

## Porovnání dvou nejčastějších metod na stanovení celkového bilirubinu u novorozenců

Šálek T.<sup>1</sup>, Macko J.<sup>2</sup>, Šafařík P.<sup>1</sup>, Pšenčík M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Oddělení klinické biochemie, Krajská nemocnice Tomáše Bati, a.s., Havlíčkovo nábřeží 600, 762 75 Zlín, ČR

<sup>2</sup>Oddělení neonatologie, Krajská nemocnice Tomáše Bati, a.s., Havlíčkovo nábřeží 600, 762 75 Zlín, ČR

### SOUHRN

*Cíl:* Porovnat stanovení celkového bilirubinu metodou přímé spektrofotometrie v plné žilní krvi a metodou Jendrassik-Gróf v séru žilní krve u 437 novorozenců narozených v Krajské nemocnici T. Bati ve Zlíně (KNTB).

*Typ studie:* retrospektivní průřezová.

*Metody:* Přímá spektrofotometrie plné žilní krve na analyzátoru ABL 835 firmy Radiometer a spektrofotometrické stanovení v séru žilní krve metodou Jendrassik-Gróf na analyzátoru Architect firmy Abbott. Obě metody mají metrologickou návaznost měření na referenční materiál NIST SRM 916a.

*Výsledky:* Medián (mezikvartilové rozpětí) sérového bilirubinu byl 228  $\mu\text{mol/l}$  (186-263), medián (mezikvartilové rozpětí) bilirubinu v plné žilní krvi byl 237  $\mu\text{mol/l}$  (192-287). Wilcoxonův párový test prokázal statisticky významný rozdíl ( $p < 0,0001$ ). Blandův-Altmanův rozdílový graf a Passing Bablokova regrese ukazují, že především v oblasti koncentrací nad 280  $\mu\text{mol/l}$  měří přímá spektrofotometrie celkového bilirubinu v plné žilní krvi vyšší výsledky než stanovení v séru žilní krve ( $p < 0,0001$ ).

*Závěr:* Při koncentraci bilirubinu nad 280  $\mu\text{mol/l}$  měří přímá spektrofotometrie v plné žilní krvi výrazně vyšší výsledky než stanovení v séru ( $p < 0,0001$ ). Hodnoty nad 280  $\mu\text{mol/l}$  je tedy nutné potvrdit měřením v séru žilní krve v biochemické laboratoři.

*Klíčová slova:* bilirubin, novorozenecká žloutenka, hemolýza, interference.

### SUMMARY

**Šálek T., Macko J., Šafařík P., Pšenčík M.: Comparison of two most frequent methods for the determination of total bilirubin in newborns.**

*Aim:* The aim of the study is to compare determination of total bilirubin by direct spectrophotometric method in whole venous blood and by indirect Jendrassik-Gróf method in venous serum in 437 newborns born in Tomas Bata hospital in Zlin.

*Design:* retrospective cross section design.

*Methods:* Determination of total bilirubin by direct spectrophotometric method in whole venous blood was performed on Radiometer ABL 835 analyzer. Determination of total bilirubin in venous serum by indirect Jendrassik-Gróf was performed on Abbott Architect analyzer. Both methods are metrologically traceable to reference material NIST SRM 916a.

*Results:* The median (interquartile range) of serum venous bilirubin was 228  $\mu\text{mol/L}$  (186-263). The median of venous whole blood total bilirubin was 237  $\mu\text{mol/L}$  (192-287). The significant difference between medians was found ( $p < 0,0001$ ). Bland-Altman plot and Passing-Bablok regression show that direct spectrophotometric method of whole venous blood gave higher results than Jendrassik-Gróf test in venous serum mainly in the concentration range above 280  $\mu\text{mol/l}$  ( $p < 0,0001$ ).

*Conclusions:* Direct spectrophotometric results of total bilirubin in whole venous blood in the concentration range above 280  $\mu\text{mol/l}$  should be confirmed by indirect serum determination in clinical biochemistry laboratory.

*Keywords:* bilirubin, neonatal jaundice, hemolysis, interferences.

## Úvod

Bilirubin je lineární tetrapyrrol, který vzniká v organismu při katabolismu látek obsahující hem. Jedná se především o hemoglobin, myoglobin, cytochromy a katalázu.

Vysoké plazmatické koncentrace celkového bilirubinu mohou poškodit mozek novorozence. Vznikne jádrový ikterus, jeho incidence v České republice je velmi nízká, nicméně stále tato diagnóza existuje. Jádrový ikterus byl v posledních letech referován v industrializovaných zemích Evropy u dětí, porozených do 28. týdne gestace [1,2].

Stanovení celkového bilirubinu hraje základní roli v detekci novorozenecké žloutenky a následně také v monitorování její terapie [3].

Ke stanovení se v praxi nejčastěji používá některá z modifikací metody dle Jendrassika a Grófa publikovaná poprvé v roce 1938. Jedná se o kopulaci bilirubinu s diazotovanou kyselinou sulfanilovou za vzniku azobilirubinu, jehož schopnost absorbovat světlo se využívá při fotometrickém stanovení.

Bilirubin samotný také absorbuje světlo, proto se vyvinuly také metody přímé spektrofotometrie v plné krvi, jejichž výhodou je potřeba malého množství krve, což je u novorozenců obzvláště významné [4].

Pro použití v klinických laboratořích jsou k dispozici také enzymové metody na stanovení bilirubinu, při kterých dochází k oxidaci bilirubinu na biliverdin.

Snaha o minimalizaci bolestivých vjemů u novorozenců vedla k vývoji transkutánních měřících jednotek, tedy neinvazivních, rychlých a bedside použitelných

přístrojů. Na trhu je dostupná řada bilirubinometrů (Bili-check, Bilitest, JM -103, Bilimed). Recentní práce [5-8] popisují korelaci transkutánního měření bilirubinu s hodnotami, naměřenými v séru, a to jak u donošených, tak i předčasně narozených dětí. Obecné závěry zní, že transkutánní bilirubinometrie je spolehlivou metodou stanovení bilirubinu u hodnot do 250  $\mu\text{mol/l}$  a u zralých donošených dětí. Validita transkutánního měření bilirubinu nebyla spolehlivě prokázána u dětí předčasně narozených (do 35. týdne gestace), u hodnot sérového bilirubinu nad 250  $\mu\text{mol/l}$ , u rychlého vzestupu hodnot v prvních 24 hodinách života. Zde se dominantně uplatňuje vyšetření hladiny bilirubinu ze séra (viz. také NHS National Institute for Health and Clinical Excellence: Neonatal Jaundice, 2010, www.nice.org.uk).

V literatuře není mnoho informací o srovnání Jendrasikovy-Grófovy metody, prováděné v klinických laboratořích, a přímé spektrofotometrie v plné krvi, která začíná být dostupná v klinické praxi u lůžka pacienta.

## Stanovení celkového bilirubinu v plné žilní krvi metodou přímé spektrofotometrie

Před vlastním měřením provádí analyzátor hemolýzu krve ultrazvukem. Měření se provádí na 128 vlnových délkách v rozpětí 478-672 nanometrů na analyzátoru ABL 835 od firmy Radiometer při 37 stupních Celsia. Každá vlnová délka má svůj vlastní detektor. Výrobce Radiometer srovnával tuto metodu se standardem, kterým bylo stanovení v plazmě na automatickém biochemickém analyzátoru Hitachi, na kterém byl použit kalibrátor s metrologickou návazností měření na certifikovaný referenční materiál NIST SRM 916a. Ke kalibraci našeho měření byl použit kalibrátor firmy Radiometer katalogové číslo 944-128,9 název Calibration Solution I a II, s čísly šarží LW02, LW05 a RI02. Výhodou této metody je potřeba pouze 35  $\mu\text{l}$  krve.

Analytické parametry obou metod jsou shrnuty v Tabulce 1.

**Table 1:** Analytical performance characteristics of two methods for determination of total bilirubin

Name of analyzer	Architect ci4100		Radiometer ABL 800-835	
Assigned concentration of total bilirubin in the reference material ( $\mu\text{mol/l}$ )	171	291	60	299
Measurement repeatability (coefficient of variation, %)	0.3	0.5	0	0.1
Intermediate measurement precision (coefficient of variation, %)	0.7	0.7	1.2	0.1
Bias (%)	0.9	0.4	0	0.1
Combined standard measurement uncertainty (%)	1.3	1.1	3.2	1.7

## Laboratorní testy

### Pacienti

Studie, která započala od poloviny prosince 2013, porovnávala obě metody stanovení celkového bilirubinu z jednoho vzorku žilní krve u 437 novorozenců. Pro minimalizaci vlivu preanalytické fáze doba obou analýz byla do 30 minut od odběru. Studie byla schválena Etickou komisí Krajské nemocnice T. Bati a. s.

### Stanovení celkového bilirubinu v séru žilní krve metodou Jendrasik-Gróf

Jedná se o metodu na principu kopulace bilirubinu s diazočinidlem v kyselém prostředí. Diazočinidlem je diazotovaná kyselina sulfanilová, která vzniká reakcí kyseliny sulfanilové s dusitanem sodným v prostředí kyseliny solné. Nekonjugovaný bilirubin je nejprve uvolněn pomocí akcelérátoru z vazby na albumin. Akcelérátorem je kofein, benzoan sodný, chelaton 3 a octan sodný. Celkový bilirubin poté kopuluje v silně kyselém prostředí s diazotovanou kyselinou sulfanilovou za vzniku červeného azobilirubinu, jehož absorbance se měří při 546 nanometrech. Jako kalibrátor byl použit kalibrátor od firmy Abbott s metrologickou návazností měření na certifikovaný referenční materiál NIST SRM 916a, katalogové číslo 1E66-04, název Bilirubin Calibrator, s čísly šarží 27267M500 a 35194M500. Reagencie jsou od firmy Erba Lachema katalogové číslo BLT00012, název Bilirubin total Jendrasik Grof, čísla šarží 112812 a 115113. Měření se provádělo na analyzátoru Architect firmy Abbott.

Na analýzu je potřebný objem 150  $\mu\text{l}$  plné krve.

## Statistické testy

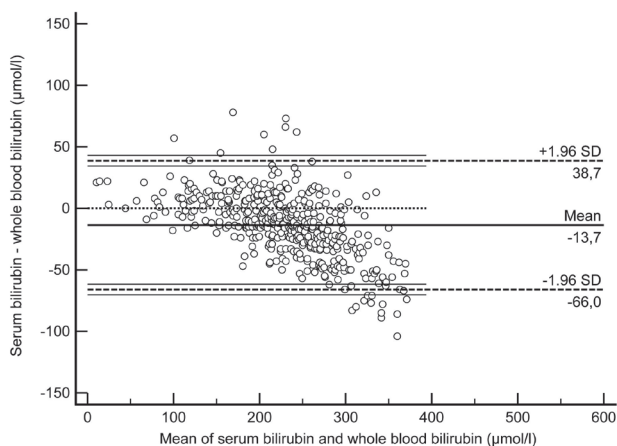
D'Agostino-Pearson test odmítl normální rozložení stanovených koncentrací bilirubinu ( $P < 0,0001$ ), proto byly použity neparametrické testy. K porovnání mediánů byl použit párový Wilcoxonův test. Blandův-Altmanův rozdílový graf a Passing-Bablokova regrese byly použity ke grafickému zobrazení rozdílů mezi dvěma metodami měření bilirubinu. Spearmanův pořadový korelační koeficient byl použit pro korelační analýzu.

## Výsledky

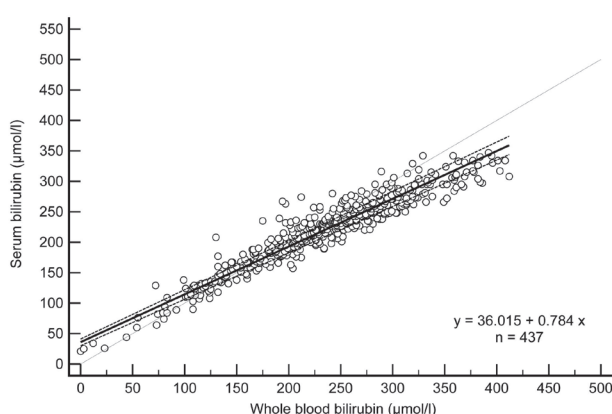
Medián (mezikvartilové rozpětí) sérového bilirubinu byl 228  $\mu\text{mol/l}$  (186-263), medián (mezikvartilové rozpětí) bilirubinu v plné krvi byl 237  $\mu\text{mol/l}$  (192-287). Wilcoxonův párový test prokázal mezi mediány statisticky významný rozdíl ( $p < 0,0001$ ). Mezi metodami byl nalezen Spearmanův korelační koeficient 0,939 ( $p < 0,0001$ ). Blandův-Altmanův rozdílový graf (obr. 1) a Passing Bablokova regrese (obr. 2) ukazují, že v oblasti koncentrací nad 280  $\mu\text{mol/l}$  měří přímá spektrofotometrie celkového bilirubinu v plné žilní krvi výrazně vyšší výsledky než stanovení v séru žilní krve ( $p < 0,0001$ ).

## Diskuse

Je známou skutečností, že hemoglobin negativně ovlivňuje měření koncentrace celkového bilirubinu metodami založenými na diazo reakci [9]. Ve své



**Fig. 1.** Bland-Altman plot for comparison of serum venous total bilirubin and whole blood venous total bilirubin



**Fig. 2.** Passing-Bablok regression for comparison of serum venous total bilirubin and whole blood venous total bilirubin

**Table 2:** Strengths and limitations of measurement systems

Method	Radiometer, whole venous blood	Architect, venous serum
Results availability	Immediate	Less than 30 minutes
Sample volume	35 µl	150 µl
Measuring range	Possible errors over 280 µmol/L	Full concentration range
Influence of light on total bilirubin	No influence	Decreased concentration

původní vědecké práci došli ke stejným výsledkům také čeští autoři [10].

V naší kohortě novorozenců byl větší medián z plné žilní krve. Tuto skutečnost naše výsledky vysvětlit nedokážou. Příčinou může být již oblast vysokých měřených koncentrací bilirubinemií.

Pro novorozence je obrovskou výhodou odběr malého objemu krve. Na stanovení hladiny bilirubinu na analyzátoru ABL 835 Flex od firmy Radiometer je potřeba pouhých 35 mikrolitrů krve. Nevýhodou kapilárního odběru krve je možná příměs tkáňového moku s následným zkreslením výsledků. Je také diskutováno, zda není žilní odběr méně bolestivý [11]. Menší bolestivost žilního odběru je také důvodem tohoto typu odběru v KNTB.

Na novorozeneckém oddělení KNTB je od roku 2007 zaveden protokol prevence procedurální bolesti podáním roztoku sacharózy v koncentraci 25 % před

a v průběhu každého bolestivého výkonu, kterým kapilární či žilní odběr bezesporu je. Při stanovení bilirubinu je nutné mít na paměti, že bilirubin se rozkládá na denním světle, a proto je nutné provést stanovení co nejdříve od odběru. Okamžité provedení analýzy ihned po odběru je důvodem, proč není metoda přímé spektrofotometrie ovlivněna světlem. V komplexním pohledu na bezpečí pacienta je nutné brát v úvahu celý proces, včetně správného označení odběrových nádobek, aby nedošlo k záměně identifikace pacienta [12]. Zajímavým zjištěním v této práci je nález výrazně pozitivního bias přímé spektrofotometrie u pacientů s hodnotami bilirubinémie nad 280 µmol/l. V literatuře jsme podobné výsledky nenašli. Protože byla obě měření provedena z jednoho vzorku žilní krve a měření byla provedena do 30 minut, je pravděpodobné, že rozdíl mezi výsledky měření je spíše analytický. Výrobce nám bližší vysvětlení nebyl schopen poskytnout. Na rozdílnost výsledků obou metod může mít určitý vliv také strmější směrnice kalibrační křivky na analyzátoru Radiometer ABL oproti druhé metodě. V případě diagnostiky a monitorování novorozenecké hyperbilirubinémie je tedy nutné si uvědomit výhody a nevýhody jednotlivých metod, které shrnuje Tabulka 2.

## Závěr

V oblasti bilirubinémie nad 280 µmol/l dává měření přímou spektrofotometrií z plné žilní krve často výrazně pozitivní výsledky. Takto vysoké koncentrace je nutné ověřit stanovením v séru žilní krve v biochemické laboratoři.

## Literatura

1. **Bhutani, V. K., Johnson, L.** Kernicterus in the 21<sup>st</sup> century: frequently asked questions. *J. Perinatol. [online]*, 2009, roč. 29 Suppl. 1, p. S20–24. Dostupné z: doi:10.1038/jp.2008.212
2. **Kaplan, M., Bromiker, R., Hammerman, C.** Severe neonatal hyperbilirubinemia and kernicterus: are these still problems in the third millennium? *Neonatology [online]*, 2011, vol. 100, iss. 4, p. 354–362. Dostupné z: doi:10.1159/000330055
3. Health, National Collaborating Centre for Women and Children's. *CG98 Neonatal jaundice: full guideline. NICE [online]*, [vid. 3. únor 2014]. Dostupné z: <http://www.nice.org.uk/>
4. **Borgard, J., Szymanowicz, A., Pellae, I., Szmídt-Adjídé, V., Rota, M.** Determination of total bilirubin in whole blood from neonates: results from a French multicenter study. *Clin. Chem. Lab. Med. [online]*, 2006, vol. 44, iss. 9, p. 1437–4331. Dostupné z: doi:10.1515/CCLM.2006.202

5. **Bertini, G., Pratesi, S., Cosenza, E., Dani, C.** Transcutaneous bilirubin measurement: evaluation of Billitest. *Neonatology [online]*, 2008, vol. 93, iss. 2, p. 101–105. Dostupné z: doi:10.1159/000107351
6. **Kaynak-Türkmen, M., Aydoğdu, A., Gökbulut, C., Yenisey, C., Söz, O., Cetinkaya-Cakmak, B.** Transcutaneous measurement of bilirubin in Turkish newborns: comparison with total serum bilirubin. *Turk. J. Pediatr.*, 2011, vol. 53, iss. 1, p. 67–74.
7. **Kazmierczak, S., Robertson, A., Briley, K., Kreamer, B., Gourley, G.** Transcutaneous measurement of bilirubin in newborns: comparison with an automated Jendrassik-Grof procedure and HPLC. *Clin. Chem. [online]*, 2004, vol. 50, iss. 2, p. 433–435. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2003.027326
8. **Raimondi, F., Lama, S., Landolfo, F., Sellitto, M., Borrelli, A., Maffucci, R., Milite, P., Capasso, L.** Measuring transcutaneous bilirubin: a comparative analysis of three devices on a multiracial population. *BMC Pediatr. [online]*, 2012, vol. 12, p. 70. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2431-12-70
9. **Koseoglu, M., Hur, A., Atay, A., Cuhadar, S.** Effects of hemolysis interferences on routine biochemistry parameters. *Biochem. Med. (Zagreb)*, 2011, vol. 21, iss. 1, p. 79–85.
10. **Procházka, J., Bořecká, K., Lánská, V.** Vliv hemolýzy na stanovení celkového a přímého bilirubinu. *Klin. Biochem. Metab.*, 2013, vol. 21 (42), iss. 4, p. 215–219.
11. **Larsson, B., Nörstmo, A., Guthenberg, C., Olsson, G., Danielsson, P., Hagenfeldt, L., Elander, G., Larsson, A.** The routine sampling procedure for PKU should be changed. Venous puncture is less painful than heel lancing. *Läkartidningen*, 1997, vol. 94, iss. 49, p. 4625–4628.
12. **Friedecký, B.** Kvalita v klinické laboratoři a bezpečnost pacientů. *Klin. Biochem. Metab.*, 2010, vol. 18 (39), iss. 2, p. 136–143.

Do redakce došlo 15. 6. 2014

*Adresa pro korespondenci*  
 MUDr. Tomáš Šálek, Ph.D.  
 Záhumení 789  
 687 22 Ostrožská Nová Ves  
 e-mail: tsalek@seznam.cz