

Proteinüride Esbach Yöntemi ile Turbidimetrik Yöntemin Karşılaştırılması*

Murat USTA, Osman OĞUZ, Sinem HOCAOĞLU, Berrin Berçik İNAL, Hale ARAL, Güzin YILMAZ, Güvenç GÜVENEN.

ÖZET

Amaç: Klinisyenlerin ESBACH yöntemiyle idrarda protein ölçümünü bazı durumlarda tercih etmesiyle ilgili olarak, ESBACH ve turbidimetrik otomasyon yöntemi ile elde edilen sonuçları karşılaştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: 24 saatlik idrar örneğinde (n=51) protein ölçümü Esbach yöntemi ile yapıldı ve Abbott Aeroset (Abbott Park, ABD) analizörüyle benzethonium kloridli turbidimetrik yöntem ile karşılaştırıldı.

Bulgular: Pairedsample T testi ile iki yöntem arasındaki fark ileri düzeyde anlamlı bulundu (sırasıyla $2,95 \pm 1,93$ g/gün ve $4,99 \pm 3,70$ g/gün, $p<0,0001$). Korelasyon analizinde $r=0,84$; $p<0,0001$ olarak bulundu. BlandAltman analizinde protein konsantrasyonu arttıkça her iki yöntem arasındaki farkın arttığı gözlemlendi. Farkların ortalaması (2,04 g/gün) ve SD (2,31 g/gün)'sinden hesaplanan uyum sınırı 2,58 ile 6,66 g/gün arasındaydı. BlandAltman analizinden yola çıkılarak hastalar 2 alt grupta toplandı; idrar protein ortalama düzeyi < 3 g/gün olanlar (Grup I, n = 24) ve ≥ 3 g/gün olanlar (Grup II, n = 27) MannWhitney U testi ile Grup II'nin mutlak fark ortalaması, Grup I'in mutlak fark ortalamasından istatistiksel olarak çok ileri düzeyde anlamlı yüksek bulundu (mutlak fark ortalamaları sırasıyla $3,31 \pm 2,38$ g/gün ve $0,96 \pm 0,76$ g/gün, $p<0,0001$).

Tartışma: İdrarda protein konsantrasyonu arttıkça iki yöntem arasında fark artmış ve bu fark bir profil sergileyerek turbidimetrik yöntemle doğru kaymıştır.

Anahtar Kelimeler: Esbach, Proteinüri, Turbidimetrik metod.

SUMMARY

Comparing Esbach Method with Turbidimetric Method in Proteinuria

Aim: Since clinicians especially preferred daily urine protein analysis with ESBACH method in many occasions we aimed to compare results of ESBACH with turbidimetric automation method.

Materials and Methods: Esbach results of 24 hour collected urine samples were compared with benzethonium chloride turbidimetric method by using Abbott Aeroset analyzer (Abbott Park, USA).

Results: There was an extremely significant difference between the two methods using pairedsample T test (2.95 ± 1.93 g/day and 4.99 ± 3.70 g/day; $p<0.0001$, respectively). The results were $r=0.84$ $p<0.0001$ in correlation analysis. It was determined that when the protein concentration increased, the differences between the two methods increased in BlandAltman analysis. The mean of differences (2.04 g/day) and SD (2.31 g/day) were used in calculating to accord level (2.58 and 6.66 g/day). After BlandAltman analysis was computed the patients were separated into two subgroups one with urine protein mean level < 3 g/day (Group I, n = 24) and the other ≥ 3 g/day (Group II, n = 27). It was found that the absolute difference mean of Group II was more significant than Group I using MannWhitney U test (absolute difference means were 3.31 ± 2.38 g/day and 0.96 ± 0.76 g/day, respectively; $p<0.0001$).

Discussion: When urine protein concentration increased, the difference between the two methods increased and this difference was in favor of turbidimetric method by performing a profile.

Key Words: Esbach, Proteinuria, Turbidimetric method

GİRİŞ

İdrarda bulunan protein miktarında artış olarak tanımlanan proteinürinin saptanması ve bu protein miktarının ölçülmesi, böbrek hasarının derecesini yansıtabildiği gibi tedaviye verilen cevabın izlenmesinde de kullanılır. Böbrek fonksiyonunun incelenmesinde noninvaziv ve önemli bir belirteç olduğundan sıklıkla başvuru alan biyokimyasal tahliller arasındadır.

Çalışılacak örnek tipinin doğru seçimi ve uygulanmasının takibi (24 saatlik örneğin gerektiği gibi toplanması) preanalitik hataları önlemede, dolayısıyla güvenilir laboratuvar sonuçları elde etmede önemli bir etkidir. Proteinüri miktarının belirlenmesinde 24 saatlik

idrarda numunesinin toplanamaması durumlarında spot idrar örneğinde protein / kreatinin (miligram/gram) oranı hesaplanabilir ve bu oranın günlük protein atımını yansıttığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (1). Ancak kas kütlesi fazla olan veya kaşetik veya diyabetik bireylerde (1,2), preeklampsi şüphesiyle izlenen gebe kadınlarda yapılan çalışmalarda 300 mg/g ve üzerindeki düzeylerde (3,4), proteinürinin arttığı olgularda protein / kreatinin oranıyla hasta takibinin yapılamayacağı ve 24 saatlik idrar proteini değerleri kadar doğru sonuç alınmadığı belirtilmektedir (5-7).

Çalışmamızda idrar proteini düzeyi $> 0,5$ g/gün bulunan hastalarda 24 saatlik idrar proteini ölçümünde manuel olarak ESBACH ve biyokimya analizöründe turbidimetrik yöntemle elde edilen protein değerlerini karşılaştırmayı amaçladık.

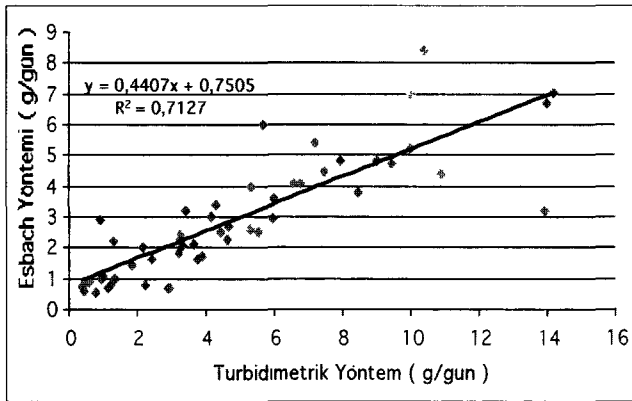
23-26 Nisan 2009 tarihlerinde Antalya'da Türk Klinik Biyokimya Derneği tarafından düzenlenen IX. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi'nde poster olarak sunulmuştur. İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Kliniği

GEREÇ VE YÖNTEM

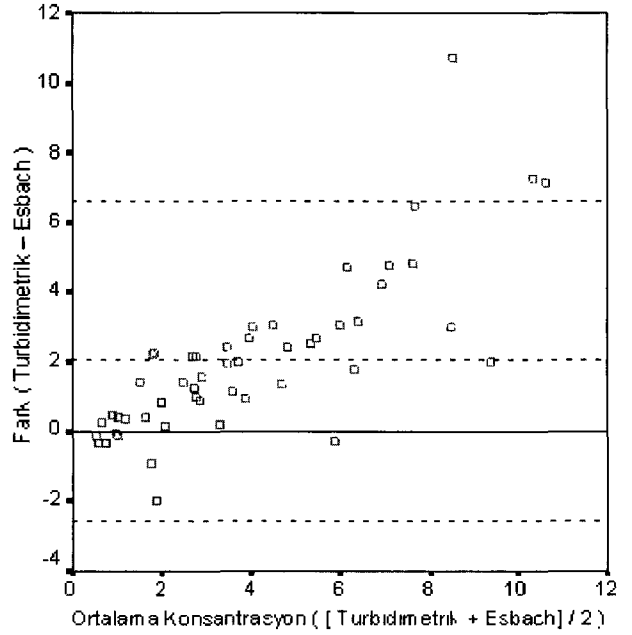
Sağlık Bakanlığı İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Merkez Polikliniğinde İdrar Analizi Laboratuvarı'nda Esbach yöntemiyle protein düzeyi > 0,5 g/gün bulunan farklı tanıları olan hastaların (n=51) 24 saatlik idrar örneklerinde çalışma yapıldı. Öncelikle 24 saatlik idrar örneğinden bir tüpe aktarılıp 3 dakika süreyle yaklaşık 1.800 devir/dakika (450 g) santrifüj edildi, olası hücreler çöktürüldü. Elde edilen süpernatanda iki farklı yöntemle idrarda protein tayini yapıldı.

Esbach yöntemi: Çift asitle (%1 pikrik asit, % 2 sitrik asit karışımı) proteini çöktürüp çöktüğünün verdiği yüksekliği okuma prensibine dayanmaktadır. 'U' işaretine kadar idrar ve 'R' işaretine kadar ESBACH ayıracağı (% 1 pikrik asit, % 2 sitrik asit karışımı, Gül Biyoloji, Türkiye) ile dolduruldu. Tıpası kapanıp, köpürtmemek için 5 – 10 kez baş aşağı getirip doğrultmakla karıştırıldı, ayaklığına yerleştirildi, düz bir yere kapalı bir şekilde bırakıldı, 24 saat sonra değerlendirildi. Esbach tüpünün çizgileri deneysel olarak elde edilmiştir. Çöktüğünün verdiği yükseklik hizasındaki sayı gr / L olarak protein değerini göstermektedir. Lineeritesi 0,5 12 gr/L'dir. Özgül ağırlığı 10-10 üstünde olan idrarlar önce dilüe edilip; sonuç seyreltim katsayısıyla çarpıldı (Örneğin, özgül ağırlığı 1006-1008'e getirecek şekilde 10-16 ise X 2, 1024 ise X 3) (4). Bu yöntemle proteinden başka maddeler de çöktürülür (örneğin, kreatinin, ürik asit, kinin, ürotropin gibi).

Turbidimetrik yöntem: Protein denatürasyonu ile oluşan bulanıklığın gösterdiği aborbans değişikliğinin değerlendirilmesi prensibine dayanmaktadır. Proteinin benzethonium klorid ile denatüre edilip oluşan bulanıklığın gösterdiği aborbans değişikliği turbidimetrik olarak 404 nm'de, Abbott Aeroset analizöründe (Abbott Park, USA) mg/dL olarak değerlendirildi. Lineeritesi 6,8 200 mg/dL olup; 200 mg/dL üzerinde 1:2, 1: 10 sulandırmalarla çalışıldı. Üretici firma tarafından kit prospektüsünde ölçüm sınırı (Limit of Quantitation LOQ) değeri 6,75 mg/dL olarak verilmiştir; ayrıca askorbik asit (>200 mg/dL), glukoz (>1.000 mg/dL) düzeylerinde interferans saptandığı bildirilmektedir.



Şekil 1. Esbach ve turbidimetrik yöntemler arasındaki lineer regresyon grafiği.



Şekil 2. Esbach ve turbidimetrik yöntemleriyle elde edilen idrar proteini sonuçlarının ortalama konsantrasyon değerlerine karşı fark değerlerinin saçılım grafiği (BlandAltman grafiği). Ortalama fark (2,04 g/gün) ve ± 2SD (± 4,62 g/gün) kesikli çizgilerle gösterilmiştir.

İstatistiksel analizler; SPSS 11.5 (SPSS, USA) ve Excel (Microsoft Corp., USA) programlarıyla yapıldı. Yöntemler arasındaki farklılığın anlamlılığı için pairesample T testi; metotlar arasındaki ilişki için lineer regresyon ve Pearson korelasyon analizi; yöntemler arasındaki uyum için BlandAltman analizi yapıldı.

BULGULAR

1. Pairesample T testi ile iki yöntem arasındaki fark ileri düzeyde anlamlı bulundu (sırasıyla 2,95 ± 1,93 g/gün ve 4,99 ± 3,70 g/gün; p<0,0001). Her iki yöntemin sonuçları arasında pozitif güçlü bir korelasyon vardı (r=0,84; p<0,0001). Esbach yöntemi ve turbidimetrik yöntemle ölçülen protein sonuçlarının lineer regresyon grafiği şekil 1'de gösterilmiştir.

2. BlandAltman analizinde protein konsantrasyonu arttıkça her iki yöntem arasındaki farkın arttığı gözlemlendi (Şekil 2). Farkların ortalaması (2,04 g/gün) ve SD (2,31 g/gün)'sinden hesaplanan uyum sınırı 2,58 ile 6,66 g/gün arasındaydı.

3. BlandAltman analizinden yola çıkılarak hastalar 2 altgrupta toplandı; idrar protein ortalama düzeyi < 3 g/gün olanlar (Grup I, n = 24) ve ≥ 3 g/gün olanlar (Grup II, n = 27) şeklinde. MannWhitney U testi ile Grup II'nin mutlak fark ortalaması, Grup I'in mutlak fark ortalamasından istatistiksel olarak çok ileri düzeyde anlamlı yüksek bulundu (mutlak fark ortalamaları sırasıyla 3,31±2,38 g/gün ve 0,96±0,76 g/gün; p<0,0001).

4. Elli bir idrar numunesinden 8'inde Esbach yöntemiyle elde edilen sonuçlar daha yüksek iken; 43'ünde turbidimetrik yöntemle elde edilen sonuçlar daha yüksek idi. Türbidimetrik yöntemle yüksek bulunan sonuçların yüzdesi Grup I'de % 70,8 iken; Grup II'de % 96,3 idi ($p = 0,019$; Fisher exact test ile elde edilmiştir).

TARTIŞMA

İdrarda protein miktarının belirlenmesinde çeşitli kalitatif ve kantitatif yöntemler bulunmaktadır (8-10). Bunlardan semikantitatif dipstick yöntemi idrarda sadece albümine duyarlıdır; globulin, myogloblin, hemogloblin, Bence Jones, mukoproteinler bu yöntemle saptanamaz. Günümüzde turbidimetrik (Sulfosalisilik asit, Trikloraetik asit, Benzethonium klorid) ve boya bağlayıcı yöntemler (Coomassie brilliant mavisi, Panceau S, Molibdatpyrogallol kırmızısı) idrarda albümin dışındaki proteinlerin de saptanmasını sağlar; bu yöntemler rutin biyokimya laboratuvarlarında otomasyona uygun olması açısından en çok tercih edilen yöntemlerdir. Dört farklı otomasyon yöntemiyle (boya bağlama ve turbidimetrik) manuel yöntemin (Ponceu S/TCA) karşılaştırıldığı bir çalışmada; idrar numunesinin içeriğinin otomasyon yöntemlerinde interferansa yol açtığı, normal aralıklarda (<100 mg/L) idrar proteini ölçümünde tekrarlanabilirliğin zayıfladığı (imprecision), doğruluktan sapmanın arttığı (inaccuracy) sonucuna varılmıştır. Aynı çalışmada su veya salin solüsyonu ile yapılan sulandırmanın, hasta idrar örneğinin iyonik kompozisyonunu bozduğu ve bir otomasyon yönteminin bundan olumsuz yönde etkilendiği görülmüştür (11). İjima ve arkadaşları geliştirdikleri acid violet 6B (AV6B) ile boyama yönteminin düşük protein düzeylerinde diğer otomasyon yöntemlerine göre daha güvenilir olduğunu savunmaktadır (12). Diğer bir çalışmada 150 mg/gün üzerinde süreklilik gösteren proteinürilerde idrar bulunan tüm proteinlerin ayrıştırılarak miktarlarının belirlenmesi ve aynı hastaların serum içeriğiyle birlikte değerlendirilmesinin önemi vurgulanmaktadır (13).

Yaptığımız bu çalışmada, Esbach yöntemiyle ölçülen 24 saatlik idrar proteini sonuçlarının turbidimetrik yöntemle ölçülen 24 saatlik idrar proteini sonuçlarına göre istatistiksel olarak düşük olduğu gösterildi. İki yöntem arasındaki uyumu araştırmak için yapılan BlandAltman analiziyle idrarda protein konsantrasyonu arttıkça her iki yöntem arasındaki farkın da arttığı saptanmıştır. Bu durum ortalama idrar proteini ile idrar proteini farkı arasında açık bir ilişki olduğunu göstermektedir. İdrarda protein konsantrasyonu arttıkça iki yöntem arasında fark artmış ve bu fark bir profil sergileyerek turbidimetrik yöntemle doğru kaymıştır. Nefrotik sendrom açısından kritik değer olan 3 g/gün'ün üzerindeki değerlerde iki yöntem arasındaki farkın arttığını saptadık. Türbidimetrik yöntemde cihaz sadece 9,6 mikrolitre idrar örneği alırken Esbachla yaklaşık 12 ml örnek kullanılıyor oluşunun, bu iki yöntem arasında farklılığa yol açabilecek diğer önemli bir etken olabileceğini düşünüyoruz.

Esbach yöntemiyle testin sonuçlanması için 24 saatlik süre gereksinimi, 0,5 g/gün altında kullanılamaması, 12 g/gün üstünü ölçmemesi, proteinden başka diğer maddeleri de çöktürmesi gibi bilinen dezavantajları vardır. Birim fiyatının oldukça düşük oluşu ise avantajdır. Tüm parametrelerde olduğu gibi idrar proteini test isteminin artmasıyla hem kişisel hatalardan arındırmak hem de daha hızlı ve kolay sonuç vermek için otomasyon yöntemleri tercih edilmektedir. Laboratuvarımızda kullanmakta olduğumuz bu iki farklı yöntem, klinik bulgularla ve diğer tanı yöntemleriyle beraber ele alınarak güvenilirlikleri açısından uzun süreli çalışmalarla değerlendirilmelidir.

KAYNAKLAR

1. **Price CP, Newall RG, Boyd JC.** Use of protein: Creatinine ratio measurements on random urine samples for prediction of significant proteinuria: A systematic review. *Clin Chem* 2005; 51: 1577-86.
 2. **Lemann J, Doumas BT.** Proteinuria in health and disease assessed by measuring the urinary protein/creatinine ratio. *Clin Chem* 1987; 33: 297-9.
 3. **Papanna R, Mann LK, Kouides RW, Glantz JC.** Protein/creatinine ratio in preeclampsia: a systematic review. *Obstet Gynecol* 2008; 112: 35-44.
 4. **Aggarwal N, Suri V, Soni S, Chopra V, Kohli HS.** A prospective comparison of random urine proteincreatinine ratio vs 24hour urine protein in women with preeclampsia. *Medscape J Med.* 2008; 10: 98-100
 5. **Antunes VV, Veronese FJ, Morales JV.** Diagnostic accuracy of the protein/creatinine ratio in urine samples to estimate 24 h proteinuria in patients with primary glomerulopathies: a longitudinal study. *Nephrol Dial Transplant.* 2008; 23: 22426. Urine proteintocreatinine ratio in an untimed urine collection is a reliable measure of proteinuria in lupus nephritis. *Rheumatology (Oxford).* 2007; 46: 64-52.
 7. **Lane C, Brown M, Dunsmuir W, Kelly J, Mangos G.** Can spot urine protein/creatinine ratio replace 24 h urine protein in usual clinical nephrology? *Nephrology (Carlton).* 2006; 11: 245-9.
 8. **Yenson M.** Klinik biyokimya laboratuvar çalışmaları. İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi yayınları, Rektörlük No: 2950. 1982; 162.
 9. **Tietz NW.** A model for comprehensive measurement system in clinical chemistry. *Clin Chem* 1979; 25: 833-9.
 10. **Koch DD, Peters T.** Selection and evaluation of methods. Tietz textbook of clinical chemistry. (Editors:) Burtis CA, Ashwood ER. 3 rd edition, Elsevier Inc, Missouri. 1999: 320-4.
 11. **Dube J, Girouard J, Leclerc P, Douville P.** Problems with the estimation of urine protein by automated assays. *Clin Biochem.* 2005; 38: 479-85.
 12. **Iijima S, Cho H, Sakai N, Shiba K, Toyoshima Y, Nishida K, Kobayashi S.** Development of a new method for measuring total urinary protein using acid violet 6 B pigment. *J Clin Lab Anal.* 2003; 17: 147-54.
 13. **Le Bricon T.** Laboratory identification and measurement of urinary proteins (abstract) *Ann Biol Clin (Paris).* 2002; 60: 525-40.
-