

Наиболее распространенные ошибки в клинической биохимии

Довольно часто приходится сталкиваться с ситуациями, когда в ЛПУ переходят с одного метода определения конкретного анализата на другой, например с метода определения белка в моче с сульфосалициловой кислотой на метод с пирогаллоловым красным. При этом возникает вопрос о нормальных значениях данных показателей для интерпретации получаемых лабораторией результатов обследования пациентов. В таких случаях необходимо учитывать два основных условия, обеспечивающих корректную работу КДЛ. Во-первых, используемые контрольные сыворотки и калибраторы (стандарты) должны быть обязательно аттестованы именно тем методом, который в данный момент применяет лаборатория, во-вторых, недопустимо сравнивать результаты определения одного и того же анализата разными методами у одного пациента, и уж тем более недопустимо ведение терапии пациента при последовательном применении различных методов для определения одного и того же анализата.

Неоднократно нашим специалистам задавался вопрос о различиях в содержании глюкозы в цельной крови и в сыворотке (плазме) крови. В цельной крови уровень глюкозы составляет ~ 90% от содержания в сыворотке (плазме) крови. Серьезной методической ошибкой при определении глюкозы в сыворотке (плазме) является недостаточно быстрое отделение сыворотки (плазмы) от клеток крови, что 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. Также, при использовании жидких антикоагулянтов, например 3,8% раствора цитрата натрия, который обычно используется в соотношении цитрат-кровь – 1:9, следует учитывать разведение антикоагулянтом образца. То есть в вышеприведенном примере результат необходимо разделить на 0,9. При сложении всех вышеперечисленных факторов потери могут составлять до 30-40% от реального уровня глюкозы в крови. Следовательно, пациент с реальными 9 ммоль/л натощак (диабет) покажет результат 5,4 ммоль/л, и будет отнесен к вполне здоровым людям.

В последнее время широкое распространение получили глюкометры, и часто стал возникать вопрос о соответствии результатов анализов полученных с помощью глюкометра с результатами стандартных лабораторных методов. Ответ один – сравните на одних и тех же образцах такие результаты и введите, если это потребуется, поправочный коэффициент. И не забывайте периодически повторять эту процедуру.

Часто задается вопрос о возрастных нормах для самых различных анализатов. Вопрос сложный, поскольку ответ на него сильно зависит от географии (образ жизни, приоритеты питания и т.д.) и национального состава (генетика). Но о некоторых вещах хотелось бы сказать. Если вы определяете уровень глюкозы у пациента в возрасте 55-60 лет и выше, то верхняя граница нормы совсем не 5,5 ммоль/л, а 6,5-6,6 ммоль/л. Аналогичное заблуждение широко распространено в отношении уровня холестерина. Верхняя граница нормы после 50 лет и у мужчин, и у женщин находится в районе 7,2 ммоль/л (280 мг/100 мл), а вовсе не 6,5 ммоль/л (250 мг/100 мл). Для окончательного решения этого вопроса для себя лучше всего пользоваться рекомендациями МинЗдрава РФ и собственными многолетними наблюдениями.

При использовании биохимических автоанализаторов для калибровки прибора иногда используют контрольные сыворотки вместо мультикалибраторов в силу дороговизны последних. При этом в прибор вводится среднее значение (Target) контрольной сыворотки по каждому анализату. Это совершенно недопустимо, так как ошибка калибровки прибора по основной массе анализатов в данном случае может достигать 15-20%.

При использовании мультикалибраторов для настройки автоанализаторов довольно часто отмечается следующая ситуация: при первой настройке в прибор вводятся паспортные данные мультикалибратора определенной серии (лота, Lot No). Пока все правильно. Однако с течением времени мультикалибратор расходуется и наступает момент, когда лаборатория закупает следующую партию мультикабратора – тот же производитель, тот же номер по каталогу, но другая серия. В этом случае необходимо перепрограммировать прибор в соответствии с паспортом мультикалибратора новой серии. Если этого не сделано (а именно о такой ситуации идет речь) прибор будет работать неправильно и полученные результаты будут некорректными.

При работе с автоанализаторами иногда возникает следующая ситуация: по какому-то из определяемых аналитов прибор начинает показывать нулевые значения, из чего делается вывод о неработоспособности набора реагентов. При этом на вопрос, проверяли ли Вы работу набора реагентов на другом оборудовании (полуавтомат, ФЭК), или хотя бы смотрели ли на глаз, развивается ли окраска в пробирке при смешивании рабочего реагента и контрольной сыворотки или исследуемого образца, часто следует ответ «нет». Если окраска не развивается, либо не работает набор реагентов, либо допущена ошибка при приготовлении рабочего реагента (например в буфер забыли добавить раствор ферментов). Если окраска развивается в пробирке, а автоанализатор все равно дает нули, то проблема в анализаторе. Если, при условии правильного приготовления рабочего реагента, окраска не развивается в пробирке – не работает набор. Наиболее сложна диагностика причины возникновения таких «неприятностей» при длине волны 340 нм, так как при данной длине волны визуально видимой окраски не развивается (кинетические набора для АЛТ, АСТ, гексокиназная глюкоза). В этом случае возможна диагностика ситуации только с применением другого оборудования (например ФЭКа).

Одной из наиболее распространенных методических ошибок является полное или частичное игнорирование постановки контроля на реактивы для пробы (так называемый «контроль цветности пробы») в таких методах как трансаминазы по Райтману-Френкелю, общий и прямой билирубин (независимо от используемого в наборе метода), щелочная фосфатаза по «конечной точке». Особенно часто эта ошибка распространена при работе на автоанализаторах при исследовании концентрации общего и прямого билирубина. В вышеперечисленных методах постановка контроля на реактивы для пробы совершенно необходима для каждого исследуемого образца. В противном случае получение ложноположительных результатов неизбежно. В контексте обсуждения данного вопроса, позвольте обратить Ваше внимание на создание на фирме «ООО НПФ АБРИС+» наборов реагентов для определения общего и прямого билирубина, при постановке которых необходимость в контроле реактивов для пробы отсутствует. Данные наборы выгодно отличает малое время анализа (не более 6 минут для общего билирубина и 4 минут для прямого билирубина) и отсутствие каких-либо ограничений при постановке данных методик на автоанализаторах.

Во многих лабораториях для дезинфекции фотометрических кювет и многоцветных пробирок применяются различные растворы, содержащие перекись водорода. Недостаточно тщательное ополаскивание после применения таких растворов приводит к получению ложнозавышенных результатов при проведении методик основанных на пероксидазной реакции (метод Триндера). В их число входят наборы, предназначенные для определения концентрации общего холестерина, ЛПВП-холестерина, ЛПНП-холестерина, триглицеридов, глюкозооксидазный метод определения глюкозы, мочевой кислоты, молочной кислоты. При подготовке к выполнению данных методик необходимо быть уверенным в чистоте кювет и пробирок от остатков перекиси водорода. Пробирки, особенно пластиковые, лучше вообще использовать одноразовые, не моя их для повторного использования. Это, к сожалению, весьма распространенная практика, а пластик (в отличие от стекла) имеет довольно высокую пористость, и отмыть его от дезинфицирующего или моющего раствора полностью практически невозможно.

Распространенной ошибкой является определение глюкозы в моче глюкозооксидазным методом. Дело в том, что кетоновые тела и ацетоновые тела, содержащиеся в моче при ряде патологий, попав в реакционную смесь глюкозооксидазного метода, дают красную окраску. В

итоге в моче определяется не содержание глюкозы, а сумма кетоновых тел, ацетоновых тел и глюкозы. Для определения глюкозы в моче следует использовать референтный гексокиназный метод. Да, он дороже, но им определяется только глюкоза.

По наборам с уреазно-фенолгипохлоритным методом довольно часто встречаются рекламации о потемнении фенол-нитропруссидного реагента. Причиной потемнения является фотолиз. В инструкции написано – хранить в темноте. В практике часто это выглядит так – утром достали флакон с этим реагентом из коробки, поставили на стол, и до конца рабочего дня, когда лаборант убирает рабочее место, реагент стоит на свету. После двух-трех таких сессий реагент можно выкидывать. Достали из темноты, внесли в пробирки и сразу убрали в темноту, и не будет никаких проблем.

Аналогичная ситуация наблюдается при использовании кинетических методов для определения трансаминаз. Рабочий реагент стабилен до 14 суток при непрерывном хранении в холодильнике. Если он 6-8 часов стоял на рабочем столе, то через два дня он выйдет из строя. Рекомендации те же, сразу после использования убрать рабочий реагент в холодильник.

При определении активности ЛДГ наиболее часто встречаются следующие ошибки:

- рабочий реагент стабилен не более одного рабочего дня в холодильнике: если он весь день стоит на столе, то во второй половине дня он уже неработоспособен.

- при определении активности ЛДГ в контрольных сыворотках часто путают метод с использованием пирувата и метод с использованием лактата в качестве субстратов. По выявляемой активности эти методы существенно отличаются друг от друга.

- в состав наборов для кинетического определения трансаминаз входит ЛДГ (в весьма значительных количествах). Если не поменять наконечник автоматической пипетки после работы с этими наборами и «залезть» им в набор для определения ЛДГ – набор можно сразу выкинуть. После работы с любым набором наконечник с пипетки должен быть сразу удален и больше никогда не использоваться (отмыть наконечники невозможно).

Основная ошибка при определении активности щелочной фосфатазы – это непонимание (или незнание) того факта, что активность этого фермента сильно зависит от буфера. Сравнивать между собой данные, полученные на АМР-буфере, ДЭА-буфере или глициновом буфере нельзя ни в исследуемых образцах, ни в контрольных сыворотках.

Кроме того, при использовании метода определения щелочной фосфатазы по «конечной точке» иногда делается вывод о неработоспособности набора на основании того, что лаборант практически не видит развивающейся желтой окраски, особенно в области нормальных значений (и, не измерив пробы на приборе, прекращает анализ). Чувствительность фотоэлемента при длине волны 405 нм существенно превышает чувствительность человеческого глаза. Следует также отметить необходимость обязательной постановки контроля на реактивы для пробы для каждого исследуемого образца. Все вышесказанное относится также к методу определения активности ГГТФ «по конечной точке».

Одной из основных ошибок при анализе трансаминаз по Райтман-Френкель является использование для приготовления рабочего раствора едкого натрия дистиллированной воды, насыщенной углекислым газом. В этом случае часто получают пробы с монотонно высокими оптическими плотностями.

Постановка контроля на реактивы для пробы совершенно необходима для каждого исследуемого образца. Дело в том, что 2,4-динитрофенилгидразон, получаемый как конечный окрашенный продукт данного метода, имеет максимум поглощения в той же области, в которой его имеет сыворотка крови человека. То есть поглощение при 540 нм, измеряемое при постановке реакции по Райтману-Френкелю, представляет собой сумму поглощений 2,4-динитрофенилгидразона (специфическая оптическая плотность) и сыворотки крови данного конкретного пациента (неспецифическая оптическая плотность). И, если на всех пациентов ставится единичный контроль на реактивы для пробы или он не ставится вообще, то полученные результаты будут некорректными.

Каждая партия (серия) наборов для определения трансаминаз по Райтману-Френкелю имеет индивидуальные, не всегда тождественные характеристики по оптической плотности калибратора. Это обусловлено тем, что на данный показатель оказывает влияние достаточно большое количество факторов (микропримеси в рабочем растворе щелочи, партия 2,4-динитро-фенилгидразина и т.д.). При ежедневной постановке калибратора все эти влияния становятся несущественными. А вот постановка калибровочной кривой (один раз в месяц или

раз в год) совершенно недопустима в связи с вышеизложенным, что, кстати, отмечается и в рекомендациях МинЗдрава РФ.

Иногда приходится сталкиваться с тем, что при использовании наборов для кинетического анализа активности ферментов в ЛПУ произвольно, по собственному усмотрению или по сторонним некомпетентным рекомендациям, меняют величину фактора, который вводится в прибор для окончательного расчета активности фермента. Обычно это происходит в случае недовыявления в мультикалибраторах или контрольных сыворотках паспортных значений и имеет своей целью скорректировать это недовыявление. Но эта ситуация (недовыявление) определяется либо неработоспособностью набора реагентов, либо плохим качеством контрольных материалов. И произвольная коррекция фактора обеспечит Вам в 100 случаях из 100 получение некорректных результатов.

Основные ошибки при определении активности амилазы:

Основной, причем грубейшей, ошибкой при определении активности альфа-амилазы является загрязнение исследуемых проб и реагентикулы амилазой слюны. Работать можно только в маске (ватно-марлевой повязке).

Одной из часто встречающихся ошибок при определении амилазы по Каравею является сравнение между собой результатов полученных с использованием наборов реагентов различных производителей – они никогда не будут идентичны. Вся проблема заключается в том, что крахмал по Литнер никогда не бывает единообразным от партии к партии даже в руках одного и того же лаборанта. Поэтому следует выбрать конкретного поставщика и все равно помнить, что метод по Каравею является полуколичественным.

При проведении ферментативного анализа мочевины (уреазно-глутаматдегидрогеназный метод) и креатинина (креатининиминогидролазный-глутаматдегидрогеназный метод) основным источником ошибок является загрязнение атмосферы рабочего помещения аммиаком. Дело в том, что в обоих случаях конечным продуктом гидролиза определяемых аналитов является аммиак, количество которого и определяется в глутаматдегидро-геназной реакции. А так как количество определяемого в кювете аммиака составляет 10^{-12} - 10^{-15} моль, то даже незначительное загрязнение аммиаком атмосферы приводит к получению ложнозавышенных результатов.

Основные ошибки при определении концентрации ионов железа и ОЖСС.

- загрязнение многоразовой посуды ионами железа, в частности при ополаскивании посуды водой из «железных» дистилляторов типа ОП-2, ОП-10. Как следствие – получение ложнозавышенных результатов;

- использование в анализе вместо сыворотки цитратной, оксалатной или ЭДТА-плазмы крови. Данные антикоагулянты взаимодействуют с ионами железа и способствуют занижению полученных данных.

- отдельно для ОЖСС – загрязнение супернатанта осадком основного карбоната магния (в итоге получение ложнозавышенных результатов).

Кальций и магний.

- использование в анализе вместо сыворотки цитратной, оксалатной или ЭДТА-плазмы крови. Данные антикоагулянты взаимодействуют с ионами щелочноземельных металлов, что в итоге способствует занижению полученных данных.

- плохо вымытая многоразовая посуда. Использовать одноразовую посуду.

Фосфор.

Основной источник ошибок – многоразовая посуда, особенно вымытая с использованием обычных моющих средств (стиральных порошков), которые на 90% состоят из технического тринатрий фосфата. Использовать одноразовую посуду.

Калий.

Нестрогое соблюдение времени инкубации при анализе на полуавтоматах – ошибка даже на 10 секунд в любую сторону исключает корректное получение результатов анализа. Это замечание касается не только анализа калия тетрафенилборатным методом, но и всех псевдокинетических и турбидиметрических методов.

Попов Ю.Г.
ООО НПФ «АБРИС+»