

Современные подходы к определению содержания билирубина у новорожденных

Зубовская Е.Т., Гнедько Т.В., Митрошенко И.В., Курлович И.В.,
Белуга М.В., Мартинкевич Л.А., Вильчук В.К., Блыга З.В.

Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя», Минск, Беларусь

Zubovskaya E.T., Gnedko T.V., Mitroshenko I.V., Kurlovich I.V.,
Beluga M.V., Martinkewich L.A., Vilchuk V.K., Blyga Z.V.

Republican Scientific and Practical Center «Mother and Child», Minsk, Belarus

Modern approaches to defining the content of bilirubin in newborns

Резюме. Ранняя диагностика и своевременное лечение неонатальных желтух у детей способствуют профилактике развития билирубиновой энцефалопатии. Приоритет определения уровня билирубина в плазме крови у новорожденных детей принадлежит методам микроанализа.

Ключевые слова: новорожденные, неонатальные желтухи, билирубин, лабораторная диагностика.

Медицинские новости. – 2017. – №2. – С. 15–17.

Summary. Early diagnosis and timely treatment of neonatal jaundices in children contribute to the prevention of bilirubin encephalopathy. Priority to determine the level of bilirubin in blood plasma of newborn children belongs to the microanalysis techniques.

Keywords: newborn, neonatal jaundice, bilirubin, laboratory diagnostics.

Meditsinskie novosti. – 2017. – N2. – P. 15–17.

В структуре заболеваемости новорожденных детей в Республике Беларусь желтухи занимают одно из ведущих мест среди как доношенных, так и недоношенных детей. По данным «Отчета о медицинской помощи беременным, роженицам, родильницам» за 2014 г., заболеваемость новорожденных гемолитической болезнью, обусловленной изоиммунизацией, составила 4,8‰ (доношенных – 4,6‰, недоношенных 10,6‰); другими видами неонатальных желтух – 44,9‰ (доношенных – 35,9‰, недоношенных – 252,5‰).

В основе патогенеза желтух лежит нарушение пигментного обмена, состояние которого характеризует билирубин [1, 2].

В неонатальной практике диагностическое значение уровня общего билирубина и его фракций используется при заболеваниях, характерных для периода новорожденности, — гемолитической болезни плода и новорожденного, водянке плода, обусловленной гемолитической болезнью, ядерной желтухе, неонатальной желтухе, обусловленной чрезмерным гемолизом, неонатальной желтухе, обусловленной другими и неуточненными причинами. Определение общего и связанного билирубина проводится при диагностике отдельных состояний, возникающих в перинатальном периоде, в комплексе биохимического исследования крови по действующим «Клиническим протоколам диагностики, реанимации и интенсивной терапии в неонатологии» [3].

Интенсивность желтухи зависит от концентрации билирубина в плазме крови и меняется с повышением уровня непрямого

билирубина от светло-лимонного до интенсивно шафранового, при патологическом увеличении уровня прямого (конъюгированного) билирубина кожа приобретает оливково-желтый или зеленоватый оттенок. У доношенных новорожденных видимая желтуха развивается при уровне билирубина около 75–85 мкмоль/л, у недоношенных и маловесных к сроку гестации – 95–120 мкмоль/л, что связано с меньшей толщиной подкожно-жировой клетчатки [4].

Интенсивное нарастание содержания билирубина в плазме крови быстро приводит к его чрезмерному накоплению в тканях и появлению у ребенка резко выраженной желтухи с симптомами билирубиновой интоксикации (ядерной желтухи). Опасность повреждения центральной

в крови до того значения, при котором не повреждаются нервные клетки.

Увеличение числа случаев неонатальной желтухи определило актуальность разработки методов измерения содержания билирубина в плазме крови, на определении которого основана диагностика гипербилирубинемий у детей в период новорожденности.

Характеристика методов определения концентрации билирубина в сыворотке крови

Методы определения концентрации билирубина в сыворотке крови различаются между собой количеством реагентов, их стабильностью; акселератором; этапностью реакции; объемом пробы; измерительной длиной волны (нм); пределом линейности калибровочной кривой

Определение общего и связанного билирубина проводится при диагностике отдельных состояний, возникающих в перинатальном периоде, в комплексе биохимического исследования крови по действующим «Клиническим протоколам диагностики, реанимации и интенсивной терапии в неонатологии»

нервной системы в виде ядерной желтухи появляется при повышении уровня непрямого билирубина у доношенного ребенка выше 300–340 мкмоль/л, у недоношенных детей – 170–204 мкмоль/л.

Ранняя диагностика и своевременное лечение неонатальных желтух у детей способствуют профилактике развития билирубиновой энцефалопатии [5]. Независимо от происхождения гипербилирубинемии задача лечения состоит в предотвращении повышения уровня непрямого билирубина

(мкмоль/л); механизмами интерференции компонентов крови, прежде всего гемоглобина; аналитической вариацией; корреляцией.

Методы высокоэффективной жидкостной хроматографии, требующие 250–500 мкл сыворотки крови, позволяют разделить разные фракции билирубина: α -фракция (свободный, неконъюгированный); β -фракция (билирубинмоноглюкуронид); γ -фракция (билирубиндиглюкуронид); δ -фракция

(конъюгированный билирубин, прочно связанный с белком).

Несмотря на ценность и важность выяснения каждой фракции билирубина, метод не может быть использован как вариант повседневного микроанализа.

Электрохимические методы, в частности полярография, при которых используется примерно такое же количество сыворотки крови, позволяют определить свободный от белка билирубин, однако хорошего совпадения результатов с другими методами не установлено.

Окислительные методы основаны на получении окрашенных соединений под действием на билирубин хлорного железа, йода, концентрированной азотной кислоты и др. — отличаются сравнительно низкой чувствительностью.

Метод сухой химии с использованием многослойной пленки на некоторых анализаторах, работа которых основана на принципе отражательной фотометрии. Этот метод может быть примером аналитической надежности определения билирубина методом микроанализа. Определение общего билирубина методом сухой химии проводится в 10 мкл сыворотки крови в течение 5 минут при 37°C. Диапазон линейности концентрации билирубина находится в пределах до 445 мкмоль/л. Метод сухой химии дорогостоящий и требует соответствующих анализаторов.

Ферментативный метод определения концентрации билирубина относится к методу микроанализа. Основан на использовании фермента билирубинаксидазы, катализирующей окисление билирубина кислородом воздуха, и превращения его

ментов при взаимодействии билирубина с диазореагентом (реактив Эрлиха). Азопигменты обладают свойствами двойных индикаторов. В нейтральной среде азопигменты имеют красную окраску, в щелочной и кислой — синюю.

Различаются используемым акселератором, то есть ускорителем реакции. Акселераторы разрушают метиленовую связь неконъюгированного билирубина с альбумином. В качестве акселераторов применяют кофеин, дифиллин, диметилсульфоксид, додецилсульфат натрия, мочевины и ряд других поверхностно-активных соединений — детергентов.

В группу химических колориметрических методов входят:

- метод Иендрашика — Грофа, в качестве акселератора используется кофеин;
- Маллоя — Эвелин, акселератор — детергент;
- Валтерса и Герарда, акселератор — диметилсульфоксид.

К недостаткам метода Иендрашика — Грофа, особенно с точки зрения микроанализа, относится многоэтапность технологии, нестабильность диазореактива и высокая концентрация кофеина (5% раствор) при определении билирубина у новорожденных.

Для определения прямого билирубина во всех колориметрических методах необходима сульфаниловая кислота, соляная кислота и нитрит натрия. Сульфаниловая кислота может быть заменена другими сульфосоединениями — дихлоранилином, дихлорфенилдиазонием, диазониевыми солями красителей и др.

Неинвазивные (чрескожные) методы определения билирубина

Учитывая число детей, страдающих неонатальной желтухой, большое значение для клинической практики имеет разработка и внедрение неинвазивных методов определения уровня билирубина. При этом исследование не приводит к нарушению целостности кожного покрова, болезненности процедуры, к риску развития инфекции. Большинство ведущих перинатальных клиник и клинических протоколов рекомендуют использование методов неинвазивного определения уровня билирубинемии у новорожденных.

Спектрофотометр АНКУБ «Спектр».

Оптимизация медицинской помощи этой категории детского населения, внедрение диагностических и терапевтических аппаратов с неинвазивной функцией была реализована при создании отечественного диагностического аппарата АНКУБ «Спектр» (ТУ ВУ 100321654.008-2008) в ГУ РНПЦ «Мать и дитя» совместно с Институтом физики НАН Беларуси и ПК «Люзар». Разработанный аппарат предназначен для чрескожного измерения уровня билирубина у новорожденных детей, контроля исходного показателя и его динамики на фоне комплексной терапии. Разработанный метод определения билирубина является скрининговым экспресс-методом для выделения группы риска по развитию тяжелой гипербилирубинемии, а также для уменьшения числа новорожденных, которым требуется взятие крови.

В основе функционирования аппарата лежит метод многоволнового спектрального отражения с измерением разности логарифмов коэффициентов отражения света и определением оптических плотностей, соответствующих билирубину, гемоглобину и меланину в тканях дермы ребенка, с визуализацией показателя на дисплее аппарата. Диапазон показаний концентрации билирубина 0–400 мкмоль/л с погрешностью ±15%. Уровень билирубинемии определяет тактику диагностических и лечебных мероприятий.

По точности концентрации билирубина в сыворотке крови неинвазивный метод уступает химическим и спектрофотометрическим измерениям. Погрешности в определении билирубина обусловлены многими причинами: толщина и влажность кожных покровов, окраска, плотность между мембраной и кожей и др. Кроме того, прокрашивание кожных покровов билирубином, особенно при гемолитической болезни новорожденного, запаздывает и не соответствует быстрому нарастанию билирубина в крови. Только

Ранняя диагностика и своевременное лечение неонатальных желтух у детей способствуют профилактике развития билирубиновой энцефалопатии

в биливердин. Энзиматическим методом билирубин может быть определен в конечной точке или кинетическим путем по убыли абсорбции при длине волны 440 нм. Гемолиз пробы не мешает ферментативному определению билирубина. В перспективе может служить референтным методом.

Химические колориметрические методы наиболее распространенные и широко используются для количественного определения общего и прямого билирубина. Объем пробы составляет от 50–200 мкл и более и зависит как от набора реагентов фирмы-производителя, так и от используемого анализатора.

Основаны на образовании диазотированных соединений билирубина — азопиг-

Альтернативным реактивом диазореактиву, применяемому в методе Иендрашика — Грофа, является 2,4-дихлорфенилдиазоний (2,4-ДХФД) как более стабильный и адаптированный к биохимическим анализаторам реагент. Однако в сыворотках крови больных с уреимией, хронической почечной недостаточностью, подвергавшихся лечению гемодиализом, при использовании 2,4-ДХФД и аналогичных соединений отмечаются завышенные результаты.

Широко распространены методы с использованием других диазотированных сульфосоединений и детергентов. Их недостаток — интерференция гемоглобина и индикана, особенно при определении прямого билирубина.

начиная с 2–3-х суток жизни у новорожденного устанавливается равновесие, и можно контролировать билирубин в динамике.

Спектрофотометрические безреагентные методы определения содержания билирубина основаны на прямом измерении цвета сыворотки крови, окрашенной билирубином в желтый цвет. Билирубин

измерения концентрации билирубина в пробе – 3 секунды, время непрерывной работы – не менее 8 ч. Средний срок службы билирубинометра не менее 5 лет. В комплект поставки входит многоразовая двухсекционная кювета с длиной оптического пути 0,25 мм. Прибор калибруется стандартом билирубина, контроль качества определения концентрации билируби-

в том числе мониторинг прироста уровня билирубина. Результаты определения содержания билирубина у новорожденных детей удовлетворяют неонатологов.

Широкое включение исследования билирубина в диагностические программы, а также большая потребность в этом анализе в педиатрии, прежде всего в неонатологии, свидетельствуют о необходимости внедрения микрометодов определения уровня билирубина в повседневную практику.

Отечественные приборы АНКУБ «Спектр» и билирубинометр БФ-ЦН-01 являются незаменимым оборудованием для родильных домов и родильных отделений стационаров. Билирубинометр БФ-ЦН-01 можно использовать в детских поликлиниках с целью контроля уровня билирубина при затяжных желтухах у детей.

В РНПЦ «Мать и дитя» с 2010 г. внедрен метод определения концентрации билирубина у новорожденных детей на билирубинометре БФ-ЦН-01

измеряется в пределах длины волны 420–460 нм; присутствующий в сыворотке крови гемоглобин отсекается при 551–580 нм.

Билирубинометр БФ-ЦН-01. На ЗАО «Солар» (Республика Беларусь) разработан билирубинометр цифровой неонатальный БФ-ЦН-01. Прибор предназначен для определения содержания общего билирубина в сыворотке крови, в том числе у новорожденных детей прямым безреагентным методом двухволновой фотометрии. Объем сыворотки крови (венозной или капиллярной) составляет не более 18–20 мкл, диапазон измерения концентрации билирубина до 600 мкмоль/л. Метод может использоваться также для определения уровня билирубина в околоплодных водах с целью пренатальной диагностики желтух.

Время установления рабочего режима билирубинометра с момента включения в сеть составляет не более 1 мин, время

на проводится по контрольной сыворотке с диапазоном концентрации билирубина в пределах 65–115 мкмоль/л и более.

В РНПЦ «Мать и дитя» с 2010 г. внедрен метод определения концентрации билирубина у новорожденных детей на билирубинометре БФ-ЦН-01. Прибор обладает высокой точностью и хорошей воспроизводимостью (коэффициент вариации 4,5–6,5%). Сравнительный анализ результатов параллельного определения концентрации билирубина в сыворотке крови новорожденных детей безреагентным методом на билирубинометре БФ-ЦН-01 и на биохимическом анализаторе «Хита-чи-911» методом Иендрашика показал высокую степень корреляции ($r=0,96$). Метод широко используется в повседневной практике неонатологов РНПЦ «Мать и дитя». За период 2010–2015 гг. проведено около 30 тыс. процедур определения концентрации билирубина у новорожденных детей,

ЛИТЕРАТУРА

1. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям в лабораторной диагностике. – М., 2009. – 896 с.
2. Клиническая лабораторная диагностика (методы и трактовка лабораторных исследований): Учеб. пособие / под ред. В.С. Камышникова. – М., 2015. – 720 с.
3. Клинические протоколы диагностики, реанимации и интенсивной терапии в неонатологии. Приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь №81 от 28.01.2011.
4. Гнедько Т.В., Берестень С.А., Паюк И.И., Мезян С.М. // Мед. панорама. – 2014. – №3. – С. 12–14.
5. Гнедько, Т.В. Неонатальное здоровье недоношенных детей / Т.В. Гнедько // Педиатрия. Восточная Европа. – 2015. – №2. – С.24–31.

Поступила 08.01.2016 г.

ЭТО ИНТЕРЕСНО ЗНАТЬ

МН НОВЫЙ ПЛАСТЫРЬ МЕНЯЕТ ЦВЕТ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ РАНЫ

Группа ученых из Великобритании разработали специальный пластырь, меняющий цвет при инфицировании раны.

Тоби Дженкинс (Toby Jenkins) объясняет, что пластырь сделан из гидратированной агарозы, содержащей микрокапсулы с флуоресцентным красителем. Краситель высвобождается под действием токсинов, синтезируемых болезнетворными бактериями.

Ученые уже выяснили, что пластырь реагирует на присутствие таких микроорганизмов, как кишечная палочка, синегнойная палочка, золотистый стафилококк и фекальный энтерококк. Известно, что бактерии образуют биопленки на поверхности ран. Авторы показали, что, чем выше вероятность образования биопленок микроорганизмами, вызывающими инфекции, тем сильнее меняется цвет пластыря. Пластырь способен не только выявить инфекцию, но и определить, какие именно бактерии ее вызвали.

Источник: <http://medportal.ru>

МН

СОЗДАН НОВЫЙ ТЕСТ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГЕПАТИТА С

Ученые из Калифорнийского университета в Ирвайне разработали новый тест для диагностики гепатита С. По данным

Центров контроля и профилактики заболеваний (Centers for Disease Control and Prevention), сейчас во всем мире гепатитом С заражены более 150 миллионов человек. Нередко до развития серьезных заболеваний печени, например, цирроза или рака печени, люди и не подозревают, что инфицированы гепатитом С.

Все тесты, используемые в настоящее время, включают в себя проведение двухэтапного анализа – сначала в крови выявляют вирус-специфические антитела, после чего с помощью ПЦР подтверждают активен ли вирус в настоящее время. Исследователи подчеркивают, что оборудованием, необходимым для проведения обоих этапов анализа, оснащены не все лаборатории, что существенно снижает уровень выявления гепатита С во всем мире.

Созданный доктором Ке-Квин Ху (Ke-Qin Hu) и его коллегами тест позволяет выявить и подтвердить гепатит С всего за один этап. Новый тест недорог и прост в применении. Авторы объясняют, что для проведения анализа нужна моча пациента, а не кровь, как для большинства методов диагностики. Это снижает стоимость анализа, а также значительно упрощает его проведение.

Источник: <http://medportal.ru>