

Kit Bağımlı Beckman Synchron CX3 Analizörü İçin Alternatif Kreatinin Çözeltilisi

Dr. İsmail Temel¹, Dr. Ahmet Çıgılı¹, Dr. Yusuf Türköz¹, Dr. Elif Özerol¹, Dr. Engin M. Gözükara¹

Beckman Synchron CX3 otoanalizörü kit bağımlı bir klinik analizördür. Kolay kullanımı, doğru ve kesin sonuçları ile 24 saat sürekli çalışma gibi avantajlarından dolayı laboratuvarımızda acil analizlerde kullanılmaktadır. Fakat cihazın kapalı sistem olması, çok fazla bakım ve aşırı miktarda reaktife ihtiyaç duyması gibi bazı önemli dezavantajları da vardır. Özellikle reaktif fiyatının yüksek olması nedeniyle alternatif reaktif aramak zorunda kaldık ve Synchron CX3 de kullandığımız bazı reaktifleri ürettik. Orijinal ve ürettiğimiz reaktiflerin lineeritesini kıyasladığımızda her ikisinin de aynı kullanılabilir lineer test aralıklarına sahip olduklarını gördük (serum: 0 ile 25 mg/dL ; idrar: 10 ile 40 mg/dL). Kontrol serumu kullanarak, sonuçların doğruluğunu araştırdık ve aralarındaki korelasyon katsayısının 0.999 a eşit olduğunu bulduk. Ayrıca farklı serum ve idrar örneklerinden elde edilen sonuçları lineer regresyon ile kıyasladık ve aralarındaki ilişkinin $y = 0.981x - 0.02$ olduğunu saptadık. Bunlara ilaveten her iki çözeltinin de hemolizden etkilenmediğini fakat yüksek miktarlarda lipemi ve bilirubin varlığından etkilendiklerini tespit ettik. Sonuç olarak laboratuvarımızda ürettiğimiz kreatinin reaktifi ile orijinal Beckman reaktifinin tamamen aynı özellikleri taşıdığını gördük, ancak ürettiğimiz reaktif orijinal reaktiften en az 10 kat daha ucuzdu. [Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi 1997;4(2):182-186]

Anahtar Kelimeler: Synchron CX3, kreatinin çözeltisi

An alternative creatinine reagent for the reagent-dependent Beckman Synchron CX3 analyzer

The Beckman Synchron CX3 otoanalyzer is a reagent-dependent clinical analyzer. Because of its advantages such as easy usage, accurate and precise results and working continuously for 24 hours it is used in our laboratory for stat analysis. But the analyzer has also some important disadvantages. It has an unopened system, requires much more maintenance procedures and large reagent volum. Because of its too high reagent cost we were obligated to search an alternative reagent and have produced some reagents used on the Synchron CX3. When we compared linearity of the reagents, we observed that they had same usable linear test ranges (serum: from 0 to 25 mg/dL ; urine: from 10 to 40 mg/dL). We searched accuracy of the results using same control serum and found correlation coefficient among them equals to 0.999. We also compared the results obtained from different serum and urine samples by linear regression, and found the relation between them as $y = 0.981x - 0.02$. In addition to these criteria, we determined that both of reagents were not affected from hemolysis but were affected from high degress of lipemia and bilirubinemia. As a result, we observed that creatinine reagent produced in our laboratory had completely same properties with original Beckman creatinine reagent, but our reagent was cheaper than original reagent at least 10 times. [Journal of Turgut Özal Medical Center 1997;4(2):182-186]

Key Words: Synchron CX3, creatinine reagent

¹ İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Malatya

Kreatinin tümüyle endojen olarak üretilen ve kan dolaşımına sabit hızda salıverilen bir metabolittir. Tübüluslardan düşük oranda geri emildiği için böbrek glomerul fonksiyonunun iyi bir göstergesi olarak kabul edilir. Bu yüzden kreatinin analizi, klinikte çok yaygın olarak kullanılır. Kreatinin analizi için en çok kullanılan yöntem *Jaffe* alkalen pikrat yöntemidir (1). *Jaffe* yöntemi, alkali ortamda pikrat iyonlarının kreatinin ile sarı - turuncu renkte bir kompleks oluşturması esasına dayanır. Yaygın kullanımına rağmen bu yöntem kreatinin dışında başka maddeler tarafından interfere edilebilmektedir (2,3).

Kreatinin dışında alkalen pikrat ile pozitif ya da negatif interferans oluşturan maddeler arasında askorbik asit, bilirübin, pürivat, aseton, asetoasetik asit, ürik asit ve proteinler gibi biyomoleküller ile fenolsulfaftalein, barbitüratlar ve sefalosporinler gibi ilaçlar sayılabilir (4,5). Bu yüzden kit ve cihaz üreticisi firmalar *Jaffe* yönteminde çeşitli modifikasyonlar yaparak daha özgül reaksiyonlar oluşturmayı denemişlerdir. Uygulamaya konulan yöntemlerden ne Fuller'in Earth yöntemi ne de deproteinizasyon işlemiyle end - point reaksiyonlar hız, özgüllük ve örnek gereksinimi yönünden kinetik "Jaffe rate" yöntemi kadar avantajlı olamamıştır. Enzimatik yöntemler ise özgül olmalarına karşın hız ve maliyet açısından avantajlı değildir (6,7).

"Rate" yönteminde pikrat-kreatinin kompleksi oluşumu örnekle reaktif karıştırıldıktan sonraki ilk 10-60 saniyeler arasında gerçekleşir. Reaksiyon sıcaklığındaki artışa bağlı olarak bu aralık azalabilir ve ortamın sıcaklığı sabit tutularak testin presizyonu artırılabilir (8). Alkalen pikrat ile protein arasındaki reaksiyon yavaş olduğu için kinetik reaksiyon sırasında proteinlerden dolayı önemli bir interferans oluşmaz. Oysa end - point yöntemlerde protein engeli ancak yorucu bir işlem olan deproteinizasyon ile aşılabilmektedir (9). Benzer şekilde pikratla kreatininden daha hızlı reaksiyona giren moleküller, kinetik reaksiyonun absorban okuma süresi ve reaksiyon sıcaklığı ayarlanarak kontrol altına alınabilmektedir. Böylece kreatinin analizleri daha hızlı, daha ucuz ve daha güvenli yapılabilmektedir (10).

Bu çalışmanın temel amacı, kit bağımlı olduğu ve fazla miktarda reaktif tükettiği için pahalı olan bir sistemi, kaliteden ödün vermeksizin daha ucuza çalıştırabilmektir. Diğer önemli bir hedefi ise yerli

üretim için gerekli bilgi ve alt yapının varlığını ortaya koymaktır.

MATERYAL ve METOD

Çözeltiler:

Kalibratör I-II: Beckman Instruments, Inc., Brea, CA 92621-6209, USA

Kontrol serumu (normal ve abnormal): P.Z. Cormay, 20-150 Lublin, Poland

Orjinal kreatinin çözeltisi: Beckman Instruments, Inc., Galway, Ireland

Laboratuvar yapımı kreatinin çözeltisi:

a) 188 mmol/L NaOH + 10 mmol/L Na₂B₄O₇ .10 H₂O + %0.1 (v/v) Triton X-100

b) 50 mmol/L pikrik asit

Çözeltinin son hacmi 2 litre olup, kullanımdan önce 1600 mL a çözeltisine 400 mL b çözeltisi karıştırılmaktadır. Yüzey aktif madde olarak, a çözeltisinin içine 2 mL triton X-100 katılmıştır.

Hemoglobin çözeltisi (10 g/dL): Hematolojik analizlerden artan antikoagulanlı kan örneklerinden bir miktar alınarak 2000 g'de santrifüj edildi. Üstteki plazma uzaklaştırıldıktan sonra eritrositler üç kez serum fizyolojik (SF) ile yıkandı. Elde edilen eritrosit paketinden yaklaşık 1 mL alınarak üzerine eşit hacimde distile su eklendi ve kuvvetlice karıştırıldı. Tekrar santrifüj edilerek üstteki berrak hemolizat alındı. Hemoglobin konsantrasyonu 10 g/dL olacak şekilde dilüe edildi.

Stok kreatinin standartı (100 mg/dL): 100 mg kreatinin alınarak 100 mL distile suda çözüldü.

Tripalmitin çözeltisi (10 g/dL): 1000 mg tripalmitin alınarak 10 mL methanol içinde çözüldü.

Bilirübin çözeltisi (200 mg/dL): 20 mg bilirübin tartılarak 10 mL methanol içinde çözüldü.

Otoanalizör: Synchron CX3, Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA 92634, USA

İstatistiksel analizler: Makalede kullanılan ortalama (x), standart sapma (SD), presizyon (%CV), önemlilik testi (p) ve regresyon analizi hesapları ile grafiklerin çiziminde SPSS for Windows version 6.1 istatistik programından yararlanılmıştır.

Lineerite kontrolü: Beckman Synchron CX3 otoanalizöründe serum kreatinin analizi için 30 µL, idrar analizi için 10 µL örnek hacmi ve her iki analiz için de aynı miktarda reaktif hacmi kullanılmaktadır. Bu nedenle serum ve idrar örnekleri için farklı lineerite kontrolü uygulamak gerekmektedir. Birincisi için toplanan serum havuzu içine farklı miktarlarda stok kreatinin standart çözeltisi ilave edilerek 0.5 ila 30 mg/dL arasında değişen konsantrasyonlarında kreatinin standartları hazırlandı. İkincisi için ise stok standart, SF ile dilüe edilerek 10 ila 50 mg/dL arasında farklı standartlar hazırlandı. Tüm standartlar hem orijinal hem de laboratuvar yapımı kreatinin çözeltileri ile çift çalışıldı ve ortalamaları hesaplandı.

Presizyon kontrolü: Farklı kreatinin seviyelerine sahip kontrol serumları kullanılarak hem orijinal hem de laboratuvar yapımı çözeltilerin çalışma içi ve çalışmalar arası analizleri yapıldı. Elde edilen sonuçlara regresyon analizi uygulandı.

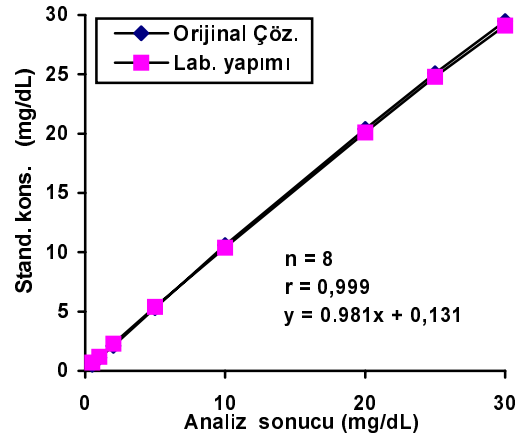
Hasta serum ve idrar örnekleri analizi: Her iki çözelti ile hem normal, hemde patolojik serum ve idrar örneklerinde kreatinin analizleri yapılarak sonuçlar arasındaki korelasyon katsayısı hesaplandı.

İnterferans kontrolü: Hemoliz, lipemi ve bilirübin klinik biyokimya laboratuvarlarında sık karşılaşılan en önemli interferans nedenleridir. Muhtemel interferans etkilerini araştırmak üzere hasta örneklerinden artakalan hemolizsiz, berrak ve bilirübinemisi olmayan normal serum örnekleri temiz bir kaptaki toplanarak serum havuzu oluşturuldu. Oluşturulan serum havuzuna herhangi bir madde eklemeyen önce, başlangıç kreatinin seviyesi saptandı. Buradan alınan örneklerle sırasıyla 100, 500, 1000 mg/dL hemogloblin ; 100, 200, 500 mg/dL tripalmitin ve 5, 10, 20 mg/dL bilirübin ilave edildikten sonra her seferinde yeniden kreatinin analizi yapıldı.

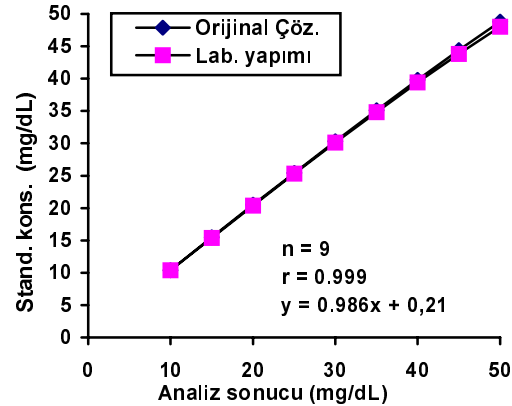
BULGULAR

Çözeltilerden elde edilen analiz sonuçlarının standart konsantrasyonlarına karşı grafiğe aktarılmasıyla, her iki çözeltinin de serum örnekleri için: 0.5 ila 25 mg/dL aralığında; idrar örnekleri için: 10 ila 40 mg/dL aralığında lineer bir yapı sergilediği görüldü. Aralarındaki korelasyon katsayıları ($r_{\text{serum}} = r_{\text{idrar}} = 0.999$); regresyon

analizleri $y_{\text{serum}} = 0,981x + 0.131$; $y_{\text{idrar}} = 0,986x + 0.21$ olarak tespit edildi (Şekil 1 ve 2).



Şekil 1. Serum kreatinin analizi için çözeltilerin lineerite aralıkları

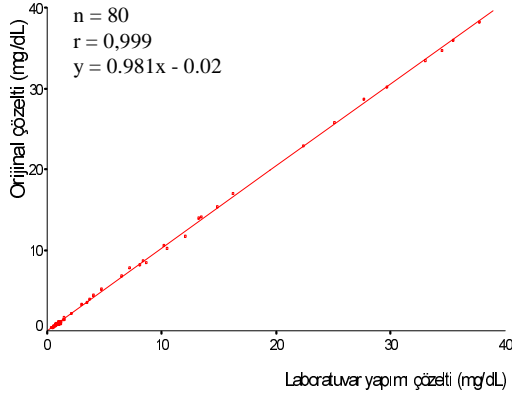


Şekil 2. İdrar kreatinin analizi için çözeltilerin lineerite aralıkları

Her iki çözeltiye ait ortalama, SD ve %CV değerleri birbirine çok yakın olup; presizyonları, çok küçük değerlerdeki kreatinin analizleri hariç %5'den daha küçük bulundu (Tablo 1).

Çeşitli idrar ve serum örneklerinin çalışılmasından elde edilen sonuçlar, çözeltiler arasında pozitif tam bir korelasyon ($r = 0.999$) ve

lineer ilişki ($y = 0.981x - 0.02$) olduğunu göstermektedir (Şekil: 3).



Şekil 3. Farklı serum ve idrar örnekleri kullanılarak elde edilen analiz sonuçları arasındaki doğrusal ilişki

Farklı konsantrasyonlardaki hemoglobün (hemoliz) analiz sonuçlarını etkilememesine rağmen, yüksek miktarlardaki lipemi (tripalmitin) ve bilirubinemi analizi negatif yönde etkilemektedir (Tablo 2).

TARTIŞMA

Beckman Synchron CX3 analizörü, “Jaffe rate” yöntemiyle 520 ve 560 nm dalga boylarında bikromatik analiz yapan bağımsız bir kreatinin modülüne sahiptir. Sistemde olası interferanslardan kaçınmak için kreatinin analizi 37°C yerine 41°C ta yapılmakta; absorbans okumaları, hasta örneği çözeltiye ilave edildikten tam 25.6 saniye sonra yapılmakta ve serum ile idrar örnekleri için farklı örnek hacimleri kullanılmaktadır. Bu haliyle sistem oldukça geniş bir konsantrasyon aralığında yüksek presizyon ve duyarlılıkta kreatinin analizleri yapabilmektedir (11).

Sistemin bu avantajlarına karşın kullandığı reaktif hacminin büyük ve fiyatının pahalı olması kullanıcıları alternatif aramalara sevk etmektedir. Benzer sorunlarla karşılaşan çeşitli yabancı araştırmacılar da Beckman Synchron CX3 analizörü için daha ucuz alternatif kit üretim çalışmaları yapmışlardır (12,13,14). Ülkemizde kit üretimi tümüyle dışa bağımlı olduğu için yerli kit üretimi ve adaptasyonu konusunda herhangi bir yayına rastlanmamıştır. Normalde kreatinin reaktif laboratuvar koşullarında kolay üretilebilen bir reaktiftir. Analizörün kapalı bir yapıya sahip olması

Tablo 1. Çalışma içi ve çalışmalar arası presizyon analizleri.

	Kontrol (mg/dL)	Çalışma içi presizyon kontrolü (n = 20)			Çalışmalar arası presizyon kontrolü (n = 30)		
		Ortalama (mg/dL)	St. sapma (SD)	Presizyon n (%CV)	Ortalama (mg/dL)	St. sapma (SD)	Presizyon (%CV)
Orijinal çöz.	0.8	0.84	0.05	6.07	0.86	0.06	6.54
	1.6	1.61	0.06	3.28	1.62	0.08	3.52
	3.9	3.88	0.10	2.68	3.87	0.12	2.92
Lab.yap.çöz.	0.8	0.85	0.06	6.44	0.87	0.07	6.65
	1.6	1.67	0.08	3.48	1.68	0.08	3.55
	3.9	3.94	0.11	2.78	3.96	0.11	2.83

Tablo 2. Hemoliz, lipemi ve bilirubinün kreatinin analizi üzerine interferans etkileri.

Etkileşen madde	Etkileşen madde miktarı (mg/dL)	Orijinal çöz. analiz sonucu (mg/dL)	p	Lab. yapımı çöz. analiz sonucu (mg/dL)	p
Hemoglobin	2.4	AD	2.4	AD
	100	2.4	AD	2.4	AD
	500	2.3	AD	2.3	AD
	1000	2.2	AD	2.2	AD
Tripalmitin	----	2.4	AD	2.4	AD
	100	2.4	AD	2.4	AD
	200	2.3	AD	2.4	AD
	500	2.1	<0.005	2.1	<0.005
Bilirubin	----	2.4	AD	2.4	AD
	5	2.3	AD	2.4	AD
	10	2.3	AD	2.3	AD
	20	2.0	<0.005	2.1	<0.005

AD: Anlamlı Değil.

ve orijinal reaktifin bazı katkı maddeleri içermesi bu kolaylığı ortadan kaldırmaktadır. Örneğin, çözelti içerisindeki alkali konsantrasyonunun yüksek tutulması, reaktife sodyum tetra borat ve yüzey aktif madde olarak triton X 100'ün ilave edilmesi reaksiyon hızının değişmesine neden olmaktadır (15). Ancak analizörün çalışma prensiplerini ve kalibrasyon parametrelerini iyi bilen ve yorumlayan bir kullanıcı, bu özelliklerin farkına varabilir ve deneme yanılma yöntemiyle de olsa sisteme uygun reaktif üretebilir.

Bazı denemelerden sonra laboratuvarımızda orijinaline benzer özelliklere sahip reaktif üretmek mümkün olmuştur. Üretilen çözeltinin performansını ortaya koymak için lineerite aralığı, analiz presizyonu ve doğruluğu ile sık karşılaşılan interferanslar konusunda orijinal kit ile karşılıklı kıyaslamalar yapılmış ve istatistiksel olarak aralarında fark olmadığı görülmüştür.

Sonuç olarak laboratuvarımızda Beckman Synchron CX3 otoanalizöründe kullanabileceğimiz kreatinin çözeltisi üretilmiş olup halen başarıyla kullanılmaktadır. Laboratuvarımızda üretilen çözelti ile orijinali arasındaki en önemli fark, aralarındaki fiyat farkıdır. Kaba bir hesapla birim test fiyatları arasında en az 10 misli fark mevcuttur. Ürettiğimiz çözelti maliyeti yaklaşık 1000 TL/mL iken orijinal çözelti 10000 TL/mL kadardır. Aradaki büyük fiyat farkı, her laboratuvarın mümkün olan koşullarda kendi kit ya da çözeltilerini kendilerinin üretmelerinin daha ekonomik olacağını ortaya koymaktadır. Bu çalışmalar yerli üretimi teşvik edeceği için ülke ekonomisine olumlu katkı sağlayacağı düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

- Whelton A, Watson AJ, Rock RC. Nitrogen Metabolites and renal function. In: Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. Burtis CA, Ashwood ER eds. 4th ed. Philadelphia: WB. Saunders Comp. 1996: 569-2.
- Woo J, Canon DC. Metabolic Intermediates and Inorganic Ions. In: Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods 18th ed. by Henry JB. Philadelphia W.B. Saunders Company 1991: 140-1.
- Levey AS, Perrone RD, Madias NE. Serum creatinine and renal function. Ann Rev Med 1988; 39: 456-9.
- Swain RR, Briggs SL. Positive interference with the Jaffe reaction by cephalosporin antibiotics. Clin Chem 1977; 23: 1340-2.
- Soldin SJ, Henderson L, Hill JG. The effect of bilirubin and ketones on reaction rate methods for the measurement of creatinine. Clin Biochem 1978; 11: 82-6.
- Cruickshank AM, Shenkin A. A comparison of effect of acetoacetate concentration on the measurement of serum creatinine using Technicon SMAC II, Beckman Astra and enzymatic techniques. Ann Clin Biochem 1987; 24: 317-9.
- Thienpont LM, Van-Landuyt KG, Stockl D, De-Leenheer AP. Candidate reference method for determining serum creatinine by isocratic HPLC: validation with isotope dilution gas chromatography mass sepectro- photometry and application for accuracy assessment of routine test kits. Clin Chem 1995; 41(7): 995-3.
- Bowers LD, Wong ET. Kinetic serum creatinine assays II. A critical evaluation and review. Clin Chem 1980; 26: 555-0.
- Murray LR. Creatinine. In: Clinical Chemistry theory, analysis, and correlation. Kaplan LA, Pesce AJ, eds. second ed. St. Louis: The C. V. Mosby Company 1984: 1247-3.
- Peake MJ, Pejaković M, White GH. Laboratory evaluation of Beckman Synchron CX3 clinical chemistry analyzer. Clin Chem 1988; 34(2): 404-7.
- Beckman Synchron CX3 Clinical system. Operating and service instructions. Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA. USA, 1989.
- Dyer TF, Cocks DA. An economical reagent for use with the Beckman Analyzer in estimating plasma urea. Ann Clin Biochem 1980; 17: 214-5.
- Fischl J, Federman D, Talmor N. Preparation of a modified glucose oxidase reagent for the polarographic determination of glucose with the Beckman "Glucose Analyzer". Clin Chem 1975; 21(6): 760-1.
- Jury DR, Ward R. Laboratory-prepared reagent for the Beckman Creatinine Analyzer. Clin Chem 1979; 25 (9):1674
- Butler AR. The Jaffe reaction: Identification of the coloured species. Clin Chem Acta 1976; 59: 227-2.

Yazışma adresi: Yrd.Doç.Dr. İsmail TEMEL
İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
44300, Kampüs, MALATYA