемыми являются значения коэффициентов вариации результатов определения величины показателя с использованием анализатора «FACS Canto™II», которые составили от 0,9 до 19,8 %. Высокая вариация результатов наблюдалась при использовании камеры Горяева и анализатора «Sismex XT-4000i». Следует отметить, что при визуальном подсчете клеток выявлена тенден-

ция к снижению коэффициентов вариации при увеличении количества остаточных лейкоцитов в образце. Согласно полученным данным, использование камеры Горяева допустимо для подсчета количества лейкоцитов более  $40,0 \times 10^6$  в дозе. Высокие коэффициенты вариации при тестировании образцов на анализаторе «Sysmex XT-4000i» связаны с тем, что количество лейкоцитов от 0 до  $25,0 \times 10^6$  в дозе является фоновым диапазоном согласно технической документации на анализатор. Вместе с тем в соответствии с требованиями Технического регламента количество остаточных лейкоцитов в лейкофильтрованных компонентах крови не должно превышать  $1,0 \times 10^6$  клеток в дозе. Следовательно, метод подсчета в камере Горяева и анализатор «Sysmex XT-4000i» не пригодны для анализа лейкофильтрованных компонентов крови по показателю «Количество лейкоцитов», так как не обладают достаточной аналитической чувствительностью. В ходе сопоставления трех методик определения количества остаточных лейкоцитов в лейкофильтрованных компонентах крови сделан вывод о целесообразности использования метода проточной цитометрии на анализаторе «FACS Canto™II». Приписанная характеристика методики составила 19,8 % [1].

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе метрологической оценки методик контроля качества эритроцитсодержащих компонентов крови установлены приписанные характеристики методик определения общего гемоглобина и степени гемолиза гемиглобинцианидным методом и бесцианидным SLS-методом с использованием гематологического анализатора «Sysmex XT-4000i», доказана статистическая эквивалентность результатов указанных методик. Сделан вывод о непригодности метода фотометрии с применением портативного анализатора «HemoCue Hb 201+» для оценки содержания общего гемоглобина и степени гемолиза. Установлены приписанные характеристики и показано отсутствие статистических различий результатов определения гематокрита унифицированным методом и с использованием гематологическо-



го анализатора «Sysmex XT-4000i». Количество остаточных лейкоцитов в лейкофильтрованных компонентах рекомендовано определять методом проточной цитометрии на анализаторе «FACS Sauto™II» или аналогичном, установлена приписанная характеристика данной методики. Результаты проведенного исследования использованы при разработке проекта рекомендаций «Методы контроля качества эритроцитсодержащих компонентов крови».

Проведенное исследование позволило оценить пригодность существующих методик анализа показателей качества эритроцитсодержащих компонентов крови.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. МИ 2377-98 Государственная система обеспечения единства измерений. Разработка и аттестация методик выполнения измерений. Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/1200005227>

2. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: МедиаСфера, 2000. 312 с.

3. Технический регламент: О требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии: постановление Правительства РФ от 26 января 2010 № 29. Режим доступа: <http://www.transfusion.ru/2010/01-30-1.html>

4. Четкин А.В., Ващенко В.И., Карнищенко А.И., Согрина Ю.Н., Ващенко Т.Н. Лабораторные методы контроля качества гемотрансфузионных средств в службе крови. Методическое пособие. СПб., 2006. 29 с.

## **METROLOGICAL EVALUATION OF QUALITY CONTROL METHODS OF ERYTHROCYTE-CONTAINING BLOOD COMPONENTS**

**Nataliya Sergeevna NIKULINA, Elena Nikolaevna KALININA**

*Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of FMBA  
610027, Kirov, Krasnoarmeyskaya str., 72*

---

**Objective** – to evaluate experimentally the suitability of quality control methods used to control the quality of erythrocyte-containing blood components. **Material and methods.** In order to assess the metrological characteristics of the techniques, 46 samples of erythrocyte-containing blood components were analyzed: 10 samples of erythrocyte mass, 26 samples of erythrocyte suspension, 6 samples of erythrocyte suspension of leukoreduced and 4 samples of leukoreduced platelet concentrate. For determining the hemoglobin content as a negative control («placebo» sample), «Sodium chloride, 0.9 % infusion solution» was used. The hemoglobin content (total and free) was determined by three methods: hemiglobincyanide method, non-cyanide SLS method using a hematology analyzer «Sysmex XT-4000i-1», and photometric method using a portable analyzer «HemoCue Hb 201+». Two methods were used to determine hematocrit: a unified method of centrifugation in hematocrit capillaries, a conductometric method using a hematology analyzer «Sysmex XT-4000i-1». Counting the number of residual leukocytes was performed by three methods: a unified method of counting in 2 Goryaev chambers, flow cytometry using a «Sysmex XT-4000i-1» hematology analyzer, and flow cytometry using a «FACS CantoTMII analyzer». **Results and discussion.** The maximum values of coefficients of variation of the analysis methods of total hemoglobin and the hemolysis degree by the hemiglobincyanide method, hematocrit – by the unified method, were 3.03, 20.71 and 1.83 %, respectively. When using the analyzer «Sismex XT-4000i-1», the coefficients of variation of the methods for determining the hemoglobin content ranged from 0.29 to 0.54 %, hematocrit from 0.58 to 1.87 %. In the course of comparing the three methods for determining the amount of residual leukocytes in the leukoreduced blood components, it was concluded that it is advisable to use the flow cytometry method on the «FACS CantoTMII analyzer». The attributed characteristic of the technique was 19.8 %. **Conclusion.** For the control of total hemoglobin and the degree of hemolysis, the hemiglobincyanide method and the uncyanide SLS method using the «Sysmex XT-4000i» hematology analyzer are recommended. Hematocrit determination should be carried out using a unified method and using a «Sysmex XT-4000i» hematology analyzer. The amount of residual leukocytes in leukoreduced components is recommended to be determined by flow cytometry using a «FACS CantoTMII» analyzer.

---

**Key words:** validation, erythrocyte-containing blood components, quality control, methods of analysis, metrological characteristics.

*Nikulina N.S. – junior researcher of laboratory of blood products, e-mail: nikulina@niigpk.ru  
Kalinina E.N. – head of quality assurance, e-mail: kalininaen@niigpk.ru*