

О НЕОБХОДИМОСТИ ВНЕДРЕНИЯ АВТОМАТИЗИРОВАННЫХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ В ЭКСПЕРТНУЮ ПРАКТИКУ СУДЕБНО-БИОХИМИЧЕСКИХ ОТДЕЛЕНИЙ БЮРО СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ

В. А. Павлюшина¹, Н. Ю. Кандрина²

¹Бюро судебно-медицинской экспертизы Московской области (нач. — д.м.н., проф. В. А. Клевно)

²ЗАО «Thermo Fisher Scientific», департамент клинической лабораторной диагностики (директор — П. Н. Батищев)

Аннотация: В статье указано на целесообразность интеграции новых методик в работу судебно-биохимического отделения: автоматизацию, компьютеризацию и использование возможностей контроля качества исследований на биохимическом анализаторе. Приведены данные сравнительного анализа, наглядно демонстрирующие эффективность и экономическое преимущество использования автоматического биохимического анализатора вместо ручных рутинных методик.

Ключевые слова: ручные и автоматизированные методы биохимических исследований; исследование глюкозы, мочевины и креатинина; биохимический анализатор

THE NEED OF INTRODUCING AUTOMATED METHODS INTO THE EXPERT PRACTICE OF FORENSIC BIOCHEMICAL OFFICES OF THE BUREAU FORENSIC EXAMINATION

V. A. Pavljushina, N. Ju. Kandrina

Abstract: The article pointed out that it would integration of new techniques into the work of forensic biochemistry department — automation, computerization and the use of quality control studies on the biochemical analyzer. The data of the comparative analysis demonstrate the effectiveness and economic advantage of using an automatic biochemical analyzer instead of manual routine procedures.

Keywords: manual and automated methods of biochemical researches; study of glucose, urea and creatinine; biochemical analyzer

<http://dx.doi.org/10.19048/2411-8729-2016-2-1-38-40>

◇ ВВЕДЕНИЕ

Получение аутопсийного материала для биохимических исследований в судебно-медицинской практике имеет особенности и специфику. В частности, материал в лабораторию не всегда доставляется без следов гемолиза. И если, например, в клинической лаборатории при необходимости определения показателей, на результаты которых влияет гемолиз, кровь у пациента берут заново и строго натощак, то возможности повторного забора образца трупной крови может и не быть. Между тем, доставленный биологический материал необходимо исследовать любыми доступными методами с целью получения достоверного результата.

Следует подчеркнуть, что разрешенные медицинские технологии судебной биохимии привязаны к конкретным производителям («Лахема», «Витал»), и для выполнения исследований по каждому методу указаны условия, диктующие необходимость использовать конкретные реагенты. Однако это противоречит основным принципам выполнения биохимических исследований — методы, используемые для определения аналитов, у разных производителей могут различаться. Для решения конкретной задачи эксперт должен выбрать сам, какой именно метод определения предпочтительнее в исследуемом им случае. Главным критерием вы-

бора для него становится наличие регистрационного удостоверения у набора используемых им реагентов, соответствие требованиям лаборатории и доказанная эффективность при выполнении экспертизы выбранным методом. Однако достаточность этих критериев вызывает вопросы.

Так, например, в рекомендациях производителей наборов реагентов («ТермоСайентифик», «Лахема», «Витал») указано, что при пробоподготовке образцов необходимо использовать только **сыворотку или плазму**, полученную после центрифугирования крови. При этом в рекомендованных медицинских технологиях для биохимических исследований в судебной медицине, в разделе «ход определения» в качестве типа образца указана **цельная кровь**, осажденная органическими осадителями, что **осталось незамеченным при разрешении к применению**.

Между тем, органические осадители (10% р-р ТХУ) используются в некоторых методиках для удаления следов гемолиза **из сыворотки**, а не цельной крови. Это допустимо только в случае определения белковой части сыворотки (например, при определении концентрации мочевины и креатинина) [1].

Методики, которые рекомендуют производители наборов реагентов, не всегда можно адаптировать при-

менительно к трупной крови. В частности, совершенно недопустимо подменять тип исследуемого образца (сыворотку, плазму) на цельную кровь. Во всех инструкциях, прилагаемых к наборам реагентов, четко прописаны условия проведения исследования — производитель всегда указывает, что достоверные результаты возможны только при строгом соблюдении всех условий.

В соответствии с п. 88 Приказа Минздравсоцразвития РФ от 12.05.2010 № 346н «Об утверждении Порядка организации и производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации», среди задач, стоящих перед соответствующими структурными подразделениями ГСЭУ, указана необходимость **освоения и внедрения новых** качественных и количественных биохимических методов анализа, адаптированных к задачам судебно-медицинской практики, с целью расширения диагностических возможностей проводимых экспертных исследований.

В этой связи следует отметить, что колоссальные трудо- и энергозатраты, требуемые на проведение исследований рутинными, ручными методами, не всегда оправдывают ожидания по качеству результатов исследований. Достоверность результатов подобных исследований напрямую зависит от квалификации работника лаборатории, его опыта и добросовестности. Поскольку исключить влияние «человеческого фактора» на результаты исследования невозможно (например, из-за ошибок при разведении реактивов, калибровок и контрольных материалов, пипетировании, снятии показаний при фотометрировании и пр.), то в международной практике ручные методы определения аналитов все активнее замещаются автоматизированными — выполняемыми при помощи автоматических биохимических анализаторов. Их программы позволяют исключить влияние «человеческого фактора» на процесс исследования и позволяют оперативно контролировать качество результатов. Это приводит к повышению производительности, рентабельности и качеству работы. То есть при минимальном штате лаборатории ее потенциал и продуктивность возрастают, при этом обеспечивается работа по утвержденным ГОСТ, осуществляется надежный внутренний и внешний контроль качества производимых биохимических исследований.

Экспертами судебно-биохимического отделения ГБУЗ МО «Бюро СМЭ» совместно со специалистами компании Thermo Scientific были проведены экспериментальные биохимические исследования с целью сравнения результатов, полученных ручными методами, с результатами, полученными при использовании биохимического анализатора Indiko (производства ThermoScientific, Финляндия).

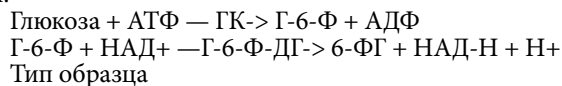
♦ МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Совместно со специалистами компании Thermo Scientific было проведено 80 исследований. Тип образца — супернатант, полученный в результате осаждения сыворотки со следами гемолиза 10% ТХУ. Ранее такой тип образца исследовался ручными рутинными методами (только три методики), а на анализаторах исследовалась цельная сыворотка, без иктеричности, липемии и следов гемолиза.

Методика определения концентрации глюкозы в сыворотке крови

Глюкоза фосфорилируется с помощью АТФ в результате реакции, катализируемой гексокиназой (ГК).

Образующийся глюкозо-6-фосфат (Г-6-Ф) окисляется до 6-фосфоглюконата (6-ФГ). В этой же реакции эквивалентное количество НАД восстанавливается до НАД-Н, что приводит к увеличению светопоглощения при 340 нм.



Тип образца

Сыворотка или ЭДТК-плазма или моча.

В случае следов гемолиза более допустимых значений интерференции возможно использовать супернатант, полученный в результате осаждения сыворотки 10% ТХУ («Лабораторные методы исследований в клинике», под редакцией Миньшикова, Москва «Медицина», 1987 год). Если образец сыворотки или плазмы не был отделен от клеток или анализируется сразу после отбора, следует использовать ингибитор гликолиза. Применительно к судебной медицине, не всегда представляется возможность отобрать сыворотку или плазму сразу. Поэтому при заборе крови на определение глюкозы необходимо использовать специальные пробирки (с серой крышечкой), содержащие ингибитор гликолиза. При заборе крови на исследование глюкозы в пенициллиновый флакон и хранении её до 10 дней в холодильнике результаты будут недостоверны, а конкретно — значительно занижены. Так как серьезной методической ошибкой при определении глюкозы в сыворотке (плазме) является недостаточно быстрое отделение сыворотки (плазмы) от клеток крови, это приводит к занижению уровня глюкозы в исследуемом образце. Кроме того, необходимо вносить в пробирки для забора крови калий фтористый или йодацетат (ингибиторы гликолиза), иначе потери глюкозы в исследуемом образце неизбежны, или использовать специализированные пробирки. Возвращаясь к вопросу о возможности определения глюкозы в цельной крови, стоит отметить, что такой способ действительно существует. Однако она не может храниться дольше, чем несколько часов, после чего в ней начинают происходить изменения, затрудняющие корректное проведение анализа.

Интерференция

2-реагентный метод: Билирубин: интерференция не наблюдается до концентрации 800 мкмоль/л (46,8 мг/дл).

Гемолизат: интерференция не обнаружена до концентрации 10 г/л гемоглобина.

Липемия: интерференция не обнаружена до концентрации 10 г/л Intralipid*

Методика определения концентрации креатинина в сыворотке крови

Данный анализ основан на методе Яффе (Jaffe), в котором креатинин образует соединение красного цвета со щелочным раствором пикрата. Эта модификация метода Яффе позволяет снизить влияние интерферирующих веществ на результат реакции. Интенсивность цвета образующегося комплекса измеряется при 510 нм.

Интерференция

1-реагентный метод:

Несвязанный билирубин: интерференция не наблюдается до концентрации 50 мкмоль/л (2,9 мг/дл).

Связанный билирубин: интерференция не наблюдается до концентрации 20 мкмоль/л (1,2 мг/дл).

Гемолизат: интерференция не обнаружена вплоть до содержания 7 г/л гемоглобина.

Липемия: интерференция не обнаружена до концентрации 1 г/л Intralipid или 2,6 ммоль/л (230 мг/дл) добавленных триглицеридов.

2-реагентный метод:

Несвязанный билирубин: интерференция не наблюдается до концентрации 120 мкмоль/л (7,0 мг/дл).

Связанный билирубин: интерференция не наблюдается до концентрации 90 мкмоль/л (5,3 мг/дл).

Гемолизат: интерференция не обнаружена вплоть до содержания 10 г/л гемоглобина.

Липемия: интерференция не обнаружена до концентрации 3 г/л Intralipid® или 4,6 ммоль/л (410 мг/дл) до-бавленных триглицеридов.

Тип образца

Сыворотка или ЭДТК-плазма. В случае гемолиза выше допустимых значений интерференции возможно использовать супернатант, полученный в результате осаждения сыворотки со следами гемолиза 10% ТХУ.

Методика определения концентрации мочевины в сыворотке крови

Мочевина в присутствии воды и уреазы гидролизуется с образованием аммиака и диоксида углерода. В присутствии глутаматдегидрогеназы (ГЛДГ) и восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотида (НАД-Н) аммиак соединяется с α-кетоглутаратом (α-КГ) с образованием L-глутамата.

В результате при превращении НАД-Н в НАД происходит уменьшение светопоглощения при 340 нм, которое пропорционально содержанию мочевины в образце.

Мочевина + H₂O —> 2 NH₃ + CO₂

NH₃ + α-КГ + НАД-Н —> L-глутамат + НАД

Тип образца

Сыворотка, гепаринизированная или ЭДТК плазма. Не использовать сыворотку, стабилизированную фторидами. В случае гемолиза выше допустимых значений интерференции возможно использовать супернатант, полученный в результате осаждения сыворотки 10% ТХУ.

Интерференция

Билирубин: интерференция не наблюдается до концентрации 1000 мкмоль/л (58,5 мг/дл).

Гемолиз: интерференция не наблюдается до концентрации 10 г/л гемоглобина в продукте гемолиза.

Липемия: интерференция не обнаружена до концентрации 20 ммоль/л (1770 мг/дл) триглицеридов.

Производитель реагентов рекомендует использовать для определения данных анализов сыворотку, гепаринизированную или ЭДТК плазму. Использование цельной крови не допускается.

В ходе совместных исследований удалось получить сопоставимые результаты одного и того же супернатанта, исследованного разными методиками (ручными и аппаратными), но более высокого качества с минимальными коэффициентами вариации для каждого метода, допускаемыми приказами по контролю качества. При этом время, затраченное экспертом на участие в процессе и на выполнение анализа, сократилось вдвое благодаря использованию биохимического анализатора.

Для корреспонденции:

ПАВЛЮШИНА Валентина Александровна — заведующая судебно-биохимическим отделением государственного бюджетного учреждения здравоохранения Московской области «Бюро судебно-медицинской экспертизы» (ГБУЗ МО «Бюро СМЭ»). Адрес: 111401, г. Москва, ул. 1-я Владимирская, д. 33, корп. 1, ГБУЗ МО «Бюро СМЭ» • pavlyushina@sudmedmo.ru

КАНДРИНА Наталия Юрьевна — специалист по клинической химии, департамент клинической лабораторной диагностики ЗАО Термо Фишер Сайентифик. Адрес: Московская обл., г. Химки, Ленинградская ул., вл. 39, стр. 6 • nataliya.kandrina@thermofisher.com

Было доказано, что привязывать исследование биохимических параметров к определенному производителю нет никакой необходимости при правильном исследовании материала с выполнением ежедневного контроля качества и калибровки используемых реагентов.

В результате проведенных в судебно-биохимической лаборатории московского областного бюро СМЭ исследований были разработаны методики, позволяющие максимально эффективно использовать ресурсы лаборатории для выполнения рутинных биохимических исследований, экономить время, уменьшать количество повторений, что позволило увеличить количество и повысить качество выполняемых исследований.

◇ ВЫВОДЫ

Современное аналитическое оборудование, связанное с компьютерными системами и профессиональными уровнями программ математической обработки результатов исследования, позволяет максимально быстро и качественно получать результаты исследования. Проведенный сравнительный анализ показал экономическое и информативное преимущество использования автоматического биохимического анализатора модели Indiko в судебно-медицинской практике.

Наши опыты выявили большие преимущества автоматизации выполнения исследований, обычно выполняемых в лабораторных подразделениях бюро СМЭ ручными методами. Это дало основания рекомендовать активное внедрение автоматизации в повседневную работу судебно-биохимических отделений бюро судебно-медицинской экспертизы. Было принято решение перевести выполнение рутинных методов исследования крови в судебно-биохимической лаборатории ГБУЗ МО «Бюро СМЭ» на биохимический анализатор Indiko (производства ThermoScientific, Финляндия). Работа на анализаторе удобна, экономит временные и материальные ресурсы, дает широкие возможности внедрения новых методик, позволяет достичь устойчивого контролируемого качества исследований и принципиально по-новому организовать архив.

◇ ЛИТЕРАТУРА

1. Лабораторные методы исследований в клинике. Справочник / Меньшиков В. В., Делекторская Л. Н., Золотницкая Р. П., Андреева З. М., Анкирская А. С., Балаховский И. С., Белокриницкий Д. В., Смоляницкий А. Я. и др.; под ред. Меньшиков В. В. М.: Медицина, 1987. – 364 с.
2. Минеева Л. Д., Гугуева Н. Б., Джуха Ю. П., Соловей А. Э., Новоточенова В. И. Сравнительная оценка результатов судебно-биохимических анализов, полученных общепринятыми методами и при помощи автоматического биохимического анализатора // Проблемы экспертизы в медицине. 2009. № № 36–4 / Т 09. – С. 39–40.