J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 17, 1979, pp. 683–687

Enzymatische Kreatinin-Bestimmung im Serum: Vergleich mit Jaffé-Methoden

Von G. Szász †, U. Börner, E. W. Busch

Institut für Klinische Chemie, Universitätskliniken Giessen

und

W. Bablok

Boehringer Mannheim GmbH, Medizinische Forschung, Mannheim

(Eingegangen am 16. August/8. Oktober 1979)

Zusammenfassung: In 337 Seren wurde die Kreatinin-Konzentration enzymatisch sowie mit 6 verschiedenen Modifikationen der Jaffé-Methode untersucht. Bei zufriedenstellender Präzision des enzymatischen Verfahrens wurden beim Vergleich mit der "Methode nach Adsorption an Fullererde" (Lloyd's Reagenz) übereinstimmende Ergebnisse erhalten. Alle übrigen Pikrat-Methoden gaben zu hohe Werte: Der Median der relativen, prozentualen Differenzen zur enzymatischen Methode lag zwischen + 20 % und + 50 % (Bereich 22–88 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin) bzw. + 10 % und + 30 % (Bereich 89–177 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin).

Die Ergebnisse bestätigen damit die Unspezifität aller Jaffé-Methoden mit Ausnahme des Verfahrens nach Adsorption an Fullererde.

Enzymatic assay of creatinine in serum: Comparison with Jaffé methods

Summary: The creatinine concentrations in 337 sera were determined by enzymatic assay and by six different modifications of the Jaffé method. The enzymatic assay showed satisfactory precision and gave the same results as the assay after adsorption on Fuller's earth (Lloyd's reagent). All other methods using picrate gave falsely high values: the relative deviation from the enzymatic method had a median value between +20 % and +50% for creatinine concentrations in the range 22–88 $\mu\text{mol/l}$, and between +10% and 30% for creatinine concentrations in the range 89–177 $\mu\text{mol/l}$.

The study thus confirms the lack of specificity of all Jaffé methods, with the exception of the assay after adsorption on Fuller's earth.

Einführung

Die meisten Methoden zur Bestimmung des Kreatinins beruhen auf der 1886 beschriebenen Jaffé-Reaktion: Im alkalischen Medium bildet Kreatinin mit Pikrinsäure eine orange Lösung, die photometrisch vermessen werden kann. Diese einfache Methode ist jedoch nicht spezifisch für Kreatinin und deshalb vielfach modifiziert worden: Die kinetische Methode soll weniger störanfällig gegenüber "Jaffé-positiven Substanzen" als die klassische Endwert-Methode sein. Am besten werden Störungen der Jaffé-Methode durch Einsatz von Fullererde (Lloyd's Reagenz) umgangen. Dieses Verfahren gilt als Referenzmethode, ist jedoch aufwendig und wenig praktikabel.

Vor kurzem wurde ein Test eingeführt, der die Bestimmung des Kreatinins auf enzymatischem Wege gestattet. Der Vergleich der verschiedenen Modifikationen der Jaffé-Methode mit der enzymatischen Methode ist Gegenstand dieser Arbeit (1).

Material und Methoden

Präzision

Die Präzision in der Serie und von Tag zu Tag wurde für alle Konzentrationsbereiche und Methoden am selben Untersuchungsmaterial ermittelt. Dazu wurden Fünffach-Analysen je eines Poolserums aus 3 Konzentrationsbereichen an 5 Tagen

Tab. 1. Methoden, Reagenzien, Geräte und Meßbedingungen.

Methoden und Reagenzien	Geräte	Messung
Enzymatisch nach <i>Wahlefeld</i> et al. (4) (Test-Combination Creatinin enzymatisch Boehringer Mannheim GmbH)	Eppendorf-Substratautomat 5032	334 nm gegen Probenleerwert (siehe l.c. (14))
Modifikationen der <i>Jaffé</i> -Methoden		
<i>Endpunktmethoden</i> (mit Enteweißung)		
Fullererde-Methode nach <i>Knoll & Stamm</i> (5) mod. nach <i>Haeckel</i> (pers. Mitt.)	Eppendorf 1101 M	509 nm gegen Reagenzienleerwert
<i>Popper</i> et al. mod. (6) (Test-Combination Creatinin, Boehringer Mannheim GmbH)	Eppendorf 5032	509 nm gegen Reagenzienleerwert, nach Vor- schrift des Herstellers
<i>Chasson</i> (7), <i>Rapoport</i> (8)	SMA 6/60	505 nm, nach Vorschrift des Herstellers
<i>Kinetische Methoden</i>		
<i>Bartels</i> et al. (9) mod. nach <i>Helger</i> et al. (10)	Eppendorf Enzymautomat 5020	2 min-Messung bei 509 nm gegen Standard (siehe l.c. (14))
Adaptation auf IL 919 Glucose-Harnstoff- Creatinin-Analyzer	IL 919 Glucose-Harnstoff- Creatinin-Analyzer	16 s-Messung bei 525 nm nach Vorschrift des Herstellers; Kalibrierung mit albuminhaltigem Standard (354 µmol/l Kreatinin)
Adaptation auf Centrifichem 300 (Test-Combination Creatinin, Boehringer Mannheim GmbH)	Centrifichem 300	60 s-Messung nach Vorschrift des Herstellers

Tab. 2. Präzisionen der Methoden mit Humanseren in verschiedenen Konzentrationsbereichen (N = 25).

Methoden	Kreatinin Niedriger Konzentrationsbereich			Kreatinin Mittlerer Konzentrationsbereich			Kreatinin Hoher Konzentrationsbereich		
	Mittelwert	VK [%]		Mittelwert	VK [%]		Mittelwert	VK [%]	
	[µmol/l]	Serie	v.Tag zu Tag	[µmol/l]	Serie	v.Tag zu Tag	[µmol/l]	Serie	v.Tag zu Tag
Enzymatisch	71	6,0	10,7	244	1,5	2,5	529	1,4	2,4
<i>Knoll & Stamm</i>	71	2,5	3,0	245	1,3	1,5	525	1,2	1,3
<i>Popper</i> et al. mod.	75	1,2	2,0	246	0,4	1,1	523	0,4	1,0
<i>Chasson, Rapoport</i> (Adaptation auf SMA)	75	3,7	4,6	247	1,3	2,0	533	1,2	1,7
<i>Bartels</i> et al. mod.	81	5,0	6,8	254	1,4	1,9	539	0,8	1,4
Adaptation auf IL 919	90	3,4	5,7	265	— ⁺	— ⁺	564	0,9	3,2
Adaptation auf Centrifichem 300	96	2,6	2,8	270	1,0	1,8	552	2,0	2,1

⁺ nicht auswertbar

Tab. 3. Präzisionen der Methoden mit Kontrollseren (N = 25).

Methoden	Kreatinin Precinorm S			Kreatinin Monitrol II		
	Mittelwert [µmol/l]	VK [%] Serie	VK [%] v.Tag zu Tag	Mittelwert [µmol/l]	VK [%] Serie	VK [%] v.Tag zu Tag
Enzymatisch	130	2,9	4,8	512	0,9	2,4
<i>Knoll & Stamm</i>	131	1,7	3,4	505	0,7	1,1
<i>Popper</i> et al. mod.	130	1,0	1,5	502	0,6	1,2
<i>Chasson, Rapoport</i> (Adaptation auf SMA)	144	1,6	3,9	525	1,5	2,4
<i>Bartels</i> et al. mod.	157	3,6	3,6	541	0,9	1,5
Adaptation auf IL 919	156	1,8	4,9	538	0,8	3,7
Adaptation auf Centrifichem 300	157	1,3	2,6	549	0,8	2,4

durchgeführt sowie zwei kommerzielle Kontrollseren eingesetzt. Die Werte wurden auf Normalverteilung geprüft (2) und die Präzisionen mit einer einfachen Varianzanalyse bestimmt (3).

Vergleichsuntersuchungen

337 tiefgefrorene Seren des Konzentrationsbereiches von 0–884 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin wurden portionsweise aufgeteilt. Der Kreatininhalt wurde mit der enzymatischen Methode sowie 6 Jaffé-Methoden in Doppelbestimmungen gemessen (Tab. 1). Für den Vergleich wurde der Mittelwert aus beiden Einzelbestimmungen eingesetzt. Die Prüfung auf systematische Unterschiede zwischen enzymatischer Methode und den Vergleichsmethoden erfolgte mit der von Wilcoxon modifizierten Rangvarianzanalyse (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0,05$) (11).

Ergebnisse und Diskussion

Präzision

Die Tabellen 2 und 3 enthalten die Ergebnisse der Präzisionsuntersuchungen in Human- und Kontrollseren:

Im niedrigen Konzentrationsbereich erreicht die enzymatische Methode nicht die Präzision der Jaffé-Methoden, ist jedoch mit einem Variationskoeffizienten von 6 % in der Serie noch tolerabel. Bei höheren Konzentrationen sind keine großen Unterschiede zwischen den Methoden festzustellen: die Präzisionen in der Serie und von Tag zu Tag liegen für Human- und Kontrollseren meist unter 3 %.

Vergleichsuntersuchungen

In Abbildung 1 und Tabelle 4 sind die Ergebnisse der Vergleichsuntersuchungen der enzymatischen Methode gegenüber den Jaffé-Methoden wiedergegeben und die 90 % Bereiche der prozentualen Differenzen (5. bis 95. Quantil) eingetragen. Zur Ermittlung wurde von nicht klassifizierten Daten ausgegangen (12).

Im niedrigen Konzentrationsbereich (bis 177 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin, Abb. 1) gibt nur die "Jaffé-Methode nach Adsorption an Fullererde" vergleichbare Werte. Es bestehen nur Unterschiede in der Variabilität der beiden Methoden. Der Vergleich mit den übrigen Jaffé-Methoden zeigt, daß wesentlich zu hohe Kreatinin-Konzentrationen vorgetäuscht werden: Der Median der Differenzen zwischen den Vergleichsmethoden und dem enzymatischen Verfahren liegt zwischen etwa + 20 % und + 50 % (Bereich 22–88 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin) bzw. + 10 % und + 30 % (Bereich 89–177 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin) (Tab. 4).

Die Unterschiede zu allen Vergleichsmethoden sind – die "Fullererde-Methode" ausgenommen – bis zu einer Kreatininkonzentration von 354 $\mu\text{mol/l}$ statistisch signifikant (Tab. 5). Eine Umrechnung der Ergebnisse der Jaffé-Methoden auf die "Fullererde-Methode" oder die enzymatische Methode ist nicht möglich, da die Streuung der Differenzen sehr groß ist: Für den erstgenannten Bereich bis 88 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin liegt das 95. Quantil für die meisten Methoden bei etwa 60 %; im Bereich bis 177 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin können die Differenzen der Jaffé-Methoden gegenüber der enzymatischen Methode immer noch etwa + 30 % betragen.

Tab. 4. Percentile und Mediane der prozentualen Differenzen zwischen Vergleichsmethoden und enzymatischer Methode.

Die tabellierten Werte geben das 5., 50. (Median) und 95. Percentil an. Die Differenzen wurden aus Einzelbestimmungen errechnet. Der Wert einer Einzelbestimmung N stammt aus zwei Analysen.

Kreatinin Bereiche [$\mu\text{mol/l}$]	Percentil			Percentil			Percentil			Percentil		
	5.	50.	95.	5.	50.	95.	5.	50.	95.	5.	50.	95.
22–88 97	–19,7	–1,5	17,6	–1,3	21,7	67,1	–9,8	22,6	60,3	–6,0	27,8	70,2
89–177 92	–5,9	1,3	10,7	0	10,3	34,5	4,2	14,4	34,2	5,6	17,1	33,6
178–354 49	–3,7	1,9	8,4	–2,5	4,9	20,9	1,4	10,2	24,4	0,5	9,5	28,6
355–530 53	–5,3	0,6	7,9	–8,5	–1,3	14,0	–1,1	5,4	13,5	–5,2	1,6	20,1
531–884 46	–2,0	2,2	7,4	–9,4	–2,8	4,5	–2,6	5,6	11,7	–5,2	–1,4	12,1
Methoden	Knoll & Stamm			Popper et al. mod.			Chasson, Rapoport			Barrels et al. mod.		
	Adaptation IL 919			Adaptation CentrifChem 300			Adaptation IL 919			Adaptation CentrifChem 300

Abb. 1. Differenzen zwischen Vergleichsmethoden und enzymatischer Kreatinin-Bestimmung in % (Bereich 22–177 $\mu\text{mol/l}$).

----- Identitätslinie
 ——— 5. bzw. 95. Perzentil

Tab. 5. Unterschiede zwischen der enzymatischen Methode und den Vergleichsmethoden (s = signifikant, ns = nicht signifikant; Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0,05$).

Methoden	Konzentrationsbereiche von Kreatinin [$\mu\text{mol/l}$]				
	22–88	89–177	178–354	355–530	531–884
<i>Knoll & Stamm</i>	ns	ns	ns	ns	ns
<i>Popper et al. mod.</i>	s	s	s	ns	ns
<i>Chasson, Rapoport</i> (Adaptation auf SMA)	s	s	s	s	s
<i>Bartels et al. mod.</i>	s	s	s	s	ns
Adaptation auf IL 919	s	s	s	s	ns
Adaptation auf Centrifichem 300	s	s	s	s	s

Im höheren Konzentrationsbereich werden die Differenzen der Jaffé-Methoden gegenüber der "Fullererde-Methode" oder der enzymatischen Methode zunehmend geringer, die relative Streuung der Einzelwerte nimmt mit zunehmender Konzentration ab. Die Unterschiede sind in diesem Bereich jedoch klinisch weniger bedeutungsvoll.

Die Ergebnisse bestätigen die Unspezifität aller Pikrat-Methoden mit Ausnahme des Verfahrens nach Adsorption an Fullererde. Kinetische Methoden oder continuous

flow-Methoden, die mit Dialyse arbeiten, sind ähnlich störanfällig wie Methoden nach Enteiweißung. Die enzymatische und die "Fullererde-Methode" dürften am ehesten die Messung der "wahren" Kreatinin-Konzentration ermöglichen.

Ein wünschenswerter zusätzlicher Vergleich mit einer unabhängigen, spezifischen Methode, z.B. Massen-Fragmentographie (13), konnte aus Gründen der Praktikabilität nicht durchgeführt werden.

Literatur

1. Szász, G., Börner, U., Bablok, W. & Busch, E. W. (1978), *Clin. Chem.* 24, 997 Abstract 047.
2. Conover, W. J. (1971), *Practical Nonparametric Statistics*, John Wiley & Sons: New York.
3. Ostle, B. (1966), *Statistics in Research*, The Iowa State University Press, Ames Iowa, 2nd edition.
4. Wahlefeld, A. W., Herz, G. & Bergmeyer, H. U. (1972), *Scand. J. Clin. Lab. Inv.* 29, Suppl. 126.
5. Knoll, E. & Stamm, D. (1970), *diese Z.* 8, 582–587.
6. Popper, H., Mandel, E. & Mayer, H. (1937), *Biochem. Z.* 291, 354–367.
7. Chasson, A. L., Grady, H. J. & Stanley, M. A. (1961), *Amer. J. Clin. Pathol.* 35, 83–88.
8. Husdan, H. & Rapoport, A., (1968), *Clin. Chem.* 14, 222–238.
9. Bartels, H., Böhmer, M. & Heierli, C. (1972), *Clin. Chim. Acta* 37, 193–197.
10. Helger, R., Rindfrey, H. & Hilgenfeld, J. (1974), *diese Z.* 12, 344–349.
11. Wilcoxon, F. & Wilcox, R. (1964), *Some rapid approximate statistical procedures*, Lederle Lab., Pearl River, N.Y., S. 11.
12. Linder, A. & Berchtold, W. (1979), *Elementare statistische Methoden*, Birkhäuser Verlag Boston, Stuttgart, S. 21.
13. Björkhem, J., Blomstrand, R. & Ohman, G. (1977), *Clin. Chem.* 23, 2114–2121.
14. Börner, U., Szász, G., Bablok, W. & Busch, E. W. (1979), *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 17, 679–682.

Prof. Dr. E. W. Busch
Boehringer Mannheim GmbH
Diagnostica Forschung
Sandhofer Straße 116
D-6800 Mannheim 31