Ein schneller enzymatischer Harnstoff-Farbstest als Endpunkt-Methode mit Probenleerwert

A. Bruckner

Städtisches Krankenhaus, Zentrallabor, Frankfurt-Höchst

Zusammenfassung:

Es wird eine neue pH-Indikatormethode zur Harnstoffbestimmung beschrieben. Die Methode zeichnet sich durch gute Präzision und Richtigkeit aus. Der aus 150 Wertepaaren ermittelte Korrelationskoeffizient beträgt mit der DAM-Methode $r = 0,9970$ und mit der GLDH-Methode $r = 0,9971$. Die Richtigkeitsversuche charakterisieren die Methode als praxisgerecht. Wegen der schnellen Durchführung ist die Methode auch für Notfall-Laboratorien zu empfehlen.

Schlüsselwörter:

Endpunkt-Harnstoffbestimmung – Präzision und Richtigkeit – Methodenvergleich

Summary:

A new endpoint pH-Indicator method for the determination of Urea is described. Precision and accuracy of the method are good. A comparative study of the results obtained with the Urease/GLDH method and the new endpoint technique showed a good correlation ($r = 0,9971$). Because of its practicability and rapid performance the method is suitable for emergency-laboratories.

Keywords:

Endpoint Urea determination – precision and accuracy – comparison

Einleitung

Eine Harnstoffbestimmung ist bei folgenden Fragestellungen angezeigt: akute oder chronische Nierenerkrankung, Azotämien, Fieber, Traumen, Blutungen, Verbrennungen, Transfusionszwischenfällen, Hungerzuständen, Zustände mit gesteigertem Katabolismus bei Kindern, Diarrhoe und Erbrechen (1, 2). Deshalb ist eine schnelle und billige Harnstoffbestimmung neben der Bestimmung von Kreatinin notwendig (3, 4). Nach der vor kurzem im Handel erschienenen Indikator-Methode für die Harnstoffbestimmung stellten wir uns zur Aufgabe, diese Methode als schnelle Endpunktvariante auf das Gerät RA-1000 (Technicon®), das bei uns als Notfallgerät eingesetzt wird, zu adaptieren. In unserer Arbeit vergleichen wir die Diacetylmonoxim- und die vollenzymatische GLDH-Methode mit der von uns auf das Gerät RA-1000 adaptierten pH-Indikator-Methode hinsichtlich Präzision, Richtigkeit, Wiederfindung, Linearität sowie Störanfälligkeit gegenüber exogenen und endogenen Substanzen.

Material und Methoden

Prinzip

Harnstoff wird durch Urease zu Ammoniumbicarbonat und Ammoniumhydroxid gespalten, wodurch der pH-Wert der Reaktionslösung proportional zu der Harnstoffkonzentration erhöht wird.

In Gegenwart eines pH-Indikators führt die pH-Werterhöhung zu einer proportionalen Extinktionsänderung, die spektralphotometrisch gemessen wird. Voraussetzung für die Proportionalität ist, daß pH-Indikator und Puffer die gleichen pK-Werte haben (5, 14).

Reagenzien und Kontrollseren

Enzymatischer Farbstest „Harnstoff-Duo“ und Kontrollserum Duotrol der Fa. Biomed. Harnstoff-Stickstoff-Diacetylmonoxim-Methode, Harnstoff-Endpunkt-Methode mit Urease/GLDH und Calibrator von der Fa. Technicon. Precinorm UPX wurde von Boehringer Mannheim, Validate A von Gödecke AG, Monitrol I von Merz und Dade, Kontrolllogen L von Behring bezogen.

Lösungen

Die Arbeitslösungen für DAM- und Urease/GLDH-Methoden wurden nach Herstellerangaben vorbereitet. Für die pH-Indikator-Methode¹ wählten wir folgendes Mischungsverhältnis:

Reagenz: zu 50 ml Lösung A (Puffer-Indikator-System) gibt man 2,0 ml Lösung B (Urease Suspension), Leerwert-Reagenz: 50 ml Lösung A mischt man mit 2,0 ml

¹ Aus patentrechtlichen Gründen gibt der Hersteller die Konzentrationsangaben nicht frei

0,9%iger NaCl-Lösung. Die so hergestellten Reagenzien sind bei + 4°C bis vier Wochen haltbar.

Geräte

Die Vergleichsuntersuchungen wurden am SMA II-Gerät (Technicon) mit der DAM-Methode und am RA-1000 (Technicon) mit der pH-Indikator-Methode und mit der Urease/GLDH-Methode durchgeführt.

Die Geräteeinstellung am RA-1000 ist aus Tab. 1 zu entnehmen.

Tab. 1: Geräteeinstellung am RA-1000

Name	2 HST
Typ	2
% Pr.Vol.	15
Filter Pos.	5 WL 550
Totz.	200
LW-Reag.	
% Reag.Vol.	70
Einh.	2 MG/DL
Unit Fac.	1,0000
Dez.Punkt	0
RLW UG	0,000
RLW OG	1,500
Linber UG	0
Lin.Gr.	220
Kal.Faktor	*
Std.W.	**
Norm.B. -	20
Norm.B. +	45
Steig.	1,000
Schnittp.	0,0000
EP LIM	0,0050

* Wird vom Gerät errechnet

** Wert eines Kalibrationsserums

Ergebnisse

Reaktionsverlauf

Anhand eines Humanserums ist in Abb. 1 die Meßsignalentwicklung ohne und mit Urease gezeigt.

Nach der Serumzugabe erfolgt eine gewisse Extinktionszunahme, die auf Serumfarbe und Ammoniakkonzentration zurückzuführen ist. Nach etwa 1 min stabilisiert sich die Probenleerwertextinktion. Nach dem Start mit Urease beginnt die Harnstoffumsetzung, die bei der hier gewählten Urease-Menge nur langsam ihren Endpunkt (4–6 min) erreicht.

Abb. 1: Reaktionsverlauf am RA-1000 der pH-Indikator-Harnstoffbestimmung. Verhältnis Urease:Reagenz = 1:56. Messung gegen Luft als Leerwert. Die nach der Serumzugabe meßbare Extinktionsänderung ist auf die endogene Ammoniakkonzentration, Serumfarbe oder Trübung zurückzuführen

Abb. 2: Optimierung der Urease-Reagenz-Verhältnisse. Kurve 1: Urease:Reagenz = 1:19, Kurve 2: Urease:Reagenz = 1:26, Kurve 3: Urease:Reagenz = 1:36, Kurve 4: Urease:Reagenz = 1:51

Reagenz

Das Mengenverhältnis Urease zu Reagenz ist davon abhängig, wie schnell der Endpunkt der Reaktion erreicht werden soll.

Die Abb. 2 zeigt den Reaktionsablauf bei einem Harnstoffgehalt des Serums von 33 mmol/l. Daraus ist ersichtlich, daß ein Mischungsverhältnis von 1:26 (Kurve 2) ausreicht, um bei Seren mit erhöhtem Harnstoffgehalt die Reaktion etwa nach 100–120 sec zum Stillstand zu bringen. Bei kleineren Ureaseaktivitäten läuft die Reaktion viel langsamer ab (Kurve 3 und 4). Kurve 1 in Abb. 2 zeigt, daß bei entsprechend hohen Urease-Aktivitäten die Reaktion auch früher ihren Endpunkt erreichen kann. Aus wirtschaftlichen Gründen und aufgrund der im Reagenzpack befindlichen Ureasemenge wählten wir die in der Kurve 2 (Abb. 2) gezeigten Verhältnisse. Die so erreichte Urease-Verdünnung mit einem Proben-Reagenzverhältnis von 1:46 (7,5 µl Serum und 337,4 µl Reagenz) ist laut unseren Messungen ausreichend, die Reaktion bei 37°C innerhalb 2 min zum Stillstand zu bringen.

Linearität

Die Abb. 3 zeigt die Linearität, die mit der beschriebenen Reagenzzusammensetzung erreicht werden konnte. Pro-

Abb. 3: Linearität der pH-Indikator-Harnstoffbestimmung. Verdünnung eines Patientenserums, Mittelwerte aus Doppelbestimmungen

ben mit einer Harnstoffkonzentration, höher als 37 mmol/l (= 220 mg/dl), müssen verdünnt werden.

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze, ermittelt an 24 Tagen, wobei Wasser anstatt Probe analysiert wurde, zeigt einen durchaus akzeptablen Wert von 0,52 mmol/l (6, 7). Somit hat die Methode den sehr guten Meßbereich 0,52–37 mmol/l.

Präzision

Die Präzision wurde mit verschiedenen Kontroll- und Pool-Seren an mehreren Tagen bestimmt.

Die Tab.2 zeigt die Präzision in der Serie. Die einzige auffallend schlechte Zahl zeigt unser Pool-Serum mit nie-auffallend schlechte Zahl zeigt unser Pool-Serum mit niedrigem Harnstoffgehalt. Diese schlechte Präzision hat sich auch in den Präzisionen von Tag zu Tag bestätigt, was wir mit allgemein schlechteren Präzisionen im unteren

Bereich auch beim Methodenvergleich bestätigen konnten. Größere Streuungen im unteren Bereich, wie das auch bei Paardifferenzanalysen zu sehen ist, können Fluktuationen der Meßergebnisse verursachen, womit ein höherer VK in der Serie als von Tag zu Tag zu deuten ist.

Den Erwartungen entsprechend zeigt die Präzision von Serie zu Serie, wie auch die von Tag zu Tag, geringfügig schlechtere statistische Zahlen als die in Tab.1 angegebenen Werte.

Die Präzisionen von Tag zu Tag zeigen einen durchschnittlichen Variationskoeffizienten von 3,4% (Tab.3 und 4). Auch die Wiederfindung an Kontrollseren mit einer mittleren Abweichung von –0,3% spricht für eine gute Richtigkeit der Methode. Die Wiederfindung ist besser als diejenige, die man mit der Diacetylmonoxim-Methode erreichen kann. Die DAM-Methode liefert in unserer Routine mit den Kontrollserum Monitrol I (Sollwert: 6,16 mmol/l) in einem Zeitraum von 14 Monaten eine mittlere Wiederfindung von –2,8%.

Tab. 2: Präzision der Serie

Kontrollseren Chargen-Nr.	Sollwert mmol/l	n	$\bar{x}$ mmol/l	S mmol/l	VK %
Duotrol 7280-1	7,17	21	7,5	0,1341	1,79
Validate-A 2423091	17,99	21	18,66	0,2040	1,09
Moni-Trol I 178	6,33	21	6,70	0,1280	1,91
Kontrollseren L 623120A	8,08	21	7,99	0,1705	2,13
Precinorm UPX 3-587	–	21	8,88	0,0804	0,906
Pool ↓	–	21	3,99	0,2235	5,59
Pool ↑	–	21	11,89	0,1533	1,29

Pool ↓ = Pool-Serum mit niedrigem Harnstoffgehalt
Pool ↑ = Pool-Serum mit erhöhtem Harnstoffgehalt

Tab. 3: Präzision von Serie zu Serie

Kontrollseren Chargen-Nr.	Sollwert mmol/l	n	$\bar{x}$ mmol/l	S mmol/l	VK %
Duotrol 7280-1	7,17	21	7,16	0,2356	3,29
Validate-A 2423091	17,99	21	19,10	0,3468	1,82
Moni-Trol I 178	6,33	21	6,58	0,1546	2,35
Kontrollseren L 623120A	8,08	21	8,15	0,2552	3,13
Precinorm UPX 3-587	–	21	9,08	0,2014	2,22
Pool ↓	–	21	3,99	0,1393	3,49
Pool ↑	–	21	12,24	0,3008	2,46

Pool ↓ = Pool-Serum mit niedrigem Harnstoffgehalt
Pool ↑ = Pool-Serum mit erhöhtem Harnstoffgehalt

Tab. 4: Präzision von Tag zu Tag

Kontrollseren Chargen-Nr.	Sollwert mmol/l	n	$\bar{x}$ mmol/l	S mmol/l	VK %	R %
Duotrol 7280-1	7,17	11	6,95	0,2119	3,05	–3,07
Validate-A 2423091	17,99	11	18,43	0,4099	2,22	+2,44
Moni-Trol I 178	6,33	11	6,37	0,2988	4,69	+0,63
Kontrollseren L 623120A	8,08	11	7,98	0,2732	3,42	–1,24
Precinorm UPX 3-587	–	9	8,77	0,2634	3,00	
Pool ↓	–	9	3,85	0,1943	5,05	
Pool ↑	–	9	11,88	0,3116	2,62	

Pool ↓ = Pool-Serum mit niedrigem Harnstoffgehalt
Pool ↑ = Pool-Serum mit erhöhtem Harnstoffgehalt

Richtigkeit

Die Richtigkeit der Methode wurde durch Regressions- und Korrelationsanalysen sowie durch Paardifferenzanalysen geprüft (8-11).

Wie die Abb. 4 zeigt, liefern die beiden Methoden weitgehend übereinstimmende Ergebnisse.

Ähnlich gute Übereinstimmung konnten wir auch gegenüber der Glutamat-Dehydrogenase-Methode erzielen.

Die neue Indikatormethode, die in unserer Adaptation mit Probenleerwert durchgeführt wird, liefert im Durchschnitt 1-2% niedrigere Werte als die zwei Vergleichsmethoden. Die DAM-Methode liegt im Durchschnitt 0,98% und die GLDH-Methode 2,0% höher. Die Ursache für diesen geringfügigen Unterschied ist unserer Meinung nach der mitgeführte Probenleerwert, womit alle Einflüsse von Untergrundfarbe, pH-Wert der Proben und Ammoniakgehalt

eliminiert werden. Die Brauchbarkeit der Methode hinsichtlich möglicherweise interferierender Substanzen wie Bilirubin, Hämoglobin und Lipoproteine wurde untersucht. Keine der erwähnten Störmöglichkeiten beeinflusst die Meßergebnisse. Bei Zusatz von Bilirubin bis zu einer Konzentration von 210 mmol/l und von Hämoglobin bis zu einer Konzentration von 4190 mg/l zeigt sich keine nennenswerte Interferenz bei der vorgestellten Harnstoffbestimmungs-Methode. Die prozentualen Abweichungen lagen immer innerhalb von $\pm 2\%$.

Hohe Untergrundfarbe, Trübung sowie erhöhte Ammoniakkonzentrationen werden, wie z.B. bei unseren Pool-Seren, durch den Probenleerwert effektiv eliminiert (Abb. 6).

Besonders interessierte uns, wie sich das Reagenz bei Seren mit erhöhten Ammoniakkonzentrationen verhält. Unsere Versuche zeigen, daß auch sehr hohe Ammoniak-

Abb. 4: Korrelation und Regression nach der standardisierten Hauptkomponenten-Methode. Verglichen wurde die Diacetylmonoxim-Methode mit der pH-Indikator-Methode

Abb. 5: Korrelation und Regression nach der standardisierten Hauptkomponenten-Methode. Verglichen wurde die GLDH-Methode mit der pH-Indikator-Methode

Abb. 6: Einfluß interferierender Substanzen auf die Leerwertextinktion. Die Leerwertextinktionen zweier Kontrollseren (Precinorm UPX und Validate A) sind relativ gering zum Meßwertsignal. Ammoniak- und bilirubinhaltige Proben sowie trübe Proben (unterer Teil der Abbildung) bewirken eine relativ starke Erhöhung des Leerwertsignals zum Meßwertsignal

Abb. 7: Harnstoffbestimmungen bei Patientenseren mit erhöhten Ammoniakkonzentrationen

konzentrationen den Reaktionsverlauf nicht stören. Die Ammoniumionen ergeben eine deutlich hohe Probenleerwertextinktion, die am Ende der Reaktion von der Probenextinktion abgezogen wird.

Wie Abb. 7 zeigt, besteht keine meßtechnische Proportionalität zwischen Harnstoff und Ammoniakgehalt. Somit sind auch Plasmaproben, die mit dem Antikoagulans Ammoniumheparinat gewonnen wurden, einsetzbar.

Diskussion

Die Methode liefert 1–2% niedrigere Werte im Vergleich zur DAM- und Urease/GLDH-Methode. Damit bestätigt sich die Aussage anderer Autoren (14), die aber vorschlagen, für die neue Indikator-Methode bei der Kalibration die Sollwerte um 3% höher anzusetzen, um die mit den anderen Methoden ermittelten Sollwerte zu erreichen. Wir sind aber der Meinung, daß die Indikator-Methode in ihrer Endpunktvariante mit Probenleerwert wie auch die Indikator-Methode als kinetische Bestimmung die richtigeren Werte liefert. Die neue Indikator-Methode

wird durch Kreatinin, Allantoin, Arginin und Proteine wie das bei der DAM-Methode und durch Ammoniak wie das bei der Urease/GLDH-Methode bekannt ist, nicht gestört (2, 12, 13).

Zusammenfassend beurteilen wir die neue Indikator-Methode als ein schnelles und billiges (Reagenzkosten pro Analyse DM 0,16), für das Notfall-Labor geeignetes Bestimmungsverfahren. In dieser von uns erarbeiteten Adaptation liegen die Ergebnisse in 2 min 15 sec vor. Die von Tag zu Tag ermittelten Variationskoeffizienten mit einem Wert von 3,4% sind gut. Das Reagenz ist lange, mit Urease zusammengemischt, über drei Wochen stabil. Die Korrelation mit anderen Methoden ist überdurchschnittlich gut. Die Methode ist gegenüber vielen Störmöglichkeiten unempfindlich. Es können sogar mit Ammoniumheparinat gewonnene Plasmaproben analysiert werden. Die von uns erarbeitete Endpunktvariante mit Probenleerwert ist mit üblichen Harnstoffbestimmungen vergleichbar.

Danksagung: Der Fa. Biomed danken wir für das Überlassen von Reagenzien.

Schrifttum:

1. PÖGE, A. W., KOTHE, W.: Eine alle Harnstoff(H-N)-Konzentrationen im Serum und Harn erfassende Bestimmungsvariante. Z. ges. inn. Med. 38, 371–374 (1983).
2. THOMAS, L.: Labor und Diagnose, 2. Aufl., S. 327–330, Medizinische Verlagsgesellschaft Marburg/Lahn (1984).
3. KRUSE-JARRES, J. D., DUNSCHACH, F., GOSSLER, D., KALTWASSER, F., MINDER, W., SASSE, U., BABLOK, W., KOLLER, P. U., POPPE, W. A.: Harnstoffbestimmung mit Reflotest-Urea in Blut und Serum. Dtsch. med. Wschr. 105, 756–761 (1980).
4. BRUCKNER, A.: Ein neues Reagens für schnelle Harnstoffbestimmung aus 5 µl Vollblut, Serum oder Urin. Unveröffentlicht (1974).
5. SKEGGS, L. T. jr.: An automatic method for the determination of carbon dioxide in blood plasma. Amer. J. clin. Path. 33, 181–185 (1960).
6. KAISER, H.: Zum Problem der Nachweisgrenze. Z. Analyt. Chem. 209, 1–18 (1965).
7. STAMM, D.: Recommendations for the description of a selected method in clinical chemistry. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17, 280–282 (1979).
8. HAECKEL, R.: Statistische Verfahren beim Methodenvergleich. Med. Labor 34, 8–14 (1981).
9. HAECKEL, R.: 3. Kleinkonferenz über statistische Probleme beim Vergleich klinisch-chemischer Analysenverfahren. Lab.med. 8, 137–140 (1984).
10. EISENWIENER, H. G., BABLOK, W., BARDORFF, W., BENDER, R., MARKOWERZ, D., PASSING, H., SPAETHE, R., SPECHT, W.: Präzisionsangaben beim Methodenvergleich. Lab.med. 7, 273–281 (1983).
11. SACHS, L.: Angewandte Statistik, 4. Aufl., S. 241–249, Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin (1974).
12. DIN-NORMENTWÜRFE: Bestimmung von Harnstoff im Serum, Plasma und Harn. Urease/GLDH-Methode (Endpunktverfahren) DIN 58979. Lab.med. 6, A+B 90–92 (1982).
13. BOEHRINGER MANNHEIM GmbH: Testfibel: Harnstoff (1983).
14. HINSCH, W.: Ein neues Prinzip zur Harnstoffbestimmung in der klinisch-chemischen Routineprüfung. Ärztl. Lab. 30, 231–235 (1984).

Anschrift des Verfassers:

Dipl.-Ing. med. Biochem.
Aladár Bruckner
Städtisches Krankenhaus
Zentrallabor
Gotenstraße 6–8
6230 Frankfurt-Höchst

□