

DACIE AND LEWIS

PRACTICAL

HAEMATOLOGY

TENTH Edition

S. MITCHELL LEWIS, BSc, MD, FRCPATH, DCP, FIBMS

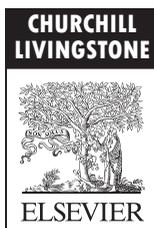
EMERITUS READER IN HAEMATOLOGY, UNIVERSITY OF LONDON;
SENIOR RESEARCH FELLOW IN HAEMATOLOGY, IMPERIAL COLLEGE SCHOOL OF MEDICINE,
HAMMERSMITH HOSPITAL, LONDON, UK

BARBARA J. BAIN, FRACP, FRCPATH

PROFESSOR OF DIAGNOSTIC HAEMATOLOGY,
ST. MARY'S HOSPITAL CAMPUS OF IMPERIAL COLLEGE FACULTY OF MEDICINE, LONDON, UK

IMELDA BATES, MD, FRCP, FRCPATH

SENIOR LECTURER IN TROPICAL HAEMATOLOGY,
LIVERPOOL SCHOOL OF TROPICAL MEDICINE, UNIVERSITY OF LIVERPOOL, LIVERPOOL, UK



С.М. Льюис, Б. Бэйн, И. Бэйтс

ПРАКТИЧЕСКАЯ И ЛАБОРАТОРНАЯ ГЕМАТОЛОГИЯ

Перевод с английского
под редакцией проф. А.Г. Румянцева



Москва

ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА

«ГЭОТАР-Медиа»

2009

УДК 6616.15-07
ББК 54.11
Л91

Льюис, С. М.

Л91 Практическая и лабораторная гематология / С.М. Льюис, Б. Бэйн, И. Бэйтс; пер. с англ. под ред. А.Г. Румянцева. — М. : ГЭОТАР-Медиа, 2009. — 672 с. : ил.
ISBN 978-5-9704-1192-6

Руководство уже более 50 лет является стандартом по лабораторной гематологии в США и Западной Европе. Авторы подробно описывают методики лабораторного обследования больных с заболеваниями крови и интерпретацию полученных результатов, принципы организации и управления работой гематологической лаборатории, а также освещают вопросы контроля за качеством проводимых исследований.

Руководство может служить настольной книгой для заведующих лабораториями, врачей-гематологов, лаборантов, а также справочником по качественной лабораторной практике для руководящего звена учреждений здравоохранения.

УДК 6616.15-07
ББК 54.11

This edition of *Dacie and Lewis Practical Haematology*, 10e by S. Mitchell Lewis, Barbara J. Bain & Imelda Bates is published by arrangement with Elsevier Limited.

Медицина как наука претерпевает постоянные изменения. Результаты экспериментальных и клинических исследований расширяют наши знания и могут изменять лечебную тактику. Авторы и издатели этой книги предприняли все усилия для того, чтобы представить наиболее полную и современную информацию. Однако ввиду вероятности ошибок у любого человека, а также постоянных изменений, происходящих в медицинской науке, ни авторы, ни издатели, ни другие лица, которые участвовали в подготовке данной книги, не могут гарантировать того, что изложенный в ней материал лишён неточностей. Авторы, издатели и другие лица, которые принимали участие в подготовке и выпуске данной книги, не несут ответственности за ошибки, неточности или за результаты использования информации, содержащейся в ней. Читателям желательно подтверждать информацию, изложенную в настоящем издании, другими источниками. В частности, следует изучать информацию о лекарственных препаратах и других изделиях медицинского назначения, которая содержится в инструкциях по применению. Особенно важно это в отношении новых или редко используемых препаратов.

ООО ИГ «ГЭОТАР-Медиа» и «Elsevier Ltd.» не гарантируют качества рекламируемых товаров и услуг.

ISBN 978-0-443-06660-3 (англ.)
ISBN 978-5-9704-1192-6 (рус.)

© Elsevier Ltd., 2006
© Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа», 2009

Оглавление

Авторы	12
Предисловие к изданию на русском языке	13
Предисловие к изданию на английском языке	14
Список сокращений	16
От редакции	16
Глава 1. Забор и обработка крови	17
Предупреждение биологического риска	17
Стандартизированная методика	17
Венозная кровь	17
Капиллярная кровь	19
Различия между капиллярной и венозной кровью	20
Сыворотка	21
Антикоагулянты	21
Влияние хранения на результаты анализов крови	23
Влияние хранения на морфологию клеток крови	23
Однородность образца	24
Список литературы	24
Глава 2. Относительные величины и нормальные значения	26
Относительные нормальные величины	26
Методика статистических расчетов	26
Нормальные относительные величины	28
Физиологические изменения гематологических показателей	31
Список литературы	36
Глава 3. Основные методы исследования крови	39
Измерение уровня гемоглобина	39
Измерение уровня гемоглобина при помощи спектрометра (спектрофотометра) или фотоэлектрокалориметра	39
Гемоглобинцианидный (циангемоглобиновый) метод	40
Оксигемоглобиновый метод	42
Прямая спектрометрия	43
Прямое считывание с портативных гемоглобинометров	43
Гематокритное число, или гематокрит	44
Микрогематокритный метод	44
Эталонная методика, рекомендованная Международным советом по стандартизации в гематологии	45
Подсчет вручную клеток крови и эритроцитарных индексов	46
Подсчет базофилов и эозинофилов	46
Ручной подсчет лейкоцитарной формулы	47
Подсчет тромбоцитов	48
Подсчет ретикулоцитов	48
Автоматизированные приборы для подсчета клеток крови	52
Концентрация гемоглобина	52
Подсчет эритроцитов	52

Системы подсчета	53
Достоверность показателей электронных счетных устройств	54
Гематокрит и средний объем эритроцита	55
Эритроцитарные индексы	56
Изменение объема эритроцитов: ширина распределения эритроцитов по объему	57
Изменение насыщения эритроцитов гемоглобином: ширина распределения гемоглобина в эритроците	58
Подсчет общего количества лейкоцитов	58
Автоматизированный подсчет лейкоцитарной формулы	59
Графики автоматизированных приборов	61
Подсчет тромбоцитов	61
Подсчет ретикулоцитов	62
Калибровка приборов для автоматического подсчета клеток крови	63
Система предупреждения в приборах для автоматизированного подсчета клеток крови	64
Список литературы	65
Глава 4. Изготовление и методы окрашивания мазков крови и костного мозга	69
Изготовление мазков крови на предметных стеклах	69
Окрашивание мазков крови и костного мозга	70
Методы окрашивания	72
Исследование нативных препаратов крови	74
Методы концентрирования и разделения клеток крови	75
Паразиты, определяемые в крови, костном мозге или аспирате селезенки	77
Исследование мазков крови для выявления паразитов	77
Окрашивание тонких мазков для выявления паразитов	78
Малярия	78
Лейшманиоз	79
Трипаносомоз	80
Филяриоз и лоаоз	81
Бабезиоз	82
Эрлихиоз	82
Список литературы	82
Глава 5. Морфология клеток крови в норме и при патологии	84
Изучение мазков крови	84
Морфология эритроцитов	85
Нарушение эритропоэза	85
Нарушение синтеза гемоглобина	86
Повреждение эритроцитов после их созревания	87
Игольчатые эритроциты и фрагментация красных клеток	88
Другие нарушения эритроцитов	89
Изменения, связанные с компенсаторным усилением эритропоэза	91
Эффекты спленэктомии и гипоспленизма	92
Сканирующая электронная микроскопия	92
Морфология лейкоцитов	92
Полиморфно-ядерные лейкоциты	92
Эозинофилы	96
Базофилы	97
Моноциты	97
Лимфоциты	97
Морфология тромбоцитов	98
Список литературы	98
Глава 6. Биопсия костного мозга	100
Аспирация костного мозга	100

Аспирация костного мозга у детей	102
Пункционные иглы	103
Обработка исследуемого материала	103
Исследование пунктата костного мозга	104
Оформление результатов исследования мазка костного мозга	106
Приготовление среза из аспирированного образца костного мозга	108
Чрескожная трепанобиопсия костного мозга	108
Список литературы	110
Глава 7. Железодефицитная анемия и избыток железа	111
Метаболизм железа	111
Содержание железа в организме	113
Нарушения обмена железа	114
Методы оценки содержания железа	114
Сывороточный ферритин	116
Иммунологическое выявление ферритина	117
Оценка концентрации железа в сыворотке	120
Альтернативный метод: оценка сывороточного железа без преципитации белков	121
Концентрация сывороточного железа в норме и при патологии	123
Железосвязывающая способность, сывороточный трансферрин, насыщенность трансферрина железом	123
Определение остаточной железосвязывающей способности	124
Сывороточный трансферрин	125
Насыщенность трансферрином	126
Сывороточные трансферриновые рецепторы	127
Эритроцитарный протопорфирин	129
Методологическая и биологическая вариабельность анализов	130
Прогностическая значимость показателей метаболизма железа	132
Заключение	135
Список литературы	136
Глава 8. Исследование при мегалобластной анемии — обмен кобаламина, фолиевой кислоты и их метаболитов	141
Гематологические характеристики мегалобластной анемии	142
Обследование пациентов с подозрением на дефицит витамина В ₁₂ или фолата	142
Методики определения содержания витамина В ₁₂ и фолата	151
Пробы на конкурентное связывание с белками	151
Серологические пробы на витамин В ₁₂	151
Методики определения содержания фолата в сыворотке	153
Методики определения уровня фолата в эритроцитах	153
Метаболическое исследование путей превращения кобаламина и фолата	155
Определение содержания метилмалоновой кислоты	156
Определение содержания гомоцистеина	156
Определение количества антител к внутреннему фактору	158
Исследование всасывания витамина В ₁₂	159
Экскреция с мочой витамина В ₁₂ (проба Шиллинга)	159
В ₁₂ -связывающая способность сыворотки или плазмы: измерение уровня транскобаламина	161
Латентная связывающая способность витамина В ₁₂ , качественное и количественное определение транскобаламина	161
Голотранскобаламиновые пробы	161
Благодарность	162
Список литературы	162
Глава 9. Лабораторные методы исследования для диагностики гемолитических анемий	166
Исследование для выявления гемолитической анемии	166

Гемоглобин плазмы	168
Гаптоглобин сыворотки	170
Гемопексин сыворотки	173
Исследование плазмы (или сыворотки) на метгемальбумин	173
Обнаружение гемосидерина в моче	174
Химические исследования катаболизма гемоглобина	174
Порфирины	175
Аномальные пигменты гемоглобина	178
Список литературы	181
Глава 10. Исследования при врожденных гемолитических анемиях: аномалии мембраны и ферментов эритроцитов	183
Исследование дефектов мембраны	183
Определение осмотической резистентности путем лизиса в гипотоническом растворе	184
Проточная цитометрия окрашенных клеток	188
Пробы на время лизиса под действием глицерина	190
Криогемолиз	191
Аутогемолиз	191
Анализ белков мембраны	193
Определение дефицита ферментов при врожденных гемолитических анемиях	193
Проба на восстановление метгемоглобина	197
Цитохимические пробы, позволяющие определить дефект метаболизма эритроцитов	199
Скрининг-тест на пириимидин-5'-нуклеотидазу	199
Проба на пируваткиназу	205
Количественная оценка восстановленного глутатиона	207
2,3-Дифосфоглицерат	209
Кривая диссоциации кислорода	212
Список литературы	214
Глава 11. Приобретенные гемолитические анемии	217
Оценка вероятности приобретенной гемолитической анемии у пациента	217
Изучение мазков крови и подсчет клеток при подозрении на приобретенную гемолитическую анемию	217
Иммунные гемолитические анемии	217
Гемолитическая анемия вследствие воздействия окислителей	239
Микроангиопатическая и механическая гемолитические анемии	239
Пароксизмальная ночная гемоглобинурия	240
Список литературы	246
Глава 12. Исследование при наличии патологических гемоглобинов и талассемии	251
Молекула гемоглобина	251
Структурные формы гемоглобина	252
Синдромы талассемии	254
Обследование пациентов с подозрением на гемоглобинопатию	258
Лабораторное определение форм гемоглобина	258
Тесты для определения гемоглобина S	271
Неонатальный скрининг	272
Определение нестабильных гемоглобинов	273
Определение гемоглобина Ms	274
Определение гемоглобинов с нарушенной аффинностью	274
Дифференциальная диагностика наиболее распространенных форм гемоглобина	275
Обследование при подозрении на талассемию	275
Количественное определение гемоглобина A ₂	275
Интерпретация значений гемоглобина A ₂	280
Количественное определение гемоглобина F	281
Оценка внутриклеточного распределения гемоглобина F	283
Оценка состояния обмена железа при талассемии	284

Эритроцитарные включения	285
Пренатальная диагностика генных нарушений глобина	286
Список литературы	286
Глава 13. Цитохимическое исследование эритроцитов и лейкоцитов	289
Цитохимическое исследование эритроцитов	289
Цитохимическое исследование лейкоцитов	293
Список литературы	304
Глава 14. Иммунофенотипирование	306
Введение	306
Методы изучения иммунологических маркеров	306
Список литературы	322
Глава 15. Диагностические радиоизотопы в гематологии	325
Источники радиоизотопов	325
Радиационная защита	325
Объем крови	329
Кинетика железа	334
Оценка продолжительности жизни эритроцитов <i>in vivo</i>	337
Проба на совместимость	342
Визуализация селезенки при помощи сцинтилляционного сканирования	342
Определение кровопотери через пищеварительный тракт	344
Определение продолжительности жизни тромбоцитов	344
Список литературы	345
Глава 16. Исследование гемостаза	348
Компоненты нормального гемостаза	348
Основные подходы к исследованию гемостаза	354
Оборудование для лабораторного анализа	356
Преаналитические переменные: забор крови и приготовление образцов	358
Коагулограмма	365
Интерпретация результатов тестов первого ряда	369
Тесты второго ряда	369
Обследование при кровотечениях, связанных с дефицитом или дефектом факторов свертывания	374
Обследование пациента на наличие циркулирующего ингибитора свертывания крови	379
Обследование пациента с предполагаемой афибриногенемией, гипофибриногенемией или дисфибриногенемией	382
Дефекты первичного гемостаза	383
Исследование при предполагаемой болезни Виллебранда	384
Исследование при подозрении на наследственное или приобретенное нарушение функций тромбоцитов	393
Тест растворимости сгустка для определения фактора XIII	399
Синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови	400
Обследование носителей врожденного дефицита или дефекта системы гемостаза	402
Список литературы	403
Глава 17. Выявление склонности к тромбообразованию	407
Представление о тромбофилии	407
Выявление волчаночного антикоагулянта	407
Исследования при наследственных тромботических состояниях	413
Исследование дефицита протеина С и S	414
Фибринолитическая система	420
«Гиперактивность» и активация тромбоцитов	425
Гомоцистеин	426
Маркеры активации системы свертывания	426
Активированный фактор VIIa	427
Общая оценка системы свертывания	427
Список литературы	427

Глава 18. Лабораторный контроль антикоагулянтной, тромболитической и антиагрегантной терапии	431
Лечение непрямыми антикоагулянтами	431
Стандартизация тромбопластинов	432
Лечение гепарином натрия	436
Тромболитическое лечение	443
Антитромбоцитарное (антиагрегантное) лечение	445
Список литературы	445
Глава 19. Антигены клеток крови и антитела к ним: эритроциты, тромбоциты и гранулоциты	447
Эритроциты	447
Тромбоциты и гранулоциты	472
Список литературы	485
Глава 20. Лабораторные аспекты гемотрансфузии	491
Последние разработки в гемотрансфузиологии	491
Предтрансфузионные этапы определения совместимости	492
Определение групп крови по системе АВ0 и D	494
Скрининг антител	499
Непрямая антиглобулиновая методика	500
Идентификация антител	502
Подбор и трансфузия эритроцитарной массы	503
Перекрестная проба на совместимость крови	504
Экстренный подбор крови	506
Аntenатальная серология и гемолитическая болезнь новорожденных	508
Исследование совместимости в особых трансфузиологических ситуациях	513
Лабораторный анализ трансфузионных реакций	516
Список литературы	519
Глава 21. Молекулярный и цитогенетический анализ	522
Представление об анализе ДНК	522
Выделение ДНК	523
Полимеразная цепная реакция	523
Анализ продуктов полимеразной цепной реакции	525
Исследование гемоглинопатий	527
Нарушения свертывающей системы	530
Лейкоз и лимфома	532
Исследование химеризма «хозяин—донор»	543
Дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы	544
Приложения: техническое описание методик	544
Словарь	556
Список литературы	556
Глава 22. Прочие методы	559
Исследования реакций острой фазы	559
Гетерофильные антитела в сыворотке: диагностика инфекционного мононуклеоза	564
Эритропоэтин	566
Дополнительные тесты на малярию	567
Список литературы	568
Глава 23. Подходы к диагностике и классификации заболеваний крови	571
Общие проявления гематологических заболеваний	571
Первичные скрининг-тесты	571
Специфические тесты на часто встречающиеся заболевания крови	578
Прочие заболевания	579
Классификация онкологических заболеваний крови	580
Список литературы	585
Глава 24. Организация и управление лабораторией	586
Структура и функции управления	586

Достоверность исследования	589
Выбор исследования	590
Оборудование	591
Обработка данных	593
Преданалитический и постаналитический этапы исследования	596
Аудит и аккредитация лаборатории	599
Международные стандарты работы	601
Сравнительный анализ	601
Список литературы	603
Глава 25. Техника безопасности при работе в лаборатории	605
Биологически опасные образцы	607
Утилизация отходов	611
Транспортировка образцов	611
Список литературы	612
Глава 26. Обеспечение качества	613
Эталонные препараты	615
Материалы для контроля качества	616
Анализ данных	619
Внешняя оценка качества	622
Протокол обеспечения качества работы диагностических лабораторий	625
Список литературы	626
Глава 27. Гематологические исследования в лабораториях с ограниченными ресурсами	627
Введение: типы лабораторий	627
Организация клинико-лабораторного обслуживания	628
Доступность исследований на каждом уровне	629
Важнейшие гематологические тесты	629
Поддержание качества и достоверности исследований	631
Основные гематологические тесты	631
Лабораторное обеспечение терапии ВИЧ/СПИДа: количество	637
CD4-положительных Т-клеток	637
Управление лабораторией	637
Список литературы	639
Приложение	642
Приготовление основных часто применяемых реактивов, антикоагулянтов и консервирующих растворов	642
Буферы	643
Реактивы	645
Эталонные стандарты и реактивы	646
Подготовка стеклянного оборудования	647
Размеры пробирок	648
Скорость центрифугирования	648
Единицы массы и другие единицы измерения, часто применяемые в гематологии	649
Атомный вес и молекулярная концентрация	649
Дозы ионизирующего излучения	649
Статистические анализы	650
Анализ ANOVA	651
Автоматические (механические) пипетки	656
Аппараты для автоматического разведения	657
Микроскопия	657
Плановое обслуживание микроскопа	658
Дефибринирование крови	659
Список литературы	659
Указатель	660

Авторы

Barbara J. Bain, FRACP, FRCPath

Imperial College Faculty of Medicine
St. Mary's Hospital
London, UK

Imelda Bates, MD, FRCP, FRCPath

Liverpool School of Tropical Medicine
University of Liverpool
Liverpool, UK

Sheena Blackmore CSci, FIBMS

Department of Haematology
Good Hope Hospital NHS Trust
Birmingham, UK

**Anne Bradshaw, BSc, FIBMS,
DMLM**

Department of Haematology
Hammersmith Hospital
London, UK

**Daniel Catovsky, FRCP, FRCPath, DSc,
FMedSci**

Royal Marsden Hospital
The Institute of Cancer Research
London, UK

**Barbara De la Salle, MSc, CSci,
FIBMS**

UK NEQAS (H)
Watford General Hospital
Watford, UK

Inderjeet Dokal, MD, FRCP, FRCPath

Department of Haematology
Imperial College Faculty of Medicine
Hammersmith Hospital
London, UK

Malcolm Hamilton, MRCP, FRCPath

Haematology Department
Good Hope Hospital
Sutton Coldfield, UK

Jaspal Kaeda, PhD, FIBMS, GiBiol

Department of Haematology
Hammersmith Hospital
London, UK

Sue Knowles, BSc, MB, FRCP, FRCPath

Department of Haematology
St. Helier's Hospital
Carshalton, Surrey, UK

Mike Laffan, DM, FRCP, FRCPath

Department of Haematology
Imperial College Faculty of Medicine
Hammersmith Hospital
London, UK

Mark D. Layton, FRCP, FRCPath

Department of Haematology
Imperial College Faculty of Medicine
Hammersmith Hospital
London, UK

**S. Mitchell Lewis, BSc, MD, FRCPath,
DCP, FIBMS**

Department of Haematology
Imperial College School of Medicine
Hammersmith Hospital
London, UK

Richard Manning, BSc, FIBMS

Department of Haematology
Hammersmith Hospital
London, UK

Estella Matures, MD, PhD, FRCPath

Royal Marsden Hospital
The Institute of Cancer Research
London, UK

Barry Mendelow, MD

Department of Haematology
University of Witwatersrand
Johannesburg, South Africa

Clare Milkins, BSc, CSci, FIBMS

UK NEQAS (BGS)
Watford General Hospital
Watford, UK

Ricardo Morilla, MSc

Royal Marsden Hospital
Department of Academic Haematology
London, UK

Fiona Regan, MRCP, MRCPath

Department of Haematology
Hammersmith Hospital
London, UK

David Roper, FIBMS, MSc

Department of Haematology
Hammersmith Hospital
London, UK

**Megan Rowley, FRCP,
FRCPath**

Department of Haematology
Kingston Hospital
Kingston, UK

**David Swirsky, FRCP,
MRCPath**

Department of Haematology
Leeds General Infirmary
Leeds, UK

Noriyuki Tatsumi, MD, PhD
International Buddhist University
Osaka, Japan

Tom Vulliamy, BA, PhD
Department of Haematology
Hammersmith Hospital
London, UK

Barbara Wild, PhD, FIBMS
Department of Haematology
King's College Hospital
London, UK

Nay Win, FRCP, FRCPath
Red Cell Immunohaematology
National Blood Service:
Tooting Centre
London, UK

**Mark Worwood, BSc, PhD,
FRCPath, FMed Sci**
Department of Haematology
Cardiff University School
of Medicine
Heath Park, Cardiff, UK

Предисловие к изданию на русском языке

Руководство «Практическая и лабораторная гематология» уже в течение 50 лет является стандартом лабораторной гематологии в США и Европе. В России выходит перевод юбилейного, 10-го издания книги, увидевшего свет в 2006 г.

Руководство описывает все методики, используемые при обследовании пациентов с заболеваниями системы крови. С точки зрения современной науки подробно описаны основные принципы каждого исследования, причины возможных ошибок, показания к проведению, интерпретация результатов и их клиническое значение.

В книге рассмотрен широкий спектр вопросов, затрагивающих практическую деятельность гематологической лаборатории: ее организацию и управление, основы техники безопасности и контроля за качеством исследований. Книга содержит большое количество иллюстративного материала: высококачественные фотографии мазков

крови при различных патологических состояниях и в норме, краткие алгоритмы исследований при наиболее распространенных гематологических заболеваниях. В отдельной главе, посвященной организации исследований в лабораториях с ограниченными ресурсами, подробно перечислены обязательные тесты, которые должны проводиться на различных уровнях оказания медицинской помощи.

Руководство рекомендовано гематологам, специалистам по лабораторной клинической диагностике (биохимикам, биофизикам, цитологам, патологам и др.), врачам-лаборантам, другим сотрудникам гематологических лабораторий, включая средний медицинский персонал. Поскольку фундаментальных руководств по указанным аспектам деятельности гематологических лабораторий не имеется, выход в свет данной книги представляется весьма своевременным.

*Директор ФГУ «Федеральный
научно-клинический центр
гематологии, онкологии и иммунологии
Минздрава России»,
чл.-кор. РАМН, проф.*



А.Г. Румянцев

Предисловие к изданию на английском языке

Первое издание этой книги под редакцией Дж. Дэйси (J.V. Dacie) вышло в 1950 г. Через 56 лет вышло данное юбилейное, 10-е издание. В начале руководство было построено на курсе лекций по гематологии для получения диплома по клинической патологии Лондонского университета, а впоследствии — на лекциях для специализации по гематологии в аспирантуре Королевской медицинской школы.

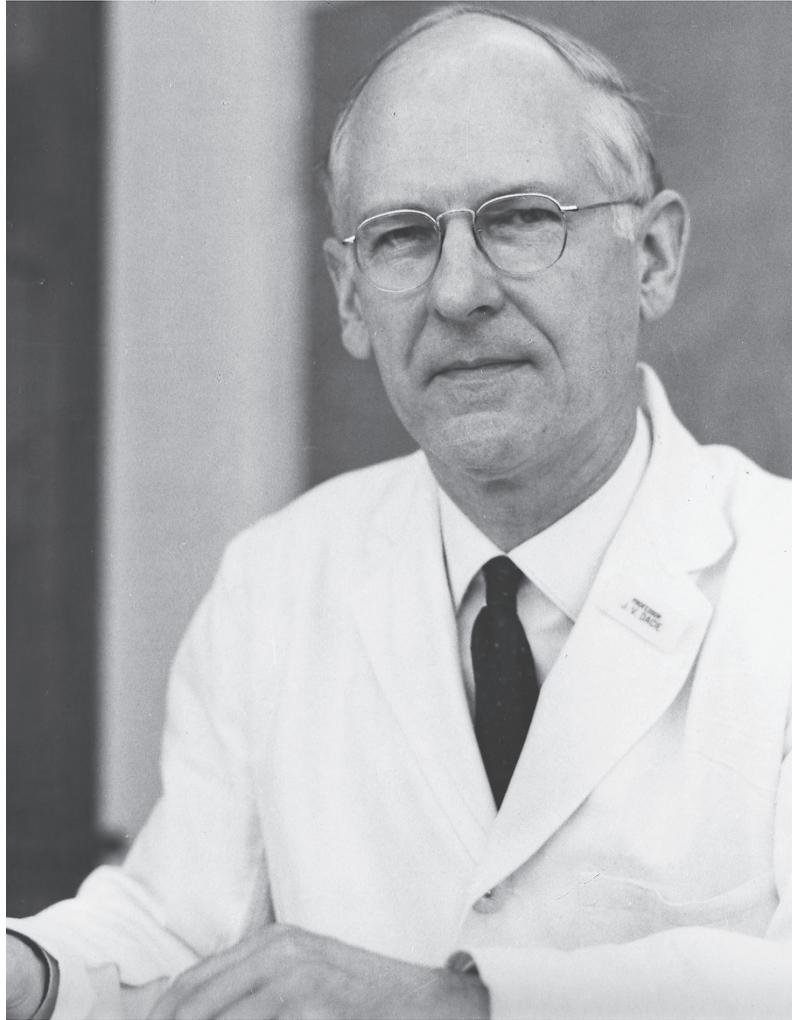
В последние 50 лет наблюдается огромный прогресс во всех областях медицинской науки, среди которых прежде всего выделяется клиническая и лабораторная гематология. В начале своего существования лабораторная гематология занималась лишь подсчетом количества клеток при помощи счетной камеры и микроскопа. Общий анализ крови до сих пор остается важнейшей частью клинического обследования и играет большую роль в постановке диагноза и назначении лечения, однако в наши дни автоматические анализаторы определяют физико-химические свойства отдельных клеток крови и точные размеры эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов со скоростью, какую раньше невозможно было даже представить. Современные технологии лабораторной диагностики позволяют проводить в обычных лабораториях такие сложные исследования, как анализ ДНК, иммунофенотипирование лейкозных клеток, диагностика мегалобластных анемий и радиоизотопные тесты. Тем не менее для многих лабораторий доступны не все современные исследования, поэтому в данное руководство включена глава, посвященная важнейшим исследованиям в лабораториях с ограниченными ресурсами. Появляется все больше готовых наборов для лабораторной диагностики, многие исследования можно сделать у постели больного. Этим диктуется необходимость того, чтобы лаборатории участвовали в процессах, обеспечивающих надежность указанных исследований.

Интернет также оказывает огромное влияние на медицинскую науку и практику. Сегодня там можно найти массу информации практически по любой теме, часто при помощи поиска лишь по одному ключевому слову. В руководстве указаны некоторые важные гематологические интернет-сайты, включая страницы производителей лабораторного оборудования и реактивов.

В то время как клинические гематологи занимаются лечением больного, вопросами лабораторной диагностики больше занимаются ученые-медики. Тем не менее как ученые, так и клиницисты должны понимать важность эффективной организации работы и управления лабораторией, необходимость поддерживать техническую сторону исследований на высоком уровне и постоянно проводить контроль качества, а также значимость гематологических исследований для медицинской практики. Основы качественной лабораторной практики были сформулированы Дж. Дэйси в первом издании данного руководства. Он писал: «Все, кто работает в лаборатории, должны знать клиническую значимость исследований, которыми они занимаются, их относительную ценность и порядок, в котором их следует проводить». Мы попытались во всем следовать данному подходу, лишь приведя его в соответствие с реалиями нашего времени.

Выражаем благодарность всем участникам издания, перечисленным на следующих страницах, а также коллегам, которые дали нам ценные советы в ходе работы над руководством, особенно Nichel Deenmatmode (радиоизотопные исследования), Mark Griffin (здоровье и безопасность персонала), Julia Howard (цитогенетические исследования), John Meek (биохимия), Andrew Osei-Bimpong (общая гематология).

Наше юбилейное издание посвящается памяти сэра Джона Дэйси, а также его многочисленным ученикам из



Sir John V. Dacie, MD, FRCPath, FRS
(1912–2005)

разных стран, которые многого добились под его руководством и влиянием, и образцовому научному центру, созданному им в бывшей аспирантуре Королевской ме-

дицинской школы Лондонского университета (ныне Медицинский факультет Имперского колледжа Лондона на базе больницы Хаммерсмит).

*С. Митчелл Льюис
Барбара Бэйн
Имелда Бэйтс*

Список сокращений

АДФ	аденозиндифосфат	НАДФ	никотинамидадениндинуклеотидфосфат
АТФ	аденозинтрифосфат	НАДФН	восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат
АЧТВ	активированное частичное тромбопластиновое время	ПВ	протромбиновое время
ВЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография	ПЦР	полимеразная цепная реакция
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения	РНК	рибонуклеиновая кислота
ДВС	диссеминированное внутрисосудистое свертывание	СКВ	системная красная волчанка
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота	СКО	стандартное квадратичное отклонение
ИЛ	интерлейкин	СОЭ	скорость оседания эритроцитов
КВ	коэффициент вариабельности	СПИД	синдром приобретенного иммунодефицита
кДНК	комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота	ТВ	тромбиновое время
МИЧ	международный индекс чувствительности	цАМФ	циклический аденозинмонофосфат
МКБ	Международная классификация болезней	ЦНС	центральная нервная система
МНО	международное нормализованное отношение	ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота
мРНК	матричная рибонуклеиновая кислота	ARMS	амплификационная система для идентификации мутаций
НАД	никотинамидадениндинуклеотид	HLA	лейкоцитарные антигены человека
НАДН	восстановленный никотинамидадениндинуклеотид	IRE	железочувствительная последовательность
		pO ₂	парциальное давление кислорода

От редакции

В соответствии с рекомендациями Международной организации по стандартизации (ISO), Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и других международных организаций, для обозначения единиц измерения мы использовали Международную систему SI (см. «Приложение»). Концентрацию растворов выражали в моль/л (по веществу) или г/л (по массе) в зависимости от конкретного случая. Хотя в некоторых странах до сих пор гемоглобин выражают в г/дл, мы, в соответствии с международными рекомендациями, выражаем гемогло-

бин в г/л. Чтобы получить значение гемоглобина в г/дл, нужно разделить соответствующее значение в г/л на 10.

Если какой-либо реактив, набор реактивов или аппарат выпускается только одним производителем или рекомендована какая-либо конкретная марка устройства, мы указывали фирму-изготовитель. Если какой-либо материал или прибор выпускается разными компаниями, их названия не указывались. Каталоги продукции этих производителей и подробную информацию о ее использовании можно найти на интернет-страницах соответствующих фирм.

1 Забор и обработка крови

*С. Митчелл Льюис (S. Mitchell Lewis)
и Нориюки Татсуми (Noriyuki Tatsumi)*

Точный и последовательный методологический подход при оценке функций крови и их нарушений позволяет свести к минимуму вероятность недостоверных результатов, обусловленных техническими погрешностями. Первый этап исследования — получение образца крови. Для большинства гематологических и биохимических исследований используют венозную кровь. В ряде случаев можно использовать и капиллярную кровь, если она получена путем свободного истекания (см. ниже), но данный метод применим только у детей и в тех случаях, когда необходимо лишь несколько капелек крови (например, при скрининговых тестах). Аспирация костного мозга описана в гл. 6.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО РИСКА

Для снижения риска заражения патогенными микроорганизмами следует строго соблюдать необходимые меры предосторожности на всех этапах лабораторного исследования. Основные меры предосторожности описаны в гл. 25. Лаборант обязан использовать одноразовые пластиковые или тонкие резиновые перчатки*. Желательно также использовать защитный передник или фартук, а при необходимости — обычные или защитные очки. Чтобы избежать травмы, следует осторожно обращаться со шприцами, иглами и скарификаторами.

По возможности нужно использовать одноразовые шприцы, иглы и скарификаторы и не допускать их повторного применения. Изделия многократного применения после каждого использования необходимо стерилизовать в автоклаве или сухожаровом шкафу при 160 °С в течение 1 ч (см. гл. 25).

* Ряд индивидуумов могут иметь аллергические реакции или на пластиковые, или на резиновые перчатки (см. гл. 25).

СТАНДАРТИЗИРОВАННАЯ МЕТОДИКА

Элементы крови могут повреждаться под воздействием факторов, перечисленных в табл. 1-1, поэтому при заборе образцов крови и работе с ними необходимо соблюдать стандартную методику. Опубликован ряд статей [1–3], посвященных рекомендациям по стандартизации методики забора крови и обработке анализируемых образцов.

ВЕНОЗНАЯ КРОВЬ

Забор и обработку крови обычно проводят специально обученные лаборанты. Опубликованы инструкции с рекомендациями к выполнению данных процедур [1–4].

Набор для венепункции

Удобны к использованию готовые наборы, содержащие все необходимое для забора крови (см. табл. 1-2).

Одноразовые пластиковые шприцы и иглы

Иглы не должны быть слишком тонкими, большими, или длинными; обычно используют иглы 19 или 21G** для взрослых и 23G (особенно с короткой канюлей около 15 мм) для детей. В ряде случаев для забора крови удобен катетер с крылышками («бабочка»), представляющий собой пластиковую трубочку, соединенную с иглой. Катетер прикрепляют к канюле шприца или игле для прокола крышечки емкости для забора крови (см. далее).

** Международная организация по стандартизации установила стандарт (ISO 7864), соотносящий следующие диаметры игл с их маркировкой: 19G=1,1 мм, 21G=0,8 мм, 23G=0,6 мм.

Таблица 1-1. Причины недостоверных результатов, связанные с неправильной техникой забора образцов для исследования

Действия, предшествующие сдаче анализа
<ul style="list-style-type: none"> • Посещение туалета менее чем 30 мин до анализа. • Прием жидкости и/или пищи в течение 2 ч до анализа. • Курение. • Физическая активность (в том числе быстрая ходьба) в течение 20 мин перед анализом. • Стрессовое состояние, прием препаратов или пищевых добавок в течение 8 ч до анализа
Во время забора образца
<ul style="list-style-type: none"> • Различное время суток (суточные вариации). • Положение пациента (лежа, сидя или стоя). • Гемоконцентрация из-за длительного сдавления конечности жгутом. • Чрезмерное отрицательное давление при поступлении крови в шприц. • Неправильный тип пробирки. • Забор капиллярной крови вместо венозной
Подготовка препарата
<ul style="list-style-type: none"> • Недостаточное или избыточное количество антикоагулянтов. • Неадекватное смешивание крови с антикоагулянтом. • Ошибки при идентификации пациента и/или образца крови • Неадекватные условия хранения образца • Задержка при транспортировке в лабораторию

Емкости для образцов

Стандартные емкости для анализов имеют отметку уровня для добавления крови. Они содержат в качестве антикоагулянтов двукальциевую, трикальциевую или динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). На рынке медицинских товаров также представлены контейнеры, содержащие тринатриевую соль лимонной кислоты, гепарин или цитрат декстрозы, пробирки без добавок, используемые при анализе сыворотки. Требования к форме и маркировке тары для забора образцов крови описаны в материалах, посвященных национальным и международным стандартам (например, Международного совета по стандартизации в гематологии [5]). Существует и Европейский стандарт (EN 14820). В настоящее время нет универсального правила цветовой маркировки контейнеров с различными добавками, поэтому лаборант, забирающий кровь, обязан знать, какими цветами маркирует добавки поставщик данной клиники.

Системы для забора крови, широко используемые в настоящее время, состоят из стеклянной или пластиковой

Таблица 1-2. Набор для венепункции

- Шприцы и иглы.
- Жгут.
- Контейнеры (пробирки) для образцов (или система для забора крови) — пустые и с различными антикоагулянтами.
- Необходимы тампоны, пропитанные 70% изопропиловым спиртом или 0,5% хлоргексидином.
- Стерильные марлевые тампоны или ватные подушечки.
- Пластырь.
- Самоклеющиеся пластиковые (перевязочные) пакеты.
- Штатив, помогающий поддерживать образцы вертикально в течение процесса заполнения.
- Прочный контейнер для использованных игл и отходов

пробирки (емкости), содержащей антикоагулянт (или без него), с определенным уровнем отрицательного давления, иглы и держателя иглы для прикрепления последней к трубке. Главное преимущество системы — минимальный риск изменения состава воздушной среды в контейнере при заборе образцов, так как для заполнения пробирки достаточно просто проткнуть крышечку контейнера, а не удалять ее [6, 7]. Системы для забора крови удобны в тех случаях, когда необходимо получить несколько образцов с различными антикоагулянтами. Заданное отрицательное давление обеспечивает нужный объем поступающей в пробирку крови, достаточное для последующих анализов количество вещества, и правильную пропорцию при смешивании с антикоагулянтом, если он присутствует. Покрытые силиконом системы применяют для стандартного определения показателей свертывания крови.

Методика венепункции

Лаборант в первую очередь обязан записать данные, удостоверяющие личность пациента и проверить правильность заполнения бланка направления, а также убедиться в наличии всех необходимых для процедуры емкостей и инструментов.

Для забора крови из локтевой вены или других видимых вен предплечья предпочтительнее использовать специальную систему или шприц. Перед началом процедуры необходимо обработать кожу 70% спиртом (например, изопропанолом) или 0,5% хлоргексидином и дождаться подсыхания обработанной поверхности, целесообразность обработки антисептиком кожи в месте предполагаемого прокола для предотвращения инфицирования неясна [8]. Необходимо не допускать загрязнения жгута кровью для предупреждения инфицирования [9]. Жгут следует наложить непосредственно выше места венепункции и снять

сразу после начала поступления крови в шприц или систему. В противном случае могут возникнуть венозный застой и гемоконцентрация, изменятся свойства крови [4]. Катетер типа «бабочка» удобно использовать для получения серии образцов крови пациента.

Успешному проведению венопункции способствует согревание руки пациента, повышение давления до уровня диастолического в манжете сфигмоманометра, наложенной на плечо, похлопывание по коже вокруг места пункции. После обработки кожи, подсыхания антисептика и наложения жгута попросите пациента несколько раз сжать кулак. Вены, подходящие для пункции, как правило, становятся заметными. Если у пациента вены тонкие, возможно применение катетера «бабочка» или иглы 23G. У тучных пациентов иногда пунктируют вены на тыльной стороне кисти после ее согревания в теплой воде; однако стенки сосудов тыла кисти хрупкие и высока вероятность кровотечения в окружающие ткани. Венопункция не должна приводить к царапинам или образованию гематомы.

При заборе крови шприцем поршень следует тянуть медленно, не пытаясь получить кровь быстрее ее естественного поступления. Антикоагулянт перемешивают с образцом крови, переворачивая контейнер несколько раз. Избежать гемолиза образца можно, используя чистые инструменты, медленно набирая кровь, избегая применения слишком тонких игл, бережно переливая кровь в пробирку, не допуская вспенивания при извлечении иглы и последующем смешивании с антикоагулянтом. Если же откачивать кровь слишком медленно или плохо перемешать ее с антикоагулянтом, то возможно частичное свертывание образца. После забора емкость с материалом необходимо прочно закрыть. Если получить кровь не удалось, важно, сохраняя спокойствие, выявить причину неудачи. Причиной могут служить технические ошибки при выполнении манипуляции: продвижение иглы параллельно коже, а не вглубь; прокалывание вены насквозь. После двух–трех неудачных попыток следует дать пациенту немного отдохнуть и передать его другому специалисту.

После забора крови и снятия жгута следует удалить иглу и прижать место пункции стерильным тампоном. Руку после извлечения иглы нужно поднять на несколько минут, продолжая оказывать давление на тампон, а затем проверить, полностью ли остановилось кровотечение. В заключение процедуры нужно заклеить место пункции небольшим пластырем.

При получении крови из постоянного или временного катетера необходимо отмыть катетер от гепарина. Если пациенту производилось внутривенное вливание, то венозную кровь на анализ из этой руки брать не следует.

Действия после венопункции

Лаборант повторно записывает данные, удостоверяющие личность пациента, и проверяет правильность заполнения направления на анализ. Кроме заполнения соответствующего бланка, необходимо маркировать емкости с каждым полученным образцом сразу же после забора. Маркировка образца должна обязательно включать фамилию, имя или инициалы пациента, номер больничной карты (истории болезни), дату рождения и время сдачи анализа. Ту же информацию необходимо внести в бланк направления вместе с указанием палаты или отделения, имени врача, назначившего анализ, показателей, которые нужно исследовать. По мере необходимости следует прикрепить предупреждение о биологической опасности к контейнеру и бланку направления. Если процесс идентификации пациентов автоматизирован, то маркировку пробирки и бланк направления помечают штрихкодом с соответствующими данными.

Образцы крови следует транспортировать в одиночных пластиковых пакетах отдельно от бланков направлений, чтобы не допустить загрязнения последних при протекании пакетов. В некоторых случаях возможна транспортировка образцов в лабораторию в пробирках, зафиксированных вертикально в держателе или на штативе, помещенном вместе с бланками направлений в транспортный контейнер.

Утилизация отходов

Не отделяя иглу от шприца, следует поместить их вместе с использованными тампонами и другими материалами в устойчивый к проколам контейнер для отходов (см. гл. 25). При необходимости утилизировать иглу отдельно от шприца, ее следует снять со шприца с помощью пинцета или другого подобного инструмента. В качестве альтернативы можно уничтожить иглу на месте при помощи специальных устройств (например, *Sharp-X, Biomedical Disposal Inc, www.biodisposal.com*).

КАПИЛЛЯРНАЯ КРОВЬ

Для получения небольшого количества крови, а также для непосредственного проведения анализа или забора крови в капиллярные пробирки с гепарином или специальное приспособление для микрозабора крови, обработанное антикоагулянтом, можно использовать прокол кожи (см. ниже). Этот метод используют в основном в случае, когда невозможно получить венозную кровь (например, у грудных детей, тучных пациентов, или для продолжительного контроля за состоянием пациента).

Забор капиллярной крови

Прокол кожи производят при помощи разовой иглы или ланцета (скарификатора). У взрослых и детей старшего возраста кровь можно забрать из пальца. Рекомендуется использовать для проколов ладонную поверхность дистальной фаланги III–IV пальцев, отступив на 3–5 мм от ногтевого ложа [1]. Кровь, полученная из мочки уха, недостоверно отражает состав циркулирующей крови из-за сниженного кровотока в этой области. У младенцев подходящие образцы для анализов можно получить при глубоком проколе подошвенной поверхности пятки в участках, указанных на рис. 1-1. Пятку предварительно согревают в теплой воде. Не следует пунктировать центральную область подошвы и заднюю часть свода стопы, особенно у новорожденных, во избежание повреждения или инфицирования прилежащих костей предплюсны.

Необходимо обработать поверхность 70% спиртом (например, изопропиловым) и дождаться ее подсыхания.

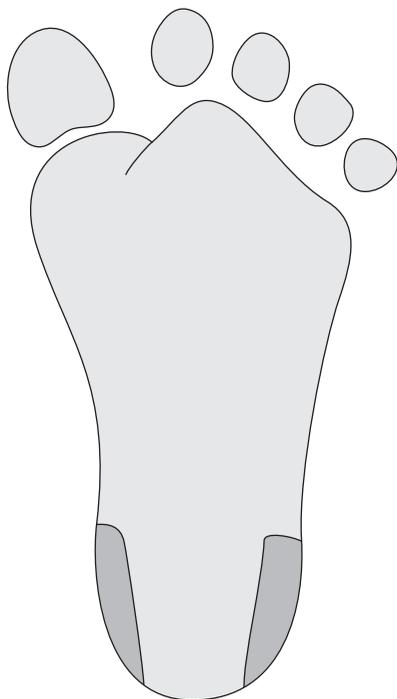


Рис. 1-1. Пункция кожи у детей. Место пункции должно располагаться в пределах наружной медиальной и наружной латеральной частей подошвенной поверхности стопы, отмеченных штриховкой.

Проколоть кожу на глубину 2–3 мм стерильным одноразовым скарификатором. Удалить первую каплю крови сухой стерильной марлей. При необходимости мягко надавить, поддерживая свободное истечение крови. Вторую и последующие капли можно собрать микропипеткой на 10–20 мл и добавить в емкость с раствором для разведения или переместить капли крови непосредственно на полоску с реактивом. При сборе крови допустимо лишь легкое сжатие для поддержания кровотока, крупные капли крови должны вытекать медленно, без дополнительного воздействия. В противном случае результаты могут оказаться недостоверными. Когда слабый кровоток обусловлен низкой температурой участка, выбранного для пункции, результаты измерений уровня гемоглобина, количества эритроцитов и лейкоцитов будут завышены.

Существуют способы забора капиллярной крови с использованием капиллярных трубок, по которым кровь за счет поверхностного натяжения поступает в прикрепленный микроконтейнер (например, *Microtainer**) [10]. В другой системе (*Unopette**) калиброванный капилляр заполняется кровью в соответствии с предварительно отмеренным количеством раствора для ее разбавления [11]. При хорошем проколе можно собрать достаточно большое количество свободно вытекающей крови в стеклянную или пластиковую емкость [12].

Использованные скарификаторы и иглы необходимо поместить в плотный контейнер для последующей утилизации. Недопустимо их повторное использование.

Приготовление мазка крови

Мазок следует приготовить непосредственно после забора крови. В наборе для венепункции есть несколько чистых предметных стекол и приспособлений для нанесения мазка. Лаборант должен пройти соответствующую подготовку по приготовлению мазков (см. гл. 4). Для приготовления мазка крови возможно использование автоматических приспособлений [13]. Если же мазок не был приготовлен на месте, необходимо сделать его в лаборатории, как только образцы крови будут доставлены.

РАЗЛИЧИЯ МЕЖДУ КАПИЛЛЯРНОЙ И ВЕНОЗНОЙ КРОВЬЮ

Венозная и капиллярная кровь не идентичны. Кровь, полученная после прокола кожи, представляет собой

* Biomedical Disposal Ltd.

смесь крови из мелких артерий, вен и капилляров и вдобавок содержит немного межклеточной (интерстициальной) и внутриклеточной жидкости [1, 4, 14]. Некоторые исследователи полагают, что различия между капиллярной и венозной кровью при ее свободном истекании не существенны [15], но было доказано отличие образцов крови, полученных при кожной и венозной пункциях у новорожденных [16], детей [17] и взрослых [18]. Различия могут быть более выраженными при низкой температуре, приводящей к замедлению капиллярного кровотока [4].

Гематокрит, количество эритроцитов и уровень гемоглобина в капиллярной крови немного больше, чем в венозной. Общее количество лейкоцитов и нейтрофилов выше примерно на 8%, количество моноцитов на 12%, а в некоторых случаях на 100%, особенно у детей. Наоборот, количество тромбоцитов выше в венозной крови по сравнению с капиллярной, в среднем эта разница составляет 9%, но в ряде случаев может достигать 32% [16, 18]. Это — следствие адгезии тромбоцитов в месте прокола кожи.

СЫВОРОТКА

Различие между плазмой и сывороткой состоит в том, что в последней отсутствуют фибриноген и некоторые факторы свертывания крови. Кровь, собранную для анализа сыворотки, нужно поместить в стерильную пробирку с крышечкой или готовую систему без антикоагулянта и оставить на 1 ч при комнатной температуре* для образования тромба. После этого ступок нужно аккуратно отделить от стенки контейнера тонкой деревянной, пластмассовой или стеклянной палочкой. Попытка грубого удаления может вызвать лизис клеток крови. Пробирку необходимо закрыть крышкой. Некоторые изделия содержат активаторы тромбообразования в составе геля для ускоренного разделения сыворотки (например, пробирки для отделения сыворотки).

Пробирки, как содержащие, так и не содержащие разделитель сыворотки, центрифугируют в течение 10 мин приблизительно при 1200 г. Пипеткой переносят супернатант в другую пробирку и вновь центрифугируют 10 мин при тех же условиях. Получившийся супернатант забирают для анализа или хранения. Для большинства анализов сыворотка должна храниться при температуре 4 °С, однако, если исследование отложено, сыворотку следует хранить не более 3 мес при температуре –20 °С. При температуре –40 °С и ниже она может храниться длительное время. Замороженные образцы размораживают на под-

ставке или на водяной бане при комнатной температуре, после чего несколько раз переворачивают для лучшего перемешивания и лишь затем используют для анализа. Недопустимо повторное замораживание образцов.

Дефибринированная цельная кровь

Методику, описанную в Приложении, используют для получения свободных от плазмы эритроцитов, например, для определения типа гемолитической анемии. При этой методике сохраняется морфология клеток.

Холодовые агглютинины

В случае необходимости определения холодовых агглютининов сыворотку крови отделяют при 37 °С. Если известно, что у пациента в крови присутствуют холодовые агглютинины в высокой концентрации, лучше выполнить забор крови в лаборатории предварительно нагретым шприцем, а затем поместить кровь в емкость, нагретую до 37 °С. Заполненный контейнер нужно немедленно поместить на водяную баню с температурой 37 °С. Только таким образом можно получить сыворотку, свободную от гемоглобина, в случае, когда присутствуют холодовые антитела, вызывающие агглютинацию даже при достаточно высокой температуре (порядка 30 °С). На практике нагреть шприц можно, поместив его в упаковке на 10 мин в сухожаровой шкаф приблизительно при 50 °С или на 30 мин в термостат с температурой 37 °С. После того как произойдет ретракция ступка (тромба) в полученном образце и останется чистая сыворотка, ее забирают пастеровской пипеткой и переносят в нагретую на водяной бане пробирку. Полученную сыворотку как можно быстрее центрифугируют, чтобы избавиться от малейшей примеси взвешенных эритроцитов.

АНТИКОАГУЛЯНТЫ

Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) и цитрат натрия связывают кальций, необходимый для свертывания. Кальций или выпадет в осадок в виде нерастворимого оксалата (такие кристаллы можно наблюдать в цитратной крови), или связывается, переходя в неионизированную форму. Гепарин связывает антитромбин, ингибируя взаимодействие ряда факторов свертывания.

ЭДТА используют при количественном анализе элементов крови; цитрат натрия применяют при заготовке проб для оценки свертывающей системы, а также при измерении скорости оседания эритроцитов (СОЭ). При длительном хранении эритроцитов для проведения анализов или для переливания используют цитрат в комбинации с декстрозой в форме лимоннокислой декстрозы, цит-

* Комнатной обычно считают температуру 18–25 °С.

ратфосфата декстрозы или раствора Олсвера (см. Приложение). Также антикоагулянты используют в смеси друг с другом, что позволяет компенсировать недостатки каждого из них и в то же время удовлетворить требованиям для проведения анализа [19, 20]. Такие смеси могут включать лимоннокислую декстрозу, цитратфосфат-декстрозы или гепарин в сочетании с ЭДТА или ЭДТА, цитрат или гепарин в сочетании с фторидом натрия. Для подготовки крови к проточной цитометрии можно использовать любой антикоагулянт [19, 21].

Этилендиаминтетрауксусная кислота

Натриевая и калиевая соли ЭДТА — эффективные антикоагулянты, хорошо подходящие для рутинного анализа крови. Действие ЭДТА основано на способности связывать катионы кальция в крови. Для достижения такого эффекта требуется концентрация 1,2 мг сухой соли на 1 мл крови (около 4 ммоль). Двухкалиевая соль ЭДТА хорошо растворима (1650 г/л) и по этому показателю является более предпочтительной, чем натриевая соль, растворимая значительно хуже (108 г/л) [22]. Тонкий слой ЭДТА в качестве покрытия внутренней поверхности пипетки для забора крови способствует увеличению скорости ее заполнения кровью.

Двулитиевая соль ЭДТА также эффективна в качестве антикоагулянта [23], при ее применении возможно использовать тот же образец крови для биохимического анализа. Однако литиевая соль менее растворима (160 г/л), чем калиевая.

Готовая трикалиевая соль ЭДТА в жидкой форме была рекомендована в США Клиническим институтом лабораторных стандартов (прежде Национальный комитет по клиническим лабораторным стандартам, или NCCLS) [3]. При добавлении в этот раствор кровь слегка разбавляется. К тому же трикалиевая соль приводит к сморщиванию эритроцитов, что проявляется в снижении гематокрита на 2–3% после 4-часовой выдержки и сопровождается постепенным увеличением среднего объема эритроцитов. Двухкалиевая соль, напротив, незначительно изменяет результат анализа [1, 4]. В связи с этим Международный совет по стандартизации в гематологии рекомендует использовать двухкалиевую соль в концентрации $1,50 \pm 0,25$ мг/мл крови [24]. Тринатриевую соль ЭДТА не используют из-за его высокого рН.

Избыток ЭДТА, независимо от вида соли, негативно воздействует как на эритроциты, так и на лейкоциты, вызывая их сморщивание и дегенеративные изменения. Концентрация ЭДТА, превышающая 2 мг/мл крови, может привести к существенному уменьшению гематокри-

та и увеличению средней концентрации гемоглобина в эритроците [4]. Избыток ЭДТА приводит к набуханию и расщеплению тромбоцитов, что выражается в завышенном их количестве, поскольку образующиеся фрагменты имеют достаточно крупные размеры и могут быть подсчитаны как нормальные кровяные пластинки. В связи с этим следует обратить внимание на точность при добавлении необходимого объема крови, а также тщательное перемешивание антикоагулянта с добавленной кровью. Мазок крови, консервированной ЭДТА, не выявит базофильной зернистости эритроцитов при отравлении свинцом. Установлено также, что ЭДТА может способствовать агглютинации лейкоцитов, причем как нейтрофилов, так и лимфоцитов [25]. Известно, что ЭДТА отвечает за активность естественных противотромбоцитарных аутоантител, иногда приводящих к адгезии тромбоцитов на нейтрофилах в мазке крови (см. гл. 5). Наблюдали также снижение активности моноцитов, оцениваемой по высвобождению тканевого фактора и фактора некроза опухолей, при использовании ЭДТА по сравнению с цитратом и гепарином. В присутствии ЭДТА снижалась активность нейтрофилов, оцениваемая по липополисахарид-индуцированному высвобождению лактоферрина. Кроме того, ЭДТА подавляет дегрануляцию тромбоцитов [26].

Тринатриевый цитрат

Для оценки функции свертывания крови (выполнения коагулограммы) смешивают 9 частей крови с одной частью 109 ммоль/л раствора цитрата натрия (32 г/л $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ *) [27]. Такое соотношение крови и антикоагулянта является предельным, поскольку изменение осмотического давления и концентрации свободного катиона кальция влияют на результаты коагулограммы.

Для оценки СОЭ к четырем частям крови добавляют одну часть раствора цитрата натрия (109 ммоль/л) и сразу же тщательно перемешивают. Оценку производят в пробирке Вестергрена (*Westergren*) [28].

Гепарин

Натриевую или литиевую соль гепарина в концентрации 10–20 МЕ на 1 мл крови часто используют в качестве антикоагулянта при анализе химического состава, концентрации газов в крови, а также для экстренных анализов. Гепарин не влияет на размер эритроцитов, и именно его рекомендуют использовать в случае, когда нужно свести к минимуму риск лизиса после забора крови. Таким образом, гепарин предпочтительно использовать при исследо-

* Или 38 г/л $2\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

вании осмотической резистентности крови. Кроме того, он также подходит для проведения иммунофенотипического анализа. Однако гепарин не применяют при количественном определении форменных элементов крови, так как он часто вызывает склеивание тромбоцитов и лейкоцитов [4, 29, 30]. Не следует использовать гепарин при приготовлении мазков крови, потому что он дает тусклый голубоватый фон при окраске по Романовскому, особенно в присутствии патологических белков. Гепарин подавляет активность ферментов [19] и не может быть использован при проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР), поскольку в ней участвуют ферменты [31].

ВЛИЯНИЕ ХРАНЕНИЯ НА РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗОВ КРОВИ

В крови, консервированной антикоагулянтами, в условиях комнатной температуры происходят изменения, проявляющиеся в большей степени при повышении температуры окружающей среды. Эти изменения наблюдают независимо от вида используемого антикоагулянта. Они менее выражены при добавлении лимоннокислой декстрозы, цитратфосфат-декстрозы или раствора Олсвера, чем в присутствии ЭДТА, и более выражены в присутствии трикальевой соли ЭДТА, чем двукальевой. Количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов и эритроцитарные индексы обычно не изменяются в течение 8 ч от момента забора крови. По мере набухания эритроцитов растет гематокрит, клеточный объем эритроцитов, снижается осмотическая резистентность, уменьшается СОЭ. Если кровь хранится при 4 °С, изменения в ее составе в течение суток обычно незначительны. Таким образом, кровь, оставленная на ночь в холодильнике, при условии, что приняты меры, препятствующие ее замораживанию, наутро вполне пригодна для проведения исследований. Тем не менее предпочтительнее анализировать количество лейкоцитов и особенно тромбоцитов в ближайшие 2 ч от момента забора крови, поскольку происходит снижение числа лейкоцитов и абсолютного числа лимфоцитов, наиболее выраженное в ближайшие несколько часов, особенно при избытке ЭДТА (>4,5 мг/мл) [21]. Хранение образца крови дольше 24 ч при 4 °С приводит к ошибочным данным при автоматизированном дифференциальном подсчете лейкоцитов. Степень погрешности зависит от технических характеристик анализатора и рекомендаций изготовителя, обязательных для соблюдения при его использовании. Результаты одного исследования с использованием щелевого импедансного анализатора показали,

что лейкоциты и нейтрофилы остаются стабильными в течение 2–3 дней хранения крови при комнатной температуре, однако другие лейкоцитарные клетки оставались стабильными лишь в течение нескольких часов [32].

Количество ретикулоцитов не изменяется при хранении крови в течение суток при 4 °С независимо от использованного консерванта (цитрата декстрозы или ЭДТА), но при комнатной температуре их количество начинает уменьшаться в течение 6 ч. Ретикулоциты исчезают в препарате крови в течение 1–2 дней хранения при комнатной температуре.

Концентрация гемоглобина остается неизменной в течение многих дней в неинфицированной крови (на инфицирование крови могут указывать мутность или обесцвечивание образца). Однако в течение 2–3 дней, особенно при высокой температуре окружающей среды, начинается лизис, приводящий к снижению количества эритроцитов, гематокрита с увеличением расчетных показателей содержания и концентрации гемоглобина в эритроцитах.

Соответствие стандарту при выполнении анализа системы свертывания крови имеет решающее значение в диагностике и лечении коагулопатий. В связи с этим Национальный комитет по клиническим лабораторным стандартам (NCCLS) рекомендует выполнять исследование в течение 2 ч при хранении крови или сыворотки при 22–24 °С, в течение 4 ч — при 4 °С, 2 нед — при –20 °С, и 6 мес — при –70 °С [2].

Для исследований сыворотки или плазмы кровь необходимо центрифугировать в течение 5 ч от момента забора. Для исследования концентрации витамина В₁₂ и фолиевой кислоты сыворотку или плазму хранят при 4 °С. Хранение более 2–3 нед возможно при температуре –20 °С. При длительном хранении образцы следует разделить на несколько порций, чтобы избежать многократного размораживания–замораживания.

Нарушение правил транспортировки образцов крови в лабораторию (например, слишком сильная тряска) может стать причиной гемолиза, частичной коагуляции и разрушения клеток. При транспортировке образцов необходима специальная упаковка.

ВЛИЯНИЕ ХРАНЕНИЯ НА МОРФОЛОГИЮ КЛЕТОК КРОВИ

Морфологические изменения в клетках крови возникают даже при непродолжительном хранении. Они происходят не только вследствие присутствия антикоагулянта,

поскольку их наблюдают и в дефибринированной крови. Независимо от вида антикоагулянта мазок крови, приготовленный из образца, в течение часа хранившегося при комнатной температуре, практически не отличается от мазка, приготовленного сразу же после забора крови. При хранении в течение 3 ч морфологические изменения в препарате становятся заметными, а через 12–18 ч хранения образца мазок значительно отличается от приготовленного сразу после забора крови. Изменения касаются части нейтрофилов. Их ядра приобретают более равномерную окраску, может происходить отделение ядерных сегментов. Цитоплазматическая граница становится неровной или хуже различимой, в цитоплазме возникают небольшие вакуоли (рис. 1-2, А, Б, см. цв. вклейку). Выраженные изменения наблюдают в большинстве крупных моноцитов: в цитоплазме возникают небольшие вакуоли, ядра принимают дольчатый вид, иногда даже распадаются на части (рис. 1-2, В, см. цв. вклейку). Аналогичным изменениям подвержены и лимфоциты. В их цитоплазме появляется несколько вакуолей; ядра окрашиваются более равномерно, чем обычно; некоторые из них расщепляются, образуя ядра, состоящие из 2–3 долек (рис. 1-2, Г–Е, см. цв. вклейку). Изменения эритроцитов при хранении в течение 6 ч при комнатной температуре незначительны. При более продолжительном хранении их края приобретают зазубренные очертания, а сами клетки заметно округляются (рис. 1-2, Б, Д и Е, см. цв. вклейку). При избытке ЭДТА края эритроцитов приобретают зазубренные очертания в течение нескольких часов. Появление морфологических изменений обуславливает необходимость приготовления мазка крови как можно быстрее после получения образца. Допустима задержка не более 3 ч.

Изменения клеток крови вследствие хранения следует отличать от апоптоза (контролируемого процесса запрограммированной смерти клетки), происходящего при подавлении активности или отсутствии цитокинов и факторов роста, регулирующих жизненный цикл клетки. Особое значение здесь имеет митохондриальная дисфункция [33, 34]. Морфологически апоптоз (рис. 1-3, см. цв. вклейку) характеризуется сморщиванием клетки с уплотнением цитоплазмы вокруг ядерной мембраны, образованием углублений в ядре и последующей его фрагментацией; процесс заканчивается формированием плотных базофильных участков (апоптотических телец). Апоптоз нейтрофилов с образованием единственного апоптотического тельца может быть ошибочно принят за ядерные (незрелые) эритроциты, если не учесть особенностей цитоплазмы. Обычно остатки подвергшихся

апоптозу клеток фагоцитируются и лишь случайно могут оказаться в мазке крови, окруженные жизнеспособными клетками [35]. Чаще апоптотические клетки выявляют при лейкозе.

ОДНОРОДНОСТЬ ОБРАЗЦА

Чтобы обеспечить равномерное распределение кровяных клеток, необходимо тщательно перемешать образец непосредственно перед отбором пробы на анализ. Следует поместить пробирку с образцом в механическую мешалку как минимум на 2 мин или вручную перевернуть ее 8–10 раз. Если образец хранился при температуре 4 °С, то он будет вязким, поэтому перед перемешиванием нужно согреть кровь до комнатной температуры.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tatsumi N., Miwa S., Lewis S.M. International Council for Standardization in Haematology / International Society of Hematology. Specimen collection, storage, and transportation to the laboratory for hematological tests // *International Journal of Hematology*. — 2002. — Vol. 75. — P. 261–268.
2. NCCLS. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. Approved standard, 5th edition. H3–A5. NCCLS, Wayne P.A. — 2003.
3. NCCLS. Tubes and additives for venous blood specimen collection. Approved standard, 5th edition. NCCLS, Wayne P.A. — 2003.
4. Van Assendelft O.W., Simmons A. Specimen collection, handling, storage and variability. In: Lewis S.M., Koepeke J.A. (eds) *Hematology Laboratory Management and Practice*, Butterworth Heinemann, Oxford. — 1995. — P. 109–127.
5. Tatsumi N., van Assendelft O.W., Naka K. ICSH recommendation for blood specimen collection for hematological analysis // *Laboratory Hematology*. — 2002. — Vol. 8. — P. 1–6.
6. Katz L. Evacuated blood—collection tubes — the backflow hazard // *Canadian Medical Association Journal*. — 1975. — Vol. 113. — P. 208–213.
7. Katsuda I. Safety of evacuated—blood collection tubes // *Japanese Journal of Clinical Pathology* 23 (suppl 2). — 2003. — P. 168.
8. Sutton C.D., White S.A., Edwards R. A prospective controlled trial of the efficacy of isopropyl alcohol wipes before venesection in surgical patients // *Annals of the Royal College of Surgeons*. — 1999. — Vol. 81. — P. 183–186.
9. Golder M., Chen C.L.H., O’Shea S. et al Potential risk of cross—infection during peripheral—venous access by contaminated tourniquets // *Lancet*. — 2000. — Vol. 355. — P. 44.

10. Meitis S. Skin puncture and blood collection techniques for infants: updates and problems // *Clinical Chemistry*. – 1988. – Vol. 34. – P. 1890–1894.
11. Hicks J.R., Rowland G.L., Buffone G.J. Evaluation of a new blood collection device («Microtainer») that is suitable for pediatric use // *Clinical Chemistry*. – 1976. – Vol. 22. – P. 2034–2036.
12. Freudlich M.H., Gerarde H.W. A new, automatic disposable system for blood count and hemoglobin // *Blood*. – 1963. – Vol. 21. – P. 648–655.
13. Tatsumi N., Pierre R. Automated image processing; past, present, and future of blood cell morphology identification // *Clinics in Laboratory Medicine*. – 2002. – Vol. 22. – P. 299–316.
14. Conway A.M., Hinchliffe R.F., Earland J. et al. Measurement of hemoglobin using single drops of skin puncture blood: is precision acceptable? // *Journal of Clinical Pathology*. – 1998. – Vol. 51. – P. 248–250.
15. Yang Z-W, Yang S-H, Chen L. et al. Comparison of blood counts in venous, finger tip and arterial blood and their measurement variation. *Clinical and Laboratory Haematology*. 2001. – Vol. 23. – P. 155–159.
16. Kayiran S.M., Uzbek N., Turan M. et al. Significant differences between capillary and venous complete blood counts in the neonatal period // *Clinical and Laboratory Haematology*. – 2003. – Vol. 25. – P. 9–16.
17. Daae L.N.W., Hallerad M., Halvorsen S. A comparison between haematological parameters in «capillary» and venous blood samples from hospitalized children aged 3 months to 14 years // *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. – 1988. – Vol. 51. – P. 651–654.
18. Daae L.N.W., Halvorsen S., Mathison P.M. et al. A comparison between haematological parameters in «capillary» and venous blood from healthy adults // *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. – 1988. – Vol. 48. – P. 723–726.
19. Narayanan S. The pre-analytic phase: an important component of laboratory medicine // *American Journal of Clinical Pathology*. – 2000. – Vol. 113. – P. 429–457.
20. Tatsumi N. Universal anticoagulants // *Japanese Society of Thrombosis and Haemostasis*. – 2003. – Vol. 13. – P. 158–168.
21. NCCLS. Clinical application of flow cytometry: quality assurance and immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes. Document H43–A, NCCLS, Wayne P.A. – 1997.
22. Hadley G.G., Weiss S.P. Further notes on use of salts of ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA) as anticoagulants // *American Journal of Clinical Pathology*. – 1955. – Vol. 25. – P. 1090–1093.
23. Sacker L.S., Sanders K.E., Page B. et al. Dilithium sequestrane as an anticoagulant // *Journal of Clinical Pathology*. – 1959. – Vol. 12. – P. 254–257.
24. International Council for Standardization in Haematology. Recommendations for ethylenediaminetetraacetic acid anticoagulation of blood for blood cell counting and sizing // *American Journal of Clinical Pathology*. – 1993. – Vol. 100. – P. 371–372.
25. Deal I., Hernandez A.M., Pierre R.V. Ethylenediamine tetraacetic acid-associated leukoagglutination // *American Journal of Clinical Pathology*. – 1995. – Vol. 103. – P. 338–340.
26. Engstad C.S., Gutteberg T.J., Osterud B. Modulation of cell activation by four commonly used anticoagulants // *Thrombosis and Haemostasis*. – 1997. – Vol. 77. – P. 690–696.
27. Ingram G.I.C., Hills M. The prothrombin time test; effect of varying citrate concentration // *Thrombosis and Haemostasis*. – 1976. – Vol. 36. – P. 230–236.
28. International Committee for Standardization in Haematology. Recommendation for measurement of erythrocyte sedimentation rate of human blood // *American Journal of Clinical Pathology*. – 1977. – Vol. 66. – P. 505–507.
29. Salzman E.W., Rosenberg R.D. Effect of heparin and heparin fractions on platelet aggregation // *Journal of Clinical Investigation*. – 1980. – Vol. 65. – P. 64–73.
30. Hirsh J., Levine N.M. Low molecular weight heparin // *Blood*. – 1992. – Vol. 79. – P. 1–9.
31. Yokota M., Tatsumi N., Nathalang O. et al. Effects of heparin on polymerase chain reaction for blood white cells // *Journal of Clinical and Laboratory Analysis*. – 1999. – Vol. 13. – P. 133–140.
32. Gulati G.L., Hyland L.J., Kocher W. et al. Changes in automated complete blood cell count and differential leukocyte count results induced by storage of blood at room temperature // *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. – 2002. – Vol. 126. – P. 336–342.
33. Kerr J.F., Wylie A.H., Curie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics // *British Journal of Cancer*. – 1972. – Vol. 26. – P. 239–257.
34. Wylie A.H., Kerr J.F.R., Currie A.R. Cell death: the significance of apoptosis // *International Review of Cytology*. – 1980. – Vol. 68. – P. 251–306.
35. Lach-Szyrma V., Brito-Babapulle F. The clinical significance of apoptotic cells in peripheral blood smears // *Clinical and Laboratory Haematology*. – 1999. – Vol. 21. – P. 277–280.