

Исследование билирубина у взрослых пациентов методом прямого фотометрирования на анализаторе Билимет К.

Милютин И.А.⁽¹⁾, Ованесов Е.Н.⁽²⁾, Овчинников И.М.⁽²⁾, Губайдуллин Б.Х..⁽¹⁾

1. ФГУ «5 Центральная поликлиника Минобороны России» г. Москва
2. ЗАО НПП «ТЕХНОМЕДИКА», г. Москва

Измерение общего билирубина в клинической практике является необходимым компонентом при проведении биохимических исследований почти у каждого больного. Основным методом определения концентрации билирубина в крови в лабораториях страны является метод Йендрашека/1/ или его модификации, требующей достаточного количества времени, персонала, подготовленного для выполнения ручной работы или работы на биохимическом анализаторе. Этот метод многие годы использует в ежедневной практике сотрудники лабораторного отделения ФГУ «5 Центральная поликлиника Минобороны России» г. Москва.

Наряду с диазометодами определения билирубина существуют ряд безреагентных спектрометрических методов определения билирубина, основанных на поглощении синезеленого света билирубином /2/, применяемые, в основном, в педиатрии, что даёт точное и простое определение концентрации билирубина при минимальном объеме пробы (несколько десятков микролитров).

НПП Техномедика в настоящее время выпускает бихроматический безреагентный билирубинометр Билимет К. Аналогом фотометрической кюветы является прецизионный стеклянный капилляр. Объем пробы плазмы или сыворотки составляет около 30 мкл. Так как основным интерферирующим агентом в крови новорожденных является гемоглобин, то для компенсации его влияния на определение концентрации билирубина производится измерение и вычитание оптической плотности пробы на двух длинах волн. На предприятии Техномедика анализатор Билимет калибруется билирубиновым калибратором С-20 производства фирмы Beckman не требует дополнительной перекалибровки в клинической лаборатории. Перед каждым измерением пробы анализатор контролирует параметры спектрофотометрического тракта и при необходимости автоматически их корректирует. Процесс измерения не требует дозирования и занимает (не включая времени для центрифугирования) несколько секунд. Проверка прибора в детской клинике имени Н.В.Филатова показала высокую точность определения билирубина у новорожденных, не уступающую биохимическим анализаторам /3/.

Референтный интервал общего билирубина для взрослых составляет 3.4– 17.1 мкмоль/л, что на порядок уже, чем референтный интервал для новорожденных. К тому же в крови взрослых пациентов могут присутствовать окрашенные вещества, влияющие на определение билирубина спектрофотометрическими методами. Влияние наиболее распространенных в крови веществ, изменяющих либо окраску, либо прозрачность пробы на определение билирубина спектрофотометрическими методами исследовалось в работе /2/

Наибольшее влияние на результат определения билирубина оказывают: гемоглобин, лепемия, каротиноиды, метальбумин.

В Таб. 1 представлены результаты (из /2/) для трех спектрофотометрических методов определения общего билирубина с разведением пробы в боратном буфере, кофеиновом реагенте и смеси боратного буфера и кофеинового реагента.

Таб. 1

| Interferent | Apparent bilirubin, $\mu\text{mol/L}$ (and % change) | | |
|--|--|--------------|--------------|
| | BOR method | CAF method | B-C method |
| Hemoglobin, g/L | | | |
| 0 | 142 (0) | 140 (0) | 141 (0) |
| 1.0 | 144 (1.4) | 140 (0) | 142 (0.7) |
| 2.0 | 143 (0.7) | 137.5 (-1.8) | 140.5 (0) |
| 3.0 | 140 (-1.4) | 138 (-1.4) | 138.5 (-1.8) |
| 4.0 | 139.5 (-1.8) | 138.5 (-1.1) | 139 (-1.4) |
| 5.0 | 140.5 (-1.1) | 138.5 (-1.1) | 139.5 (-1.1) |
| Turbidity, absorbance units at 465 nm | | | |
| 0 | 141.5 (0) | 140 (0) | 141 (0) |
| 1.22 | 145 (2.5) | 144 (2.9) | 145 (2.8) |
| 2.44 | 149.5 (5.7) | 142.5 (1.8) | 147 (4.3) |
| 3.66 | 157.5 (11.3) | 147 (5.0) | 153 (8.5) |
| 4.88 | 161.5 (14.1) | 153 (9.3) | 157.5 (11.7) |
| 6.08 | 169.5 (19.8) | 157 (12.1) | 163 (15.6) |
| Carotene, $\mu\text{mol/L}$ | | | |
| 0 | 97 (0) | 103 (0) | 100 (0) |
| 2.4 | 101 (4.1) | 104 (1.0) | 102 (2.0) |
| 4.7 | 103 (6.2) | 106.5 (3.4) | 104.5 (4.5) |
| 7.1 | 105 (8.2) | 108.5 (5.3) | 106.5 (6.5) |
| 9.5 | 107.5 (10.8) | 111.5 (8.3) | 109 (9.0) |
| 11.9 | 109.5 (12.9) | 115.5 (12.1) | 113 (13.0) |
| Methalbumin, $\mu\text{mol/L}$ | | | |
| 0 | 140 (0) | 141 (0) | 141 (0) |
| 50 | 142 (1.4) | 143.5 (1.8) | 144 (2.1) |
| 100 | 145 (3.6) | 150.5 (6.7) | 150 (6.4) |
| 150 | 149 (6.4) | 160.5 (13.8) | 159.5 (13.1) |
| 200 | 155 (10.7) | 170 (20.6) | 168.5 (19.5) |
| 250 | 161 (15.0) | 179.5 (27.3) | 176.5 (25.2) |

Как видно из таблицы 1. влияние интерферирующих компонентов крови, за исключением гемоглобина, потенциально может быть достаточно сильным. Кроме гемоглобина все интерферирующие вещества дают положительное смещение результата, поэтому они не изменяют чувствительность безреагентного метода определения билирубина, а лишь уменьшают его специфичность. Реальное же влияние будет определяться реализуемой на практике концентрацией интерферирующих веществ.

Для оценки пригодности безреагентного метода в клинической практике у взрослого контингента пациентов были проведены сравнительные исследования общепринятого биохимического метода и метода прямого фотометрирования сыворотки крови в условиях медицинского лечебного учреждения широкого профиля - ФГУ «5 Центральная поли-

клиника Минобороны России» г. Москва с контингентом пациентов, страдающим многими заболеваниями, в основном, людьми пожилого и старческого возраста.

В лабораторном отделении поликлиники проведено около 400 пар измерений общего билирубина в сыворотках больных методом прямого бихроматического фотометрирования и биохимическим методом. Биохимические исследования производились методом Йендрашека-Грофа на полуавтоматическом анализаторе Riele Photometer 5010. Использовался реагент «Билирубин Общий LIQUID 350» производства Lachema. Результаты биохимических измерений общего билирубина находились в интервале 5-321 мкмоль/л. Графически результаты измерений приведены на Рис. 1. Причем на Рис. 1 а представлены результаты в диапазоне близком референтному интервалу, а на Рис. 2 б приведены результаты обработки всех измерений, диапазон концентраций захватывает широкий интервал 0-321 мкмоль/л, характерный скорее для неонатологии.

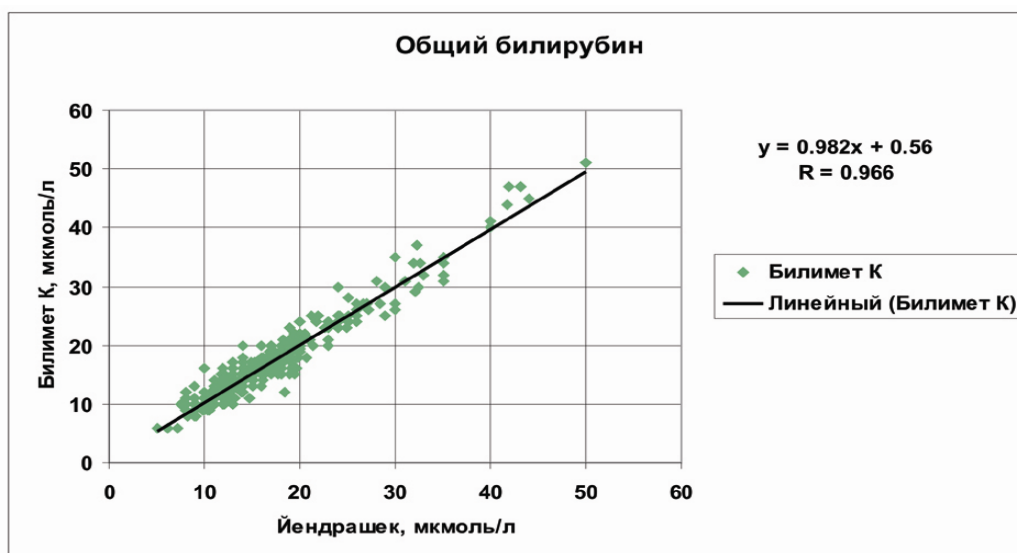


Рис. 1 а. Результаты исследований в диапазоне концентрации билирубина 0-60 мкмоль/л.

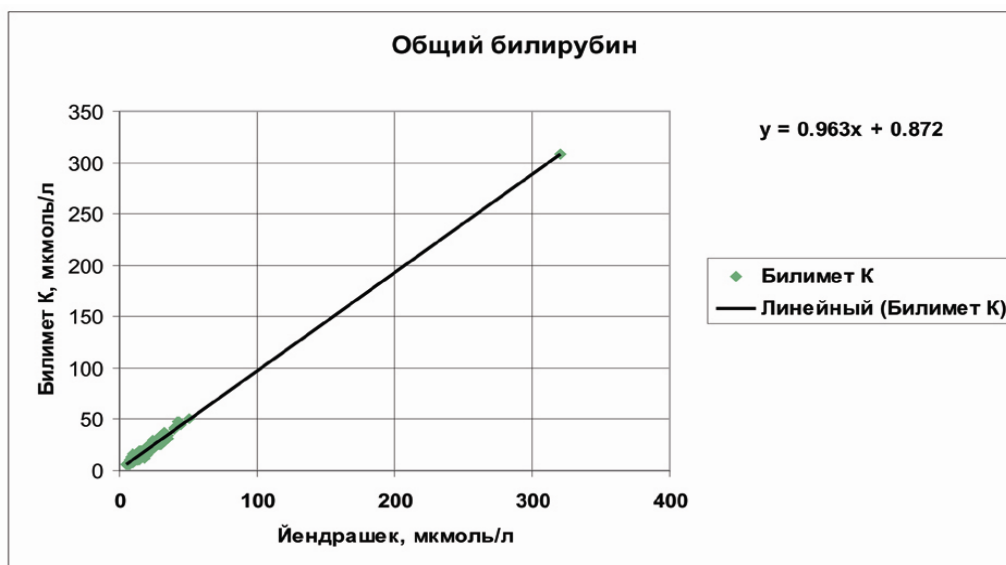


Рис. 1 б. Результаты исследований в широком диапазоне концентраций билирубина.

На верхнем пределе около 300 мкмоль/л была получено только одна пара результатов определения билирубина, что связано с редким появлением в поликлинике больных с тяжёлой печеночной патологией, но и этот проведённый опыт подтвердил соответствие результатов обоих методов исследования, малое количество очень высоких концентраций билирубина объясняет представленную на Рис. 1б только регрессионную формулу. Результаты линейной регрессии, включающие определение случайной и систематической ошибки для узкого (до 60 мкмоль/л) диапазона измерений представлены в Таб.2. Сравнение результатов регрессии в узком и широком диапазоне показало высокую линейность определения общего билирубина анализатором Билимет К в диапазоне 0-300 мкмоль/л, наклон регрессионной прямой составил 0.96-0.98.

Таб. 2

| <i>Регрессионная статистика сравнительных испытаний в диапазоне 0-60 мкмоль/л</i> | |
|---|---------------|
| Множественный R | 0.97 |
| Стандартное отклонение – δ (воспроизводимость) | 1.70 мкмоль/л |
| Смещение (правильность) | 0.61 мкмоль/л |
| Наблюдения | 390 |

Как видно из Рис.1а случайное отклонение результатов измерений от линии регрессии довольно однородно распределено во всем интервале значений общего билирубина 0-60 км/л. Произведем оценку воспроизводимости результатов измерений Билимет К по результатам линейной регрессии (Таб. 2). Пренебрежем влиянием точности измерений анализатора Riele. Как видно из Таб. 2, смещение линии регрессии, т. е. правильность безреагентного метода значительно меньше стандартной ошибки, т.е. воспроизводимости. В этом случае для оценки полной ошибки измерений, т.е. 95% доверительного интервала полной ошибки, можно воспользоваться формулой $TE(\text{полная ошибка}) = 1.96 * \delta$. Тогда $TE = \pm 3.35$ мкмоль/л, эта величина значительно меньше допуссаемого CLIA (Таб.3) /4/ значения TE установленного для определения общего билирубина (0.4 мг/дл = 6.8 мкмоль/л). Полученная оценка дает основание сделать вывод- в реальности количество веществ в крови, влияющих на точность определения билирубина, обычно мало, и безреагентный метод может применяться для определения общего билирубина у взрослых в подавляющем большинстве случаев.

| Source | Type | ALT | AST | ALP | GGT | Albumin | Bilirubin |
|---|----------------------|----------------------|---------|---------|----------|----------|----------------------|
| Performance specifications | | | | | | | |
| CLIA | Mandate | TE ^a = 20 | TE = 20 | TE = 30 | | TE = 10 | TE = 20 or 0.4 mg/dL |
| European (5) | Biological variation | I = 13.6 | I = 7.2 | I = 3.4 | NS | I = 1.4 | I = 11.3 |
| | | B = 13.6 | B = 6.2 | B = 6.4 | | B = 1.1 | B = 9.8 |
| | | TE = 36 | TE = 18 | TE = 12 | | TE = 3.4 | TE = 28 |
| Ricos et al. (215) | Biological variation | I = 12.2 | I = 6.0 | I = 3.2 | I = 6.9 | I = 1.6 | I = 12.8 |
| | | B = 12.2 | B = 5.4 | B = 6.4 | B = 10.8 | B = 1.3 | B = 10 |
| | | TE = 32 | TE = 15 | TE = 12 | TE = 22 | TE = 3.9 | TE = 31 |
| Skendzel et al. (35) | Clinician opinion | NS | TE = 26 | NS | NS | NS | TE = 23 |
| Within-laboratory imprecision, % | | | | | | | |
| Lott et al. (13) | Proficiency tests | 8 | 9 | 5 | 6 | NS | NS |
| Ross et al. (216) | Proficiency tests | NS | NS | NS | NS | 4.4 | 8.9 |

^a TE, total error; I, imprecision or degree of reproducibility; B, bias or difference from correct result; NS, not specified.

Таб. 3

Методика определения общего билирубина в сыворотке для взрослых такая же, как и при определении билирубина в плазме для новорожденных. Но для измерений сыворотки можно применять негепаринизированные капилляры, это снижает стоимость теста в два раза. Для проведения измерения:

1. нажатием левой кнопки на лицевой панели анализатора выдвигаем каретку.
2. устанавливаем капилляр с сывороткой в специальное углубление каретки
3. нажатием левой кнопки на лицевой панели анализатора задвигаем каретку с капилляром и считываем результат измерений в мкмоль/л с табло анализатора

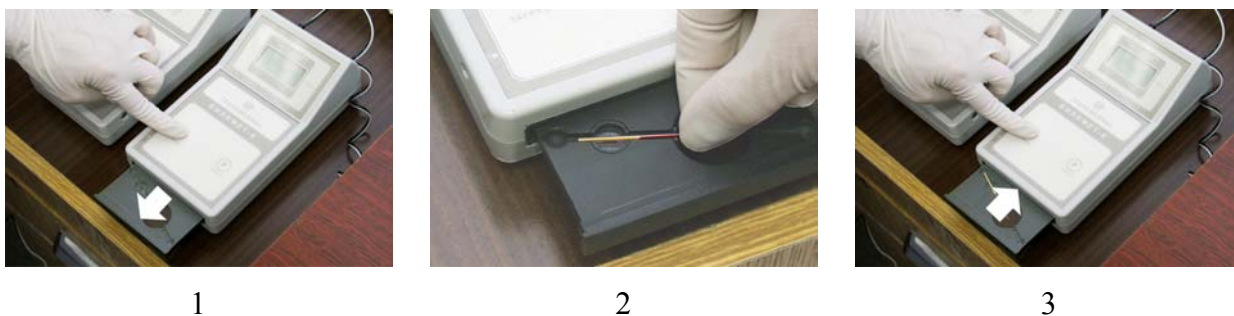


Рис. 2. Методика измерения билирубина в сыворотке

Заключение:

- для небольших лабораторий с ограниченным штатом безреагентный анализатор билирубина Билимет К может быть использован для очень экономичного определения общего билирубина у взрослых пациентов;
- положительным свойством прибора является отсутствие калибровки;
- отмечается высокая точность получаемых результатов в достаточно широком интервале концентраций билирубина;

- время определения концентрации билирубина сокращается на порядок по сравнению с применяемым в лаборатории методом;
- измерения могут проводиться медицинским персоналом средней квалификации (обучение работе на нём занимает несколько минут), возможно и в полевых условиях, в том числе на вспышках гепатита;
- За время проведения эксперимента прибор показал высокую надежность.

Список литературы

1. Analytic Methods for Bilirubin in Blood Plasma, Watson D., Clin. Chem., v.7, pp 603-625, 1961
2. Three Direct Spectrophotometric Methods for Determination of Total Bilirubin in Neonatal and Adult Serum, Adapted to the Technicon RA-1000 Analyzer, Stephen P. Harrison and Ian M. Barlow
3. Безреагентная билирубинометрия- альтернатива биохимическим методам контроля желтухи новорожденных в условия роддомов и других медицинских учреждений. Лагутина Н. К., Ованесов Е. Н., Овчинников И. М., Павлушкина Л. В., Лаборатория 6, 2007
4. Diagnosis and Monitoring of Hepatic Injury. I. Performance Characteristics of Laboratory Tests, D. Robert Dufour, John A. Lott, Frederick S. Nolte, David R. Gretch, D. Raymond S. Koff, and Leonard B. Seeff, *Clinical Chemistry* 46:12, 2027–2049 (2000)