

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MIRJANA HRNJAK

DIPLOMSKA NALOGA

**VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE
BIOMEDICINE**

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



MIRJANA HRNJAK

**PRIMERJAVA NEFELOMETRIČNEGA IN TURBIDIMETRIČNEGA
DOLOČANJA ALBUMINOV V URINU**

**COMPARISON THE RESULTS OF ALBUMIN IN URINE
DETERMINED BY NEPHELOMETRIC AND TURBIDIMETRIC
METHODS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2010

Diplomsko nalogo sem opravljala v Diagnostičnem laboratoriju Splošne bolnišnice Novo mesto.

ZAHVALA

Za strokovno pomoč, vodenje in vzpodbudo pri izdelavi diplomske naloge se zahvaljujem mentorju prof. dr. Borutu Božiču, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorici asist. mag. Danijeli Furlan, spec. med. biokem.. Za pomoč pri laboratorijskem delu se zahvaljujem vsem sodelavcem Diagnostičnega laboratorija Splošne bolnišnice Novo mesto.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Boruta Božiča, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom asist. mag. Danjele Furlan, spec. med. biokem..

Mirjana Hrnjak

Ljubljana, 2010

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Joško Osredkar, mag. farm. spec. med. biokem.

Član diplomske komisije: doc. dr. Janez Ilaš, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK

SEZNAM OKRAJŠAV

SEZNAM SLIK

1. UVOD	8
1.1. Albumin	8
1.2. Ledvica	9
1.3. Albuminurija	11
1.4. Bolezenska stanja, ki so povezana z albuminurijo	11
1.4.1. Diabetična nefropatija	11
1.4.2. Arterijska hipertenzija	12
1.4.3. Sladkorna bolezen in arterijska hipertenzija	12
1.4.4. Nefrotski sindrom	12
1.5. Albumin v laboratorijski diagnostiki	13
1.5.1. Reagenčni trak	13
1.5.2. Imunoturbidimetrična metoda	13
1.5.3. Imunonefelometrična metoda	15
1.5.4. Biooznačevalci	15
2. NAMEN DELA	16
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1. Vzorci	17
3.2. Reagenti	17
3.2.1. Reagenti za delo na analizatorju Hitachi 912	17
3.2.2. Reagenti za delo na analizatorju BN ProSpec	18
3.3. Oprema	18
3.4. Postopki	19
3.4.1. Postopek za delo z analizatorjem Hitachi 912	19
3.4.2. Postopek za delo z analizatorjem BN ProSpec	19
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	21
4.1. Rezultati	21
4.2. Rezultati z upoštevanjem zgornje referenčne vrednosti 30 mg/L	23
4.3. Korelacija linearnosti izmerjenega signala med metodama	24
5. ZAKLJUČEK	28
6. LITERATURA	29
PRILOGA	31

<i>Preglednica I: Rezultati določitev koncentracije albumina v urinu na obeh analizatorjih.....</i>	<i>31</i>
<i>Preglednica II: Primerjava rezultatov z upoštevanjem prazne vrednosti na spektrofotometru</i>	<i>34</i>
<i>Preglednica III: Rezultati z upoštevanjem prazne vrednosti na nefelometru</i>	<i>36</i>
<i>Preglednica IV: Rezultati vzorca in tirov različnih koncentracij.....</i>	<i>38</i>
<i>Preglednica V: Primerjava nefelometričnih rezultatov, ki so bili na spektrofotometru 0,00 mg/L.....</i>	<i>38</i>

POVZETEK

Albumin je glavni plazemski protein in kot transportni protein prenaša kalcijeve ione, maščobne kisline, bilirubin, hormone, elemente v sledovih in zdravila po krvi. Zvišane koncentracije v urinu so indikacija za poškodbe tubulov ali pa posledica različnih bolezenskih stanj, kot so nefritis, diabetična nefropatija, izpostavljenost težkim kovinam ali delovanju nefrotoksičnih zdravil.

Namen naloge je bil ugotoviti skladnost ali neskladnost rezultatov meritev koncentracije albumina v urinu z dvema različnima rutinskima metodama. Obravnavali smo vzorce 120 diabetičnih bolnikov. Vsakemu vzorcu urina smo vzporedno izmerili koncentracijo albumina na spektrofotometričnem analizatorju Hitachi 912, ter na nefelometričnem analizatorju BN ProSpec. Zanimalo nas je tudi ujemanje rezultatov na obeh analizatorjih, če upoštevamo zgornjo mejo referenčne vrednosti 30 mg/L. Želeli smo tudi preveriti korelacijo linearnosti izmerjena signala na obeh analizatorjih, zato smo izbrali vzorec urina z visoko koncentracijo albumina in ga redčili do titra 1 : 5. Zanimala nas je tudi občutljivost obeh metod v nizkem območju meritev, zato smo primerjali ujemanje rezultatov vzporednih določitev, ki so bili na spektrofotometru 0 mg/L.

Ugotovili smo, da pri vseh 120 bolnikih metodi zelo dobro korelirata, saj je korelacijski koeficient $r = 0,9969$. Koncentracija na nefelometru je bila v povprečju za 29,1% višja, kot na spektrofotometru.

Če zajamemo samo rezultate z upoštevanjem prazne vrednosti 30 mg/L, lahko ugotovimo neujemanje pri dveh vzporedno izmerjenih rezultatih. S turbidimetrično metodo smo določili oba rezultata pod mejno vrednostjo, medtem ko sta bili vrednosti z nefelometrično metodo že v patološkem območju.

Pri redčenju vzorca (do titra 1 : 5) z visoko koncentracijo albumina se je izkazalo, da sta oba analizatorja v višjih območjih zelo natančna, saj je korelacijski koeficient $r = 0,9998$.

Vzporedne meritve, ki so bile s spektrofotometrično metodo 0 mg/L, so z nefelometrično metodo dale rezultate v območju od 2,09 do 5,98 mg/L. Menimo, da je vzrok za večjo občutljivost nefelometrične določitve v sestavi reagenta, saj metoda uporablja specifična protitelesa proti humanemu albuminu, medtem ko ima spektrofotometrična metoda poliklonska protitelesa in zato morda manjšo občutljivost v tem območju, kar pa na pravilno postavitve diagnoze ne vpliva.

SEZNAM OKRAJŠAV

GF – glomerulna filtracija

oGF – ocena glomerulne filtracije

MDRD – enačba za izračun ocene glomerulne filtracije

KLB – kronična ledvična bolezen

GMB – glomerulna bazalna membrana

CSF – cerebrospinalna tekočina

NGAL – nevtrofilna gelatinaza povezana z lipokalinom

KIM-1 – molekula za odkritje ledvične okvare

IL-18 – molekula interleukina

SEZNAM SLIK

Slika 1: Molekula serumskega albumina

Slika 2: Bowmanova kapsula

Slika 3: Princip turbidimetričnega določanja albuminov

Slika 4: Delež delitev sodelujočih v študiji glede na spol

Slika 5: Spektrofotometer HITACHI 912

Slika 6: Analizator BN ProSpec

Slika 7: Frekvenca porazdelitve koncentracij albumina na analizatorju Hitachi 912

Slika 8: Frekvenca porazdelitve koncentracij albumina na analizatorju BN ProSpec

Slika 9: Regresijska premica in 95% napovedna vrednost ter 95% meja zaupanja parnih rezultatov za 120 vzorcev, izmerjenih na analizatorju Hitachi 912 in BN ProSpec (mg/L)

Slika 10: Regresijska premica in 95% napovedna vrednost ter 95% meja zaupanja parnih rezultatov za 98 vzorcev z upoštevanjem zgornje referenčne vrednosti 30 mg/L na analizatorju Hitachi

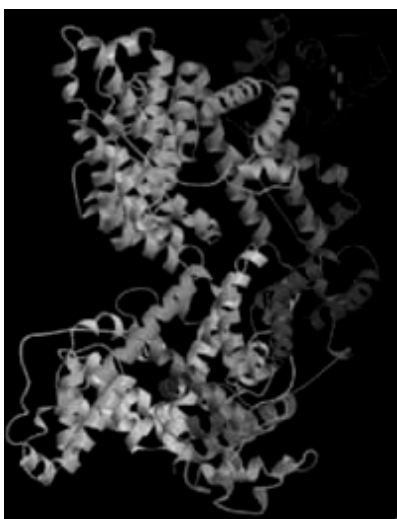
Slika 11: Regresijska premica in 95% napovedna vrednost ter 95% meja zaupanja parnih rezultatov za 96 vzorcev z upoštevanjem zgornje referenčne vrednosti 30 mg/L na analizatorju BN ProSpec

Slika 12: Regresijska premica in 95% napovedna vrednost ter 95% meja zaupanja parnih rezultatov za 6 vzorcev, izmerjenih na analizatorju Hitachi 912 in BN ProSpec (mg/L)

1. UVOD

1.1. *Albumin*

Albumin je največji plazemski protein, ki se sintetizira v jetrnih parenhimskih celicah. Albumin kot transportni protein prenaša kalcijeve ione, maščobne kisline, bilirubin, hormone, elemente v sledovih in zdravila po krvi. Kvantitativno je albumin najpomembnejša proteinska komponenta v plazmi, cerebrospinalni tekočini (CSF), in urinu. Prvi ga je opisal Richard Bright leta 1817, kasnejše raziskave so potrdile prisotnost zvišanih vrednosti v urinu pri številnih stanjih in boleznih. Poškodbe glomerulno-filtracijske pregrade povzročijo dvig koncentracije albumina v urinu in kažejo na renalne in vaskularne zaplete. Koncentracija albumina v urinu je pri zdravih ljudeh 10 – 15 mg/L. Zvišana koncentracija albumina v urinu je pokazatelj ledvične okvare, ki je lahko povezana s sladkorno boleznijo ali z arterijsko hipertenzijo. Če teh bolezni ne zdravimo pride do večje okvare glomerulov, koncentracija albumina v urinu se nenormalno zviša in lahko pride do odpovedi ledvic (1).

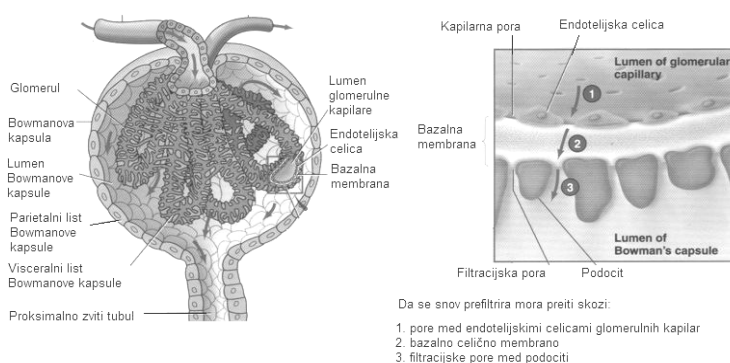


Slika 1: Molekula serumskega albumina (2)

1.2. Ledvica

Uravnavanje telesnih tekočin in elektrolitov ter izločanje presnovnih produktov sta bistveni nalogi sečil za ohranjanje telesne homeostaze. Glavni del sečil predstavlja ledvica, kjer nastaja urin, ki nato odteka po sečnih izvodilih na prosto.

V ledvicah se odvijajo številni procesi: glomerulna filtracija, tubulna reabsorpcija in sekrecija, koncentriranje in razredčevanje seča, odstranjevanje kislin s sečem ter nastajanje in razgradnja hormonov kot so renin, angiotenzin II, prostaglandini, eritropoetin in 1,25 dihidroksi vitamin D3. Filtracija je selektivni prehod majhnih molekul, vode in ionov iz kapilarne strukture, imenovane glomerul v del nefrona, ki se imenuje Bowmanova kapsula (3).



Slika 2: Bowmanova kapsula (4)

Za oceno ledvičnega delovanja in spremljanje ledvične bolezni je najpomembnejša določitev glomerulne filtracije (GF). GF predstavlja izločevalno sposobnost ledvic, ki je sorazmerna masi delujočih nefronov. Če se GF zmanjša, sklepamo na pojav nefropatije ali na zmanjšanje ledvičnega pretoka (funkcijska ledvična okvara) (5).

Kronična ledvična bolezen (KLB) prizadane približno 10% populacije in je pogosto asimptomatična, dokler ni ledvična funkcija resno zmanjšana. Tudi blaga KLB je pomembna, saj predstavlja značilen rizični faktor za koronarno srčno bolezen. Z oceno stopnje glomerulne filtracije dobimo pomembno informacijo o funkcionalnem stanju ledvic preiskovanca. Pri ocenjevanju funkcije ledvic primerjamo preiskovančevo GF (glomerulno filtracijo) s klinično pomembno GF. Pri tem pa je potrebno upoštevati

faktorje, ki vplivajo na izmerjeno preiskovančevo GF (4). Obstaja kar nekaj metod za določanje GF:

1. Določanje očistka: klirens testi (očistek kreatina, inulina ali cistatina C)
2. Določanje koncentracije (sečnina, kreatinin, kreatin, sečna kislina, amoniak).

Danes se za izračun ocene glomerulne filtracije (oGF) priporoča uporaba formule MDRD, ki pa ima tudi določene omejitve. Rezultati dobljeni z MDRD formulo ne veljajo pri osebah mlajših od 18 let oziroma starejših od 75 let, pri osebah z močno spremenjeno mišično maso in osebah s specifično prehrano ali terapijo z določenimi zdravili.

Kreatinin v telesu nastaja kot presnovni produkt kreatina in kreatin fosfata v mišičnem tkivu. Njegova prisotnost v serumu je odvisna od telesne mase in je zato serumska koncentracija v stacionarnem stanju relativno stalna, vendar odvisna od spola in starosti. Ker se kreatinin nahaja tudi v beljakovinski hrani, tudi prehrana lahko vpliva na koncentracijo kreatinina v serumu. Kreatinin se v glomerulih prosto filtrira, v proksimalnih tubulih pa se izloča. Izločanje kreatinina je aktivno in se povečuje sorazmerno s porastom serumskega kreatinina, dokler transportni mehanizem ni zasičen. Izločanje kreatinina iz tubulov lahko očistek kreatinina poveča za 10 do 20 odstotkov. Poznamo tudi številna zdravila (trimetoprim, cimetidin, amilorid), ki zmanjšajo tubulno izločanje kreatinina, kar zviša vrednost serumskega kreatinina in zniža očistek kreatinina. Serumska koncentracija kreatinina je zato relativno slab pokazatelj ledvičnega delovanja v zgodnjih stopnjah kronične ledvične bolezni. Očistek kreatinina je sicer boljši pokazatelj GF kot serumska koncentracija kreatinina, vendar zahteva 24-urno zbiranje seča, ki pogosto ni zanesljivo (4,6).

Kreatinin določamo (4,6):

1. Z ALKALNIM PIKRATOM (Jaffejeva metoda): metoda je slabo specifična, ker mnoge endogene in eksogene snovi reagirajo s pikratom. Z različnimi postopki izvedbe, predvsem z optimiranjem kinetične meritve, lahko izboljšamo specifičnost metode.
2. ENCIMSKE METODE: so manj občutljive na interference kot Jaffejeve metode.
3. KROMATOGRFSKE METODE: so zelo specifične in občutljive metode (4,6).

1.3. Albuminurija

Albuminurija je pogost znanilec glomerulne bolezni, vendar jo lahko ugotovimo tudi pri zdravih osebah (25%) od katerih ima le majhen delež glomerulno bolezen. V ledvičnem telescu se zaradi selektivnosti glomerulne kapilarne stene filtrira minimalna količina beljakovin. Filtracija je odvisna od naboja in velikosti beljakovinskih molekul. Beljakovine so najpogostejše površinsko negativno nabite molekule, ki se odbijajo od negativno nabite glomerulne bazalne membrane (GBM) in od površine glomerulnih epitelnih in endotelni celic (1). Selektivnost za prehod beljakovin določa velikost špranje med nožicami podocitov glomerulne bazalne membrane. Spremembe naboja GBM z njeno poškodbo ali tudi brez nje sta najpogostejša vzroka glomerulne albuminurije. Najpogostejši imunološki vzroki so odlaganje imunskih kompleksov, spremembe v celični imunosti ali prisotnost posebnega cirkulirajočega dejavnika, ki povzroči prepustnost glomerulne stene za albumine in je najverjetneje povezan z genetsko pogojeno spremembo podocitov (5).

1.4. Bolezenska stanja, ki so povezana z albuminurijo

1.4.1. Diabetična nefropatija

Diabetična nefropatija je kronična specifična okvara ledvic pri sladkorni bolezni. Razvije se pri sladkorni bolezni tipa 1 in 2. Pri sladkorni bolezni tipa 1 je pogostejša, približno 20% vseh bolnikov ima diabetično nefropatijo različne stopnje. Prevalenca diabetične nefropatije je pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 2 nižja, okrog 15% (5). Za razvoj diabetične nefropatije so pomembne presnovne motnje v bazalni membrani in mezangiju glomerulov ter spremenjena znotrajledvična hemodinamika. Bistveni sestavni deli bazalne membrane in mezangija so kolagen, glikozaminoglikani, laminin in fibronektin. Pri sladkornih bolnikih sta zvečani glikacija in tvorba kolagena, upočasnjena pa je njegova razgradnja. Poleg tega je zmanjšana sinteza heparansulfata. Ti procesi povzročajo zadebelitev bazalne membrane glomerula in tubulov, kar je prvi znak nastajajoče diabetične nefropatije. Pomnoži se glomerulni mezangijski matriks. Na njegovo zvečano sintezo vplivajo hiperglikemija, povečana glomerulna filtracija in lokalni renin-angiotenzinski sistem. Zniža se število endotelijskih celic in podocitov. Zvečajo se pore in spremeni se naboj bazalne membrane. Posledica je večja prepustnost bazalne membrane za večje molekule, med drugim tudi za albumine. Zgodnji, prvi in zanesljiv znak diabetične nefropatije je zvečano in nenormalno izločanje albumina v urin (7,8).

1.4.2. Arterijska hipertenzija

Arterijska hipertenzija je zelo pogost spremljevalec kronične ledvične bolezni. Zvišan krvni tlak je eden od značilnih kliničnih znakov pri bolnikih z akutnom nefritičnim sindromom, s sindromom hitro napredujočega glomerulonefritisa ter kroničnim glomerulonefritsom. Osemdeset do sto odstotkov bolnikov z napredovalo kronično ledvično insuficienco ima zvišan krvni tlak. Zvišanje krvnega tlaka je lahko prvi znak neprepoznane kronične ledvične bolezni ali kazalec na napredovanje že znane ledvične bolezni. Zdravljenje arterijske hipertenzije bistveno zavre napredovanje diabetične nefropatije (5).

1.4.3. Sladkorna bolezen in arterijska hipertenzija

Arterijska hipertenzija je ena najpogostejših bolezni, katere posledica sta zvečana kardiovaskularna obolevnost in umrljivost. Sladkorna bolezen je drug pomemben dejavnik z enakimi zapleti. Zvišan krvni tlak pri bolniku s sladkorno boleznijo najdemo približno dvainpolkrat pogosteje kot pri zdravih ljudeh. Pri sladkorni bolezni tipa 1 je hipertenzija običajno povezana z razvojem diabetične nefropatije. Zvišan krvni tlak se pojavi skupaj s pojavom mikroalbuminurije ali pred njo in korelira s stopnjo zniževanja ledvične funkcije. Pri sladkorni bolezni tipa 2 je za razvoj arterijske hipertenzije pomembnih več dejavnikov: hiperinsulinemija in odpornost proti insulinu, debelost, starost, homeostaza natrija in stanje ledvične funkcije. Zdravljenje zvišanega krvnega tlaka in sladkorne bolezni pomembno prispeva k znižanju zbolewnosti in smrtnosti zaradi kardiovaskularnih zapletov. Ciljni krvni tlak pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 1 in z mikroalbuminurijo ali proteinurijo je pod 120/80 mmHg (5).

1.4.4. Nefrotski sindrom

Za nefrotski sindrom so značilni štirje simptomi: obsežna proteinurija, hipoalbuminemija, hiperlipidemija in generalizirani edemi. Vzroki, ki pripeljejo do nefrotskega sindroma so lahko nekatere primarne ledvične bolezni (glomerulonefritis), delovanje nefrotoksinov, sistemske bolezni, ki prizadanejo glomerule ali nepravilna cirkulacija v ledvičnih venah. V klinični sliki prevladuje edem, ki prizadane rahlo vezivo po celem telesu. Zdravljenje nefrotskega sindroma je zdravljenje osnovne bolezni (diabetične nefropatije, sistemskega

lupusa eritematodesa). Pri veliki večini bolnikov z nefrotskim sindromom izboljšamo počutje in odpravimo edeme s simptomatskim zdravljenjem (7,8).

1.5. Albumin v laboratorijski diagnostiki

Koncentracijo albuminov v urinu določamo najpogosteje kot pomoč pri izključevanju ledvične bolezni in pri boleznih srca in ožilja. Razvoj metod za določanje koncentracije albuminov v urinu je šel od kolorimetričnih metod (reagenčni trak), preko encimskih imunoabsorpcijskih metod (ELISA) do avtomatiziranih metod (turbidimetrija, nefelometrija) (1).

1.5.1. Reagenčni trak

Ta metoda je občutljivejša za albumin kot za druge proteine. Vendar pa ta metoda ni dokaz za albuminurijo, saj lahko pride do lažno pozitivnih vrednosti (koncentriran urin) in lažno negativnih vrednosti (razredčen urin) (8).

PRINCIP MERJENJA:

Trak vsebuje na določenem polju pH indikator, ki je vgrajen v pufer s pH vrednostjo 3. V stiku z urinom, ki vsebuje proteine, se indikator veže na NH_3 skupine proteinov. S tem molekula indikatorja spremeni ionsko obliko in hkrati tudi barvo. Koncentracija proteinov je sorazmerna z intenziteto nastale barve indikatorja (1).

1.5.2. Imunoturbidimetrična metoda

Danes se za določanje albuminov v urinu uporabljajo hitre in občutljive imunometrične metode, med katerimi je tudi turbidimetrija. S turbidimetrom merimo izgubo jakosti svetlobe pri prehodu skozi moten vzorec, kjer se svetloba razprši in iz te sledi izračun absorbance.

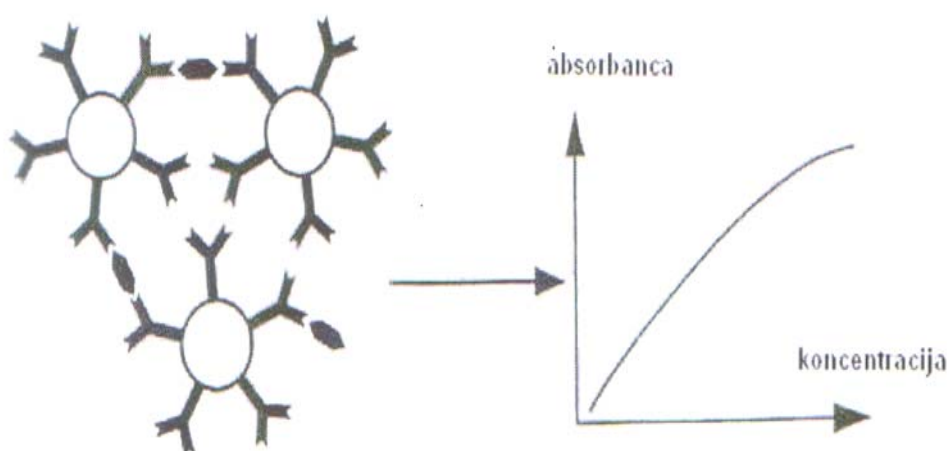
PRINCIP MERJENJA:

Vzorcu dodamo pufer, nato še protitelesa proti albuminu. Če je v vzorcu albumin se tvorijo antigen protitelo kompleksi, ki jih po aglutinaciji merimo turbidimetrično (9).



Antigen (albumin v vzorcu)

protitelesa proti albuminu



Turbidimetrična meritev

Kompleks antigen - protitelo

Slika 3: Princip turbidimetričnega določanja albuminov (9)

1.5.3. Imunonefelometrična metoda

Nefelometrija je najbolj pogosto uporabljana metoda za določanje proteinov v urinu, serumu in drugih telesnih tekočinah. Je tudi ena izmed najbolj točnih metod.

PRINCIP:

Vzorcu dodamo protitelesa proti albuminu, ki tvorijo komplekse z albumini v vzorcu. Nato skozi vzorec pošljemo snop monokromatske svetlobe in merimo intenzivnost sipane svetlobe. Intenziteta sipane svetlobe je sorazmerna koncentraciji albuminov v vzorcu (10).

1.5.4. Biooznačevalci

Že dolgo znani urinski biooznačevalci kot so visokomolekulski proteini in tubulni proteini ali encimi niso bili dovolj specifični in prihajalo je do pomanjkanja ustreznih standardov. S pomočjo inovativnih tehnologij kot so funkcionalna genomika in proteomika je odkritih nekaj novih genov in genskih produktov, ki se uporabljajo kot biooznačevalci pri akutni ledvični bolezni (11).

Najnovejše raziskave pri akutni ledvični bolezni so odkrile številne biooznačevalce (11):

1. NGAL (nevtrofilna gelatinaza povezana z lipokalinom): raziskave na živalih so pokazale NGAL kot protein in hiter diagnostični biomarker, ki ga je zelo enostavno določiti v urinu takoj po akutni ledvični bolezni.
2. KIM-1 (molekula za odkritje ledvične okvare): pri raziskavah na živalih je KIM-1 eden najbolj zvišanih proteinov v ledvicah po akutni ledvični bolezni in zelo enostavno ga je detektirati (ELISA).
3. IL-18 (molekula interleukina 18) je eden od vnetnih citokinov, ki ga najdemo v proksimalnem tubulu in zelo enostavno ga je detektirati.

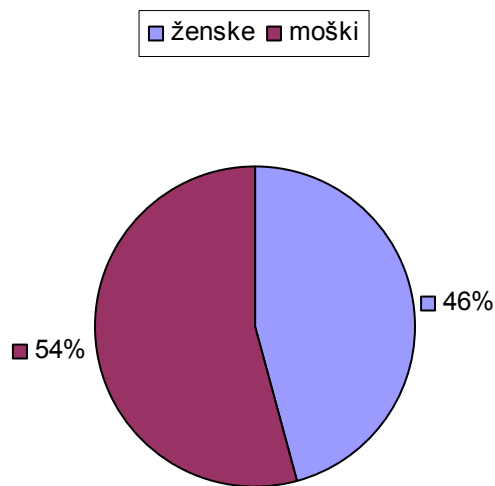
2. NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je ugotoviti skladnost ali neskladnost rezultatov meritev koncentracije albumina v urinu z dvema različnima rutinskima metodama. Na izbrani populaciji diabetičnih bolnikov (120) bomo v urinu določali koncentracijo albumina vzporedno z dvema različnima metodama na dveh različnih analizatorjih. Uporabili bomo turbidimetrično in nefelometrično metodo in skušali dokazati ujemanje rezultatov, saj je to pomembno pri primerjavi izvidov, pridobljenih z navedenimi metodami ali ob zamenjavi metode v laboratoriju.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Vzorci

V študiji smo določali koncentracijo albumina v urinu pri 120 diabetičnih bolnikih, od katerih je bilo 55 žensk in 65 moških. Vzorci so bili poslani v laboratorij iz ambulate diabetes Splošne bolnišnice Novo mesto. Vsakemu vzorcu urina smo določili koncentracijo albumina vzporedno na dveh analizatorjih in primerjali rezultate meritev.



Slika 4: Delež delitev sodelujočih v študiji glede na spol

3.2 Reagenti

3.2.1. Reagenti za delo na analizatorju Hitachi 912

Za določanje koncentracije albuminov smo uporabljali tovarniško pripravljen reagent Tina-quant albumin, ki je sestavljen iz:

- R1: pufer (TRIS pufer * : 50 mmol / L, pH 8,0; PEG: 4,2%; EDTA: 3,7 g / L; prezervativ)
- R2: Anti-albumin protitelesa (TRIS pufer * : 100 mmol / L; pH 7,2; prezervativ)
- Poliklonalna anti-humana albumin protitelesa (ovčja): odvisno od titra.
- 3a-e Kalibratorji: Albumini (humani); fosfatni pufer 50mmol / L; pH 8,0; prezervativ

- TRIS = Tris (hidroksimetil) aminometan

Reagent R1, R2 in kalibratorji (stekleničke 3a-3e) so že pripravljene za uporabo. Reagent R1 in R2 sta po odprtju stabilna 90 dni, če jih imamo v ohlajenem delu analizatorja. Kalibratorji (3a-e) so po odprtju stabilni 28 dni, hranimo jih pri 2-8 °C zaradi zaščite pred bakterijsko kontaminacijo (9).

3.2.2. Reagenti za delo na analizatorju BN ProSpec

Za merjenje koncentracije albuminov v urinu smo uporabljali tovarniško pripravljene reagente:

- N Protein Standard SL (human), Code No. OQIM
- N/T Protein Control LC (human), Code No. OQLW
- N Reaction Buffer, Code No. OUMS
- N Diluent, Code No. OUMT

Reagenti morajo imeti sobno temperaturo (15 – 25°C), preden jih prvič uporabimo na analizatorju (10).

3.3. Oprema

Za določanje koncentracije albumina v urinu smo uporabljali: spektrofotometrični analizator Hitachi 912, proizvajalca ROCHE (Nemčija); nefelometrični analizator BN ProSpec, proizvajalca SIEMENS (Nemčija); epruvete, merilne pipete, čaše.

Analizator Hitachi 912 (slika 5) je spektrofotometer, ki omogoča merjenje absorbance pri 12 valovnih dolžinah, in sicer med 340 in 800 nm. Spektrofotometrično lahko določamo številne analite, ki dajejo v končni reakciji obarvan produkt. Za merjenje se uporabljajo tekoči reagenti, ki so že tovarniško pripravljene in takoj uporabni za delo. Absorbanco obarvanega produkta merimo s fotometrom pri določeni valovni dolžini. Intenzivnost barve je sorazmerna količini merjenega analita v vzorcu. Z analizatorjem HITACHI 912 pa je možna tudi detekcija motnosti, ki je osnova turbidimetričnih metod. Večja kot je motnost, manj je prepuščene svetlobe, izmerjena absorbanca pa je premosorazmerna koncentraciji analita v vzorcu. Analizator ima dve ohlajeni mesti za skladiščenje reagentov, termostabilno vodno kopel pri 37 °C in krožnik za odlaganje vzorcev, ki ima 20 urgentnih in 50 rutinskih položajev za kivete z vzorci. Analizator sprejema naše ukaze

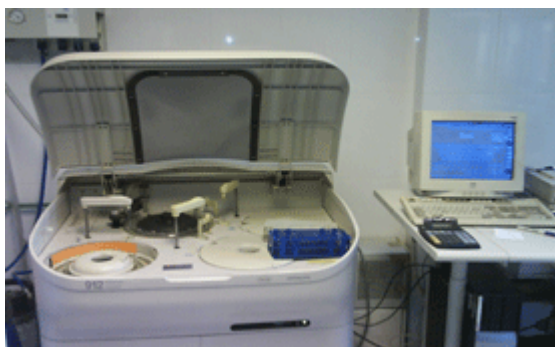
preko računalnika, na katerem lahko izberemo kalibracijo, kontrolo, postopke vzdrževanja in vrsto preiskave.

3.4. Postopki

3.4.1. Postopek za delo z analizatorjem Hitachi 912

Koncentracijo albuminov v vzorcu smo izmerili s turbidimetrično metodo. Vzorce v čašicah smo vstavili na krožnik, na računalniku pa smo izbrali preiskavo albumini in začeli z analizo. Pipetor je vsrkal predpisano količino urina-vzorca in ga prenesel v merilno celico, drugi pipetor je dodal reagent. Po določenem času inkubacije je poteklo turbidimetrično merjenje. Po koncu preiskave se je rezultat izpisal na ekranu računalnika.

Referenčna vrednost oziroma mejna vrednost za koncentracijo albuminov je do 30 mg/L.



Slika 5: Spektrofotometer HITACHI 912 (12)

3.4.2. Postopek za delo z analizatorjem BN ProSpec

Analizator BN ProSpec (slika 6) sprejema naše ukaze preko računalnika, na katerem lahko izberemo kontrolo, proces vzdrževanja ali pa vrsto preiskave. Koncentracijo albuminov v vzorcu smo izmerili z nefelometrično metodo. Vzorce v kivetah smo najprej vpisali v računalnik in jih po vrsti vstavili v krožnik. Na računalniku smo izbrali preiskavo albumin in pričeli z analizo. Albumini v vzorcu dajo s specifičnimi protitelesi imunske komplekse. Del svetlobe gre skozi komplekse, del pa se odbije. Intenziteta odbite svetlobe je proporcionalna koncentraciji albuminov v vzorcu. Po določenem času inkubacije je poteklo nefelometrično merjenje. Če je koncentracija visoka, analizator avtomatsko redči vzorec in po končanem protokolu se rezultati izpišejo na ekran računalnika.

Referenčna vrednost za koncentracijo albuminov je do 30 mg/L.



Slika 6: Analizator BN ProSpec (13)

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

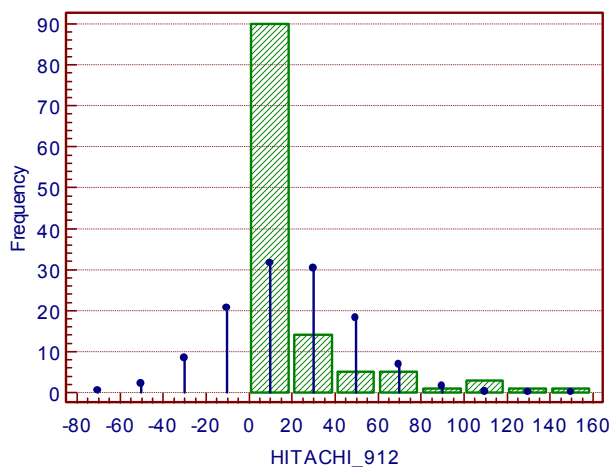
4.1. Rezultati

Vzporedno smo določili koncentracijo albumina v 120 vzorcih urina na obeh analizatorjih (preglednica I v prilogi). Rezultati na spektrofotometru so se gibali od 0 do 145,5 mg/l, povprečna vrednost je znašala 18,35 mg/L. Na nefelometru so bili rezultati od 2,09 do 155,0 mg/L s povprečno vrednostjo 23,69 mg/L, torej so bile koncentracije z nefelometrično metodo višje in sicer v povprečju za 29,1%.

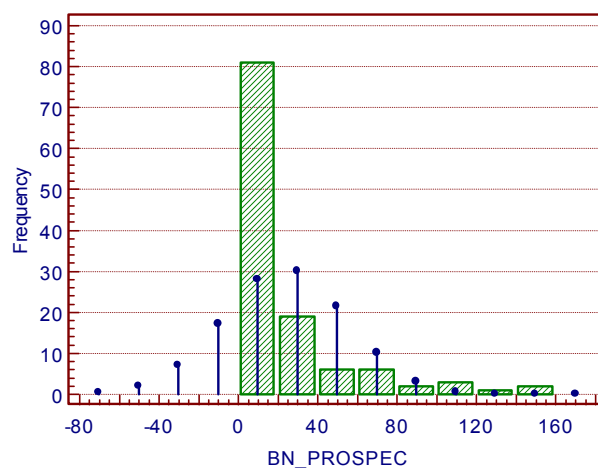
	HITACHI 912	BN ProSpec
najnižja vrednost	0	2,09
najvišja vrednost	145,5	155
aritmetična sredina	18,35	23,69
mediana	7,55	12,5

Primerjava rezultatov v nizkem merilnem območju od 0 do 10 mg/L je pokazala, da je v 20 primerih (6%) spektrofotometrična meritev znašala 0 mg/L, medtem ko so bili pri nefelometrični metodi ti rezultati v območju od 2,09 do 5,98 mg/L. Ta razlika pa ni statistično značilna, saj je izračun Wilcoxonovega neparnega testa pokazal, da je $p = 0,1641$. Na statistično značilno razliko sklepamo, ko je $p < 0,05$.

Sliki 7 in 8 prikazujeta frekvenco porazdelitve rezultatov izmerjenih koncentracij albumina v urinu na posameznem analizatorju. Na obeh analizatorjih je bila večina rezultatov v območju od 0 do 20 mg/L.



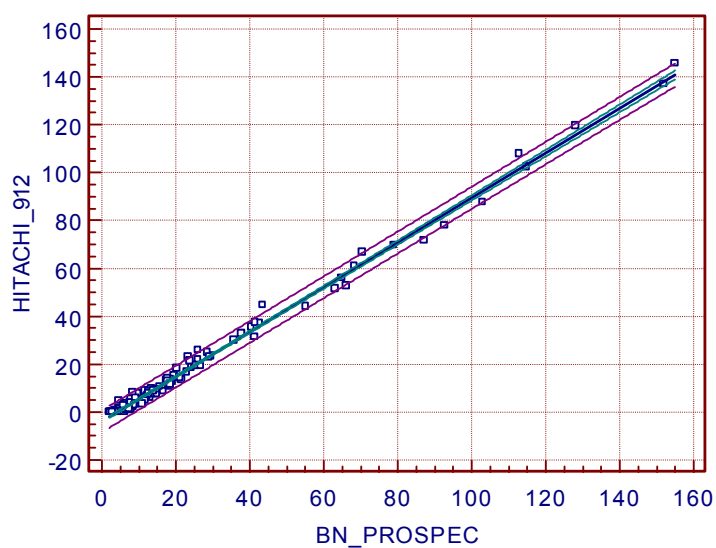
Slika 7: Frekvenca porazdelitve koncentracij albumina na analizatorju Hitachi 912



Slika 8: Frekvenca porazdelitve koncentracij albumina na analizatorju BN ProSpec

Izračunali smo enačbo regresijske premice in korelacijski koeficient. Na sliki 9 je diagram regresijske premice z upoštevanjem 95% meje zaupanja in 95% napovedne vrednosti.

Enačba premice: $y = -3,7764 + 0,9338 x$. Korelacija obeh metod je dobra, saj je korelacijski koeficient $r = 0,9969$.



Slika 9: Regresijska premica in 95% napovedna vrednost ter 95% meja zaupanja parnih rezultatov za 120 vzorcev, izmerjenih na analizatorju Hitachi 912 in BN ProSpec (mg/L)

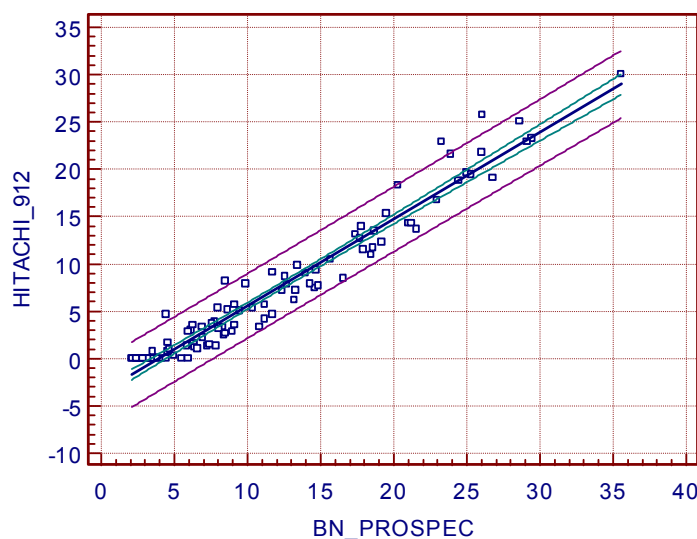
4.2. Rezultati z upoštevanjem zgornje referenčne vrednosti 30 mg/L

Izbrali smo rezultate, ki so bili pod prazno vrednostjo, določeni na posameznem analizatorju, in jih primerjali z vzporednimi rezultati iz drugega analizatorja. Zanimalo nas je ujemanje rezultatov na obeh analizatorjih, če upoštevamo zgornjo mejo referenčne vrednosti 30 mg/L (preglednica II in III v prilogi).

Najprej smo upoštevali prazno vrednost za analizator Hitachi in pregledali rezultate vzporednih meritev na nefelometru, nato pa še obratno. Ugotovili smo, da je na spektrofotometričnem analizatorju Hitachi 98 meritev pod vrednostjo 30 mg/L, na nefelometričnem analizatorju BN ProSpec pa 96 meritev v istih vzorcih. Torej je zabeleženo neujemanje pri dveh rezultatih, ki sta na nefelometru že nad mejno vrednostjo.

Izračunali smo enačbo regresijske premice in korelacijski koeficient. Na sliki 10 je diagram regresijske premice z upoštevanjem 95% meje zaupanja in 95% napovedne vrednosti parnih rezultatov za vzorce, ki so bili na Hitachiju izmerjeni pod zgornjo referenčno vrednostjo 30 mg/L.

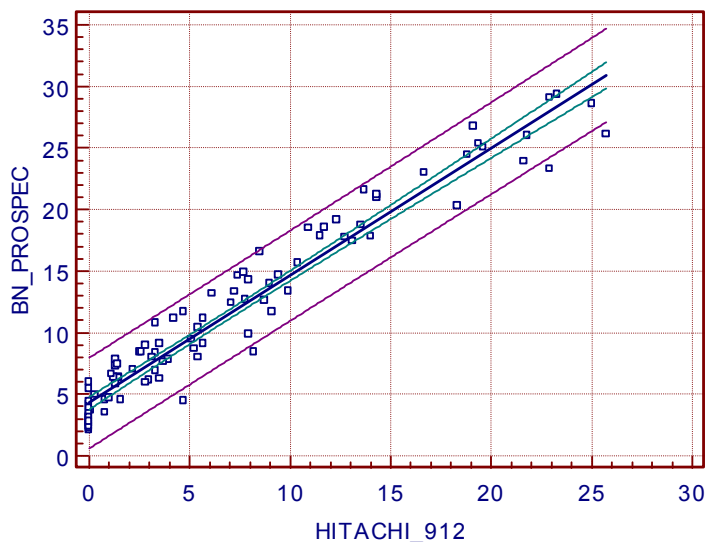
Enačba premice: $y = -3,5670 + 0,9161 x$. Korelacija obeh metod je dobra, saj je korelacijski koeficient $r = 0,9737$.



Slika 10: Regresijska premica in 95% napovedna vrednost ter 95% meja zaupanja parnih rezultatov za 98 vzorcev z upoštevanjem zgornje referenčne vrednosti 30 mg/L na analizatorju Hitachi

Na sliki 11 je diagram regresijske premice z upoštevanjem 95% meje zaupanja in 95% napovedne vrednosti parnih rezultatov za vzorce, ki so bili na analizatorju BN ProSpec pod zgornjo referenčno vrednostjo 30 mg/L.

Enačba premice: $y = 4,3029 + 1,0349 x$. Korelacija obeh metod je dobra, saj je korelacijski koeficient $r = 0,9706$.



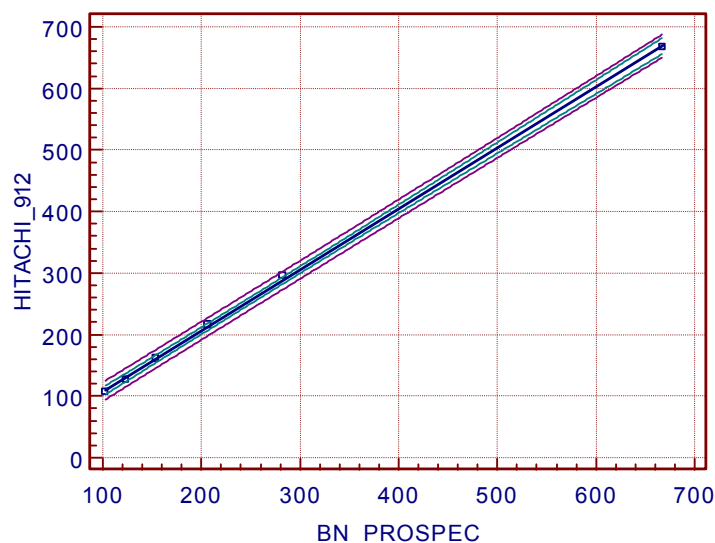
Slika 11: Regresijska premica in 95% napovedna vrednost ter 95% meja zaupanja parnih rezultatov za 96 vzorcev z upoštevanjem zgornje referenčne vrednosti 30 mg/L na analizatorju BN ProSpec

4.3. Korelacija linearnosti izmerjenega signala med metodama

Želeli smo ugotoviti ujemanje linearnosti izmerjenega signala na obeh analizatorjih, zato smo izbrali vzorec urina z visoko vrednostjo albumina in ga redčili do titra 1 : 5. V vseh vzorcih smo izvedli vzporedne določitve. Rezultati so zbrani v preglednici IV (v prilogi). Rezultati so pokazali, da so vrednosti na analizatorju BN ProSpec v povprečju višje za 3,4%.

Izračunali smo enačbo regresijske premice in korelacijski koeficient. Na sliki 12 je diagram regresijske premice z upoštevanjem 95% meje zaupanja in 95% napovedne vrednosti parnih rezultatov za 6 vzorcev, izmerjenih na analizatorju Hitachi 912 in BN ProSpec.

Enačba premice: $y = 8,5722 + 0,9905 x$. Korelacija obeh metod je odlična, saj je korelacijski koeficient $r = 0,9998$



Slika 12: Regresijska premica in 95% napovedna vrednost ter 95% meja zaupanja parnih rezultatov za 6 vzorcev, izmerjenih na analizatorju Hitachi 912 in BN ProSpec (mg/L)

Pri pregledu rezultatov vzporednih določitev, ki so bili na spektrofotometru 0 mg/L, smo ugotovili, da so se na nefelometru gibal od 2,09 do 5,98 (povprečna vrednost 3,34 mg/L) (preglednica V glej v prilogi). To pa je nekako pričakovano, saj smo že z zgornjimi rezultati ugotovili, da so vrednosti, izmerjene na nefelometru, višje kot na spektrofotometru. Morda je nefelometrična metoda nekoliko občutljivejša.

Določitev mikroalbuminurije je pomemben diagnostični kriterij pri diabetični nefropatiji. 30-40% bolnikov s sladkorno boleznijo tipa I, po nekaterih podatkih celo 80%, razvije diabetično nefropatijo, medtem ko je pri tipu II verjetnost za pojav mikroalbuminurije in nadaljni razvoj diabetične nefropatije le 25%.

Albumin je označevalni protein za določitev diabetične nefropatije. Z zgodnjim odkritjem diabetične nefropatije lahko z pravilno terapijo še vedno preprečimo postopno izgubo ledvične funkcije (1).

Mikro in makroalbuminurija se razlikujeta glede na količino albumina, ki se izloči v urin. Testni lističi niso primerni za ugotavljanje mikroalbuminurije, ker imajo nizko analizo občutljivost. Mikroalbuminurijo lahko detektiramo z uporabo analizo visoko občutljivih

hitrih testov ali z imunokemičnimi testi. Mikroalbuminurija je najzanesljivejši znak za motnje v delovanju glomerulne filtracije.

Tehnološki razvoj laboratorijske opreme in vse bolj občutljivih laboratorijskih diagnostičnih metod zelo dobro sledi razvoju drugih diagnostičnih pripomočkov za odkrivanje različnih bolezenskih stanj, ki so danes v porastu. Z uporabo imunoloških tehnik (specifična protitelesa) lahko hitro, učinkovito in zanesljivo odkrijemo patološko dogajanje v telesu. Tudi pri naši nalogi smo uporabljali sodobni imunokemični metodi (turbidimetrija, nefelometrija) za merjenje koncentracije albumina v urinu z uporabo občutljivejših reagentov.

V nalogi je bilo zajetih 120 bolnikov, katerih vzorce smo prejeli v laboratorij iz ambulate za diabetes Splošne bolnišnice Novo mesto. Ker so bili vsi bolniki diabetiki, ni bilo potrebno spremljati povezave med diagnozo bolnika in koncentracijo albumina v urinu, ampak smo primerjali rezultate paralelnih meritev dobljenih na dveh različnih analizatorjih (iz istih vzorcev urina). Vsak vzorec, ki smo ga prejeli v laboratorij z namenom, da izmerimo koncentracijo albumina v svežem jutranjem urinu, smo analizirali paralelno na analizatorju Hitachi 912 ter na analizatorju BN ProSpec.

Rezultati primerjav koncentracije albumina so pokazali, da je koncentracija na nefelometričnem analizatorju BN ProSpec višja kot na spektrofotometričnem analizatorju Hitachi 912. Rezultati na nefelometru so v povprečju višji za 29,12%.

Korelacija rezultatov obeh metod je zelo dobra, saj je korelacijski koeficient $r = 0,9969$ (za vseh 120 meritev). Ko smo primerjali samo rezultate z upoštevanjem prazne vrednosti (30 mg/L) za Hitachi 912 in BN ProSpec, smo ugotovili, da se 96 vzoprno izmerjenih rezultatov ujema, pri dveh rezultatih pa je spektrofotometer odčital ta dva rezultata pod mejno vrednostjo, medtem ko sta bili ti dve vrednosti pri nefelometrični metodi že v patološkem območju.

Rezultati vzporednih meritev pri visokih koncentracijah so pokazali, da sta obe metodi zelo natančni. Dokaz zato je določitev koncentracije albumina v različnih titrih, ki smo jih sami pripravili iz urina z visoko koncentracijo albumina. Izračun korelacijskega koeficienta za te

meritve je bil skoraj 1 ($r = 0,9998$), torej je ujemanje obeh metod glede linearnosti izmerjenega signala odlično.

20 rezultatov (6%) s koncentracijo 0 mg/L, določenih na spektrofotometru, je z nefelometrično metodo imelo vrednosti med 2,09 in 5,98 mg/L. Rezultati v tem območju na postavitev diagnoze nimajo vpliva, ker je to v območju znotraj referenčnih vrednosti, vendar pa razlika 29,1% ni zanemarljiva, ko govorimo o vrednostih, ki so na zgornji meji referenčnega območja. Neujemanje rezultatov je morda lahko posledica različne sestave reagentov (uporaba poliklonskih oziroma specifičnih protiteles).

Seveda postavljanje diagnoze diabetične nefropatije ne temelji le na enkratni določitvi koncentracije albumina v svežem urinu, temveč je potrebno potrditev vsaj z dvema ali tremi neodvisnimi preiskavami v obdobju 6 mesecev. Upoštevati je potrebno tudi druge vzroke ledvičnih bolezni, kot so infekcije urinarnega trakta, tubulne poškodbe, biološki faktorji kot je fizična aktivnost, sistemske infekcije, slabo spremljanje glukoze v krvi, hipertenzija in srčne poškodbe (1).

5. ZAKLJUČEK

Namen naše naloge je bil ugotoviti skladnost ali neskladnost rezultatov meritev koncentracij albumina v urinu z dvema različnima rutinskima metodama. Na izbrani populaciji diabetičnih bolnikov (120) smo v urinu določali koncentracijo albumina vzporedno z dvema različnima metodama na dveh različnih analizatorjih.

Ugotovili smo, da pri vseh 120 bolnikih metodi zelo dobro korelirata, saj je korelacijski koeficient dober ($r = 0,9969$). Koncentracija na nefelometru je bila v povprečju za 29,1% višja kot na spektrofotometru. Ta razlika pa ni statistično značilna, saj je izračun Wilcoxonovega neparnega testa pokazal, da je $p = 0,1641$. Statistična razlika bi bila, če bi bil $p < 0,05$.

Primerjava rezultatov vzporednih določitev z upoštevanjem prazne vrednosti 30 mg/L je pokazala neujemanje pri dveh rezultatih. S turbidimetrično metodo na spektrofotometru smo določili oba rezultata pod mejno vrednostjo, medtem ko sta bili vrednosti z nefelometrično metodo že v patološkem območju.

Pri redčenju vzorca (do titra 1 : 5) z visoko koncentracijo albumina se je izkazalo, da sta obe metodi v višjih območjih zelo natančni, saj je korelacijski koeficient $r = 0,9998$.

Vzporedne meritve, ki so bile s spektrofotometrično metodo 0 mg/L, so z nefelometrično metodo dale rezultate v območju od 2,09 do 5,98 mg/L. Rezultati v tem območju na postavitev diagnoze nimajo vpliva, ker je to v območju znotraj referenčnih vrednosti. Vzroki za neujemanje pa so lahko v različni sestavi reagentov.

6. LITERATURA

1. Boege F. Urinary proteins. V: Thomas L. Clinical Laboratory Diagnostics: Use and Assesment of Clinical Laboratory Results. 1st ed. Frankfurt / Main: TH – Books – Verl. – Ges., Germany; 1998. 382 – 400.
2. Albumin – Wikipedija, prosta enciklopedija: <http://sl.wikipedia.org/wiki/Albumin> (5.4.2009)
3. Kidney disease Outcome Quality Initiative. K/DOQ/clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evulation, classification, and stratification Am J Kidney Dis 2002; 39: S1 - S246
4. Hojs R, Bevc S, Ekart R Ocena glomerulne filtracije – primerjava serumskega kreatinina, serumskega cistatina in enačb za izračun očistka kreatinina, Zdrav vestn 2006; 75: 255 – 62
5. Lindič J Kveder R. Bolezni ledvic. V: Kocjančič A, Mravlje F, Štajer D: Interna medicina, 3. Izdaja; Ljubljana 2005, 936 – 945
6. Stevens LA, Levey AS Clinical implications for estimating equations for GFR. Ann Intern Med 2004; 141: 959 – 61
7. Dvornik Š. Bolesti bubrega. V: Topič E, Primorac D, Jankovič S: Medicinskobiokemijska dijagnostika u kliničkoj praksi, Medicinska naklada Zagreb, 2004; 74 – 84
8. Boright AP, Paterson AD, Mirea L Genetic variation at the ACE gene is associated with persistent microalbuminuria and severe nephropathy in type 1 diabetes: the DCCT/EDIC Genetics Study. Diabetes 2005; 54:1238 – 44
9. Multicenter study of Tina quant Albumin in urine. Workshop Munich, November 29 – 30, 1990. Wien klin Wschr. 1991;103, Supplement 189:1 – 6

10. Priložena navodila: Navodila za delo z BN ProSpec analizatorjem, Dade Behring, 2006
11. Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a new marker of kidney disease. Scand J Clin Lab Invest Suppl 2008; 241: 89 – 94
12. Roche/Hitachi 912 System from Roche Diagnostics – Clinical: <http://www.medcompare.com/details/16557/RocheHitachi-912-System.html> (7.7.2009)
13. BN Pro Spec System from Siemens Healthcare Diagnostics – Clinical: <http://www.medcompare.com/details/32266/BN-ProSpec-System.html> (7.7.2009)

PRILOGA

Preglednica I: Rezultati določitev koncentracije albumina v urinu na obeh analizatorjih

ZAPOREDNA ŠTEVILKA	HITACHI 912 mg/L	BN ProSpec mg/L
1	9,1	11,7
2	18,8	24,4
3	0	3,02
4	0	2,09
5	16,7	23
6	3,9	7,8
7	87,5	103
8	22,9	23,3
9	0,1	3,65
10	0	2,91
11	13,7	21,6
12	19,6	25
13	32,9	38,1
14	31,1	41,3
15	5,2	8,65
16	52,6	66,2
17	19,4	25,3
18	66,7	70,3
19	0,8	3,52
20	4,7	4,46
21	23,3	29,4
22	9,9	13,4
23	5,4	10,4
24	21,6	23,9
25	7,2	13,3
26	1,3	5,89
27	102,3	115
28	7,4	14,6
29	44,5	43,6
30	51,8	63
31	15,3	19,5
32	2,5	8,42
33	5,7	11,2
34	2,6	8,45
35	77,7	92,7
36	8,5	16,6
37	1,3	7,84
38	10,9	18,5
39	4,2	11,2
40	35,5	40,5
41	6,1	13,2

42	7,1	12,4
43	32,7	37,8
44	1,5	6,42
45	11,5	17,9
46	8,7	12,6
47	7,9	14,3
48	1,5	6,35
49	7,8	12,7
50	13,5	18,7
51	37,2	42,7
52	12,3	19,2
53	0	4,16
54	7,9	9,86
55	119,7	128
56	3,5	9,11
57	14,3	21
58	0	2,17
59	8,2	8,48
60	7,7	14,9
61	10,4	15,7
62	30	35,6
63	1,2	6,41
64	71,4	87,1
65	19,1	26,8
66	69,6	79,1
67	5,1	9,47
68	21,8	26
69	25,7	26,1
70	13,1	17,4
71	0,8	4,56
72	61	68,3
73	0	5,48
74	14,3	21,2
75	37,6	41,6
76	0	4,43
77	9,4	14,7
78	14	17,8
79	1,6	4,54
80	1	4,7
81	0	2,6
82	56	64,7
83	0,3	4,98
84	12,7	17,7
85	0	2,46
86	0	3,16
87	0	3,34
88	3,3	6,89
89	2,2	6,99
90	9	14
91	5,4	7,96
92	0	3,56

93	5,7	9,12
94	3,3	8,38
95	3,1	8,02
96	3	6,14
97	3,7	7,58
98	18,3	20,3
99	136,9	152
100	25	28,6
101	0	3,85
102	2,8	8,98
103	0	3,14
104	3,5	6,27
105	44,2	55,1
106	145,5	155
107	0	5,98
108	4,7	11,7
109	1,1	6,59
110	22,9	29,1
111	1,3	7,27
112	0	2,55
113	0	2,68
114	1,4	7,42
115	0	2,38
116	2,8	5,93
117	0	2,82
118	108	113
119	3,3	10,8
120	11,7	18,6
n = 120	18,35 ± 28,68	23,69 ± 30,61

Preglednica II: Primerjava rezultatov z upoštevanjem prazne vrednosti na spektrofotometru

ZAPOREDNA ŠTEVILKA	HITACHI 912 mg/L	BN ProSpec mg/L
1	9,1	11,7
2	18,8	24,4
3	0	3,02
4	0	2,09
5	16,7	23
6	3,9	7,8
7	22,9	23,3
8	0,1	3,65
9	0	2,91
10	13,7	21,6
11	19,6	25
12	5,2	8,65
13	19,4	25,3
14	0,8	3,52
15	4,7	4,46
16	23,3	29,4
17	9,9	13,4
18	5,4	10,4
19	21,6	23,9
20	7,2	13,3
21	1,3	5,89
22	7,4	14,6
23	15,3	19,5
24	2,5	8,42
25	5,7	11,2
26	2,6	8,45
27	8,5	16,6
28	1,3	7,84
29	10,9	18,5
30	4,2	11,2
31	6,1	13,2
32	7,1	12,4
33	1,5	6,42
34	11,5	17,9
35	8,7	12,6
36	7,9	14,3
37	1,5	6,35
38	7,8	12,7
39	13,5	18,7
40	12,3	19,2
41	0	4,16
42	7,9	9,86

43	3,5	9,11
44	14,3	21
45	0	2,17
46	8,2	8,48
47	7,7	14,9
48	10,4	15,7
49	30	35,6
50	1,2	6,41
51	19,1	26,8
52	5,1	9,47
53	21,8	26
54	25,7	26,1
55	13,1	17,4
56	0,8	4,56
57	0	5,48
58	14,3	21,2
59	0	4,43
60	9,4	14,7
61	14	17,8
62	1,6	4,54
63	1	4,7
64	0	2,6
65	0,3	4,98
66	12,7	17,7
67	0	2,46
68	0	3,16
69	0	3,34
70	3,3	6,89
71	2,2	6,99
72	9	14
73	5,4	7,96
74	0	3,56
75	5,7	9,12
76	3,3	8,38
77	3,1	8,02
78	3	6,14
79	3,7	7,58
80	18,3	20,3
81	25	28,6
82	0	3,85
83	2,8	8,98
84	0	3,14
85	3,5	6,27
86	0	5,98
87	4,7	11,7
88	1,1	6,59
89	22,9	29,1
90	1,3	7,27
91	0	2,55

92	0	2,68
93	1,4	7,42
94	0	2,38
95	2,8	5,93
96	0	2,82
97	3,3	10,8
98	11,7	18,6

Preglednica III: Rezultati z upoštevanjem prazne vrednosti na nefelometru

ZAPOREDNA ŠTEVILKA	BN ProSpec mg/L	HITACHI 912 mg/L
1	11,7	9,1
2	24,4	18,8
3	3,02	0
4	2,09	0
5	23	16,7
6	7,8	3,9
7	23,3	22,9
8	3,65	0,1
9	2,91	0
10	21,6	13,7
11	25	19,6
12	8,65	5,2
13	25,3	19,4
14	3,52	0,8
15	4,46	4,7
16	29,4	23,3
17	13,4	9,9
18	10,4	5,4
19	23,9	21,6
20	13,3	7,2
21	5,89	1,3
22	14,6	7,4
23	8,42	2,5
24	11,2	5,7
25	8,45	2,6
26	16,6	8,5
27	7,84	1,3
28	18,5	10,9
29	11,2	4,2
30	13,2	6,1
31	12,4	7,1
32	6,42	1,5
33	17,9	11,5
34	12,6	8,7

35	14,3	7,9
36	6,35	1,5
37	12,7	7,8
38	18,7	13,5
39	19,2	12,3
40	4,16	0
41	9,86	7,9
42	9,11	3,5
43	21	14,3
44	2,17	0
45	8,48	8,2
46	14,9	7,7
47	15,7	10,4
48	6,41	1,2
49	26,8	19,1
50	9,47	5,1
51	26	21,8
52	26,1	25,7
53	17,4	13,1
54	4,56	0,8
55	5,48	0
56	21,2	14,3
57	4,43	0
58	14,7	9,4
59	17,8	14
60	4,54	1,6
61	4,7	1
62	2,6	0
63	4,98	0,3
64	17,7	12,7
65	2,46	0
66	3,16	0
67	3,34	0
68	6,89	3,3
69	6,99	2,2
70	14	9
71	7,96	5,4
72	3,56	0
73	9,12	5,7
74	8,38	3,3
75	8,02	3,1
76	6,14	3
77	7,58	3,7
78	20,3	18,3
79	28,6	25
80	3,85	0
81	8,98	2,8
82	3,14	0
83	6,27	3,5
84	5,98	0
85	11,7	4,7

86	6,59	1,1
87	29,1	22,9
88	7,27	1,3
89	2,55	0
90	2,68	0
91	7,42	1,4
92	2,38	0
93	5,93	2,8
94	2,82	0
95	10,8	3,3
96	18,6	11,7

Preglednica IV: Rezultati vzorca in tirov različnih koncentracij

VZOREC	HITACHI mg/L	BN ProSpec mg/L
original	667,4	667
razmerje 1:1	282,4	295
razmerje 1:2	206	216
razmerje 1:3	154,5	162
razmerje 1:4	124,2	127
razmerje 1:5	102,7	107

Preglednica V: Primerjava nefelometričnih rezultatov, ki so bili na spektrofotometru 0,00 mg/L

ZAPOREDNA ŠTEVILKA	HITACHI 912 mg/L	BN ProSpec mg/L
1	0	3,02
2	0	2,09
3	0	2,91
4	0	4,16
5	0	2,17
6	0	5,48
7	0	4,43
8	1	4,7
9	0	2,6
10	0	2,46
11	0	3,16
12	0	3,34
13	0	3,56
14	0	3,85
15	0	3,14
16	0	5,98
17	0	2,55

18	0	2,68
19	0	2,38
20	0	2,82