

# ОПЫТ РАБОТЫ НА ОТЕЧЕСТВЕННОМ ГЕМОГЛОБИНОМЕТРЕ МИНИГЕМ

Е.Н. Ованесов, И.М. Овчинников

ЗАО НПП «ТЕХНОМЕДИКА», Москва

Исследование концентрации гемоглобина крови является одним из наиболее массовых и клинически важных лабораторных исследований. Нормы точности, предъявляемые к лабораторному исследованию гемоглобина, определены Приказом Минздрава РФ №45 от 07.02.2000г. Предельно допустимые значения смещения (В) и коэффициента общей аналитической вариации (CV), рассчитанные по результатам 20 измерений определяемого показателя в контрольном материале гемоглобина, составляют 4%. Этим же приказом определены биологически обоснованные нормы аналитической точности клинических лабораторных исследований концентрации гемоглобина в крови: В(20) - 2,5%, CV(20) - 2,3%.

Наиболее массовыми, рутинными методами исследования гемоглобина крови являются фотометрические методы, использующие свойство гемоглобина и его производных хорошо растворяться в воде, окрашивая раствор характерным цветом. По данным Центра внешней оценки качества клинических лабораторных исследований (2004 год) 92% российских медицинских лабораторий используют фотометрический гемиглобинцианидный метод. При этом доля автоматических исследований составляет только 10%, ручных – 82%. Для определения гемоглобина применяется довольно широкий парк оборудования, среди которого фотоколориметры КФК-2 и КФК-3 занимают 54,7%, гемоглобинометры (специализированные фотометры) МиниГЕМ 540 – 15,5%, МФ 1020 – 12,4%.

Гемиглобинцианидный метод основан на химическом преобразовании основных производных гемоглобина крови (рис. 1) в одну форму – гемиглобинцианид, раствор которого имеет специфическую окраску и простой спектр поглощения с достаточно широким максимумом в диапазоне волн 540-545 нм (рис. 2).

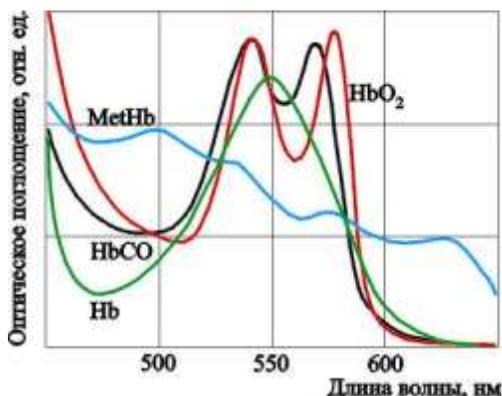


Рис. 1. Спектры поглощения производных гемоглобина: дезоксигемоглобина Hb, оксигемоглобина HbO<sub>2</sub>, карбоксигемоглобина

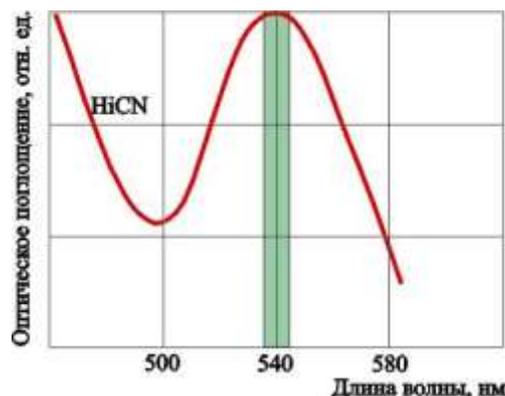


Рис.2 Спектр поглощения гемиглобинцианида.

HbCO и метгемоглобина MetHb.

Растворы гемиглобинцианида характеризуются многолетней стабильностью и воспроизводимостью оптических характеристик при использовании реагентов, изготовленных любыми производителями по методу Дробкина.

Три важных фактора определяют точность определения гемоглобина:

1. калибровка
2. измерение холостой пробы
3. измерение концентрации гемоглобина.

Рассмотрим простейшую оптическую схему устройства для фотометрирования растворов (рис. 3).

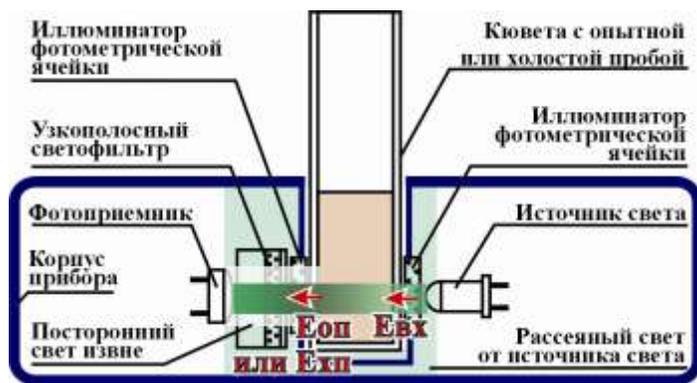


Рис. 3. Простейшая оптическая схема устройства для фотометрирования.

Световой поток от источника света (лампа накаливания, светодиод) пропускается через кювету с исследуемым раствором и попадает на фотоприемник. Световой поток, проходя через раствор, частично поглощается. Степень поглощения зависит от концентрации гемиглобинцианида. Перед фотоприемником расположен светофильтр, который пропускает световой поток и в значительной мере защищает фотоприемник от постороннего света извне. На фотоприемник попадает также незначительное излучение от источника света, рассеянное конструктивными элементами прибора и не прошедшее через кювету. Это излучение не ослабляется светофильтром. Электрический ток фотоприемника пропорционален падающему на фотоприемник световому потоку  $E$ .

Без учета рассеянного и постороннего света, а также других причин, искажающих результат измерения справедливы соотношения:

$I_{хп} = E_{хп} \cdot K$ , где  $K$  – коэффициент преобразования силы света  $E_{хп}$ , прошедшего через холостую пробу, в электрический ток фотоприемника  $I_{хп}$ ;  $I_{оп} = E_{оп} \cdot K$ ,  $I_{оп}$  измеряется с опытной пробой;

$T_{хп} = E_{хп}/E_{вх}$ ,  $T_{оп} = E_{оп}/E_{вх}$  где  $T$  – коэффициент пропускания соответствующей жидкости;

$D = -\lg T$ , где  $D$  – оптическая плотность раствора;  $D_{оп} = -(\lg E_{вх} - \lg E_{оп})$ ;  $D_{хп} = -(\lg E_{вх} - \lg E_{хп})$ ;

$C = F \cdot D_{нб}$ , где  $C$  – концентрация гемиглобинцианида (или гемоглобина),  $F$  – коэффициент пропорциональности (или фактор),  $D_{нб}$  – оптическая плотность опытной пробы относительно оптической плотности холостой пробы,  $D_{нб} = D_{оп} - D_{хп} = \lg(E_{оп}/E_{хп}) = \lg(I_{оп}/I_{хп})$ .

В случае, если световой пучок монохроматичный или его спектр ограничен светофильтром с очень узкой полосой пропускания (до 10 нм), последняя зависимость имеет линейный вид (рис. 4).

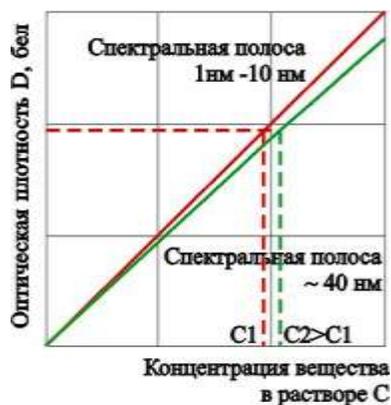


Рис. 4. Зависимость оптической плотности от концентрации вещества в растворе при различной спектральной полосе пропускания светофильтра.

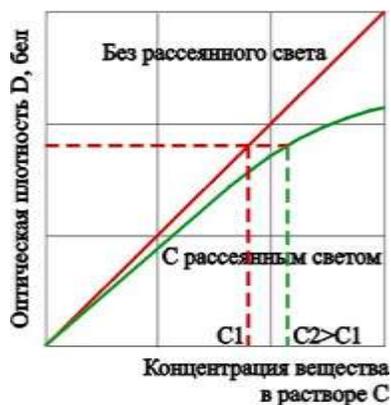


Рис. 5. Влияние рассеянного и постороннего света на результат измерения.

В случае попадания на фотоприемник рассеянного и постороннего света, связь между оптической плотностью и концентрацией становится нелинейной (рис. 4). К такому же эффекту приводит увеличение спектральной полосы пропускания светофильтра (рис. 5). Увеличение спектральной полосы снижает также величину измеренной оптической плотности по сравнению с монохроматическими измерениями и, соответственно, увеличивает значение коэффициента

пересчета оптической плотности в концентрацию, то есть, фактора, при измерении в максимуме пропускания (рис. 6) [1].

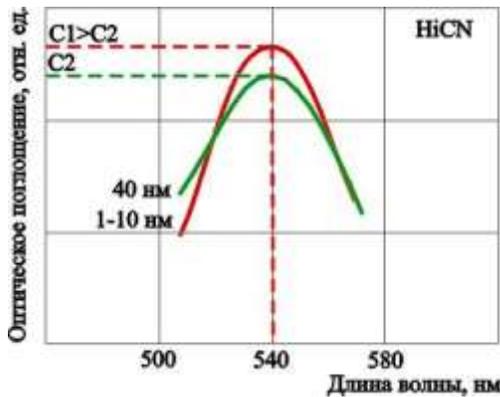


Рис. 6. Влияние спектральной полосы пропускания светофильтра на измерение оптической плотности. Рис. 7. Влияние холостой пробы на результат измерения.

Правильная и постоянная калибровка значительно снижает влияние негативных факторов при работе на обычных фотометрах. Однако при калибровке фотометра трудно учесть влияние потока постороннего света извне, так как этот поток зависит от взаимного расположения и перемещения внешних источников света в помещении, где проводятся измерения.

Процедура калибровки является наиболее важной при определении гемоглобина. Неправильно приготовленный или испорченный калибратор приведет к ошибкам измерения. Для гемиглобинцианидного метода многие фирмы выпускают готовые наборы калибровочных растворов с разной концентрацией гемиглобинцианида. Эти растворы паспортизируются относительно холостой пробы – дистиллированной воды и обладают долговременной стабильностью при соответствующем хранении в прохладном светозащищенном месте в плотно закрытой посуде.

Следует особо отметить, что качество измерения оптической плотности холостой пробы  $D_{хп}$  в лабораторных условиях существенным образом отражается на качестве измерения концентрации гемоглобина. Холостой пробой для гемиглобинцианидного метода служит дистиллированная вода. Однако, если в воде присутствуют какие-либо включения (пузырьки воздуха, взвесь и тому подобное), оптическая плотность такой «холостой» пробы окажется выше и результат определения гемоглобина на неправильно откалиброванном фотометре будет

искажен (рис. 7).

Кроме чисто оптических факторов на результат измерения оказывает влияние и нестабильность электрических параметров схемы преобразования силы света в электрический сигнал. В обобщенном виде это можно представить, как нестабильность коэффициента  $K$ . Этот недостаток также компенсируется калибровкой фотометра, но только на непродолжительное время.

Таким образом, качество определения гемоглобина зависит и от качества калибраторов и от конструктивных особенностей используемого фотометра.

К сожалению, не все лаборатории удовлетворяют требованиям по точности измерений. Так, согласно результатам внешней оценки качества определения гемоглобина, белка и глюкозы в лабораториях Новосибирской области, проведенной В.И. Пупковой и др. [2] при анализе в контрольных пробах гемоглобина в КДЛ с помощью наборов реagens разных производителей правильные значения получили только около 50% лабораторий. По мнению авторов исследования, такой результат “ в значительной степени связан с наличием в КДЛ изношенного оборудования, применением стеклянных дозаторов, отсутствием внутри лабораторного контроля качества и методическими погрешностями, допускаемыми операторами при работе”.

Согласно В. И. Пупковой и В.В. Ждановой [3] неправильная калибровка фотометра обуславливает до 40% от общего числа ошибок, допускаемых при измерении гемоглобина.

Большинство фотометров, используемых для определения гемоглобина, разработаны в 70-80 г. прошлого столетия и имеют на передней панели от одной до нескольких ручек для периодической подстройки приборов. Это ручки регулировки нуля и калибровки. Справедливости ради нужно сказать, что и в наше время на рынке предлагаются, гордо именуемые «цифровыми», импортные гемоглобинометры с таким же управлением.

НПП «Техномедика» разработало и производит современный микропроцессорный гемоглобинометр МиниГЕМ, не требующий никаких калибровок в процессе эксплуатации и обеспечивающий определение гемоглобина в соответствии с требованиями Минздрасоцразвития (рис. 8).



Рис. 8. Гемоглобинометр МиниГЕМ 540

Алгоритм измерения сигналов в гемоглобинометре МиниГЕМ, соответствующих опытной пробе содержит следующие фазы:

- измерение  $I_{оп}$  – электрического тока, соответствующего оптическому коэффициенту пропускания кюветы с опытной пробой, когда кювета опущена в фотометрическую ячейку ;

- измерение  $I_{аоп}$  – электрического тока, соответствующего оптическому коэффициенту пропускания оптической схемы без кюветы в цикле измерения опытной пробы.  $I_{аоп}$  характеризует состояние оптико-электронного тракта прибора и хранится в памяти прибора. Значение  $I_{аоп}$  из предыдущего цикла измерения используется при вычислении концентрации гемоглобина в текущем цикле. Измерение  $I_{аоп}$  является функцией самоконтроля гемоглобинометра, а его оперативное изменение – функцией саморегулирования. Эти функции обеспечивают многолетнюю стабильность измерений на гемоглобинометре МиниГЕМ.

- измерение  $I_{d1}$  – электрического тока при выключенном светодиоде в цикле измерения с кюветой в цикле измерения опытной пробы;

- измерение  $I_{d2}$  – электрического тока при выключенном светодиоде в цикле измерения без кюветы в цикле измерения опытной пробы;

Такой же алгоритм измерения сигналов, соответствующих холостой пробе:

- измерение  $I_{хп}$  – значение электрического сигнала, соответствующего оптическому коэффициенту пропускания кюветы с холостой пробой, когда кювета опущена в фотометрическую ячейку.  $I_{хп}$  вносится в энергонезависимую память прибора при заводской калибровке и соответствует концентрации гемоглобина в холостой пробе равной нулю. Если по какой-либо причине результат измерения холостой пробы не равен нулю,  $I_{хп}$  может быть восстановлено пользователем самостоятельно процедурой установки бланка;

- измерение  $I_{ахп}$  – электрического тока, соответствующего оптическому коэффициенту пропускания оптической схемы без кюветы в цикле измерения холостой пробы;

- измерение  $I_{d3}$  – электрического тока при выключенном светодиоде в цикле измерения с кюветой в цикле измерения холостой пробы;

- измерение  $I_{d4}$  – электрического тока при выключенном светодиоде в цикле измерения без кюветы в цикле измерения холостой пробы;

Концентрация гемоглобина  $C$  и электрические сигналы связаны следующим выражением:

$$C = (\lg(I_{\text{оп}} - I_{d2}) - \lg(I_{\text{оп}} - I_{d1}) - \lg(I_{\text{хп}} - I_{d3}) + \lg(I_{\text{хп}} - I_{d4})) \cdot F = (D_{\text{оп}} - D_{\text{хп}}) \cdot F = D_{\text{Hb}} \cdot F.$$

$F = 32768/M$ ,  $M$  – масштабный коэффициент, значение которого устанавливается при заводской калибровке прибора и хранится в энергонезависимой памяти прибора.

Значение масштабного коэффициента  $M$  записывается в паспорт прибора и может быть выведено на дисплей прибора для контроля. Если по какой-либо причине  $M$  не соответствуют паспортному значению, пользователь может восстановить его самостоятельно.

Таким образом, алгоритм работы гемоглобинометра обеспечивает точные и стабильные измерения, учитывая как влияние рассеянного и постороннего света, так и изменение состояния оптико-электронного тракта прибора.

Конструкция гемоглобинометра МиниГЕМ имеет высокую надежность. В ней используются новейшие разработки мировых производителей электронных компонентов. Управление работой гемоглобинометра и расчет концентрации гемоглобина осуществляет микропроцессорная программа.

В качестве источника света используется светодиод с высокой яркостью, что позволяет работать с прибором даже на освещенном солнцем рабочем месте, не прикрывая открытую фотометрическую ячейку. Срок службы такого светодиода составляет десятилетия. Одним из самых уязвимых и ненадежных элементов конструкции фотометра являются интерференционные светофильтры со спектральной полосой пропускания до 10 нм. Их использование, в основном, обусловлено необходимостью обеспечить линейность измерений (рис. 5). Но, служат они относительно недолго. В гемоглобинометре МиниГЕМ применен узкополосный абсорбционный светофильтр из комбинации цветных стекол с полосой около 40 нм. Такой светофильтр имеет практически неограниченный срок службы. Небольшая нелинейность, возникающая при измерениях с таким светофильтром, компенсируется микропроцессорной программой.

Описанные алгоритм измерения и конструкция обеспечивают работу гемоглобинометра с заводской калибровкой весь срок службы прибора.

Особенностью конструкции гемоглобинометра МиниГЕМ является автоматическое включение прибора при опускании кюветы в фотометрическую ячейку. При опускании кюветы прибор переходит в активный режим, производит измерение и выводит результат на дисплей. При вынимании кюветы гемоглобинометр переходит в пассивный режим ожидания с минимальным энергопотреблением. Прибор не имеет кнопок включения и выключения питания,

каких-либо ручек для регулирования и калибровок. Таким образом, фотометрирование опытных проб полностью автоматизировано, что обеспечивает высокую производительность измерений и минимизирует ошибки оператора.

Гемоглобинометр МиниГЕМ определяет оптическую плотность растворов в диапазоне 0-0,9 бел, что соответствует концентрации гемоглобина 0-360 г/л. Суммарная погрешность определения концентрации гемоглобина, полученная при сравнительных медицинских испытаниях, не превышает 2% в референтном диапазоне концентраций. Прибор имеет размеры 178x128x43 мм, питается от внутренних батарей и от сетевого адаптера. Время работы от одного комплекта из трех батарей – до 4 лет. Контроль работоспособности гемоглобинометра производится с помощью прилагаемой к нему контрольной меры из оптического стекла. При внутрилабораторном и внешнем контроле качества могут использоваться растворы гемиглобинцианида и растворы гемоглобина (оксигемоглобина).

Высокие эксплуатационные характеристики определили интерес к гемоглобинометру со стороны российских и зарубежных лабораторных специалистов. Кроме России, гемоглобинометром МиниГЕМ пользуются в десятках стран мира. Объем покупок в 2004-2007 годах составил 7 тысяч приборов. Парк приборов составляет в России 12 тысяч, за рубежом (в основном в тропических и жарких странах) – около 2 тысяч штук. При этом число рекламаций в России не более 0,3% от всего парка в год, за рубежом – не более десятка рекламаций за время поставок примерно 10 лет, что свидетельствует о высокой надежности конструкции.

Простота работы с прибором, портативность, высокая точность и надежность определили самые разнообразные области его применения. Гемоглобинометры МиниГЕМ используются в небольших стационарных лабораториях в качестве основного оборудования, в крупных лабораториях – в качестве дублирующего. Наши приборы работают в полевых условиях, в мобильных гражданских и военных лабораториях. Гемоглобинометр МиниГЕМ получил высокую оценку Гематологического научного центра РАМН, где прибор безотказно работает с 1998 года, Центральной КДЛ Медицинского центра управления делами Президента РФ, Лаборатории гемцитологии ГНЦ РАМН, кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики ВМА ГВМУ МО РФ и главного лаборанта МО РФ, Главного военно-клинического госпиталя ВВ МВД РФ, кафедры КЛД РМАПО и главного специалиста по КЛД МЗ РФ, многих других медицинских учреждений.

Вот отзыв Мещерской участковой больницы из Пензенской области: «...уже 2 года, как мы эксплуатируем МиниГЕМ 540. За это время было сделано более 8 тысяч анализов и аппарат ни разу не подвел. Он легок и прост в обращении, не требует особых реактивов, работает от сети и портативно, не требует калибровок. МиниГЕМ 540 эксплуатируется нами как в стационарных условиях, так и при выезде в детские сады, школы, на ФАПы. Если раньше мы

забирали кровь и ехали домой, то сейчас, благодаря аппарату, мы производим анализы на месте. Он надежен в работе. Мы очень благодарны за выпуск такого незаменимого аппарата».

#### Литература.

1. В.В. Долгов, Ованесов Е.Н., Щетникович К.А. Фотометрия в лабораторной практике. СПб. «Витал Диагностикс СПб», 2004.
2. В.И. Пупкова и др. Результаты внешней оценки качества определения гемоглобина, белка и глюкозы в лабораториях Новосибирской области. НОВОСТИ "Вектор-Бест" N4(30) Декабрь 2003
3. В. И. Пупкова, В.В. Жданова. Рекомендации по определению гемоглобина. Опыт внедрения в практику гемихромного метода (набор "Гемоглобин-Ново", НОВОСТИ "Вектор-Бест" N15 Март 2000г.