

## Albumine-analyse in plasma: vergelijking tussen de broomcresolgroen, broomcresolpurper en een immunoassay bij volwassen patiënten met en zonder hemodialyse

J.S. KAMPHUIS<sup>1</sup>, H.J.M. SALDEN<sup>1</sup> en F.M.J. ZUIJDERHOUDT<sup>1</sup>

**Binnen ons laboratorium zijn drie methoden vergeleken voor het bepalen van albumine in plasma van 27 volwassen hemodialysepatiënten en 15 volwassen niet-hemodialysepatiënten. Het doel van dit onderzoek was tweeledig: onderzoeken of een factor aanwezig is in het plasma van een van de patiëntengroepen die interfereert met de albuminebepaling en hoe de resultaten van de diverse albuminemethoden zich tot elkaar verhouden. De gebruikte methoden zijn: broomcresolgroen (BCG), broomcresolpurper (BCP) en een turbidimetrische immunoassay (IA; referentiemethode). In de hemodialysegroep liet de BCP-methode een goede correlatie zien met de IA. De gemiddelde BCG-albuminewaarde was significant hoger dan de gemiddelde IA-albuminewaarde ( $p < 0.001$ ). De onderlinge verschillen tussen de albuminemethoden in de hemodialysegroep kwamen tevens tot uiting in de niet-hemodialysegroep. Dit onderzoek toont geen interfererende factor aan in plasma van deze onderzochte patiëntengroepen en laat zien dat de BCP-methode de meest accurate colorimetrische albuminemethode is voor deze patiëntengroepen.**

*Trefwoorden: hemodialysepatiënten; albumine; immunoassay; BCP; BCG*

Voor het meten van de albumineconcentratie in plasma wordt tegenwoordig in de klinisch-chemische laboratoria gebruik gemaakt van verschillende methoden, waaronder de broomcresolpurper (BCP) (1), broomcresolgroen (BCG) (2) en een keuze uit verschillende immunoassays, waarbij de turbidimetrische immunoassay door ons als referentiemethode werd beschouwd. Eerder gepubliceerde resultaten van vergelijkingen van meetmethoden voor albumine lieten zien dat de BCG-kleurstof een specifieke binding aangaat met eiwitten (globulines), resulterend in een overschatting van de albumineconcentratie (3,4). In een studie waarbij de resultaten van bovenstaande methoden werden vergeleken bij pediatrie hemodialysepatiënten bleek dat de BCP-methode significant lagere albuminewaarden opleverde dan de im-

muonoassay, terwijl de BCG-methode juist significant hogere albuminewaarden liet zien (5,6). Aangezien er binnen ons ziekenhuis een grote dialyse-afdeling is, waren wij geïnteresseerd in de recente vergelijking van de drie hierboven beschreven methoden in plasma van volwassen hemodialyse- en niet-hemodialysepatiënten. Dit met als doel te bekijken of er een interfererende factor aanwezig is in plasma van de dialysepatiënten voor een van de genoemde methoden.

### MATERIAAL en METHODEN

#### BCG-albumine

De analyse werd uitgevoerd op de Hitachi 917 analyser (Roche) gebruikmakend van de colorimetrische methode ontwikkeld door Roche (1). Plasma (2,0 µl) werd gemengd met 270 µl reagens 1 (75,0 mmol/l succinaat buffer pH 4,2 en 0,14 mmol/l BCG). Een 2-punts kalibratie werd uitgevoerd met de "calibrator for automated systems" (Cfas) zoals voorgeschreven door Roche. De absorptie werd afgelezen bij 600 nm.

#### BCP-albumine

De analyse werd uitgevoerd op de Hitachi 917 analyser gebruikmakend van de colorimetrische methode ontwikkeld door Roche (2). Plasma (2,2 µl) werd gemengd met 180 µl buffer en 108 µl kleurreagens (526 µmol/l BCP). De absorptie werd afgelezen bij 600 nm. Een 2-punts kalibratie werd uitgevoerd met Cfas. Daar de albumineconcentratie in Cfas niet door Roche werd opgegeven voor deze methode, is deze waarde door onszelf bepaald. De albuminewaarde van Cfas was bepaald met een nefelometrische immunoassay (BN-100 analyser; Behring) die was geijkt op een standaard van Behring (gekalibreerd op CRM-470). Nieuwe lotnummers van Cfas, waarbij Roche geen albuminewaarde leverde werden telkens geijkt op onze oude Cfas, die was geijkt op de Behring-standaard. De albumineconcentratie in de kalibrator Cfas werd 10 keer bepaald m.b.v. de BCP-methode, waarna de gemiddelde waarde werd gebruikt als nieuwe albuminewaarde voor het nieuwe lotnummer van Cfas.

#### IA-albumine

Deze turbidimetrische bepaling werd uitgevoerd op de Hitachi 917 analyser (Roche). Plasma (4,0 µl) werd gemengd met 250 µl reagens 1 (50 mmol/l Tris

Correspondentie: Dr. J.S. Kamphuis, Deventer Ziekenhuis<sup>1</sup>, Klinisch Chemisch Laboratorium, HJP Fesevurstraat 7, 7400 GC Deventer.  
E-mail: Kamphuis@dz.nl

**Tabel 1.** Algemene karakteristieken van geïncludeerde patiënten

	Hemodialyse			Niet-hemodialyse	
	Leeftijd (jaren)	Ureum (mmol/l) pre	Ureum (mmol/l) post	Leeftijd (jaren)	Ureum (mmol/l)
Gemiddelde	64,1	27,7	9,3	64,1	11,8
SD	11,3	6,4	3,0	18,9	9,1
Min	32,3	15,3	4,4	18,7	2,8
Max	77,9	37,8	14,5	84,0	33,1

SD: standaarddeviatie; Min: minimum; Max: maximum; Pre: predialyse; Post: postdialyse.

**Tabel 2.** Plasma albumineconcentraties en data regressie-analyse van hemodialyse- en niet-hemodialysepatiënten

Albumine (g/l)	Hemodialyse						Niet-hemodialyse		
	Pre			Post			IA	BCP	BCG
	IA	BCP	BCG	IA	BCP	BCG			
Gemiddelde	36	35	39*	41	40	43*	25	26	30*
SD	4	4	4	6	6	5	9	9	7
r**		0,93	0,97		0,98	0,98		1,00	0,98
Sy.x		1,00	0,61		1,28	1,55		0,56	0,74
Y-as intercept		6	9		3	10		<1	10

SD: standaarddeviatie; r: correlatiecoëfficiënt; Sy.x: standaardafwijking van punten t.o.v. de berekende regressielijn; Pre: Predialyse; Post: Postdialyse; \*: significant verschillend ( $p < 0,001$ ) t.o.v. de desbetreffende IA; \*\*:  $p < 0,001$  voor alle r-waarden.

pH 8,0, 4,2% PEG en 3,7 g/l EDTA) en 50 µl reagens 2 (100 mmol/l Tris pH 7,2 en polyclonale albumine-antilichamen). Een 5-punts kalibratie m.b.v. Cfas werd uitgevoerd zoals voorgeschreven door de fabrikant. De absorptie werd gemeten bij 340 nm. De albumineconcentratie in Cfas is volgens Roche bepaald m.b.v. een referentiemethode (gekalibreerd op CRM-470). De IA is om deze reden in deze studie gebruikt als referentiemethode. De kwaliteit van de IA voor albumine werd gecontroleerd middels een tweemaandelijks externe kwaliteitsronddending georganiseerd door de Stichting Kwaliteitsbewaking Ziekenhuis Laboratoria (SKZL) (7). Binnen dit programma werden de resultaten van 4 externe controlemonsters van deelnemende laboratoria met onze resultaten vergeleken. Hierbij vielen onze gemiddelde waarden binnen de gemiddelde waarde  $\pm 2 \times \text{SD}$  van alle deelnemende laboratoria voor wat betreft dezelfde methodegroep.

### Patiënten en monsters

Binnen de studie is gebruik gemaakt van twee patiëntengroepen. De eerste groep bestond uit klinische hemodialysepatiënten ( $n=27$ ), waarbij voor en na dialyse een bloedmonster is afgenomen. De tweede groep bestond uit niet-hemodialysepatiënten ( $n=15$ ). Algemene bijzonderheden van de geïncludeerde patiënten zijn opgenomen in tabel 1. Bloed werd afgenomen in buizen met lithiumheparine (Becton Dickinson, Plymouth, UK).

### Statistische analyse

Lineaire regressie analyse werd uitgevoerd volgens Passing&Bablok en de statistische analyse werd uitgevoerd middels de Student t-test (ongepaard, tweezijdig).

## RESULTATEN

In de hemodialysegroep kwam de gemiddelde BCP-waarde pre- en postdialyse (35 g/l en 40 g/l respectievelijk) sterk overeen met de gemiddelde IA-waarde pre- en postdialyse (36 g/l en 41 g/l respectievelijk; figuur 1A en tabel 2). De gemiddelde BCG-waarde was significant hoger zowel voor als na dialyse wanneer deze vergeleken werd met de corresponderende gemiddelde IA-waarde ( $p < 0,001$ ; tabel 2). Tabel 2 laat eveneens zien dat voor de hemodialysegroep de BCP-methode en de BCG-methode beide goed correleren met de IA, maar dat de BCG-methode een hoge y-as intercept laat zien (zowel predialyse (9 g/l) als postdialyse (10 g/l)). De BCP-methode daarentegen laat een lagere y-as intercept zien (voor dialyse: 6 g/l; na dialyse: 3 g/l). Uit tabel 2 blijkt eveneens dat de gemiddelde BCG-waarde zowel pre- als postdialyse hoger ligt dan de gemiddelde BCP-waarde pre- en postdialyse. Dialyseren resulteert in een marginale verbetering van het y-as intercept (BCP-methode). Bij een vergelijking van figuur 1A en 1B blijkt o.a. uit het y-as intercept dat de BCP-methode beter correspondeert met de IA dan de BCG-methode. Uit tabel 2 volgt ook dat de verstrooiing rondom de regressielijn (Sy.x) minder is voor de BCG-methode vergeleken met de BCP-methode (voor dialyseren); na dialyse verandert dit beeld, waarbij de verstrooiing voor de BCG-methode sterk is toegenomen en groter is dan de verstrooiing voor de BCP-methode.

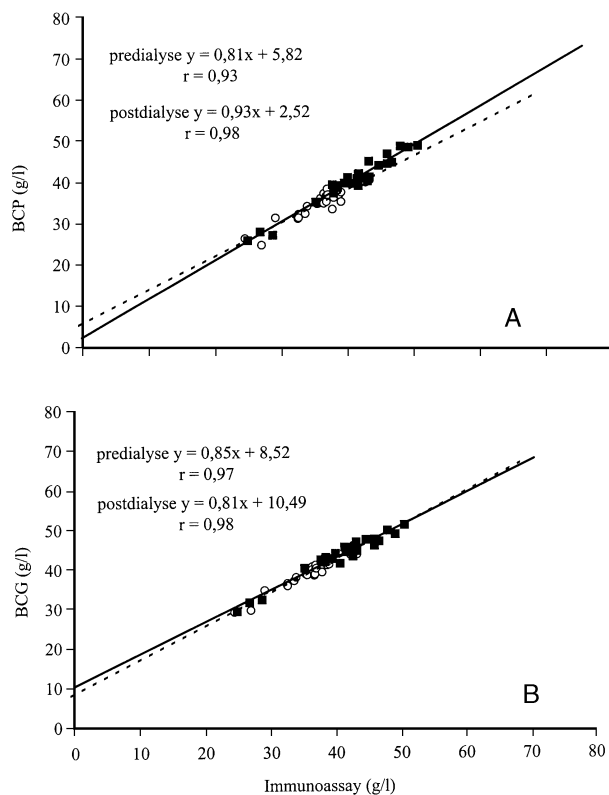
In de niet-hemodialysegroep vertoonden de uitkomsten van zowel de BCP-methode als de BCG-methode een goede correlatie met de IA. Uit figuur 2 en tabel 2 blijkt dat de BCG-methode een hoge y-as intercept laat zien (10 g/l), terwijl het y-as intercept voor de

BCP-methode beduidend lager ligt (<1 g/l). De gemiddelde BCP-waarde (26 g/l) correspondeert zeer goed met de gemiddelde IA-waarde (26 g/l), terwijl de gemiddelde BCG-waarde (30 g/l) significant verschilt van deze IA-waarde ( $p < 0,001$ ). De verstrooiing rondom de regressielijn is voor beide methoden nage-noege gelijk.

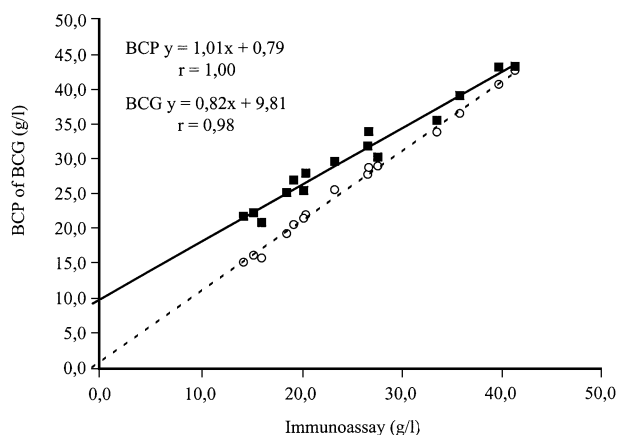
## DISCUSSIE

Colorimetrische meting van albumine in plasma of serum voor routine gebruik gebeurt in de meeste klinisch-chemische laboratoria met de BCG-methode. In de hier beschreven studie zijn drie verschillende methoden voor het bepalen van albumine met elkaar vergeleken, waarbij de IA als referentiemethode werd gehanteerd. In plasma van pre- en posthemodialysepatiënten alsmede in plasma van niet-hemodialysepatiënten werd een goede correlatie waargenomen tussen de waarden verkregen met IA en de BCP (alsmede BCG)-methode. Het meest opvallend was de hoge y-as intercept voor de BCG-methode voor beide patiëntengroepen met daarbij ook een hoger gemiddelde voor albumine gemeten met de BCG-methode t.o.v. de BCP-methode en IA. Daarnaast bleek dat de spreiding rondom de regressielijn voor de BCP-methode hoger is dan die voor de BCG-methode bij hemodialysepatiënten vóór dialyse. De spreiding rondom de berekende regressielijn nam toe na dialyse zowel voor de BCP- als de BCG-methode. Een moge-

lijke verklaring voor deze constatering moeten wij schuldig blijven. Een mogelijke verklaring voor de significant hogere gemiddelde BCG-waarde is het feit dat zowel de BCG- als BCP-methode gebaseerd zijn op binding van een kleurstof, waarbij beide methoden verschillen op de manier waarop ze gekalibreerd worden. De BCG-methode is gekalibreerd m.b.v. Cfas met een bekende albuminewaarde gegeven door Roche. Dit in tegenstelling tot de BCP-methode, die tevens gekalibreerd is op Cfas, maar waarvan de albuminewaarde bepaald is door ons m.b.v. de IA, daar tijdens het onderzoek geen door Roche opgegeven waarde voorhanden was voor albumine in Cfas. Momenteel heeft de fabrikant Cfas voorzien van een albuminewaarde die gebruikt wordt in ons laboratorium. Deze waarde is toegekend door gebruik te maken van het controleserum CRM-470. Nader onderzoek wees uit dat de albuminewaarden van patiëntenmonsters en controlemonsters, gemeten met de BCP-methode gekalibreerd op onze Cfas-waarde, dezelfde resultaten laten zien als wanneer gekalibreerd werd met de huidige Cfas-waarde van Roche. Hieruit kan geconcludeerd worden dat de albuminewaarde die door ons aan Cfas was gegeven de juiste was en dat de manier van kalibreren geen invloed heeft op de waargenomen verschillen tussen de BCG-methode en IA, er van uitgaande dat de opgegeven Cfas-waarden correct zijn. Zowel de IA als de BCP-methode worden dagelijks gecontroleerd middels interne controlemonsters en tweemaandelijks aan de hand van een aantal externe controlemonsters voor de IA en de BCP-methode (respectievelijk 4 en 8). De BCG-methode is niet in routinegebruik binnen ons laboratorium en wordt dus ook niet meegenomen in deze kwaliteitscontroles. De resultaten van de gebruikte controles bepaald met de BCP-methode en de IA komen goed overeen met de gemiddelde waarde ( $\pm 2xSD$ ) bepaald uit de resultaten van andere laboratoria voor dezelfde methode (7). De IA en de BCP-methode zijn daarom juiste en reproduceerbare bepalingen. Een andere mogelijke verklaring voor het hoge y-as intercept voor de BCG-methode is de invloed van heparine als gevolg van een toename van de turbiditeit. Heparine vormt echter geen probleem



**Figuur 1.** A: Regressieanalyse van BCP-methode en immunoassay in de groep van hemodialysepatiënten; F: pre-dialyse; O: postdialyse. B: Regressie analyse van BCG-methode en immunoassay in de groep van hemodialysepatiënten; F: pre-dialyse; O: postdialyse.



**Figuur 2.** Regressie analyse van zowel BCP- als BCG-methode versus immunoassay in de groep van niet-hemodialysepatiënten; F: BCP-albumine; O: BCG-albumine.

voor de BCG-methode, daar de eindconcentratie van heparine na bloedafname in de in deze studie gebruikte heparinebuizen geen interferentie vertoont (8). Het kan mogelijk een probleem geven voor de BCP-methode. Dit kan echter voorkomen worden door de molariteit te verhogen van de acetaatbuffer tot 0,25 mmol/l of bij gebruik van 0,1 mmol/l acetaatbuffer met daarin 0,15 mmol/l NaCl (9). In onze situatie is echter gebruik gemaakt van een gemodificeerde assay (1) met eindpuntmeting en een monsterblanco. De mogelijke interferentie van heparine wordt zo vermeden.

Onze resultaten komen niet overeen met de eerder gepubliceerde artikelen betreffende dialysepatiënten. Resultaten van Postlethwaite et al. (5) laten zien dat de BCP-methode resulteert in lagere albumineconcentraties vergeleken met de IA in pediatrische hemodialysepatiënten. Gesuggereerd werd dat er een interfererende factor in het serum van deze kinderen aanwezig zou zijn die de binding van BCP aan albumine zou beïnvloeden, terwijl dit niet zou gelden voor de BCG-methode. Dit werd gezien bij enkele patiënten. Dezelfde onderwaardering voor de albumineconcentratie werd gezien bij volwassen dialysepatiënten (6). Andere studies laten tevens een onderwaardering zien van de albumineconcentratie in plasma van dialysepatiënten (10,11). Een mogelijke verklaring voor deze resultaten was de aanwezigheid van een factor in het serum van deze patiënten die gebonden voorkomt aan albumine of dat een van structuur veranderd albuminemolecuul de binding aan BCP wijzigt. In onze studie werden geen verschillen gevonden tussen hemodialyse- en niet-hemodialysepatiënten en ook geen invloed gezien van een mogelijke interfererende factor in plasma van de hemodialysepatiënten. Het gebruik van een andere referentiemethode is mogelijk een bron die een oorzaak zou kunnen zijn voor het verschil tussen onze studie en de hierboven beschreven studie. In een andere studie waarbij de BCP-methode tevens werd vergeleken met een turbidimetrische immunoassay, werd een invloed van dialyseren aangetoond (12). Bij twee patiënten verdween het aanwezige verschil tussen de albuminewaarde gemeten met de BCP-methode en de albuminewaarde gemeten met de immunoassay naarmate de dialyse vorderde. Volgens de auteurs is hier mogelijk sprake van een interfererende factor die te verwijderen is met dialyse. Deze studie vertoont geen overeenkomstige resultaten met onze studie. Het betreft hier echter een waarneming geconstateerd bij een beperkt aantal patiënten. Een andere verklaring voor dit verschil is voor ons onbekend.

De conclusie van deze studie is dat beide colorimetrische methoden goed te gebruiken zijn binnen elk klinisch-chemisch laboratorium, maar dat de referentiewaarden wel aangepast moeten worden aan het type methode. Bij gebruik van de BCG-methode in combinatie met de juiste referentiewaarden behorende bij de BCP-methode kan een hypoalbuminemie gemaskeerd worden. Een aanpassing van de kalibratie is tevens een oplossing. Onze voorkeur bij de keuze voor een colorimetrische bepaling gaat daarom uit naar de BCP-methode, mede door het feit dat deze juist

meet dan de BCG-methode in het lage albumineconcentratiebereik. Verder is gebleken dat er geen factor kan worden aangetoond in plasma van volwassen hemodialysepatiënten, die interfereert met een van de albuminemethoden.

## Literatuur

1. Dumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol-green. *Clin Chim Acta* 1971; 31: 87-96.
2. Bracken JS, Klotz IM. A simple method for the rapid detection of serum albumin. *Am J Clin Path* 1953; 23: 1055-1058.
3. Hill PG. The measurement of albumin in serum and plasma. *Ann Clin Biochem* 1985; 22: 565-578.
4. Webster D. A study of the interaction of bromocresol green with isolated serum globulin fractions. *Clin Chim Acta* 1974; 53: 109-115.
5. Wells FE, Addison GM, Postlethwaite RJ. Albumin analysis in serum of haemodialysis patients: discrepancies between bromocresol purple, bromocresol green and electroimmunoassay. *Ann Clin Biochem* 1985; 22: 304-309.
6. Maguire GA, Price CP. Bromocresolpurple method for serum albumin gives falsely low values in patients with renal insufficiency. *Clin Chim Acta* 1986; 155: 83-88.
7. Steigstra H, Jansen RTP, Baadenhuysen. Combi Scheme: New combined internal/external quality-assessment scheme in the Netherlands. *Clin Chem* 1997; 37: 1196-1204.
8. Perry BW, Dumas BT. Effect of heparin on albumin determination by use of bromocresol green and bromocresol purple. *Clin Chem* 1979; 25: 1520-1522.
9. Hill B, Wilson DW, Hill RP, Hill PG. Heparine does not interfere with the measurement of plasma albumin by bromocresol purple. *Clin Chem* 1983; 29: 1989-1990.
10. Dumas BT, Peters T Jr. Serum and urine albumin: a progress report on their measurement and clinical significance. *Clin Chim Acta* 1997; 258: 3-20.
11. Joseph R, Tria L, Mossey RT, Bellucci AG, Mailloux LU, Vernace MA, Miller I, Wikes L. Comparison of methods for measuring albumin in peritoneal dialysis and hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1996; 27: 566-572.
12. Beyer C, Boekhout M, Iperen van H. Bromocresol purple dye-binding and immunoturbidimetry for albumin measurement in plasma or serum of patients with renal failure. *Clin Chem* 1994; 40: 844-845.

## Summary

*Albumin analysis in plasma: comparison between bromocresol green, bromocresol purple and immunoassay in adult (non) hemodialysis patients. Kamphuis JS, Salden HJM and Zuidershoudt FMJ. Ned Tijdschr Klin Chem 2001; 26: 9-12.*

We compared three methods used to measure the albumin concentration in plasma from 27 adult hemodialysis patients and 15 adult non-hemodialysis patients. The methods used were bromocresol purple (BCP), bromocresol green (BCG), and a turbidimetric immunoassay (IA, our reference method). A good correlation was observed in the hemodialysis group between the IA and both the BCP- and BCG-methods. The mean BCG-albumin concentration was significantly higher than the mean IA-albumin concentration ( $p < 0.001$ ).

No differences were observed between the hemodialysis group and the non-hemodialysis group concerning the mean albumin values measured by the three tested methods.

We conclude that the BCP-method is the most accurate colorimetric method to measure albumin in plasma and that we could not establish an influence of an interfering factor in plasma of adult hemodialysis patients in our situation.

*Key-words: hemodialysis patients; albumin; immunoassay; BCP; BCG.*