

Безреагентная билирубинометрия - альтернатива биохимическим методам контроля желтухи новорожденных в условия роддомов и других медицинских учреждений.

Лагутина Н. К.¹, Ованесов Е. Н.², Овчинников И. М.², Павлушкина Л. В.¹.

¹Московская Детская городская клиническая больница № 13 им. Н.Ф.Филатова

²ЗАО НПП «ТЕХНОМЕДИКА», г. Москва

Как известно, желтуха проявляется у большинства новорожденных. Это состояние определяется дисбалансом между количеством продуцируемого билирубина, 80% которого возникает при распаде гемоглобина эритроцитов, и утилизацией билирубина в печени. Внешнее проявление желтухи – желтизна кожных покровов, связанная с накоплением желтого пигмента – билирубина в подкожной жировой клетчатке ребенка. В благоприятных случаях желтизна начинает спадать с конца первой недели и исчезает ко 2-3 неделе жизни. Однако, чрезвычайно редко, развитие желтухи может вызывать сильную неврологическую патологию вплоть до летальных исходов. Возможность, хотя и редких, но очень опасных последствий заставляет производить периодический контроль уровня билирубина (в основном общего). Существует множество факторов, влияющих на токсическое действие билирубина на клетки мозга новорожденного, механизм их сложен и до конца не выяснен. Тем не менее, в ряде стран разработаны протоколы контроля гипербилирубинемии новорожденных, существенно снижающих риск возникновения серьезной патологии нервной системы. Эти протоколы позволяют выявить потенциально опасные для будущего ребенка состояния и определяют критерии для проведения лечебных мероприятий, снижающих уровень билирубина в крови. Наибольшую известность в нашей стране получило Клиническое Практическое Руководство, выработанное подкомитетом по Гипербилирубинемии Американской Академии Педиатрии /2/. Документ опубликован в июле 2004 года. Основу его составляет алгоритм выявления желтухи в первые часы жизни и порядок лечения для новорожденных с гестационным возрастом 35 и более недель. На основе этого алгоритма также принимается решение о выписке новорожденного из родильного учреждения. Одним из безопасных лечебных мероприятий, позволяющих снижать уровень билирубина в крови, с 60^x годов прошлого века используется фототерапия при помощи осветителей сине-зеленого спектрального диапазона. Если же фототерапия не позволяет удерживать уровень билирубина в допустимых протоколами Руководства пределах, зависящих от факторов риска, присущих конкретному младенцу, то назначается процедура заменного переливания крови. Поскольку основным биохимическим параметром, определяющим действия лечащего персонала при диагностике и лечении желтухи новорожденных является общий билирубин, то чем точнее и быстрее выполняется это измерение, тем эффективнее будет процесс лечения.

В настоящее время для определения уровня общего билирубина в плазме или сыворотке применяются разнообразные методы. Большую часть измерений выполняют либо биохимическими методами (в основном с диазокрасителями) /3/, либо методами прямого фотометрирования плазмы с разведением или без разведения. Для определения билирубина методами прямого фотометрирования разработаны специализированные полихроматические полуавтоматические анализаторы. Оба метода - как биохимический, так и прямого фотометрирования - позволяют выполнять измерения с высокой точностью в широком диапазоне концентрации билирубина. Для обеспечения высокой точности определения общего билирубина у новорожденных биохимическими методами требуется выполнение ряда условий, связанных как с широким диапазоном уровня билирубина от (единиц мкмоль/л до сотен мкмоль/л), так и с возможным гемолизом пробы, достигающим нескольких грамм/л. Поскольку повторный забор крови у новорожденных связан с большой задержкой результата, желательно использовать реагенты, допускающие измерение со значительным гемолизом в первой же пробе. Калибровка биохимического анализатора **во всем диапазоне измерений** необходима для обеспечения точности определения при высоком уровне билирубина.

Достоверную оценку уровня билирубина в крови во многих случаях можно получить при помощи транскутанных билирубинометров. Первый отечественный и второй в мировой медицинской практике транскутанный билирубинометр Билитест разработан и производится в НПП «ТЕХНОМЕДИКА». В настоящий момент «ТЕХНОМЕДИКА» производит также неинвазивные черезкожные билирубинометры третьего поколения - Билитест 2000.



Рис. 1. Определение ТБИ при помощи Билитест 2000

По зарубежным данным использование транскутанных билирубинометров позволяет сократить на 60% количество измерений билирубина в крови новорожденных. Однако в некоторых случаях точность оценки билирубина транскутанными анализаторами оказывается недостаточной. Данные транскутанных измерений могут расходиться с измерениями билирубина в крови при проведении фототерапии и заменном переливании крови.

В дополнение к транскутанным анализаторам Билитест, Билитест М и Билитест 2000, НПП «ТЕХНОМЕДИКА» разработало бихроматические безреагентные анализаторы прямого фотометрирования Билимет и современную модель - Билимет К.

При работе на анализаторе Билимет К для определения общего билирубина требуется не более 40 мкл крови младенца и 10 минут времени.

Забор крови производится без дозирования в специальный гепаринизированный капилляр и в этом же капилляре на центрифуге плазма (или сыворотка) отделяется от форменных элементов крови. В этом же капилляре плазма фотометрируется, для этого он помещается в автоматическую выдвигающуюся каретку анализатора. Фотометрирование длится 3-4 секунды и результат в единицах мкмоль/л выводится на дисплей или принтер, который может поставляться, как опция.



1. Забор крови

2. Центрифугирование

3. Измерение

Рис.2. Определение билирубина у новорожденных анализатором Билимет К.

Бихроматический режим измерения в анализаторе Билимет К может скомпенсировать влияние гемолиза на результат определения общего билирубина даже при высоком содержании гемоглобина в фотометрируемой плазме вплоть до нескольких грамм на литр.

Простота работы на приборе позволяет медицинским работникам с минимальной подготовкой быстро освоить этот миниатюрный полуавтоматический анализатор, который не требует калибровки и дозирования пробы и реагентов и всегда готов к измерениям общего билирубина в широком диапазоне концентрации. Анализатор калибруется один раз на предприятии-изготовителе по жидкому билирубиновому калибратору. Перед каждым измерением пробы происходит автоматическая проверка и учет спектральных параметров измерительного тракта. Такой алгоритм работы анализатора обеспечивает неизменность калибровки и высокую воспроизводимость результатов измерений.

В таблице 1 приведены результаты статистической обработки многократного последовательного измерения пробы в капилляре.

Таблица 1.

Статистические параметры 100 измерений пробы	
Среднее значение мкмоль/л	216
Стандартное отклонение мкмоль/л	1.41

Реальная точность измерений ограничена точностью изготовления микрокапилляров и составляет не более 5% измеряемой величины. Верхняя граница диапазона измерений ~ 500 мкмоль/л. Гемолиз пробы до 5 г/л слабо влияет на результат определения билирубина.

Однако в России, как и в других странах, существует проблема сопоставимости результатов определения общего билирубина, выполненными разными методами и на разном оборудовании /4/.

При сравнении результатов, полученных на анализаторе Билимет К и биохимическими методами, некоторые лаборатории обнаруживают значительные различия (чаще при концентрациях выше 200 мкмоль/л), которые трактуются, как «завышение» уровня билирубина анализатором Билимет К. При этом провести объективный анализ лаборатории самостоятельно не могут в силу отсутствия референтного оборудования и реагентов. С целью получения объективной оценки качества определения билирубина на анализаторах Билимет К, в Московской Детской городской клинической больнице № 13 им. Н.Ф.Филатова (главный врач д.м.н. профессор В. В. Попов) было проведено сравнительное тестирование анализатора Билимет К и ряда современных биохимических автоматических анализаторов в реальных условиях детской многопрофильной больницы. Лаборатории Филатовской больницы имеют квалифицированных специалистов и оснащены первоклассным оборудованием. Кроме того, качество исследований контролируется международной программой контроля качества EQAS и российской ФСВОК. Для определения билирубина используются высококачественные реагенты, пригодные для определения общего билирубина, в том числе высоких концентраций и в лизированных пробах.

Для тестирования в качестве одного из биохимических анализаторов использовался автоматический биохимический анализатор Architect C8000 фирмы АBBОТТ, на котором общий билирубин определялся диазореагентом 6L45 с дихлоранилином производства АBBОТТ. Диапазоном линейности составляет от 1.7 до 427.5 мкмоль/л. Потенциальное влияние гемоглобина при концентрации его ниже 10 г/л и интралипидов с концентрацией ниже 5 г/л не превышает большей из величин < 10% или 0.3 мг/дл (5 мкмоль/л). Вторым анализатором-автоматом Roche Hitachi 902 с диазореагентом на общий билирубин Bilirubin DPD Bil-T производства Roche. Диапазон линейности этого реагента 1.71-513 мкмоль/л. В качестве третьего автоматического анализатора сравнения использовался анализатор газов крови ABL 735 производства Radiometer.

Было выполнено 172 измерения общего билирубина на биохимических анализаторах. Из них 90 измерений на анализаторе Architect C8000 в диапазоне 21-494 мкм/л и 82 измерения на анализаторе Hitachi 902 в диапазоне 7-460 мкм/л. На анализаторе ABL 735 было выполнено 50 определений общего билирубина в диапазоне 21-370 мкм/л.

По итогам регрессионного статистического анализа пар результатов измерений на анализаторах Билимет К и биохимических анализаторах составлена таблица 2.

Таблица 2.

Architect C8000 - Билимет К	
Регрессионная формула	$Y=1.022*X+12.8$ (мкм/л)
Множественный R	0.957
Стандартная ошибка	27.9 мкм/л
Наблюдений (пар)	90
Hitachi 902 - Билимет К	
Регрессионная формула	$Y=1.03*X+4.1$ (мкм/л)
Множественный R	0.938
Стандартная ошибка	34.45 (мкм/л)
Наблюдений (пар)	82
ABL 735 - Билимет К	
Регрессионная формула	$Y=0.978*X - 1.3$ (мкм/л)
Множественный R	0.960
Стандартная ошибка	22.8 (мкм/л)
Наблюдений (пар)	50

Графически результаты тестирования представлены на рисунках 3-5.

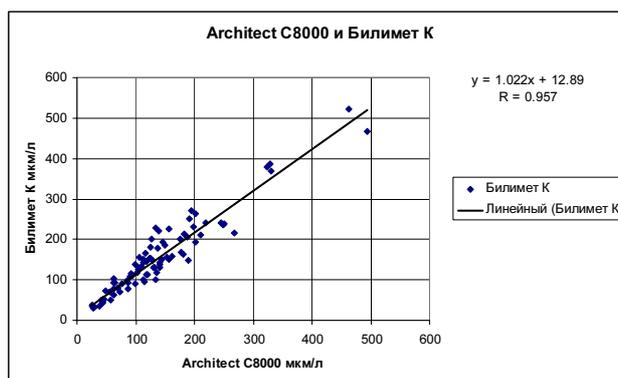


Рис.3. Результат сравнительного тестирования анализаторов Architect 8000 и Билимет К.

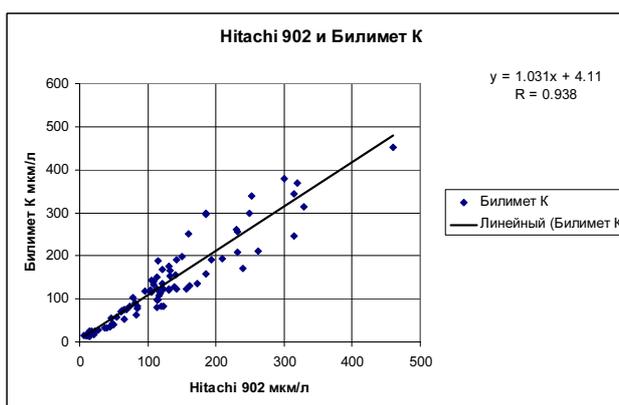


Рис.4. Результат сравнительного тестирования анализаторов Hitachi 902 и Билимет К.

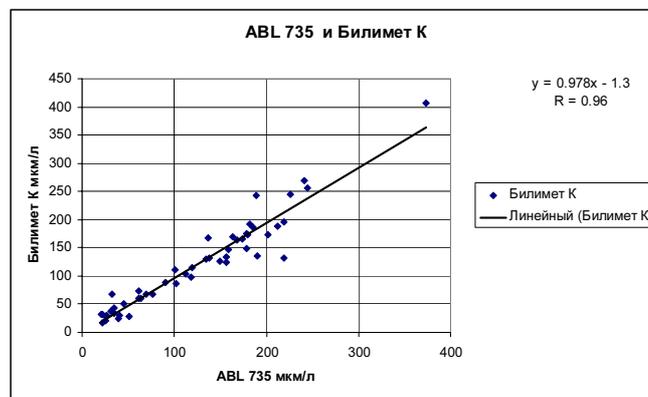


Рис.5. Результат сравнительного тестирования анализаторов ABL 735 и Билимет К.

Для сравнения на рисунке 6 приведены график пар результатов измерений выполненных на биохимическом анализаторе Hitachi 917 и анализаторе газов крови ABL 735 /5/.

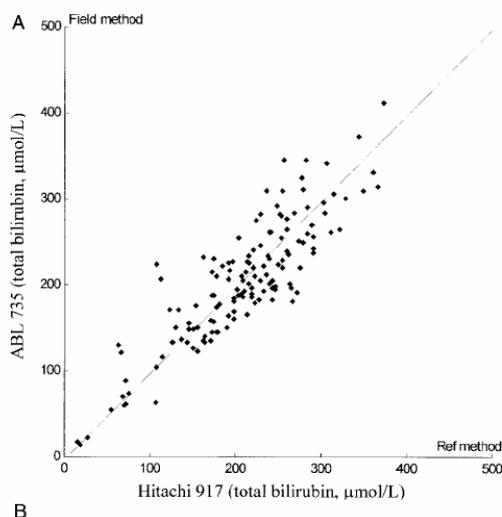


Рис.6. Результат сравнительного тестирования анализаторов ABL 735 и Hitachi 917.

Данные, приведенные в таблице. 2 и в рисунках 3-5, показывают хорошую корреляцию результатов, полученных на автоматических анализаторах разных типов и безреагентном билирубинометре Билимет К. Коэффициент пропорциональности регрессионных зависимостей незначительно отличается от единицы. Анализатор Билимет К линеен в широком диапазоне концентрации общего билирубина (вплоть до 500 мкмоль/л). Отклонение значений от линии регрессии для Билимет К не превышает разброса значений для значительно более дорого и сложного анализатора ABL 735 (рисунок 6).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Проведенное тестирование показало, что результаты определения общего билирубина на анализаторах Билимет К с высокой точностью совпадают с результатами биохимического определения, полученных квалифицированным персоналом на биохимических анализаторах при условии использования реагентов, устойчивых к гемолизу крови в пробе пациента.

В целом, анализаторы Билимет обладают целым рядом достоинств:

- высокой точностью и достоверностью измерения

- небольшим объемом биопробы (30-40 мкл крови)
- простой безреагентной пробоподготовкой
- отсутствием какого-либо дозирования
- отсутствием процедуры калибровки
- коротким временем определения билирубина
- пониженными требованиями к квалификации медицинского персонала.

Эти достоинства позволяют использовать анализаторы Билимет К в качестве альтернативы биохимическим методам контроля желтухи новорожденных в условиях роддомов и других медицинских учреждений, где, в связи с проводимой терапией, необходим мониторинг высоких концентраций билирубина крови новорожденных.

Благодарность.

Авторы выражают благодарность главному врачу Московской Детской городской клинической больницы № 13 им. Н.Ф.Филатова, доктору медицинских наук, профессору Попову В.В. за оказанное содействие при подготовке материалов данной статьи.

Литература:

1. Hyperbilirubinemia and requirements to the determination of the concentration of bilirubin, Anne Skurup. // 2001, feb, skurup@radiometer.dk. Radiometer
2. Management of Hyperbilirubinemia in the Newborn Infant 35 or More Weeks of Gestation Subcommittee on Hyperbilirubinemia // Pediatrics 2004; 114:297-316
3. Investigation into paediatric bilirubin analyses in Australia and New Zealand. LR Watkinson, a ST John, LA Penberthy // J. Clin. Pathol 1982; 35:52-58
Bilirubin Measurement for Nenates: Comparison of 9 Frequently Used Methods. Karina Grohmann, Markus Roser... Pediatrics 2006; 117, 1174-1183
4. Performance of Bilirubin Determinations in Us Laboratories- Revisted. Stanley F.Lo Basil T. Doumas and Edward Ashwood.// Clinical Chemistry 2004; 50, 190-194
Do we measure bilirubin correctly anno 2005. Joke Apprloo, Fedde van der Graaf et al. // Clin Chem Lab Med 2005; 43,531-535
5. Total Bilirubin Measurement by Photometry on a Blood Gas Analyzer: Potential for Use in Neonatal Testing at the Point of Care Boris Rolinski, Helmut Kuster, Bernhard Ugele, Rudolf Gruber, and Klaus Horn1 // Clinical Chemistry 2001 ;47, 1845-1847