

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Габрильчак А.И., Ерещенко А.А., Халиулин А.В., Медведева Е.А., Тукшумская Л.Л.

СРАВНЕНИЕ ДИАЗО- И ВАНАДАТОКСИДАЗНОГО МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИЛИРУБИНА И ЕГО ФРАКЦИЙ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ ГИПЕРЛИПИДЕМИИ И ГЕМОЛИЗЕ НА АВТОМАТИЧЕСКИХ АНАЛИЗАТОРАХ DIRUI СЕРИИ CS

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 443099, Самара, Россия

Определяли концентрацию общего и прямого билирубина в 405 образцах сыворотки крови на автоматическом биохимическом анализаторе DIRUI CS-T240 PLUS диазометодом (DIRUI INDUSTRIAL CO., LTD, Китай) и методом окисления ванадата (DIRUI INDUSTRIAL CO., LTD, Китай). Проводилась оценка сравнимости результатов определения билирубина и его фракций между выбранными методиками. Далее в опытных пробах моделировали различные уровни гемолиза (HI) и липемии (LI) с последующим определением общего и прямого билирубина двумя методиками. Оба метода продемонстрировали высокую корреляцию в диапазоне рассмотренных значений 2,0-284,0 мкмоль/л ($r=0,984$). Диазометод показал высокую чувствительность к гемолизу и липемии: для общего билирубина при значениях HI=100 ед и LI=30 ед, а для прямого билирубина уже при HI и LI 30 ед. Для метода окисления ванадата при определении общего билирубина предел индекса гемолиза и липемии составил 500 ед, а для прямого билирубина HI=500 ед и LI=150 ед. Метод окисления ванадата более устойчив к интерференциям гемолиза и липемии, что особенно важно в практике педиатрических и гематологических отделений, отделений экстренной помощи. Ввиду ограниченной доступности и более высокой стоимости реактивов для данной методики целесообразно в клинико-диагностической лаборатории при определении концентрации билирубина и его фракций использовать диазометод в качестве основного и метод с ванадатоксидазой для гемолизированных и липемичных образцов.

Ключевые слова: билирубин; гемолиз; липемия; окисление ванадата; диазометод

Для цитирования: Габрильчак А.И., Ерещенко А.А., Халиулин А.В., Медведева Е.А., Тукшумская Л.Л. Сравнение диазо- и ванадатоксидазного методов определения билирубина и его фракций в сыворотке крови при гиперлипидемии и гемолизе на автоматических анализаторах DIRUI серии CS. Клиническая лабораторная диагностика. 2024; 69 (2): 56-65.
DOI:https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-2-56-65

Для корреспонденции: Габрильчак Анастасия Ивановна, ассистент каф. фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой; e-mail: a.i.gabrilchak@samsmu.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы при финансовой поддержке компании DIRUI.

Поступила 19.12.2023
Принята к печати 29.01.2024
Опубликовано 15.02.2024

Gabrilchak A.I., Ereshchenko A.A., Khaliulin A.V., Medvedeva E.A., Tukshumskaya L.L.

COMPARISON OF DIAZO- AND VANADATE OXIDASE METHODS FOR THE DETERMINATION OF BILIRUBIN AND ITS FRACTIONS IN SERUM UNDER CONDITIONS OF HYPERLIPIDEMIA AND HEMOLYSIS USING DIRUI CS SERIES AUTOMATIC ANALYZERS

Samara State Medical University, 443099, Samara, Russia

The concentration of total and direct bilirubin in 405 samples was determined on a DIRUI CS-T240 PLUS automatic biochemical analyser using the diazo method (DIRUI INDUSTRIAL CO., LTD, China) and the vanadate oxidation method (DIRUI INDUSTRIAL CO., LTD, China). The comparability of the results of the determination of bilirubin and its fractions between the selected methods was evaluated. In addition, different levels of haemolysis (HI) and lipemia (LI) were simulated in experimental samples with subsequent determination of total and direct bilirubin by two methods. Both methods showed a high correlation within the considered range of values, 2.0-284.0 $\mu\text{mol/l}$ ($r=0.984$). The diazo method showed high sensitivity to haemolysis and lipemia: for total bilirubin at values of HI=100 units and LI=30 units, and for direct bilirubin even at HI and LI 30 units. For the vanadate oxidation method for total bilirubin, the limit of haemolysis and lipemia index was 500 units and for direct bilirubin – HI=500 and LI=150 units. The vanadate oxidation method is more resistant to hemolysis and lipemia interference, which is especially important in the practice of pediatric and hematology departments, emergency departments. Due to the limited availability and higher cost of reagents for this method, it is advisable to use diazo reaction as the main method and method with vanadate oxidase for hemolyzed and lipemic samples in the clinical diagnostic laboratory when determining the concentration of bilirubin and its fractions.

Key words: bilirubin; hemolysis; lipemia; vanadate oxidation; diazo method

For citation: Gabrilchak A.I., Ereshchenko A.A., Khaliulin A.V., Medvedeva E.A., Tukshumskaya L.L. Comparison of diazo- and

vanadate oxidase methods for the determination of bilirubin and its fractions in blood serum under conditions of hyperlipidemia and hemolysis using dirui cs series automatic analyzers. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (2): 56-65 (in Russ.). DOI: https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-2-56-65

For correspondence: *Gabrilchak A.I.*, Assistant of the Department of Fundamental and Clinical Biochemistry with Laboratory Diagnostics, of SamSMU; e-mail: a.i.gabrilchak@samsmu.ru

Information about authors:

Gabrilchak A.I., <https://orcid.org/0000-0003-2474-3127>;
Ereshchenko A.A., <https://orcid.org/0000-0002-4221-4440>;
Khaliulin A.V., <https://orcid.org/0000-0003-4689-8904>;
Medvedeva E.A., <https://orcid.org/0009-0008-7861-3970>;
Tukshumskaya L.L., <https://orcid.org/0009-0004-7214-2718>.

Conflict of interest. *The authors declare no conflict of interest.*

Acknowledgment. *The research was carried out as part of a research project with the financial support of DIRUI.*

Received 19.12.2023

Accepted 29.01.2024

Published 15.02.2024

Введение. В обеспечении качества результатов лабораторных исследований принимают участие как специалисты клинико-диагностических лабораторий, так и медицинский персонал клинических подразделений. Несоответствие биологического образца критериям качества преаналитического этапа является наиболее частой причиной отказа лаборатории в проведении исследования [1]. В лабораторной практике встречаются такие нарушения преаналитического этапа, как несоответствие типа пробирки назначенному исследованию, недостаточный объем образца, наличие сгустка в пробирке с антикоагулянтом и др. [2] Однако чаще всего ведущей причиной отказа в приеме лабораторией образца крови является наличие гемолиза и липемии (хилеза) [3]. Наиболее чувствительными к данным интерференциям являются биохимические методики.

Влияние гемолиза на результаты биохимических исследований могут быть обусловлены несколькими механизмами. Первый из них - увеличение концентрации внутриклеточных метаболитов в сыворотке крови, что может привести к ложным завышенным результатам для некоторых аналитов. Эффект разведения образца, напротив, может привести к ложному занижению концентрации внеклеточных веществ. В основе спектрального механизма лежит искажение результатов измерения величины абсорбции при определенной длине волны в присутствии свободного гемоглобина в реакционной смеси. Химические интерференции реализуются, когда высвободившиеся внутриклеточные вещества вступают в химические реакции с компонентами реагентов или продуктами реакций [4].

Наиболее частой причиной появления гемолиза является неправильная техника взятия крови (длительное наложение жгута, дополнительное надавливание на конечность при проведении венопункции при медленном токе крови, использование шприцев, а не вакуумных систем взятия крови) [5]. Также гемолиз может возникнуть при неправильном хранении и транспортировке пробирок с кровью (интенсивное встряхивание пробирки, ее длительное хранение до доставки в лабораторию, заморозка и оттаивание, а также некорректные режимы настройки работы пневмопочты) [6].

Липемия обусловлена высокой концентрацией в сыворотке крови холестерина, триглицеридов и липо-

протеинов (хиломикрон). Механизмы данного типа интерференции реализуются следующим образом. Спектральная интерференция обусловлена тем, что холестерин, триглицериды и хиломикроны обладают высокой способностью к светопоглощению, особенно на низких диапазонах длины волны. Физико-химическая интерференция реализуется за счет способности липопротеинов блокировать реакцию антиген-антитело, что становится значимым для иммунотурбидиметрических методов. Липемия также приводит и к эффекту перераспределения объема, когда за счет увеличения доли объема липидной фазы может происходить некорректное измерение некоторых водорастворимых веществ. Эффект неоднородности образца - при центрифугировании крови хиломикроны, обладая низкой плотностью, образуют слой на поверхности пробирки. В данном слое сконцентрированы гидрофобные компоненты плазмы. В свою очередь, гидрофильные компоненты распределены в нижней части пробирки. При отборе пробы в иглу попадает преимущественно верхний слой образца, что может исказить результаты исследования [7].

Наиболее частой причиной хилеза образцов становится постпрандиальная липемия, возникающая при неправильном инструктаже или несоблюдении пациентом правил подготовки к сдаче биохимического анализа крови, а именно, несоблюдением необходимого периода голодания (6-8 часов).

Помимо преаналитических факторов, ведущих к развитию липемии и гемолиза, существует и ряд патологических состояний, при которых невозможно предотвратить данные интерференции даже при строгом соблюдении всех правил подготовки пациента, взятия и транспортировки биоматериала. Гемолиз может развиваться *in vivo* при ряде гематологических, аутоиммунных, иммунологических нарушений, при отравлении гемолитическими ядами, а также при наличии у пациента аппаратов вспомогательного кровообращения [8, 9]. Длительная стойкая гиперлипидемия может развиваться у пациентов с тяжелыми формами панкреатита, сахарного диабета, заболеваниями печени и почек и наследственными нарушениями липидного обмена. В вышеописанных случаях получить образцы приемлемого качества не представляется возможным.

Отказ в проведении исследования по причине нека-

чественного образца биоматериала влечет за собой увеличение времени до постановки диагноза и принятия клинического решения, дополнительные финансовые и ресурсные траты, сопряженные с необходимостью назначения повторного анализа; возникновению конфликтных ситуаций между лабораторией и врачами-клиницистами и пациентами. Таким образом, врач клинической лабораторной диагностики всегда вынужден искать равновесие между скоростью выдачи результата и предоставлением врачу-клиницисту достоверной лабораторной информации. На данный момент в арсенале лабораторной службы имеются методики, позволяющие нивелировать интерференции гемолиза и липемии для некоторых биохимических аналитов.

Одними из самых часто назначаемых рутинных биохимических маркеров является общий билирубин и его фракции. Определение их концентраций широко используется в практике хирургических, гематологических, педиатрических и других отделений. Наиболее широко используемым методом измерения фракций билирубина является диазометод. Данный метод доступен, не требует больших финансовых затрат, легко автоматизируется и зачастую предлагается поставщиками лабораторного оборудования в качестве метода выбора по умолчанию. Однако, диазометод имеет некоторые ключевые ограничения, включая наличие интерференций, вызванных гемолизом и липемией. Альтернативным подходом к измерению билирубина и его фракций является ферментативный метод с ванадатоксидазой, который является более устойчивым к упомянутым выше интерференциям [10].

Цель работы: сравнение результатов определения общего билирубина и его фракций методами с применением соли диазония и окисления ванадата и устойчивости данных методик к различным уровням гемолиза и липемии.

Материал и методы. Исследуемые образцы. В исследовании было проанализировано 405 проб (из них 135 остаточных образцов сыворотки крови пациентов многопрофильного стационара Клиник Самарского государственного медицинского университета без гемолиза и липемии, 135 образцов в условиях липемии и 135 в условиях гемолиза). Согласно решению Совета Евразийской экономической комиссии от 12 февраля 2016 г. № 29 остаточными образцами считаются остатки образцов, собранные в ходе лечебно-диагностического процесса. Первоначально у пациентов проводилось взятие венозной крови в пробирки с активатором свертывания с применением вакуумных систем. Для получения сыворотки образцы центрифугировали 10 минут при 1200g.

Критериями включения являлись: достаточный объем образца (не менее 1,5 мл сыворотки), отсутствие в образце гемолиза и липемии, что подтверждалось при количественном определении сывороточных индексов образца на автоматическом биохимическом анализаторе Cobas Integra 400 plus («Roche-Diagnostics», Швейцария) с использованием коммерческих наборов реактивов. Измерение сывороточных индексов проводится путем разбавления аликвоты образца сыворотки 0,9% NaCl с последующим измерением оптической плотности по следующим парам длин волн: 700/660 нм - для определения индекса липемии; 600/570 нм - для определения индекса гемолиза. Показатели индекса гемолиза (HI) коррелируют с концентрацией гемоглобина в исследуемом образце.

Концентрация свободного гемоглобина 10 мг/дл соответствует 10 HI. Индексы липемии (LI) измеряются в единицах липемии и основываются на оптических характеристиках заменителя липидов — Intralipid. LI представляет собой оценку мутности образца, а не концентрации триглицеридов и служит мерой рассеяния света, зависящей от размера частиц. Концентрация Intralipid 10 мг/дл примерно соответствует 10 LI. Индексы гемолиза и липемии в образцах, включенных в исследование, не превышали 10 (минимальные значимые индексы, рекомендуемые для проведения биохимических исследований) [11].

Критериями исключения являлись: недостаточный объем образца, наличие видимого гемолиза и/или липемии, показатели сывороточных HI и LI в образце выше 10. После применения критериев исключения в исследование было включено 127 остаточных образцов. Из каждого образца было получено три аликвоты по 500 мкл (контрольная и две опытные – для моделирования гемолиза и липемии). Контрольные аликвоты предназначались для оценки сравнимости результатов определения общего и прямого билирубина диазометодом и методом окисления ванадата. Опытные – для оценки интерференции гемолиза и липемии на данные методики. Все аликвоты замораживались при температуре -20 °С до проведения эксперимента, далее следовало однократное размораживание образцов при комнатной температуре.

Биохимические методы исследования. Определение общего билирубина и его фракций проводилось на автоматическом биохимическом анализаторе DIRUI CS-T240 PLUS (DIRUI INDUSTRIAL CO., LTD, Китай) диазометодом и методом окисления ванадата.

Принцип диазометода (метод Йендрашика-Гофа): при взаимодействии сульфаниловой кислоты с нитратом натрия образуется диазофенилсульфоновая кислота (диазореагент), которая реагирует в кислой среде с прямым билирубином сыворотки с образованием изомеров азобилирубина, имеющих характерное кармино-красное окрашивание. Интенсивность окрашивания измеряется фотометрически при длине волны ≈600 нм и пропорциональна концентрации прямого билирубина. Непрямой билирубин реагирует с диазореагентом после добавления в реакционную смесь активатора (кофеина), что позволяет определить концентрацию общего билирубина. По разнице между общим и прямым билирубином определяют концентрацию непрямого билирубина. Для определения общего и прямого билирубина диазометодом использовались коммерческие тест-системы Total Bilirubin и Direct Bilirubin (DIRUI INDUSTRIAL CO., LTD, Китай). Предел линейности для данных методик, указанный в спецификациях производителя, составляет 300 мкмоль/л как для общего, так и для прямого билирубина.

Принцип ванадатоксидазного метода основан на окислении прямого билирубина под действием ванадата до билвердина в кислой среде (pH 3,0), имеющего зеленое окрашивание, который затем может быть дополнительно окислен до бесцветных продуктов. Изменение степени абсорбции регистрируется при длине волны 450 нм. Для определения общего и прямого билирубина данным методом использовались коммерческие тест-системы Total Bilirubin - Vanadate Oxidation и Direct Bilirubin - Vanadate Oxidation (DIRUI INDUSTRIAL

СО., LTD, Китай). Пределы линейности ванадатоксидазной методики, указанные в спецификациях производителя, соответствуют 341 мкмоль/л для прямого билирубина и 648 мкмоль/л для общего билирубина.

Дизайн эксперимента. Планирование и разработка этапов эксперимента проводилась с учетом протоколов CLSI EP9-A2 и CLSI EP7-A2. На первом этапе исследования в опытных пробах моделировались различные уровни гемолиза и липемии.

Моделирование гемолиза проводилось следующим образом. Первоначально была проведена отмывка донорских эритроцитов физиологическим раствором для предотвращения попадания компонентов плазмы крови в опытный образец. Эритроцитарная взвесь была однократно заморожена при температуре -20°C на трое суток. После оттаивания проводилось тщательное vortexирование гемолизата в течение 3-х минут с последующим центрифугированием в течение 5-ти минут при 14000g. Далее был проведен контроль клеточного компонента надосадка гемолизата на автоматическом гематологическом анализаторе. Эритроциты, лейкоциты и тромбоциты не определялись. Значение концентрации свободного гемоглобина использовалось для расчета объема гемолизата, необходимого для формирования определенного уровня гемолиза. Моделирование липемии проводилось путем добавления во второй опытный образец различных объемов липидной эмульсии для парентерального питания Intralipid 20%.

Поскольку общепринятых четких критериев для градации степени гемолиза и липемии на данный момент не существует, было принято решение сформировать несколько групп образцов с различной степенью интерференции (усредненные значения по различным литературным источникам) [12 - 14]. Были сформированы 7 групп образцов с диапазонами индексов гемолиза 11-30 HI (трудноразличимый гемолиз), 31-100 HI (видимый гемолиз), и диапазоны, соответствующие различной степени грубого гемолиза - 101-150 HI, 151-

500 HI, 501-1000 HI, 1001-2000 HI, >2000 HI. Также были сформированы 7 групп опытных образцов с различными диапазонами индексов липемии: 11-30 LI (трудноразличимая липемия), 31-100 LI (видимая липемия), и диапазоны, соответствующие различной степени высокой липемии - 101-150 LI, 151-500 LI, 501-1000 LI, 1001-2000 LI, >2000 LI. Контрольное количественное определение сывороточных индексов в смоделированных опытных образцах также проводилось на автоматическом биохимическом анализаторе.

На втором этапе исследования проводилась оценка сравнимости результатов определения общего и прямого билирубина диазометодом и методом окисления ванадата. Для этого после проведения всех необходимых процедур технического обслуживания оборудования, калибровки и получения удовлетворительных результатов контроля качества было проведено определение общего билирубина и его фракций двумя методами в контрольных образцах. Тесты из одной и той же пробы выполнялись в одно и то же время. Все образцы были проанализированы в дублях, для статистического анализа было взято среднее значение. На третьем этапе исследования проводили определение общего и прямого билирубина двумя методиками в смоделированных гемолизированных и липемичных образцах. Для минимизации влияния аналитических факторов вариации данные измерения были проведены в той же аналитической серии, в которой исследовались контрольные образцы. Все образцы также были исследованы двукратно с расчетом средних значений.

Статистическая обработка. Анализ полученных результатов и статистический расчет проводился при помощи программного обеспечения Microsoft Office Excel 2007 и StatTech (версия 4.0.0, разработчик ООО "Статтех", Россия). Количественные показатели оценивались на соответствие нормальному распределению с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Поскольку данные имели ненормальное распределение, для оценки сравнимости методик определения

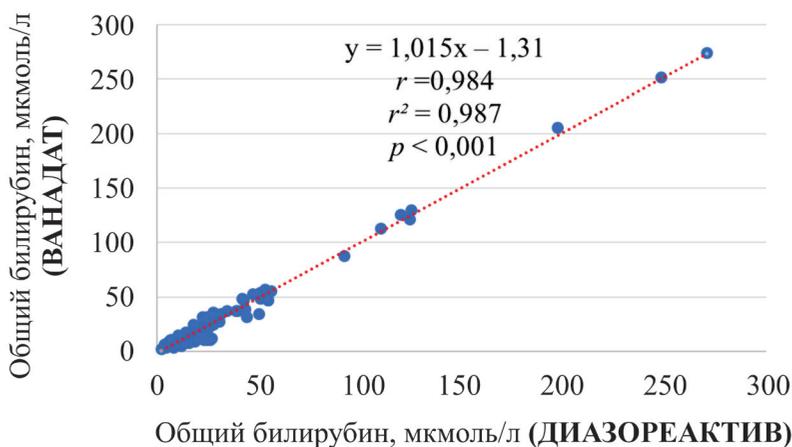


Рис. 1. Корреляция между методами определения общего билирубина ($n=127$).

Здесь и на рис. 2 - 6: ванадат – ванадатоксидазный метод определения общего билирубина и его фракций; диазореактив – метод с диазореактивом для метода определения общего билирубина и его фракций.

содержания общего билирубина и его фракций проводился корреляционный анализ с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена с последующим составлением уравнений линейной регрессии и построением графиков рассеяния (scatter plot). Статистически значимым уровнем ассоциированности принимали значения $p \leq 0,05$.

Оценку устойчивости методик к интерференциям гемолиза и липемии проводили путем расчета интерференционной погрешности. Значение, полученное при тестировании контрольной аликвоты принималось за истинное, при тестировании опытной пробы – за измеренное. Интерференционная погрешность рассчитывалась по формуле: $\text{Интерференционная погрешность, \%} = (\text{истинное значение} - \text{измеренное значение}) / \text{истинное значение} * 100$.

Согласно протоколу CLSI EP7-A2, уровень интерференции считался значимым, если интерференционная погрешность превышала 10%.

Результаты и обсуждение. Оценка сопоставимости и корреляции между методами определения билирубина. Согласно техническим требованиям ISO 15189-2015 результаты исследования одного лабораторного показателя, выполненные с помощью разных методов измерения, должны быть сопоставимы, иначе возможна их неправильная клиническая интерпретация. Результаты исследования корреляции между методами определения общего билирубина с помощью солей диазония и окисления ванадата для образцов с НН и LI менее 10 представлены на рис. 1.

Оба метода хорошо коррелируют до 284 мкмоль/л

с небольшим положительным смещением для ванадатоксидазного метода. Коэффициенты корреляции ($r=0,984$) и детерминации ($r^2=0,987$) указывают на сильную линейную взаимосвязь между парными данными ($p < 0,001$). Таким образом, согласно протоколу CLSI EP9-A2, при $r \geq 0,975$ и $r^2 \geq 0,95$, диапазон собранных данных считается приемлемым. Уравнение линейной регрессии ($y=ax+b$) для методов общего билирубина получено следующее: $y = 1,015x - 1,31$ мкмоль/л. Его параметры характеризуют величину систематической ошибки (SE) между методами. Коэффициент a (тангенс угла наклона прямой) характеризует пропорциональный компонент SE, который меняется по мере возрастания концентраций, а коэффициент b - константный компонент SE. Полученное уравнение позволяет рассчитать величину смещения (Bias%) для разных уровней принятия клинического решения, описанных В.Е. Statland [15]: для уровней общего билирубина 23,9 мкмоль/л, 42,08 мкмоль/л и 345,82 мкмоль/л величина смещения Bias% составила 4,0%, 1,5% и 1,1%, соответственно. Таким образом, поскольку Bias% для общего билирубина намного меньше межиндивидуальной биологической вариации (21,8%), различия между двумя сравниваемыми методами клинически незначимы.

На рис. 2 показана корреляция между методами определения прямого билирубина для образцов с НН и LI менее 10. Аналогично предыдущему графику, методики определения прямого билирубина также хорошо коррелируют с небольшим положительным отклонением для диазометода и показывают хороший уровень сопоставимости.

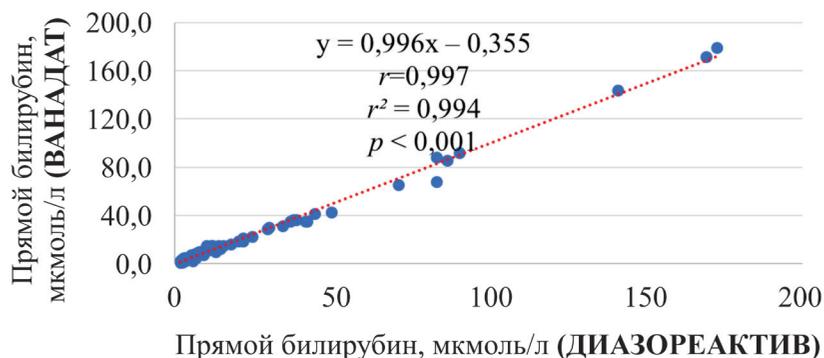


Рис. 2. Корреляция между методами определения прямого билирубина (n=127).

Влияние гемолиза. Рекомендации производителя по пределу гемолиза, липемии и линейности представлены в табл. 1.

Как видно из представленной таблицы, предел индекса гемолиза для диазометода не определен, хотя в требованиях, предъявляемых к образцам, отмечено, что образцы с видимым гемолизом не подлежат исследованию. Учитывается, что визуальная оценка гемолиза является весьма субъективной, не точно соответствует

реальной концентрации свободного гемоглобина в сыворотке и зависит от таких факторов, как опыт сотрудников лаборатории, особенностей его цветовосприятия и остроты зрения, уровня освещенности в помещении и др. Визуально гемолиз становится различим только при концентрации свободного гемоглобина в сыворотке ближе к 20 мг/дл. Разночтения специалистов при определении границы видимого или грубого гемолиза могут попадать в достаточно широкий диапазон 30-60

Технические характеристики производителя для методов определения билирубина и его фракций

Метод	Линейность	Предел индекса гемолиза	Предел уровня триглицеридов
Общий билирубин – диазометод	до 300 мкмоль/л	-	>15,8 ммоль/л
Прямой билирубин – диазометод	до 300 мкмоль/л	-	>37,0 ммоль/л
Общий билирубин – метод окисления ванадата	до 648 мкмоль/л	>5 г/л (HI=500)	>13,6 ммоль/л
Прямой билирубин – метод окисления ванадата	до 341 мкмоль/л	>10 г/л (HI=1000)	>2,8 ммоль/л

мг/дл [12]. Соответственно, невозможно точно определить, является ли уровень гемолиза в конкретном образце значимым для определения тех или иных аналитов без применения автоматических методов измерения индекса гемолиза. В этом случае будет возможно не только выявить образцы с минимальным, но значимым уровнем гемолиза, но и не отказывать в проведении лабораторного исследования в тех случаях, когда интерференция будет отсутствовать [16].

Содержание билирубина и его фракций оценивалось двумя методами во всех образцах в исходном значении и после моделирования разного уровня гемолиза. Значения параметров исследования показаны в табл. 2. Значимые уровни влияния гемолиза на определения общего билирубина показали при уровне гемолиза более 151 ($p<0,01$), а для прямого билирубина более 101 ($p<0,01$) для двух сравниваемых методов.

Влияние уровня гемолиза на концентрацию общего и прямого билирубина (Me [25%, 75%])

Уровень гемолиза	Общий билирубин диазореактив, мкмоль/л		Прямой билирубин диазореактив, мкмоль/л		Общий билирубин ванадат, мкмоль/л		Прямой билирубин ванадат, мкмоль/л	
	Исходный	Гемолиз	Исходный	Гемолиз	Исходный	Гемолиз	Исходный	Гемолиз
11-30	29.9 [13.8, 47.9]	25.6 [14.0, 44.6]	12.7 [3.8, 31.9]	11.3 [3.2, 23.02]	30.4 [9.7, 49.8]	21.9 [7.6, 42.1]	13.3 [3.8, 31.5]	11.0 [2.8, 22.9]
31-100	14.65 [5.7, 27.1]	14.2 [5.1, 26.1]	4.2 [2.6, 12.6]	4.2 [3.2, 9.55]	10.2 [7.4, 24.4]	7.25 [5.5, 18.8]	3.95 [2.4, 13.9]	2.5 [1.5, 8.5]
101-150	14.8 [7.0, 18.4]	17.9 [11.6, 23.4]	2.9 [2.1, 3.2]	5.8*** [5.2, 6.3]	6.6 [3.8, 9.1]	5.8 [2.9, 7.5]	2.2 [1.5, 3.4]	0.8** [0.1, 1.4]
151-500	11.7 [6.2, 24.9]	22.10** [16.6, 28.0]	4.0 [3.0, 5.2]	10.0*** [7.4, 12.9]	9.8 [7.8, 13.9]	6.3** [5.0, 8.4]	3.9 [3.2, 5.5]	1.0*** [0.12, 2.4]
501-1000	7.6 [6.3, 10.5]	39.9** [35.5, 42.8]	3.45 [3.3, 4.1]	25.7*** [24.0, 29.1]	8.55 [6.9, 10.6]	5.4** [4.4, 7.0]	3.2 [2.9, 4.1]	-1.95*** [-2.3, -1.3]
1001-2000	17.8 [8.7, 22.7]	55.45*** [49.3, 66.7]	4.6 [2.6, 6.8]	45.6*** [39.4, 53.1]	13.0 [5.6, 17.27]	6.4* [3.1, 9.75]	4.1 [2.5, 6.1]	-7.75*** [-12.8, -3.9]
>2000	44.6 [25.0, 105.7]	103.8** [96.4, 116.7]	14.2 [8.65, 80.4]	98.9*** [93.8, 109.4]	34.6 [31.2, 106.7]	11.85* [4.2, 42.8]	14.8 [9.5, 67.7]	-21.2*** [-26.1, 0.1]

Примечание. * – $p<0,05$; ** – $p<0,01$; *** – $p<0,001$

На рис. 3 показано, что интерференция (смещение) при диазометодe меняется в зависимости от степени гемолиза по-разному. Так, при HI 11-30 сначала наблюдается повышение концентрации общего билирубина в среднем на допустимом уровне 9,4%, в диапазоне гемолиза 31-100 отклонения небольшие, а при превышении HI более 100 наблюдается резкая отрицательная значимая интерференция, со средним смещением концентрации общего билирубина на -27,8% по сравнению с исходным уровнем, и при дальнейшем увеличении HI ситуация усугубляется.

Метод окисления ванадата показал более устойчивые значения при гемолизе. Допустимое снижение кон-

центрации общего билирубина на 10-11% наблюдается до уровня гемолиза 500, после чего различия становятся существенно значимыми, смещение в среднем составляло -36,4%.

При сравнении методов определения прямого билирубина в условиях гемолиза мы выявили похожую ситуацию (рис. 4). Диазометод показал высокую чувствительность к гемолизу, и уже при HI 11-30 снижение концентрации прямого билирубина было значимым (смещение -20,3%), а при увеличении степени гемолиза влияние интерференции только усиливалось. Для метода окисления ванадата при определении прямого билирубина предел индекса гемолиза составил 500.



Рис. 3. Влияние гемолиза на уровень общего билирубина (n=127). Красная пунктирная линия ограничивает пределы допустимого диапазона смещения $\pm 10\%$ (CLSI EP7-A2).

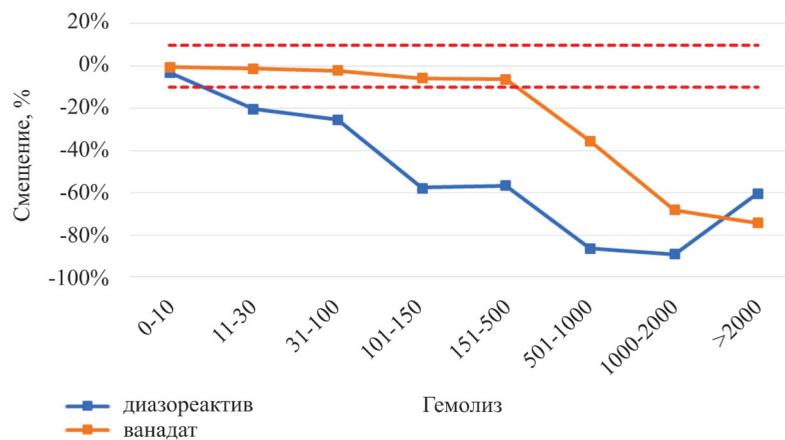


Рис. 4. Влияние гемолиза на уровень прямого билирубина (n=127).

Влияние липемии. Производителем указаны предельные концентрации триглицеридов (см. табл. 1). Индекс липемии является показателем мутности и обусловлен присутствием в сыворотке нескольких аналитов, таких как холестерин, триглицериды и липопротеины (хиломикроны), поэтому не всегда LI коррелирует с концентрацией триглицеридов.

В дальнейшем содержание билирубина и его фракций оценивалось двумя методами во всех образцах в исходном значении и после моделирования разного уровня липемии. Значения параметров исследования показаны в табл. 3. Значимые уровни влияния липемии для диазометода при опреде-

лении общего билирубина показали при LI более 31 ($p < 0,01$), а для прямого билирубина более 11 ($p < 0,05$). Для метода окисления ванадата индекс липемии не оказывал существенного влияния до значения LI 500 ($p < 0,01$).

При моделировании LI метод определения общего билирубина с использованием солей диазония показал значительную чувствительность. Так, при небольшом увеличении LI до 11-30 концентрация общего билирубина уже значимо смещалась в сторону увеличения на 27,0% (рис. 5, б), достигая довольно значительных изменений в дальнейшем. Например, при LI 1000 смещение составило 1685% (рис. 5, а).

Влияние уровня липемии на концентрацию общего и прямого билирубина (Ме [25%, 75%])

Уровень липемии	Общий билирубин диазореактив, мкмоль/л		Прямой билирубин диазореактив, мкмоль/л		Общий билирубин ванадат, мкмоль/л		Прямой билирубин ванадат, мкмоль/л	
	Исходный	Гемолиз	Исходный	Гемолиз	Исходный	Гемолиз	Исходный	Гемолиз
11-30	4.9 [4.2, 18.6]	9.3 [8.6, 11.0]	2.7 [2.3, 3.9]	6.1* [5.7, 6.9]	7.9 [7.1, 12.6]	7.6 [7.0, 9.0]	2.7 [2.1, 4.2]	2.0 [1.5, 3.0]
31-100	21.25 [6.1, 42.5]	38.35** [24.7, 58.3]	6.85 [2.7, 29.4]	21.6*** [14.3, 41.4]	20.5 [7.5, 47.3]	24.5 [7.2, 44.1]	6.0 [2.5, 28.6]	6.4 [1.1, 22.8]
101-150	34.5 [12.1, 54.9]	67.15* [43.0, 105.6]	8.3 [2.6, 4.8]	35.6*** [24.6, 65.1]	22.2 [7.2, 56.4]	22.6 [7.8, 56.1]	9.1 [2.0, 39.7]	6.0 [0.7, 32.4]
151-500	22.2 [9.45, 35.0]	99.95*** [65.2, 120.9]	9.1 [2.6, 21.1]	56.2*** [50.9, 74.8]	16.3 [6.7, 31.0]	25.9 [15.1, 36.3]	8.5 [2.7, 18.4]	7.5 [0.9, 12.5]
501-1000	11.7 [7.27, 22.7]	175.7*** [163.2, 217.5]	4.7 [3.35, 5.65]	112.2*** [87.5, 138.6]	10.4 [7.8, 12.8]	22.3** [17.5, 30.7]	4.2 [3.2, 5.9]	-7.9*** [-12.1, -1.6]
1001-2000	16.6 [8.2, 22.9]	271.7*** [236.9, 339.6]	4.5 [3.4, 6.9]	177.3*** [117.8, 230.7]	11.3 [8.1, 16.5]	-3.9*** [-56.9, 6.7]	4.1 [3.3, 7.9]	-16.3*** [-23.7, -14.2]
>2000	24.7 [8.7, 31.8]	338.3*** [225.7, 419.1]	3.6 [3.0, 6.9]	293.9*** [215.7, 298.9]	8.3 [7.9, 16.3]	-193.9*** [-211.8, 179.6]	3.8 [3.1, 6.7]	-47.3*** [-55.1, -43.1]

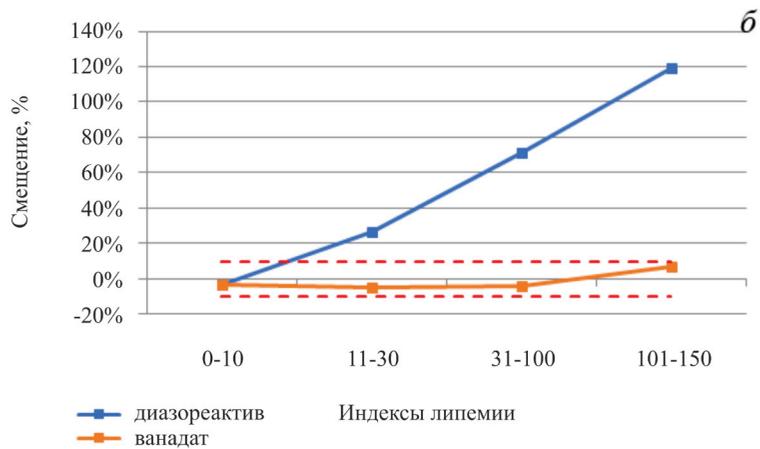


Рис. 5. Влияние липемии на уровень общего билирубина (n=127).
 а – в диапазоне индексов липемии 0-2000; б - в диапазоне индексов липемии 0-150.

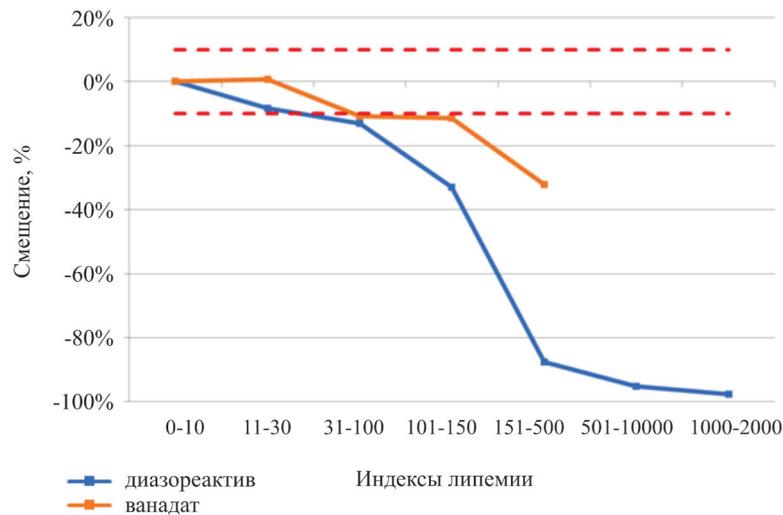


Рис. 6. Влияние липемии на уровень прямого билирубина (n=127).

Для метода окисления ванадата уровень общего билирубина не превышал 10% до тех пор, пока индекс липемии не достиг 500, что привело к среднему смещению концентрации на +14,4% по сравнению с исходным уровнем.

Методики определения концентрации прямого билирубина показали похожие чувствительности (рис. 6). Предельные значения индексов липемии для диазометода составил 30, а для окисления ванадата - 150.

Визуальная оценка липемии также, как и гемолиза, не всегда является точной. Обнаружено, что при возрастании в сыворотке крови концентрации только липопротеинов низкой плотности образец может оставаться прозрачным, что ещё больше ограничивает возможности визуальной оценки качества пробы [17] и свидетельствует о необходимости применения фотометрических методов при определении уровня липемии.

Устранить наличие гемолиза и липемии в пробе посредством повторного взятия образца не всегда является возможным. В отделениях экстренной помощи (терапевтические, хирургические, приемный покой) обойтись без липемичных образцов невозможно, поскольку невозможно соблюдать правило сдачи крови строго натощак. В практике гематологических и онкогематологических отделений всегда будут встречаться гемолизированные образцы, что связано с особенностями этиологии и патогенеза гематологических заболеваний. В отделениях неонатологии, педиатрии, родильных домах, а также в гериатрических отделениях, где находятся пациенты, у которых практически всегда могут быть проблемы с проведением венопункции, также высока доля образцов с гемолизом. Тем не менее, для всех перечисленных отделений лаборатории не могут бесконечно отказывать в проведении исследований по причине несоответствия пробы установленным критериям преаналитического качества. Поскольку для некоторых аналитов, таких как общий билирубин и его фракции, даже небольшое повышение таких интерферирующих факторов как гемолиз и липемия, способно исказить результаты исследо-

вания, предпочтительно иметь в арсенале лаборатории методы, являющиеся более устойчивыми к их действию. Кроме того, в задачи лаборатории входит своевременно оповестить врачей-клиницистов о появлении нового метода определения общего билирубина и его фракций, особенно в отделениях, где процент гемолизированных проб постоянно высокий. Поскольку при применении диазометода при определении концентрации общего и прямого билирубина в гемолизированных образцах происходит значимое смещение (занижение) истинных значений, при переходе к методу с ванадатом у клиницистов могут возникнуть сомнения в связи с получением большого количества результатов с завышенными, по их мнению, значениями, которые на самом деле будут являться истинными [18].

Заключение. Несмотря на то, что методы с применением солей диазония являются недорогими и легко автоматизируемыми, они имеют некоторые ключевые ограничения, включая влияние низких уровней гемолиза и липемии. Влияние гемолиза на результат определения билирубина может быть особенно проблематичным в ряде отделений, где сбор образцов сложный и приводит к их неоптимальному качеству. Чувствительность диазометода даже к низким степеням гемолиза ставит клиническую лабораторию в трудное положение - либо отменять тестирование при наличии гемолиза, либо, в качестве альтернативы, сообщать результат с пометкой о том, что гемолиз мог повлиять на измерение. Первый подход может привести к неудовлетворенности клинициста и пациента, в то время как второй подход рискует привести к получению неточных результатов.

Методы окисления ванадата представляют собой альтернативный подход к измерению билирубина. Основными текущими ограничениями для внедрения метода являются доступность и стоимость. Таким образом, оптимальным будет использовать диазометод в качестве основного метода определения билирубина и его фракций, перейдя к методу ванадатоксидазы для

образцов, которые гемолизированы, липемичны или превышают верхний предел линейности.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-10, 13-15 см.
REFERENCES)

11. Клименкова О.А., Берестовская В.С., Ларичева Е.С. Индекс гемолиза: от обсуждения к решению проблем преаналитического качества. *Медицинский алфавит*. 2013; 3(16): 38-40.
12. Клименкова О.А., Желтякова О.В., Берестовская В.С., Ларичева Е.С. Визуальная оценка гемолиза - взгляд на вершину айсберга. *Поликлиника*. 2013; 4(1): 43-7.
16. Клименкова О.А., Берестовская В.С., Иванов Г.А., Эмануэль А.В. Опыт применения индекса гемолиза как индикатора преаналитического качества для иммунохимических исследований. *Вестник Росздрава*. 2014; 3: 33-8.
17. Клименкова О.А., Берестовская В.С., Ларичева Е.С. Распространённость липемии среди амбулаторных пациентов. *Поликлиника*. 2014; 4(1): 8-10.

REFERENCES

1. Lippi G., Becan-McBride K., Behulova D., Bowen R.A., Church S., Delanghe J. et al. Preanalytical quality improvement: in quality we trust. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2013; 51(1): 229-41. DOI: 10.1515/cclm-2012-0597.
2. Lippi G., von Meyer A., Cadamuro J. Simundic A-M. Blood sample quality. *Diagnosis*. 2019; 6(1): 25-31. DOI: 10.1515/dx-2018-0018.
3. Tian G., Wu Y., Jin X., Zeng Z., Gu X., Li T. et al. The incidence rate and influence factors of hemolysis, lipemia, icterus in fasting serum biochemistry specimens. *PLoS One*. 2022; 17(1): e0262748. DOI: 10.1371/journal.pone.0262748.
4. Delgado J.A., Morell-Garcia D., Bauca J.M. Hemolysis interference studies: the particular case of sodium ion. *EJIFCC*. 2019; 30(1): 25-34.
5. Tóth J., Oláh A.V., Petercsák T., Kovács T., Kappelmayer J. Detection of haemolysis, a frequent preanalytical problem in the serum of newborns and adults. *EJIFCC*. 2020; 31(1): 6-14.
6. Kumari S., Kumar S., Bharti N., Shekha R. Impact of pneumatic

- transport system on preanalytical phase affecting clinical biochemistry results. *Journal of laboratory physicians*. 2022; 15(1): 48-55. DOI: 10.1055/s-0042-1750077.
7. Nikolac N. Lipemia: causes, interference mechanisms, detection and management. *Biochemia medica*. 2014; 24(1): 57-67. DOI: 10.11613/BM.2014.008.
 8. Marques-Garcia F. Methods for hemolysis interference study in laboratory medicine - a critical review. *EJIFCC*. 2020; 31(1): 85-97.
 9. Köhne I. Haemolysis induced by mechanical circulatory support devices: unsolved problems. *Perfusion*. 2020; 35(6): 474-83. DOI: 10.1177/0267659120931307.
 10. Dhungana N., Morris C., Krasowski MD. Operational impact of using a vanadate oxidase method for direct bilirubin measurements at an academic medical center clinical laboratory. *Pract. Lab. Med*. 2017; 8: 77-85. DOI: 10.1016/j.plabm.2017.05.004.
 11. Klimenkova O.A., Berestovskaja V.S., Laricheva E.S. Hemolysis index: from discussion to solving preanalytical quality problems. *Meditsinskiy alfavit*. 2013; 3(16): 38-40. (in Russian)
 12. Klimenkova O.A., Zheltyakova O.V., Berestovskaya V.S., Laricheva E.S. Visual evaluation of hemolysis is a look at the tip of the iceberg. *Poliklinika*. 2013; 4(1): 43-7. (in Russian)
 13. Agarwal S., Vargas G., Nordstrom C., Tam E., Buffone G.J., Devaraj S. Effect of interference from hemolysis, icterus and lipemia on routine pediatric clinical chemistry assays. *Clin. Chim. Acta*. 2015; 438:241-5. DOI: 10.1016/j.cca.2014.08.008.
 14. Soleimani N., Mohammadzadeh S., Asadian F. Lipemia interferences in biochemical tests, investigating the efficacy of different removal methods in comparison with ultracentrifugation as the gold standard. *J. Anal. Methods Chem*. 2020; 2020:9857636.
 15. Statland B.E. Clinical decision levels for laboratory tests. Oradell NJ: Medical Economics Books; 1987.
 16. Klimenkova O.A., Berestovskaya V.S., Ivanov G.A., Emanuel A.V. Experience of using hemolysis index as the pre-analytical quality indicator in immunochemical tests. *Vestnik Roszdravnadzora*. 2014; 3: 33-8. (in Russian)
 17. Klimenkova O.A., Berestovskaya V.S., Laricheva E.S. Prevalence of lipemia among outpatients. *Poliklinika*. 2014; 4(1): 8-10. (in Russian)
 18. Stirling K.J., Kaempf J.W., Wang L., Luzzi V.I., McDonald J.V. Overdiagnosis of Newborn Hyperbilirubinemia: A Natural Experiment in Quality Improvement Fundamentals. *Pediatr. Qual. Saf.* 2023; 8(4): e675. DOI: 10.1097/pq9.0000000000000675.