

## **Факторы, влияющие на правильность определения гемоглобина**

*Е.Г. Степанова, Т.Я. Леонова, М.В. Паламарчук, В.И. Пупкова\*, В.В. Жданова\*,  
Кафедра лабораторной диагностики Новосибирской государственной медицинской  
академии*

*\* Закрытое акционерное общество "Вектор-Бест"*

Концентрация гемоглобина (Hb) в крови - один из важнейших показателей здоровья человека. Снижение его уровня в крови - это анемии, частота которых среди населения весьма высока, поэтому правильное определение Hb является одной из главных задач клинико-диагностических лабораторий (КДЛ).

Международным Комитетом по стандартизации в гематологии в качестве надежного стандартного метода определения Hb рекомендован гемиглобинцианидный метод [1]. Правильные результаты анализа при его применении обеспечиваются способностью всех производных Hb быстро и количественно превращаться в гемиглобинцианид; строгим подчинением оптической плотности его растворов в широком диапазоне концентраций закону Бугера-Ламберта-Бера; наличием в спектре поглощения гемиглобинцианида плоского максимума при  $\lambda = 540$  нм, что позволяет использовать фотометры различных классов без заметного снижения точности анализа [2]. Однако применение данного метода на практике, к сожалению, не приводит к ожидаемым результатам: по данным Федеральной системы внешней оценки качества за 1998 г. только 63% результатов определения гемоглобина в КДЛ были правильными.

До недавнего времени Hb определяли только гемиглобинцианидным методом с помощью соответствующих наборов реагентов. В 1998 г. МЗ РФ зарегистрировал и рекомендовал к применению набор реагентов, основанный на альтернативном, гемихромном методе анализа Hb [3-5]. Этот метод по аналитическим характеристикам не отличается от гемиглобинцианидного, а по скорости протекания реакции (5 мин против 20) и по устойчивости трансформирующего реагента (6 мес. против 3) превосходит его. Большим достоинством нового метода является отсутствие в его составе вредных для здоровья цианистых соединений и других токсичных веществ [6]. Многие КДЛ уже используют данный метод в своей практике.

С целью выработки рекомендаций по повышению качества определения Hb в КДЛ нами была разработана программа, включающая в себя сравнение двух методов определения гемоглобина; оценку качества наборов реагентов, калибровочных образцов и контрольных растворов Hb различных производителей, используемых в КДЛ Новосибирской области. Настоящее сообщение посвящено кратким итогам выполнения данной программы с участием 28 КДЛ различных медицинских учреждений.

**Материалы и методы.** Для определения Hb гемиглобинцианидным методом использовали соответствующие наборы реагентов, калибровочные образцы гемиглобинцианида, контрольные растворы гемоглобина производства НПО "Ренам", г. Москва; ООО "Агат-Мед", г. Москва (далее "Агат"); Екатеринбургского предприятия по производству бактериальных препаратов (далее "Бак. препараты"); "VITAL DIAGNOSTICUM", г. С.-Петербург (далее "Vital"). Для гемихромного метода - наборы реагентов для определения Hb, калибровочные образцы гемихрома и контрольные растворы гемоглобина производства ЗАО "Вектор-Бест", г. Новосибирск. Все перечисленные наборы приобретены у производителей через торговую сеть.

Определение гемоглобина в крови и контрольных растворах Hb проводили согласно инструкциям к наборам. Правильными считали результаты, не отличающиеся от декларируемых величин более чем на +4%.

### **Результаты и обсуждение.**

*Комплектность поставок. Все коммерческие наборы реагентов для определения гемоглобина содержат трансформирующие растворы. В состав наборов производства НПО "Ренам" и "Бак.препаратов" дополнительно включены калибровочные образцы раствора гемиглобинцианида, ЗАО "Вектор-Бест" - гемихрома, "Агата" - гемолизата Hb, которые поставляются в одной концентрации. Наборы "Vital" выпускаются без калибратора с указанием фактора для расчета гемоглобина.*

Некоторые фирмы выпускают отдельно наборы калибровочных образцов и контрольных растворов Hb. Так, НПО "Ренам" и ЗАО "Вектор-Бест" производят наборы калибровочных образцов четырех концентраций Hb (от ~ 50 до 200 г/л), "Бак. препараты" - калибровочный образец гемиглобинцианида одной концентрации, который рекомендуется разводить для построения калибровочного графика. НПО "Ренам", ЗАО "Вектор-Бест" и "Агат" выпускают контрольные растворы Hb трех концентраций, которые аттестованы у "Агата" с точностью +7%, у НПО "Ренам" и ЗАО "Вектор-Бест" - с точностью +2% (причем у ЗАО "Вектор-Бест" аттестация проведена двумя методами).

Таблица 1  
Анализ контрольных растворов гемоглобина двумя методами

Контрольный раствор	Гемиглобинцианидный метод			Гемихромный метод			Оба метода		
	Всего анализов	Правильных анализов		Всего анализов	Правильных анализов		Всего анализов	Правильных анализов	
		n	%		n	%		n	%
Гемоконт-Ново (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск)	97	67	69,1	100	81	81,0	197	148	75,1
Диагем-К (НПО «Ренам», г. Москва)	75	50	66,7	15	11	73,3	90	61	67,8
Биоконт-ГД (МП «Агат», г. Москва)	87	50	57,5	57	28	49,1	144	78	54,2
Всего анализов	259	167	64,5	172	120	69,8	431	287	66,6

Таким образом, в настоящее время доступны все реагенты, калибраторы и контрольные образцы, необходимые для проведения качественной калибровки приборов и контроля правильности определения гемоглобина.

Оценка качества контрольных растворов Hb различных производителей. Её проводили в КДЛ, используя имеющиеся на местах фотометры и наборы реагентов для определения Hb различных фирм. Данные, представленные в таблице 1, показывают, что наибольший процент правильных результатов получен при анализе контрольных растворов Hb "Гемоконт-Ново" (ЗАО "Вектор-Бест"); сравнимый, но несколько меньший процент - при анализе "Диагем-К" (НПО "Ренам"). Низкий процент правильных анализов получен при анализе контрольного раствора "Биоконт-ГД" ("Агат"), вероятно, из-за неоднородности растворов, которую отметили около 70% участников программы.

Результаты определения Hb во всех контрольных растворах гемиглобинцианидным и гемихромным методами, в целом, не отличаются значительно.

Сравнение качества калибровочных образцов и наборов для определения Hb. Оценка качества наборов реагентов различных фирм проводили путем определения Hb в контрольных растворах "Гемоконт-Ново" (ЗАО "Вектор-Бест") на фотометре Spocol-11. Для расчета концентрации Hb использовали имеющиеся в наборах калибраторы или применяли методику из инструкции по применению набора реагентов.

Таблица 2

Сравнение различных наборов реагентов

Параметры	Наборы реагентов производителей				
	НПО «Ренам»	«Бак. препараты»	«Агат»	«Vital»	ЗАО «Вектор-Бест»
Число определений	19	40	18	24	106
Число правильных определений, %	90	78	50	21	78

Лучшие результаты получены при применении наборов НПО "Ренам", "Бак. препараты", ЗАО "Вектор-Бест" (табл. 2). Низкий процент правильных результатов, полученных при работе с наборами фирм "Агат" и "Vital", можно объяснить отсутствием калибровочных образцов в составе их наборов.

Определение Hb наборами реагентов НПО "Ренам", "Агат", "Бак. препараты", "Vital" с использованием для расчета гемоглобина единого калибратора или теоретического фактора, равного 367,7, показало, что все трансформирующие реагенты количественно переводят Hb в гемиглобинцианид с отклонением результатов от декларируемых величин менее +2%. Это свидетельствует о том, что правильность определения Hb с использованием различных наборов реагентов зависит главным образом от качества калибровочных растворов.

Таблица 3  
Определение гемоглобина на различных приборах

Наименование прибора	Количество приборов	Количество определений					
		Гемиглобинцианидный метод		Гемихромный метод		Двумя методами	
		всего	правильных, %	всего	правильных, %	всего	правильных, %
Spocol	3	102	71	42	74	144	72
СФ-46	2	45	67	12	83	57	70
КФК-3	15	80	53	73	59	153	56
КФК-2	9	21	57	39	67	60	63
Всего	29	248	62	166	71	414	64

Тип используемого фотометра и правильность определения Hb. Каждый участник программы проводил определение Hb в контрольных растворах двумя методами на имеющихся в лаборатории фотометрах. Полученные результаты, как видно из данных, представленных в таблице 3, зависели от класса точности приборов. Различия результатов, полученных на приборах одного наименования, можно объяснить нелинейностью и нестабильностью работы некоторых фотометров, вследствие непроведенной плановой поверки, а кроме того ошибками, допущенными при построении калибровочных графиков, и другими причинами.

Отдельным экспериментом показано, что при исключении этих ошибок приборные различия не превышали +4%.

Следует отметить, что по-прежнему КДЛ Новосибирской области для биохимических анализов чаще всего применяют приборы КФК-2 и КФК-3. Их использование при точном соблюдении всех рекомендаций по проведению анализа обеспечивает получение правильных результатов. Ряд лабораторий Новосибирской области в настоящее время имеет автоматические гематологические анализаторы. Поэтому в программу было включено определение гемоглобина в контрольных растворах на различных типах анализаторов (Микрос АВХ, Medonik-470, Coulter).

Полученные на автоматических приборах результаты определения Hb не отличались от результатов ручного анализа Hb, выполняемых в соответствии с рекомендациями. Следует отметить, что на всех анализаторах, кроме Medonik-470, выявлено некоторое занижение результатов определения Hb.

Таблица 4  
Определение гемоглобина в крови пациентов двумя методами

1. Число исполнителей (КДЛ)	12
2. Количество исследований каждым методом	209
3. Среднее значение гемоглобина, г/л	
— гемихромным методом	125,2
— гемиглобинцианидным методом	126,8
4. Различия между методами, %	1,2

*Дозаторы.* Проведенные исследования показали, что правильность определения Hb существенно зависит от точности дозирования крови, а около 50% ошибок анализа обусловлены применением неуповеренных пипеток. Сравнение механических дозаторов и пипеток Сали было в пользу последних. Невысокий процент правильных результатов, полученных с применением механических дозаторов, обусловлен рядом причин: неточный объем дозатора, неудачно выбранный наконечник (широкое отверстие), неправильный способ дозирования крови [7].

*Сравнение двух методов определения Hb в образцах крови.* В нем участвовало 12 КДЛ, выполнивших каждым методом по 209 анализов Hb в пробах крови больных. Как видно из полученных в КДЛ результатов, представленных в таблице 4, между двумя методами определения Hb нет статистически достоверных различий (вероятность  $p > 0,95$ , по t-критерию Стьюдента), а разница между средними величинами Hb составляет всего 1,2%.

*Источники ошибок, допускаемых в КДЛ при проведении анализа Hb.* Исследования, проведенные по программе, позволили выявить следующие источники ошибок:

- использование некалиброванных пипеток и несовершенная техника дозирования проб;
- применение неуповеренного оборудования, не обеспечивающего линейную зависимость оптической плотности от концентрации гемоглобина в требуемой области измерений;
- отсутствие внутрилабораторного контроля качества;
- недостаточная чистота кювет, особенно проточных;
- ошибки при построении калибровочных графиков и расчете факторов;
- использование контрольных растворов гемоглобина низкого качества;
- ошибки оператора.

## **Выводы**

Данные, полученные в ходе выполнения программы, еще раз подтверждают, что гемиглобинцианидный и гемихромный методы определения Hb дают сопоставимые результаты анализа, с некоторым преимуществом гемихромного метода. Результаты определения Hb, полученные на автоматических гематологических анализаторах и ручным методом, не отличаются. Все фотометрическое оборудование, используемое в КДЛ, обеспечивает получение правильных результатов определения Hb при соблюдении рекомендаций по проведению анализа.

Для получения правильных результатов определения гемоглобина в лабораториях необходимо использовать :

- калибровочные образцы Hb высокого качества;
- уповеренное фотометрическое оборудование, обеспечивающее стабильность измерений и линейную зависимость оптической плотности от концентрации Hb в растворе в требуемой области измерений;
- чистые, тщательно вымытые кюветы;
- метрологически аттестованные дозаторы;
- проводить внутрилабораторный контроль качества анализа с использованием контрольных растворов Hb высокого качества.

## **Литература**

1. Drabkin D.I., Austin I.H. // J. Biol. Chem. 1935-1936. V. 112. P. 51.
2. Tentori L., Salvaty F.A. // Methods in Enzymology. 1981. V. 76. P. 707-715
3. Ахрем А.А., Андреюк Г.М., Киселев М.А. и др. // Патент РФ № 1386901, опубли. 15.01.90. Бюл. изобр. № 2.
4. Ахрем А.А., Андреюк Г.М., Киселева С.И.// Лаб. дело. 1989. №5. С. 13-15.
5. Пупкова В.И., Банина Л.И., Войтова В.В. // Патент РФ № 2159442, опубли. 20.11.2000. Бюл. изобр. № 32.
6. Вредные вещества в промышленности/ под ред.
7. Н.В. Лазарева и Э.Н. Левиной, 7 издание, Л.: Химия, 1976. Т. 1, 2
8. Рекомендация "Дозирование цельной крови человека"// Лаборатория. 1997. № 5. С. 21-22.