

“Gerçek” Kreatinin Ölçümü İçin Geliştirilen Kreatinin Ölçüm Yöntemlerinin Karşılaştırılması

[Comparison of Creatinine Measurement Methods Developed for “True” Creatinine]

Bülent Aydınbelge¹,
Aytün Ş.Kılınç¹,
Banu Diri²,
Murat Duranay²,
Gülsevım Saydam¹,
Doğan Yücel¹

Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, ¹Tıbbi Biyokimya Bölümü, ²Nefroloji Kliniği, Ankara

Yazışma Adresi
[Correspondence Address]

Doğan Yücel

S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Tıbbi Biyokimya Bölümü, Ulucanlar Cad.,
Cebeci, Ankara 06340, Türkiye
Tel: 90-312-5953212
Faks: 90-312-3621857
E-posta: doyuucel@yahoo.com

Kayıt Tarihi: 25 Şubat 2011; Kabul Tarihi: 27 Ekim 2011
[Registered: 25 February 2011; Accepted: 27 October 2011]

ÖZET

Amaç: Kreatinin ölçümünde kullanılan yöntemlerin çoğu Jaffe reaksiyonuna dayanır. Çeşitli kreatinin dışı bileşikler Jaffe yöntemini interfere eder. Bu çalışmanın amacı, Jaffe reaksiyonuna dayanan “gerçek” kreatinin ölçümüne yönelik yöntemler geliştirerek performans özelliklerini karşılaştırmak ve yöntemleri otomatize etmektir.

Yöntem: Çalışmada 102 kronik böbrek hastası ile 37 sağlıklı kontrolden elde edilen serumlarda şu yöntemlerle kreatinin ölçümleri yapıldı: Enzimatik yöntem, Jaffe reaksiyonuna dayanan kinetik ölçüm yöntemi, asidifikasyon yöntemi, farklı pH’da tamponlanan [(pH 7.8 Tamponlu1) ve pH 9.65 (Tamponlu2)] pikrik asit ayıraçlarına dayanan yöntemler, Fuller’s earth’e kreatinin adsorbsiyonuna dayanan yöntem. Yöntemlerin performans özelliklerinin karşılaştırılmasında enzimatik yöntem referans alındı.

Bulgular: Kullanılan yöntemlerin tümü de kinetik Jaffe yöntemine göre daha düşük kreatinin değerleri verdi. Enzimatik yöntem (x) göre diğer yöntemlerin ilişkisini ortaya koyan regresyon denklemleri şöyle bulundu: Kinetik: $0.24 + 0.98x$; Asidifikasyon: $0.27 + 0.87x$; Tamponlu1: $0.22 + 0.91x$; Tamponlu2: $0.10 + 0.96x$; Fuller’s earth: $0.32 + 0.86x$.

Sonuç: Adsorbsiyon yöntemi dışında tüm yöntemler otomatize edilebilmektedir. Performans özellikleri genel olarak kinetik Jaffe ve enzimatik yöntem ile uyumludur. Bunlar içinde enzimatik yöntemle en iyi uyum gösteren Tamponlu 2 yöntemidir. Yöntem rutin çalışmalara elverişli, ucuz, otomatize edilebilir özelliktedir.

Anahtar Kelimeler: Kreatinin, glomerüler filtrasyon hızı, kronik böbrek hastalığı, yöntem karşılaştırma, standardizasyon

ABSTRACT

Objective: Commonly used creatinine methods are based on Jaffe reaction. Jaffe reaction is interfered by various interferents. Our aim was to improve and automate “true” creatinine measurement methods based on Jaffe reaction and to compare the performance of these methods.

Methods: Sera were collected from patients with chronic kidney disease (CKD, n = 102) and healthy controls (n = 37). Creatinine was measured by enzymatic method, kinetic method based on Jaffe reaction, acidification method, and “buffered methods” [(pH 7.8, Buffered1) and (pH 9.65, Buffered2)] and a method based on creatinine adsorption to Fuller’s earth. Enzymatic method was considered as a reference in method comparison.

Results: All the methods used gave lower creatinine concentrations than Jaffe kinetic method. Relationships between enzymatic method (x) and the others (y) were as following: Kinetic method: $0.24 + 0.98x$; acidification method: $0.27 + 0.87x$; Buffered1: $0.22 + 0.91x$; Buffered2: $0.10 + 0.96x$ and adsorption method: $0.10 + 0.96x$.

Conclusions: All methods can be automated except adsorption method. Performance of the methods is comparable with Jaffe kinetic and enzymatic methods. Among the methods, Buffered2 is the best compatible with enzymatic method. It is cheaper, suitable for routine studies and it can be automated.

Key Words: creatinine, glomerular filtration rate, chronic kidney disease, method comparison, standardization

Giriş

Plazma kreatinin konsantrasyonu bugün için böbrek fonksiyonunun değerlendirilmesinde kullanılan en önemli analittir. Serum ve idrarda kreatinin ölçümü için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar içinde en yaygın kullanılan olan yöntem, alkali ortamda pikrik asit ve kreatinin arasında renk oluşumuna dayanan Jaffe reaksiyonuna dayanır. Jaffe reaksiyonu kreatinin için spesifik değildir; glukoz, proteinler, aseton, askorbik asit, alfa-keto bileşikler, bilirubin, sefalosporin grubu antibiyotikler gibi çok sayıda metabolit veya molekülünden etkilenir. Bu yüzden, Jaffe reaksiyonu kreatinin konsantrasyonunun gerçek değere göre daha yüksek hesaplanmasına neden olur (1). Buna rağmen, ilk kez Jaffe tarafından 1886'da tanımlanan Jaffe reaksiyonu günümüzde hala geçerliliğini korumaktadır.

Jaffe yönteminin özgüllüğünün geliştirilmesi için farklı yaklaşımlar önerilmiştir. Reaksiyonun başlatılmasından bir süre sonra seçilen zaman aralığında (genellikle 10 – 80 saniye) renk oluşum hızının ölçülmesi interferansı bir ölçüde azaltmaktadır (Kinetik Jaffe Yöntemi). Ancak kinetik Jaffe yöntemi ile serumda elde edilen sonuçlar da önemli ölçüde yükseklik göstermektedir (2,3). Diğer bir yaklaşım ise alkali ortamda kreatinin ile oluşan rengin asit eklenmesi ile yeniden kaybolması temeline dayanan asidifikasyon işlemidir (4-6). Kreatinin magnezyum silikat killerine adsorbe olur. Kreatininin "Fuller's earth"e (Floridin) spesifik adsorpsiyonu sonucunda kreatinin dışı kromojenler ortamdaki uzaklaştırılabilir. Bu yaklaşım da "gerçek" kreatinin ölçümü için önerilmiştir (7-9). Kreatinin ölçümünde enzimatik yöntemler de tanımlanmıştır. Kreatinin ölçümü için geliştirilen enzimatik yöntemlerin, kinetik Jaffe yöntemine göre daha özgül olduğu belirtilmektedir (10).

Bu çalışmada başlıca amaç, Jaffe reaksiyonunda görülen kreatinin dışı kromojenlerin etkisiz kalacağı yöntemleri laboratuvar koşullarında saptamaktır. Bu amaçla reaksiyon ortamının asidifikasyonu veya pikrik asit ayırıcının farklı pH'larda tamponlanmasıyla çalışmalar yapılarak, uygunluğu saptanan yöntemlerin otomatik sistemlere uygulanması düşünüldü. Bunların yanı sıra klasik Floridin "gerçek" kreatinin yöntemi ile de çalışmalar yapıldı. Rutin çalışmalarda kullanılan "Kinetik Jaffe" ve enzimatik kreatinin ölçüm yöntemleriyle de paralel ölçümlerin yapılması düşünüldü. Ayrıca, yöntemlerin performansı kronik böbrek hastalığı olan hastalar ile sağlıklı bireylerde yapılan ölçümlerle de karşılaştırıldı.

Gereç ve Yöntemler

Cihazlar

Beckman-Coulter Olympus AU 400 ve Olympus AU 2700 analizörleri (Beckman-Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA), Sigma 3K30 yüksek hızlı santrifüj cihazı (SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Germany), Shimadzu CL-770 Spektrofotometre (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), pH metre: Hanna HI 9321 Microprocessor (Hanna Instruments, Portugal).

Ayıraçlar

Kullanılan kimyasallardan kreatinin, pikrik asit, sodyum dodesil sülfat (SDS), sodyum hidroksit, sodyum fosfat, sodyum tungstat ve sülfirik asit Merck firmasından (E. Merck, Darmstadt, Germany); HCl ve asetik asit Riedel-de Haën'den (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Germany), Fuller's earth Sigma'dan (Sigma Chemical Company Poole, Dorset, UK) sağlandı. Kinetik Jaffe yöntemi olarak Beckman - Coulter kitleri (Beckman-Coulter, Inc.), enzimatik kreatinin ölçümü için Roche kitleri (Roche Diagnostics, IN, USA) kullanıldı.

Yöntemler

Serum kreatininini fotometrik olarak şu yöntemlerle ölçüldü:

Asidifikasyon yöntemi. Asidifikasyon yöntemi olarak Heinegard ve ark.'nın geliştirdiği yöntem değiştirilerek kullanıldı (6). Yöntemin prensibi, serumda bulunan kreatininin pikrik asitle verdiği rengin asidik ortamda yok olması, ancak kreatinin dışı kromojenlerin verdiği rengin asidik ortamda da sürmesine dayanır. Uygulamada reaksiyon ortamının pH'sı <5.8'e getirildi. Renk şiddetinde asitleştirmeye bağlı azalma spektrofotometrik olarak 520 nm'de belirlendi. Yöntem Olympus AU 400 cihazına uygulandı.

Pikrik asit ayırıcının tamponlanmasına dayanan yöntemler. Yatızidis'in (11) çalışmasından yola çıkarak farklı pH değerlerinde tamponlanan alkalen pikrat ayıraçları ile kreatinin ölçümü yapıldı.

pH 7.8 (Tamponlu 1). Pikrik asit ayırıcının (25 mmol/L) pH'sı fosfat tampon ile 7.8'e ayarlandı (R1). Örnekteki kreatininin önce pH'sı 7.8 olan bu pikrik asit ayırıcı ile reaksiyon vermesi sağlandı, daha sonra NaOH ayırıcı (R2) eklenerek 520 nm'de ölçüm yapıldı. Yöntem, Olympus AU 400 cihazına uygulandı.

pH 9.65 (Tamponlu 2). Pikrik asit ayırıcının (25 mmol/L) pH'sı fosfat tampon ile 9.65'e ayarlandı (R1); reaksiyon bu pH'da başlatıldı ve ortama NaOH ayırıcı (R2) eklenerek 520 nm'de ölçüm yapıldı. Yöntem Olympus AU 400 cihazına uygulandı.

Adsorbsiyon yöntemi. Bu çalışmada Haeckel'in (9) önerdiği yöntem kullanıldı. Bu yöntemin prensibi deproteinize serum örneğindeki kreatininin Fuller's earth'e (Floridin) adsorbe olması, kreatinin dışı kromojenlerin santrifügasyon ile uzaklaştırılması ve sonrasında adsorbe olan kreatininin Jaffe ayırıcı ile renk oluşturmasına dayanır. Deproteinizasyonda Folin-Wu filtratı kullanıldı (sodyum tungstat + sülfirik asit); okumalar 520 nm dalga boyunda manuel olarak spektrofotometrede (Shimadzu CL-770) yapıldı.

Kinetik Jaffe yöntemi. Orijinal Beckman-Coulter ayıraçları kullanılarak Olympus AU 2700 analizöründe çalışıldı.

Enzimatik yöntem. Enzimatik yöntem olarak Roche/Hitachi CREA plus kiti kullanıldı.

Yöntemin prensibi kreatininin kreatininaz enzimi ile yıkılması ve daha sonra kreatinaz ve sarkozin oksidaz enzimleriyle üretilen hidrojen peroksidin peroksidaz varlığında parçalanması sonucunda Trinder Reaksiyonu

ile oluşan rengin 540 nm’de ölçülmesine dayanmaktadır. Yöntem Olympus AU 400 cihazına uygulandı.

Kalibrasyon İşlemleri

Enzimatik yöntem dışındaki diğer beş yöntemde kalibrasyon için Olympus Sistem Kalibratör 66300 (Lot No: 0113 kullanıldı. Sıfır standardı olarak deiyonize su kullanıldı. Sistem kalibratörünün kreatinin değeri Ulusal Standartlar ve Teknolojisi Enstitüsü (NIST) Standart Referans Malzemeleri 909b Düzey 2’ye göre izlenebilirdi. Enzimatik yöntemde kalibratör olarak %0.9 NaCl (S1, sıfır standardı) ve c.f.a.s. (S2) kullanıldı. Enzimatik yöntemde kullanılan kalibratörün kreatinin değeri izotop dilüsyon-kütle spektrometri (ID-MS) tekniğine göre izlenebilirdi.

Kontrol Materyali

Enzimatik yöntem dışındaki yöntemler için kontrol materyali olarak Beckman-Coulter Kontrol Serum 1 ODC0003 (Lot No: 0027 ve Kontrol Serum 2, ODC0004 (Lot No: 0028 kullanıldı. Enzimatik yöntemde ise kontrol materyali olarak Precinorm U ve Precipath U (Roche Diagnostics) kullanıldı.

Yöntem Performansı Çalışmaları

Doğrusallık. Doğrusallık çalışması için kreatinin konsantrasyonu bilinen serum havuzuna stok kreatinin çözeltisinden ekleme yapılarak yüksek kreatinin içeren (10 mg/dL) serum havuzu oluşturuldu; bu havuz başlangıç serum havuzu ile seyreltilerek farklı kreatinin konsantrasyonlarında serum havuzları elde edildi. Konsantrasyonları 10, 7.5, 5.0, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156 ve 0.078 mg/dL olan bu havuzlarda her bir yöntemle çift kreatinin çalışması yapıldı.

Kesinlik. Düşük ve yüksek düzeyde kreatinin içeren iki ayrı serum havuzu oluşturuldu. Çalışma içi kesinlik çalışmasında bu havuzlar aynı seride 21 kez çalışıldı. Günler arası kesinlik çalışması için aynı havuzlardan örnekler bölünerek -80 °C’de saklandı; bu örnekler, her gün çözülerek 21 gün çalışıldı.

Saptama sınırı. Bu amaçla 21 kez boş örnek (kör) çalışması yapıldı. Elde edilen absorbans değerlerinin ortalama ve standart sapması hesaplandı. Ortalama değere 3 standart sapma eklenerek elde edilen absorbans değerine karşılık gelen konsantrasyon, saptama sınırı olarak belirlendi.

Geri kazanım. Kreatinin konsantrasyonu 1.0 mg/dL olan serum havuzuna 5 farklı düzeyde kreatinin eklendi ve her düzeyde eklenen kreatininin ne kadar doğru ölçülebildiği hesaplandı, sonuçlar % geri kazanım (%R) olarak ifade edildi.

Yöntem karşılaştırma. Bu amaçla S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nefroloji Polikliniği’nde izlenen 102 kronik böbrek hastasından (yaş: 49 ± 15 yıl, 40 erkek, 62 kadın) rutin izlem sırasında alınan açlık kanı örnekleri ve 37 sağlıklı gönüllüden (yaş: 45 ± 13 yıl, 17 erkek, 20 kadın) alınan açlık kan örnekleri kullanıldı. Çalışma hakkında S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Eğitim Planlama ve Koordinasyon Kurulu’ndan onay alındı; hastalara sözlü bildirim yapılarak onayları alındı. Kan örnekleri vakumlu jelli tüplere (Vacutainer SST, Becton-Dickinson) alındı, pıhtılaşma sonrasında 1500 g’de 10 dakika santrifüj edildi, ayrılan serum örnekleri çalışma zamanı çıkarılmak üzere -80 °C’de donduruldu. Yöntem karşılaştırma çalışmaları Clinical Laboratory Standards Institute tarafından yayımlanan standart EP9-A2 rehberine göre yapıldı (12). Buna göre, örnekler gruplandırılarak her bir yöntemle farklı günlerde eş zamanlı olarak (toplam 2 saat içinde) çalışıldı. Yöntem karşılaştırmada enzimatik yöntem referans alındı.

İstatistiksel Analiz

Tanımlayıcı istatistiksel analizler, yöntemler arasındaki korelasyon analizi (Pearson) için “SPSS for Windows ver. 15.00”, Deming regresyon analizi için Analyze-It (Microsoft) paket istatistik programları kullanıldı.

Bulgular

Hasta ve kontrol gruplarında tüm yöntemlerle elde edilen kreatinin değerleri Tablo 1’de verilmektedir. Tabloda da görüldüğü gibi, değiştirilen yöntemlerin tümünün de ortalama kreatinin değerleri kinetik Jaffe yöntemine göre daha düşüktü.

Doğrusallık çalışmasındaki bulgular Tamponlu1, Tamponlu2 ve Adsorbsiyon yöntemlerinin 10 mg/dL’ye kadar doğrusal (lineer) olduğunu, Asidifikasyon yönteminin >7.5 mg/dL konsantrasyonlarda doğrusallığını koruyamadığını göstermektedir.

Saptama sınırı çalışmasında yöntemlerin alt saptama sınırı birbirine yakındır. Saptama sınırları Asidifikasyon yöntemi için 0.034 mg/dL, Tamponlu1 için 0.064 mg/dL,

Tablo 1. Hasta ve Kontrol Gruplarında Kreatinin Değerleri.

Yöntem	Hasta Grubu ($\bar{X} \pm s$) mg/dL (n = 102)	Kontrol Grubu ($\bar{X} \pm s$) mg/dL (n = 37)
Enzimatik	1.53 ± 1.16	0.74 ± 0.14
Kinetik Jaffe	1.73 ± 1.13	0.97 ± 0.15
Asidifikasyon	1.60 ± 0.99	0.88 ± 0.19
Tamponlu1 (pH 7.80)	1.62 ± 1.04	0.86 ± 0.16
Tamponlu2 (pH 9.65)	1.57 ± 1.11	0.80 ± 0.15
Adsorbsiyon	1.62 ± 1.00	0.98 ± 0.15

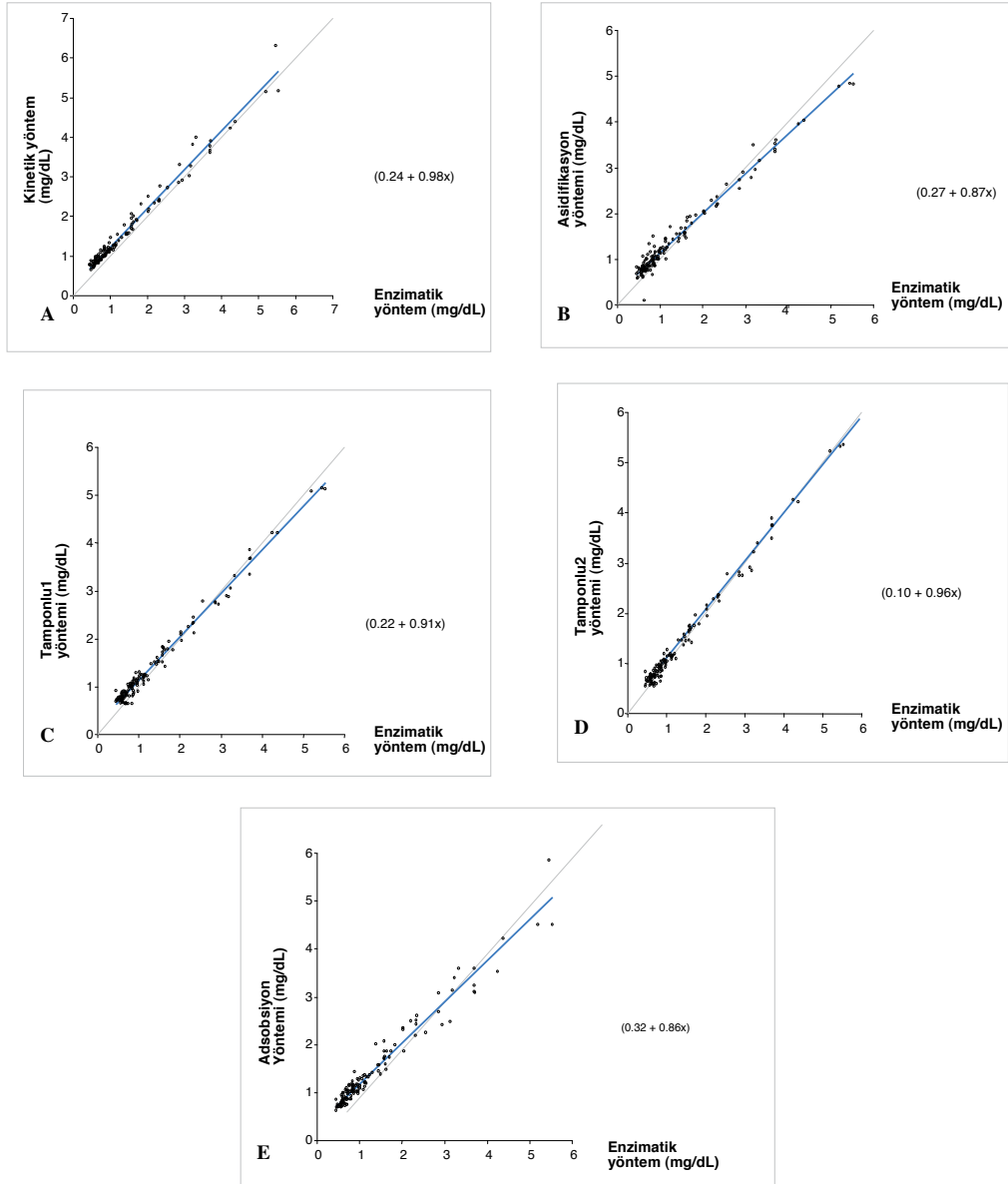
Tamponlu2 için 0.048 mg/dL, Adsorbsiyon yöntemi için 0.037 mg/dL olarak bulunmuştur. Kit açıklamalarında saptama sınırı enzimatik yöntem için 0.030 mg/dL, kinetik Jaffe için 0.027mg/dL olarak verilmektedir.

Geri kazanım çalışmasında elde edilen ortalama %R değerleri Asidifikasyon, Tamponlu1, Tamponlu2 ve Adsorbsiyon yöntemleri için sırasıyla %97.1, %98.3, %96.3 ve %102.6 olarak bulundu.

Kesinlik çalışmasında yöntemlerin çalışma içi kesinliği düşük kontrol havuzunda (1 mg/dL) (n = 21) aynı yöntem sırasıyla %0.75, %1.1, %1.63 ve %5.08; yüksek

kontrol havuzunda (6.58 mg/dL) %0.61, %0.71, %0.86 ve %1.89 olarak bulundu. Yöntemlerin günler arası kesinliği ise düşük havuzda aynı yöntem sıralamasıyla (1 mg/dL) %3.20, %2.34, %6.02, %5.14; yüksek havuzda (6.58 mg/dL) %3.0, %2.76, %3.25, %3.93 idi. Enzimatik yöntemin çalışma içi ve günler arası kesinliği %0.9 ve %2.1, kinetik Jaffe yönteminin ise %1.19 ve %2.0 idi.

Yöntem karşılaştırma çalışması kapsamında Enzimatik yöntem referans alınarak yapılan Deming regresyon analizi sonuçları Şekil 1'de verilmektedir.



Şekil 1. Deming regresyon analizi ile yöntem karşılaştırma sonuçları. Koyu çizgi, yöntemler arasındaki ilişkiyi, soluk çizgi ideal ilişkiyi göstermektedir. Regresyon denklemi, r değeri, kesim ve eğim değerlerinin %95 güven aralıkları (CI) ve regresyon çizgisi etrafındaki dağılımın standart sapması (Sy/x) her bir analiz için aşağıda verilmektedir. Değerler aralığı enzimatik yöntemle göre 0.45 – 5.54 mg/dL'dir (SI birimi olarak 40 – 490 µmol/L). (A) enzimatik ve kinetik Jaffe, $y = 0.24 + 0.98x$ ($r=0.97$; kesim için %95 CI: 0.17 - 0.30; eğim için %95 CI: 0.91 - 1.04; Sy/x: 0.142); (B) enzimatik ve asidifikasyon, $y = 0.27 + 0.87x$ ($r=0.939$; kesim için %95 CI: 0.22 - 0.31; eğim için %95 CI: 0.84 - 0.89; Sy/x: 0.146); (C) enzimatik ve tamponlu 1, $y = 0.22 + 0.91x$ ($r=0.938$; kesim için %95 CI: 0.18 - 0.24; eğim için %95 CI: 0.88 - 0.93; Sy/x: 0.145); (D) enzimatik ve tamponlu 2, $y = 0.10 + 0.96x$ ($r=0.947$; kesim için %95 CI: 0.08 - 0.13; eğim için %95 CI: 0.94 - 0.98; Sy/x: 0.106); (E) enzimatik ve adsorbsiyon, $y = 0.32 + 0.86x$ ($r=0.952$; kesim için %95 CI: 0.24 - 0.40; eğim için %95 CI: 0.78 - 0.94; Sy/x: 0.185).

Tartışma

Kreatinin ölçümünde 100 yılı aşkındır kullanılan Jaffe reaksiyonu bugün önemini hala sürdürmektedir. Ancak Jaffe reaksiyonu çeşitli kreatinin dışı madde veya moleküllerce etkilenir. Bu yüzden özellikle serumda “gerçek” kreatinin ölçüm yöntemlerinin geliştirilmesi için pek çok girişimde bulunulmuştur. Bugün bir yandan otomatik sistemlerin yaygın kullanımı ve bu sayede kinetik ölçümlerin kolayca uygulanabilmesi, bir yandan da ID-MS yöntemine göre izlenebilir ürünlerin sağlanması ve böylece harmonizasyon ve standardizasyon alanında önemli başarıların elde edilmesi sayesinde, kimyasal tekniklerle “gerçek” kreatinin ölçümü arayışları eski yoğunluğunu yitirmiştir. Jaffe yöntemi ile elde edilen sonuçların ID-MS'e göre düzeltilerek verilmesi de (Kompanse Jaffe) bu gelişmelere önemli katkı sağlamıştır (13, 14) ancak yeterli değildir, çünkü her hasta örneğinde kreatinin dışı kromojenlerin sabit miktarda olduğu kabul edilir ki bu da gerçekle bağdaşmaz (15). Bütün bu standardizasyon – harmonizasyon – izlenebilirlik çabalarına rağmen Jaffe yöntemi ile kreatinin ölçümünde sorunlar ortadan kaldırılabilmemiş değildir (16). Bu sorunu aşmak amacıyla rutin çalışmalar için 1970'lerden başlayarak enzimatik yöntemler geliştirilmişse de henüz yaygınlık kazanmamıştır (17). Enzimatik yöntemlerin ID-MS yöntemine göre izlenebilir ise daha doğru kreatinin sonuçları verdiği belirtilmektedir; bu bakımdan enzimatik kreatinin ölçümleri “kompanse Jaffe” yönteminden daha üstündür (18), referans (HPLC) ve tanımlayıcı (ID-MS) yöntemlerle uyumludur (19). Bu nedenden çalışmada enzimatik yöntem referans alındı. Çalışmada sağlıklı kontrol grubunda enzimatik yöntemle elde edilen kreatinin değerleri (0.74 ± 0.14 mg/dL) kinetik Jaffe'ye göre (0.97 ± 0.15) yaklaşık 0.2 mg/dL düşüktü ve bu bulgu literatür bilgisiyle uyumluydu (10, 20). Enzimatik yöntemin kinetik Jaffe'ye göre düşük sonuç vermesi hasta grubunda da sürdü. Hasta grubunda tüm kronik böbrek yetmezliği evrelerinde enzimatik yöntem kinetik Jaffe'ye göre yaklaşık 0.2 mg/dL düşük sonuç verdi (sonuçlar verilmemektedir). Jaffe reaksiyonunda modifikasyon yapılan diğer tüm yöntemler de, enzimatik yöntemden daha yüksek olmakla birlikte, kinetik Jaffe yönteminden düşük sonuçlar verdi.

Asidifikasyon yöntemi. İlk kez Slot tarafından (4) tanımlanmıştır. Bu yöntemde düşük pH'da protein çökmesini önlemek için renk reaksiyonu öncesinde örneklerin proteinsizleştirilmesi gereklidir. Daha sonra Heinegard ve ark. (6) örneklerde proteinsizleştirme yapılmadan asidifikasyon yöntemini uygulamışlardır. Çalışmada protein çökmesi reaksiyon ortamına sodyum dodesil sülfat (SDS) ve borat eklenerek önlenmektedir. Burada SDS asit pH'da protein çökmesini, borat ise pikratın karbonhidratlarla reaksiyon vermesini önler. Çalışmamızda yöntemin otomatik cihaza uygulanabilmesi için Heinegard ve ark.'nın geliştirdiği yöntem kullanıldı. Ancak yazarların yaptığından farklı olarak SDS alkalen pikrat ayırıcı içine değil, asidifikasyonda kullanılan asetik asit

çözeltisi içine eklendi. Pikrat reaksiyonu sonrasında %6 SDS ve 5 mol/L asetik asit eklenerek reaksiyon ortamının pH'sı <5.8'e getirildi. Böylece kreatininden kaynaklanan renk kaybı ölçüldü. Yöntem Olympus AU 400 cihazına uygulandı. Literatürde otomatik asidifikasyon yöntemi yer almamaktadır. Asidifikasyon yönteminin sonuçları kinetik Jaffe'ye göre yaklaşık 0.1 mg/dL daha düşüktür; enzimatik yöntemle uyumu diğer modifiye yöntemlere göre daha kötüdür (Şekil 1B, $y = 0.27 + 0.87x$).

Jaffe reaksiyonunda pH'nın etkisi. Çalışmada farklı pH değerlerinde tamponlanan alkalen pikrat ayırıcı ile ölçümler yapıldı. Literatürde bu konuda çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Yatizidis'in çalışmasına göre (11) kreatinin alkalen pikrat ayırıcı ile pH 9.65'de reaksiyon vermemekte, pH 11.5'de ise sadece kreatinin ve proteinler ile renk oluşmaktadır. Buna dayanarak her iki pH değerinde elde edilen absorbans değerlerinin farkı “gerçek” kreatinin yansıtır. Çalışmada, pH 9.65'e ek olarak, kreatinin ile pikrat arasındaki reaksiyonun pH ne kadar düşürülebilirse o kadar zayıf kalacağı düşüncesinden yola çıkılarak çökme olmaksızın kreatinin dışı kromojenlerin ölçülebileceği en düşük pH saptandı (pH 7.80) ve bu pH'da da tamponlama yapıldı. Böylece, pH 7.80 ve 9.65'de tamponlanan alkalen pikrat ayırıcıları ile örnek karıştırıldıktan sonra elde edilen absorbans kreatinin dışı kromojenlerin reaksiyonunu yansıtacaktır. Daha sonra pH'nın NaOH (3 mol/L) eklenerek >12.8'e çıkarılmasıyla kreatininden kaynaklanan renk ölçüldüğünde aradaki fark “gerçek” kreatininin daha doğru ölçülmesini sağlayacaktır. Her iki pH'da yürütülen reaksiyon da otomatik cihaza uygulandı. Her iki yöntem de kinetik Jaffe'ye göre düşük sonuçlar verdi (pH 7.80'de yaklaşık 0.1 mg/dL, pH 9.65'de yaklaşık 0.15 mg/dL düşük sonuçlar elde edildi). pH 9.65'e tamponlanan pikrat ayırıcı ile enzimatik yöntem arasında daha iyi uyum görüldü (Şekil 1 C ve D). Literatürde farklı pH uygulamalarının otomatik sistemlere uygulanmasına ilişkin bilgi yoktur. Çalışma sonuçları, her iki pH'da da ama özellikle pH 9.65'e tamponlanan alkalen pikrat ayırıcıları ile sağlıklı, otomatik analiz yapılabileceğini göstermektedir.

Adsorbsiyon yöntemi. Vaktiyle referans yöntem olarak görülen Floridin adsorbsiyon yöntemi (9), günümüzde önemini yitirmiştir. Çünkü otomatize edilmesi mümkün değildir, ön işlem (proteinsizleştirme) gerekmektedir, kullanılan örnek hacmi yüksektir, absorbans ölçümü öncesinde de santrifügasyon gereklidir ve çökeğin iyi ayrışmaması veya dağılması okumaları etkileyebilmektedir. Çalışmamızda adsorbsiyon yöntemi de hasta grubunda kinetik Jaffe'ye göre düşük sonuç vermiştir ancak kontrol grubunda belirgin fark yoktur. Yöntemin enzimatik yöntem ile uyumu da diğer yöntemlere göre kötüdür (Şekil 1 E). Ayrıca yöntemin çalışma içi ve günler arası kesinlik değerleri de iyi değildir.

Kinetik Jaffe yöntemi. Bugün tüm dünyada en çok kullanılan kreatinin ölçüm yöntemidir. Kreatinin dışı kromojenlerin bazılarının pikrat ile reaksiyonu kreati-

nine göre yavaş, bazılarının hızlıdır. Örneğin proteinler yavaş, asetoasetat hızlı reaksiyon verir. Bu yüzden ölçümlerin 10 – 80 saniye arasında yapılması kreatinin dışı kromojenlerin etkisini azaltır. Ancak gene de interferans sorunu tam olarak çözülememiştir. Vickery ve ark (18) kinetik Jaffe yöntemi sonuçlarının ID-MS'e göre %7.5 daha yüksek olduğunu belirtmektedirler. Çalışmamızda kinetik Jaffe yöntemi, enzimatik yöntemle göre yaklaşık 0.20 - 0.25 mg/dL yükseklik gösterdi. Ancak, iki yöntem arasındaki uyum nispeten iyiydi (Şekil 1A; $y = 0.98x + 0.24$). Bu regresyon analizine göre eğim 1'e yakındır, ancak kinetik Jaffe yöntemi enzimatik yöntemle göre yaklaşık 0.25 mg/dL sabit hata vermektedir.

Sonuç. Kreatinin bireysel biyolojik değişkenliğinin çok düşük olmasından dolayı böbrek fonksiyonunun değerlendirilmesinde ve özellikle de takibinde ve glomerüler filtrasyon hızının saptanmasında çok değerli bir testtir. [Bireysel biyolojik değişkenliği sağlıklı bireylerde %4.3, kronik böbrek yetmezliğinde %5.3'tür (21, 22)]. Bu durum, biyolojik değişkenliğe dayalı hata sınırlarının da düşük kalmasını getirmektedir. Buna göre azami kesinlik değeri <%2.7, azami sapma (bias) <%3.8, azami toplam hata <%8.2 olmalıdır (21). Kreatinin için bu hata hedeflerini patolojik örneklerde tutturmak belki mümkünse de, "normal" örneklerde yakalamak zordur. Nitekim 1.00 mg/dL kreatinin konsantrasyonunda laboratuvar içi kesinlik %2.0 ile %8.4 arasında değişmektedir (1). Enzimatik yöntemlerin ID-MS ile uyumlu olduğu gösterilmiştir ancak bugün için kullanılan yüksek enzim miktarları nedeniyle pahalıdır. Çalışmamızda verilen hata sınırlarına göre adsorbsiyon yöntemi dışındakilerin kesinliği literatür bilgilerine göre iyidir. Bu yöntemlerden pikrik asit ayırıcının pH 9.65'e tamponlandığı yöntem (Tamponlu 2) enzimatik yöntemle en iyi uyum gösteren yöntemdir. Dolayısıyla adsorbsiyon yöntemi dışındaki yöntemler, özellikle Tamponlu 2, "gerçek" kreatinin ölçümü için yararlıdır. Yöntemler ucuzdur, otomatik cihazlara uygulanabilmektedir.

Kaynaklar

- [1] Myers GL, Miller WG, Coresh J, Fleming J, Greenberg N, Greene T, Hostetter T, Levey AS, Panteghini M, Welch M, Eckfeldt JH. (2006) Recommendations for improving serum creatinine measurement: A report from the Laboratory Working Group of the National Kidney Disease Education Program. *Clin Chem*. 52:5-18.
- [2] Romer J. (1975) Evaluation of a kinetic method for creatinine. *Lab Med*. 6:15-8.
- [3] Spencer K. (1986) Analytical reviews in clinical biochemistry: the estimation of creatinine. *Ann Clin Biochem*. 23:1-25.
- [4] Slot C. (1965) Plasma creatinine determination: a new and specific Jaffe reaction method. *Scand J Clin Lab Invest*. 17:381-387.
- [5] Graffneter D, Janosova Z, Cervinkova I. (1967) Note on Slot's method for the specific determination of creatinine. *Clin Chim Acta*. 17:493-498.
- [6] Heinegard D, Tiderström G. (1973) Determination of serum creatinine by a direct colorimetric method. *Clin Chim Acta*. 43:305-310.
- [7] Knoll E, Stamm D. (1970) Specific determination of serum creatinine. *J Clin Chem Clin Biochem*. 8:582-587.
- [8] Haeckel R. (1980) Simplified determinations of the "true" creatinine concentration in serum and urine. *J Clin Chem Clin Biochem*. 18:385-394.
- [9] Haeckel R. (1981) Assay of creatinine in serum with use of fuller's earth to remove interferents. *Clin Chem*. 27:179-183.
- [10] Junge W, Wilke B, Halabi A, Klein G. (2004) Determination of reference intervals for serum creatinine, creatinine excretion and creatinine clearance with an enzymatic and a modified Jaffe method. *Clin Chim Acta*. 344:137-148.
- [11] Yatzidis H. (1974) New method for direct determination of "true" creatinine. *Clin Chem*. 20:1131-1134.
- [12] CLSI Standard EP9-A2. (2002) Method comparison and bias estimation using patient samples; approved guideline – second edition, Vol. 22, No: 19.
- [13] Wuyts B, Bernard D, Van Den Noortgate N, Van De Walle J, Van Vlem B, De Smet R, Geeter F, Vanholder R, Delanghe JR. (2004) Reevaluation of formulas for predicting creatinine clearance in adults and children, using compensated creatinine methods. *Clin Chem*. 49:1011-1014.
- [14] Chromy V, Rozkosna K, Sedlak P. (2008) Determination of serum creatinine by Jaffe method and how to calibrate to eliminate matrix interference problems. *Clin Chem Lab Med*. 46:1127-1133.
- [15] Panteghini M. (2008) Enzymatic assays for creatinine: time for action. *Scan J Clin Lab Invest Suppl*. 241: 84-88.
- [16] Delanghe JR, Cobbaert C, Galteau MM, Harmoinen A, Jansen R, Kruse R, Laitinen P, Thienpont LM, Wuyts B, Weykamp C, Panteghini M. (2008) Trueness verification of actual creatinine assays in the European market demonstrates a disappointing variability that needs substantial improvement. An international study in the framework of the EC4 creatinine standardization working group. *Clin Chem Lab Med*. 46:1319-1325.
- [17] Cobbaert CM, Baadenhuijsen H, Weykamp CW. (2009) Prime time for enzymatic creatinine methods in pediatrics. *Clin Chem*. 55:549-555.
- [18] Vickery S, Stevens PE, Dalton RN, Van Lente F, Lamb EJ. (2006) Does the ID-MS traceable MDRD equation work and is it suitable for use with compensated Jaffe and enzymatic creatinine assays? *Nephrol Dial Transplant* 21:2439-2445.
- [19] Lamb EJ. (2009) Creatinine. In *Methods in Clinical Chemistry* (Derleyen: Hickman PE, Koerbin G), s. 440-451, Mosby.
- [20] Mazzachi BC, Peake MJ, Ehrhardt V. (2000) Reference range and method comparison studies for enzymatic and jaffe creatinine assays in plasma and serum and early morning urine. *Clin Lab* 46: 53-55.
- [21] Westgard J. (2009) Biological variation in patients with disease. <http://www.westgard.com/biological-variation-in-patients-with-disease.htm>.
- [22] Ricos C, Iglesias N, Garcia-Lario J-C, Simon M, Cava F, Hernandez A, Perich C, Minchinela J, Alvarez V, Domenech M-V, Jimenez C-V, Biosca C, Tena R. (2007) Within-subject biological variation in disease: collated data and clinical consequences. *Ann Clin Biochem* 44:343-352.