

นิพนธ์ต้นฉบับ

# การทวนสอบประสิทธิภาพการตรวจบิลิรูบินในทารกแรกเกิดด้วยเครื่อง Bilirubinometer

สุธีรัตน์ ศรีสุภลักษณ์ วทม.\*

**Abstract**      **Bilirubinometer Performance Verification in newborn plasma.**  
**Suteerat srisupaluk M.Sc.\***

\* Department of Clinical Pathology, Prapokkklao Hospital, Chanthaburi, Thailand  
*J Prapokkklao Hosp Clin Med Educat Center 2008;25:(Suppl):66s-71s.*

- Background** : A rapid serum bilirubin measurement was useful in hyperbilirubinemia treatment for decrease bilirubin level and protect kernicterus disease.
- Objective** : To evaluate the performance verification of Bilirubinometer in analysis of newborn plasma.
- Method** : A total of 65 newborns blood sampling at Prapokkklao Hospital and district hospitals in Chanthaburi province. Measurable bilirubin were obtained by Bilirubinometer and SYNCHRON LX<sup>®</sup> i 725 chemistry analyzer (Accuracy study). Precision was analysed by within-run and between-run 20 times. Linearity was analysed by diluted the high and low level bilirubin of plasma.
- Result** : For regression analysis, it was found that regression coefficient of these two methods was 0.984. Statistic analysis of the Bilirubinometer showed agreement with SYNCHRON LX<sup>®</sup> i 725 chemistry analyzer. For within-run precision test studies showed mean, SD, %CV were 17.510, 0.04, 0.26, respectively. For between-run precision test studies showed mean, SD, %CV were 17.575, 0.16, 0.92, respectively. The highest of linearity was 17.9 mg/dL.
- Conclusion** : Bilirubinometer had high efficiency. The procedure determined was accurate, precise and rapid. The highest of linearity was 17.9 mg/dL.

## บทนำ

บิลิรูบิน (bilirubin) เกิดจากการสลายตัวของฮีโมโกลบิน (Heme) ซึ่งเป็นผลมาจากการสลายตัวของเม็ดเลือดแดง บิลิรูบินที่เพิ่มขึ้นในเลือดนำไปสู่การเกิดภาวะเหลือง (jaundice) บิลิรูบินที่มีในเลือดเด็กเป็นรูป

unconjugated ซึ่งจับกับ albumin 95 เปอร์เซ็นต์ และ มีรูป conjugated (ละลายน้ำได้) น้อยมาก (น้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์) ทารกแรกเกิดที่มีความผิดปกติต่าง ๆ เช่น มีความผิดปกติของหมู่เลือด ABO หรือ Rh factor เข้ากันไม่ได้ ขาด enzyme glucose-6-phosphate-

\* กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลพระปกเกล้า จังหวัดจันทบุรี

dehydrogenase หรือเด็กคลอดก่อนกำหนด เหล่านี้เป็นสาเหตุทำให้เกิดภาวะบิลิรูบินในเลือดสูง (hyperbilirubinemia) ผู้ป่วยเด็กที่มีค่าบิลิรูบินสูงกว่า 17.5 mg/dl เป็นเวลานานอาจเกิดพยาธิสภาพต่อสมองเกิดภาวะ Kernicterus โดย unconjugate bilirubin เข้าไปที่เซลล์สมอง ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ เมื่อเซลล์สมองตายสมองจะไม่สามารถพัฒนาได้ตามปกติ ทำให้เด็กปัญญาอ่อนซึ่งแพทย์จะทำการปฏิบัติรักษาโดยให้แสงไฟบำบัด (phototherapy) หรือถ่ายเลือด (blood transfusion) แล้วแต่ความรุนแรงของโรค โดยติดตามระดับบิลิรูบินในพลาสมาจนกว่าระดับบิลิรูบินลดลงอยู่ในระดับปกติ (5-8mg/dl)<sup>1,2</sup> ดังนั้นเพื่อให้ทารกแรกเกิดที่มีภาวะบิลิรูบินสูงในเลือดได้รับการรักษาที่เหมาะสมทันเวลาที่ การตรวจวัดบิลิรูบินได้อย่างมีประสิทธิภาพ คือได้ผลการตรวจถูกต้องและรวดเร็ว จึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง

ปัจจุบันการตรวจวัดบิลิรูบินในทารกแรกเกิดแบ่งได้เป็น 3 แบบใหญ่ ๆ แบบที่หนึ่งคือใช้เครื่องวัดบิลิรูบินโรงพยาบาลใหญ่บางแห่งมีเครื่องวัดบิลิรูบินผ่านผิวหนัง (transcutaneous bilirubin) ซึ่งมีข้อดี คือ เป็นวิธีตรวจวัดที่ไม่ต้องเจาะเลือด แต่มีข้อเสียคือความสัมพันธ์จากค่าที่ได้จากเครื่องมือและค่าที่ได้จากการตรวจวัดในซีรัมอาจไม่สอดคล้อง หากคนไข้ได้รับแสงเพื่อการรักษาขณะที่โรงพยาบาลใหญ่จำนวนมากใช้เครื่อง Bilirubinometer วัดบิลิรูบินจากพลาสมาโดยตรง แบบที่สองคือการตรวจวัดบิลิรูบินแบบไม่ใช้สารเคมี (non-chemical photometric measurement) คือการตรวจความเข้มข้นของบิลิรูบินในตัวทำละลายโดยเครื่อง HPLC และสุดท้ายเป็นการตรวจวัดโดยใช้เครื่องมือในห้องปฏิบัติการวัดความเข้มแสงที่บิลิรูบินเกิดขึ้นหลังปฏิกิริยาทางเคมี<sup>3</sup> ซึ่งตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจหาสารเคมีชนิดอัตโนมัติ (Automatic Chemistry Analyzer) หรือด้วยเครื่อง spectrophotometer

ปัจจุบันกุมารแพทย์ร่วมกับห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลพระปกเกล้าประชุมมีมติร่วมกันเลือกใช้วิธีตรวจวัดปริมาณ total bilirubin ในทารกแรกเกิด ด้วยเครื่อง Bilirubinometer เนื่องจากสะดวกในการตรวจ

วัดได้เร็วและใช้ตัวอย่างเลือดน้อย เพียงเจาะเลือดใส่หลอด capillary ที่เคลือบด้วย heparin อย่างน้อย 2 หลอด ขณะที่ถ้าตรวจด้วยเครื่องตรวจหาสารเคมีชนิดอัตโนมัติ ต้องใช้ถึง 6 หลอด เพื่อความมั่นใจในประสิทธิภาพของเครื่อง Bilirubinometer ที่ใช้ในโรงพยาบาลพระปกเกล้า การศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพการวัดบิลิรูบินด้วยเครื่อง Bilirubinometer เทียบกับเครื่องตรวจหาสารเคมีชนิดอัตโนมัติ SYNCHRON LX<sup>®</sup>i 725

## วัสดุและวิธีทดลอง

1. ตัวอย่างเลือดจากทารกแรกเกิดที่แพทย์ต้องการตรวจภาวะเหลืองทั้งในโรงพยาบาลพระปกเกล้า และโรงพยาบาลชุมชนในจังหวัดจันทบุรี จำนวน 65 ราย เตรียมเป็น Non-hemolytic heparinized plasma โดยการเจาะเลือดจากเส้นท่อน้ำเด็กโดยเทคนิคปราศจากเชื้อใส่หลอด capillary ที่เคลือบด้วย heparin ที่ใช้สำหรับตรวจฮีมาโตคริต นำไปปั่นโดยเครื่องฮีมาโตคริตใช้ตรวจทันที หลีกเลี่ยงการถูกแสงเพราะ unconjugated bilirubin เสื่อมง่ายเมื่อถูกแสง

2. Standard solution ST checker ERMA CODE No. 04-607-2 5 ml 17.5 ± 1 mg/dl

### วิธีการตรวจ

การตรวจวัดบิลิรูบินด้วยเครื่อง Bilirubinometer ตรวจวัด total bilirubin ด้วยเครื่อง Bilirubinometer ERMA B-105 (ประเทศญี่ปุ่น) เป็นการวัดพลาสมาโดยตรงไม่ต้องเจือจางตัวอย่าง โดยอาศัยการดูดกลืนแสงของบิลิรูบินที่ความยาวคลื่น 455 นาโนเมตร และหักลบการดูดกลืนแสงจากสารรบกวนตัวอื่นที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เป็นส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของบิลิรูบินในพลาสมา โดยแสดงความเข้มข้นที่หน้าจอในหน่วย mg/dl วิธีนี้มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% coefficient of variation; %CV) แบบ within-run และ between-run เท่ากับ 2.61 และ 1.98 ตามลำดับ และมีค่าความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 24 mg/dl ช่วงรายงานผลอยู่ระหว่าง 6-24 mg/dl การตรวจวัดวิธีนี้ใช้เวลาประมาณ 7 วินาทีต่อราย

(ข้อมูลจากบริษัทผู้ผลิต)

**การตรวจวัดบิลิรูบินด้วยเครื่องตรวจหาสารเคมีชนิดอัตโนมัติ**

ตรวจวัด total bilirubin ด้วยเครื่อง SYNCHRON LX<sup>®</sup> i 725 โดยหลักการนำยา Total bilirubin ทำปฏิกิริยาทางเคมีกับ total bilirubin ในซีรัมหรือพลาสมา และวัดด้วยวิธี timed endpoint Diazo method วิธีนี้ %CV แบบ within-run และ between-run เท่ากับ ร้อยละ 3.0 และร้อยละ 4.5 ตามลำดับ และมีค่าความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 30 mg/dl ช่วงรายงานผลอยู่ระหว่าง 0.1-30.0 mg/dl (ข้อมูลจากบริษัทผู้ผลิต)

**การตรวจหาความแม่นยำ (Precision) ของวิธีวิเคราะห์**

นำ Standard solution ST checker ERMA มาตรวจวัดด้วยเครื่อง Bilirubinometer ในเวลาเดียวกัน (within-run) 20 ครั้ง และตรวจวัดทุกวัน (between-run) 20 ครั้ง หาค่า mean, SD, %CV

**การตรวจหาความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์**

นำตัวอย่างเลือดทารกแรกเกิด 65 ตัวอย่าง มาตรวจหาระดับ total bilirubin ด้วยเครื่อง Bilirubinometer และเครื่อง SYNCHRON LX<sup>®</sup> i 725 นำข้อมูลที่ได้มาทำ comparative study หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ค่า slope, ค่า intercept และสูตรสมการความถดถอย โดยใช้ pearson correlation และใช้ simple linear regression

**การตรวจหาความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของวิธีวิเคราะห์<sup>4</sup>**

นำพลาสมาของตัวอย่างเลือดทารกแรกเกิดที่ตรวจวัดระดับ total bilirubin ด้วยเครื่อง SYNCHRON LX<sup>®</sup> i 725 จำนวน 2 ตัวอย่างที่มีค่า 21.7 และ 4.1 mg/dl มาผสมให้เข้ากันในอัตราส่วน 1:0, 3:1, 1:1, 1:3 และ 0:1 จากนั้นนำตัวอย่างแต่ละ dilution มาตรวจวัดระดับ total bilirubin 3 ครั้ง ด้วยเครื่อง Bilirubinometer หาค่าเฉลี่ย นำข้อมูลที่ได้มา plot กราฟ Expected value ที่ได้จากการวัดระดับ total bilirubin ด้วยเครื่อง

SYNCHRON LX<sup>®</sup> i 725 อยู่แทน X Average value ที่ได้จากการวัดระดับ total bilirubin ด้วยเครื่อง Bilirubinometer อยู่แทน Y

**ผลการศึกษา**

ผลการตรวจหาความแม่นยำ (precision) ของวิธีวิเคราะห์ total bilirubin ด้วยเครื่อง Bilirubinometer พบว่ามีความแม่นยำดี ดังแสดงในตารางที่ 1

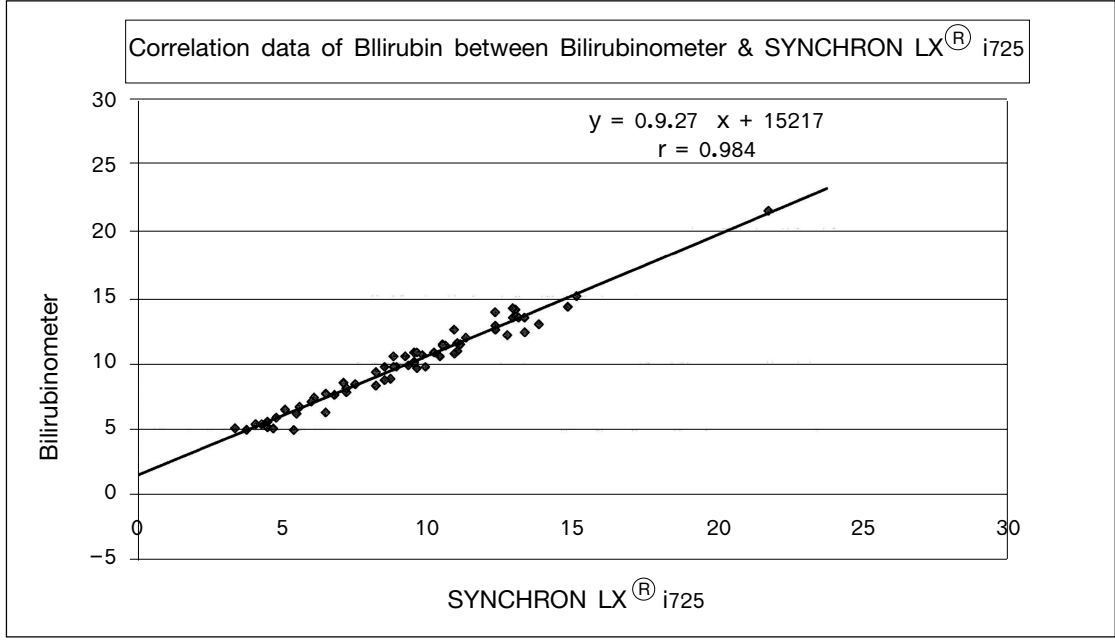
**ตารางที่ 1** แสดงความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

ครั้งที่	Bilirubinometer (mg/dl)	
	Within run	Between run
1	17.5	17.2
2	17.5	17.4
3	17.5	17.4
4	17.5	17.4
5	17.5	17.4
6	17.5	17.5
7	17.5	17.5
8	17.5	17.5
9	17.5	17.5
10	17.5	17.6
11	17.5	17.6
12	17.5	17.7
13	17.5	17.7
14	17.5	17.7
15	17.5	17.7
16	17.5	17.7
17	17.5	17.7
18	17.5	17.7
19	17.5	17.8
20	17.7	17.8
Mean	17.510	17.575
SD	0.04	0.16
%CV	0.26	0.92

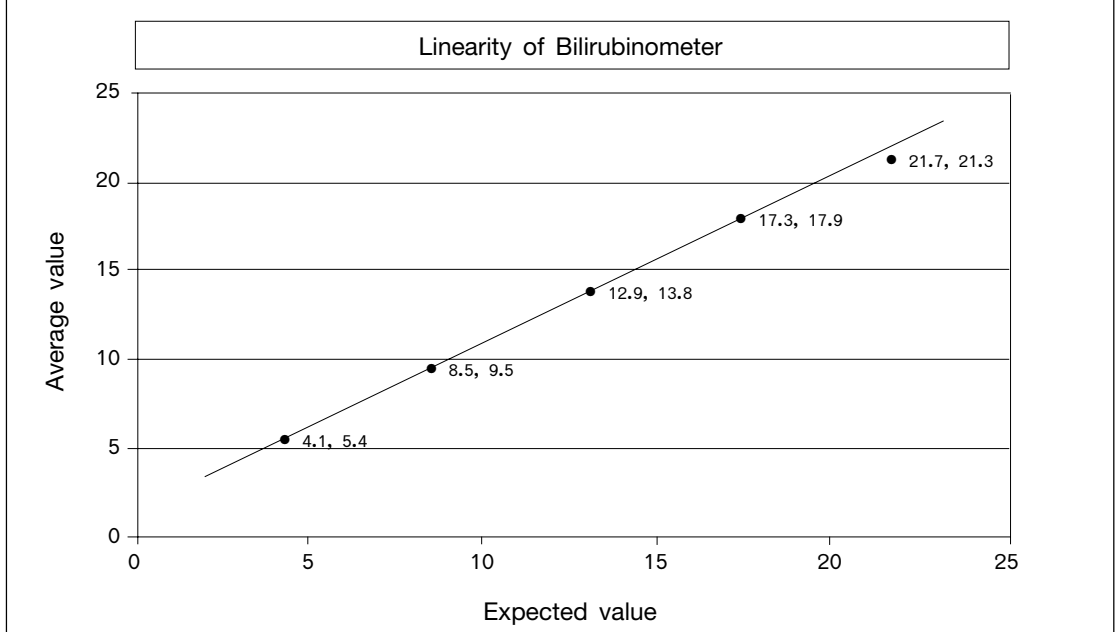
ผลการตรวจหาความถูกต้อง (accuracy) ของค่า total bilirubin ที่วัดด้วยเครื่อง Bilirubinometer เทียบกับเครื่อง SYNCHRON LX<sup>®</sup> i 725 พบว่ามีความสัมพันธ์กันดีด้วยค่า  $r = 0.984$  โดยตัวอย่างส่วนใหญ่มีค่า total bilirubin อยู่ระหว่าง 5 - 15.0 mg/dl

ดังแสดงในกราฟที่ 1 ผลการตรวจหาความเป็นเส้นตรง (linearity) ของวิธีวิเคราะห์ total bilirubin ด้วยเครื่อง Bilirubinometer พบว่าการตรวจหาปริมาณ total bilirubin มีความเป็นเส้นตรงไม่น้อยกว่า 17.9 mg/dl ดังแสดงในกราฟที่ 2

กราฟที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ของความถูกต้อง (accuracy) จากการวัดด้วยเครื่อง Bilirubinometer กับ LX<sup>®</sup> i 725



กราฟที่ 2 แสดงความเป็นเส้นตรง (linearity) ของวิธีวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Bilirubinometer



## บทวิจารณ์

การทวนสอบประสิทธิภาพเครื่องตรวจวัด Bilirubinometer ของโรงพยาบาลพระปกเกล้า พบว่ามีประสิทธิภาพดีโดยมีความแม่นยำ (precision) ดี มีค่า %CV within-run และ between-run 0.26, 0.92 ตามลำดับ น้อยกว่าค่าของบริษัทที่ให้มา และมีความแม่นยำใกล้เคียงกับการวัดปริมาณ total bilirubin ด้วยเครื่อง Olympus AU400 (ค่า %CV within-run และ between-run 0.34, 0.038 ตามลำดับ)<sup>5</sup> มีความแม่นยำกว่าวิธี manual วัดด้วยเครื่อง photometer (ค่า %CV within-run และ between-run 1.83, 2.15 ตามลำดับ)<sup>6</sup> มีความถูกต้อง (accuracy) ดี ค่า total bilirubin ที่วัดจากเครื่อง Bilirubinometer เทียบกับเครื่อง SYNCHRON LX<sup>®</sup> i725 มีความสัมพันธ์กันดีด้วยค่า  $r = 0.984$  โดยตัวอย่างส่วนใหญ่มีระดับ total bilirubin อยู่ในช่วง 5 - 15.0 mg/dl สอดคล้องกับการวัดเทียบกับเครื่องอัตโนมัติอื่น ๆ ได้แก่ นพดลและคณะได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการตรวจวัด total bilirubin ด้วยเครื่อง Vitros พบว่ามีความสัมพันธ์กันดีด้วยค่า  $r = 0.93$  โดยตัวอย่างส่วนใหญ่มีระดับ total bilirubin อยู่ในช่วง 10.1 - 13.0 mg/dl<sup>7</sup> และผลการศึกษาความเป็นเส้นตรง (linearity) ของวิธีวิเคราะห์ total bilirubin ด้วยเครื่อง Bilirubinometer พบว่ามีความเป็นเส้นตรงไม่น้อยกว่า 17.9 mg/dl ซึ่งครอบคลุมค่าวิกฤติ 17.5 mg/dL ที่อาจทำให้เด็กเป็นโรค Kernicterus อย่างไรก็ตามแม้เครื่องตรวจวัดบิลิรูบินจะมีประสิทธิภาพดีหากเก็บรักษาตัวอย่างตรวจไม่ดีก็อาจทำให้ค่าบิลิรูบินต่ำกว่าระดับบิลิรูบินในผู้ป่วยได้ มีรายงานว่ากรณีที่ซีรัมโดนแสงโดยตรงจะทำให้ค่าบิลิรูบินลดลง 50% ใน 1 ชั่วโมง ดังนั้นสิ่งส่งตรวจบิลิรูบินควรเก็บในที่มืดไม่ให้โดนแสงฟลูออเรสเซนต์รวมทั้งแสงอาทิตย์ทั้งทางตรงและทางอ้อมโดยเฉพาะซีรัมที่อยู่ใน capillary tube ควรทำการตรวจโดยเร็ว การเก็บรักษาซีรัมในที่มืดจะสามารถเก็บได้หลายสัปดาห์ในตู้เย็น และเมื่อแช่แข็งจะเก็บไว้ได้นาน 3 เดือน<sup>8</sup> อนึ่งการตรวจวัด total bilirubin ด้วยเครื่อง Bilirubinometer ใช้วิธี direct spectrophotometric method ซึ่งเป็นวิธีการวัดสีของ

บิลิรูบินโดยตรง วิธีนี้จะมีข้อผิดพลาดในกรณีที่ตัวอย่างขุ่น (turbid), มีเม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis) และสารที่มีสีเหลืองในตัวอย่าง (yellow lipochrome pigments) จะทำให้ค่า total bilirubin สูงกว่าความเป็นจริง จึงเหมาะสำหรับการวัด บิลิรูบินในทารกแรกเกิดซึ่งไม่มีสารพวก lipochrome pigments เช่น carotene และซีรัมไม่ขุ่น สามารถวัดการดูดกลืนแสงโดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์โดยตรงได้ เหมาะสำหรับการวัด total bilirubin ในทารกอายุไม่เกิน 2 - 3 เดือน กรณีที่เด็กอายุเกิน แนะนำให้ใช้วิธี diazo-colorimetric และวิธีนี้ไม่สามารถวัดในซีรัมผู้ใหญ่ได้<sup>9,10</sup>

การทวนสอบประสิทธิภาพของวิธีการทดสอบเป็นสิ่งจำเป็นตามมาตรฐาน ISO15189:2003 เพื่อให้ผลการตรวจถูกต้องนำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยได้ ดังนั้นผลการศึกษาครั้งนี้คาดว่าจะสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเพื่อประกอบการเลือกใช้วิธีการตรวจวัดบิลิรูบินที่เหมาะสมในห้องปฏิบัติการต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิกทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ ร่วมมือ และสนับสนุนข้อมูล จนทำให้บรรลุวัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้

## เอกสารอ้างอิง

1. โครงการประกันคุณภาพทางเคมีคลินิกโดยองค์กรภายนอก. สารชีวเคมีในเด็ก. ข่าวสารคุณภาพทางเคมีคลินิก พฤษภาคม 2540 ฉบับที่ 125
2. รุจามา นิมสังข์. บิลิรูบินระดับสูงผิดปกติในเด็กแรกเกิดและเคอนิกเตอร์ส. การประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่องความก้าวหน้าของความรู้เรื่องบิลิรูบินและการฝึกปฏิบัติการ. แขนงวิชาเคมีคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2550:9-13

3. วารุณี คำสายใย.วิธีวิเคราะห์ที่มีประโยชน์ในการตรวจหาปริมาณบิลิรูบินในซีรัม. การประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่องความก้าวหน้าของความรู้เรื่องบิลิรูบินและการฝึกปฏิบัติการ. แขนงวิชาเคมีคลินิกภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2550:21-4.
4. NCCLS EP9-A2 : Method comparison and bias estimation using patient samples. Approved Guideline,1999. NCCLS, PA, USA.
5. รุจามา นิมสังข์, ขจรศักดิ์ ตระกูลพั้ว, กัญญาปรีชาศุทธิ์, วารุณี คำสายใย, วัลลภ เพชรดี. การผลิตชุดน้ำยาวิเคราะห์บิลิรูบินในซีรัมโดยใช้เอนไซม์ bilirubin oxidase. JMed Tech Assoc Thailand 2006;34:1686-99.
6. กชกร ทองสุขแก้ง. การศึกษาเปรียบเทียบการวัดระดับบิลิรูบินในทารกแรกเกิดโดยวิธี DCA และวิธีใช้เครื่องโฟโตมิเตอร์โดยตรง. JMed Tech Assoc Thailand 2004;32:728-36.
7. นพดล ทับเปรม, จุรีรัตน์ ดาดวง, เรวัตร์ ทักษิณะ-มณี, ลี้มทอง พรหมดี. การศึกษาเปรียบเทียบการตรวจวัดบิลิรูบินในเด็กแรกคลอด 3 วิธีที่ใช้ในงานประจำ. JMed Tech Assoc Thailand 2007; 35:1868-76.
8. Tietz NW. Methods for evaluation of liver function, in Fundamentals of Clinical Chemistry, Tietz NW. Editor. 1982, W.B. Saunders company : Philadelphia. p.1035-49.
9. Fody EP. Liver function in Clinical Chemistry principles, procedures, correlations, E.P.F. Michael LB., Larry ES. Editor. LippincottWilliam &Wilkins : Philadelphia. 2005;p.475-91.
10. Doumas BT. and Wu TW. The measurement of bilirubin fractions in serum.Crit Rev Clin Lab Sci,1991;28:415-45.