04/0083/35

บทความปริทัศน์

ศึกษาการรบกวนของบิลิรูบิน ที่มีต่อการตรวจครีอาตินินโดยปฏิกิริยา Jaffé

Study of bilirubin interference in creatinine determination by the Jaffé reaction

อาภา วรรธนะวหะ* โศภณ นภาธร*
สมพงษ์ จินายน** วิศิษฏ์ สิตปรีชา*

Abstract : **Arpar Wathanavaha, Sophon Napathorn, Sompongse Chinayon, and Visith Sitprija. 1992. Study of bilirubin interference in creatinine determination by the Jaffé reaction. Thai J Hlth Resch 6(2): 125-128**

Bilirubin interference in creatinine measurement by the manual endpoint Jaffé method was assessed. The serum and urine specimens were enriched by the various amounts of bilirubin dissolving in dimethyl sulfoxide before creatinine analysis. When bilirubin concentration was 40 mg/dL, a positive interference (up to 10.5%) of bilirubin in the serum creatinine determination was observed. This may cause a slight underestimation of the creatinine clearance in renal function test. On the other hand, the potential interference in urinary creatinine determination may be considered as negligilble (+3.6%).

Key words : *Bilirubin interference; Serum and urine creatinine; Manual endpoint Jaffé reaction.*

*ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กทม.10330
Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330.
**ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กทม.10330
Department of Medical Technology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330.

01/0087/35

บทคัดย่อ : **อาภา วรรธนะวหะ, โศภณ นภาธร, สมพงษ์ จินายน, และวิศิษฏ์ สิตปรีชา. 2535. ศึกษาการรบกวนของบิลิรูบินที่มีต่อการตรวจครีอาตินินโดยปฏิกิริยา Jaffé. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ 6(2) : 125-128**

ศึกษาการรบกวนของบิลิรูบินต่อการตรวจระดับครีอาตินินในซีรัมและปัสสาวะด้วยวิธีที่ใช้ปฏิกิริยา Jaffé โดยระบบจุดสิ้นสุด ที่ทำด้วยมือ การทดลองทำโดยเติมสารบิลิรูบินปริมาณหลายระดับที่ละลายใน dimethyl sulfoxide ลงในซีรัม และปัสสาวะ แล้วนำมาวัดปริมาณครีอาตินิน พบว่าในซีรัมเมื่อเติมบิลิรูบิน 40 มก./ดล. มีผลทำให้ระดับครีอาตินินสูงขึ้น 10.5% (positive interference) ซึ่งถ้าคำนวณค่าครีอาตินิน-เคลียร์รานซ์สำหรับการตรวจการทำงานของไตในซีรัมที่มีบิลิรูบินสูงดังกล่าว อาจจะได้ผลต่ำกว่าความเป็นจริงเล็กน้อย อีกประการหนึ่งในปัสสาวะนั้นปริมาณการรบกวนของบิลิรูบินมีน้อยมาก (+3.6%) ต่อวิธีวัดครีอาตินิน

คำสำคัญ : *การรบกวนของบิลิรูบิน; การวัดครีอาตินินในซีรัมและปัสสาวะ; ปฏิกิริยาแจฟฟีระบบจุดสิ้นสุด*

ปัจจุบันการวัดระดับครีอาตินินในซีรัมและปัสสาวะ โดยหลักการของปฏิกิริยา Jaffé นั้น ได้ใช้กันอยู่อย่างกว้างขวางในห้องปฏิบัติการทางคลินิก (Narayanan and Appleton, 1980; Rock *et al.*, 1986) เพราะว่าได้มีการปรับปรุงเทคนิควิเคราะห์ให้มีคุณสมบัติดีขึ้น โดยเฉพาะการเพิ่มความจำเพาะ (specificity) ทั้งในวิธีการวัดผลิตผลด้วยระบบ kinetic assay (Knight and Trainer, 1978; Bowers and Wong, 1980) และระบบ endpoint assay (Rock *et al.*, 1986) ที่ห้องปฏิบัติการหน่วยโรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้วัดระดับครีอาตินินในสิ่งส่งตรวจด้วยปฏิกิริยา Jaffé โดยระบบ endpoint ที่ทำด้วยมือ และอ่านผลด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ชนิดธรรมดา (Rock *et al.*, 1986) เพราะกระบวนการวิเคราะห์เหมาะสมกับปริมาณงานและสถานภาพของห้องปฏิบัติการแห่งนี้ อนึ่ง วิธีนี้มีความไม่เที่ยงตรงชนิดต่างการทดลอง (inter-assay imprecision) แสดงโดยค่า CV 4.0 และ 1.4% ที่ความเข้มข้นของครีอาตินิน 1.0 และ 11.5 มก./ดล. ตามลำดับ ซึ่งเป็นความแปรปรวนที่ยอมรับได้ (Whitehead, 1977) ด้วยมีงานวิจัยทางคลินิกซึ่งต้องวัดระดับครีอาตินินในซีรัมและปัสสาวะ เพื่อนำมาคำนวณค่าเคลียร์รานซ์ เพื่อทดสอบสมรรถภาพการทำงานของไตในผู้ป่วยด้วยโรคติดเชื้อ หรือการอุดตันของระบบน้ำดี (Tungsanga *et al.*, 1984; Sitprija *et al.*, 1990) ผู้ป่วยกรณีดังกล่าว มีปริมาณบิลิรูบินในซีรัมและปัสสาวะเพิ่มขึ้นมาก สูงสุดระหว่าง 27.0 ถึง 40.4 มก./ดล. และมีค่าครีอาตินินเคลียร์รานซ์ลดลงกว่าคนปกติ (Sitprija *et al.*, 1990) อย่างไรก็ตามมีรายงานการศึกษากล่าวถึงการรบกวน (interference) ของบิลิรูบินต่อการวัดระดับครีอาตินิน โดยใช้ปฏิกิริยา Jaffé ทั้งระบบ kinetic assay (Watkins *et al.*, 1976; Kaplan *et al.*, 1979) และระบบ endpoint assay (Franzini *et al.*, 1991) ถึงแม้ว่าในวิธีการตรวจครีอาตินินด้วยมือในระบบ endpoint assay (Rock *et al.*, 1986) นั้น มีขั้นตอนที่ตกตะกอนโปรตีนออกจากซีรัมก่อนโดยใช้ tungstic acid ซึ่งช่วยในการกำจัดสารรบกวนปฏิกิริยาหลายชนิดรวมทั้งบิลิรูบินออกก่อนแล้ว ส่วนในปัสสาวะซึ่งมีสารที่รบกวนปฏิกิริยา Jaffé น้อยกว่านั้นใช้วิธีเจือจางด้วยน้ำกลั่นด้วยอัตราส่วน 1:100 (Narayanan and Appleton, 1980; Rock *et al.*, 1986) แต่ในกรณีที่มีระดับบิลิรูบินในสิ่งส่งตรวจสูงมาก อาจทำให้ความจำเพาะของวิธีวัดครีอาตินินเปลี่ยนไปได้ จึงสมควรที่จะศึกษาหาปริมาณที่แน่นอนของบิลิรูบิน ที่มีผลกระทบต่อค่าครีอาตินินที่ตรวจได้ ทั้งนี้เพื่อยืนยันความถูกต้องของค่าครีอาตินินเคลียร์รานซ์ซึ่งจะช่วยทดสอบการทำงานของไตโดยเฉพาะที่ส่วน glomeruli ในผู้ป่วย วิธีการศึกษาหาปริมาณรบกวนของบิลิรูบินปฏิบัติตามหลักการของ Westgard *et al.* (1978) โดยใช้สารบิลิรูบินซึ่งได้จาก bovine gall stones (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo, USA) นำมาละลายด้วย dimethyl sulfoxide ให้มีความเข้มข้น 100, 200 และ 400 มก./ดล. และเติมลงในซีรัมหรือปัสสาวะ แล้ววัดปริมาณครีอาตินิน ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 1 ซึ่งในซีรัมเมื่อเติมบิลิรูบินลงไปปริมาณ

10 และ 20 มก./ดล. ทำให้ค่าครีอาตินินเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (1.3 และ 3.9% หรือบิลิรูบิน 1 มก./ดล. ทำให้ค่าครีอาตินินสูงขึ้น 0.001 และ 0.0015 มก./ดล. ตามลำดับ) จึงไม่มีความสำคัญในการแปลผลทางคลินิก แต่สำหรับบิลิรูบินปริมาณสูงถึง 40 มก./ดล. ทำให้ระดับครีอาตินินสูงขึ้น 10.5% หรือบิลิรูบิน 1 มก./ดล. เพิ่มค่าครีอาตินิน 0.002 มก./ดล. ดังนั้นจึงพบว่ามี positive interference เล็กน้อย สำหรับวิธีวิเคราะห์ซีรัมครีอาตินินโดยปฏิกิริยา Jaffé ที่ใช้อยู่ในห้องปฏิบัติการแห่งนี้ โดยเฉพาะเมื่อนำมาคำนวณค่าครีอาตินินเคลียร์รานซ์ อาจจะได้ค่าต่ำลงกว่าความจริงบ้าง (underestimation) อนึ่ง ในปัสสาวะเมื่อเติมบิลิรูบินปริมาณเท่ากับที่เติมในซีรัม มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น คือบิลิรูบินระดับ 40 มก./ดล. มีผลทำให้ระดับครีอาตินินสูงขึ้น 3.6% หรือบิลิรูบิน 1 มก./ดล. ทำให้ค่าครีอาตินินในปัสสาวะสูงขึ้น 0.059 มก./ดล. อย่างไรก็ตามผลการตรวจในหลอดทดลอง (*in vitro* study) นี้ เป็นเหตุการณ์ที่ไม่ได้เกิดขึ้นจริงในพยาธิสรีระของร่างกายคน เพราะว่าจากรายงานของ Fulop *et al.* (1971) นั้น ในผู้ป่วยที่มีระดับซีรัมบิลิรูบินสูงระหว่าง 25.0 ถึง 30.0 มก./ดล. มีบิลิรูบินชนิด conjugated ถูกขับถ่ายออกในปัสสาวะ 250 มก.ต่อวัน ถ้าปัสสาวะมีปริมาณปกติ 1.5 ลิตรต่อ 24 ชั่วโมง จะมีบิลิรูบินจำนวน 16.7 มก./ดล. และถ้าก่อนการวิเคราะห์ครีอาตินินได้เจือจางปัสสาวะลง 100 เท่า จะคงมีบิลิรูบินอยู่ในสิ่งส่งตรวจ 0.17 มก./ดล. ถ้าจำนวนปัสสาวะลดลงจนมีปริมาณ 0.5 ลิตรต่อวัน จะมีบิลิรูบินในสิ่งส่งตรวจหลังเจือจางแล้ว 0.5 มก./ดล. ดังนั้น ในทางปฏิบัติวิธีวัดครีอาตินินในปัสสาวะ จึงไม่ถูกรบกวนโดยบิลิรูบิน

Table 1 Creatinine values with bilirubin added at various concentrations.

	Measured creatinine* mg/dl	Added bilirubin mg/dl	Interference mg/dl	Difference %
serum	0.76	–	–	–
	0.77	10	+0.01	1.3
	0.79	20	+0.03	3.9
	0.84	40	+0.08	10.5
urine	65.66	–	–	–
	65.75	10	+0.09	0.1
	66.84	20	+1.18	1.8
	68.01	40	+2.35	3.6

*mean values of 20 replications

ดังได้กล่าวแล้วข้างต้น ผลการทดลองแสดงว่าบิลิรูบินปริมาณสูงถึง 40 มก./ดล. ทำให้ค่าซีรัมครีอาตินินสูงขึ้น (positive interference) เมื่อวัดด้วยปฏิกิริยา Jaffé ระบบ endpoint assay ที่คลื่นแสง 515 นาโนเมตร แต่ไม่อาจอธิบายสาเหตุของการรบกวนชนิดนี้ได้ อีกประการหนึ่ง ผลที่ได้ครั้งนี้แตกต่างกับการศึกษาของ Watkins *et al.* (1976) ซึ่งพบว่าบิลิรูบิน 1 มก./ดล. ทำให้ค่าซีรัมครีอาตินินต่ำลง (negative interference) 0.001 มก./ดล. เมื่อวัดด้วยปฏิกิริยา Jaffé ระบบ kinetic assay เพราะว่ามีการ oxidation ของบิลิรูบินในน้ำยาที่มีฤทธิ์เป็นด่างแก่ เกิดเป็นสารที่มีการดูดกลืนแสงลดลงเมื่อวัดที่คลื่นแสง 500 นาโนเมตร ผลการทดลองที่แตกต่างกันนี้ ประการหนึ่งอาจเนื่องจากสารบิลิรูบินที่ใช้ในการทดลองนั้นต่างกัน เช่น ความบริสุทธิ์ หรืออนุพันธ์ต่างกัน ดังการศึกษาของ Franzini *et al.* (1991) ที่แสดงว่าอนุพันธ์ของบิลิรูบินต่างชนิดกัน ส่งผลกระทบไม่เหมือนกันต่อการวัดซีรัมครีอาตินิน ดังนั้นในกรณีที่วัดระดับครีอาตินินในซีรัมที่มีปริมาณบิลิรูบินสูงมาก จึงควรเจือจางซีรัมก่อนตามความเหมาะสม โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าต้องนำค่ามาคำนวณหาเคลียร์รานซ์ เพื่อใช้ช่วยตรวจสอบการทำงานของไต จะให้การแปลผลทางคลินิกเป็นประโยชน์ได้อย่างแท้จริง

เอกสารประกอบการเขียน

Bowers LD, and Wong ET. 1980. Kinetic serum creatinine assays. II. A Critical evaluation and review. Clin Chem 26(5): 555-561.

Franzini C, Morelli AM, and Cattozzo G. 1991. Use of a synthetic soluble bilirubin derivative to assess interference in creatinine measurements. Clin Chem 37(2): 236-238.

Fulop M, Katz S, and Lawrence C. 1971. Extreme hyperbilirubinemia. Arch Intern Med 127: 254-258.

Kaplan LA, Miller J, and Stein EA. 1979. Kinetic serum creatinine (KSCr) and bilirubin (BR) interference; possible mechanism and solution. Clin Chem 25(6): 1069. Abstract.

Knight DR, and Trainer TD. 1978. Negligible effect of bilirubin on serum creatinine measurement by the kinetic Jaffé method. Clin Chem 24(10): 1851-1852. Letter.

Narayanan S, and Appleton HD. 1980. Creatinine : A review. Clin Chem 26(8): 1119-1126.

Rock RC, Walker WG, and Jennings CD. 1986. Nitrogen metabolites and renal function. In Tietz NW, ed. Textbook of clinical chemistry, Philadelphia : WB Saunders Company, p 1278-1280.

Sitprija V, Kashemsant U, Sriratanaban A, Arthachinta S, and Poshyachinda V. 1990. Renal function in obstructive jaundice in man : Cholangiocarcinoma model. Kidney International 38: 948-955.

Tungsanga K, Boonwichit D, Lekhakula A, and Sitprija V. 1984. Urine uric acid and urine creatinine ratio in acute renal failure. Arch Intern Med 144: 934-937.

Watkins RE, Feldkamp CS, Thibert RJ, and Zak B. 1976. Interesting interferences in a direct serum creatinine reaction. Micro Chem J 21: 370-384.

Westgard JO, de Vos DJ, Hunt MR, Quam EF, Carey RN, and Garber CC. 1978. Concepts and practices in the evaluation of clinical chemistry methods. II. Experimental procedures. Am J Med Technol 44(5): 420-430.

Whitehead TP. 1977. Quality control in clinical chemistry. New York : Wiley Medical Publication. John Wiley and Sons, p 95-105.