

Проблемы преаналитики: влияние гемолиза in vitro на результаты исследований в коагулологии

Вероятность того, что ошибки могут поставить под угрозу качество результата анализа, присутствует на всех этапах лабораторного исследования: преаналитическом, аналитическом и постаналитическом. По мнению большинства исследователей, от 40 до 70% ошибок имеют место на преаналитическом этапе как наиболее сложном поддающемся стандартизации. В коагулологических лабораториях, как и в других клиничко-диагностических отделах, гемолиз в исследуемых образцах представляет основную диагностическую проблему. Механизм влияния гемолиза на оценку системы гемостаза имеет как аналитическую, так и биологическую природу. Аналитическая составляющая ошибки связана с высокой абсорбцией свободного гемоглобина на длинах волн, используемых в оптических коагулометрах. Биологическая интерференция гемолиза является следствием высвобождения из поврежденных клеток эндотелия и крови про- и антикоагулянтных молекул, активации тромбоцитов и плазменных факторов свертывания крови.

К наиболее распространенным преаналитическим факторам, влияющим на качество результата в коагулологических лабораториях, относятся следующие (G.L. Salvagno et al., 2008):

- гемолиз (39%);
- образование сгустка в первичной пробирке (29%);
- нарушенное соотношение кровь/антикоагулянт (28%);
- контаминация образца растворами, используемыми для промывания внутривенных катетеров (2%);
- липемия и гипербилирубинемия (по 1%).

Гемолизированные образцы являются основным источником недостоверных результатов в биохимии, иммунохимии, общем клиническом анализе крови, анализе газового состава крови, оценке функций тромбоцитов и коагулологических исследованиях. Многокомпонентная структура системы гемостаза, взаимозависимость и взаимодействие про-, антикоагулянтных и фибринолитических механизмов и связанная с этим сложность аналитических методов и измерительных приборов делают коагулологические тесты более уязвимыми и подверженными влиянию гемолиза по сравнению с другими исследованиями лабораторной диагностики. Если вероятность гемолиза in vivo исключена, гемолизированные образцы представляют серьезную проблему, определяемую потенциальной биологической и аналитической интерференцией. Последняя связана с пиком абсорбции гемоглобина на тех же длинах волн, которые обычно используются в оптических коагулометрах для регистрации образования фибринового сгустка. Биологическая интерференция, которая часто не принимается во внимание, также имеет важное значение, поскольку вносит погрешность в измерение как на оптических, так и на механических анализаторах гемостаза. Этот феномен связан с высвобождением молекул плазматических мембран и цитоплазмы эндотелия, эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов (например, тканевого тромбопластина, фосфолипидов, протеаз, АДФ и др.), что приводит к активации факторов свертывания и тромбоцитов и последующему образованию микросгустков в пробирке. В процессе проведения коагулологического теста преждевременная активация факторов приводит к уменьшению времени образования фибринового сгустка, а в случаях избыточного потребления субстратов реакции in vitro до исследования время получения сгустка увеличивается. Присутствие в плазме свободного (внеклеточного) гемоглобина отражает прежде всего затруднения при взятии крови (проблемная венопункция) и может считаться надежным показателем сопутствующего повреждения эндотелия с высвобождением прокоагулянтных эндотелиальных и субэндотелиальных факторов, что в конечном итоге ставит под сомнение качество образца и, следовательно, результата анализа. Это относится как к оптическим, так и к механическим технологиям регистрации сгустка, поскольку биологическая интерференция является значительной, даже если аналитическим влиянием гемолиза на механические системы можно пренебречь.

Причиной получения гемолизированного образца являются все фазы преаналитического этапа: процедура венопункции и взятие крови, хранение, транспортировка, первичная обработка и получение образца для исследования (табл. 1). В практической работе удобно использовать классификацию степеней гемолиза, основанную на концентрации внеклеточного гемоглобина и внешнем виде плазмы (табл. 2). Считается, что человеческий глаз способен различить изменение оттенка плазмы при содержании гемоглобина >0,3-0,5 г/л.

В повседневной лабораторной практике приблизительно 95% гемолизированных образцов демонстрируют незначительный гемолиз (до 0,3 г/л гемоглобина); как правило, это образцы крови, поступающие из отделений скорой помощи и блоков интенсивной терапии и реанимации (P. Carraro et al., 2000; G. Lippi et al., 2009). Оценка так называемых сывороточных индексов (в том числе индекса гемолиза) в настоящее время рекомендована Международной федерацией клинической химии и широко применяется в современных биохимических анализаторах, в то время как в автоматических коагулометрах начала реализовываться лишь недавно (NIL-системы).

Для оценки влияния гемолиза на результаты коагулологических тестов исследователи прибегают к различным методам, искусственно провоцирующим данный процесс. Применяются

замораживание/оттаивание цельной крови с антикоагулянтом, механическое повреждение клеток путем пропускания крови через иглу с маленьким просветом, лизис клеток крови деионизированной водой или ультразвуком, добавление в нормальный образец гемолизата. Все перечисленные подходы имеют свои недостатки, и ни один из этих способов не обеспечивает полной идентичности искусственного гемолиза спонтанному, происходящему при получении образца крови у пациента. Размер и знак сдвига ошибки измерения зависят также от методики анализа (хромогенный, клоттинговый, иммунотурбидиметрический), способа регистрации сгустка (механический или оптический), технических особенностей анализатора и состава реагентов. Именно поэтому данные о степени смещения результатов в ту или иную сторону под влиянием гемолиза сильно разнятся, что не позволяет определить четкий порог значимой интерференции на основании концентрации свободного гемоглобина в плазме. Некоторые авторы полагают, что результат исследования гемолизированного образца должен отвергаться всякий раз, если он находится на пороге принятия клинического решения (G. Lippi et al., 2007; C.G. Fraser et al., 2012). Особую проблему в таких случаях представляет ложнонормальный результат, например, когда в образце с потенциально удлиненным временем образования сгустка влияние гемолиза приводит к укорочению временного промежутка и попаданию в референсные интервалы.

Лишь немногие исследования влияния гемолиза на коагулологические тесты были опубликованы, и, к сожалению, их данные мало сопоставимы по вышеизложенным причинам. Тем не менее авторам удалось оценить общие тенденции, на которые необходимо обращать внимание. Далее представлены результаты нескольких работ, посвященных изучению проблемы гемолиза в коагулологии.

Ross и Paar (1998) исследовали 50 образцов нормальной донорской плазмы до и после добавления гемолизата в пробирку (коагулометр MDA 180, BioMerieux). Авторы отметили,

Таблица 1. Ошибки преаналитического этапа, приводящие к появлению гемолиза в пробирке

Получение крови для исследования	
Плохой венозный доступ	
Нарушение методики получения крови	
Травматическая венопункция	
Использование игл, не соответствующих вакуумной системе	
Использование игл с малым просветом (калибр 23G и выше)*	
Неадекватное заполнение пробирки	
Длительное наложение жгута	
Чрезмерно интенсивное перемешивание крови с антикоагулянтом	
Транспортировка крови	
Превышение временного интервала доставки в лабораторию	
Несвоевременное отделение плазмы от форменных элементов	
Транспортировка при экстремальной температуре (слишком низкая или высокая)	
Механическое воздействие на образец	
Первичная обработка крови	
Неадекватные условия центрифугирования (скорость, время, температура, уравнивание пробирок)	
Ресуспендирование крови и повторное центрифугирование	
Контаминация плазмы, содержащей остаточные клеточные элементы, после замораживания/оттаивания	
Примечание: * чем больше калибр иглы, тем меньше ее просвет.	

Таблица 2. Визуальная оценка степени гемолиза

Степень выраженности	Концентрация внеклеточного гемоглобина (г/л)	Окрашивание плазмы/сыворотки
Отсутствует	0,05	Желтый разной интенсивности
Незначительный	0,05-0,3	От желтого до слегка розоватого оттенка
Умеренно выраженный	0,3-0,6	Розовый
Выраженный	0,6-2,0	Розово-красный
Значительно выраженный	≥2,0	Насыщенно-красный

что активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) достоверно не изменялось, тогда как в отношении протромбинового времени (ПВ) значимое занижение результата наблюдалось при концентрации гемоглобина >0,48 г/л, укорочение протромбинового времени (ТВ) отмечалось при уровне гемоглобина >3,4 г/л, снижение концентраций фибриногена и антитромбина III (АТ III) – при концентрациях гемоглобина >1,0 и >2,4 г/л соответственно.

A.C. Laga и соавт. (2006) провели ретроспективное сравнение результатов исследования нормальных и гемолизированных образцов (гемоглобин от 0,2 до 7 г/л) от одних и тех же пациентов, у которых производился повторный забор крови после обнаружения гемолиза (анализатор MDA-II, BioMerieux). По данным авторов, наблюдалось укорочение АЧТВ и ПВ (на 3,0 и 2,8% соответственно), увеличение концентрации активированных факторов VII (32,6%), V (11,9%), X (2,6%), протромбинового фрагмента 1,2 (125%); существенного влияния на факторы XIIa и VIII отмечено не было. Интересен тот факт, что выявить какую-либо корреляцию между концентрацией свободного гемоглобина и относительным смещением ПВ и АЧТВ в образцах пациентов не удалось. Это исследование ценно своим дизайном, так как авторы сравнивали образцы не с индуцированным гемолизом, а с истинным, развившемся на различных стадиях преаналитического этапа.

G. Lippi и соавт. (2006) изучили влияние гемолиза на основные коагулометрические тесты в образцах крови от 10 здоровых доноров (анализатор BCS(R), Dade-Behring). Гемолизированные образцы формировались путем добавления к плазме гемолизата, полученного после однократного замораживания/оттаивания цельной крови (диапазон концентраций внеклеточного гемоглобина от 0 до 17 г/л). Статистически достоверное увеличение ПВ наблюдалось при концентрации гемоглобина 0,9 г/л, укорочение АЧТВ и снижение концентрации фибриногена – при 1,7 г/л. Клинически значимое изменение ПВ было зарегистрировано при концентрации свободного гемоглобина 1,7 г/л, АЧТВ – при 2,0 г/л и фибриногена – при 3,4 г/л. Статистически достоверное повышение D-димера отмечено при содержании гемоглобина 5 г/л, а при значении данного показателя 13,6 г/л смещение превышало 10%. Авторы исследования обращают внимание на высокий коэффициент внутрисерийной вариации (62%) при исследовании проб от разных доноров с одинаковой концентрацией свободного гемоглобина, что подтверждает отсутствие какой-либо корреляции между концентрацией гемоглобина в плазме и степенью искажения результата.

В недавней работе Tantanate и соавт. (2011) исследовали плазму пациентов с нормальными значениями ПВ, АЧТВ и фибриногена после добавления в нее гемолизата. Показано, что все образцы продемонстрировали значимое завышение результатов (анализатор Sysmex CS-2100i54).

Сравнивая влияние гемолиза на измерение D-димера с использованием двух принципиально различных методик (иммунотурбидиметрия и иммунохемилюминисцентный анализ) G. Lippi и соавт. (2012) убедительно показали, что интерференция носит скорее биологический характер, нежели аналитический, поскольку практически не зависит от используемого метода. Согласно данным этого исследования, значительное снижение показателя наблюдалось при выраженном гемолизе (>11,5 г/л), тогда как при меньших концентрациях гемоглобина ошибка не превышала 10%. Авторы сделали вывод о том, что при незначительной контаминации гемоглобином результаты исследования на D-димер этими методами клинически достоверны и могут передаваться врачу.

Проанализировав современное состояние проблемы гемолизированных проб в лабораторной медицине в целом и коагулологии в частности, Институт стандартизации лабораторных исследований (Clinical and Laboratory Standards Institute) в документе H21-A5 приводит следующие рекомендации: «Образцы гемолизированные, иктеричные, липемичные или содержащие вещества, потенциально мешающие прохождению света, представляют серьезную проблему в исследовании системы гемостаза и нежелательны».

Подготовила **Александра Яковец**

3