

Метрологическая оценка методик контроля показателей безопасности концентратов тромбоцитов лейкоредуцированных

Н.С. Никулина, Е.Н. Калинина, Е.В. Ноздрина, Н.В. Исаева,
Т.В. Кривокорытова, Е.С. Кормщикова

*Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА России
610027, г. Киров, ул. Красноармейская, 72*

Резюме

Цель исследования – оценить возможность использования методик контроля показателей безопасности концентратов тромбоцитов лейкоредуцированных. **Материал и методы.** Осуществлен анализ 14 образцов концентратов тромбоцитов лейкоредуцированных. Содержание тромбоцитов подсчитывали в 2-сеточной камере Горяева с помощью светового микроскопа «Микмед-1» и методом кондуктометрии с гидродинамическим фокусированием на гематологическом анализаторе «ХТ-4000i». Остаточное количество лейкоцитов определяли лазерной проточной цитофлуориметрией на анализаторе «FACS Canto II». Измерение рН проводили потенциометрически с помощью рН-метра-милливольтметра «рН-150М». Возможность применения методик контроля показателей безопасности оценивали на основании коэффициентов вариации (CV). **Результаты и их обсуждение.** Максимальное значение CV при подсчете содержания тромбоцитов в камере Горяева составило 18,6 %, методом кондуктометрии – 2,8 %. CV при определении остаточного количества лейкоцитов лазерной проточной цитофлуориметрией не превышал 17,5 %. CV потенциометрического способа определения рН составил 0,4 %. **Заключение.** Для контроля содержания тромбоцитов рекомендованы унифицированный подсчет в 2-сеточной камере Горяева и кондуктометрия с гидродинамическим фокусированием на гематологическом анализаторе. Остаточное содержание лейкоцитов следует определять лазерной проточной цитофлуориметрией. Максимальные значения CV приняты за приписанные характеристики сходимости: для унифицированного метода – 18,6 %, для метода кондуктометрии – 2,8 %, для лазерной проточной цитофлуориметрии – 17,5 %, для потенциометрии – 0,4 %.

Ключевые слова: концентрат тромбоцитов, контроль показателей безопасности, методики анализа, приписанная характеристика сходимости.

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

Автор для переписки: Никулина Н.С., e-mail: nikulina@niigpk.ru

Для цитирования: Никулина Н.С., Калинина Е.Н., Ноздрина Е.В., Исаева Н.В., Кривокорытова Т.В., Кормщикова Е.С. Метрологическая оценка методик контроля показателей безопасности концентратов тромбоцитов лейкоредуцированных. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2020; 40 (3): 28–33. doi: 10.15372/SSMJ20200304

Metrological evaluation of methods for control the safety indicators of leukoreduced platelet concentrates

N.S. Nikulina, E.N. Kalinina, E.V. Nozdrina, N.V. Isaeva,
T.V. Krivokorytova, E.S. Kormshchikova

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

Abstract

Objective. The aim of research was to evaluate experimentally the feasibility of using of control methods of safety indicators of leukoreduced platelet concentrates (CPI). **Material and methods.** The analysis of 14 leukoreduced platelet concentrates samples was performed. Platelet count was estimated in a 2-grid Goryaev's camera using a «Mikmed-1» light microscope and conductometry with hydrodynamic focusing on an «ХТ-4000i» hematology analyzer. To determine

the residual number of leukocytes, we used the laser flow cytofluorimetry method by «FACS Canto II» analyzer. The pH was measured by the potentiometric method by a pH-millivoltmeter «pH-150M». The feasibility of applying safety performance monitoring techniques was assessed based on the basis of coefficient of variation (*CV*). **Results and discussion.** The maximum *CV* value when calculating the platelet count in the Goryaev's camera was 18,6 %; conductometry method – 2,8 %. *CV* when determining the residual number of leukocytes by laser flow cytofluorimetry did not exceed 17,5 %. The *CV* of the method for determining pH by potentiometric method was 0,4 %. **Conclusion.** To control the platelet count, a unified method of counting in a 2-grid Goryaev's camera and conductometry method with hydrodynamic focusing on hematology analyzer are recommended. Laser flow cytofluorimetry should be used to determine the residual number of leukocytes. The maximum *CV* values were taken as the assigned convergence characteristics: for the unified counting method – not more than 18,6 %, for the conductometry method – not more than 2,8 %, for laser flow cytofluorimetry – not more than 17,5 %, for potentiometry – not more than 0,4 %.

Key words: platelet concentrate, monitoring of safety indicators, analysis methods, attributed convergence characteristics.

Conflict of interests. The authors declare lack of the possible conflicts of interest.

Correspondence author: Nikulina N.S., e-mail: nikulina@niigpk.ru

Citation: Nikulina N.S., Kalinina E.N., Nozdrina E.V., Isaeva N.V., Krivokorytova T.V., Kormshchikova E.S.. Metrological evaluation of methods for control the safety indicators of leukoreduced platelet concentrates. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2020; 40 (3): 28–33 [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20200304

Введение

Согласно Постановлению Правительства Российской Федерации от 22 июня 2019 г. № 797 утверждены «Правила заготовки, хранения, транспортировки и клинического использования донорской крови и ее компонентов» (далее – Правила) и утратило силу Постановление Правительства Российской Федерации от 26 января 2010 г. № 29 «Об утверждении технического регламента о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии». В приложении № 1 Правил приведены перечень и значения показателей безопасности концентратов тромбоцитов лейкоредуцированных (КТл), периодичность контроля [1]. Методики исследования компонентов крови и нормы аналитической точности не регламентированы. В связи с этим метрологическая характеристика количественных методик оценки показателей безопасности КТл и экспериментальное обоснование возможности их применения являются актуальными и своевременными.

Материал и методы

Объектами настоящего исследования служили 14 образцов КТл. Содержание тромбоцитов определяли в семи образцах КТл унифицированным методом в 2-сеточной камере Горяева с помощью светового микроскопа «Микмед-1» («ЛМО», Россия) и кондуктометрией с гидродинамическим фокусированием на гематоло-

гическом анализаторе ХТ-4000i (Sysmex Corporation, Япония) с использованием стандартного комплекта реагентов. Определение остаточного содержания лейкоцитов проводили в пяти образцах КТл лазерной проточной цитофлуориметрией на анализаторе FACS Canto II (BD Biosciences, США) с набором реагентов BD Leuco Count (BD Biosciences). Измерение pH (при температуре 22 °C) в конце срока годности компонента крови осуществляли потенциометрическим методом в 6 образцах КТл с использованием pH-метра-милливольметра pH-150M (РУП «ГЗИЛ», Республика Беларусь).

Аналитическая серия – совокупность измерений, выполненных одновременно в одних и тех же условиях в одном образце – включала в себя 10 измерений показателя безопасности компонента крови.

При выполнении статистической обработки результатов исследования проводили проверку нормальности распределения с использованием критерия Шапиро – Уилка, вычисление среднего значения M , стандартного отклонения s , коэффициента вариации CV при уровне значимости статистических гипотез 0,05 [2, 3].

Результаты и их обсуждение

Данные определения количества тромбоцитов унифицированным подсчетом и методом кондуктометрии представлены в табл. 1. Характер распределения результатов, полученных в камере Горяева, близок к нормальному, так как $p \geq 0,30$. Средние значения количества тромбоцитов в ис-

Таблица 1. Результаты определения содержания тромбоцитов в образцах КТл
Table 1. The results of determining of platelet content in leukoreduced platelet concentrates samples

№ исследова- вания	Содержание тромбоцитов, $\times 10^9$ клеток в единице в образце						
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№7
<i>Унифицированный метод подсчета в камере Горяева</i>							
1	309,5	277,0	220,8	319,0	200,1	379,9	218,1
2	362,7	304,5	244,8	298,7	207,1	397,3	192,2
3	272,6	259,9	206,4	287,1	203,6	350,9	186,6
4	307,2	377,0	224,0	290,0	201,8	411,8	203,3
5	311,9	362,5	248,0	275,5	210,4	377,0	199,6
6	318,8	400,2	220,8	255,2	205,3	371,2	201,4
7	304,9	451,8	227,2	324,8	175,5	385,7	203,3
8	307,2	356,7	212,8	211,7	242,2	403,1	216,2
9	348,8	262,9	241,6	234,9	193,1	377,0	203,3
10	279,5	350,9	177,6	205,9	201,5	374,1	201,4
<i>p</i>	0,31	0,56	0,39	0,49	0,94	0,77	0,30
<i>M</i>	208,2	340,3	222,4	270,3	204,1	382,8	202,5
<i>s</i>	18,2	63,2	20,8	42,0	16,6	17,6	9,4
<i>CV, %</i>	8,7	18,6	9,4	15,6	8,1	4,6	4,7
<i>Метод кондуктометрии</i>							
1	– (254,3)	335,5	216,0	263,9	200,9	381,9	200,3
2	320,0	334,7	214,6	263,9	206,2	384,0	200,3
3	307,5	335,5	212,6	261,9	205,5	380,8	204,6
4	313,8	330,9	214,9	263,6	202,5	384,8	203,5
5	315,8	338,7	215,8	265,6	200,2	381,4	201,2
6	312,8	337,9	215,7	262,7	202,4	384,0	202,2
7	316,8	332,9	214,6	269,1	202,2	386,0	203,3
8	315,0	335,5	213,6	263,6	205,0	381,4	200,3
9	298,3	335,2	214,9	264,5	199,5	381,1	203,8
10	294,8	333,2	211,0	263,3	200,8	386,0	200,7
<i>p</i>	0,10	0,73	0,15	0,21	0,34	0,10	0,10
<i>M</i>	310,5	335,0	214,4	264,2	202,5	383,1	202,0
<i>s</i>	8,7	2,3	1,6	2,0	2,3	2,1	1,7
<i>CV, %</i>	2,8	0,7	0,7	0,8	1,1	0,5	0,8

Примечание: Здесь и в табл. 2, 3 *p* – уровень значимости для критерия Шапиро – Уилка.

следуемых образцах находились в диапазоне от $(202,5 \pm 9,4) \times 10^9$ до $(382,8 \pm 17,6) \times 10^9$ клеток в единице компонента крови при использовании унифицированного метода. Максимальное значение коэффициента вариации данных составило 18,6 % и принято за приписанную характеристику сходимости [4].

Характер распределения данных содержания тромбоцитов в образце № 1, полученных на гематологическом анализаторе, отличался от нормального ($p = 0,001$), поэтому проводили анализ выпадающих значений. Исключение первого результата $254,3 \times 10^9$ клеток позволило привести характер распределения к нормальному: $p \geq 0,10$, средние значения количества тромбоцитов находились в диапазоне от $(202,0 \pm 1,7) \times 10^9$ до $(383,1 \pm 2,1) \times 10^9$ клеток в единице компонента

крови. Максимальный *CV* данных метода кондуктометрии составил 2,8 %. Указанное значение *CV* приняли за приписанную характеристику методики [4]. Статистически значимых различий в результатах, полученных в камере Горяева и на гематологическом анализаторе ХТ-4000i, не выявлено (значение *p* для критерия Стьюдента не менее 0,24).

Рассмотрена возможность применения унифицированного подсчета и метода проточной цитометрии с помощью гематологического анализатора для оценки остаточного содержания лейкоцитов в КТл, исходя из максимально допустимого значения показателя 1×10^6 клеток в единице компонента крови [1]. Наименьшее количество лейкоцитов, сосчитанных в камере Горяева, определяется как одна клетка в световом поле,

Таблица 2. Результаты определения остаточного содержания лейкоцитов в образцах КТл

Table 2. The results of determining of leukocyte residual number in leukoreduced platelet concentrates samples

№ исследования	Остаточное содержание лейкоцитов, $\times 10^6$ клеток в единице в образце				
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5
1	0,17	0,51	0,07	0,28	0,04
2	0,26	0,53	0,06	0,19	0,04
3	0,30	0,40	0,08	0,21	0,03
4	0,21	0,44	0,07	0,20	0,02
5	0,21	0,34	0,05	0,19	0,03
6	0,29	0,36	0,08	0,23	0,02
7	0,23	0,48	0,05	0,19	0,03
8	0,23	0,41	0,06	0,19	0,03
9	0,20	0,54	0,08	0,15	0,04
10	0,21	0,35	0,05	0,25	0,03
<i>p</i>	0,46	0,35	0,39	0,45	0,63
<i>M</i>	0,23	0,44	0,07	0,21	0,03
<i>s</i>	0,04	0,08	0,01	0,04	0,01
<i>CV</i> , %	16,9	17,4	17,5	17,4	17,4

Таблица 3. Результаты определения pH в образцах КТл

Table 3. The results of determining pH in leukoreduced platelet concentrates samples

№ исследования	Значение pH в образце					
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6
1	7,30	7,37	7,32	7,38	7,12	7,09
2	7,27	7,42	7,26	7,33	7,13	7,12
3	7,30	7,39	7,28	7,34	7,12	7,07
4	7,29	7,38	7,26	7,37	7,13	7,13
5	7,33	7,37	7,28	7,34	7,10	7,09
6	7,32	7,42	7,26	7,30	7,14	7,13
7	7,32	7,40	7,28	7,31	7,11	7,11
8	7,34	7,38	7,30	7,34	7,14	7,09
9	7,34	7,38	7,31	7,34	7,14	7,11
10	7,35	7,40	7,30	7,38	7,12	7,08
<i>p</i>	0,70	0,15	0,23	0,27	0,28	0,41
<i>M</i>	7,32	7,39	7,29	7,34	7,13	7,10
<i>s</i>	0,03	0,02	0,02	0,03	0,01	0,02
<i>CV</i> , %	0,3	0,3	0,3	0,4	0,2	0,3

что соответствует $3,125 \times 10^6$ клеток в единице КТл при среднем объеме трансфузионной дозы 250 мл. Согласно технической документации на гематологический анализатор ХТ-4000i, фоновым диапазоном считается концентрация лейкоцитов от 0 до $0,1000 \times 10^3$ клеток в мкл. При пересчете на единицу компонента крови это составляет от 0 до 25×10^6 клеток. Таким образом, обе методики не обладают достаточной чувствительностью для определения остаточного содержания лейкоцитов в КТл.

Альтернативой данным методам является лазерная проточная цитофлуориметрия с нижним порогом обнаружения лейкоцитов в трансфузионной среде $0,0025 \times 10^6$ клеток в единице ком-

понента крови, что удовлетворяет требованию к чувствительности метода для определения остаточного содержания лейкоцитов. Результаты применения лазерной проточной цитофлуориметрии для определения остаточного содержания лейкоцитов представлены в табл. 2. Характер распределения данных близок к нормальному ($p \geq 0,35$). Средние значения показателя находились в диапазоне от $(0,03 \pm 0,01) \times 10^6$ до $(0,44 \pm 0,08) \times 10^6$ клеток в единице компонента крови. Максимальный *CV* составил 17,5 % и принят за приписанную характеристику сходимости методики [4].

Результаты измерения pH, представленные в табл. 3, имели нормальное распределение ($p \geq 0,15$). Средние значения pH находились в

диапазоне от $7,10 \pm 0,02$ до $7,39 \pm 0,02$. Максимальное значение CV составило 0,4 % и принято за характеристику сходимости методики определения рН в КТл [4].

Заключение

В ходе исследования установлены приписанные характеристики сходимости и экспериментально обоснован выбор методик контроля показателей безопасности КТл. Контроль содержания тромбоцитов можно осуществлять с использованием камеры Горяева или гематологического анализатора «ХТ-4000i». Автоматизированный метод позволяет быстрее получать результаты с низкой вариабельностью при меньших трудозатратах. Приписанная характеристика сходимости унифицированного метода подсчета составила 18,6 %, кондуктометрии – 2,8 %. Для оценки остаточного содержания лейкоцитов в КТл рекомендуется лазерная проточная цитофлуориметрия, характеризующаяся сходимостью 17,5 %. Для методики контроля рН потенциометрическим методом с помощью рН-метра-милливольтметра рН-150М установлена приписанная характеристика сходимости 0,4 %.

Настоящее исследование позволило оценить возможность применения методик анализа показателей безопасности КТл. Результаты метрологической оценки включены в методические рекомендации «Методы контроля качества тромбоцитных компонентов крови».

Список литературы/References

1. Постановление Правительства РФ от 22 июня 2019 г. № 797 «Правила заготовки, хранения, транспортировки и клинического использования донорской крови и ее компонентов». Режим доступа: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/72184110/>
2. Декрет of the Government of the Russian Federation No. 797 of June 22, 2019 «Rules for the collection, storage, transportation and clinical use of donated blood and its components». Access mode: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/72184110> [In Russian].
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1998. 459 с.
4. Glants S. Primer of Biostatistics. Moscow: Praktika, 1998. 459 p. [In Russian].
5. Макарова Н.В., Трофимец В.Я. Статистика в Excel: учеб. пособие. М.: Финансы и статистика, 2002. 386 с.
6. Makarova N.V., Trofimets V.Ya. Statistics in Excel. Moscow: Finansy i statistika, 2002. 386 p. [In Russian].
7. МИ 2377-98 ГСИ. Государственная система обеспечения единства измерений. Разработка и аттестация методик выполнения измерений. Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/1200005227>
8. MI 2377-98. State system for ensuring the uniformity of measurements. Development and certification of measurement procedures. Access mode: <http://docs.cntd.ru/document/1200005227> [In Russian].

Сведения об авторах:

Наталья Сергеевна Никулина, e-mail: nikulina@niigpk.ru
Елена Николаевна Калинина, e-mail: kalininaen@niigpk.ru
Елена Васильевна Поздрина, e-mail: lena_nozdrina@mail.ru
Наталья Васильевна Исаева, к.б.н., e-mail: isaeva@niigpk.ru
Татьяна Валериевна Кривокорытова, e-mail: krivokorytova@niigpk.ru
Елена Сергеевна Кормщикова, e-mail: kormschikova@niigpk.ru

Information about the authors:

Natalia S. Nikulina, e-mail: nikulina@niigpk.ru
Elena N. Kalinina, e-mail: kalininaen@niigpk.ru
Elena V. Nozdrina, e-mail: lena_nozdrina@mail.ru
Natalya V. Isaeva, candidate of biological sciences, e-mail: isaeva@niigpk.ru
Tatyana V. Krivokorytova, e-mail: krivokorytova@niigpk.ru
Elena S. Kormshchikova, e-mail: kormschikova@niigpk.ru

<i>Поступила в редакцию</i>	<i>31.10.2019</i>	<i>Received</i>	<i>31.10.2019</i>
<i>После доработки</i>	<i>05.03.2020</i>	<i>Revision received</i>	<i>05.03.2020</i>
<i>Принята к публикации</i>	<i>25.04.2020</i>	<i>Accepted</i>	<i>25.04.2020</i>