

Yenidoğanda Total Bilirubin Analizinde Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması

The Comparison of the Different Methods in Total Bilirubin Determination in the Newborn

Cevval Ulman* Fatma Taneli* Melek Revanlı**
Huri Yıldırım* Bekir Sami Uyanık*

*Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı, Manisa

**Moris Şinasi Çocuk Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı, Manisa

ÖZET

Yenidoğanda uygulanan total bilirubin analizi, hiperbilirubineminin tanı ve tedavisini yönlendiren önemli bir parametredir. Bu çalışmanın amacı, yenidoğan bilirubin tayininde kullanılan bilirubinometre (Wako) (I.), sıvı sistem (Merck Mega) (II.) ve kuru sistem (Vitros 750) (III.) yöntemleriyle elde edilen değerlerin karşılaştırılmasıdır. Moris Şinasi Çocuk Hastanesi'ne yenidoğan sarılığı nedeniyle ardışık başvuran 19 yenidoğan çalışmaya alınmıştır. Laboratuvara gelen venöz kan örneğinden birinci, ikinci ve üçüncü metotlar kullanılarak aynı gün ve bekletilmeden 3 ayrı ölçüm yapılmıştır. Her bir örnekten bu 3 yöntemle bilirubin tayini yapılarak elde edilen sonuçların ortalaması alınarak en doğru değer (IV.) olarak kabul edilmiştir. Bu 4 değer arasındaki korelasyonlar anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$). En yüksek korelasyonun ($r=0.980$) dördüncü ile ikinci sonuçlar arasındaki olduğu görülmektedir. Bu 19 örnek arasından yalnızca bilirubin değerleri 10 mg/dL üzerinde bulunan 10 örneğin ortalama değerleri (IV. değerleri) ele alınarak her 3 yöntemle elde edilen sonuçlar tekrar aynı gün karşılaştırıldığında ise, en yüksek korelasyonun ($r=0.974$) bu kez dördüncü değer ile üçüncü yöntemle elde edilen değerler arasında olduğu saptanmıştır.

Sonuç olarak, yeni doğanda total bilirubin tayininde çok noktalı kalibrasyon yöntemi kullanıldığında her 3 yöntem de güvenlidir; ancak, yüksek bilirubin düzeylerinde en yüksek korelasyon katsayısını ($r=0.974$) göstermesi nedeniyle kuru sistemin (III.) en güvenli sonuçları verdiği kanısındayız.

Anahtar Sözcükler: Yenidoğan, hiperbilirubinemi, yöntem

ABSTRACT

Total bilirubin assessments are essential in identifying the etiology of jaundice, in predicting its evolution, and in managing treatment in the newborn. The aim of this study was to compare the results obtained by bilirubinometer WAKO (1st), centrifugal auto analyzer Merck Mega (2nd) and discrete analyzer with dry slide technology Vitros 750 (3rd) methods.

The study group comprised 19 consecutive newborns admitted to Moris Şinasi Children's Hospital, with neonatal hyperbilirubinemia. The venous samples were assessed in the same day without delay. In each sample bilirubin was assessed by these 3 methods, in addition to these 3 values, the average value (4th) of all three assessments was taken as the most acceptable value. Correlations between these 4 values were found highly significant ($p < 0.0001$). It was seen that the highest correlation

Bu çalışma daha önce III. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresinde (30 Nisan-5 Mayıs 2003, İzmir) poster olarak sunulmuştur

($r=0.980$) achieved was between the 4th and the 2nd values; however, when only 10 out of 19 samples with the bilirubin level higher than 10 mg/dL were taken into consideration, the highest correlation ($r=0.974$) achieved was seen to be between the 4th and the 3rd.

In conclusion, in assessing total bilirubin level in neonatal jaundice when multiple point calibration is used all the above mentioned 3 methods are found reliable. However, since 3rd gives the highest correlation coefficient ($r=0.974$) at high serum bilirubin levels, we believe that, discrete analyzer with dry slide technology could be used most confidently for bilirubin analysis.

Key Words: Newborn, hyperbilirubinemia, method

GİRİŞ

Yeni doğan bebeklerde uygulanan total bilirubin analizi, hiperbilirubineminin tanı ve tedavisini yönlendiren önemli bir parametredir. Yenidoğan bilirubin analizinde en hassas ve en güvenilir, aynı zamanda hızlı ve en az numune gerektiren yöntem arayışı bir çok çalışmaya konu olmaktadır (12,3,4). Serumda bilirubin miktarının doğru tespiti gerekmekte ancak, klinik laboratuvarlarda rutin olarak kullanılan yöntemlerin sonuçları arasında zaman zaman anlamlı farklılıklar oluşabilmektedir. Örneğin, göbek kordonundan alınan numuneden ve frontal analiz yöntemiyle yapılan tetkikler zor veya güvenilir bulunmadığından rutin kullanım alanı bulamamıştır (3,5). Bu durum özellikle fototerapi uygulanan bebeklerde tedavinin takibinde karışıklıklara yol açmaktadır. Ayrıca, hayatın ilk haftasında 10 mg/dl üzerindeki değerlerin doğruluğu gerekli tedavinin başlanmasında ve kernikterus olasılığının önlenmesi için kan değişimi kararında etkilidir. Dolayısı ile total bilirubin analizi için kullanılan yöntem ve cihazların standardizasyonu önem kazanır. Bu çalışmanın amacı, yenidoğan total bilirubin tayininde kullanılan spektrofotometrik (Wako) (I.), sıvı sistem (Merck Mega) (II.) ve kuru sistem (Vitros 750) (III.) yöntemleriyle elde edilen değerlerin karşılaştırılmasıdır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Moris Şinasi Çocuk Hastanesi'ne yeni doğan sarılığı nedeniyle başvuran 0-30 günlük 19 yeni doğanın venöz kan örnekleri alınarak, hiç bekletilmeden üç ayrı yöntemle serum total bilirubin düzeyleri çalışılmıştır. Çalışma bilirubinometre (Wako Japonya) (I.), sıvı sistem

(Merck Mega DIASIS; İsviçre)(II.) ve kuru sistem (Vitros 750 Ortho-Clinical Diagnostics, Johnson and Johnson Company, İngiltere) (III.) ile yapılmış olup, çalışma öncesi bütün cihazların kalibrasyonu ve internal kalite kontrolleri yapılmıştır. Her örnek için elde edilen üç ayrı değerlerin ortalaması (IV.), kabul edilebilir en doğru değer olarak alınmış ve her bir yöntemin sonuçları bu ortalama değer ile ve kendi aralarında karşılaştırılmıştır. Bu çalışma için Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi etik kurulundan izin alınmıştır. İstatistiksel analiz için Macintosh LC StatWorks 1.2 programı kullanılarak korelasyon analizleri yapılmıştır.

Bilirubinometre ile serum bilirubin ölçüm yönteminde, 455 ve 575 nanometre olmak üzere iki ayrı dalga boyunda bilirubin absorbansı ölçülerek 455 nm'de elde edilen değerden 575 nm'de elde edilen absorbans çıkarılarak sonuç verilmiştir. Oksihemoglobin absorbansı her iki dalga boyunda aynı iken bilirubin sadece 455 nm'de absorpsiyon yapmaktadır. Bu şekilde örnekteki oksihemoglobinden kaynaklanan interferans ekarte edilmiştir. Wako cihazı için 0-40 mg/dL arasındaki ölçümler lineer kabul edilmektedir.

Sıvı sistem otoanalizörlerinde total bilirubin ölçümünde en yaygın kullanılan yöntem bir hızlandırıcı varlığında diazo boyaları ile reaksiyona dayanır. Hızlandırıcı kullanılmadan oluşan direkt reaksiyonla konjuge bilirubin tespit edilmekte (7), alkol ilavesiyle, (genellikle metanol) yapılan hızlandırılmış indirekt reaksiyonla da ankonjuge bilirubin ölçümü yapılır. Total bilirubin konjuge ve ankonjuge bilirubin kombinasyonudur. Diazo reaksiyonunda oluşan azo bilirubin, güçlü asid veya

güçlü alkali ortamda renk veren bir indikatördür. Kullandığımız yöntemde total bilirubin asid ortamda diazotize dikloro anilin varlığında kırmızı renkli azo bileşiği oluşturmaktadır.

Vitros analizörlerde bilirubin protein matriksinden ince-film teknolojisi ile ayrıştırılmaktadır. Kuru kimya reaktifleri çok katlı tabakalar halinde hazırlanmış olup, serum katmanlarından geçerken tepkime oluşmaktadır. Total bilirubin, ankonjuge bilirubin (indirekt) ve konjuge bilirubin (direkt) albuminden ayrıldıktan sonra diazotizasyonla ölçülmektedir. Bilirubin polimer katmanında difüze olarak kompleks oluşturmakta ve tepkime reflektans spektrofotometri ile monitörize edilmektedir (6).

BULGULAR

Tüm örneklerdeki her üç yönteme göre elde edilen değerlerin ortalama, medyan ve SD sonuçları Tablo 3'de gösterilmiştir. Yüksek

bilirubin değerine sahip 10 örneğin ortalama, medyan ve SD sonuçları Tablo 1'de gösterilmiştir. Total bilirubin analizleri sonuçları arasında ve bunların hesaplanan ortalama değerleri ile korelasyon sonuçları Tablo 2'de gösterilmiştir. Birinci, ikinci ve üçüncü yöntemlerle elde edilen değerler arasında anlamlı korelasyonlar bulunmuştur.

Her örnek için hesaplanan ortalama değerler (IV.) ile yukarıda adı geçen 3 yöntemden elde edilen sonuçlar ayrı ayrı karşılaştırıldığında, en yüksek korelasyonun ($r=0.980$) dördüncü değer ile ikinci yöntemle elde edilen değer arasında olduğu görülmektedir.

19 örnekten bilirubin ortalama değerleri 10 mg/dL'nin üzerinde olan 10 örnek tekrar değerlendirildiğinde elde edilen korelasyon sonuçları ise Tablo 3'de verilmiştir. Yüksek bilirubin değeri gösteren örneklerden elde edilen sonuçların kendi aralarında yapılan korelasyonlarda en yüksek korelasyonun dördüncü değer ile üçüncü yöntemle elde

Tablo 1. Tüm örneklerin ortalama, medyan (mg/dL) ve SD değerleri; n=19.

	Kuru Sistem	Sıvı Sistem	Bilirubinometre	Ortalama
Minimum	2.840	3.380	3.000	3.170
Maksimum	19.790	17.360	18.600	18.580
Median	8.620	10.090	11.000	10.010
Mean	8.964	10.359	10.644	10.001
SD	3.672	3.667	3.824	3.652

Tablo 2. Farklı bilirubin ölçüm yöntemleri arasındaki ve ortalama değer ile her bir yöntem arasındaki korelasyonlar; n=19.

	P	r
Bilirubinometre-sıvı sistem otoanalizör	P<0.0001	r=0.940
Bilirubinometre-kuru sistem otoanalizör	P<0.0001	r=0.929
Kuru sistem otoanalizör-sıvı sistem otoanalizör	P<0.0001	r=0.934
Ortalama- Bilirubinometre	P<0.0001	r=0.977
Ortalama- Sıvı sistem otoanalizör	p=0.0001	r=0.980
Ortalama- Kuru sistem otoanalizör	p=0.0001	r=0.976

Tablo 3. Bilirubin düzeyleri > 10 mg/dl olan olgularda korelasyon değerleri; n=10.

	P	r
Bilirubinometre-sıvı sistem otoanalizör	P<0.013	r=0.748
Bilirubinometre-kuru sistem otoanalizör	P<0.002	r=0.845
Kuru sistem otoanalizör-sıvı sistem otoanalizör	P<0.001	r=0.878
Ortalama- Bilirubinometre	P<0.0001	r=0.910
Ortalama- Sıvı sistem otoanalizör	P<0.0001	r=0.931
Ortalama- Kuru sistem otoanalizör	P<0.0001	r=0.974

Tablo 4. Yüksek değerli örneklerin(> 10 mg/dl) ortalama, medyan(mg/dL) ve SD değerleri n=10.

	Kuru Sistem	Sıvı Sistem	Bilirubinometre	Ortalama
Minimum	8.600	9.320	11.000	10.010
Maksimum	19.790	17.360	18.600	18.580
Median	10.425	12.955	12.800	11.965
Mean	11.277	12.997	13.264	12.535
SD	3.212	2.169	2.295	2.428

edilen değerler arasında olduğu Tablo 3'de görülmektedir ($r=0.974$).

TARTIŞMA

Yenidoğan sarılığında total bilirubin değerlerinin doğru tespiti, sarılığın teşhisi, takibi ve tedavisinde hayati öneme sahiptir. Yenidoğanda hiperbilirubinemi serum total bilirubin düzeyi 12 mg/dl üzerine çıktığı zaman önem kazanır. İlk 36 saatte 12 mg/dL üzeri, ilk 60 saatte 15 mg/dL üzerindeki değerler yüksek risk sınırı, ilk 36-60 saat arasında 10 mg/dL, daha sonraki dönemlerde 12 mg/dL üzerindeki değerler orta düzey risk bölgesi kabul edildiğinden genelde 10 mg/dL üzerindeki değerleri verirken doğruluğundan ve gerçek değere en yakın değer olduğundan özellikle emin olunması gerekir (8).

Total bilirubin ölçümünde en yaygın olarak kullanılan yöntem bir hızlandırıcı varlığında diazo boyaları ile reaksiyona dayanır. Diazo reaksiyonunda oluşan azobilirubin, güçlü asit veya güçlü alkali ortamda renk veren bir indikatördür. Bu yüzden diazo reaksiyonunda bazı modifikasyonlar uygulanabilmektedir. Bizim yöntemimizde total bilirubin asit ortamda diazotize dikloroanilin varlığında kırmızı renkli azo bileşiği oluşturmaktadır. Bilirubinometre ile çalışan spektrofotometrik yöntem ise kalibre etmesi güç de olsa yeni doğanlarda yüksek bilirubin konsantrasyonlarında güvenilir sonuç verir; ayrıca diazo yöntemine göre daha basit olup, daha az serum gerektirir (6).

Tüm vakalarda (0-20 mg/dl değerler için) her üç yöntemin verileri kendi aralarında karşılaştırıldığında en yüksek korelasyonun I. ile II. yöntemlerle elde edil en değerler arasında

olduğu görülmüştür ($r=0.940$). Diğer metotların verileri karşılaştırıldığında p değerleri değişmemekle birlikte korelasyon katsayısı en küçük olanı I. yöntem ile III. yöntemle elde edilenler arasındadır ($r=0.929$). IV. değer ile her üç metotla elde edilen veriler karşılaştırıldığında en yüksek korelasyon IV. değer ile III. Yöntemle elde edilen değerler arasında bulunmuştur ($r=0.980$). Bu karşılaştırma yüksek bilirubin değeri gösteren 11 örnekte elde edilen veriler için yapıldığında en yüksek korelasyonun IV. değer ile III. yöntemin değerleri arasında olduğu görülür ($r=0.974$). Tüm 20 örneğin değerleri için ise bu korelasyon ($r=0.976$) dır. Buradaki fark çok azdır. Bu da örneklerdeki bilirubin miktarının korelasyona etkisinin az olduğunu göstermektedir. Oysa, ortalama ile bilirubinometre ile elde edilen sonuçlarda bu regresyon katsayısı 0.977'den 0.910'a, sıvı sistem sonuçları için ise $r=0.980$ den $r=0.931$ 'e gerilemiştir. Bu da yenidoğan döneminde yüksek bilirubin değerlerinin önemi dolayısıyla kuru sistem yönteminin 3 metotla elde edilen değerler arasında 0 ile 20 mg/dl bilirubin düzeyleri için doğruya en yakın sonucu verdiğini göstermektedir.

Tablo 1'de görüldüğü gibi bu 3 yöntemin sonuçları arasında anlamlı fark yoktur. Bütün örnekler dikkate alındığında en yüksek sonuçlar bilirubinometre ile alınan sonuçlardır. En yüksek korelasyonun bilirubinometre yöntemi ile sıvı sistem arasında olduğu görülmektedir ($r=0.940$). Yüksek bilirubin değerleri için ise kuru sistem ile sıvı sistem sonuçları arasındakidir ($r=0.878$).

Sonuç olarak, yeni doğanda çok noktalı kalibrasyon yönteminin kullanılması durumunda bilirubin tayini için bilirubinometre, sıvı sistem

ve kuru sistem yöntemlerinin güvenle kullanılabileceği; Ancak, çalışmamızın sonuçlarına göre yüksek bilirubin değerlerinde kuru sistemin sonuçlarının 3 yöntemle aynı kandan elde edilen değerlerin ortalaması ile en yüksek korelasyonu ($r=0.974$) vermesi nedeni ile tercih edilebileceği kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Schlebusch H, Axer K, Schneider C, Liappis N, Rohle GJ. Comparison of five routine methods with the candidate reference method for the determination of bilirubin in neonatal serum. Clin Chem Clin Biochem 1990; 28(4): 203-210.
2. Langbaum ME, Farber SJ, Rosenthal P. Automated total and neonatal bilirubin values in newborns: a distinction clinically relevant? Clin Chem 1992; 38(9): 1690-1693.
3. Yeung CY, Fung YS, Sun DX. Capillary electrophoresis for the determination of albumin binding capacity and free albumin in jaundiced neonate. Semin Perinatol 2001; 25: 50-4.
4. Fung YS, Sun DX, Yeung CY. Capillary electrophoresis for determination of free albumin-bound bilirubin and the investigation of drug interaction with bilirubin-bound albumin. Electrophoresis 2000; 21: 403-10.
5. Zhang B, Fung Y, Lau K, Lin B. Bilirubin-human serum albumin interaction monitored by capillary zone electrophoresis. Miomed Chromatogr 1999; 13: 267-71.
6. Jean Jorgenson Limne and Karen Munson Ringsrud eds. Chemistry, Clinical Laboratory Science. ed. p 269-270: Mosby Press; 1999.
7. Westwood A. The analysis of bilirubin in serum. Ann Clin Biochem 1992; 29(p2): 119-130.
8. Bhultani VK, Johnson L, Siviery EM. Predictive ability of a predischARGE hour specific serum bilirubin for subsequent significant hyperbilirubinemia in healthy term and near-term newborns. Pediatrics 1999; 103: 6.

Yazışma adresi:

Dr. Cevval Ulman
Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı,
45010 Manisa
Tel: 0 236 2323133/105 veya 325
GSM: 0 533 660 57 03
Fax: 0236 2370213
e-mail: cevval.ulman@softhome.net veya
cevval.ulman@bayar.edu.tr
