

Проблемы преаналитики: интерференция гипербилирубинемии и липемии в коагулологии

Лабораторная ошибка определяется как «любое реальное или возможное отрицательное влияние на ведение пациентов», поскольку данные лабораторных исследований во многом определяют принятие клинических решений. Большинство ошибок в лабораторной диагностике возникают на пре- и постаналитическом этапах, тем не менее и на аналитическом этапе, генерирующем меньшее число ошибок, последние могут быть не распознаны вследствие несовершенства способа их обнаружения. При этом наиболее часто встречающиеся ошибки вызваны интерференцией или недостаточной чувствительностью аналитического метода. Kroll и Elin (2005) определяют интерференцию как «влияние вещества, присутствующего в образце, которое изменяет истинное значение результата». Интерференция, вмешивающаяся в процедуру анализа, может привести к получению ложного результата, не отражающего состояние пациента in vivo.

Необходимость проведения коагулологических тестов у пациентов с выраженными нарушениями липидного обмена или гипербилирубинемией является нередкой ситуацией в клинической практике. И если гемолиз in vitro, появляющийся как правило вследствие нарушения сбора, транспортировки и подготовки образца к анализу, можно предотвратить надлежащим выполнением указанных процедур, то поступления на исследование липемичных либо иктеричных образцов избежать невозможно в связи с тем, что таковые являются следствием патологических процессов, протекающих in vivo.

Сывороточный (плазменный) билирубин — конечный продукт катаболизма гемма — является высокогидрофобным веществом и транспортируется в печени в связанной с альбумином форме. Метаболизм билирубина в печени завершается образованием его ди- и моноглюкуронидов, хорошо растворимых в воде. Билирубин, в чистом виде имеющий интенсивный коричневый цвет, придает плазме оттенки от соломенного до желтого. Состояние гипербилирубинемии сопровождается появлением ярко-желтого окрашивания плазмы различной степени выраженности (иктеричность) с высоким значением оптической плотности в спектре 400–520 нм и пиком абсорбции около 546 нм, что перекрывает абсорбцию на длинах волн, используемых в автоматических коагулометрах. Самую большую проблему в коагулологии представляет именно аналитическая интерференция билирубина, а не биологическая — появление его окисленных форм (биливердина и билипурпурина) вследствие реагирования с окислителями, присутствующими в пробе или реагентах. Большинство исследователей полагают, что при устранении фотометрических погрешностей биологической интерференцией билирубина можно пренебречь.

Многочисленные исследования были посвящены оценке влияния гипербилирубинемии на биохимические тесты, что же касается рутинных и специализированных коагулологических тестов, то таких работ немного. Первое исследование, посвященное этой проблеме, было опубликовано Roß и Paar в 1998 г. (анализатор MDA 180, BioMerieux). Оценивая результаты измерения нормальной плазмы после введения в нее неконъюгированного билирубина, авторы пришли к выводу, что он практически не влиял на активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), тогда как значительное укорочение протромбинового времени (ПВ) и удлинение тромбинового времени (ТВ) наблюдались при концентрациях билирубина >250 мкмоль/л. Аналитически значимое повышение концентрации фибриногена и снижение таковой антитромбина III (АТIII) отмечалось при концентрациях билирубина 375 и 25 мкмоль/л соответственно.

Quehenberger и соавт. (1999) сравнивали результаты измерения иктеричных проб (концентрации билирубина от 46 до 925 мкмоль/л), полученные на оптическом приборе СА-6000, с таковыми, полученными на анализаторе с механическим способом детекции сгустка (STA, Diagnostica

Stago). Авторы показали, что корреляция между инструментами была удовлетворительной для всех тестов ($\geq 0,97$), за исключением ТВ (0,641). Другая группа авторов (A. Appert-Flory et al., 2007; F. Fischer et al., 2006) тестировала желтушные образцы на длине волны 671 нм (оптические анализаторы ACL TOP и Sysmex CA-7000) и обнаружила, что результаты клоттинговых, хромогенных и иммунохимических методик были сопоставимы с таковыми, полученными на механическом приборе STA, Diagnostica Stago. В работе Tantanate и соавт. (2011), исследовавших плазму пациентов с нормальными значениями ПВ, АЧТВ и фибриногена до и после введения в образец избытка билирубина с использованием длины волны 660 нм (Sysmex CS-2100i), не было обнаружено интерференции вплоть до концентрации билирубина 240 мкмоль/л. Согласно данным приведенных исследований, можно сделать вывод о том, что гипербилирубинемия не представляет значимой аналитической проблемы при использовании современных анализаторов гемостаза, имеющих отсекающую длину волны для работы с иктеричными образцами.

О липемии образца говорят при обнаружении мутности плазмы различной степени выраженности — от легкой опалесценции до абсолютно непрозрачного молочно-белого состояния. Чаше всего мутность образца связана с присутствием избытка триглицеридов (ТГ; как правило, >5,65 ммоль/л). Механизмы появления гиперлипидемии различны. Она может быть связана с физиологическим состоянием (постпрандиальный метаболизм), ятрогенными причинами (внутривенное введение жировых эмульсий, лечение ингибиторами протеаз, препаратами стероидов) либо метаболическими расстройствами при различных заболеваниях, таких как сахарный диабет, алкогольная болезнь, нарушение функции почек, острый панкреатит, миелома, заболевания щитовидной железы, первичный билиарный цирроз, системная красная волчанка.

Эффект аналитической интерференции, вызываемой липемией, в корне отличается от влияния гемолиза и иктеричности. Липемия создает в оптической системе помехи путем рассеяния и отражения света, тем самым нарушая прохождение его через реакционную смесь. Степень рассеяния зависит от количества, размера и показателя преломления взвешенных липидных частиц. Более крупные липидные структуры, такие как хиломикроны и липопротеины очень низкой плотности, вызывают большее светорассеяние. В зависимости от вида и концентрации различных фракций липидов интерференция может быть положительной или отрицательной. При сильной мутности образца никакие измерения невозможны в силу ограниченной линейности фотометров. В некоторых современных оптических коагулометрах применяется методика предварительной оценки абсорбции пробы, и если этот показатель превышает заданный порог, анализатор выдает сообщение о невозможности проведения анализа в связи с высокой вероятностью

получения некорректного результата. Анализаторы с механическим способом регистрации сгустка, по понятным причинам, менее подвержены этому типу интерференции. Еще одной причиной получения некорректных результатов в липемичных образцах является так называемый эффект дегидратации, или замещения разбавителя, — вытеснение жидкой части плазмы из анализируемого объема. Это связано с тем, что большинство определяемых веществ (аналитов) растворены в водной фазе плазмы крови. Эффект гиперлипидемии реализуется в снижении концентрации аналита, поскольку объем, занимаемый липопротеинами в плазме, включается в расчет. Непосредственное участие липидных частиц в процессах свертывания крови также в ряде случаев является источником биологической интерференции.

Roß и Paar (1998) впервые сделали попытку оценить влияние липемии на результаты нескольких коагулологических тестов при использовании оптического анализатора. Авторы отметили отсутствие достоверного отклонения результатов ПВ и АЧТВ при концентрациях ТГ вплоть до 10,9 ммоль/л, тогда как значимое увеличение ТВ, снижение концентрации фибриногена и повышение АТIII наблюдались уже при концентрации ТГ 5,5 ммоль/л. В последующей работе Agambagi и соавт. (1998) добавляли в нормальную и патологическую плазму пациентов (которая далее рассматривалась как контроль) различные количества 20% эмульсии соевого масла и оценивали изменение ПВ и АЧТВ с использованием оптического прибора с возможностью предварительной оценки абсорбции (ACL-3000, Instrumentation Laboratory). Во всех образцах с концентрацией ТГ >9,79 ммоль/л проведение анализа оказалось невозможным из-за превышения порога абсорбции. Далее авторы подвергли исследуемые пробы процедуре экстракции липидов органическими растворителями и тестировали их повторно. Полученные результаты оказались отличными от контрольных: в частности, ПВ было в среднем на 6% ниже, а АЧТВ — на 12% выше по сравнению с контролем. Исследователи пришли к выводу, что использование липидочищающих процедур нецелесообразно в связи полным удалением эндогенных липидов, небольшие количества которых присутствуют в нормальной плазме и участвуют в коагулологических реакциях in vitro.

Quehenberger и соавт. (1999) сравнивали результаты измерения липемичных образцов с концентрацией ТГ от 2,42 до 18,7 ммоль/л на инструментах с оптическим (Sysmex CA-6000) и механическим (STA) способом регистрации сгустка. Величина линейной корреляции для ПВ, АЧТВ, ТВ, фибриногена и АТIII составила 0,907, 0,988, 0,288, 0,961 и 0,902 соответственно, что продемонстрировало серьезные проблемы при определении на оптическом анализаторе лишь ТВ. Dom-Beineke и соавт. (2005), анализируя липемичные пробы на коагулометре Sysmex CA-7000, отметили отрицательное смещение вплоть до некорректных результатов для ПВ при концентрации ТГ >13,5 ммоль/л и положительное

смещение вплоть до некорректных результатов для фибриногена в образцах с содержанием ТГ >3,51 ммоль/л. Результаты АЧТВ в этом исследовании были аналитически достоверны при концентрации ТГ до 18,5 ммоль/л. В недавней работе Tantanate и соавт. (2011) показали незначительную тенденцию к увеличению ПВ и снижению АЧТВ и фибриногена после добавления 20% раствора соевого масла в плазму пациентов с известными значениями указанных показателей (оптический коагулометр Sysmex CS-2100i). Авторы еще одной публикации (G. Lipri et al., 2009) сравнивали результаты основных скрининговых тестов в плазме здоровых доноров натошак, а также через 1, 2 и 4 ч после приема богатого жирами завтрака. Клинически значимое смещение было отмечено только для АЧТВ.

Таким образом, большинство исследований демонстрируют, что интерференция гипербилирубинемии в коагулологии носит почти исключительно аналитический характер — она связана с перекрыванием учетной длины волны и может быть устранена использованием отсекающей длины волны. Результаты скрининговых коагулологических тестов, полученные на современных коагулометрах, клинически надежны вплоть до концентрации билирубина 340 мкмоль/л. Влияние гиперлипидемии имеет более сложный механизм из-за присутствия источников как аналитических, так и биологических помех. Наиболее существенной является оптическая интерференция, преодолеть которую можно использованием механического способа детекции сгустка. В оптических инструментах измерение начальной абсорбции пробы позволяет предотвратить получение и выдачу врачу недостоверных результатов. В некоторых ситуациях допустимо дополнительное разведение образца, но только для тех исследований, где это предусмотрено методически: определения фибриногена по Клауссу, некоторых факторов свертывания и проч., однако такой подход не применим для скрининговых тестов (ПВ, АЧТВ, ТВ).

В документе EP7-A2 (2005) Институт стандартизации клинических лабораторных исследований (Clinical and Laboratory Standards Institute) рекомендует биохимическим лабораториям использовать процедуру ультрацентрифугирования высоколипемичной плазмы, однако такой подход требует дополнительного времени и оборудования, что существенно ограничивает его применение в повседневной рутинной практике. Для коагулологических тестов эта рекомендация остается спорной в связи с возможным осаждением из плазмы таких высокомолекулярных белков, как фибриноген, комплекс фактор VIII / фактор Виллебранда и др. Экстракция липидов с помощью органических растворителей также не всегда позволяет адекватно избавиться от интерференции, так как создает недостаток липидов, необходимых для протекания некоторых реакций. Усовершенствование лабораторного оборудования, методик и технологий позволяет в ряде ситуаций избежать ошибок, связанных с липемией, но в целом высоколипемичные образцы по-прежнему представляют серьезную проблему в коагулологии в частности и в клинической лабораторной медицине в целом.

Как справедливо заметил однажды российский профессор В.Л. Эммануэль, иногда лучше не делать анализ вообще, чем сделать его неправильно.

Подготовила **Александра Яковец**