

Erfahrungen mit einer neuen Endpunktmethode zur enzymatischen Kreatininbestimmung im Serum und Urin an Hitachi 717 und 747 Analysatoren

Experience with a new enzymatic endpoint procedure for the determination of creatinine in serum and urine using the Hitachi 717 and 747 analyzers

H. Luthé¹ und W. Hinsch²

Zusammenfassung

Die Kreatininbestimmung mit Kreatinin-Iminohydrolase und Glutamatdehydrogenase war als kinetisches Meßverfahren nicht völlig zufriedenstellend. Dies veranlaßte den Reagenzhersteller zur Entwicklung einer Endpunkt-Methode, die von uns unter Routinebedingungen erprobt und mit dem Kodak Ektachem Single-Slide-Test sowie kinetischen *Jaffe*-Methoden an BM/Hitachi 717 und 747 Analysatoren und am Beckman Analysator Astra 8 verglichen wurde. Die Ergebnisse zeigten eine gute Übereinstimmung der enzymatischen Methode mit Kodak Ektachem und der kinetischen *Jaffe*-Methode an BM/Hitachi Analysatoren, jedoch nicht am Astra 8, der signifikant höhere Werte lieferte. Messungen mit der kinetischen *Jaffe*-Methode ergaben bei Seren mit einer Bilirubin-Konzentration >30 mg/dl deutlich niedrigere Werte als die anderen Methoden. Für die Kreatinin-Messungen im Urin ist eine Verdünnung von 1:100 für die enzymatische wie für die *Jaffe*-Methode notwendig. Unsere Ergebnisse zeigen, daß die enzymatische Endpunkt-Methode sowohl für die Kreatinin-Bestimmung im Serum als auch im Urin geeignet ist.

Schlüsselwörter

Kreatinin – enzymatische Bestimmung – *Jaffe* Methode – Bilirubin – Urin

Summary

The kinetic assay for creatinine using creatinine iminohydrolase and glutamate dehydrogenase was not fully satisfactory. This led to the development of an endpoint procedure by the reagent manufacturer which was evaluated by us under routine conditions and compared to the Kodak Ektachem single slide test and kinetic *Jaffe* methods run on Hitachi analyzers as well as on a Beckman Astra 8 analyzer. The results showed good agreement of the enzymatic method with Kodak Ektachem and the kinetic *Jaffe* method on Hitachi 717 and 747 analyzers, but not on the Astra 8, which yielded significantly higher results. The influence of high concentrations of bilirubin on the creatinine measurement was also investigated. With serum bilirubin >30 mg/dl, creatinine values obtained with the kinetic *Jaffe* method on Hitachi 717 and 747 analyzers were lower as compared to the other methods. For the measurement of creatinine in urine a dilution of 1:100 is necessary for the enzymatic method as is the case with the *Jaffe* method. The results presented here show that the enzymatic endpoint method is a suitable procedure for determination of creatinine in serum and urine.

Key words

Creatinine – enzymatic assay – *Jaffe* method – bilirubin – urine

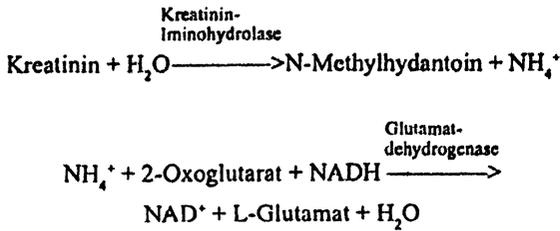
Einleitung

Kreatinin ist ein wichtiger und sehr häufig bestimmter Analyt in der Klinischen Chemie. Die Messung erfolgt auch heute noch in vielen Fällen – wenn auch stark modifiziert-, mit einer der ältesten klinisch-chemischen Methoden, die schon vor über 100 Jahren von *Jaffe* beschrieben wurde. Inzwischen stehen enzymatische Methoden zur Verfügung, die gegenüber den meisten Variationen der *Jaffe*-Methode wesentlich höhere Spezifität aufweisen [1–3]. Eine dieser enzymatischen Methoden verwendet Kreatinin-Iminohy-

¹ Korrespondenzadresse: Dr. Hilmar Luthé, Klinikum der Universität, Zentrum Innere Medizin, Abt. Klinische Chemie, Robert-Koch-Str. 40, D-37075 Göttingen. Fax: x49-551-9 54 36

² Reinhard-Nieter-Krankenhaus Wilhelmshaven, Zentrallabor

drolase (Kreatinin-Deiminase) zur Spaltung des Kreatinins und läuft nach folgender Reaktion ab [2]:



Ein entsprechendes Reagenz wird kommerziell vertrieben (Biomed, Oberschleißheim). Es kam zunächst für ein kinetisches Meßverfahren auf den Markt, das aber noch nicht völlig zufriedenstellen konnte. Es wurde an verschiedenen Geräten evaluiert [4, 5]. Inzwischen wurde der Test verbessert und als Endpunktbestimmung (Zweipunkt-Messung) gestaltet. Er ist gegenüber der bisherigen kinetischen Methode durch ein höheres Meßsignal und geringere Interferenzen charakterisiert.

Dieses Verfahren wurde von uns im Vergleich zu verschiedenen anderen Methoden an unterschiedlichen mechanisierten Analysegeräten sowohl für Serum als auch für Urin untersucht.

Methoden und Material

Die enzymatische Methode wurde mit dem Reagenz Kreatinin-Duo (Biomed Oberschleißheim, Bestell-Nr. 102214) an den Hitachi Analysatoren 717 und 747 (Boehringer Mannheim GmbH) angewendet. Die Geräteeinstellungen wurden entsprechend dem Arbeitsvorschlag des Reagenzienherstellers gewählt.

Als Vergleichsmethoden dienten

- die kinetische *Jaffe*-Methode an den Hitachigeräten 717 und 747 (Reagenz Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Bestell-Nr. 1040847 bzw. 1127632 u. 1127659)
- die Kodak Ektachem Clinical Chemistry Slides (CREA) Methode (Best.-Nr. 8212763, Kodak, Braunschweig) am Kodak Ektachem 700 und die
- kinetische *Jaffe*-Methode, modifiziert am Astra 8 (Best. Nr. 668306, Beckman Instruments, München).

Als Kontrollproben wurden Precinorm U (Charge 1491414 u. 174912), Precipath U (Charge 776830), beide Boehringer Mannheim, Duotrol (Charge 6350-2) der Firma Biomed und Monitrol I (Charge LTD-218) sowie Monitrol II (Charge PTD 119) beide Baxter, München, verwendet.

Die Kalibration für die Analysengeräte Hitachi 717 und 747 für die enzymatische Kreatininmethode erfolgte mit Duotrol und (nach Ermittlung von Sollwerten) mit dem Multikalibrator (Charge 172221) von Boehringer Mannheim. Die Kalibration am ASTRA 8 erfolgte mit den High- und Low-Kalibratoren der Fa. Beckman Instru-

ments, Best.Nr. 667700. Am Kodak Ektachem 700 wurde mit den Kodak Ektachem Kalibratoren 1, 3 und 5 kalibriert (Best.Nr.: 8903684, 8520454, 8640344).

Die statistische Auswertung bei den Methodenvergleichen erfolgte nach Passing und Bablok [6].

Ergebnisse

Präzision

Präzisionsuntersuchungen wurden am Hitachi 717 sowohl in der Serie (intra-assay) als auch von Tag zu Tag (inter-assay) einerseits für die enzymatische Methode, z. T. auch für die *Jaffe*-Methode durchgeführt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 1. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Bestimmungen am Hitachi 717 unter Routinebedingungen durchgeführt werden sollten, wobei die Ergebnisse aus medizinischen Gründen lediglich mit einer Stelle hinter dem Komma angegeben werden. Aufgrund der Rundung sind daher die VK-Werte etwas schlechter zu erwarten, als wenn mit zwei Kommastellen gerechnet worden wäre. Das erklärt die höheren VK-Werte für beide Methoden bei den Messungen mit niedriger Konzentration. Sowohl innerhalb der Serie, wie auch von Tag zu Tag, zeigt sich für die enzymatische Methode eine niedrige Impräzision, die der der *Jaffe*-Methode nicht nachsteht.

Tabelle 1. Präzisionsergebnisse der verschiedenen Methoden.

Methode	Bedingungen	n	(mg/dl)	Vk (%)
Enzymatisch	Intra-Assay	20	0,82	3,8
Jaffe	Intra-Assay	20	0,86	5,8
Enzymatisch	Intra-Assay	20	8,7	1,1
Jaffe	Intra-Assay	20	9,5	0,9
Enzymatisch	Inter-Assay	16	1,21	4,2
Enzymatisch	Inter-Assay	16	5,33	3,0

Richtigkeit

Die Richtigkeit der Methode wurde an beiden Geräten anhand verschiedener Kontrollseren überprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 wiedergegeben. Es zeigt sich, daß

Tabelle 2. Richtigkeit der enzymatischen Methode bei verschiedenen Kontrollproben. Angaben in mg/dl.

	Moni- trol I	Moni- trol II	Preci- norm U	Preci- norm U	Preci- path U
Charge	LTD-218	PTD-119	169141	174912	776830
Referenz- methoden- wert	1,1	5,7	2,1	1,8	3,9
BM/Hitachi 717	1,2	5,3	2,0		
BM/Hitachi 747				1,7	3,6

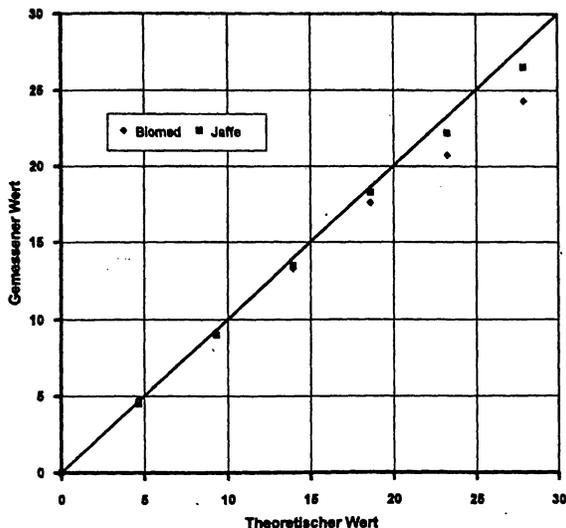


Abb. 1. Linearität der Jaffe- und der enzymatischen Methode am Hitachi 747.

die Ergebnisse recht gut mit den Zielwerten der Kontrollseren übereinstimmen, mit der Tendenz zu einer etwas niedrigeren Wiederfindung im hohen Konzentrationsbereich.

Linearität

Die Linearität beider Methoden (enzymatisch und *Jaffe*) wurde anhand einer Verdünnungsreihe im Bereich bis ca. 25 mg/dl überprüft (Abb. 1). Beide Methoden sind im sehr hohen Bereich nicht mehr linear, wobei die *Jaffe*-Methode etwas weniger von der Linearität abweicht. Im Bereich von 0–20 mg/dl (*Jaffe*) bzw. 0–15 mg/dl (enzymatische Methode) ist Linearität gegeben.

Methodenvergleich mit Serum

Die neue Kreatininmethode wurde an verschiedenen Geräten mit verschiedenen Routinemethoden verglichen (s. Methoden und Material). Die Ergebnisse zeigt Abbildung 2, die statistischen Daten sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3. Zusammenfassung der statistischen Daten des Methodenvergleichs. Angaben in mg/dl, Auswertung nach Passing und Bablok [6].

Methode x	Jaffe/BM Hitachi 717	Jaffe/BM Hitachi 747	Jaffe/BM Hitachi 747	Jaffe/BM Hitachi 747	Kreatin Duo/BM Hitachi 747	Astra 8
Methode y	Kreatinin Duo/ BM Hitachi 717	Kreatinin Duo/ BM Hitachi 747	Astra 8	Ektachem 700	Ektachem 700	Kreatinin Duo / BM Hitachi 747
n	216	200	50	50	50	50
r	0,996	0,991	0,987	0,990	0,989	0,991
Ausgleichs- gerade	$y=0,964x + 0,082$	$y=1,000x + 0,075$	$y=1,162x + 0,136$	$y=0,997x + 0,05$	$y=0,989x + 0,026$	$y=0,862x + 0,042$

Dabei zeigt sich, daß die neue enzymatische Methode sehr gut mit der kinetischen *Jaffe*-Methode korreliert, ebenso mit der Ektachem-Methode. Ausnahme ist die Kreatininbestimmung am Astra 8, die zwar eine gute Korrelation mit den anderen Methoden zeigt, jedoch gegenüber allen anderen Methoden etwa 15 % höhere Werte ergibt.

Kreatininbestimmung im Urin

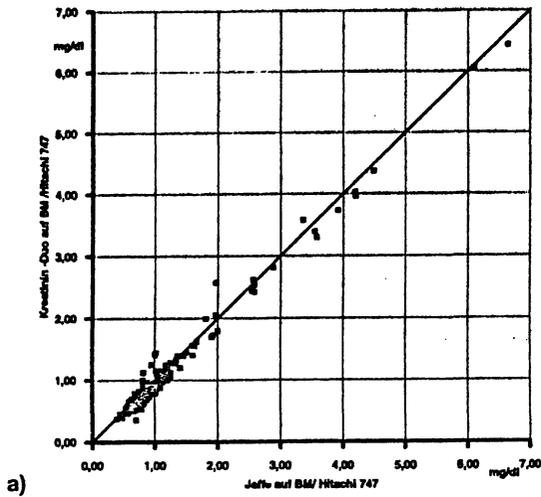
Um zu prüfen, ob die Methode auch im Urin zuverlässige Werte liefert, und ob sie für die Bestimmung der Kreatinin-Clearance heranziehbar ist, wurden am Hitachi 717 149 Proben in verschiedenen Verdünnungen mit der *Jaffe*-Methode und der enzymatischen Bestimmung analysiert.

Abbildung 3 zeigt die Ergebnisse in verschiedenen Verdünnungen bezogen auf die *Jaffe*-Methode in 1 : 100 Verdünnung, von der man annehmen kann, daß dabei die meisten Störungen minimiert werden. Es zeigt sich, daß die Übereinstimmung der enzymatischen Methode bei Verdünnung der Proben im Verhältnis 1 : 100 am besten ist. Hierbei ergibt sich ein Korrelations-Koeffizient von 0,994 und mit dem Auswerteverfahren nach Passing/Bablok eine Ausgleichsgerade von

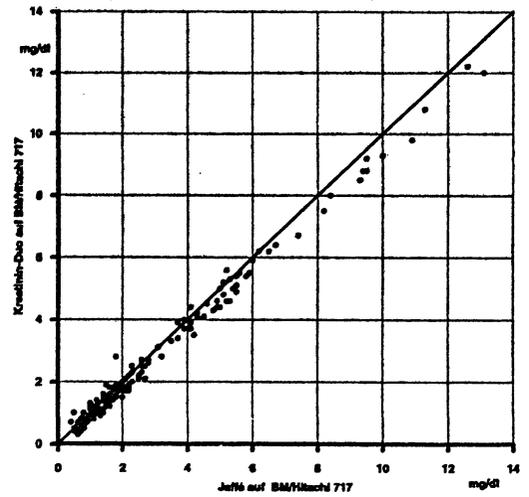
$y=0,960x-5,2$ (x = Ergebnis *Jaffe*-Methode, Probenverdünnung 1 : 100).

Bei gleicher Kalibration entspricht die Steigung der Ausgleichsgeraden nahezu der im Serum (0,964) und bei beiden Gleichungen sind die additiven Glieder zu vernachlässigen. Dies bedeutet, daß der Quotient aus Urin- und Serum-Konzentrationen, wie er zur Ermittlung der Kreatinin-Clearance verwendet wird, für die enzymatische und die *Jaffe*-Methode gleich ist und daher auch die Ergebnisse der Kreatinin-Clearance vergleichbar sind.

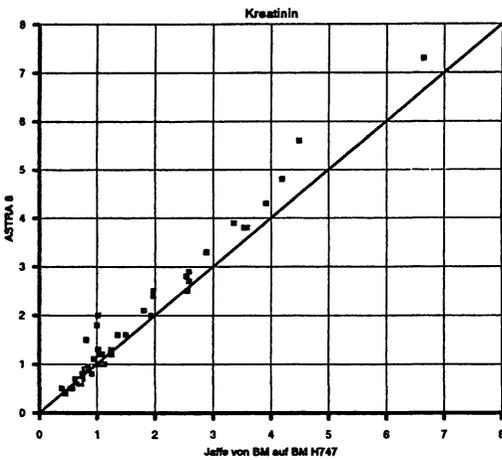
In Abbildung 3 sind auch die Werte mit einer 1 : 10 Verdünnung für die *Jaffe*-Methode angegeben, die allerdings bei höheren Konzentrationen aufgrund mangelnder Linearität der Methode zu niedrig ausfallen. Sie zeigen, daß eine Reihe von Urinproben, die bei geringer Verdünnung deutliche Störeffekte in der *Jaffe*-Reaktion aufweisen, bei der enzymatischen Methode in 1 : 50 Verdünnung geringe, in 1 : 100 Verdünnung keine Störungen verursachen.



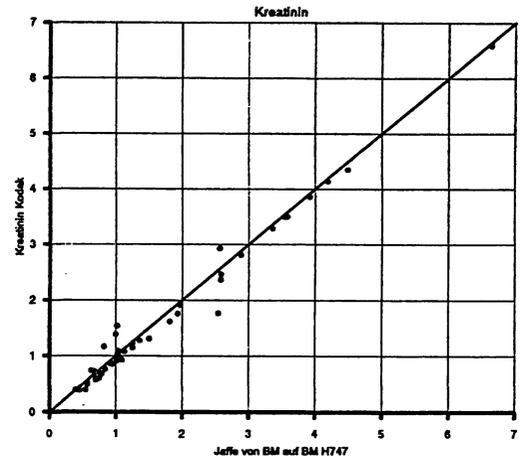
a)



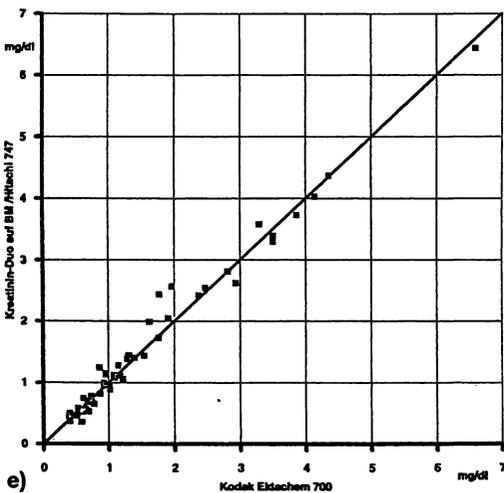
b)



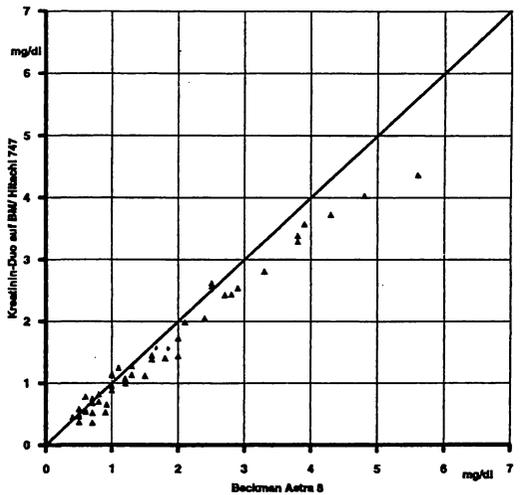
c)



d)



e)



f)

Abb. 2a-f. Vergleich der Kreatininmeßwerte, die mit verschiedenen Methoden erhalten wurden.

Störungen der Kreatininbestimmung im Serum durch Bilirubin

Während die enzymatische Kreatininase/Kreatinase/PAP-Methode massiv durch Bilirubin gestört wird, ist bekannt, daß die *Jaffe*-Methode bei hohen Bilirubinkonzentrationen, nach Gerät und Methodenvariante unterschiedlich, erniedrigte Ergebnisse ergibt [7]. Für die Ektachem-Methode sind Bilirubin-Störungen nicht beschrieben. Auch die hier untersuchte enzymatische Methode wird in ihrer ursprünglichen kinetischen Form durch Bilirubin nicht gestört.

Abbildung 4 zeigt die Abweichungen der Kreatininmeßwerte bei einer Reihe ikterischer Seren mit unterschiedlich hohem Bilirubingehalt für verschiedene Methoden, wobei die Ergebnisse der enzymatische Endpunktmethode als Bezugsdienten. Die enzymatische Endpunktbestimmung und die Kodak Ektachem-Methode, die durch ikterische Seren nicht gestört wird [7], zeigen sehr gute Übereinstimmung. Die enzymatische Methode wird also offensichtlich ebenfalls durch hohe Bilirubinwerte nicht beeinflusst. Die Werte am Astra 8 sind in unserer Studie über einen weiten Bereich ebenfalls bilirubinunabhängig, lediglich bei sehr hohen Werten zeigt sich ein leichter Anstieg. Wie schon

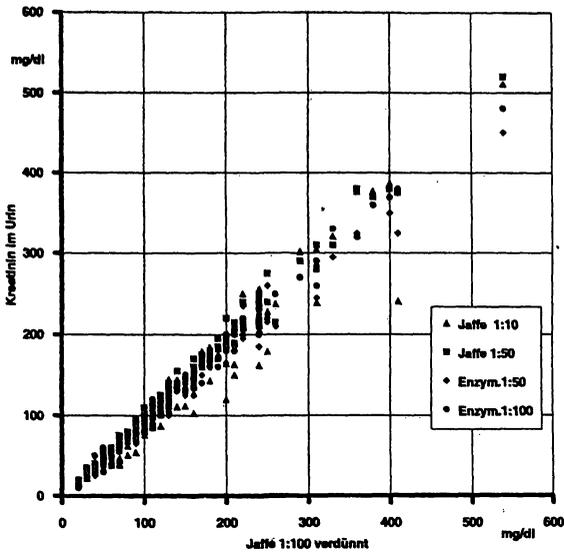


Abb. 3. Kreatinin im Urin. Vergleich der enzymatischen mit der *Jaffe*-Methode bei verschiedener Probenverdünnung.

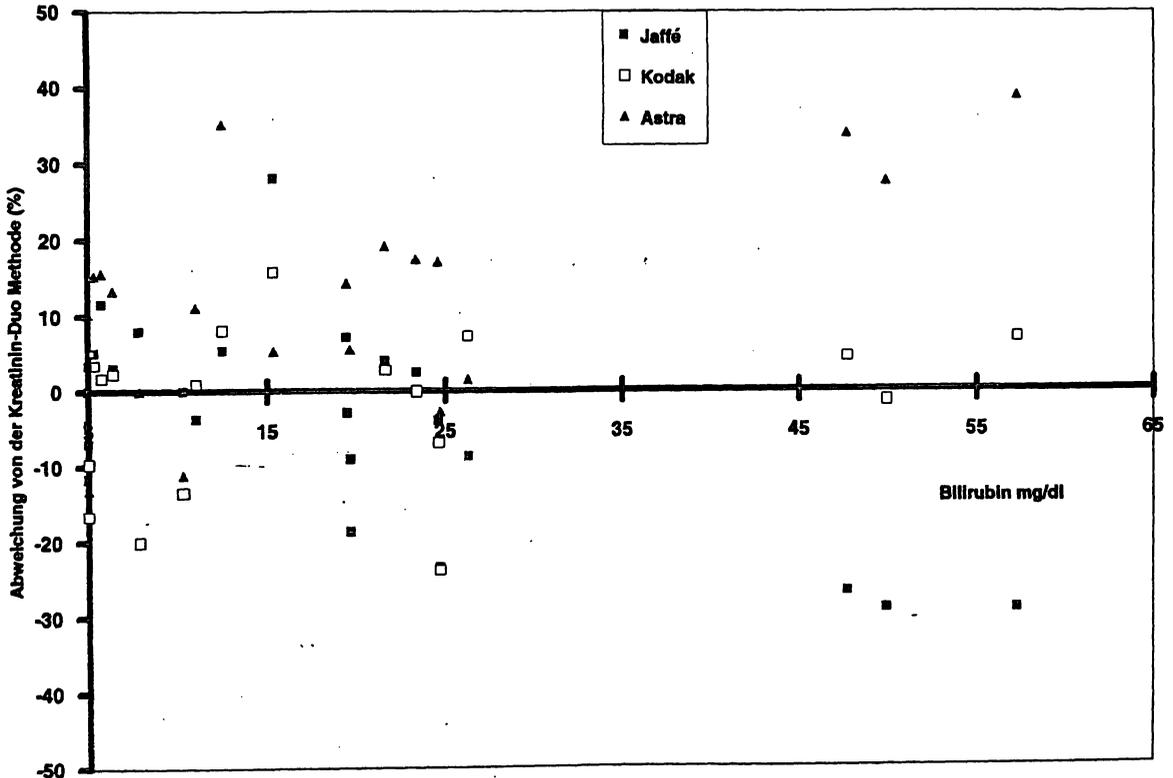


Abb. 4. Einfluß hoher Bilirubinwerte auf die Ergebnisse der Kreatininbestimmung bei verschiedenen Methoden.

beim Methodenvergleich gezeigt, finden sich auch hier im Durchschnitt etwa 15–20 % höhere Werte mit der Astra-Methode als mit den anderen Methoden. Wie zu erwarten, führten bei der *Jaffe*-Methode sehr hohe Bilirubinwerte zu erniedrigten Werten.

Die Ergebnisse zeigen, daß die enzymatische Methode ebensowenig bilirubinabhängig ist wie die Kodak Ektachem-Methode am Ektachem 700.

Diskussion

Die enzymatische Kreatininbestimmung mit Kreatinin-Iminohydrolase und Glutamatdehydrogenase, die als kinetischer Test seit einiger Zeit kommerziell vertrieben wird, wurde verbessert, indem eine Endpunktmethode entwickelt wurde, die ein höheres Meßsignal und weniger Störungen aufweist. Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit mit einigen anderen in der Routine gebräuchlichen Methoden verglichen. Wenn man von der Astra 8-Methode absieht, die allerdings nicht nur gegenüber der enzymatischen, sondern auch den anderen getesteten Methoden um ca. 15 % höhere Werte aufweist, ergibt sich eine sehr gute Übereinstimmung zwischen der hier getesteten enzymatischen Methode, der *Jaffe*-Methode am Hitachi 717 und 747, sowie der Kodak Ektachem-Methode am Kodak Ektachem 700. Durch Bilirubin scheint die enzymatische Methode nicht gestört zu werden.

Auch zur Bestimmung der Kreatinin-Clearance ist die enzymatische Methode genauso geeignet wie die *Jaffe*-Methode, da die Quotienten aus Urin- zu Serumkreatinin entsprechend den Ausgleichsgeraden bei beiden Methoden nahezu identisch sind.

Die ermittelten Impräzisionen weichen nicht wesentlich von denen der kinetischen *Jaffe*-Methode ab und sind für die Routine durchaus als gut zu bezeichnen.

Danksagung

Wir danken Frau Anne Behrends und Herrn Holger Hille für die äußerst sorgfältige Durchführung der Analytik.

Literatur

1. Wahlefeld AW, Siedel J (1985) Creatine and Creatinine. In: Methods of Enzymatic Analysis Vol. VIII (Bergmeyer HU ed) Verlag Chemie Weinheim, Germany pp 488–506
2. Tanganelli E, Prencipe L, Bassi D, Cambiaghi S, Murador E (1982) Enzymatic assay of creatinine in serum and urine with creatinine deiminase. *Anal Chem Acta* 183, 75–80
3. Guder WG, Hoffmann GE, Hubbuch A, Poppe WA, Siedel J, Price CP (1986) Multicenter evaluation of an enzymatic method for creatinine determination using a sensitive colour reagent. *J Clin Chem Clin Biochem* 24, 889–902
4. Sonntag O, Schumann G (1991) Evaluation einer enzymatischen UV-Methode zur Bestimmung der Creatinin-Konzentration im Serum. *Lab Med* 15, 518–523
5. Fröhlich K (1991) Enzymatischer UV-Test von Kreatinin am EPOS 5060. *GIT-Labor-Medizin* 287–292
6. Passing H, Bablok W (1983) A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from different analytical methods. Applications of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. *J Clin Chem Clin Biochem* 21, 709–720
7. da Fonseca-Wollheim F (1988) Ringstudie zur Bilirubininterferenz bei der Bestimmung von Serum-Creatinin. *Lab Med* 12, 317–320