

2. Material und Methoden

2.1. Liste der Materialien

- PreventID[®] Albumin Teststreifen, Preventis Bensheim, Deutschland
- Modular P800, Gerät ACN 411 für Urin Roche/Hitachi, Institut für Labormedizin der Charité, Berlin, Deutschland
- Röhre mit konischem Zwischenboden, Schraubverschluss aus HD-PE, 4 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Pipettierhilfe, Finnpipette 200 – 1000 µl
- Pipettenspitze Typ Eppendorf 1000 µl, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Eppendorfgefäße
- Ständer für Eppendorfgefäße
- Aufbewahrungsbecher für Urin zur Durchführung des Tests
- Eisschrank, Electrolux Medical Refrigeration
- Handschuhe

2.2. Liste der Reagenzien

- 24-h Sammelurine aus dem klinischen Zentrallabor der Charité, Berlin, Deutschland
- R1-Reagenz (Modular) TRIS – Puffer Tris(hydroxymethyl)-aminomethan: 50 mmol/l, pH 8,0; PEG: 4,2%; EDTA: 2,0 mmol/l, Konservierungsmittel
- R2-Reagenz (Modular) Polyklonaler Anti-human-Albumin-Antikörper (Schaf): abhängig vom Titer; TRIS-Puffer: 100 mmol/l, pH 7,2; Konservierungsmittel
- 0,9% NaCl
- Kalibrator: C.f.a.s. (Calibrator for automated systems) PUC
- Kontrollen: Precinorm PUC, Precipath PUC, Precinorm Protein, Precipath Protein
- Tina-quant Albumin MODULAR P Antigen Excess Reagent, für die MODULAR P Urinapplikation mit Antigenüberschussprüfung

2.3. Prinzip des PreventID® Albumin Teststreifen

PreventID® Albumin Teststreifen bieten als eine Form der in-vitro-Diagnostik die Möglichkeit, die Konzentration von Albumin im Urin zu messen.

Erhöhte Albuminwerte sind ein frühes Zeichen eines möglichen Nierendefektes (Viberti, G.C. et al. 1982). Das rechtzeitige Erkennen und Messen des erhöhten Albumins im Urin kann dabei helfen, eine beginnende Nephropathie bei Patienten mit Krankheiten wie Diabetes und arterieller Hypertonie zu entdecken und damit den Verlauf der Erkrankung günstig zu beeinflussen. Diese Mikroalbuminurie kann mit Hilfe des Teststreifens ab Werten über 18 mg/l erkannt werden, dabei unterscheidet der Test zwischen positiven und negativen Ergebnissen, abhängig davon, ob die Konzentration von Albumin im Urin oberhalb oder unterhalb von 18 mg/l liegt.

Werte über 18 mg/l werden bei gesunden Individuen normalerweise nicht gemessen und stellen damit einen präziseren Grenzwert zu einer Mikroalbuminurie dar. Ältere Testformen können diese niedrigen signifikanten Albuminlevel nicht erkennen.

Die „American Diabetes Association“ empfiehlt aber, mindestens zwei Urinproben mit erhöhter Albuminkonzentration von insgesamt drei Urinproben innerhalb einer Zeitspanne von 3-6 Monaten zu erhalten, bevor bei Patienten die Diagnose einer Mikroalbuminurie gestellt wird (Weir, M.R. 2004).

Die Funktion des Tests beruht auf der Bindung von Albumin an blau gefärbte Latexpartikel, die über eine Antikörperreaktion vermittelt wird. Zur Verfügung stehen hierbei fixierte monoklonale Antikörper gegen humanes Albumin.

Nach Platzieren des Urinstreifens in der Urinprobe vermischt sich diese mit den Latexpartikeln, und mittels kapillärer Aufwärtsbewegung werden diese Partikel entlang des Teststreifens transportiert.

Der Teststreifen hat humanes Albumin an dem unteren von insgesamt zwei Markierungsstreifen gebunden. Bei niedrigen Albuminkonzentrationen in der Urinprobe binden sich die freien blauen Latexpartikel an diesen unteren mit Albumin versetzten Markierungsstreifen und rufen in der unteren Hälfte des Testfensters eine Blaufärbung hervor. Daneben findet sich ein zweiter Markierungsstreifen, der diese blauen Latexpartikel binden kann, wenn sie bereits mit Albumin reagiert haben.

Bei niedrigen Albuminwerten binden sich die meisten der Latexpartikel an den unteren Streifen, jedoch werden auch einige der Latexpartikel mit der gering vorhandenen Albuminmenge reagie-

ren und sich an dem oberen Markierungsstreifen binden. Dies verursacht die Färbung des zweiten Streifens im Testfenster.

Je höher die Albuminurie, desto mehr blaue Latexpartikel können den ersten Markierungsstreifen passieren, sich an dem zweiten binden und eine intensivere Färbung hervorrufen. Nach ca. drei Minuten Reaktionszeit kann dann die Intensität beider Streifen im Testfenster verglichen werden.

Zeigt das Testfenster in der oberen Hälfte einen helleren Streifen an oder erscheinen beide Markierungen als gleich hell, so ist der Test als negativ zu interpretieren.

Sobald sich der obere Streifen dunkler verfärbt, ist der Test positiv.

Der PreventID[®] Albumin Teststreifen enthält eine eingebaute Kontrollfunktion: Während der Testdurchführung kommt es in dem Teststreifen zu einer sichtbaren Aufwärtsbewegung der Flüssigkeitsfront mit den enthaltenen Latexpartikeln. Dieser Vorgang ereignet sich ca. 60 Sekunden nach dem Eintauchen des Teststreifens in die Urinprobe. Des Weiteren muss der Test in Höhe des oberen Markierungsstreifens innerhalb von drei Minuten nach Kontakt mit der Urinprobe eine Blaufärbung zeigen. Dieser blaue Streifen muss geradlinig verlaufen und farblich einheitlich erscheinen. Sollte eine der Kontrollfunktionen ausfallen, so ist die zu untersuchende Urinprobe mit einem anderen Teststreifen wiederholt zu untersuchen.

2.4. Durchführung des Tests

Zur Durchführung des Experiments werden aus dem klinischen Zentrallabor der Charité randomisiert 24-h-Sammelurine entnommen, die dort in Kühlschränken bei einer Temperatur von ca. +4 °C lagern. Unter diesen Proben finden sich zufällig verteilt sowohl Urine mit hoher als auch niedriger Proteinurie. Zur weiteren Dokumentation werden Name, Geburtsdatum und Datum der Urinentnahme vermerkt.

Vor Beginn der Testdurchführung müssen die Urinproben Raumtemperatur annehmen. Danach kann der Teststreifen in die Urinprobe getaucht werden, sodass der Urinspiegel mindestens bis zu der dafür vorgesehenen Markierung reicht. Empfohlen ist die Verwendung von Morgenurin, da im Tagesverlauf die Albuminausscheidung schwankt (Russo, L.M. et al. 2002).

Eine Kalibrierung des Tests durch den Anwender ist nicht notwendig, jedoch sollte die Bildung von Luftblasen in dem Teststreifen vermieden werden, da diese den Flüssigkeitstransport behindern und es so zu ungültigen bzw. verfälschten Ergebnissen kommen kann.

Die Testergebnisse sollten nach mindestens drei Minuten bis maximal acht Stunden Einwirkzeit mit Hilfe einer beigelegten Übersichtskarte ausgewertet werden.

Um diese Ergebnisse validieren zu können, werden im vorliegenden Fall von den 88 ausgewählten Urinproben Aliquots entnommen und zunächst zur Aufbewahrung bei Temperaturen von ca. -80°C gelagert. Erst nach vollständiger Entnahme werden sie nach Erwärmen auf Raumtemperatur weiter untersucht.

In diesen Aliquots wird durch zwei anerkannte Methoden der Albuminwert im Urin bestimmt und mit dem erhaltenen Wert des zu untersuchenden Urintests verglichen. Bei diesen Methoden dient der Modular P800, Roche/Hitachi, der im Institut für Labormedizin der Charité entwickelt wurde, als Goldstandard. Ferner wird mit Hilfe dieser Methode der Wert für das Kreatinin im Urin ermittelt, um sich mit diesem die Berechnung der Albumin-Kreatinin-Ratio (ACR) zu ermöglichen. Dieses Prinzip stellt eine bestätigte Alternative zur Ermittlung einer Albuminurie dar und ist positiv bei $>30\text{ mg/g}$ (Levey, A.S. et al. 2003).

2.5. Patientenkollektiv

Für diese Arbeit werden 88 Urinproben des klinischen Zentrallabors der Charité randomisiert ausgewählt und weiter untersucht.

Das Alter der Patienten liegt zwischen 16 und 100 Jahren bei einem Mittelwert von 53,8 Jahren. Von diesen Patienten sind 60,20% männlich und 39,80% weiblich.

2.6. Gegenmessung mit dem Modular

Der Modular P800, Gerät ACN 411 für Urin Roche/Hitachi ist ein optisches Analyseverfahren und erlaubt in Suspensionen, Aerosolen und anderen trüben Dispersionen eine Bestimmung des Feststoffanteils. Er arbeitet nach dem Prinzip der Turbidimetrie. (Beschreibung s.o.) Der Modular dient in dieser Arbeit als Goldstandard zur Gegenbestimmung von Albumin im Urin. Das Prinzip der Albuminmessung durch den Modular wird im Folgenden erörtert:

2.6.1. Albumin im Urin

Bei der Bestimmung des Albumins mit dem Modular P800, Roche/Hitachi handelt es sich um einen immunologischen Trübungstest, mit dem quantitativ Albumin in Humanurin, -serum, -plasma und -liquor bestimmt werden kann.

Zur Durchführung der Gegenmessung werden die entsprechenden 24-h-Sammelurine in die für die Modulare geeigneten Gefäße mit konischem Zwischenboden pipettiert.

Zur Vorbereitung der Proben kann mit Hilfe von Teststreifen (z.B. Combur 9 Test/CHEMSTRIP) der Konzentrationsbereich des Albumins im Urin bestimmt werden, um nachfolgend bei höheren Konzentrationen die Probe mit 0,9% NaCl zu verdünnen. Die Ergebnisse werden dann gemäß der verwendeten Verdünnung mit einem Verdünnungsfaktor multipliziert und anschließend zentrifugiert. Diese Handlungsschritte sind nur in seltenen Fällen notwendig und werden durch einen automatischen Rerun des Modulars weitestgehend ersetzt (s.u.).

Die für die Gegenmessung relevanten Proben werden nun in den Modular eingegeben und können je nach zu untersuchendem Parameter dem P1- oder P2-Modul zugeführt werden.

Nach dem Transport der Proben in das dafür vorgesehene P-Modul wird zunächst eine Leerwertmessung einer mit Wasser gefüllten Küvette durchgeführt. Der dabei gemessene Extinktionswert dient dann als Ausgangs- bzw. Referenzwert für die anschließende Extinktionsmessung der Proben. Erst nach Bestimmung dieses Leerwertes wird die Küvette auf die Position der Probenpipettierung gedreht, um anschließend mit der Probe gefüllt zu werden. Den Proben werden dann die entsprechenden Reagenzien zugegeben, und es folgt die photometrische Messung der Konzentrationen.

Der für den Modular mögliche Messbereich von Albumin im Urin liegt bei 3-400 mg/l (0,046-6,08 $\mu\text{mol/l}$). Bei höheren Konzentrationen werden die Proben automatisch dem so genannten Rerun zugeführt, der einen erweiterten Messbereich von 3-3000 mg/l (0,046-45,6 $\mu\text{mol/l}$) erlaubt.

Eine eingeschränkte Beurteilung der Messergebnisse wird durch verschiedene Stoffwechselstörungen hervorgerufen, wie sie bei Hämolysen, Hyperbilirubinämien, einer vermehrten Bildung von Azeton oder anderen erhöhten Parametern (z.B. Glukose, Kreatinin, Harnstoff, Harnsäure u.a.) vorkommen. Die Ergebnisse sind stets im Zusammenhang mit der Patientengeschichte, der klinischen Untersuchung und anderen Untersuchungsergebnissen zu werten.

2.6.2. Kreatinin im Urin

Die Bestimmung von Kreatinin kann zur Diagnosestellung und Verlaufskontrolle einer Mikroalbuminurie dienen, wenn mit Hilfe dieses Wertes der Albumin-Kreatinin-Quotient berechnet wird. Er stellt eine anerkannte diagnostische Methode dar, die in dieser Arbeit als Referenzwert verwendet wird (s.u.).

Die Kreatininbestimmung mittels Modular zur späteren Berechnung des Albumin-Kreatinin-Quotienten basiert auf einem kinetischen Farbttest. Es wird bei diesem Messprinzip der zu bestimmenden Urinprobe Pikrinsäure beigegeben, welche mit dem Kreatinin der Probe in alkalischer Lösung einen gelb-orange gefärbten Komplex hervorbringt:

Kreatinin + Pikrinsäure + alkalische Lösung → Kreatinin-Pikrinsäure-Komplex

Die Farbintensität dieses Komplexes ist direkt proportional zu der Konzentration des zu messenden Kreatinins in der Probe und kann photometrisch bestimmt werden.

Auch hier dient das Ergebnis der Extinktion eines Leerwertes als Referenz für nachfolgende Extinktionsmessungen der Proben.

Der Messbereich für Kreatinin im Urin liegt bei dem Modular um 0,2-650 mg/dl (18-57500 $\mu\text{mol/l}$) und kann ähnlich der Albuminbestimmung bei zu hoher Konzentration dem Rerun-Prozess zugeführt werden. Stoffwechselinterferenzen liegen auch hier vor, können aber durch die Rate-Blanking-Methode minimiert werden.

2.7. Der Albumin-Kreatinin-Quotient

Eine weitere hier verwendete Methode zur Bestimmung einer Mikroalbuminurie ist die Berechnung der Albumin-Kreatinin-Ratio, die ein Verhältnis von Albumin zu Kreatinin im Urin darstellt. Die Berechnung des Quotienten erlaubt eine zuverlässige und schnelle Diagnostik und gilt mittlerweile als Standarduntersuchung zur Bestimmung einer Mikroalbuminurie (Levey, A.S. et al. 2003). Das Prinzip greift auf die Verwendung von Spontan- statt Sammelurin zurück und verhindert damit die zeitaufwendige Bestimmung geringer Mengen von Albumin mittels Tagesprofil, da die Albuminausscheidung in Abhängigkeit von der Harnkonzentration schwankt. Der Albumin-Kreatinin-Quotient hingegen funktioniert unabhängig von der Harnkonzentration und ermöglicht ein einfaches Screening auf etwaige Nierenschäden.

2.8. Statistik

Sensitivität und Spezifität sind häufig verwendete statistische Maße zur Beurteilung der Güte eines diagnostischen Testverfahrens. In dieser Arbeit soll die Güte des PreventID[®] Albumintests hinsichtlich seiner Fähigkeit zur Trennung von Testergebnissen untersucht werden.

2.8.1. Sensitivität und Spezifität

Das Prozedere zur Erstellung einer Diagnose resultiert aus der Ableitung von zwei Einzelentscheidungen (Krankheit existiert/ Krankheit existiert nicht) und wird mithilfe diagnostischer Tests ermittelt. Auch die Testresultate unterliegen einer solchen Beurteilung, hier gilt die Einteilung Testergebnis positiv (krank) versus Testergebnis negativ (gesund).

Stehen Testverfahren mit einer quantitativen Auswertung zur Verfügung z.B. Laborwerte, so ermöglichen Trennwerte (Cut-off-Punkte) die Einteilung in ein derartiges binäres System.

Die Sensitivität eines statistischen Tests zeigt den Prozentsatz der erkrankten Personen an, der durch die Verwendung des speziellen Testverfahrens tatsächlich als krank erkannt wird. Es wird also durch sie die Wahrscheinlichkeit wiedergegeben, dass der Test bei kranken Personen ein positives Testresultat nachweist.

Mit Hilfe einer Vierfeldertafel lassen sich die Ergebnisse für die Größe der Sensitivität übersichtlich herleiten (Bender, R. et al. 2001):

Tabelle 4: Vierfeldertafel

	Tatsächlicher Sachverhalt		
	krank	gesund	Insgesamt
Positiver Befund	A richtig positiv	B falsch positiv	A+B
Negativer Befund	C falsch negativ	D richtig negativ	C+D
Insgesamt	A+C	B+D	n

Die Sensitivität ergibt sich aus dem Quotienten der richtig positiven Befunde A und der Summe aus richtig positiven A und falsch negativen C Befunden. Zusammen mit der falsch-negativ-Rate addiert sich die richtig-positiv-Rate zu einem Wert von 100%.

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Anzahl der richtig pos. Befunde}}{\text{Anzahl der richtig pos. Befunde} + \text{Anzahl der falsch neg. Befunde}}$$

Bei der Spezifität handelt es sich um eine statistische Größe, die die Wahrscheinlichkeit darstellt, bei gesunden Personen ein negatives Testergebnis zu erhalten. Auch in diesem Fall kann man sich der Vierfeldertafel bedienen und erhält für die Spezifität den Quotienten aus der Anzahl der richtig negativen Testbefunde und der Summe aus der Anzahl der richtig negativen Befunde und der falsch positiven Befunde. In einer Gleichung lässt sich der Sachverhalt folgendermaßen ausdrücken:

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{Anzahl der richtig neg. Befunde}}{\text{Anzahl der richtig neg. Befunde} + \text{Anzahl der falsch pos. Befunde}}$$

Auch hier addiert sich die Rate der falsch positiven Befunde zusammen mit der Rate der richtig negativen Testbefunde zu einem Wert von 100%.

In den Fällen A (positiver Befund bei erkrankter Person) und D (negativer Befund bei gesunder Person) ist die Einteilung korrekt, sowohl Kranke als auch Gesunde werden richtig diagnostiziert. Ein Fehler liegt jedoch in den Fällen B (positiver Befund bei gesunder Person) und C (negativer Befund bei erkrankter Person) vor. Hier wird der Fall B, bei dem Gesunde durch ein falsch positives Ergebnis als Kranke diagnostiziert werden, als α -Fehler (Fehler 1. Art) bezeichnet. In einer Stichprobe wird ein Testergebnis also für wahr gehalten, obwohl es für die Grundgesamtheit nicht zutrifft und tatsächlich fehlerhaft ist. Einen β -Fehler (Fehler 2. Art) erkennt man in Fall C, bei dem eigentlich kranke Personen durch einen falsch negativen Befund als fälschlich gesund identifiziert werden. Es werden hier also Testergebnisse als unwahr kategorisiert, obwohl sie für die Gesamtheit der Merkmalsträger zutreffend sind.

2.8.2. Positiv prädiktiver Wert und negativ prädiktiver Wert

Der Prädiktivwert widmet sich der Interpretation von Ergebnissen statistischer Tests. Bei einem Testergebnis wird mithilfe des Prädiktivwertes die Wahrscheinlichkeit geklärt, ob in dieser Situation tatsächlich eine Erkrankung vorliegt oder nicht (Bender, R. et al. 2001).

Für den positiv prädiktiven Wert gilt die Wahrscheinlichkeit, dass bei einem pathologisch ausgefallenen Testergebnis die Existenz einer Krankheit nachgewiesen ist. Es wird also der Anteil der Kranken unter den positiven Testergebnissen wiedergegeben. Hier ergibt folglich der Quotient aus den richtig positiven Ergebnissen und der Summe der richtig positiven Ergebnisse und falsch positiven Befundergebnisse den Wert des positiv prädiktiven Wertes.

$$\text{positiv prädiktiver Wert} = \frac{\text{Anzahl der richtig pos. Befunde}}{\text{Anzahl der richtig pos. Befunde} + \text{Anzahl der falsch pos. Befunde}}$$

Umgekehrt gilt für den negativ prädiktiven Wert die Wahrscheinlichkeit, dass bei einem nichtpathologischen Testbefund das Vorliegen einer Erkrankung nicht gewährleistet ist. Mittels der Vierfeldertafel wird auch hier der Quotient für den negativ prädiktiven Wert aus der Anzahl der richtig negativen Ergebnisse und der Summe aus richtig und falsch negativen Ergebnissen deutlich.

$$\text{negativ prädiktiver Wert} = \frac{\text{Anzahl der richtig neg. Befunde}}{\text{Anzahl der richtig neg. Befunde} + \text{Anzahl der falsch neg. Befunde}}$$

Insgesamt zeigt der Prädiktivwert eine Abhängigkeit von der Prävalenz einer Erkrankung auf. Da durch ihn die Frage über das Vorliegen einer Krankheit nach Testdurchführung geklärt werden soll, finden sich bei seltenen Krankheiten kleinere Werte für den positiv prädiktiven Wert, weil der Anteil der Kranken unter den Testpositiven sinken muss. In dieser Situation steigt folglich der negativ prädiktive Wert. Umgekehrte Verhältnisse liegen bei Krankheiten mit hoher Prävalenz vor.

2.8.3. ROC (Receiver operating characteristic)

Die ROC (Receiver operating characteristic) ermöglicht eine graphische Darstellung von diagnostischen Testverfahren und ihrer Fähigkeit, zwischen zwei Krankheitszuständen zu unterscheiden. Für die Erstellung einer solchen ROC-Kurve sind die Parameter Sensitivität, Spezifität und der Cut-off-Punkt relevant. Die einzelnen Werte für die Sensitivität und die Spezifität eines diagnostischen Tests werden entsprechend der möglichen Cut-off-Punkte innerhalb des Messbereichs eines Diagramms aufgetragen. Werte für die Sensitivität entsprechen den Einteilungen auf der Ordinate, entlang der Abszisse werden die Werte für die 1-Spezifität angeordnet. Beide Parameter sind von der Lage der gesetzten Diskriminanzschwelle (Cut-off-Punkt) abhängig.

Der Verbund aller abgebildeten Wertepaare ergibt den Verlauf einer ROC-Kurve, die im günstigen Fall gekrümmt und parabelartig verläuft. Bei signifikanter Abweichung dieser Kurve zu einer entsprechenden Diagonalen resultiert eine deutliche Trennschärfe des diagnostischen Testverfahrens. Im Idealfall verläuft die ROC-Kurve entlang der linksseitigen Ordinate und der oberen Abszisse. Diese Situation bedeutet für den Test eine Trennschärfe von 100%.

Ein Gütezeichen zur Beurteilung des zu untersuchenden Testverfahrens stellt außerdem die Area under the curve (AUC) dar. Mögliche Werte liegen hierbei zwischen 0 und 1, dabei entsprechen letztere dem Idealfall und bezeugen eine bessere Testgüte. Verläuft die ROC-Kurve entlang der Winkelhalbierenden, entspricht es einer AUC von 0,5. Der Test gleicht dann einer Zufallsentscheidung, und für die Fragestellung kann kein signifikantes Ergebnis eruiert werden.

In gleichem Maße können mittels einer ROC-Kurve verschiedene Tests, die sich auf die gleiche Fragestellung beziehen, innerhalb eines Diagramms verglichen werden. Hierbei kann wegen graphischer Beurteilungsschwierigkeiten die Area under the curve verwendet werden.

Für die statistische Analyse wird SPSS Version 11.5 (Chicago, IL, USA) und Microsoft® Office Excel Version 2003 verwendet.

