

# İdrar Proteini Ölçümünde Otomasyona Uygun Yeni Bir Yöntem

[A New Method for the Measurement of Urinary Protein Suitable for Automation]

Fatma Meriç Yılmaz<sup>(1)</sup>

Nuran Kazan<sup>(1)</sup>

Doğan Yücel<sup>(1)</sup>

(1) S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi  
Biyokimya Laboratuvarı, Cebeçi-Ankara

## Yazışma Adresi

[Correspondence Address]

S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi  
Biyokimya Laboratuvarı, Cebeçi-Ankara  
Tel: +90 312 363 33 30/5505  
Faks: +90 312 362 18 57

Kayıt tarihi 21 Temmuz 2003; kabul tarihi 12 Eylül 2003  
[Received 21 July 2003; accepted 12 September 2003]

## ÖZET

Klinik biyokimya laboratuvarlarında kantitatif idrar proteini ölçümü, genellikle türbidimetrik ya da boya bağlama yöntemleri kullanılarak elde yapılmaktadır. Boya bağlama yöntemleri farklı protein tiplerinde gram protein başına farklı miktarda renk oluşturmaları, türbidimetrik yöntemler (örn. trikloroasetik asit, sulfosalisilik asit vb.) ise kolay uygulanmalarına karşın fazla miktarda örnek gerektirmeleri ve impresizyonlarının yüksek olması gibi dezavantajlara sahiptir. Biz çalışmamızda benzalkonyum klorür kullanarak geliştirdiğimiz yöntemi Advia 1650 (Bayer Corp.) cihazına uyguladık.

Çalışmada Bayer SetPoint serum kalibratörü kullanılarak hazırlanan 100, 200, 500, 1000 ve 2000 mg/L konsantrasyonlarında kalibratörler ile kalibrasyon yapıldı. Yöntemin çalışma içi tekrarlanabilirliği, düşük ve yüksek düzeyde protein içeren örneklerin yirmibirer kez çalışılmasıyla hesaplandı. Düşük düzeyde CV değeri %2.4; yüksek düzeyde ise %1.9 olarak bulundu. Geri alma (sağlama, "recovery") çalışması için 30 mg/L düzeyinde protein içeren idrara çeşitli miktarlarda protein standardı eklenerek 100, 150, 200, 500, 1000 ve 2000 mg/L'lik konsantrasyonlar elde edildi ve ortalama geri alma %97.65 bulundu. Duyarlılık çalışmasında 25 mg/L düzeyine kadar sağlıklı okuma yapılabildiği görüldü.

Yöntemin doğruluğunu değerlendirmek için referans olarak Bradford yöntemi kullanıldı. Çeşitli konsantrasyonlarda toplam 51 örneğin karşılaştırılmasında iki yöntem arasında Pearson korelasyon analizi yapıldı ve korelasyon katsayısı  $r=0.98$  olarak bulundu. Yapılan lineer regresyon analizinde iki yöntem arasındaki ilişkiyi tanımlayan denklem ( $y= 1.133x - 56.462$ ) idi.

Sonuç olarak benzalkonyum klorür yöntemi, kantitatif idrar proteini ölçümünde ucuz, otomasyona uygun, geniş bir aralıkta doğru ölçüm yapabilen, referans yöntemle karşılaştırıldığında doğruluğu ve tekrarlanabilirliği yüksek yeni bir yöntem olarak sunulmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** proteinüri, idrar proteini tayini, Bradford yöntemi, benzalkonyum klorür, Coomassie brilliant blue

## ABSTRACT

Determination of urinary protein in clinical chemistry laboratories is usually made by using either manuel turbidimetric techniques which tend to be imprecise and require too much sample, or dye binding methods which give different amounts of color per gram of protein with different proteins. We developed a new method which use Benzalkonium chloride and adapted it to Advia 1650 (Bayer Corp.) analyzer.

In the study, calibrators containing 100, 200, 500, 1000 and 2000 mg/L protein, which were prepared from Bayer Setpoint serum calibrator were used. The within run imprecision was determined from two samples, a low and a high level, by reading each 21 times; CVs were 2.4 % and 1.9 % respectively. A urine pool of 30 mg/L was used for analytical recovery and concentrations of 100, 150, 200, 500, 1000 and 2000 mg/L were adjusted by adding known amounts of protein into this pool and the mean recovery was % 97.65. The method was sensitive down to 25 mg/L level.

We compared our method with Bradford method for a total of 51 samples and we found a strong correlation between the methods ( $r=0.98$ ). We also made a linear regression analysis and the equation between the two methods was found as  $y= 1.133x - 56.462$ .

As a result, we present a new method which is cheap, appropriate for automation, measure urine samples in a wide concentration range with a high accuracy and low imprecision compared with the reference method.

**Key Words:** proteinuria, urine protein determination, Bradford method, benzalkonium chloride, Coomassie brilliant blue

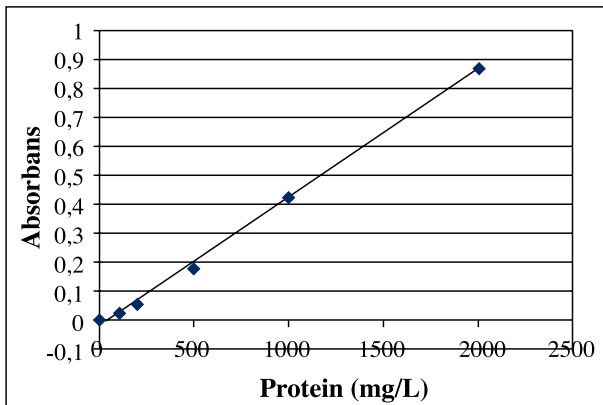
## GİRİŞ

Klinik biyokimya laboratuvarlarında kantitatif idrar proteini ölçümü, genellikle türbidimetrik ya da boya bağlama yöntemleri kullanılarak yapılmaktadır. Boya bağlama yöntemleri farklı protein tiplerinde gram protein başına farklı miktarda renk oluştururlar. Bradford yönteminde kullanılan Coomassie brilliant blue, küvetleri boyadığı için otomasyona uygun değildir. Son yıllarda otomatize kitler üretilen Pyrogallol Red ise yüksek maliyeti nedeniyle kullanımı yaygınlaşmamış bir yöntemdir. Türbidimetrik yöntemler kolay uygulanmalarına karşın fazla miktarda örnek gerektirmeleri ve imprecizyonlarının yüksek olması gibi dezavantajlara sahiptir. Kullanılan örnek hacmi, özellikle BOS gibi örnek hacminin kısıtlı olduğu durumlarda türbidimetrik yöntemler için önemli bir dezavantaj oluşturmaktadır. Ayrıca ölçümün manuel oluşu zaman ve işgücü kaybı açısından negatif bir özelliktir. Biz çalışmamızda deterjan özellikte bir kuaterner amonyum bileşiği olan benzalkonyum klorür kullanarak geliştirdiğimiz yöntemi Advia 1650 (Bayer Corp.) cihazına uyguladık ve yöntemin performans özelliklerini saptayarak Bradford yöntemi (Coomassie brilliant blue G 250) ile karşılaştırdık.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Geliştirdiğimiz yöntem, Jihei Iwata ve ark.'nın idrar proteini için alkali ortamda benzetonyum klorür kullanarak yaptıkları ölçüme dayanmaktadır (1). Benzalkonyum klorür, yapı olarak benzetonyum klorüre benzeyen, ancak maliyet olarak çok daha ucuz bir reaktiftir. Çalışmamızda Jihei Iwata ve ark.'nın yöntemini modifiye ederek benzalkonyum klorür reaktifi ile denedik.

Çalışmada ilk olarak 0,5, 1,25, 2,5 ve 5 g/L gibi değişik konsantrasyonlarda benzalkonyum klorür çözeltileri hazırlandı. Iwata ve ark.'nın önerdiği şekilde ortamı alkali hale getirmek için 33 mmol/L EDTA+0,5 mol/L NaOH içeren ikinci bir çözelti hazırlandı. Burada EDTA iki değerli katyonları bağlayarak etkisiz kılmak için kullanıldı. Her bir kombinasyon iki farklı örnek miktarı kullanılarak elde edildi. Çalışma sırasında 4mL NaOH çözeltisi üzerine 100 veya 200 µL idrar örneği eklendikten sonra vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı ve beklemeden 1 mL benzalkonyum klorür çözeltisi eklendi.



Şekil 1 Benzalkonyum klorür yöntemi için 0-2000 mg/L konsantrasyon aralığındaki kalibrasyon eğrisi

On dakika beklendikten sonra 60. dakikaya kadar onar dakika aralıklarla 450 ve 600 nm'de absorbansları alındı. En yüksek absorbans, 5 g/L benzalkonyum klorür çözeltisi ile 200 µL örnek kombinasyonu ile, 450 nm'de yapılan okumayla elde edildi. Zaman içinde bir saate kadar absorbanslarda anlamlı değişiklik oluşmadığı gözlemlendi. Yöntem, aşağıdaki parametreler kullanılarak Bayer, Advia 1650 otoanalizörüne uyarlandı. Bayer, Advia 1650 otoanalizöründe tüm örnekler, 1/5 oranında deiyonize su ile ön seyreltildiğinden, örnek miktarı beş kat fazla olacak şekilde tanımlandı:

R1 : 33 mmol/L EDTA içinde 0,5 mol/L NaOH

R2 : 5 g/L benzalkonyum klorür

R1 hacmi: 100 µL

R2 hacmi: 25 µL

Örnek hacmi : 25 µL (1:5 seyreltim nedeniyle gerçek örnek hacmi 5 µL)

Dalga Boyu : 450 nm

Reaksiyon zamanı : 15 dakika

Kalibrasyon : 100, 200, 500, 1000, 2000 mg/L konsantrasyonlarında kalibratörlerle multikalibrasyon (Şekil 1)

## SONUÇLAR

**Tekrarlanabilirlik (presizyon):** Yöntemin çalışma içi tekrarlanabilirliği, düşük (300 mg/L) ve yüksek (1000 mg/L) düzeyde protein içeren örneklerin yirmibirer kez çalışılmasıyla hesaplandı. Düşük düzeyde CV % 2,4; yüksek düzeyde ise % 1,9 olarak bulundu. Aynı örneklerden Bradford yöntemi kullanılarak yapılan ölçümlerde ise CV'ler sırasıyla % 6,7 ve % 5,5 olarak bulundu.

**Geri alma (sağlama, "recovery"):** Geri alma çalışması için 30 mg/L düzeyinde protein içeren idrara çeşitli miktarlarda protein standardı eklenerek 100, 150, 200, 500, 1000 ve 2000 mg/L'lik konsantrasyonlar elde edildi. Her bir konsantrasyon için % geri alma, (%R= Eklenen protein konsantrasyonu / Geri alınan konsantrasyon) x 100 formülü kullanılarak ayrı ayrı hesaplandı ve ortalama geri alma %97,65 bulundu (Tablo 1).

**Analitik duyarlılık (sensitivite):** Duyarlılık çalışmasında 200 mg/L konsantrasyonundaki örnek sulandırılarak en düşük sağlıklı okuma yapılabilen değer hesaplandı. Yöntemin ayıraç körünün absorbansı + 3 SD = 0,002534 + 0,00192 olarak bulundu. Alınan absorbanslar dikkate alındığında yöntemin analitik duyarlılığının 25 mg/L düzeyinde olduğu görüldü.

Tablo 1 Yöntemin değişik protein konsantrasyonlarında % geri alma değerleri

Konsantrasyon	% R
100	104
150	92
200	88
500	94
1000	97
2000	111
<b>Toplam</b>	<b>97,65</b>

**Doğruluk (accuracy):** Yöntemin doğruluğunu değerlendirmek için referans olarak Bradford Yöntemi kullanıldı. Bu yöntem, ayrıca olarak Coomassie brilliant blue G-250 'nin kullanıldığı bir boya bağlama yöntemidir. Çalışmada 30 mg Coomassie brilliant blue G 250, 15 mL %95 etanolde çözüldükten sonra 30 mL %85 fosforik asit eklendi. Son hacim 300 mL'ye tamamlandıktan sonra karışım filtre kağıdından süzülür ve 465 nm.'deki suya karşı absorpsansı  $0,800 \pm 100A$  olacak şekilde seyreltilir. Çalışma sırasında 2 mL ayıraç üzerine 20 µL örnek eklenip karıştırıldıktan 5 dakika sonra 595 nm'de ayıraç körtüne karşı absorpsans ölçümleri yapıldı (2, 3). Kalibratör olarak 100, 200, 500, 1000 ve 2000 mg/L'lik kalibratörler kullanıldı (Şekil 2).

İki yöntemi karşılaştırmak amacıyla protein değerleri 10 mg/L-2000 mg/L arasında toplam 51 taze idrar örneği her iki yöntemle analiz edildi ve aralarında lineer regresyon analizi ve Pearson korelasyon analizi yapıldı. Korelasyon katsayısı  $r=0.98$  olarak bulundu. Yapılan lineer regresyon analizinde iki yöntem arasındaki ilişkiyi tanımlayan denklem ( $y= 1.133 x - 56.462$ ) idi. İki yöntem arasındaki ilişki, Şekil 3A'da görülmektedir.

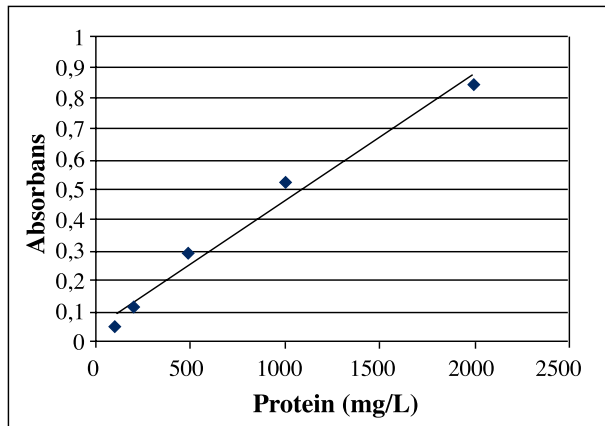
Yöntemlerin düşük konsantrasyon değerlerindeki (0 – 500 mg/L) ilişkisini araştırmak amacıyla toplam 27 örnekte ayrı bir lineer regresyon ve korelasyon analizi yapıldı. Korelasyon katsayısı  $r=0.95$ , aradaki ilişkiyi tanımlayan denklem ise ( $y= 0.903 - 18.62$ ) idi. Düşük konsantrasyon değerlerinde iki yöntem arasındaki ilişki Şekil 3B'de görülmektedir.

**Doğrusallık (Linearity):** Yöntemin doğrusallığı, protein konsantrasyonu belli örneklerin çalışılmasıyla saptandı. Yöntemin, 2000 mg/L düzeyine kadar sağlıklı okuma yapabildiği görüldü.

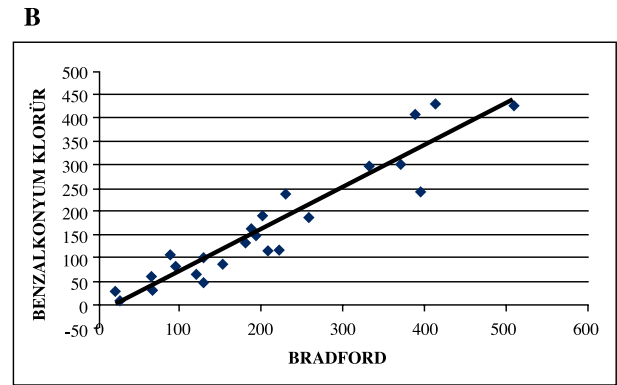
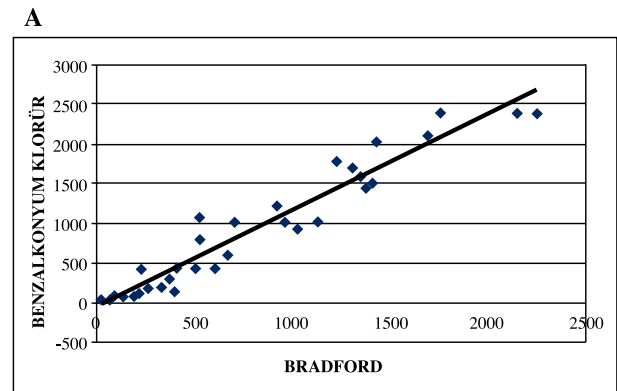
## TARTIŞMA

BOS ve idrarda total proteini ölçümü, klinik laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılan, ancak mevcut yöntemlerin birbirinden farklı avantaj ve dezavantajları nedeniyle hangi yöntemin kullanılacağı hakkında üzerinde fikir birliğine varılamamış bir konudur (4). İdrar proteinlerinin tayininde kullanılan kantitatif yöntemler bulanıklık oluşumu, boya bağlama ya da renk oluşumu temeline

dayanırlar. Bulanıklık oluşumuna dayanan türbidimetrik yöntemler triklorasetik asit (TCA), sülfosalisilik asit (SSA), ya da alkali benzetonyum klorür yöntemlerini kapsar. Boya bağlama yöntemleri, Coomassie brilliant blue, Ponceau-S ve özellikle son yıllarda yaygınlaşan Pyrogallol Red yöntemleridir. Renk oluşum temeline dayanan yöntemler ise biüre ve Folin-Lowry reaksiyonlarıdır (5). Klinik kullanımda halen en yaygın kullanılan yöntemler türbidimetrik yöntemlerdir. 1982 yılında "College of American Pathologists" tarafından yapılan laboratuvarlar arası idrar protein tayini karşılaştırma çalışmasında, litrede 1000 mg protein içeren çalışma örneğinde SSA için %50, TCA için %43 gibi yüksek CV değerleri rapor edilmiştir (6). 1986 yılında Fransa'da kalite kontrol programına üye laboratuvarlar arasında yapılan karşılaştırmada laboratuvarlar arasındaki en büyük uygunsuzluğun idrar protein tayininde olduğu görülmüş, TCA ve SSA yöntemlerini kullanan laboratuvarlarda bu uyumsuzluğun daha fazla olduğunu bildirilmiştir. 1987 yılında % 29,5 olarak bulunan CV, Coomassie blue ve Pyrogallol Red kullanımının yaygınlaşmasıyla 1999 yılında %10,7'ye gerilemiştir (7). Ayrıca TCA ve SSA yöntemlerinde gereken örnek miktarının fazlalığı, özellikle BOS örneklerinde sorun oluşturmaktadır. Boya bağlama yöntemleri türbidimetrik yöntemlere oranla daha güvenilir yöntemlerdir, ancak albumin ve globuline farklı oranda cevap oluşturma dezavantajları vardır (3). Brilliant blue, kullanım sırasında kuvetleri boyadığı için otomasyona uyarlanması



**Şekil 2** Bradford yöntemi için 0-2000 mg/L konsantrasyon aralığındaki kalibrasyon eğrisi



**Şekil 3 A.** 0-2000 mg/L konsantrasyon aralığında Bradford ve benzalkonyum klorür yöntemlerinin karşılaştırılması ( $y = 1.133 x - 56.462$ )

**B.** 0-500 mg/L konsantrasyon aralığında Bradford ve benzalkonyum klorür yöntemlerinin karşılaştırılması ( $y = 0.903 x - 18.62$ )

zordur. Pyrogallol Red son yıllarda kullanımı artan, otomatize kitleri bulunan bir yöntemdir. Ülkemizde ise özellikle maliyetinin yüksekliği nedeniyle kullanımı yaygınlaşmamıştır. Bizim geliştirdiğimiz yöntem, maliyet açısından çok ucuz olması nedeniyle boya bağlama yöntemlerinden, daha güvenilir olması, örnek miktarının azlığı ve otomasyona uygunluğu nedeniyle de diğer turbidimetrik yöntemlerden daha avantajlı görünmektedir.

Güvenilirliği yüksek bir yöntem olan Bradford yöntemiyle yapılan karşılaştırmada iki yöntem arasındaki korelasyonun yüksek ( $r=0,98$ ) olduğu görüldü. Lineer regresyon analizinde aralarındaki ilişkiyi tanımlayan denklem  $y= 1.133 x - 56.462$  idi. Tekrarabilirlik çalışmasında ise yeni yöntemin performansı Bradford'dan daha iyi olarak bulundu. CV değerleri sırasıyla %2.4; %1.9 ve Bradford için %6.7 ve %5.5'du. Dilena ve ark. tarafından yapılan yöntem karşılaştırma çalışmasında brilliant blue için 220 mg/L konsantrasyonunda CV değeri % 6.8, 620 mg/L protein konsantrasyonunda %3.5, 1020 mg/L protein konsantrasyonunda ise %2.9 olarak bulunmuştur (8). Düşük düzeyde protein içeren örnekte bulunan CV değeriyle Dilena ve ark.'nın bildirdiği değer yakın olmakla birlikte, yüksek protein miktarına sahip örnekte hesaplanan CV değeri bizim çalışmamızda daha yüksekti.

Geri alma çalışmasında benzalkonyum klorür yöntemi için, ortalama %97.6 gibi yüksek bir %R değeri bulunmuştur (Tablo 1). Coomassie brilliant blue için Bradford tarafından yapılan çalışmada (2) %R değeri bildirilmemiş, Lott ve ark.'nın aynı prosedürü idrar örneklerinde değerlendirdikleri çalışmada %97-101 ve %96-112 şeklinde iki farklı %R değeri bildirilmiştir (3).

Yöntemin analitik duyarlılığı değerlendirildiğinde, absorbansta anlamlı değişikliğe yol açan en düşük konsantrasyon 25 mg/L olarak bulunmuştur. Bradford'un çalışmasında 250 mg/L protein konsantrasyonunun 0.275 düzeyinde bir absorban değişikliği oluşturduğu bildirilmekte (2), Lott ve ark. ise 250 mg/L'nin altındaki konsantrasyonlarda örnek miktarının iki katına çıkarılmasını önermektedir (3). Bradford ayrıca daha düşük konsantrasyonlardaki protein örnekleri için 1 mL reaktif ve 0.1 mL örnekten oluşan mikroprotein yöntemi önermektedir. Bu şekilde 5 mg/L düzeyine kadar okuma yapılabilmektedir (2).

Doğrusallık çalışmasında geliştirdiğimiz yöntemin 2000 mg/L düzeyine kadar sağlıklı okuma yapabildiği görüldü. Bradford yöntemi için Lott ve ark 1500 mg/L'nin üzerindeki değerlerde seyreltme yapılmasını önermekte (3), Dilena ve ark. ise en yüksek doğrusallığın 1000 mg/L'ye kadar olduğunu bildirmektedir (8). Regresyon analizindeki 1.133 değeri, Bradford yönteminin yüksek protein konsantrasyonlarında (>1000 mg/L) yanlış düşük değerler vermesinden kaynaklanmış olabilir. Bradford yönteminin kalibrasyon eğrisinde 2000 mg/L düzeyindeki düşük absorban değeri de bu durumu desteklemektedir.

Sonuç olarak benzalkonyum klorür kullanılarak geliştirdiğimiz yöntem, kantitatif idrar proteini ölçümünde ucuz, otomasyona uygun, geniş bir aralıkta doğru ölçüm yapabilen, doğruluğu ve tekrarlanabilirliği yüksek yeni bir yöntem olarak sunulmaktadır. Yöntemin BOS örneklerinde denenmesi ve olası interferansların belirlenmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

## Kaynaklar

1. Iwata J, Nishikaze O. (1979) New micro-turbidimetric method for determination of protein in cerebrospinal fluid and urine. Clin. Chem. 7, 1317-1319
2. Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254
3. Lott JA, Stephan VA, Kirkwood AP. (1983) Evaluation of the coomassie brilliant blue G-250 method for urinary protein. Clin. Chem. 29/11, 1946-1950
4. Bricon TL. (2001) Laboratory analysis of proteinuria: quantitative aspects. Ann. Biol. Clin. 59, 701-715
5. Waller KV, Ward KM, Mahan JD, Wismatt DK. (1989) Current concepts in proteinuria. Clin. Chem. 35, 755-765
6. College of American Pathologists. Basic urine chemistry survey (1982); Set U-D, CAP, Skokie; IL.
7. Boisson RC, Eynard JC, Croizier M, Grafmeyer DC. (2000) French experience of quality assessment of quantitative urinary analysis. Clin. Chim. Act. 297, 285-95
8. Dilena BA, Penberthy LA, Fraser CG. (1983) Six methods for determining urinary protein compared. Clin. Chem. 29, 553-557