

## 1 Presence of IgM antibodies to hepatitis C virus (HCV) core protein and HCV-induced chronic liver disease – lack of positive correlation

J. Abb  
Mikrobiologisches Institut., Klinikum Ludwigsburg

Sera from 50 patients with chronic HCV infection were used to study the correlation between the presence of HCV core IgM antibodies and clinical disease activity. All study patients showed absence of concomitant infections with other hepatotropic viruses or nonviral causes of hepatocellular damage. Twenty of the 50 HCV-infected patients showed clinical and biochemical evidence of liver disease, the other 30 patients were asymptomatic. Serum specimens were investigated for the presence of IgM antibodies to HCV core (c 22) protein by an enzyme immunoassay (Abbott Laboratories, North Chicago, Ill., USA). Anti-HCV core IgM antibodies were found in 7 out of the 20 patients (35.0 percent) with chronic liver disease and in 16 out of the 30 asymptomatic patients (53.3 percent). Differences of the anti-HCV core IgM antibody prevalence between symptomatic and asymptomatic patients were not significant. (x2 test). Furthermore, sample/cutoff ratios of anti-HCV core IgM antibody determinations and ALT levels of individual patients demonstrated no significant positive correlation ( $r = -0.06$ ).

In conclusion, our results demonstrate that the detection of anti-HCV core IgM antibodies is not associated with clinical disease activity in patients with chronic HCV infections.

## 2 Chemiluminometric measurement of plasma and intracellular oxalate concentration in patients with acute or chronic inflammatory diseases

S. Albrecht<sup>1</sup>, T. Zimmermann<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Institute of Clinical Chemistry and <sup>2</sup>Dept. of Surgery of Technical University Dresden, Germany

By using the highly sensitive chemiluminometric method\* based on peroxyoxalate-chemiluminescence we have measured oxalate concentrations in human plasma and leucocytes (granulocytes, platelets, monocytes)\*\* of patients with acute or chronic inflammatory diseases.

The intracellular oxalate concentrations are exceptional high in comparison to plasma. Both plasma and intracellular oxalate concentrations are different in patients with inflammatory diseases versus a healthy control group. It is possible that oxalate plays an important role as substrate for enzymatical generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

We found in patients with acute inflammatory diseases drastically reduced intracellular oxalate concentrations. The same result was obtained after stimulation of white blood cells (granulocytes, monocytes) with zymosan or endotoxin. All these data suggest, that oxalate may be not only an useless final product of human biochemical metabolism.

## 3 Progesteron- und Cortisolbestimmungen im Blutserum und Seminalplasma bei Patienten mit unerfülltem Kinderwunsch

R. Andreeßen\*, P. Sinha\*, E. Köttgen\*, R. Nagel\*  
\*Urologische Klinik und \*Institut für Klinische Chemie und Biochemie, UKRV, Freie Universität, Augustenburger Platz 1, 13344 Berlin

### Einleitung

Über 50% des gesamten Ejakulatvolumens sind flüssige Bestandteile der accessorischen Geschlechtsdrüsen. Die biochemische Zusammensetzung und deren Bedeutung für die Zeugungsfähigkeit ist bisher ungeklärt. In der vorliegenden Studie wurden Bestimmungen von Progesteron, eine wichtige Vorstufe zur Testosteronbiosynthese, und Cortisol, das wichtigste humane Glucocorticoid, biochemisch ausgehend vom Progesteron, im Blutserum und Seminalplasma von Patienten (Pat.) mit Oligo(O), Terato-(T) und Azoospermie (A) bestimmt und deren Meßergebnisse mit normozoospermen (N) Patienten verglichen.

### Material und Methoden

Konzentrationsbestimmungen wurden mittels quantitativen Enzymimmunoassay (Synelisa<sup>®</sup>, Elias Medizintechnik, Freiburg) für Cortisol im Blutserum und Seminalplasma an 113 Pat. (Alter: 18–43 Jahre, Median 32,7 Jahre; 29 Pat. mit O, 51 Pat. mit T, 18 Pat. mit A und 15 Pat. mit N), und für Progesteron an 132 Pat. (Alter 19–48 Jahre, Median 34,1 Jahre; 32 Pat. mit O, 63 Pat. mit T, 22 Pat. mit A und 15 Pat. mit N) bestimmt.

### Ergebnisse

Progesteron und Cortisol im Blutplasma: Die Progesteronwerte lagen zwischen 0,1 bis 2,1 ng/ml, die Cortisolwerte zwischen 1,9 bis 44,5 µg/ml. Signifikante Unterschiede zwischen O, T, A und N ergaben sich nicht. Progesteron im Seminalplasma: Die gemessenen Werte zwischen 0,6 bis 5,3 ng/ml lagen signifikant ( $p < 0,001$ ) höher als im Blutserum. Zusätzlich ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen N (0,9 – 2,0 ng/ml) einerseits und O (0,6 – 3,0 ng/ml), T (0,7 – 5,3 ng/ml) und A (0,9 – 3,6 ng/ml) andererseits. Cortisol im Seminalplasma: Die gemessenen Werte lagen signifikant ( $p < 0,0001$ ) niedriger als im Blutserum. Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Spermaqualitäten konnten nicht erfaßt werden.

### Schlußfolgerung

- Progesteronkonzentrationen im Seminalplasma waren signifikant höher als im Blutserum.
- Cortisolkonzentrationen im Seminalplasma waren signifikant niedriger als im Blutserum.
- Je höher Seminalplasmakonzentrationen für Progesteron desto größer die Wahrscheinlichkeit von pathologischen Spermaveränderungen.

## 4 Elevated potassium enhances glutamate vulnerability of dopaminergic neurons developing in mesencephalic cell cultures

.Andreeva, N. (1), Ungethüm, U., Heldt J., Gross, J.  
Brain Research Institute, Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia (1.); Institute of Pathological and Clinical Biochemistry, Charité Hospital, Humboldt University, Berlin

Mesencephalic cell cultures obtained from wistar rat embryos on the 14th gestational day were maintained for 14 days in medium with either normal (4.2 mM) or elevated (24.2 mM) potassium

\* S. Albrecht et al. (1993) J. Biolumin. Chemolumin. 8 21 – 24.

\*\* S. Albrecht et al. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. 106, in press.

concentration. The development and maturation of the neurons were estimated by the content of neuron-specific enolase (NSE) in the cell monolayer and the number of tyrosine hydroxylase-immunoreactive (TH-RT) neurons; the first parameter being used for estimation of neurochemical differentiation of the whole neuronal population, the second one to evaluate (the development of dopaminergic neurons. Cultures were treated with 100 µM glutamate (Glu) for 15 min in salt solution on the in vitro days (DTV) 3, 6, 8 and 13. Glu-induced neuronal damage was estimated 24 hrs later by an increase in NSE content in the culture medium and by a reduction in the number of TH-IR neurons. On DIV 13 application of 100 µM Glu to the cultures maintained in normal K<sup>+</sup> concentration resulted in the increase in NSE content in the medium by factor 3.4, where as in the group of cultures maintained in elevated K<sup>+</sup> concentration Glu treatment caused almost 8-fold increase in the NSE content. Similar tendency was observed with respect to DA-neurons: only 8% of TH-IR cells could be determined in the high K<sup>+</sup>-treated cultures 24 hrs after glu application in comparison with 26% in low K<sup>+</sup>-treated cultures. These data show that chronic K<sup>+</sup> depolarization during development of mesencephalic cell cultures significantly increases neuronal vulnerability increases neuronal vulnerability to toxic Glu treatment.

## 5 Vergleich der Gerinnungsanalysatoren STA (Boehringer Mannheim), CS 190 und KC40 Mikro (Amelung) und MLA E 1600 (Baxter)

D. Auch, S. Schmickler, N. Katz  
 Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie,  
 Universität Gießen

Mit dem Vergleich sollte die Routinetauglichkeit der kugelkoagulo-metrischen Analysatoren KC40 Mikro, CS 190 und STA sowie des nephelometrischen Analysators MLA E 1600 anhand der Basismeßgrößen TPZ, PTT und TZ geprüft werden. Auf den beiden zuletzt genannten Geräten wurden zusätzlich Fibrinogen und Antithrombin III verglichen. CS 190 und MLA E1600 waren Vorserienmodelle.

Die Präzisionen in Serie und von Tag zu Tag wurden aus Einzelbestimmungen unter Verwendung von Kontrollplasmen ermittelt. Die Intraassayvarianz der TPZ, der PTT und TZ im Normbereich und in Plasmen mit verminderter Gerinnungsaktivität lag in der Regel unter 3%. (Außer: TZ norm: STA; TPZ pathol.: CS 190; PTT pathol.: E 1600, und CS190.) Die Interassayvarianz, bestimmt an mindestens 10 Tagen, war selten größer als 4,5%. (PTT norm: E1600; TPZ pathol.: STA mit Behring Reagenz und C5190; PTT pathol.: STA.) Eine Verschleppung mit Heparin aufgestocker Proben (5 U/ml) konnte bei keinem Gerät nachgewiesen werden.

Der Zeitaufwand für die manuelle Eingabe und die Analysendauer beträgt für eine Serie von n = 5 bzw. n = 22 Proben bei der Bestimmung von TPZ, PTT und TZ (in Minuten).

	CS190	E1600	KC40 Mikro	STA
n = 5	10	18	11	11,5
n = 22	47	54	38	28

Beim STA, dem CS 190 und dem KC40 Mikro kann der Anwender auf die Analysenzeit mittelbar Einfluß nehmen.

Der Softwareaufbau ist bei allen Geräten übersichtlich und gut zu bedienen. Beim STA ist die automatische Analysenwiederholung nach Verletzung vom Anwender definierter Grenzen eingerichtet. Folgende Charakteristika zeichnen die Geräte aus; STA: Sensorgesteuerte Erfassung der Reagenz- und Probenpositionen, frei wählbare Probenvorverdünnung; CS190: berechnete echte Restvolumina aus dem Gefäßdurchmesser; jedes Pipettiervolumen > 3 µl frei wählbar; frei definierbares Ablaufschema einzelner Teste;

MLA E1600: großes Reagenzvolumen, echte Probevorverdünnung, effiziente Reagenzienkühlung.

## 6 Serum-Amyloid A – ein Akute-Phase-Protein im Lipoprotein-Stoffwechsel

J. Aufenanger, W. Zimmer, C. Brucker, J. Bommersheim, R. Kattermann  
 Institut für Klinische Chemie, Klinikum der Stadt Mannheim,  
 Fakultät für Klinische Medizin der Universität Heidelberg, 68135 Mannheim

Über die spezifische Funktion des Serum-Amyloid A (SAA) gibt es derzeit nur wenige Untersuchungen. Einige Autoren spekulieren, daß SAA als Apolipoprotein den HDL-Stoffwechsel moduliert und so eine protektive Funktion bei der Entwicklung der Atherosklerose einnimmt (1). Andere sehen in der strukturellen Modifikation der Lipoproteine durch SAA, besonders der HDL, eine protektive Funktion im Entzündungsstoffwechsel (2). Für uns stellte sich die Frage nach dem pathobiochemischen Sinn, warum SAA als Apolipoprotein gerade und nur in der Akute-Phase-Reaktion gebildet wird.

### Material und Methoden

SAA wurde nephelometrisch quantifiziert (3). Die Aufnahme von SAA-haltigen Lipoproteinen wurde in primären Monocyten und HepG2-Zellen mit und ohne Cytokinstimulation untersucht.

### Ergebnisse

SAA-haltige Lipoproteine (besonders SAA-LDL) wurden von den HepG2-Zellen mit und ohne Stimulation von Cytokinen um Faktor 2 bis 3 geringer aufgenommen als SAA-freie Lipoproteine. Für die primären Monocyten konnte eine deutliche Steigerung der HDL<sub>3</sub>-Aufnahme unter Endotoxinstimulation gezeigt werden, die durch SAA-haltige HDL<sub>3</sub> noch gesteigert werden konnte. Desweiteren nahmen SAA-haltige HDL in höherem Maße Cholesterol aus Monocyten auf als SAA-freie HDL.

### Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, daß SAA in der Akute-Phase-Reaktion den Cholesterol-Rücktransport beschleunigt. Dieser ist aber im Gegensatz zur normalen Situation nicht zur Leber gerichtet, sondern möglicherweise zu Gebieten mit zellulärer Traumatisierung. Diese Hypothese befindet sich gerade in experimenteller Überprüfung. Somit könnte die SAA-Beladung der Lipoproteine, besonders der HDL, in der Akute-Phase-Reaktion einen zielgerichteten Mechanismus darstellen, Lipide aus lipid(über)beladenen Monocyten/Makrophagen zum Zwecke der Membranreparatur zu Zellen zu schaffen, deren Membranintegrität zerstört ist. Hierin ist ein protektiver Effekt des SAA im Entzündungsstoffwechsel zu sehen.

### Literatur:

1. Malle, E.; Steinmetz, A.; Raynes, J.G. (1993): Serum amyloid A (SAA): an acute phase protein and apolipoprotein; *Atherosclerosis* 102, 131 - 146
2. Kisilevsky, R.; Subrahmanyam, L. (1992): Serum amyloid A changes high density lipoproteins cellular affinity. A clue to serum amyloid A's principal function; *Lab Invest* 66, 778 - 785.
3. Aufenanger, J.; Münscher, G.; Ensenaer, R.; Kattermann, R. (1993): Nephelometrische Bestimmung von Serum Amyloid A (SAA) ; *GIT Labor Medizin* 16, 367 - 368.

## 7 Normal and in particular modified low density lipoproteins stimulate proliferation and extracellular matrix synthesis of cultured fat-storing cells

M.G. Bachem, A. Steinmetz\*, A.M. Gressner  
Dept. of Clin. Chem. and Dept. of Internal Medicine\*, University of Marburg

Fat-storing cell (FSC) activation is initiated and maintained primarily by polypeptide growth factors oxygen radicals and acetaldehyde. In the present study we demonstrate that native and modified low density lipoproteins (LDL) stimulate FSC proliferation and extracellular matrix synthesis of these cells.

### Methods

LDL were isolated from human plasma by sequential ultracentrifugation and oxidized using copper-sulfate or desialinated using neuraminidase total-fibronectin (p-FN) and cellular-fibronectin (c-FN) were determined by time-resolved immunofluorometric assay, proteoglycan synthesis (PG) was measured by incorporation of (<sup>35</sup>S)sulfate (20 µCi/ml medium) into sulfated glycosaminoglycans.

### Results

Addition of LDL (200 µg protein/ml medium) increased the diameter of the fat-droplets. 5 – 500 µg LDL/ml medium stimulated PG, t-FN, and c-FN synthesis, respectively, dose dependently (200 µg LDL/ml medium increased PG synthesis/DNA to a maximum of 3.8fold, p-FN up to 2.2fold and c-FN synthesis up to 4.8fold of control). Lipoprotein (a) and HDL were without significant effect on matrix synthesis. Modification of LDL resulted in a further increase of FN-synthesis (10 µg/ml native LDL 1.43fold; 10 µg oxidized LDL 2.2fold and 10 µg desialinated LDL 2.3fold of control). Besides the effects on matrix synthesis LDL stimulated cell proliferation during 48 h (control: 0.21 ± 0.07 µg DNA/well; 200 µg LDL/ml medium: 0.39 ± 0.03 µg DNA/well). Using pulse chase experiments LDL-effects on PG degradation could be excluded.

### Conclusion

Our results demonstrate that in particular modified LDL stimulated extracellular matrix synthesis and proliferation of cultured FSC. It is suggested that mechanisms which are primarily observed in atherosclerosis (stimulated matrix synthesis by LDL) might also play a role in liver fibrogenesis.

## 8 Cooperation of endothelial cells with Kupffer cells, ts myofibroblasts and platelets in TGFβ activation

M.G. Bachem, K.-M. Sell, G. Schüftan, A.M. Gressner  
Department of Clinical Chemistry,  
University of Marburg/Germany

Kupffer cells (KC) (1), myofibroblasts (MFB) (2) and platelet lysate (3) release latent TGFβ and stimulate matrix synthesis of fat-storing cells (FSC). In the present study we investigated mechanisms of TGFβ activation relevant in liver fibrogenesis.

### Methods

FSC, KC and EC were isolated by standard procedure from normal rat livers, EC also from porcine aorta. MFB were obtained by subculture of FSC. Platelets were obtained from normal human blood donors. Active TGFβ was measured by a proliferation-inhibition assay of Mv 1 Lu cells (NBL-7 cells). The effects of active TGFβ on extracellular matrix synthesis was quantitated by proteoglycans (PG), total- (t-FN) and cellular-fibronectin (c-FN). A TGFβ antisense-oligonucleotide was used to inhibit TGFβ synthesis.

### Results

During transformation of FSC to MFB the synthesis of TGFβ increased (from 0.08 ng/ml) (FSC 2nd day, 1 x 10<sup>6</sup> cells, 24h) to 3.7 ng/ml (MFB 10th day). FSC and MFB released predominantly (75 – 98%) latent TGFβ. KC (1 x 10<sup>6</sup> cells) synthesized 9.88 ± 2.2 ng/ml TGFβ during 24h (about 80% in the latent form) and platelets (10<sup>9</sup> latelets ml contained 9.77 ± 1.68 ng/ml 95 – 98% in the latent form). During 2h incubation of conditioned media with EC and even more during coculture of MFB or KC with EC the latent TGFβ was activated. EC in coculture with MFB elevated PG synthesis by 15 – 24%. By blocking the IGFII receptor with Man-6-P (100 µM) TGFβ activation was reduced. TGFβ1 antisense thiophosphonate-oligonucleotide (5 µM) added to MFB reduced PG synthesis by 41% and t-FN synthesis by 42%.

In summary our results demonstrate that KC, platelets and MFB release predominantly latent TGFβ. Latent TGFβ binds via its Man-6-P-residues to IGFII receptors and is proteolytically activated by EC (plasmin?).

1. Matsuoka, M.; Tsukamoto, H. (1990): Hepatology 11, 599 - 605.
2. Bachem, M.G., et al. (1992): J. Clin Invest., 89: 19 - 27.
3. Bachem, M.G., et al. (1989): J Clin Chem Clin Biochem, 27, 555 - 565.

## 9 TNF-α release from whole blood and PBMC in vitro

J.E. Baier<sup>1</sup>, B. Wedmann<sup>1</sup>, H.A. Neumann<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Dep. of Internal Medicine, Ruhr-University Bochum, St. Josef Hospital, <sup>2</sup>St. Elisabeth Hospital, Bochum

In order to determine the most adequate time for measurement of TNF-α in peripheral blood we examined samples of 60 µl whole blood (WB) and also 60 µl of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 8 healthy persons. Values were determined every two hours for 24 hours. Thereafter daily determinations were assessed until day 6. After measurement of baseline levels the samples were incubated in modified RPMI at 37° C and 5% CO<sub>2</sub> without and with addition (stimulation) of 5 µg/ml lipopolysaccharides (LPS). TNF-α concentrations were determined with an ELISA. In PBMC stimulated samples showed rapidly increasing values reaching a peak level after 6 hours. Then values decreased slightly until hour 12 where a plateau was reached being stable until hour 24. From then on values declined again reaching baseline at 96 hours after initiation. In WB stimulated samples also showed rapidly increasing values reaching the peak level after 8 hours. From now on values decreased rapidly reaching baseline at hour 14. From that point on they increased again until hour 24. From then on values declined again reaching baseline at 72 hours after initiation. In unstimulated probes only very low levels of TNF-α but with a similar course seen in stimulation could be determined. The course of the values measured show, that an early and a secondary response occurs during release of TNF-α both in WB and PBMC. Assessment of the early effect needs to be determined at 6 to 8 hours after stimulation. Secondary effects reach peak levels at 24 hours after initiation of stimulation with LPS.

## 10 Einfluß der Probenvorbereitung auf die Lymphozytensubpopulationen bei Vollblut-lysemethoden in der Durchfluß-zytometrie

H. Baum, Margit Obst, D. Neumeier  
Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Klinikum rechts der Isar, TU München

Bei der Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen sind Zellverluste während der Probenvorbereitung möglichst zu vermeiden.

Viele Untersucher ziehen deshalb die Vollblutlyse der Dichtegradientenisolation vor. Bei der Vollblutlyse werden zwei Varianten mit bzw. ohne Waschen unterschieden. Da bei den Methoden mit Waschen durch das Dekantieren Zellverluste auftreten können, war es Ziel dieser Untersuchung, die Zellverluste der Vollblutlyse mit Waschen zu quantifizieren und die Ergebnisse mit einer Methode ohne Waschen zu vergleichen.

#### Material und Methoden

K-EDTA-Blut von 10 gesunden Spendern wurde mit einer Vollblutlysemethode mit Waschen (Vollblut-Lysier-Kit, Coulter), wobei 3 unterschiedliche Volumina (300, 500 und 700 µl) über dem Pellet verblieben, und einer Methode ohne Waschen (Q-Prep, Coulter) zur Analyse vorbereitet. Jeder Ansatz wurde mit FITC- bzw. RDI-konjugierten monoklonalen Antikörpern gegen CD2, CD3, CD4, CD8, CD19 (alle Coulter) und gegen NK-Zellen inkubiert, wobei bei der Methode mit Waschen die NK-Zellen als CD16/56+ und CD3- (Simultest, BD) und mit Q-Prep als CD57+ und CD57/8+ (2-FARB-Cyto-Stat, Coulter) gemessen wurden. Der Mittelwert und die Standardabweichung des prozentualen Anteils der Lymphozyten und jeder Subpopulation aller Probanden wurden errechnet. Zur Bestimmung des „wahren“ Lymphozytenwertes im Blut wurden fünf Blutausstriche angefertigt und insgesamt 1000 Zellen am Mikroskop differenziert.

#### Ergebnisse

Im Vergleich zur Handdifferenzierung lag im Mittel der prozentuale Lymphozytenwert mit Q-Prep um 7% und bei der Methode mit Waschen unabhängig vom Überstandvolumen um 23% tiefer. Der prozentuale Anteil der Subpopulationen, außer bei NK-Zellen, ist für die unterschiedlichen Überstände bei der Waschmethode wie auch Q-Prep etwa gleich. Aufgrund der unterschiedlichen Antikörpergemische zeigt Q-Prep im Mittel weniger als 50% NK-Zellen im Vergleich zur Methode mit Waschen.

#### Schlussfolgerung

Bei Vollblutlysemethoden mit Waschen muß mit einem deutlichen Verlust an Lymphozyten gerechnet werden. Die Menge an Überstand hat keinen Einfluß auf die prozentuale Verteilung der Subpopulationen. Die vorgefertigten Antikörpergemische zur Bestimmung der NK-Zellen erkennen unterschiedliche Zellpopulationen und sind somit nicht direkt vergleichbar.

## 11 Leukozytendepletion von Erythrozytenkonzentraten durch Bed-side Filtration

B. Berger, T. Rogge, H.A. Fabricius

Abt. f. Laboratoriumsmedizin, Krankenhaus Am Urban, Berlin

Leukozyten in Erythrozytenkonzentraten sind die Ursache vielfältiger Nebenwirkungen bei Transfusionen (1).

Wie umfangreiche Studien belegen, ist die Leukozytenreduktion durch Filtration unter die CILL-Dosis in der Regel gesichert, wenn sie unter standardisierten Bedingungen in einer Blutbank durchgeführt wird (2).

Neben dieser in den Produktionsprozess integrierten und qualitativ kontrollierten Methode findet die Leukozytendepletion durch Bed-side Filtration zunehmend Anwendung. Über die Qualität so hergestellter gefilterter EK's liegen nur wenige Daten vor (3). Wir haben 45 buffy-coat arme Erythrozytenkonzentrate in additiver Lösung unterschiedlichen Alters (x = 9 Tage [4–32]) untersucht, die am Krankentbett filtriert wurden.

Bei einem mittleren Ausgangswert von  $1,13 \times 10^9$  Leukozyten/Präparat vor der Filtration fand sich eine Reduktion auf mittlere  $2,23 \times 10^7$  Leukozyten/Präparat nach Filtration. Die durchschnittliche Leukozytenreduktion betrug 99,59%. Alle Präparate lagen unter der CALL-Dosis.

30/45 Präparaten (66,7%) wiesen Leukozytenzahlen unter der CILL-Dosis auf und nur 19/45 Präparaten (42,2%) enthielten weniger als die empfohlene Gesamtmenge von  $5 \times 10^6$  Leukozyten/Präparat. Als Zeichen der filtrationsbedingten Hämolyse fand sich ein mittlerer Anstieg des freien Hämoglobins um 19,2 mg/dl.

Aus unserer Sicht ist der Einsatz von Depletionsfiltern ausschließlich als Bed-side Methode nicht effektiv genug, um die Leukozytenzahl ausreichend zu vermindern und so die hierdurch bedingten möglichen Transfusionsreaktionen sicher zu verhindern.

#### Literatur:

1. Snyder, E. (1989): *Transfusion* 29: 568–571.
2. Rebulla, P., et al. (1993): *Transfusion* 33,2: 128–133
3. Coplestone, J. A., et al. (1993): The Royal College of Physicians of Edinburgh Consensus Conference.

## 12 Quantitative CDR3-PCR using a microplate-format DNA hybridization assay

Ch. Berndt, M. Bebenroth, K. Oehlschlegel, F. Hiepel<sup>1</sup>, W. Schöbler<sup>2</sup>  
Inst. of Pathol. and Clin Biochemistry and Dept. of Rheumatology<sup>1</sup>,  
Humboldt Univ., Med. Faculty (Charité), and Imtec Immundiagnostika GmbH<sup>2</sup>

A method for DNA quantification based on the hybridization between single stranded target DNA and solid phase-bound capture probes on microplates is presented. Binding of the capture probes was attained by surface activation of the microplates using organosilanes. Detection of the hybridized DNA was performed by an enzyme-linked assay taking advantage of the labeled target DNA. The test is capable of proving single base mutations and has a detection limit of about 1.5 pg per well. Employing the assay a method for the quantitative PCR (QPCR) of an immunoglobuline complementarity determining region 3 (CDR3) was established. QPCR was carried out by coamplifying CDR3-coding plasmid DNA with a synthetic internal standard (IS). IS and plasmid CDR3 both shared primer binding sites and produced length-identical amplicons. The amplified DNA was quantified following differential hybridization with IS- and plasmid specific capture probes. Based on the product ratios of plasmid to IS the initial amounts of plasmid DNA were calculated. CDR3 QPCR was shown to detect initial concentration differences of plasmid DNA of about 30%. This figure seems promising for a method's intended use in quantifying malignant cells in minimal residual disease.

## 12a Epidemiologie und Diagnostik von Reisekrankheiten

U. Bienzle, Ch. G. Meyer

Institut für Tropenmedizin, Engeldamm 62–64, 10179 Berlin

Importierte Krankheiten gewinnen, bedingt durch private und geschäftliche Reisen in tropische und subtropische Regionen, zunehmend an Bedeutung. Eine große Zahl dieser Erkrankungen kann durch die Beachtung notwendiger hygienischer Maßnahmen vermieden werden. Andere können durch eine wirksame medikamentöse Prophylaxe in der Regel ausreichend begegnet werden. Bei den importierten Reisekrankheiten handelt es sich vorwiegend um Infektionen, jedoch auch um klimatisch bedingte Erkrankungen sowie um verschiedenartige Intoxikationen (giftige Tiere, Pflanzen, Produkte von Mikroorganismen). Die Erscheinungsform verschiedener importierter Infektionskrankheiten weicht oft erheblich von den Manifestationsformen der gleichen Krankheiten in den Ursprungsländern ab.

In diesem Beitrag sollen die wichtigsten Reisekrankheiten, differentialdiagnostisch im wesentlichen orientiert an den Leitsympto-



men Fieber und Diarrhoe sowie deren Diagnostik vorgestellt werden. Der diagnostische Weg von einfachen und schnell durchzuführenden Nachweisverfahren, z. B. im Direktnachweis von Parasiten, bis zu den modernen immunologischen und molekular-biologischen Techniken wird beschrieben.

### 13 Demonstration of antigens in extracts of monkey intestine specifically recognised in immunoblots by coeliac patient's sera

H. Börner, A. Osman, Th. Mothes  
*Institute of Clinical Chemistry and Pathological Biochemistry, University of Leipzig, Germany*

Endomysium antibodies (EmA) and reticulin antibodies (ARA) are directed against connective tissue components and represent highly specific and sensitive markers for coeliac disease and dermatitis herpetiformis (1). Until now, for the detection of these antibodies the investigation of their binding to tissue sections of different rat and monkey organs by means of indirect immunofluorescence is necessary. For improvement and simplification of the diagnostic procedure it would be advantageous to use the isolated reactive antigens. Therefore, fractions from monkey small intestine were extracted according to a modification of the method of (2): The intestinal homogenate was filtered and the fibres obtained were washed with NaCl-histidine buffer and extracted with SDS.

Before SDS extraction, the fibres were able to absorb EmA when incubated with coeliac patients' sera, resulting in the disappearance of positive staining in immunofluorescence. The capability of absorption of EmA was lost after SDS treatment of the fibres. This might hint to the presence of antigens in the SDS fraction able to bind EmA.

By means of immunoblotting 3 proteins of the SDS extract (molecular weight range 20 – 35 kD) could be shown to be reactive with 71% of EmA and ARA positive sera but with only 4% of EmA and ARA negative sera. After SDS polyacrylamide gel electrophoresis, 2 of the proteins were isolated by electroelution and used for immunisation of rabbits. The sera obtained, however, did not produce the typical immunofluorescence staining on tissue slices elicited by EmA and ARA. The spectrum of EmA and ARA positive patients' sera reactive with the monkey intestinal antigens is different from, but overlapping with that binding to a 48 kD antigen of rat liver, previously shown to be specifically recognised by sera of coeliac patients (3).

References:

1. Mäki, M.; Hällström, O.; Marttinen, A.; Lipsanen, V.; Viander, M.; Holm, K.; Collin, P.; Koskimies, S. (1992): In: Auricchio, S.; Visakorpi, J.K. (Eds.): Common food intolerances 1: Epidemiology of coeliac disease. Dyn. Nutr. Res., Karger, Basel, pp 93.  
 2. Light, N.; Champion, A.E. (1984): Biochem. J. 219, 1017.  
 3. Meergans, T.; Mothes, T. (1993): J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 31, A41.

### 14 Optimierung der HLA-B27-Bestimmung mit Durchflußzytometrie

M. Böttcher, G. Abel  
*Medizinisches Zentrallabor Dr. Kramer u. Partner*

Mit fluoreszenzmarkierten mAKs und Durchflußzytometrie (FCM; Epics XL u. Q-Prep-Lyse, Coulter) ist bei größerem Probenaufkommen eine schnellere und kostengünstigere HLA-B27-Bestimmung möglich, als mit dem als Referenz zu betrachtenden Terasaki-Test. Wir untersuchten den verbreitetsten anti-HLA-B27, „ABC-m3“ sowie den von der Firma BMT vertriebenen „One Lambda FD705“. Meßbar über den FCM-Mean-channel (MC), reagieren beide Ak's

unterschiedlich mit den sieben verschiedenen B27-Subtypen, ABC-m3 darüber hinaus mit HLA-B7 und -B22-Splits.

Ergebnisse

1. 500 ABC-m3 FCM-nicht negative Proben aus der Routine (n = 4000) wurden nach Abklärung im Terasaki-Test mit dem FCMM korreliert und folgende Entscheidungsgrenzen definiert:  
 Negativ: MC-Lymphoz.: bis 3; MC-Monoz.: bis 3  
 B7+/B27-: MC-Lymphoz.: 3 – 12; MC-Monoz.: 3 – 14  
 Grenzbereich: MC-Lymphoz.: 7 – 15; MC-Monoz.: 14 – 25 (B7+? o. B27+?)  
 B27+/B7-: MC-Lymphoz.: > 9; MC-Monoz.: > 25

2. Durch Inkubation von 200 ABC-m3 FCM-nicht negativen Proben (Terasaki getestet) mit anti-HLA-B7 (Biotest 2078-1), wurde versucht die Zahl der Typisierungen zu verringern:

B27+: MC erreicht 90 – 110 % des MC ohne anti-B7  
 B7+: MC sinkt auf < 70 % des MC ohne anti-B7  
 Grenzbereich: MC erreicht 70 - 90 % des MC ohne anti-B7

3. Im Terasaki-Test überprüfte und mit ABC-m3 gemessene Proben wurden mit One Lambda FD705 verglichen:

23 B27-/B7-Proben: ABC-m3: negativ; FD705: negativ  
 45 B27-/B7+Proben: ABC-m3: grenzw. 0.B7+; FD705: negativ  
 95 B27+/B7-Proben: ABC-m3: grenzw. o.B27+; FD705: 93 B27+

4. Mit FD705 inkubierte HLA-B27+Proben sind unmittelbar nach Q-Prep-Aufarbeitung negativ und zeigen über 30 min einen Anstieg im MC. Ein Veränderung der Aufarbeitung (Inkubation nach Q-Prep-Lyse unter Weglassen des Fixativs) erlaubt eine unmittelbar anschließende Messung. Beide Aufarbeitungen wurden an 100 ABC-m3 nicht negativen Proben miteinander verglichen und zeigten Übereinstimmung bei niedrigeren MC für die Standardaufarbeitung.

### 15 Bestimmung von Clonazepam/ Flunitrazepam im Plasma mit HPLC-Diodenarray

M. Böttcher, Y. Puppe  
*Medizinisches Zentrallabor Dr. Kramer u. Partner*

Clonazepam und Flunitrazepam gehören mit zu den am niedrigsten dosierten Medikamenten (therap. Bereich: Clonazepam 15 – 60ng/ml; Flunitrazepam 5 – 40 ng/ml). Bei der Entwicklung einer HPLC-Methode werden somit hohe Anforderungen an reproduzierbare Wiederfindung (Wf), selektive Extraktion und Nachweisgrenze gestellt. Wir teilen eine RP-HPLC-Methode mit Diodenarraydetektion Peakreinheitskontrolle) nach Extrelut(Merck)-Extraktion vor. In Intraassay wurde in je 4 Serien mit gespiektem Serum von 10 ng/ml (n = 5) und 100 ng/ml (n = 10) mit 8-Punkt-Kalibration (Vk des Anstieges 4, bzw 6% für Clonazepam bzw. Flunitrazepam) die Wiederfindung bestimmt. Die Ergebnisse erlauben, je nach Anforderung, Clonazepam oder Flunitrazepam als internen Standard (korr. Werte) bei Ein-Punkt-Kalibration einzusetzen. Störsubstanzen traten bisher nicht auf. Auf Interferenzen durch gängige Beimedikationen (z.B. Antiepileptika) wurde geprüft. Die Routinefähigkeit der Methode wird ständig durch einen internationalen Ringversuch überprüft.

Wiederfindung Clonazepam/Flunitrazepam  
 Interassay 4 Tage; Serum gespikt je 10 bzw. 100 ng/ml

	10 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml	100 ng/ml
	Mean	Std. Abw.	Mean	Std. Abw
Cloni, WF (%)	94,01	1,84	87,80	5,71
Clini, korr. (ng/ml)	99,37	1,04	98,84	0,46
Fluni, WF (%)	93,92	2,81	88,85	5,78
Fluni, korr. (ng/ml)	100,63	1,04	101,16	0,46

## 16 Nachweis von Sparfloxacin-Glukuronid durch Säulen-Chromatographie und photo-chemische Nachsäulen Derivatisierung

K. Borner, E. Borner, H. Hartwig, H. Lode

*Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie, Klinikum Stglitz und Städtisches Krankenhaus Zehlendorf-Heckeshorn, Freie Universität Berlin*

Sparfloxacin ist ein neueres Chinolon-Antibiotikum mit erweiterter Aktivität gegen gram-positive Erreger. Es wird säulenchromatographisch bestimmt. Zur Detektion dient der UV-Detektor oder der empfindlichere Fluoreszenzdetektor (1). Sparfloxacin wird überwiegend metabolisiert. Als Metabolit wurde bisher das Glukuronid nachgewiesen (2). Das nicht fluoreszierende Glukuronid kann bisher nur mit dem unempfindlichen UV-Detektor nachgewiesen werden. Es wird eine neue Methode vorgestellt, die das Glukuronid fluorometrisch nach Nachsäulen-Derivatisierung nachweist. Die Probe wird durch eine Ionenaustauscher-Säule (Nucleosil SAX) getrennt. Das Eluat fließt durch eine Teflonkapillare und wird mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt. Das Reaktionsprodukt fluoresziert (295/470 nm) und wird quantitativ bestimmt. Die Optimierung der Methode und die Ergebnisse der Validierung werden berichtet. Untersuchungen über die Struktur des Reaktionsproduktes werden z. Z. durchgeführt.

### Literatur:

1. Borner, K.; Borner, E. (1992): Determination of sparfloxacin in serum and urine by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography* 579, 285 - 289.
2. Borner, K.; Borner, E.; Lode, H. (1993): A metabolite of sparfloxacin in urine. *Drugs* 45 (suppl. 3) 303 - 304.

## 17 A Novel A→G Mutation in Intron I of the Hepatic Lipase Gene Leads to Alternative Splicing Resulting in Enzyme Deficiency

K. Brand<sup>1</sup>, K. A. Dugi<sup>2</sup>, J. D. Brunzell<sup>2</sup>, D. N. Nevin<sup>3</sup>, H. Bryan Brewer, Jr.<sup>2</sup>, Silvia Santamarina-Fojo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute for Clinical Chemistry and Pathobiochemistry, Technical University Munich Germany; <sup>2</sup>Molecular Disease Branch, National Institutes of Health, Bethesda, USA; <sup>3</sup>Department of Medicine, University of Washington, Seattle, USA

We have identified the underlying molecular defect in a patient with hepatic lipase (HL) deficiency presenting hypertriglyceridemia and premature cardiovascular disease. DNA sequencing and digestion with BsrI established homozygosity for an A→G mutation in intron I of HL that introduces an additional AG motif within a potential branch lariat signal located 13 bp upstream of the native 3' splice site. Two mini-gene constructs (normal and mutant) consisting of exons 1 and 2 as well as 202 bp of intron I were generated by the overlap PCR extension method and transfected into 293 cells. Analysis of RNA from cells transfected with the mutant construct demonstrated the presence of abnormally spliced products containing 13 and 78 additional bases as well as the accumulation of unspliced RNA. In these cells, no normally spliced mRNA was identified. Thus, the A→G mutation disrupts normal splicing of intron I and generates a new AG site which is preferentially used as an alternative 3' splice signal. Translation of these alternatively spliced products leads to premature termination resulting in the synthesis of truncated, nonfunctional proteins. Our studies establish the functional significance of a novel mutation in the HL gene of a patient presenting with HL deficiency. The unique BsrI restriction site created by the mutation will be useful for future screening to determine the frequency of HL deficiency and establish its role in the development of hyperlipidemia as well as premature atherosclerosis.

## 18 Detection of a wide range of common mutations by single strand conformational polymorphism (SSCP) on an automated DNA sequencing system (LICOR 4000L)

A. Braun<sup>1</sup>, D. Facius<sup>2</sup>, A.A. Roscher<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dr. v. Haunersches Kinderspital, Universität München, FRG  
<sup>2</sup>MWG-Biotech, Ebersberg, FRG

The classical procedures for the screening and the specific diagnosis of the wide variety of inherited monogenic disorders (> 4000 different diseases) heavily rely on the time-consuming combination of profile analysis of specific metabolites (e. g. amino acids, organic acids, fatty acids, oligosaccharides etc.) or protein products and the subsequent confirmatory tests in biopsy samples, largely by enzymatic methods. The rapid progress in the elucidation of the molecular defects of the diseases provides new prospects to screen specific mutations or to confirm the diagnosis at the DNA-level. This goal can potentially be achieved by the simple method of PCR followed by SSCP and the automated detection of the different electrophoretic mobility of; various PCR-products that are specific for mutant or wildtype.

We evaluate this method of DNA fragment analysis on the Licor 4000L, an automated DNA sequencing system, for some common mutations in rather frequent genetic diseases: such as  $\beta$ -thalassaemia (common mutations IVS-1 nt 1 G > A, IVS-1 nt 6 T > C, IVS-1 nt 110 G>A, codon 39 stop), the hemoglobin variants HbS and HbC,  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency (type Z), cystic fibrosis ( $\Delta$ F508), and galactosemia (Q188R). All mutations have been confirmed previously by DNA sequencing.

The results obtained so far are highly reproducible and specific for each examined mutation. Due to the genetic heterogeneity of some particular disorders the design of the SSCP procedures to achieve reasonable diagnostic sensitivities may still be complex. Nonetheless the examples chosen clearly demonstrate the great potential of this technique to screen for a variety of specific mutations on a large scale (e.g. newborn screening) by one and the same method.

## 19 Mutation analysis of the putative adrenoleukodystrophy gene

A. Braun<sup>1</sup>, H. Ambach<sup>1</sup>, W. Rabl<sup>2</sup>, S. Stöckler<sup>3</sup>, B. Rolinski<sup>1</sup>, T.M. Strom<sup>4</sup>, H. Bernheimer<sup>2</sup>, A.A. Roscher<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dr. v. Haunersches Kinderspital, Universität München, FRG

<sup>2</sup>Kinderklinik, Technische Universität München, FRG

<sup>3</sup>Kliniken für Kinderheilkunde und Neurologie, Universitäten Göttingen, Graz und Wien; FRG/Austria

<sup>4</sup>Abt. f. pädiatrische Genetik der Kinderpoliklinik, Universität München, FRG

Adrenoleukodystrophy is an X-linked disease (X-ALD) affecting 1 : 20 000 males either as cerebral ALD in childhood or as adrenomyeloneuropathy (AMN) in adults. The biochemical hallmark is a deficient oxidation in peroxisomes followed by an increase of the very-long-chain fatty acids (VLCFA). Recently, a candidate gene for the disease has been described encoding a peroxisomal membrane transporter protein (ALDP) which has homology to an other peroxisomal membrane protein (PMP70) [Mosser et al., *Nature* 361: 726 - 730, 1993].

We analysed this gene in two patients with markedly different clinical expression of X-ALD. The first patient exhibited the picture of classical childhood ALD with a very rapidly progressing course at the age of 7 years. As the genetic defect we identified a 38 bp deletion in the 5'-portion of the X-ALD gene which causes a frameshift mutation. Thus, only 91 N-terminal amino acids are identical with the normal transporter protein which has a length of 745 amino acids.

The second patient came to clinical attention at the age of 9 years because of Addison's disease. Despite of markedly elevated VLCFA levels, comparable to the other patient, no signs of neurological involvement were detected as judged by clinical, neurophysiological and NMR investigations. A guanin to adenin transition was found which causes an amino acid substitution from arginin to histidin at the position 104. This amino acid is highly conserved in comparison with the corresponding position in the PMP70.

In conclusion, our description of distinct mutations in the putative ALDP gene in patients with biochemically proven X-ALD further supports the hypothesis that alterations in this gene cause X-ALD. Furthermore, new possibilities for a direct carrier and/or prenatal diagnosis can be offered. The genotypic alterations in two patients representing the marked variability in the clinical picture of ALD may provide a first hint for ongoing further collaborative studies attempting to understand the genetic basis of the clinical heterogeneity in X-ALD.

## 20 The evaluation of SSCP as a rapid and specific diagnostic method for the detection of mutations in the inherited disorders of the globin gene

A. Braun<sup>1</sup>, S. Kammerer<sup>2</sup>, H. Ambach<sup>1</sup>, A.A. Roscher<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dr. v. Haunersches Kinderspital, Universität München, FRG

<sup>2</sup>Institut für Anthropologie und Humangenetik, Universität München, FRG

In 1982, the WHO estimated that approximately 5 % of the world population are carriers of genes which are important for the expression of clinical relevant hemoglobinopathies. Despite the availability of well established biochemical methods there is still a need for more rapid sensitive and specific procedures for the purpose of mass screening and carrier detection. Methods like restriction fragment length polymorphism, allele specific oligo hybridisation, and DNA sequencing have widely been used to detect and classify mutations in the globin genes. More than 150 mutations in the globin gene have been identified up to now. Due to this genetic heterogeneity, however, these methods are not suited for a widespread application since most of them have to be individually adapted to one particular mutation.

Therefore, we evaluated the feasibility of the SSCP (single strand conformation polymorphism) method as a diagnostic tool to analyse a wide range of mutations in the globin gene by only one simple analytical procedure. The gene was divided in six subregions that were individually amplified by PCR. All amplification products were proven to be suitable for the subsequent SSCP electrophoresis followed by silverstaining of the gel.

So far, in the heterogenic ethnic collective of our patients we examined 51 thalassaemic alleles with the SSCP method and were able to clearly differentiate between the following common alleles: Wildtype, codon 5 frameshift, IVS-1 nt1 G > A, IVS-1 nt5 G > C, IVS1 nt6 T > C, IVS1 nt1 10 G > A, codon 39 nonsense, codon 41, 42 frameshift, IVS-2 nt745 G > C. In combination with the HphI restriction digest for the IVS-2 nt1 G > A mutation we were able to recover 49 alleles of 51 (96,1%). The common hemoglobin variants (HbS, HbC) were also sufficiently resolved by the SSCP method.

In conclusion, the SSCP electrophoresis is a powerful tool for the rapid and sensitive diagnosis and elucidation of the various genetic defects of the hemoglobinopathies.

## 21 Mitochondriale Creatinkinase (miCK) im Plasma von Kindern nach operativer Korrektur angeborener Herz-Gefäß-Anomalien

S. L. Braun<sup>1</sup>, K. Löschenko<sup>1</sup>, H.-P. Lorenz<sup>2</sup>, W. Vogt<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Klinische Chemie und Labormedizin

<sup>2</sup>Klinik für Herz- und Kreislaufkrankungen im Kindesalter, Deutsches Herzzentrum München, Lothstraße 11, 80335 München

Mitochondriale Creatinkinase (miCK) tritt im Plasma von Erwachsenen in der Regel im Endstadium schwerer Erkrankungen (z. B. bei Malignomen oder Lebererkrankungen) auf. Bei Kindern sind bisher nur 7 Einzelfälle publiziert (1, 2).

In einer prospektiven Studie bei 86 Kindern (Neugeborene bis 17jährige) nach herzchirurgischen Eingriffen fanden wir in 40 Fällen atypisch hohe, immuninhibitorisch gemessene CKMB-Anteile (> 25% der gesamt CK, bei einer „MB-Aktivität“ > 10 U/L). Die CK-Gesamtaktivität fiel bei allen Kindern postoperativ regelhaft ab, die „MB“-Aktivität zeigte jedoch in diesen Fällen eine abweichende Kinetik mit einem Maximum des Relativanteils am 3. postoperativen Tag. Die elektrophoretische Auftrennung der CK (REP-System, Helena) ergab mindestens einen kathodisch zur MM-Aktivität wandernden Peak und eine Schulter im Bereich der CK-Gewebsisoform MM3. Mit einem Antikörper gegen miCK des Huhns (freundlicherweise von PD Dr. Wallimann, ETH Zürich, zur Verfügung gestellt) konnten diese Fraktionen nahezu vollständig unterdrückt werden. Der im MM-Bereich wandernde Anteil ließ sich nach Immuninhibition der CKMM isoliert darstellen. Die CK-Spezifität wurde durch Weglassen von Creatinphosphat überprüft. Die beobachtete atypische CK "MB" ist damit als miCK gesichert.

Die Gruppe der Kinder mit miCK war signifikant jünger (Median 2 gegenüber 72 Monaten). Häufigste Diagnosen waren komplexe angeborene Herz-Kreislauf-Anomalien mit ausgeprägter Hypoxie, wie Transposition der großen Gefäße und Fallot'sche Tetralogie. Die präoperative O<sub>2</sub>-Sättigung in der Aorta lag mit 88,5% im Mittel signifikant niedriger als in der Gruppe ohne miCK (96%). Im Gegensatz zum Erwachsenen tritt bei diesen Kindern miCK nur passager auf und ist nicht mit einer infausten Prognose verbunden. Unserer Hypothese nach handelt es sich um eine Freisetzung von überschüssiger miCK aus Herzmuskel nach erfolgreicher Korrektur komplexer, überwiegend zyanotischer Herzfehler. Die Hypothese wird gestützt durch Arbeiten, die zeigen, daß sowohl die Mitochondrienzahl und -größe, als auch die miCK-Aktivität unter Hypoxie zunehmen (3).

1. Wu, A.H.B.; Herson, V.C.; Bowers, G.N. (1983): Clin. Chem. 29, 201 - 204.

2. Rizzotti, P.; Cocco, C.; Burlina, A. Jr.; Marcer, V.; Plebani, M.; Burlina, A. (1985): Clin. Biochem. 18, 239 - 241.

3. Apple, F.S.; Rogers, M.A. (1986): J. Appl. Physiol. 61, 482 - 485.

## 22 Immunoreactivity of human anti-aprotinin antibodies with human tissue factor pathway inhibitor (TFPI) and aprotinin variants

T. Brinkmann, U. Daum, H. R. Wenzel\*, H. Tschesche\*, K. Kleesiek  
Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin, Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen, Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum, Bad Oeynhausen, Germany

\*Lehrstuhl für Biochemie, Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld

Aprotinin, a bovine serine proteinase inhibitor has been used for a major reduction in the need for blood units in open-heart surgery. However, potential risks are associated with high-dose aprotinin administration e. g. anaphylactic reactions have occasionally been reported. We developed an enzyme immunoassay to determine aprotinin-specific IgG antibodies. Anti-aprotinin antibodies were isolated from a heart transplanted patient and the crossreactivity

was tested against recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) and natural and semisynthetic modified aprotinin variants by a competitive enzyme immunoassay (50% inhibition). In comparison with native aprotinin (immunoreactivity = 100%) the crossreaction of [Val<sup>16</sup>]aprotinin was 15%, and of isoaprotinin 1, [Ala<sup>14,28</sup>]aprotinin and [seco-15/16]aprotinin less than 10%. An immunoreactivity to recombinant TFPI (containing domain I and II) was not detectable. We have demonstrated that the modification in the reactive site of aprotinin dramatically decreases the binding of human antibodies directed against the native inhibitor. Similar results were obtained with polyclonal anti-aprotinin antibodies from rabbit. From this we conclude that the reactive site region of aprotinin exposes a major epitope resulting in a major target site for antibodies in a species-independent way. Due to a different amino acid sequence in the reactive site region of the TFPI domains a crossreactivity has not been observed. Our results suggest that the development of antiaprotinin antibodies has no influence on the haemostatic system.

### 23 Improved chromogenic substrate assay of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) using anti-TFPI-antibodies and recombinant TFPI standard

*T. Brinkmann, U. Daum, C. Tiemann, W. Prohaska, W.K. Kleesiek  
Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin, Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen, Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum, Bad Oeynhausen, Germany*

A chromogenic substrate assay was calibrated with recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) for quantitation of TFPI in body fluids and cell culture media. In this assay tissue factor/factor VIIa activity was measured by the sequential addition of factor X. A factor Xa sensitive chromogenic substrate (N-benzoyl-Ile-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilide) was added and the absorbance at 405 nm was measured. The TFPI specific inhibitory activity was determined by the addition of anti-TFPI antibody from goat. The test system was carried out in microtiter plates and has proved itself to be a rapid technique.

The assay enables the quantitation of TFPI in the concentration range of 0.1 – 10 µg/l. The intraassay and interassay coefficients of variation are 6% and 7%, respectively. The recovery of TFPI was 93% when added to assay buffer (0.05 mol/l Tris/HCl, pH 8.0).

TFPI was quantified in sera of healthy male (n = 40) and female (n = 40) blood donors. The normal range was 150 – 250 µg/l. In men the mean value was estimated at 144 ± 51 µg/l and in women at 118 ± 20 µg/l. No age and sex dependence was observed in adults.

### 24 GMP monoclonal antibodies for immunomagnetic removal of B-lymphoma cells from bone marrow or peripheral blood MNC

*C. Brockmeyer, J. Schwender, W. Böhm, K. Drexler,  
R. Koll, R. Spaethe  
Baxter Biotech Group, Immunotherapy Division, Unterschleißheim,  
Germany*

Monoclonal antibodies against B-cell antigens (CD19, CD20, CD22, CD23, CD37) were manufactured for immunomagnetic removal of B-lymphoma cells from bone marrow or peripheral blood MNC. Antibodies were produced in compliance to current Good Manufacturing Practice (cGMP), Food and Drug Administration (FDA) standards and the guidelines of the Commission of the European Communities (CPMP).

WI-L2 729HF2 cell line expressing CD19, CD20, CD22, CD23, CD37 were established as target cell line and a Small Scale Depletion Assay (SSDA) was developed and validated in order to assure product activity and stability on a lot-to-lot basis. In model experiments for immunomagnetic elimination of B-lymphoma cells from buffy coat MNC, a 6 log tumor cell depletion could be achieved in two sequential purging cycles. Clinical scale purging experiments using the MaxSep™ device demonstrated that purging was specific for B-cells without loss of CD34<sup>+</sup> hemopoietic stem cells. A cocktail of the five monoclonal antibodies is under investigation in randomised prospective clinical trials (European CUP Trial, GOELAM Trial) comparing the efficacy of chemotherapy with purged or unpurged autologous bone marrow support in non-Hodgkin's lymphoma.

### 25 Langzeituntersuchungen von Fibrinolyse- und Gerinnungsparametern bei Patienten mit tiefer Beinvenenthrombose

*Christine Burstein, M. Steiner, O. Anders\*  
Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie und Klinik für Innere Medizin\*, Universität Rostock*

Verlaufsuntersuchungen hypofibrinolytischer Zustände sollten durchgeführt werden, um erhobene Störungen der Fibrinolyse zu bestätigen oder auszuschließen bzw. ein persistierendes Thromboserisiko zu erkennen. Ergebnisse aus einer Erstuntersuchung (Burstein et al.: Z. Klin. Med. 1991; 46: 839–841) bilden die Grundlage für die prospektive Langzeitstudie an 19 Patienten, die 1989 mit phlebographisch gesicherter tiefer Beinvenenthrombose erfaßt wurden. Kontrolluntersuchungen erfolgten im Abstand von zwei Jahren mittels eines hämostaseologischen Screening-Programms auf das Vorliegen eines thrombophilen Zustandes. Im Untersuchungszeitraum traten keine erneuten Thrombosen auf. Die Patienten wurden mittels Fibrin-Differenz-Verfahren (FDV, Burstein et al.: Klin. Lab. 1994; 40: 43–49) in Non-Responder (FDV 0–30%, n = 7) und Responder (FDV 31–100%, n = 12) eingeteilt. Die hämostaseologischen Parameter aPTT, Fibrinogen, AT III und vWF:Ag zeigten zu allen Zeitpunkten keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Erstmals bei den Nachuntersuchungen vorgenommene Bestimmungen der D-Dimere zeigten erhöhte Konzentrationen in der Gruppe der Non-Responder (Median 473 ng/ml vs 243 ng/ml, p < 0,03), während TAT und F 1 + 2 keine Differenzen erbrachten. Hypofibrinolytische Zustände in der Gruppe der Non-Responder zeigten eine auffällige Persistenz, während die Befunde der Responder heterogen ausfielen. Zwei Responder zeigten zu allen Zeitpunkten eine normale Fibrinolyse. Neun Responder wiesen in beiden Nachuntersuchungen eine signifikant erniedrigte fibrinolytische Kapazität auf. Die t-PA-Aktivitäten vor Venenokklusionstest fielen bei den Nachuntersuchungen signifikant niedriger aus, während die t-PA-Aktivitäten nach Venenokklusionstest sich heterogen verhielten. Die Aktivität des PAI-1 fiel im Verlauf von drei Untersuchungen deutlich ab. Die Persistenz der Hypofibrinolyse in der Gruppe der Non-Responder deutet auf eine längerfristige Dysregulation des Fibrinolyse systems hin. Die ungünstigen Veränderungen in der Gruppe der Responder lassen Individualität, Komplexität und Dynamik des Fibrinolyse systems erkennen.

### 26 Capillary electrophoresis with laser induced fluorescence: A new clinical tool

*Fu-Tai A., Chen Ramon Evangelista, Ming-Sun Liu, Sushma Rampal  
Beckman Instruments, 2500 Harbor Blvd., D-20A, Fullerton,  
CA 92634, USA*

Routine analysis of serum proteins, hemoglobin variants and urine analytes by capillary electrophoresis (CE) is well-established. These

analytes are on the order of  $10^{-3}$  to  $10^{-5}$  M, and can be detected readily by absorbance measurements. To broaden the clinical utilities of CE, we have investigated laser induced fluorescence (LIF) detection. We demonstrated a detection sensitivity of the LIF system in CE of  $10^{-11}$  M or better with a dynamic range of 5 orders of magnitude.

Immunoassays was performed with labeled antigens or antibody as the probe for competitive or direct binding analysis, respectively. Separation of bound vs free labeled antigen or antibody is achieved readily by CE. The enzyme catalyzed cleavage of the labeled peptide substrate can also be monitored by CE, as well as the fluor labeled primer or intercalating agent for probing DNA sequence or PCR product. The selection of various probes to match lasers, particularly the fluor dyes for semiconductor lasers to achieve detection sensitivity useful for clinical analytes will be discussed. The analysis of real clinical samples of each of the above described methods by CE/LIF will be presented.

## 27 Verbesserung des Nachweises von Anti-centromer-Antikörpern (ACA) durch den Einsatz eines eukaryotisch exprimierten rekombinanten CENP-B-Proteins

K. Conrad<sup>1</sup>, Gisela Stahnke<sup>2</sup>, B. Liedvoße<sup>3</sup>, J. Mehlhorn<sup>3</sup>, K.-H. Frank<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Virologie und Immunologie an der Med. Fakultät der Techn. Universität Dresden; <sup>2</sup>ELIAS Entwicklungslabor, Freiburg; <sup>3</sup>Ärztliche Gutachtergemeinschaft Niederdorf

Der Einsatz rekombinanter Autoantigene ermöglicht eine Standardisierung der Autoantikörper-Analytik, erfordert aber auch eine Re-Evaluierung der diagnostischen Relevanz im Vergleich mit den Befunden traditioneller Nachweismethoden. Als wichtigstes antigenes Target von ACA – einem der Marker-Antikörper der systemischen Sklerodermie – wurde das centromerspezifische Protein CENP-B identifiziert (1, 2). In einer Studie zur Bedeutung von ACA in Risikogruppen bezüglich der Sklerodermieentwicklung testeten wir 678 Seren mit einem ELISA gegen ein eukaryotisch exprimiertes rekombinantes CENP-B-Protein (2). 53 von 55 in der Immunfluoreszenz an HEp-2-Zellen ACA (IF-ACA, s. (3)) positiven Seren zeigten eine meist deutliche Bindung mit diesem Antigen. Werte über den cut-off von 5 U/ml wurden jedoch auch bei 28 IFACA negativen Seren beobachtet, nicht jedoch bei bisher 450 getesteten Blutspendern. Zusammenfassend ergeben sich gegenüber dem immunfluoreszenzoptischen Nachweis von ACA folgende Vorteile: 1. Möglichkeiten der Standardisierung, 2. Nachweismöglichkeit von niedrigtitrigen und von durch Autoantikörperkoexpressionen „maskierten“ ACA, 3. exakte Diagnostik von ACA bei untypischen Fluoreszenzbefunden. Diagnostische Wertigkeit: Wie für IF-ACA bekannt, sind CENP-B-Antikörper auch bei negativem Fluoreszenzbefund mit der Sklerodermie bzw. Verdachtssymptomen (v. a. Raynaud's Phänomen) assoziiert. Die Bedeutung dieses Assays für die Früherfassung oder Risikoabschätzung der Entwicklung einer Sklerodermie bei quarzstaubexponierten ehemaligen Uranerzbergarbeitern wird diskutiert.

1. Earnshaw, W., et al. (1986): J. Clin. Invest. 77 426 - 430.
2. Stahnke, G., et al. (1994): J. Autoimmun. 7, 107 - 118.
3. Moroi, Y., et al. (1980): Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1621 - 1631.

## 28 Quantifizierung $\beta_2$ -adrenerger mRNA in H9c2 Zellen

V. Dangel, J. Giray, D. Ratge, V. Tittelbach, H. Wisser  
Robert Bosch Krankenhaus, Abt. f. klin. Chemie, Auerbachstraße 110, 70376 Stuttgart, Deutschland

Am insuffizienten humanen Herzen ist die Reaktion auf eine adrenerge Stimulation vermindert, was zu einer verringerten Kontraktilität des Herzens auf Belastung führt. Die Ursache hierfür ist eine verminderte Anzahl an  $\beta$ -Rezeptoren im Herzgewebe. Noch ungeklärt sind die molekularen Mechanismen, welche die Downregulierung kardialer  $\beta$ -Rezeptoren verursachen. Am Modellsystem der etablierten Herzzelllinie H9c2, welche aus embryonalen Rattenmyoblasten gewonnen wurde (Kimes & Brandt), soll die Hypothese geprüft werden, ob die steady-state Konzentration  $\beta$ -adrenerger Rezeptor mRNA ( $\beta$ AR-mRNA) mit der  $\beta$ -adrenergen Rezeptorexpression auf Proteinebene korreliert.

Verdrängungsexperimente mit  $^{125}$ I-Cyanopindolol und selektiven  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Antagonisten ergaben, daß H9c2-Zellen  $\beta_2$  Rezeptoren exprimieren. Im Radioligandenbindungstest konnte eine Rezeptordichte von  $1720 \pm 470$  Rezeptoren pro unbehandelte Zelle ( $n = 5$ ;  $K_D = 15,7$  pM) nachgewiesen werden. Durch Hybridisierung mit einer humanen  $\beta_2$ -Gensonde (pTF3-Klon) gelang der Nachweis des  $\beta_2$ -Rezeptors im Southern Blot Verfahren. Wegen der extrem geringen Menge an  $\beta_2$ -AR-mRNA wurde zur Quantifizierung die PCR-Reaktion eingesetzt. Hierzu fand die kompetitive RT-nPCR Verwendung. Als interner Standard diente ein kloniertes cDNA Fragment mit einem Längenunterschied von 56 bp zur nativen Sequenz, welche ebenfalls von denselben Primersequenzen wie die Target Sequenz flankiert wird. Die klonierte Sequenz wurde mit T7 Polymerase in vitro in RNA transkribiert und nach Konzentrationsbestimmung der isolierten Proben-RNA (200ng je Ansatz) in variierenden Mengen zugesetzt (750 fg 250 pg). In einem ersten reversen Transkriptionsschritt wird die RNA in cDNA umgeschrieben und dann in die PCR eingesetzt. Zunächst erfolgt eine Amplifikation mit 13 Zyklen in der ersten und eine weitere mit 30 Zyklen in der nachfolgenden „nested“ PCR. Die Quantifizierung der mit Ethidiumbromid gefärbten PCR-Produkte im Agarosegel erfolgt densitometrisch. Bei Auftragung der Peakflächen von Probe und internem Standard erhält man am Äquivalenzpunkt die Konzentration der  $\beta_2$  AR-mRNA. Pro H9c2-Zelle konnten  $\bar{x} = 4,4 \pm 0,2$  pg Gesamt-RNA isoliert werden. Bei Durchführung der RT-nPCR an 6 aufeinanderfolgenden Tagen ergab sich ein Gehalt an  $\beta_2$ -AR-mRNA von  $\bar{x} = 33,3 \pm 11$  pg/ $\mu$ g Gesamt RNA ( $n = 6$ ;  $v_k = 3\%$ ). Kinetik und Ausmaß der  $\beta_2$ -AR-mRNA Konzentration und der  $\beta_2$ -Rezeptordichte nach Stimulation der Zellen mit Isoproterenol werden vorgestellt.

### Literatur:

Kimes, B.W.; Brandt, B.L. (1976): Properties of a clonal muscle cell line from rat heart; Exp. Cell. Res. 98: 367 - 381.

## 29 Search for new genes associated with malignant hyperthermia susceptibility (MHS)

T. Deufel<sup>1</sup>, R. Sudbrak<sup>1</sup>, D.E. Iles<sup>2</sup>, F. Lehmann-Horn<sup>3</sup>  
<sup>1</sup>Kinderklinik der Universität, Münster, <sup>2</sup>Department of Cell Biology and Histology, Catholic University, Nijmegen, Niederlande, <sup>3</sup>Abt. Angewandte Physiologie, Universität Ulm, Germany

Evidence from linkage studies has established genetic heterogeneity of the MHS trait (1, 2, 3), and non-linkage to the MHS1 locus on chromosome 19 is suggested in up to half of the pedigrees (4).

We have excluded potential candidates from the etiology of MH, such as genes coding subunits of the dihydropyridine receptor in muscle as well as a broadly expressed ryanodine receptor (RyR3) and the muscle sodium channel (SCN4A). Using highly polymorphic

PCR-based microsatellite markers we have excluded a 84 cM interval on chromosome 17q suggested to contain a putative MHS2 locus (5).

In one pedigree we found cosegregation of the MHS trait with a polymorphic marker close to the gene encoding the  $\alpha 2/\delta$ -subunit of the L-type voltage-dependent calcium channel (dihydropyridine receptor) on chromosome 7q (6).

A European collaborative mapping project with markers covering the entire genome is currently under way. Three regions of interest with lod scores approaching 3.0 have been identified so far, all of them present only in single pedigrees and excluded in the others. These results would indicate even greater genetic homogeneity for MHS than hitherto expected.

#### References:

1. T. Deufel, et al. (1992): *Am. J. Hum. Genet.* 50, 1151.
2. R. Levitt, et al. (1991): *Genomics* 11, 543.
3. D. Iles, et al. (1992): *Genomics* 14, 749.
4. S. Ball, K. Johnson (1993): *J. Med. Genet.* 30, 89
5. R. Sudbrak, et al. (1993): *Hum. Molec. Genet.* 2, 857
6. D. Iles, et al. (1994): *Hum. Molec. Genet.* 3, 969.

## 30 Die Zelllinie BV 173 als Positivkontrolle für den Nachweis All-spezifischer BCR/ABL-Fusionstranskripte

G. Dinnebier, M. Vogel, S. Gehrish, W. Jaroß  
Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin,  
Universitätsklinikum Carl Gustav Carus der Technischen  
Universität Dresden

Die Zelllinie BV 173 (1) enthält das Philadelphia-Chromosom [Translokation t(9;22)] mit einem bei CML und ALL vorkommenden b2 - a2 Bruchpunkt innerhalb der M-bcr [major breakpoint cluster region; M-bcr-Exon 2 gekoppelt an ABL-Exon 2 in der mRNA als BCR/ABL-(Gen)Rearrangement, dem molekulargenetischen Äquivalent zur t(9;22)] (2). Nach reverser Transkription der mRNA von BV 173-Zellen in cDNA konnten wir mittels nested PCR auch einen ALL-spezifischen Bruchpunkt in der m-bcr (minor breakpoint cluster region) nachweisen. Bestätigt wurde das unerwartete Resultat durch Einzelstrang-Festphasensequenzierung der durch PCR amplifizierten Fusions-Region von BCR-Exon 1 und ABL-Exon 2 mit dem PRISM Sequenase Terminator Kit auf dem 373A DNA Sequencer (beide von Applied Biosystems).

Da es keine kommerziell erhältliche Philadelphia-Chromosompositive ALG-Zelllinie mit Bruchpunkt des BCR-Gens in der m-bcr gibt, empfehlen wir die als Positivkontrolle für Bruchpunkte des BCR-Gens in der M-bcr häufig genutzte Zelllinie BV 173 nun auch gleichzeitig als Positivkontrolle für den Nachweis des ALL-spezifischen BCR/ABL-Rearrangements in der m-bcr. Die Zelllinie ist leicht auch bei FKS-Konzentrationen deutlich unter 10% in Kultur zu halten.

1. Pegoraro, L., et al. (1983): *JNCI* 70 447 - 453.
2. Hooberman, A. L., et al. (1989): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 4259 - 4263.

## 31 Darstellung einiger Qualitätsmerkmale von Schilddrüsen-Hormonbestimmungen anhand der Ringversuchsergebnisse 3/93 bis 2/94 der DGKC

P. Diziol, H. Pfuhl, E. Spanuth  
Boehringer Mannheim GmbH, Wissenschaftliches Referat  
Diagnostica, Sandhofer Straße 116, 68305 Mannheim

Die Ergebnisse der vier Ringversuche 3/93 bis 2/94 der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie werden für die Parameter TSH, FT4 und FT3 als Übersicht und im Verlauf dargestellt. Damit wird zusätzlich zur Präzision und Richtigkeit – die Kontinuität der Ringversuchsergebnisse aufgezeigt und daraus ein weiteres Qualitätsmerkmal neu eingeführt.

Die Auswertung des Verlaufes ist möglich, weil je nach Analyt der Gesamtmedian eines jeden Ringversuches als Bezugspunkt relativiert wird, indem er als 100% definiert wird. Daraus resultiert, daß die methodenspezifischen Mediane [sowie deren Streubereiche (16 – 84% Perzentile)] der vier Ringversuche im Vergleich zu einem einzigen Bezugspunkt beurteilt werden können.

Zusätzlich kann durch dieses Verfahren zu den üblichen Informationen über Präzision und Richtigkeit die Langzeitqualität von Testmethoden und die Chargenkonstanz beurteilt werden.

Die Ergebnisse der Ringversuche zeigen bei dem freien Hormon FT3 die vergleichend graphisch dargestellten Wiederfindungen unter den Testbestecken. Durch die Einbeziehung des zeitlichen Verlaufs wird die Meßwertqualität der unterschiedlichen Methoden vergleichend über den betrachteten Zeitraum verfolgt.

Wird diese Auswertemethode kontinuierlich weitergeführt, so kann die Kontinuität der Testqualität dokumentiert und bei Veränderungen frühzeitig Fehler vermieden werden.

## 32 Läßt sich der Verlauf einer radiogen induzierten Lungenfibrose in Ratten anhand ausgewählter Plasmaenzyme beschreiben?

A. Dörfler<sup>1</sup>, G. Blasek<sup>1</sup>, M. FüsseP, P. Geyer<sup>1</sup>, A. Knorr<sup>1</sup>, R. Kumpf<sup>1</sup>, D. Schuh<sup>2</sup>, Th. Herrmann<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Universitätsklinikum Carl Gustav Carus der TU Dresden Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie; <sup>2</sup>Institut für Immunologie; <sup>3</sup>Institut für Pathologie

Klinisch-chemische Parameter des peripheren Blutes zu Ausmaß und Progression der Lungenfibrose sind in der Routinediagnostik wenig gebräuchlich (1). Das Ziel der vorliegenden Untersuchung bestand darin, anhand ausgewählter kataboler Plasmaenzyme den Verlauf der radiogenen Lungenfibrose in einem Tiermodell zu beschreiben. Dazu wurde der rechte Lungenflügel von Ratten an einem Linearbeschleuniger Neptun 10 p bestrahlt. Der angewandte Dosiswert 1 x 20 Gy löste mit Sicherheit eine Fibrose aus. Der Versuchszeitraum betrug maximal 6 Monate post radiationem. Unbestrahlte Ratten dienten als Kontrollen. Das Ausmaß der Lungenfibrose wurde durch histologische Untersuchungen gesichert. Es wurden folgende Plasmahydrolasen bestimmt: N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG; EC 3.2.1.30),  $\beta$ -Glucuronidase ( $\beta$ -Glu; EC 3.2.1.31), Arylsulfatase (ASA, EC 1.1.6.1) und Angiotensin Converting Enzyme (ACE; EC 3.4.15.1). Bei den bestrahlten Tieren zeigten die untersuchten Enzyme differenzierte Veränderungen: NAG,  $\beta$ -Glu und ASA wiesen 1 bis 4 Wochen p.r. Anstiege auf. Anschließend war eine Abnahme zu beobachten, die für die NAG und  $\beta$ -Glu bis zum Versuchsende anhielt, während die ASA 6 Monate p.r. auf 200% der Kontrollwerte anstieg. Für das ACE wurde ab 3. Woche p.r. bis zum Ende ein signifikanter Abfall registriert. Während die erhöhten Werte p.r. als akute Reaktion im Sinne einer Strahlenpneumonitis zu interpretieren sind, korreliert die stetige Abnahme der lysosomalen

Exoglycosidasen mit der histomorphologischen Lungenfibrose als radiogene Spätreaktion. Das ACE, das als Ectoenzym in den Endothelzellen pulmonärer Kapillaren lokalisiert ist, eignet sich ebenfalls als Verlaufsparemeter für die Lungenfibrosierung.

1. Kropf, J.; Gressner, A.M. (1991): Z. med. Lab. diagn. 32, 150 - 158. Die Arbeit wurde vom BMFT (Reg.Nr. 07 NBL 03) unterstützt.

### 33 Evaluierung des AMGA Gerinnungsautomaten

H.H., Drossel, H.-A. Fabricius  
Abt. für Laboratoriumsmedizin, Krankenhaus Am Urban, Berlin

Der Gerinnungsautomat AMGA der Firma Amelung erfüllt als offenes, an alle Reagenzien adaptierbares selektives Mehr-Kanal-Analysesystem die Anforderungen der haemostaseologischen Labor-diagnostik. Routine- und Spezialparameter können wahlweise als kugelkoagulometrische Tests mit mindestens 75 µl Gesamtvolumen in einer miniaturisierten Küvette, als optische Trübungsmessungen oder als chromogene Tests bei 405 nm, optional nachrüstbar auch bei 340 nm Wellenlänge, erstellt werden. Die Probenzuführung erfolgt über eine Kette mit automatischer Barcode-Identifizierung am Primärgefäß, für Notfallproben stehen 6 STAT-Positionen zur Verfügung, bidirektionaler on-line-Betrieb ist möglich.

Ein Pipettierarm mit Hamiton-Spritze dosiert Plasma und auf 15 °C temperiertes Inkubationsreagenz aus 16 Reagenzpositionen, ein Polar-Roboter transferiert die Küvetten aus dem Inkubationsrad in einen der 6 kugelkoagulometrischen oder 8 optischen Meßplätze, die Startreagenz-Zugabe aus Level-Sensor-überwachen, wahlweise auf 37 °C oder 25 °C temperierten Reagenzpositionen, erfolgt mittels 8 Schlauchpumpen mit zeitgesteuerter Rückpumpautomatik.

Bei den Parametern TPZ (mit konventionellem und gentechnisch hergestelltem Reagenz), PTT, quant. Fibrinogen nach Claus und AT3 lagen - bei jeweils mehreren Reagenzien - die inter-assay Variationskoeffizienten überwiegend < 1%, alle < 3%, die intra-assay Variationskoeffizienten bei < 5%, die TPZ-Korrelationskoeffizienten zweier Reagenzien zwischen kugelkoagulometrischer und optischer Messung am AMGA bei > 0,993.

Als offenes, im Vergleich mit anderen Automaten schnelles Analysensystem wird der AMGA den differenzierten Anforderungen eines haemostaseologischen Labors mit hohem Probenaufkommen sehr gut gerecht.

1. Kotde, H.J. et al. (1993): Klin. Lab. 10: 767 - 776.  
2. Gurr, E. et al. (1992): Lab. med. 16: 161 - 169.

### 34 Imbalance between cathepsin B and its inhibitors in lung tumor tissue

W. Ebert, B. Werle, H. Knoch  
Thoraxklinik Heidelberg-Rohrbach, Heidelberg, Germany

The cysteine proteinase cathepsin B (CB) might play a role in the process by which cancer cells invade into host tissue and metastasize to secondary sites (1). In the present study, the relationship between the activities of CB and its endogenous cysteine proteinase inhibitors (CPI's) was investigated in 69 matched pairs of tumor tissue and adjacent normal lung parenchyma obtained at surgery. CB activity was measured in tissue homogenates using the fluorogenic substrate Z-Arg-Arg-AMC. CPI activity was assayed with papain as target enzyme by means of the substrate Z-Phe-Arg-AMC (2).

In tumor tissue, specific activities of CB and CPI's were found to be increased 4.4-fold and 2-fold, respectively. Although the majority of

tumor samples had increased CPI activity levels compared to the controls, we could clearly demonstrate an imbalance between the activities of CB and CPI's by determining the ratio of both values. In normal lung parenchyma, the median ratio was 0.59 indicating that CB activity is controlled by excess inhibitors, while in tumor tissue the median ratio was 1.78 suggesting deficiency of inhibitors. There was a significant correlation between CB and CPI activities in normal tissue ( $r = 0.65$ ,  $p < 0.001$ ). No such relationship was observed in the total of tumor tissue. In squamous cell carcinoma ( $n = 30$ ), however, an inverse relationship between the activities of CB and CPI's was observed ( $r = -0.45$ ,  $p < 0.01$ ).

Both, CB activity ( $p = 0.046$ ) and the ratio of CB: tumor-control/CPI: tumor-control ( $p = 0.014$ ), were found to be related to survival probability, since increased values were significantly associated with poorer prognosis.

It is concluded, that the imbalance between CB and its inhibitors is of prognostic significance in lung tumor patients.

1. Sloane, B.F. (1990): Cathepsin B and cystatins in tumor progression. Semin Cancer Biol. 1: 153 - 160.  
2. Barrett, A.J.; Kirschke, H. (1981): Cathepsin B, cathepsin H and cathepsin L. In: Methods in Enzymology. Lorand L (ed.). Academy Press, New York, pp 535 - 561.

### 35 Einfluß thyreostatischer Therapie auf die menschliche hepatische 5'Deiodination

V. Ellenrieder, Ch.-F. Wolf, A. Grünert  
Institut für Klinische Chemie, Universität Ulm, 89070 Ulm

Die hepatische (Typ I)  $T_3$ -5'Deiodination (5'D) stellt etwa 40% des zirkulierenden  $T_3$  bereit. Wir untersuchten den Einfluß von Propylthiouracil (PTU), Carbimazol (CARB), Perchlorat (PCL) und Iopansäure (IOP) auf die 5'D der menschlichen Leber. Zur Bestimmung der 5'D-Aktivität werden 100 µg mikrosomales Protein mit  $^{125}J$  5' markiertem  $rT_3$  (0.1 - 2 µM) (Substrat) und dem reduzierenden Cosubstrat Dithioerythritol (DTE; 0.5 - 10 mM) über 10 Minuten inkubiert. Unterschiedliche Konzentrationen an IOP (0 - 1 mM), CARB (0 - 5 mM), PCL (0 - 20 mM) und PTU (0.001 - 1 mM) wurden cointubiert. Die Aktivität an freigesetzten  $^{125}J$  wurde gemessen und equimolar als 5'D-Aktivität (pmol( $T_3$ /mg(prot.)\*min) umgerechnet. Die apparenten Werte für  $k_m$ ,  $V_{max}$  und  $k_i$  wurden graphisch in Lineweaver-Burk plots ermittelt. Für das Substrat  $rT_3$  beträgt die apparente  $k_m$  0.8 µM, die  $V_{max}$  13.8 pmol/mg\*min. Die Hemmung der  $rT_3$  Deiodination durch PTU ist uncompetitiv ( $k_i = 0.5$  µM). Das Cosubstrat DTE wird durch PTU competitiv verdrängt ( $k_i = 0.6$  µM). IOP hemmt die  $rT_3$  Deiodination competitiv ( $k_i = 10$  µM). Iopansäure und DTE interferieren competitiv ( $k_i = 3.8$  µM). CARB oder PCL zeigten in-vitro keinen inhibitorischen Effekt auf die 5'DA. Vermittels der menschlichen hepatischen 5'Deiodination haben PTU und IOP, nicht aber CARB oder PCL eine zusätzliche „thyreostatische“ Wirkung.

### 36 The amount of sulfate and 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate compared with proteoglycan synthesis in cultures of human chondrocytes

G. Fedders, E. van de Leur, H. Greiling  
Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, RWTH Aachen, Pauwelsstraße 30, 52057 Aachen, Germany

Sulfate and the active sulfate donor 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) are main precursor molecules in the biosynthesis of proteoglycans (PG). The amount of different sulfated disaccharide



units in the glycosaminoglycan side-chains of PG plays an important part in the function of PG. Because of their polyanionic character they can bind other molecules, especially water, and provide resilience of the cartilage. Here we report on a method to extract and determine sulfate ion and PAPS from cultured chondrocytes. Sulfate was quantified by ion chromatography with conductivity measurement, the amount of PAPS could be detected after HPLC on a Partisil SAX column by  $^{35}\text{S}$ -sulfate incorporation. To investigate a relationship of sulfate and/or PAPS concentration with the amount of PG in cultured human articular chondrocytes we studied the effect of IL-1 $\beta$  and PDGF, which are known to inhibit or to activate the PG production. Our investigation showed that in the presence of different concentrations of IL-1 $\beta$  the  $^{35}\text{S}$ -sulfate incorporation in PG decreased. An effect of IL-1 $\beta$  on the concentrations of the intracellular levels of sulfate ion and PAPS was not found. PDGF AB and PDGF BB stimulated the PG synthesis in chondrocytes, but an influence of these cytokines on the amount of sulfate and PAPS was not detectable. Furthermore we analyzed the effect of acetaminophen in chondrocytes because high doses of this substance are noted for decreasing the intracellular levels of sulfate ion and PAPS e.g. in liver. The trapping effect of acetaminophen was not obtained in cultured chondrocytes. Additionally phenolsulfotransferase activity could not be detected in chondrocyte lysates, but in hepatocyte lysates (control) the enzyme activity was proved. The intracellular concentration of sulfate and PAPS was nearly constant even when chondrocytes were treated with acetaminophen, IL-1 $\beta$ , and PDGF.

### 37 Reforms of education and training in Laboratory medicine in Hungary

A. Ferencz<sup>1</sup>, L. Dux<sup>2</sup>, M. Kellermayer<sup>3</sup>, L.G. Kovács<sup>4</sup>, L. Muszbek<sup>5</sup>  
<sup>1</sup>I. Haynal University of Health Sciences, Budapest; <sup>2</sup>A. Szentgyörgyi Medical University, Szeged; <sup>3</sup>Medical University, Pécs; <sup>4</sup>County Hospital, Szombathely; <sup>5</sup>Medical University, Debrecen

Reforms of education, continuing and training in the fields of laboratory medicine are partly on the way and partly planned in Hungary. Presently technicians are trained in the frame of a two year course after final examination at a secondary school and having a full time job in a medical laboratory. Technicians can obtain a further qualification either in clinical chemistry or microbiology after a further one year course. At the universities clinical chemistry is taught as an undergraduate discipline. For MD-s and pharmacists qualification in laboratory medicine can be obtained the frame of continuing education. In Hungary our aim is to change training of technicians to training of technologists in a college curriculum giving a BSc degree (involving the possibilities of a master degree, or even a PhD) at the universities of Budapest, Debrecen, Pécs and Szeged, respectively. Curricula are under development for technologists, for medical students, and for candidates for specialists in laboratory medicine. Presently in Hungary there is an annual requirement of 200 technologists and 25 specialists in laboratory medicine.

### 38 The pH-dependent distribution of $\text{NH}_4^+$ in human blood

F. da Fonseca-Wolheim  
 Zentrallaboratorium, Krankenhaus Berlin-Zehlendorf

After exercise causing metabolic acidosis the ammonia distribution between plasma and blood cells is changed (1). As ammonia in blood exists mainly in the  $\text{NH}_4^+$  form, this may be due to the pH-dependent Gibbs-Donnan effect (2).

To determine  $r_{\text{ammonia}} = \frac{C_{\text{plasma}}}{C_{\text{cells}}}$  at various plasma pH values, blood samples from healthy subjects were equilibrated with gas

mixtures of different  $\text{pCO}_2$ . After addition of 87  $\mu\text{mol/l}$   $\text{NH}_4\text{Cl}$ , blood cells were separated under anaerobic conditions at 37° C. From the recovery of ammonia in plasma, the haematocrit value and the water content of the samples, we calculated the actual concentrations of ammonia in plasma water and blood cell water and finally the values of  $r_{\text{ammonia}}$  for oxygenated blood in the pH range between 7.0 and 7.7. For comparison, the  $\text{H}^+$  distribution ratio ( $r_{\text{H}^+}$ ) was determined by potentiometry. At pH 7.4 the values of  $r_{\text{ammonia}}$  and  $r_{\text{H}^+}$  were 0.57 and 0.61, respectively. The pH dependency of  $r_{\text{ammonia}}$  is described by:  $r_{\text{ammonia}} = 2.68 - 0.286 \cdot \text{pH}$  ( $r = -0.91$ ), which fairly agrees with the equation for the proton distribution ratio (3).

Conclusions: 1. It is necessary to realise that, in the physiological pH range, ammonia predominantly exists as ammonium ion, the distribution of which is governed by the Gibbs-Donnan effect in a pH-dependent manner. 2. pH changes during processing of the blood sample (e. g., by loss of  $\text{CO}_2$  or pH-different additives) have to be avoided as they will cause changes in the actual plasma ammonia concentration. 3. The ratio of the ammonia concentrations in whole blood and plasma is not constant but depends on the pH and haematocrit value.

#### References:

- Harris, R.T.; Dudley, G.A. (1989): Exercise alters the distribution of ammonia and lactate in blood. *J. Appl. Physiol.* 66, 313 - 317.
- Netter, H. (1929): Gehorcht die Ammoniakverteilung auf Blutkörperchen und Serum den Membrangeleichgewichten? *Pflügers Arch.* 222, 724 - 737.
- Funder, J.; Wieth, J.O. (1966): Chloride and hydrogen ion distribution between red cells and plasma. *Acta Physiol. Scand.* 68, 234 - 245.

### 39 Quantitation of soluble HLA-DR molecules in sera of patients with septicemia and heart transplant recipients

L. Franke<sup>1</sup>, W.-D. Döcke<sup>2</sup>, R. v. Baehr<sup>2</sup>, K. Kleesiek<sup>1</sup> und T. Porstmann<sup>3</sup>  
<sup>1</sup>Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin, Herz- und Diabeteszentrum NRW, Bad Oeynhausen, <sup>2</sup>Institut für Medizinische Immunologie, Universitätsklinikum Charité, Berlin; <sup>3</sup>Seramun Diagnostica GmbH, Dolgenbrodt

In septic disease, in case of iatrogenic immunosuppression, after burn or trauma a decrease in HLA-DR expression on monocytes often goes along with „immunoparalysis“ and lethal outcome (1). For more simple and standardized investigation of this phenomenon we established an assay for the quantitation of soluble HLA-DR molecules (sHLA-DR) as a marker for „immunoparalysis“. Using different monoclonal antibodies a sensitive, simultaneous ELISA for sHLA-DR quantitation with a detection limit of about 20 ng/ml was developed. No correlation between soluble and cell surface associated HLA-DR molecules was found. However, there is a difference between sHLA-DR levels in septic patients and healthy individuals. The role of sHLADR molecules in the regulation of immune responses in septicemia, after transplantation of solid organs and other diseases will be object of further investigations.

- Volk, H.-D.; Lohmann, T.; Heym, St., et al. (1992): Association between monocytic function and clinical outcome of sepsis. *The Microbiologist* 3: 20 - 26.



## 40 Glykosaminoglykan-Gehalt und -Verteilungsmuster im Serum von Patienten mit Diabetes mellitus (Typ I)

N. Gässler<sup>1</sup>, D. Braun<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zentrallabor der CTT in Wittlich und <sup>2</sup>Med. Endokrinologie der MHH in Hannover

**Einleitung:** Glykosaminoglykane sind Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix. Bei Patienten mit angeborenem Diabetes mellitus werden erhöhte Glykosaminoglykan-Konzentrationen im Urin gemessen (1). Ein Zusammenhang zwischen der Konzentrationserhöhung und einer, durch die Grunderkrankung sekundär bedingten Nephropathie scheint gesichert (2).

**Methode:** Aus Serum von 12 weiblichen und 12 männlichen Patienten wurden die Glykosaminoglykane nach der Methode von (3) bestimmt. **Ergebnisse:** Der Gesamt-Glykosaminoglykan-Gehalt in den pathologischen Seren entspricht ungefähr dem entsprechenden Gehalt in den Seren von gesunden weiblichen Probanden, ist jedoch etwas höher als die entsprechende Konzentration in gesunden männlichen Probanden. Es wurde für das Chondroitin-6-sulfat eine 3- bzw. 6fache, signifikante Konzentrationserhöhung von Disacchariden in der Gruppe der Diabetiker ermittelt. Bei Männern ist die Konzentration von Chondroitin in den pathologischen Seren doppelt so hoch gegenüber Gesunden. Die weiterhin nachgewiesenen Glykosaminoglykan-Disaccharide Chondroitin-4-sulfat, Dermatan, Dermatan-4-sulfat, -6-sulfat und Hyaluronan werden in gleicher Konzentration gegenüber der Vergleichsgruppe gefunden.

**Diskussion:** Auffallend ist die erhöhte Konzentration von Chondroitin-6-sulfat in allen der untersuchten pathologischen Seren, von der hier erstmalig berichtet wird. Da Chondroitin-6-sulfat bei Gesunden lediglich im Urin in höherer Konzentration vorliegt, wird die Konzentrationserhöhung bei den Diabetikern im Sinne einer Nephropathie interpretiert. Eventuell könnte für Menschen mit erhöhtem Chondroitin-6-sulfat eine Prädisposition für Diabetes vorliegen.

### Literatur:

1. Gambero, G.; Cicerello, E.; Mastro Simone, S.; Lavagnini, T.; Baggio, B. (1989): *Metabolism* 38, 419 - 420.
2. Reddi, A.S. (1990): *Clin. Chim. Acta* 189, 211 - 220.
3. Gässler, G.; Reißner, C.; Janzen, H.; Kähnert, H.; Kleesiek, K. (1993): *Eur. J. Clin. Chem. Biochem.* 31, 503 - 511.

## 41 Totaluntersuchung eines Gens am Beispiel der Lipoprotein Lipase (LPL)

S. Gehrlich, M. Steinke, H. Kostka, I. Hoche, U. Julius, W. Jaross  
*Universitätsklinikum C. G. Carus; Technische Universität Dresden, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Abteilung Klinische Stoffwechselforschung, 01307 Dresden*

Für die kausale Aufklärung der Ursachen genetisch bedingter Krankheiten wird in Zukunft die Totalsequenzierung entsprechender Kandidatengene eine wichtige Untersuchung sein. Am Beispiel der sequenzanalytischen Untersuchung der LPL bei insgesamt 38 nicht-verwandten Patienten mit exzessiver Hypertriglyceridämie (unter Diät und Medikation TG > 5.70 mmol/l) werden die Ergebnisse der diagnostischen Festphasensequenzierung dargestellt. Die Exons zwei bis neun der LPL wurden individuell amplifiziert (1) und anschließend wurde die diagnostische Festphasensequenzierung (2) mit dem PRISM™ T7 Kit am automatischen DNA Sequenzierer 373A (Applied Biosystems GmbH) durchgeführt.

Insgesamt wurden 342 Exons (ca. 51 000 bp kodierende Sequenzen) analysiert und 17 heterozygote Mutationsstellen gefunden. Diese Mutationen lassen sich wie folgt unterteilen: Missense Mutationen Asp<sup>9</sup>->Asn (n = 3), Glu<sup>103</sup>->Asp (1), Gly<sup>100</sup>->Glu (2), Asn<sup>291</sup>->Ser (4); Nonsense Mutation Ser<sup>47</sup>->Stop (2); Silent Mutationen Glu<sup>118</sup> (1)

und Thr<sup>361</sup> (4). Die 10 Missense Mutationen, die in 9 Patienten gefunden (23,7%) wurden, können für die exzessive Hypertriglyceridämie ursächlich verantwortlich sein.

1. Gotoda, T. et al. (1991). *J. Clin. Invest.* 88: 1856-1864.
2. Gehrlich, S., Jaroß, W. (1993): *Klin. Lab.* 39: 887 - 894.

## 42 Bedeutung des Apolipoprotein-E-Genotyps für Gedächtnisverlust und Demenz im Alter

R. Geßner<sup>1</sup>, F.M. Reischies<sup>2</sup>, A. Kage<sup>1</sup>, B. Geiselmann<sup>2</sup>, M. Borchelt<sup>2</sup>, E. Steinhagen-Thiessen<sup>3</sup>, E. Köttgen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Klinische Chemie und Biochemie, <sup>2</sup>Psychiatrische Klinik <sup>3</sup>Medizinische Klinik, Universitätsklinikum Rudolf Virchow, Freie Universität Berlin, 14050 Berlin

Die Bestimmung des Apolipoprotein E Polymorphismus wird seit längerem im Rahmen der Lipidanalytik zur Ermittlung des individuellen Atheroskleroserisikos eingesetzt. Kürzlich konnte anhand von Familienuntersuchungen gezeigt werden, daß das Apolipoprotein E4-Allel (ApoE4) offenbar nicht nur mit einem erhöhten Atheroskleroserisiko verbunden ist, sondern auch mit der Manifestation der Alzheimer-Erkrankung nach dem 60. Lebensjahr. Da alle bisherigen Studien an ausgewählten Patienten durchgeführt worden sind, war es von großer Bedeutung, diesen Zusammenhang anhand einer geeigneten epidemiologischen Untersuchung zu überprüfen. Zudem stellten wir uns die Frage, ob aufgrund des progredienten Verlaufs dieser schweren neuropsychiatrischen Erkrankung bei Trägern des ApoE4-Allels gehäuft Symptome einer beginnenden Demenz, wie z. B. Gedächtnisverlust, zu finden ist.

Im Rahmen der Berliner Altersstudie (BASE) wurde der ApoE-Genotyp von 477 sehr alten Probanden (70 bis 104 Jahre) mittels DNA-Amplifikation und Restriktionsfragment-Längenpolymorphismusanalyse bestimmt. Die Diagnose von Demenz erfolgte gemäß den DSM-III-Rund von M. Alzheimer gemäß den NINCDS-Richtlinien. Die Gedächtnisleistung wurde u. a. mit dem ECR-Score quantifiziert, einem sehr sensitiven und zuverlässigen Verfahren.

Gegenüber publizierten Daten fanden wir eine auffällige, altersabhängige Reduktion des ApoE4-Allels, die im Sinne einer negativen Selektion interpretiert werden kann. Ein Vergleich des häufigsten Genotyps, ApoE3/3 mit dem zweithäufigsten, ApoE4/3, ergab eine über 30% höhere Prävalenz der DSM-III-R-definierten Demenz und eine über 100% höhere Prävalenz des NINCDS-definierten M. Alzheimer in letzterer Gruppe. Dieser Unterschied verstärkte sich mit zunehmenden Alter. Träger von mindestens einem ApoE4-Allel wiesen gegenüber denen ohne ApoE4-Allel in allen durchgeführten kognitiven Tests eine signifikant geringere Gedächtnisleistung auf.

Die vorliegende epidemiologische Studie zeigt eine signifikant vermehrte Auftreten des M. Alzheimer bei Trägern des ApoE4-Allels, das jedoch in seinem Ausmaß geringer ausfällt als bei den vorangegangenen Familienuntersuchungen. Träger des ApoE4-Allels wiesen darüber hinaus eine signifikant verminderte Gedächtnisleistung auf. Daher könnte eine Kombination aus ApoE-Genotypisierung und neuropsychologischen Tests helfen, Patienten mit einem erhöhten Risiko für M. Alzheimer zu identifizieren, und so einen frühzeitigen Therapiebeginn ermöglichen.

## 43 Funktionelle Untersuchungen des LI-Cadherins

R. Geßner<sup>1</sup>, B. Kreft<sup>1</sup>, D. Berndorf<sup>1</sup>, A. Böttinger<sup>1</sup>, N. Schnoy<sup>2</sup>, P. Bringmann<sup>3</sup>, R. Tauber<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Institut für Klinische Chemie und Biochemie; <sup>2</sup>Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Rudolf Virchow, Freie Universität Berlin und <sup>3</sup>Schering AG, Berlin

Die spezifische Assoziation einzelner Zellen bei der Ausbildung von Geweben und Organen während der Embryogenese wird durch den genauen zeitlichen Ablauf der Expression bestimmter Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) bestimmt. Auch bei Regenerationsvorgängen im adulten Organismus und bei pathologischen Prozessen, wie der Tumormetastasierung, ist die spezifische Zelladhäsion von großer Bedeutung. Kürzlich konnten wir in der Ratte ein neuartiges Zelladhäsionsmolekül aus der Familie der Cadherine identifizieren, das in Leber und Darm exprimiert wird und deshalb von uns als LI-Cadherin bezeichnet worden ist. Da das LI-Cadherin wesentliche Unterschiede in seiner Proteinsequenz gegenüber den klassischen Cadherinen aufweist, haben wir seine Struktur und Funktion näher charakterisiert.

Durch Proteaseverdau in Anwesenheit und Abwesenheit von Calcium-Ionen konnten wir zeigen, daß sowohl das membranständige als auch das isolierte, immunaffinitätsgereinigte LI-Cadherin durch Calcium-Ionen gegen Proteolyse geschützt wird. Durch letzteres Experiment konnte ein indirekter Effekt der Calciumionen mittels Stabilisierung der Plasmamembranen ausgeschlossen werden. Der Nachweis hochaffiner Calciumbindungsstellen, die wahrscheinlich für diese Stabilisierung und für das Calcium-abhängige Bindungsverhalten verantwortlich sind, gelang durch die Bindung von radioaktiven Calcium-45-Ionen in Anwesenheit von Magnesiumionen an das isolierte Protein.

Zur näheren Charakterisierung seiner Bindungseigenschaften wurde das LI-Cadherin in *Drosophila* S2-Zellen heterolog exprimiert. Weil S2-Zellen keine eigenen CAMs exprimieren und daher in Suspension wachsen, stellen sie ein ideales Modellsystem für Adhäsionsstudien dar. In diesem System bilden transizierte S2-Zellen nach der Induktion der LI-Cadherin-Expression große Aggregate, die über einen Reaggregationsassay eine Quantifizierung der Zelladhäsion erlauben. Sowohl die zuvor an natürlicherweise LI-Cadherin exprimierenden Ratten-Hepatomzellen beobachtete Calciumabhängigkeit der Zelladhäsion als auch die Adhäsions-Inhibition durch LI-Cadherin-spezifische Antikörper konnte mit dem neuen System verifiziert werden. Der große Vorteil des heterologen Expressionssystem besteht jedoch darin, daß durch die Einführung gezielter Mutationen die Bedeutung einzelner Proteindomänen für das homophile Bindungsverhalten der Cadherine quantifiziert werden kann und so Einblicke in die molekularen Grundlagen der Cadherin-vermittelten Zelladhäsion bis hin zur Bedeutung einzelner Aminosäuren gewonnen werden können.

## 44 Produktion von ANP in der Herzzellkultur H9c2

Jeanette Giray, Christiane Lauk, D. Ratge, K.P. Kohse, H. Wisser  
Abt. für Klinische Chemie, Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart, Deutschland

Das atriale natriuretische Peptid (ANP) ist ein wichtiger Regulator der Flüssigkeits-, Elektrolyt- und Blutdruckhomöostase. Es wird in den Cardiomyocyten des Herzvorhofs gespeichert und als Antwort auf einen Dehnungsreiz des Vorhofs in den Blutkreislauf abgegeben. ANP steigert die Natriurese und Diurese und wirkt relaxierend auf die glatte Muskulatur der Gefäße. Wir berichten über die Produktion von ANP in der etablierten Herzzelllinie H9c2 (ATCC; Kimes & Brandt, 1976), die von embryonalem Gewebe von Rattenmyoblasten abstammt. Mittels Radioimmunoassay (RIA) konnte in den Zellen immunoreaktives ANP (irANP) nachgewiesen werden. Als

Basiswert wurden  $22 \pm 3$  fmol irANP/50 000 Zellen bestimmt. Dagegen lies sich im Extrazellulärmedium kein sezerniertes irANP nachweisen. Die intrazelluläre irANP-Konzentration stieg nach Stimulation mit adrenergen Agonisten und 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetat (TPA) an. Dabei waren maximale irANP-Werte sowohl nach Zugabe von TPA ( $10^{-6}$  M) als auch bei Stimulation mit  $10^{-8}$  M Isoproterenol zu beobachten. Auch Adrenalin ( $10^{-8}$  M) hatte einen ausgeprägt positiven Effekt auf die intrazelluläre irANP-Produktion. Durch Noradrenalin hingegen wurde nur ein geringer Anstieg der ANP-Produktion erzielt. Zugabe von Verapamil zu Isoproterenol-stimulierten H9c2-Zellen führte zur Inhibierung der irANP-Produktion. Als Beweis, daß es sich beim nachgewiesenen irANP um das native Ratten-ANP handelt, erfolgte parallel die PCR-Amplifikation eines bestimmten ANP-Genabschnittes von 448 Basenpaaren (Bp) Länge, der anschließend durch Sequenzierung bestätigt werden konnte. Zur Quantifizierung der ANP-mRNA dient die Methode der kompetitiven, quantitativen RT-PCR. Dazu wurde ein interner Standard durch Klonierung hergestellt. Er besteht aus dem Plasmid pGEM4Z, in das die ANP-Primer-Anlagerungsstellen inklusive eines dazwischen integrierten 125 Bp-Fragmentes des Plasmids pBR322 eingebaut worden sind. Ausgehend vom SP6-Promotor kann in vitro RNA dieses Inserts transkribiert werden. Diese führt dann als Kompetitor der nativen ANP-RNA in der RT-PCR zu einem PCR-Produkt geringerer Größe. Mit dieser Herzzellkultur der Ratte steht uns somit ein Modell zur Verfügung, das zur Untersuchung der Regulationsmechanismen am Herzen sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene bezüglich des ANP geeignet ist.

Kimes, B.W.; Brandt, B.L. (1976): Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp. Cell Res.*, 98, 367 - 381

## 45 Diagnostik antineutrophiler cytoplasmatischer Antikörper (ANCA)

I. Greif, A. Liermann, B. Wellstein, F.E. Krapf  
Medizinisch Immunologische Laboratorien, München

### Fragestellung

ANCA repräsentieren eine Gruppe von Antikörpern, die gegen cytoplasmatische Bestandteile neutrophiler Granulozyten und Monozyten gerichtet sind. Der Nachweis erfolgt klassischerweise durch indirekte Immunfluoreszenz an alkoholfixierten humanen Neutrophilen. Hierbei können aufgrund des Antigentyps, dessen Ladung und Verteilung Antikörper gegen cytoplasmatische (c-ANCA) oder perinukleäre Antigene (P- bzw. x-ANCA) differenziert werden. Durch die Charakterisierung der Antigene stehen in der Diagnostik auch ELISA-Techniken zur Verfügung. Beide Methoden sollen im weiteren verglichen werden.

### Methode

Über den Zeitraum eines Jahres wurden 1128 Patientenserum auf die Anwesenheit von ANCA getestet. Dabei kam die indirekte Immunfluoreszenz-Technik an ethanol- und formalinfixierten Granulozyten zur Anwendung. Positive Seren wurden in ELISA-Verfahren für Proteinase3 (PR3;c-ANCA) und Myeloperoxidase (MPO;p-ANCA) eingesetzt.

### Ergebnisse

ANCA wurden in 30% (336 von 1128) der Seren identifiziert, wobei ein cytoplasmatisches Muster in 204 Fällen (18%) und ein perinukleäres Muster in 132 Fällen (12%) gefunden wurden. Mittels ELISA ergaben sich für PR3 nur 17% positive Befunde, für MPO 9%. Es konnten Seren mit atypischen Fluoreszenzmustern (x-ANCA), die im ELISA negativ waren, identifiziert werden.

### Schlußfolgerung

MPO Immunfluoreszenz wies gegenüber den ELISA-Verfahren für MPO bzw. PR3 eine wesentlich höhere Sensitivität auf. Negative Befunde für die Immunfluoreszenz bei positiven ELISA traten nicht auf.

## 46 Bilateral hepatocyte-fat storing cell interactions might provide a pathogenetic vicious circle in liver fibrogenesis involving TGF- $\beta$ -mediated parenchymal cell apoptosis

A.M. Gressner, Birgit Lahme, \*H. G. Mannherz  
Dept. of Clinical Chemistry and Central Laboratory, \*Dept. of Anatomy and Cell Biology, Philipps University, 35033 Marburg, Germany

The crucial step in liver fibrogenesis turned out to be the „activation“ of perisinusoidal fat-storing cells (FSC) to extracellular matrix (ECM) expressing myofibroblasts (MFB) in areas of necroinflammation. Previously, we have resolved the cellular crosstalk of FSC with Kupffer cells (KC), platelets, and MFB in the activation process by paracrine signal transmission involving mainly TGF- $\beta$ , TGF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , and other cytokines (1). Now we focused on FSC-parenchymal cell (PC) interactions since PC are (i) most intimately connected with FSC in situ and (ii) PC necrosis precedes most frequently FSC activation in fibrogenesis.

### Methods

FSC and PC were isolated, purified, and cultured according to previously published methods. Cell interactions were studied either by coculture techniques or transfer of the respective conditioned media obtained from hepatocytes (PC<sub>CM</sub>) and myofibroblasts (MFB<sub>CM</sub>). In PC<sub>CM</sub> the mitogenic activity for FSC in monolayers under reduced fetal calf serum conditions was tested using established methods (<sup>3</sup>H] thymidine, bromodeoxyuridine, DNA). In MFB<sub>CM</sub> TGF- $\beta$ , was determined before and after activation by transient acidification using the mink cell bioassay. PC apoptosis induced by MFB<sub>CM</sub> or authentic rec. TGF- $\beta$ , was studied by measuring electrophoretic DNA-ladder, decrease of mitochondrial dehydrogenase activity (XTT-test), enzyme release into the medium, PC detachment, endonuclease activity and quantitation of nucleosomal DNA-fragments.

### Results

Authentic TGF- $\beta$ , and, similarly, MFB<sub>CM</sub> with activated TGF- $\beta$ , are able to induce time-dependently PC apoptosis established by increases of endonuclease activity, presence of DNA-ladder and nucleosomal DNA fragments in the detached cell fraction. Exposure as short as 1 h was sufficient to induce apoptosis in the following 1 to 4 days of PC culture. Conditioned media harvested from apoptotic PC had a strong mitogenic effect on FSC as evidenced by a more than 5-fold increase of [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation. Control PC<sub>CM</sub> had much less mitogenic potency for FSC.

### Conclusion

MFB, but also KC and platelets might produce in damaged liver tissue sufficient TGF- $\beta$ 1 to induce PC-apoptosis. In turn, apoptotic PC release potent mitogenic activity stimulating untransformed FSC to proliferate strongly. Thus, a pathogenetic vicious circle depending on FSC and (damaged) apoptotic PC interactions will favour the perpetuation of the fibrogenic process even after cessation of the primary event.

1. Gressner, A.M.; Bachem, M.G. (1994): Ann. Biol. Clin. 52: 205 - 226.

## 47 Study of the human CFTR promoter in transgenic mice

Uta Griesenbach, Ting-Chung Suen, J. Chamberlain, K. Olek, Lap-Chee Tsui  
Research Institute, The Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, Canada and Institut für Klinische Biochemie, Bonn, Germany

Expression of CFTR is developmentally and tissue-specifically regulated. Previous DNA transfection studies in our laboratory

showed that the human CFTR promoter contained at least 2 positive and one negative regulatory element. Weak basal promoter activity was demonstrated with a 300 bp fragment upstream of the transcription initiation sites. Our recent data also indicated that the general transcription factor SP-1 could interact directly and indirectly with various regions of the minimal promoter region. To determine the relevance of these sequences in-vivo we have generated transgenic mice with different putative promoter fragments in front of a lacZ reporter gene. These fragments include 0.3, 0.8, 3.8 and 19 kb of the 5' region of the CFTR gene, respectively. Multiple transgenic lines have been established for each of these constructs and examined for lacZ expression in cryostat sections. No appreciable lacZ activity could be detected in any of the tissues normally expected to show CFTR expression. More sensitive RT-PCR experiments and in situ hybridization are currently being performed to detect possible low level expression of the transgenes. In an attempt to enhance expression of these promoter fragments, the MAR sequence from the chicken lysozyme gene was coinjected with the 3.8 kb construct and, a GC box from the SV40 regulatory region with the 0.3 kb construct. Multiple transgenic lines have been established and the results of these latter studies will be described.

## 48 Präanalytische Faktoren der NSE-Bestimmung im Blut

J. Gross, J., Ute Ungethüm, R. Moller, F. Priem, J. Heldt, I. Pawlow  
Institut für Pathologische und Klinische Biochemie; Institut für Transfusionslogie und Transplantologie<sup>1</sup>, Universitätsklinikum Charité, Berlin

Neuronen-spezifische Enolase (NSE) wird in der Diagnostik als Tumormarker und als Indikator für akute Hirnschädigungen eingesetzt. Da NSE auch in Thrombozyten, Lymphozyten und roten Blutzellen vorkommt, erhält die Präanalytik eine erhebliche Bedeutung. Als Untersuchungsmaterial wird bisher überwiegend Serum empfohlen. Ziel der Untersuchungen war, zu klären, ob Plasma für die NSE-Bestimmung als Indikator für Hirnschädigungen geeignet ist, da im Notfall-Labor üblicherweise Plasma für die Diagnostik eingesetzt wird.

### Methoden

Die Blutabnahme erfolgte mit Sarstedt-Monovetten, die NSE-Bestimmung mit dem immunluminometrischen Assay von Byk-Sangtec (LIA-mat) und die LDH-Bestimmung mit dem UV-Test von Boehringer-Mannheim (Hitachi 747).

### Ergebnisse

Serum weist im Vergleich zum Plasma höhere NSE-Konzentrationen und LDH-Aktivitäten auf. Bei längerer Blutabfuhrzeit (bis zu 4 Std. untersucht) steigt die NSE-Konzentration im Serum weiter kontinuierlich an, im Plasma bleibt sie konstant. Im EDTA-Plasma ist eine nahezu doppelt so hohe NSE-Konzentration als im Heparinplasma nachweisbar. Verschiedene Transportbedingungen (Hol- und Bringdienst bzw. Rohrpost) waren ohne Einfluß auf die NSE-Konzentration im Serum oder Plasma.

### Diskussion

Als Quelle für die höhere Serum-NSE-Konzentration kommen am ehesten Thrombozyten in Betracht. NSE-Freisetzung in das Serum scheint stark abhängig zu sein von der Aktivität der Plättchen und ihrer Aggregation. Sofern Blut mit g-Zahlen > 2500 g. 10 min. zentrifugiert wird, ist Heparin-Plasma für die NSE-Bestimmung gut geeignet.

## 49 Effects of separation time and conditions of application on determination of carbohydrate deficient transferrin (CDT) and other human transferrin isoforms by automated isoelectric focusing (IEF)

R. Hackler, T. Arndt, T.O. Kleine\*, A.M. Gressner  
Abteilung Klinische Chemie und Zentrallabor; MZ f. Nervenheilkunde, Funktionsbereich Neurochemie\*, Klinikum der Philipps-Universität, Marburg

The distinct microheterogenic band pattern of human transferrin detectable by IEF is caused by three different mechanisms: 1. varying degree of sialic acid content (asialo- to heptasialotransferrin), 2. varying iron saturation (apotransferrin [Fe0-Tf], monoferic- [Fe1-Tf] and diferric- [Fe2-Tf transferrin), and 3. by different amino acid sequences (genetic variants). Analysing serum of chronic alcohol abusers by IEF, bands of sialic acid deficient transferrins (a-, mono-, di-, and trisialotransferrin) were found to be more intense compared to controls (1). Because determination of CDT by conventional IEF is difficult to handle and time consuming, two automated IEF procedures have been developed (2, 3). Under the conditions described, IEF was performed in polyacrylamide gels (PhastGel IEF 4-6.5) and PhastSystem. Transferrin bands were visualized by automated coomassie staining after immunofixation and removing unprecipitated material by washing with saline. To examine the influence of separation conditions on the transferrin isoform pattern, we varied application area as well as prerun- and separation time. Different transferrin bands were identified by means of transferrin standards with known sialic acid content and by iron saturation of Tf with Fe<sup>3+</sup>-citrate or iron depletion from Tf with EDTA. By this we could demonstrate, that different IEF-isotransferrin patterns result from partiell iron loss, that occurs under two main conditions: 1. Too long separation time. 2. Application near the isoelectric point of Fe2-Tf (middle of the gel). In contrast to others (2) we could show, that long prerun times do not prevent iron loss of Fe2-Tf. This iron-loss leads to artefacts by overlapping bands of e. g. tetrasialo-Fel-Tf and disialo-Fe2-Tf (CDT), giving incorrect CDT results as obtained by Löff et al. (3). Therefore to analyse accurately CDT and other transferrin isoforms by IEF, optimal running conditions, especially with regard to iron loss, have to be considered.

1. Stibler, H. (1991): Clin. Chem. 37, 2029 - 2037.
2. van Eijk, H.G.; van Noort, W.L. (1992): Electrophoresis 13, 354 - 358.
3. Löff, K., et al. (1993): Clin. Chim. Acta 217, 175 - 186.

## 50 Unterschiedliche Relationen von intra- zu extrazellulär generierter Chemolumineszenz bei PMA- und FMLP-aktivierten Neutrophilen

S. Hammerschmidt, J. Arnold, H. Wahn, K. Arnold  
Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Universität Leipzig

Die luminolverstärkte Chemolumineszenz (LCL) weist die Generierung hochreaktiver Sauerstoffmetabolite (oxygen burst), vor allem von Hypochlorsäure, durch aktivierte Neutrophile nach (1). Die LCL-Reaktionen laufen intra- und extrazellulär ab (2). Verschiedene Aktivoren beeinflussen die Aktivierungskaskade auf unterschiedlichen Ebenen und sollten daher zu unterschiedlichen Relationen von intra- zu extrazellulärer LCL führen.

Plasmaproteine hemmen durch die Reaktion ihrer freien funktionellen Gruppen mit Hypochlorsäure die extrazellulären, ihrer Membranimpermeabilität wegen jedoch nicht die intrazellulären LCL-Anteile (3).

Neutrophile und Plasma wurden aus Blut gesunder Spender präpariert. In Suspensionen 12-Phorbol-13-myristoyl-acetat-(PMA) oder N-Formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanin-(FMLP)-aktivierter

Neutrophiler wurde die LCL kontinuierlich registriert. Plasmaproben, die zum Zeitpunkt maximaler LCL-Intensität zu den Suspensionen injiziert wurden, verringerten die LCL-Intensität unmittelbar nach Injektion (Hemmung der extrazellulären LCL). Die Menge des injizierten Plasmas wurde soweit erhöht, bis das Ausmaß der Verringerung der LCL, nicht gesteigert werden kann. Der so inhibierbare (extrazelluläre) Anteil an der Gesamt-LCL beträgt bei PMA-aktivierten Neutrophilen 18 ± 2% und bei FMLP-aktivierten Neutrophilen 67 ± 5%. Der nicht inhibierbare (intrazelluläre) Anteil beträgt 82 ± 2% (PMA-aktiviert) bzw. 33 ± 5% (FMLP-aktivierte Neutrophile).

Die unterschiedlichen Relationen von intra- und extrazellulär generierter LCL können durch Unterschiede in Fusion und Exozytose primärer und sekundärer Granula zwischen beiden Aktivoren erklärt werden.

1. Dahlgren, C. (1989): Free Rad. Biol. Med. 6, 399 - 403.
2. Edwards, S.W. (1987): J. Clin. Lab. Immunol. 22, 35 - 39.
3. Arnold, J.; Hammerschmidt, S.; Arnold, K. (1991): Biochim. Biophys. Acta 1097, 145 - 151.

## 51 Fetales Fibronectin als Marker einer drohenden Frühgeburt

D. Hampel, Brigitte Hell, Petra Krienke, E. Köttgen  
Inst. f. Klinische Chemie und Biochemie, Universitätsklinikum Rudolf Virchow der Freien Universität Berlin

Ziel ist es, eine zuverlässige, nicht-invasive und preiswerte Methode zum Erfassen einer drohenden Frühgeburt zu entwickeln.

Frühgeburlichkeit ist die Hauptursache für die Neugeborenenmortalität in Industrieländern. Die Effektivität der Behandlung einer drohenden Frühgeburt korreliert direkt mit dem Zeitpunkt der Diagnose. Bisher übliche diagnostische Verfahren sind nicht sensitiv genug, wie z. B. die Beobachtung von Flüssigkeitsabgang in die Vagina, der Farntest und die Bestimmung des vaginalen pH-Wertes oder zu invasiv, wie z. B. die Amnionpunktion mit Farbstoffinstillation. Eine Isoform des Fibronectin, das fetale Fibronectin (fFN), das sich in einigen strukturellen Eigenschaften und im Vorkommen wesentlich von der adulten Isoform, dem Plasma-Fibronectin (FN) unterscheidet, ist im Fruchtwasser in hoher Konzentration, in Cervical- und Vaginalsekret, Urin und Blut dagegen kaum vorhanden. fFN ist somit gut geeignet zum Nachweis von Fruchtwasser in der Scheide beim (vorzeitigen) Blasensprung und zur Vorhersage des baldigen Geburtseintritts. Als einziger bisher erhältlicher Test beruht der ROMCheck™ (Fa. Adeza) auf dem Einsatz monoklonaler Antikörper zur Differenzierung der unterschiedlichen Proteinstrukturen. Als Alternative stellen wir hier ein Verfahren zur Detektion der unterschiedlichen Glycanstrukturen von fFN und FN vor.

Es wurden mittels Abstrichtechnik gewonnene cervicovaginale Sekrete, Fruchtwasser (FW) und Plasma schwangerer Frauen in einem Gestationsalter zwischen der 13. und 42. Schwangerschaftswoche (SSW) untersucht.

Zum quantitativen Nachweis der Glycanstrukturen von fFN und FN diente ein neu entwickelter, dem ELISA ähnlicher Test, der (GLIA (Glycoprotein lectin immunosorbent assay), modifiziert nach Köttgen (1988). Mit Hilfe hochspezifischer Lectine wurde das Verhältnis von fFN zu FN bestimmt. Dieses betrug im Mittel bei Plasma 0,08 (± 0,03), bei FW 3,89 (± 1,71). Alle Patientinnen mit den klinischen Symptomen eines Blasensprungs bzw. mit vorzeitigem Wehen zeigten im cervicovaginalen Sekret einen Wert von deutlich über 0,20 (also positives Testergebnis), während 95% der Patientinnen der Kontrollgruppe ohne Wehen und ohne klinischen Anhalt für FW-Abgang mehr als 8 Tage vor Geburt einen Wert von 0,11 (± 0,05) aufwiesen. 95% der Patientinnen dieser Kontrollgruppe zeigten dagegen 1 bis 8 Tage vor Geburt einen Wert von über 0,20 und wiesen damit auf einen baldigen Geburtseintritt hin.

Der Nachweis von fFN im cervicovaginalen Sekret mittels des von uns entwickelten GLIA korreliert mit einem baldigen Geburtseintritt

und kann mit großer Sicherheit zum Abschätzen eines Frühgeburtenrisikos eingesetzt werden.

## 52 Diagnostischer Stellenwert des HCMV-DNA-Nachweises über nPCR aus peripheren mononukleären Zellen, Granulozyten, Plasma und Gewebeproben immunsupprimierter Transplantatempfänger

K. Hamprecht\*, Gabriele Sorg\*, M. Steinmaßl\*\*, H.J. Gerth, G. Jahn\*

\*Abt. Med. Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten, Hygiene-Institut der Universität Tübingen;

\*\*Friedrich-Miescher Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft, Tübingen

Immunsupprimierte Patienten nach Organ- oder Knochenmarkstransplantation besitzen ein erhöhtes Risiko einer Infektion mit dem humanen Cytomegalovirus (HCMV). Das HCMV-Screening zur Erfassung einer akuten HCMV-Infektion oder HCMV-Erkrankung dieser Patienten umfaßte serologische Methoden wie die Komplementbindungsreaktion (KBR), IgG- und IgM-ELISA-Systeme sowie die Virusisolierung in der Zellkultur und den HCMV-DNA-Nachweis über die Polymerasekettenreaktion (PCR). Sensitivität und Spezifität der DNA-Amplifikation wurden anhand eines Kontrollkollektives latent infizierter Blutspender sowie durch eine nested PCR mit Southern-Hybridisierung und Kontrollgenamplifikation optimiert. Im Vordergrund der Untersuchung stand der Nachweis von HCMV-DNA in der Population der peripheren mononukleären Zellen (PMNZ) sowie der Granulozyten, beides Zellfraktionen, die als Target der HCMV-Latenz diskutiert werden. Die Reinheit der Granulozytenpräparation wurde unter Verwendung des CD15-Markers cytofluorimetrisch bestimmt. Mit dieser Methodik ließ sich keine Korrelation zwischen dem HCMV-DNA-Nachweis in PMNZ und Granulozyten und der Isolierung von infektiösem Virus als Charakteristikum der Virämie herstellen. Dies bestätigte eine Longitudinaluntersuchung eines Patienten nach Nierentransplantation. Zusätzlich wurde die HCMV-DNA, nPCR aus zellfreiem Plasma nativ sowie nach dessen Konzentrierung durchgeführt. Der Nachweis der HCMV-DNA in PMNZ, Granulozyten und Plasma immunsupprimierter Patienten ist nicht konkordant. Zur Diagnostik einer HCMV-Erkrankung wurden noch bronchoalveoläre Lavagen sowie Biopsie- und Autopsieproben mittels DNA-nPCR und Virusisolierung untersucht. Der diagnostische Stellenwert der Ergebnisse der DNA-Amplifikation wird im Kontext von Serologie und Virusisolierung diskutiert.

## 53 MEIA-Prolactin-Test am AxSYM: Erprobung und Methodenvergleich

D. Hannak, R. Schmidt, R. Kattermann  
Institut für Klinische Chemie, Klinikum Mannheim der Universität Heidelberg, 68135 Mannheim

Bei etwa 20% der Patientinnen mit Zyklusstörungen liegt eine Hyperprolactinämie als primäre Ursache vor, weshalb nach Anamnese und klinischer Untersuchung als erste hormonanalytische Maßnahme die Bestimmung des Prolactins erfolgen sollte. Auch bei Hypogonadismus des Mannes gehört Prolactin zur Basisuntersuchung (1). Für eine sinnvolle Stufendiagnostik sollten daher die Resultate von Prolactin-Anforderungen rasch verfügbar sein. Im Rahmen einer Erprobung des AxSYM-Systems (Abbott) haben wir deshalb die Bestimmung von Prolactin mittels MEIA-Technik am AxSYM-Gerät mit der derzeitigen Routinemethode DELFIA (Pharmacia) verglichen.

Die MEIA-Methode am AxSYM-Gerät läuft nach Beschicken des Geräts mit Meßküvetten, dem Reagenzienpack und den zu messen-

den Proben vollmechanisiert ab. Das erste Ergebnis ist nach 15 min verfügbar, weitere Ergebnisse folgen alle 38 sec. Die Kalibration ist nach unseren Ergebnissen mindestens 4 Wochen haltbar. Die DELFIA-Methode benötigt 2 Waschzyklen, 3 Pipettierserien und eine gesamte Assay-Zeit zwischen 120 und 210 min. Weitere Ergebnisse:

Impräzision MEIA-Technik (Bio-Rad Lyphochek):

	Serie (n = 20)			Tag zu Tag (n = 10)		
	LI	L II	L III	LI	L II	L III
x	10,60	26,80	70,43	10,35	25,92	65,86
VK %	4,04	3,92	3,15	5,41	4,17	6,32

Empfindlichkeit: 0,21 ng/ml (3 s des Nullkalibrators). Methodenvergleich (n = 144): MEIA = 2,06 x DELFIA - 0,72 ng/ml (r = 0,987) oder mit Umrechnung auf mIU/l nach Herstellerangaben: MEIA = 1,37 x DELFIA - 17,39 mIU/l.

Um die unterschiedliche Standardisierung (MEIA: WHO 2nd IS 83/562, DELFIA: WHO 3rd IS 84/500) zu eliminieren, wurden für beide Methoden aus 10 Wertepaaren der externen Ringversuche der DGKC Regressionen zum Mittelwert aller Methoden berechnet. Damit ergibt sich folgendes Ergebnis: MEIA = 1,07 x DELFIA - 27,08 mIU/l.

Durch die pro Assay erforderliche Kalibrierung mit 6 x 2 Standards und der Empfehlung von Doppelbestimmungen bei der DELFIA-Methode liegt der Preis pro Patientenergebnis höher als bei der MEIA-Methode am AxSYM. Die niedrigere Personalbindung sowie die deutlich bessere Präzision der MEIA-Technik bei der sehr guten Methodenkorrelation sprechen für die Routinetauglichkeit des AxSYM-Systems.

1. v. Werder, K.; Müller, O.-A.; Landgraf, R. (1986): Überflüssige endokrinologische Diagnostik. Internist 27: 566 - 575.

## 54 CEDIA-Valproinsäure-Test am Hitachi 717: Erprobung und Methodenvergleich

D. Hannak, F. Scharbert, R. Kattermann  
Institut für Klinische Chemie, Klinikum Mannheim der Universität Heidelberg, 68135 Mannheim

Valproinsäure (VPA) wird seit etwa 30 Jahren als Antiepileptikum eingesetzt und ist als effizientes und gut verträgliches Mittel bei generalisierten Epilepsien bekannt. In den letzten Jahren hat sich auch die Verwendung als Therapeutikum bei fokalen Epilepsien durchgesetzt (1). Daher ist die Zahl der Patienten unter VPA-Therapie im Steigen begriffen mit entsprechend höherer Zahl an VPA-Bestimmungen im Rahmen des therapeutischen Drug Monitoring.

Wir haben den neuen CEDIA-Valproinsäure-Test am Hitachi 717 (Boehringer Mannheim) mit der in unserer Routineanalytik etablierten FPIA-Valproinsäure-Bestimmung (Abbott) verglichen. Als Referenz-Methode modifizierten wir eine gaschromatographische Methode zur Bestimmung von Fettsäuren im Serum (2): 100 µl Serum werden mit Octansäure in Methanol als Interner Standard versetzt, mit Toluol: Methanol: Acetylchlorid (1 : 8 : 1) 1 h bei 80°C methyliert, mit 6% wäßr. Kaliumcarbonat neutralisiert und lul der organischen Phase injiziert. GC-Bedingungen: Perkin-Elmer Modell 8420; 60 m x 0,32 mm SP 2331 Säule; Helium 2 ml/min; Split 10 : 1 nach 1 min; Gradient: 1 min 80°C, 2 C/min bis 100°C, 10°C/min bis 220°C, 30 min iso. Retentionszeit für VPA 7,2 min, für Octansäure 10,3 min.

Die Kalibration des CEDIA-VPA-Assays ist mindestens eine Woche stabil. Impräzisionen in der Serie lagen zwischen 2,1 und 2,5% VK, Impräzisionen von Tag zu Tag zwischen 3,4 und 4,0% VK im Bereich von 42 bis 135 mg/l VPA.

Methodenvergleich ( $y = a + bx$ ;  $r =$  Korrel.-koeffizient):

x	y	n	r	a	b
CEDIA	FPIA	51	0,986	0,20	1,00
CEDIA	GC	51	0,993	-1,84	0,99
GC	FPIA	51	0,992	3,00	1,00

Bei einer Empfindlichkeit von 1,5 mg/l, einer Linearität bis 200 mg/l und einer Wiederfindung von 104 bis 109% in der Prüfung auf Richtigkeit mit 6 kommerziellen Kontrollseren ist der erprobte CEDIA-ValproinsäureTest am Hitachi 717 sehr gut für die routinemäßige Überwachung einer Valproinsäure-Therapie geeignet.

1. Neundörfer, B. (1993): Differentialtherapie epileptischer Anfälle. Therapie-woche 43: 924 - 929.
2. Püttmann, M.; Krug, H.; v. Ochsenstein, E.; Kattermann, R. (1993): Fast HPLC Determination of Serum Free Fatty Acids in the Picomole Range. Clin. Chem. 39: 825 - 832.

## 55 A sensitive western blot procedure for detection of NC1 (IV) in human plasma

Lansheng Hao, E. Werle, Ch. Hasslacher, W. Fiehn  
Central Laboratory, Medical Clinic, Univ. Heidelberg

### Introduction

Basement membrane thickening is the most prominent and characteristic feature of early diabetic microangiopathy. It's a matter of dispute whether hyperglycemia increases the expression of collagen IV or whether the degradation of collagen IV is disturbed by non-enzymatic glycosylation. The aim of the present investigation was the development of a sensitive Western Blot for the collagen IV noncollagenous NC1 domain in order to compare collagen degradation products of diabetic and non-diabetic patients.

### Methods and Results

Selection of antibodies and the use of SDS, DTT and organic solvents largely influenced the detection limit which was 1 - 10 ng/lane of pepsin digested collagen IV. In human sera and plasma NC1 was complexed with high molecular weight proteins and could be dissociated into monomeric, dimeric, tetrameric and hexameric NC1. Western Blots could not differentiate between patients with diabetic nephropathy II and III. However, in two diabetic patients anti-NC1 immunoreactive proteins of low molecular weight were found which may indicate an abnormality in basement membrane metabolism.

### Conclusion

The development of a sensitive Western Blot for NC1 (IV) makes it possible to compare collagen IV degradation products in serum and plasma of diabetic and non-diabetic patients. In a few patients abnormalities were found but studying more patients will have to show whether the development and progression of diabetic nephropathy can be predicted by this method.

## 56 Chromogranin A bei benignen und malignen Erkrankungen

Ute Hasholzner, Petra Stieber, H. Dienemann<sup>1</sup>, Maren Fiebig, Susanne Poley, C. Reuter<sup>1</sup>, W. Meier<sup>2</sup>, P. G. Fabricius<sup>3</sup>, A. Fateh-Moghadam

<sup>1</sup>Institut für Klinische Chemie, Chirurgische Klinik und Poliklinik  
<sup>2</sup>Urologische Klinik und <sup>3</sup>Frauenklinik, Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München, FRG

Chromogranin A, ein lösliches saures Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 49 Kilodalton, ist in den sekretorischen Granula der meisten endokrinen und vieler neuroendokriner Zellen nachweisbar und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Hormonsekretion. Der Nachweis von Chromogranin A in den Zellen ist weit verbreitet in der Immunhistochemie, die Bestimmung von Chromogranin A kann als Serummarker für Chromogranin A-produzierende Tumoren verwendet werden.

Wir untersuchten die klinische Wertigkeit des Chromogranin A als Serum-Tumormarker bei soliden Tumoren überwiegend zum Zeitpunkt der Primärdiagnose, insbesondere Bronchialkarzinomen gegenüber den klinisch relevanten Referenzkollektiven und verglichen die Ergebnisse mit den für das entsprechende Kollektiv maßgeblichen etablierten Tumormarkern.

Mit einem EIA der Fa. Boehringer Tützing, BRD, untersuchten wir 706 Patientenserum, davon 173 Seren von Patienten mit benignen Erkrankungen sowie 533 Seren von Patienten mit malignen Erkrankungen, insbesondere Lungenkarzinome und -metastasen.

Bei einer 95%igen Spezifität gegenüber dem klinisch relevanten benignen Vergleichskollektiv fanden wir bei den kleinzelligen Lungenkarzinomen bei einem cut-off-Wert von 14,7 U/ml für Chromogranin A eine Sensitivität von 29% gegenüber 65% mit der NSE (cut-off 14,7 U/ml) und 50% mit CYFRA 21-1 (cut-off 2,0 ng/ml), bei den nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen eine Sensitivität von 23% gegenüber 62% mit CYFRA 21-1. Bei den gastrointestinalen, gynäkologischen, urogenitalen, sonstigen und Mammatumoren lag die Sensitivität des Chromogranin A bei jeweils einer Spezifität von 95% bei allen Karzinomen unter der des oder der etablierten Marker. Bei Vorliegen einer Niereninsuffizienz oder eines Hyperparathyreoidismus ergeben sich deutlich bis massiv hohe Chromograninwerte.

Bei den von uns untersuchten Tumoren bietet Chromogranin A gegenüber den etablierten Tumormarkern keine Vorteile. Bei speziellen Fragestellungen kann die Kenntnis des Chromograins für den einzelnen Patienten sinnvoll sein.

## 57 Transforming growth factor- $\beta$ 1 is a major stimulator of hyaluronan synthesis in human synovial lining cells

H.-D. Haubeck, R. Kock, D.-C. Fischer, E. Van de Leur, K. Hoffmeister, H. Greiling  
Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der RWTH Aachen, Pauwelsstr. 30, 52057 Aachen

Hyaluronan, the major glycosaminoglycan of synovial fluid, plays an important role in joint function and is responsible for the rheological and viscoelastic properties of synovial fluid. However, little is known about the regulation of hyaluronan synthesis in synovial lining cells. In inflammatory joint diseases the viscosity of synovial fluid, which is mainly determined by the concentration and molecular weight distribution of hyaluronan, is generally decreased. In contrast, in osteoarthritis the viscosity is often very high. Cytokines and growth factors are actively involved in the pathogenesis of chronic inflammatory and degenerative joint diseases. High levels of proinflammatory cytokines such as interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-8 (IL-8), but also trans-

forming growth factor  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) have been found in the synovial fluid of patients with inflammatory joint diseases.

The aim of the present study was to investigate the role of cytokines and growth factors in the regulation of hyaluronan synthesis in human synovial lining cells.

After stimulation of synovial lining cells by a panel of cytokines and growth factors, hyaluronan synthesis was measured by the use of a radioimmunoassay. Molecular weight distribution of the hyaluronan synthesized was determined by high performance gel permeation liquid chromatography. Hyaluronan synthesis is strongly stimulated in synovial lining cells by TGF- $\beta 1$ , IL-1 $\beta$  and to a lesser extent by TNF- $\alpha$ . Furthermore, analysis of the molecular weight distribution of hyaluronan after stimulation of synovial lining cells with IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta 1$  indicates, that hyaluronan is synthesized in a high molecular weight form and might be degraded in the course of inflammatory processes by oxygen derived radicals. Our findings suggest, that TGF- $\beta 1$  is a potent inducer of hyaluronan synthesis in human synovial lining cells. Due to the extremely high water binding capacity of hyaluronan, the increased synthesis of hyaluronan will lead to a strong influx of water and might be an essential mechanism for the development of joint swelling in inflammatory and degenerative joint diseases.

## 58 $6\alpha$ -biotinylated estrone, a new tracer for the development of a chemiluminescence immunoassay for total estrone in serum

Sabine Hauck, P. Lupp, Ingrid Schwab, D. Neumeier  
Institute for Clinical Chemistry and Pathobiochemistry, Klinikum rechts der Isar, Technical University Munich, Germany

We developed a novel immunoassay concept for the determination of steroids in serum using biotinylated steroids as the tracer. Assays are formatted as competitive enzyme immunoassays, signalling is performed by applying streptavidin-conjugated horseradish peroxidase. First example for this concept is the established chemiluminescence immunoassay (CLIA) for total estrone (E1) in serum using the E1 derivative 3-hydroxyestra-1,3,5(10)-trien-17-one  $6\alpha$ -N-( $\epsilon$ -biotinyl)caproamide (Bio-E1) as tracer (1) and a polyclonal anti-E1-antibody, raised against 6-carboxy-methyl-oxime-BSA-coupled E1. It can be demonstrated that Bio-E1 adequately displaces tritiated E1 from the antibody in the expected way.

For the assay run, serum samples are extracted by use of  $C_{18}$ -cartridges. Assay dynamic range is from 0 to 7400 pmol/l; lower detection limit is found with 9 fmol/well, equivalent to 185 pmol/l in serum; interassay imprecision at 1850 pmol/l is of the order of 10–15%. Recoveries of 80–110% and an excellent dilution linearity can be demonstrated.

We found reference values for premenopausal women in the range [mean  $\pm$  SD] of  $336 \pm 158$  and for men in the range of  $239 \pm 71$  pmol/l. In pregnant women during the third trimester we found peak levels up to 40 nmol/l. Comparing the assay with a non-extraction  $^{125}$ I-RIA for estrone, we found an acceptable agreement ( $y$  [CLIA] =  $145 + 0.915 \cdot x$  [RIA];  $r = 0.948$ ) for samples of about 150 healthy subject of either sex. We conclude that this new assay is a versatile method with considerable analytical performance for the determination of estrone in serum.

### Reference:

1. Lupp, P.; Birkmayer, C.; Hauptmann, H. (1994): *Bioconj. Chem.* 5, 167–171.

## 59 Beeinflussung der Kaliumbestimmung mittels ionenselektiver Elektrode durch Natriumperchlorat

C. Haug, A. Metzke, Ch.-F. Wolf, G. Steinbach, A. Grünert  
Institut für Klinische Chemie, Universität Ulm

Die ionenselektive Elektrode (ISE) wird in vielen Laboratorien zur Bestimmung der Kaliumkonzentration eingesetzt. Bei einem Patienten, der über mehrere Wochen mit Natriumperchlorat behandelt wurde (Irenat<sup>®</sup>, 3x400 mg/die), ergab die Serumkaliumbestimmung mittels ISE bei Messung in der unverdünnten Probe (Kodak Ektachem 700) deutlich niedrigere Werte als bei Messung in der verdünnten Probe (Hitachi 717) oder bei flammenphotometrischer Messung. Die im Kodak Ektachem ermittelten Kaliumkonzentrationen waren im Mittel  $1,3 \pm 0,4$  mmol/l (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 25$ , maximale Abweichung 2,4 mmol/l) niedriger als die in der verdünnten Probe und flammenphotometrisch ermittelten Werte, welche nur die üblichen Differenzen von 0,1–0,2 mmol/l aufwiesen. Nach Zugabe von Natriumperchlorat zu Poolserum konnte ein konzentrationsabhängiger Abfall der mittels ISE in der unverdünnten Probe bestimmten Kaliumwerte beobachtet werden, während bei den beiden anderen Meßmethoden keine Veränderungen auftraten. In Serumproben von Patienten, die dieselbe Natriumperchloratdosis wie der oben geschilderte Patient nur über einige Tage einnahmen ( $n = 12$ ), zeigte sich ebenso wie im Serum von Normalpersonen nur eine geringfügige Differenz zwischen den mit den 3 Meßmethoden bestimmten Kaliumkonzentrationen. Bei der potentiometrischen Kaliumbestimmung in der unverdünnten Probe kann das Anion Perchlorat die aufgrund der Wechselwirkung zwischen Kalium und dem Ionophor (im Falle des Ektachem Plättchens Valinomycin) ablaufende Potentialbildung beeinträchtigen (1). Bei Messung im Hitachi 717 scheinen diese Effekte, wahrscheinlich aufgrund der Probenverdünnung (30fach), keine wesentliche Rolle zu spielen. Da unter kurzzeitiger Perchloratmedikation keine Beeinflussung der Kaliumbestimmung beobachtet wurde, scheint diese Interferenz erst bei längerfristiger hoch dosierter Einnahme relevant zu werden. Um falsch niedrige Kaliumresultate zu vermeiden, sollte die Kaliumkonzentration in solchen Fällen nicht ausschließlich mittels ISE ohne Probenverdünnung bestimmt werden.

1. Ryba, O.; Petranek, J. (1976): *J. Electroanal. Chem.* 67, 321–331.

## 60 Untersuchungen zur Koronarsklerose und Aktivierung des fibrinolytischen Systems bei Patienten mit und ohne Fettstoffwechselstörung

M. Heins<sup>1</sup>, F. Schoebee<sup>2</sup>, D. Stein<sup>2</sup>, W. Withold<sup>1</sup>, M. Leschke<sup>2</sup>, B.E. Strauer<sup>2</sup>, H. Reinauer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik und  
<sup>2</sup>Abteilung für Kardiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Hyperlipoproteinämie gilt als eine der Hauptursachen für Artherosklerose sowie koronarer Herzkrankheit. Um die Auswirkung von Fettstoffwechselstörungen auf das fibrinolytische System zu untersuchen wurde bei 225 (konsekutiven Patienten (Pat.), die sich zur elektiven Koronarangiographie vorstellten, das Fettstoffwechsel- und fibrinolytische System sowie Marker der Gerinnungsaktivierung untersucht. Von diesen Patienten wurden 66 Patienten mit Cholesterin und Triglyceridkonzentrationen über 200 mg/dl als Hochrisikogruppe (HR) definiert, die übrigen 159 Patienten dienten als Vergleichskollektiv (NR). Die altermäßige Verteilung und der Anteil der Patienten mit lipidsenkender Therapie (HR 30%, NR 31%) und Fibrattherapie (HR 11%, NR 6%) war in beiden Kollektiven ähnlich. Es zeigte sich eine Korrelation von PAI ( $r = 0,43$ ,  $p < 0,001$ ) und t-PA ( $r = 0,31$ ,  $p < 0,001$ ) zu den Triglyceriden im Gesamtkollektiv. PAI (HR:  $5,5 [2,7 - 11,2]$  U/ml; NR:  $3,6 [1,8 - 8,2]$  U/ml (alle Werte als Median



[10. und 90. Perzentil]  $p < 0,0001$ ) und t-PA (HR: 9,0 [5,9 – 14,1] ng/ml; NR: 8,0 [4,0 – 11,0] ng/ml,  $p < 0,01$ ) waren bei HR signifikant höher. Der Plasmin- $\alpha$ 2-Antiplasminkomplex als Parameter der gesamten fibrinolytischen Aktivität war nicht signifikant unterschiedlich (HR: 429 [247 – 610] g/l; NR: 470 [258 – 753] g/l, n. s.).

Der Anteil der Patienten mit KHK war in beiden Kollektiven in etwa gleich groß (HR: 64%, NR: 61%). Weder im Schweregrad (Koronarsklerose 5 versus 1,5% I-Gefäß 21 versus 30%, 2-Gefäß 16 versus 30%, 3-Gefäß KHK 16 versus 14%) noch im Ausmaß der Coronarsklerose im Coronarscore (Gesamtscore 1,6 [0,6 – 2,3] versus 1,6 [0,6 – 2,6]) ergab sich ein signifikanter Unterschied. Jedoch war die Prävalenz für Herzinfarkt mit 44% gegenüber NR mit 27% deutlich höher.

Fazit: Unsere Untersuchungen zeigen, daß die Coronarsklerose bei Hochrisikopatienten im Vergleich zu einem Patientenvergleichskollektiv gleich groß ist. Die Erhöhung von PAI ist durch die Aktivierung von t-PA ausgeglichen, sodaß der Plasmin- $\alpha$ 2-Antiplasminkomplex bei beiden Kollektiven gleich groß ist. Bei den Hochrisikopatienten ist jedoch eine deutlich höhere Prävalenz an Herzinfarkt zu verzeichnen.

## 61 Does elevation of D-Dimer and ICAM-I concentration after bone marrow transplantation predict development of hepatic venoocclusive disease?

M. Heins<sup>1</sup>, T. Südho<sup>2</sup>, A. Heyl<sup>2</sup>, D. Söhngen<sup>2</sup>, S. Hecht<sup>1</sup>, W. Schneider<sup>2</sup>, H. Reinauer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik

<sup>2</sup>Klinik für Hämatologie, Onkologie und Immunologie, Medizinische Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Hepatic venoocclusive disease (VOD) is a common complication in patients after bone marrow transplantation (BMT). The overall frequency of VOD range from 20 to 30 percent, with a mortality rate greater than 30 percent. The clinical syndrome is characterized by sudden onset of hyperbilirubinaemia, hepatomegaly, ascites and weight gain. Endothelial injury followed by activation of the coagulation system is believed to be the key event in pathogenesis of VOD. Therefore, we analysed circulating leukocyte adhesion molecules (ICAM-I, VCAM-I, E-Selectin) and parameters indicating fibrinolytic and clotting activation (t-PA, PAI, PAP, TAT, D-Dimers), in allogeneic bone marrow recipients. By now, during a prospective study six patients have been investigated. Three of these suffered from early VOD (prior to day 14), one recovered, two died within days after clinical onset of complication. In two patients, increase of D-Dimers preceded VOD up to one week. During VOD episodes, D-Dimer concentrations exceeded 600  $\mu$ g/l, whereas maximal D-Dimer levels obtained from patients without VOD ranged below 260  $\mu$ g/l. In two patients, elevation of D-Dimer concentration was accompanied by raise of circulating adhesion molecule ICAM-I (543 and 897  $\mu$ g/l, respectively), as compared to plasma concentrations prior to transplantation (177 and 208  $\mu$ g/l). The patient who died by VOD on day 4 showed high ICAM-I levels (984  $\mu$ g/l) already with beginning of conditioning treatment with no substantial decrease until lethal outcome. However, increase of ICAM-I was not unique to VOD but was furthermore found during infectious complications. Based on these findings, we hypothesize that monitoring of D-Dimer concentration in combination with ICAM-I plasma levels may help to identify preclinical stage of VOD.

## 62 Notfallmäßige Bestimmung von nicht antikörpergebundenem Digoxin bei einem Patienten mit Digoxin-Intoxikation und FAB-Antikörpertherapie

M. Heins<sup>1</sup>, M.P. Heintzen<sup>2</sup>, W. Withold<sup>1</sup>, B.E. Strauer<sup>2</sup>, R. Beyrau<sup>1</sup>, H. Thome<sup>1</sup>, H. P. Schultzei<sup>2</sup>, H. Reinauer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik,

<sup>2</sup>Abteilung für Kardiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Die Therapie der schweren Digitalisintoxikation konnte durch die Möglichkeit der FAB-Antikörper Behandlung entscheidend verbessert werden. Leider ist eine sichere Steuerung der Antikörpertherapie bislang nur selten möglich, da die meisten derzeit verfügbaren Immunoassays zusätzlich zu dem nicht antikörpergebundenen Digoxin (non-AK Digoxin) auch das antikörpergebundene mit erfassen. Daher wurde ein neuer fluorogener Enzymimmunoassay (Opus<sup>®</sup>, Behringwerke), der die Bestimmung von non-AK Digoxin im unbehandelten Serum erlaubt, mit einem Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay (TDx<sup>®</sup>, Abbott) verglichen, bei dem die Messung erst nach Aufbereitung der Probe möglich ist. Mit Hilfe eines 30 000 Daltonfilters wurde non-AK, Digoxin bei 0° C und 2000 x g abgetrennt. Da trotz der niedrigen Temperatur ein Teil des non-AK Digoxins an Albumin gebunden ist, erfolgte die Umrechnung mittels einer Standardkurve: Digoxinfreies Serum wurde mit reinem Digoxin aufgestockt, ultrazentrifugiert und der Digoxinspiegel im aufgestocktem Serum und im Ultrafiltrat am TDx<sup>®</sup>-System bestimmt.

Ein 23jähriger Patient wurde 2 Stunden nach Einnahme von 100 mg Digoxin (400 Tabletten Lanico<sup>®</sup>) in suicidal Absicht mit einer passageren Sinusbradykardie (minimal 28 Schlägen pro Minute) und zunehmender ventrikulärer Extrasystolie auf die Intensivstation aufgenommen. Der Digoxinspiegel bei Aufnahme betrug 32 ng/ml. Bei der Therapie des Patienten mit Digitalisantitoxin (FAB-Antikörper) entsprechend des allgemein empfohlenen Dosierungsschemas über die ersten 12 h des stationären Aufenthalts war dieser in den ersten 6 h fast ausschließlich schrittmacherpflichtig. Am Ende der Therapie konnte der non-AK Digoxinspiegel auf 4,6 ng/ml (TDx<sup>®</sup> bzw.) 4,1 ng/ml (Opus<sup>®</sup> gesenkt werden, stieg aber nach Absetzen der Therapie auf 10,6 bzw. 9,0 ng/ml an. Daher war auch anschließend nach Ende der Therapie der Schrittmacher für die folgenden 72 Stunden bis zum Absinken des non-AK Digoxinspiegels bis 1 auf 3,0 bzw. 3,3 ng/ml noch phasenweise erforderlich.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß für eine effektivere und auch kostengünstigere Antikörpertherapie eine zuverlässige Messung des nicht non-AK Digoxins wünschenswert ist und die Therapie unter Kontrolle des non-AK Digoxins erfolgen sollte. Die Bestimmung ist prinzipiell mit beiden Systemen möglich, wobei das Opus<sup>®</sup>-System durch den Wegfall des Ultrafiltrationsschrittes einfacher zu handhaben ist.

## 63 Decreased glomerular basement membrane heparan sulfate proteoglycan in essential hypertension

B. Heintz<sup>1</sup>, G. Stöcker<sup>2</sup>, C. Mrowka<sup>1</sup>, E. Stickeler<sup>2</sup>, H.-G. Sieberth<sup>1</sup>, H. Greiling<sup>2</sup>, H.-D. Haubeck<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Med. Klinik II und <sup>2</sup>Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der RWTH Aachen, Pauwelsstraße 30, 52057 Aachen

Heparan<sup>®</sup>sulfate proteoglycans (HS-PG) are major components of the glomerular basement membrane (GBM) and play a key role in their molecular organization and function. Moreover, their presence is essential for the maintenance of the selective permeability of the GBM. Recently, we have isolated and characterized a novel small basement membrane associated HS-PG from human aorta and kidney. By the use of specific monoclonal antibodies we have shown that the novel HS-PG is predominantly located in the GBM, and to a lesser extent in the basement membrane of tubuli. Turnover,



or in the course of kidney diseases, degradation of HS-PG from the GBM may lead to urinary excretion of HS-PG which can be measured by a sensitive enzyme immunoassay.

The aim of the present study was to analyze whether changes of the structure and function of the GBM can be directly detected by measuring the excretion of a component of this GBM, e. g. HS-PG into urine. The excretion of this small HS-PG was compared after physical exercise in normotensive and hypertensive subjects. Normotensive subjects and treated, essential hypertensive patients underwent a standardized work load on a bicycle ergometer. Before, 15 and 45 min after exercise, biochemical characterization of the urinary proteins and HS-PG was performed. In both groups physical exercise did induce a significant increase in the excretion of urinary  $\alpha$ -1 microglobulin and albumin. However, a hundred-fold increase in the urinary excretion of HS-PG was seen in normotensive subjects under exercise. In hypertensive patients this HS-PG excretion was much less pronounced, leading to only a ten-fold increase. These data, supported by immunohistochemistry, indicate changes in the GBM of the kidney in hypertension. Therefore, determination of the urinary excretion of this novel small HS-PG after exercise may be a sensitive marker for the detection of basement membrane alterations in hypertension.

## 64 Routine in der molekularbiologischen Diagnostik – Möglichkeit der Automatisierung und Labororganisation mit modularen Systemen

T. Heyduck<sup>1</sup>, B. Schöttler<sup>2</sup>, R. Zotz<sup>2</sup>, H. T. Brüster<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fa. Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt

<sup>2</sup>Med.Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Institut für Blutgerinnung und Transfusionsmedizin

Die Durchführung einer routinemäßigen molekularbiologischen Diagnostik scheiterte bisher meistens am überaus großen Personal und Zeitbedarf. Die Anforderungen an eine moderne Diagnostik zeigen aber, daß bei bestimmten Fragestellungen (Nachweis proviraler HIV-DNA, HIV-RNA, HCV-RNA) auch große Patientenkollektive untersucht werden sollten.

An einer transfusionsmedizinischen Einrichtung wurde eine mit modularen Systemen automatisierte Methode zum Nachweis HIV spezifischer DNA bzw. RNA entwickelt und evaluiert, die es erlaubt, bis zu 300 Proben Tag für Tag zu untersuchen.

Die Extraktion der DNA aus 100  $\mu$ l EDTA Vollblut, bzw. der RNA aus 200  $\mu$ l Serum oder EDTA-Plasma erfolgt mit dem AutoGen 540 (Fa. Zinsser Analytic). Mit diesem Extraktor können bei 6 Läufen/Tag 72 Proben extrahiert werden. Die Personalbindung beträgt dabei ca. 90 Min. Mit einem „Automatischen Pipettier System“ (APS, Fa. Zinsser Analytic) werden die nötigen Pipettierungen für die Vorbereitung der Reversen Transkriptase Reaktion und die anschließende Amplifizierung durchgeführt. APS und Thermocycler arbeiten im MTP-Format. 192 Amplifikate werden in ca. 5 Std. bei einer Personalbindung von ca. 80 Min. hergestellt.

Die abschließende Detektion erfolgt auf einem weiteren APS (Fa. Zinsser Analytic) mit dem Gen-Eti-K HIV-1 SK19 Kit (Fa. Sorin Biomedica). Hier werden vollautomatisch Hybridisierungspuffer und Amplifikate verteilt, die Reagenzien vorverdünnt und dispensiert, alle Waschschritte und Inkubationen durchgeführt und überwacht. So können 192 Proben in 4 1/2 Std. bei 10 Min. Personaleinsatz abgearbeitet werden.

Wird ein Probendurchsatz von bis zu 300 Proben/Tag angestrebt, so ist dies mit dem vorgestellten modularen System (4 Extraktoren, 2 APS) und 2 MTA's zu realisieren.

## 65 Medizinische Mikrobiologie und Immunologie DIN/CEN-Normen

Margot Hildebrandt

Referentin des Normenausschusses Medizin im DIN Deutsches Institut für Normung e. V.

Die zur medizinisch-mikrobiologischen und immunologisch-serologischen Diagnostik veröffentlichten DIN-Normen und -Entwürfe nationalen, europäischen oder auch internationalen Ursprungs dienen in der Praxis als einheitliche Voraussetzung für die fachgerechte Durchführung entsprechender Untersuchungen und als Qualitätsmaßstab für Untersuchungsmaterialien. Sie haben zum Ziel, die Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der diagnostischen Untersuchungsergebnisse zu sichern und das mit diesen Arbeiten verbundene Infektionsrisiko zu mindern.

Normen im Bereich der medizinischen Mikrobiologie tragen ebenfalls zur Erfüllung der gesetzlichen Auflagen bei, welche zunehmend durch in nationale Gesetzgebung überführte EG-Richtlinien vorgegeben werden (z. B. im Hinblick auf Richtlinien für das Arbeiten mit pathogenen Mikroorganismen). Die schematische Darstellung der Beziehung zwischen nationaler und europäischer Gesetzgebung und nationaler und europäischer Normung sowie des mittelbaren und unmittelbaren Zusammenhanges mit dem EG-Binnenmarkt ist Thema dieses Posters. Es soll die Bedeutung der Normung im Bereich der medizinischen Mikrobiologie und Immunologie hervorheben und auf aktuelle Entwicklungen und Zusammenhänge hinweisen. Grundlegendes Ziel der Normung auf diesem Sachgebiet ist es, ein hohes Niveau an Sicherheit und Zuverlässigkeit anzustreben. Sie erhebt daher den Anspruch, sowohl den Interessen des Herstellers als auch des Anwenders und letztendlich insbesondere des Patienten Rechnung zu tragen. Mit Normen, an deren Erstellung alle interessierten und tangierten privaten und öffentlichen Unternehmen, Institutionen und Einzelpersonen mitwirken können, wird den Fachkreisen ein Mittel einer effektiven, rationellen und vergleichbaren Gestaltung der diagnostischen Arbeit an die Hand gegeben.

## 66 The tumor markers CYFRA 21-1 and CEA in pleural effusions: measurements on the Boehringer ES 300 immunoanalyser

R. Hinzmann<sup>1</sup>, H. Hamm<sup>2</sup>, H. Burmeister<sup>2</sup>, E. Henkel<sup>1</sup>, H. Faber<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut für Klinische Chemie II und <sup>2</sup>Abteilung Pneumologie der Medizinischen Hochschule Hannover

Cyfra 21-1 is a new tumor marker used in diagnosis and follow up of lung cancer. The aim of this study was the comparison of CEA and Cyfra levels in benign and malignant pleural effusions. Linearity, precision and tumor marker levels in different diseases were measured.

Pleural effusions from 60 patients (benign n = 20, lung cancer n = 12, mesothelioma n = 6, breast cancer n = 7, other malignancies n = 15) were centrifuged at 12 000 g and the supernatant was stored at -28° C until both Cyfra and CEA were measured on the Boehringer ES 300 Immunoanalyser (sandwich ELISA technique, dilution media supplied by Boehringer).

Linearity: 6 samples were diluted stepwise up to 400-fold. The methods were found to be linear from 1.6 to 49.7  $\mu$ g/l (Cyfra) and 1.7 to 59.5  $\mu$ g/l (CEA). Higher levels were above the analyser ranges. Precision data were excellent: Within series precision (20 measurements) for Cyfra was 3.99% at 3.73  $\mu$ g/l, 1.95 % at 17.25  $\mu$ g/l, and 1.53% at 36.08  $\mu$ g/l, for CEA it was 0.99% at 4.80  $\mu$ g/l, 1.05% at 21.52  $\mu$ g/l and 1.26% at 39.87  $\mu$ g/l. Day to day precision (20 measurements) for Cyfra was 4.69% at 3.45  $\mu$ g/l, 3.48% at 17.35  $\mu$ g/l and 3.35% at 36.53  $\mu$ g/l, for CEA it was 2.45% at 4.67  $\mu$ g/l, 2.41% at 20.33  $\mu$ g/l and 2.15% at 37.16  $\mu$ g/l. Cyfra levels were: benign: mean 41  $\mu$ g/l (median 15/range 1.4 - 225), total malignant: 533 (118/2.3-8546), lung cancer: 784 (26/4.3-4947), mesothelioma 1807 (511/143-

8546), breast cancer: 466 (390/62-922), other malignancies 127 (93/2.3-515). CEA levels were: benign: mean 1.5 µg/l (median 1.3 / range 0.4-3), total malignant: 113 (3.4/0.6-3234, lung cancer: 298 (3.5 / 0.9-3234), mesothelioma 49 (1/0.7-286), breast cancer: 50 (12/0.8-238), other malignancies 90 (2.9 / 0.6-1261). Cyfra and CEA levels were significantly higher in malignant than in benign effusions (T-Test:  $p < 0.0003$  and  $p < 0.0038$ ), Cyfra levels were significantly higher in mesothelioma and breast cancer, whereas CEA levels were significantly higher in breast cancer and lung cancer (all  $p$ -values  $< 0.05$ ).

Thus, Cyfra plus CEA measurement in pleural effusions is especially useful in the diagnosis of mesothelioma (Cyfra high and CEA low).

## 67 Immunphänotypische Charakterisierung maligner Plasmazellen: Expression des Oberflächenproteins CD 40

W. Hoechtlen-Vollmar<sup>1</sup>, A. Fateh-Moghadam<sup>1</sup>, R. BartP, S. Poley<sup>1</sup>, C. Schambeck<sup>1</sup>, M. Wick<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Klinische Chemie, <sup>2</sup>Med. Klinik III, Klinikum Großhadern, Marchioninistraße 15, 81366 München

Das Multiple Myelom ist durch die Akkumulation eines Klon maligner Zellen im Knochenmark gekennzeichnet, welche sich morphologisch als Plasmazellen präsentieren. Um polyklonal stimulierte Plasmazellen von Myelomzellen zu unterscheiden, wurde ihr Immunphänotyp durchflußzytometrisch analysiert und die Expressionsdichte der Oberflächenmarker CD 40, CD 19 und CD 56 mit der reifer B-Lymphozyten verglichen. Plasmazellen und Myelomzellen wurden durch die Expression des Plasmazellmarkers B-B4 und die Überexpression von CD 38 identifiziert und konnten als B-B4+, CD 38++ Fraktion von Lymphozyten sowie anderen mononukleären Zellen des peripheren Bluts und Knochenmarks abgetrennt werden. Das Oberflächenprotein CD 40 wurde auf den Myelomzellen aller untersuchten Plasmozytompatienten (5 Patienten) nachgewiesen, seine Expressionsdichte entsprach in 4 Fällen der reifer B-Lymphozyten. Bei einer Patientin mit plasmablastischem Myelom lag eine höhere Expression von CD 40 vor. Bei polyklonaler Plasmazellvermehrung – analysiert wurden 4 Patienten mit benigner Grunderkrankung – konnte dagegen CD 40 nicht nachgewiesen werden. CD 19, der Linienmarker der B-Zellreihe, wurde auf polyklonal stimulierten Plasmazellen in etwas geringerer Dichte als auf B-Lymphozyten gefunden, nicht dagegen auf Myelomzellen. Weder B-Lymphozyten noch polyklonale Plasmazellen exprimierten das NK-zellspezifische Adhäsionsmolekül CD 56, 3 der untersuchten Plasmozytompatienten wiesen jedoch CD 56, bzw. NCAM positive Myelomzellen auf. Myelomzellen unterscheiden sich von polyklonal vermehrten Plasmazellen demnach durch das Fehlen des Oberflächenmarkers CD 19, durch die fakultative Expression von CD 56 sowie durch die Expression von CD 40. CD 40, ein dem Rezeptor des Nervenwachstumsfaktors verwandtes Transmembranprotein, wurde von uns nicht nur auf B-Lymphozyten und Monozyten, sondern auch auf malignen Plasmazellen nachgewiesen. Das CD 40 Protein, welches eine entscheidende Rolle bei der klonalen Expansion von B-Zellen spielt, wird während deren Aktivierung vermehrt exprimiert und bei der Differenzierung zu Plasmazellen in Analogie zu unserem Ergebnis downreguliert (Banchereau, J., and Rousset, F.: Adv. Immunol. 52:125, 1992). Die Expression von CD 40 auf malignen Plasmazellen ist daher nicht nur von diagnostischer Bedeutung, sondern auch pathogenetisch interessant, da CD 40 zur Verhinderung des programmierten Zelltods (Apoptose) und infolgedessen zur Akkumulation maligner Plasmazellen im Knochenmark beitragen könnte.

## 68 Computergestützte Befundinterpretation der Urinproteindiagnostik

M. Ivandic, W. Hofmann, W. G. Guder

Städt. Krankenhaus München-Bogenhausen, Institut für Klinische Chemie, Engschalkinger Straße 77, 81925 München

Die quantitative Messung definierter Einzelproteine im Urin ermöglichen den Ausschuß und die Differenzierung von Proteinurien und Hämaturien. Aus dem Verhältnis der Einzelproteine können tubulointerstitielle von postrenalen und glomerulären Ursachen unterschieden werden (1).

Auf der Grundlage dieser „Wissensbasis“ wurde ein Befundinterpretationssystem entwickelt, das die zeitintensive ärztliche Beurteilung der Urinproteindiagnostik unterstützt.

Auf der Basis der Ergebnisse für Leukozytenesterase und Hämoglobin, Creatinin, Gesamteiweiß, Albumin, IgG und  $\alpha_1$ -Mikroglobulin wird eine abgestufte Befundung und Interpretation des Ausscheidungsmusters eingeleitet. Je nach Fragestellung werden die Meßwerte von  $\alpha_2$ -Makroglobulin und N-Acetyl- $\beta$ , D-Glucosaminidase miteinbezogen. Fakultativ kann die GFR anhand der Serummeßgrößen Creatinin und  $\alpha_1$ -Mikroglobulin berücksichtigt werden.

Das nötige Expertenwissen ist in einer zweiseitigen Wissensbasis in der Programmiersprache C implementiert. Das Programm stützt sich auf ein Regelwerk aus „WENN . . . , DANN . . .“-Anweisungen, das in die fünf Module Plausibilitätskontrolle, GFR, Hämaturie, Leukozyturie und Proteinurie gegliedert ist. Zur Klassifizierung des Ausscheidungsmusters wird auf die Ergebnisse einer geometrischen Abstandsklassifizierung zurückgegriffen. Das Wissen für diese Musterklassifizierung wurde aus einem Lernkollektiv von ca. 500 Patienten mit klinisch gesicherten Diagnosen extrahiert.

1. Hofmann, W.; Sedlmeier-Hofmann, C.; Ivandic, M.; Schmidt, D.; Guder, W.G.; Edel, H. (1993): Lab med 17: 502 - 512.

## 69 Multicenter evaluation of an immunoturbidimetric assay for the determination of HbA<sub>1c</sub> on clinical chemistry analyzers

J. Jarausch, P. Lehmann

Evaluation Department Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany

At present the determination of HbA<sub>1c</sub> is mostly performed by chromatographic methods. Although the convenience of the determination has been improved by the introduction of automated HPLC units the chromatographic detection of HbA<sub>1c</sub> is still slowing down the production of patient results. A new homogeneous immunoassay for HbA<sub>1c</sub>, Tinaquant® @ HbA<sub>1c</sub>, has been developed by Boehringer Mannheim that allows for the first time the determination of glycated haemoglobin on selective mode analyzers. The new assays is based on the photometric determination of total haemoglobin and the specific immunoturbidimetric determination of HbA<sub>1c</sub>. Up to 250 determinations of HbA<sub>1c</sub> can be performed within one hour on BM/Hitachi 717. The diagnostic value of the new HbA<sub>1c</sub> assay in the clinical application was evaluated in 18 laboratories in Europe, Japan and the USA. The measurements were carried out on BM/Hitachi 704, 717, 747, 911 and on COBAS® Fara and Mira. In a precision study of all participants the median coefficients of variations for the intra- and interassay precision were 3.2 and 4.2% CV, respectively. The accuracy of the new assay was checked by the recovery in the new control materials Precinorm® and Precipath® HbA<sub>1c</sub> as well as in two Lyphochek® controls (range: 93.3 – 103.8%). A good transferability of the results was found in an interlaboratory survey with five lyophilized blood samples. The deviation of the results obtained by the individual participants from the median of all participants was within a range of  $\pm 0.8\%$  HbA<sub>1c</sub>. The comparability of the new assay with routine methodologies was found to be

dependent on the method applied and on the elution protocol used with a chromatographic method ( $r: 0.89-0.99$ ). The reference range of the Tinaquant® @HbA<sub>1c</sub> assay was established from 355 samples of adult non-diabetic blood donors. The corresponding range was 4.3 - 5.9% HbA<sub>1c</sub> (2.5th and 97.5th percentiles). From the results obtained in 18 laboratories it is concluded that the new HbA<sub>1c</sub> assay is exhibiting a comparable analytical performance and is at the same time offering a superior specificity and a much larger sample throughput if compared with established methodologies (HPLC).

## 70 Analysis of APC mutations in colorectal cancer by non radioactive semi-automated DNA-sequencing

S. Jeremias, P. Nollau, C. Moser, G. Weinland\*, Ch. Wagener  
Abt. f. klinische Chemie, Medizinische Klinik, Universitätsklinik Eppendorf, Martinistraße 52, 20246 Hamburg, Germany  
\*Chirurgische Abt., Israelitisches Krankenhaus, Orchideenstieg 14, 22297 Hamburg, Germany

Mutations are gaining increasing importance in the diagnosis of malignancies and inherited genetic disorders. Different techniques for the detection of mutations (e. g. SSCP, TGGE) have been applied with variable sensitivity (1). In contrast, 100% of sensitivity is achieved by DNA-sequencing with the advantage of precise localisation and determination of the nucleotide exchange. Nevertheless, mutations may even be missed especially in heterogeneous tumor tissues depending on the ratio of mutant to normal alleles.

We screened 30 colorectal tumors for mutations in a 1120 bp spanning region of codon 15 of the APC gene by non radioactive semi-automated sequencing. APC mutations have been detected frequently in FAP (familial adenomatous polyposis) patients and in sporadic colorectal tumors (2) especially in early stages providing this gene as a tumorspecific marker for the future.

Different strategies of sequencing (Taq cycle sequencing, single strand sequencing) were tested for the detection of APC mutations on variable background of wildtype alleles. By application of an optimized Taq cycle sequencing technique, a new 5 bp deletion has been identified in a spontaneous colorectal carcinoma specimen.

1. Dianzani, I. et al. (1993): Dilemmas and progress in mutation detection. Trends in Genetics, Vol. 12, No: 12.
2. Miyoshi, Y. et al. (1992): Germ-line mutations of the APC gene in 53 familial adenomatous polyposis patients. PNAS, Vol. 89, pp. 4452 - 4456.

## 71 Predominant secretion of meta-o-methylated catecholamine metabolites by pheochromocytomas: Implications for the diagnostic strategy in patients with incidentally discovered adrenal mass

R. Jung, P. Algenstaedt\*, M. Wolf\*, C. Knabbe  
Abt. f. Klinische Chemie und \*Kernklinik, Med. Klinik, Universitäts-krankenhaus Eppendorf, 20246 Hamburg

Pheochromocytomas usually release epinephrine or norepinephrine (or both) causing hypertension. We present two cases of patients admitted for examination of incidentally discovered adrenal mass without severe hypertension. Daily determination of 24 hour urinary excretion of catecholamines and their metabolites by HPLC analysis with electrochemical detection showed normal values for epinephrine in all 16 collection periods (range: < 1- 9,4 µg/24h; normal: <20), for norepinephrine in 10 samples (60%) (range: 90- 450 µg/24h; normal <105), and for dopamin in 15 samples (94%) (range: 80 - 499 µg/24h; normal: <450). Excretion of the catecholamine

metabolite metanephrine was increased in 50% (range: 90 - 1284 µg/ 24h, normal: <298), excretion of vanillylmandelic acid was unregularly enhanced. In contrast, in all samples excretion of normetanephrine was vastly increased up to 36 000 µg/24h (normal: <354). Scintigraphy with <sup>123</sup>I-metaiodobenzylguanidine was typical for pheochromocytomas which was confirmed by histological examination of the tissue after surgery. We conclude that the simultaneous determination of urinary catecholamines and their metaomethylated metabolites metanephrine and normetanephrine enhances the diagnostic sensitivity in patients with incidentally discovered adrenal mass, particularly if no clinical signs of hormonal activity are apparent.

## 72 Fluoreszenzmikroskopie der Erythrozyten

M. Kärcher, T. Gening, W. Iwanow  
Medizinisches Institut Semipalatinsk, GUS

### Fragestellung

Trotz den modernsten Untersuchungen der Erythrozytenmorphologie gibt es jedoch keine klare Vorstellung über die Erythrozytendetails. Deswegen bleibt die Nachforschung neuer Differenzialmethoden zur Erythrozytenuntersuchung als eine wichtige Aufgabe.

### Methodik

Die mit Isotone abgewaschenen Erythrozyten im Verhältnis 1 : 1 mit Paraformglutaraldehyd mindestens 30 Minuten fixieren. Das fixierte Sediment dreimal nacheinander für jeweils 5 min im Citrat-Phosphat Puffer pH 6,8 - 7,2 bei 2000 Umdrehungen/min zentrifugieren. Aus den im Citrat-Phosphat-Puffer im Verhältnis 1 : 1 resuspendierten Erythrozyten Ausstriche machen. Luftgetrocknete Präparate für 10 min in eine mit Puffer pH 6,8 - 7,2 verdünnte Akridinorange-Lösung (1 : 10 000) tauchen, danach zweimal nacheinander für jeweils 1 min im Puffer spülen. Farbstoffreste auf der Objektträgerunterseite mit einem Tuch entfernen und Präparat schräggestellt bei 37° C lufttrocknen. Die Auswertung der Präparate wird mit einem Fluoreszenzmikroskop vorgenommen.

### Ergebnisse

Die vorgeschlagene fluoreszenzmikroskopische Methode erlaubt Aussagen über Form, Größe, Farbintensität und Leuchteigenarten des Zellzytoplasmas der Erythrozyten. Die Erythrozyten sind polymorph, ihre Farbe variiert von dunkelgrün über gelb-orange nach rot. Bei Kranken mit Anämie sieht man rot fluoreszierende Einschlüsse in den Erythrozyten.

### Schlußfolgerung

In der Literatur ist die Meinung verbreitet, die Erythrozyten würden nicht fluoreszieren (1, 2). Unsere Ergebnisse beweisen, daß bei bestimmten Bedingungen die Erythrozyten fluoreszieren.

### Literatur:

1. Marmont, A.; Damasio, E. (1963): 9. Freiburger Symposium, 113 - 129.
2. Ziele, G. (1984): Labmed. 8: 424 - 428.

## 73 $\beta$ -adrenerge Stimulation erhöht die antiadhäsive Aktivität von Glykokonjugaten des Speichels gegen Mannosyl-spezifische Lektine

A. Kage, E. Köttgen

Universitätsklinikum Rudolf Virchow, Institut für Klinische Chemie und Biochemie, Spandauer Damm 130, 14050 Berlin

Adhäsion ist der erste Schritt einer mikrobiellen Invasion des Organismus und kann durch eine Oligosaccharid-Lektin-Wechselwirkung vermittelt werden. Dabei heften sich Mikroorganismen über Oberflächen-gebundene Lektine an den Oligosaccharidanteil von Glykokonjugaten der Mukosaoberfläche. Dieser Bindungsmechanismus wurde für *E. coli* Stämme, *Candida albicans* Stämme und Viren nachgewiesen. Unter anderen wurden Mannosyl-Gruppen als Bindungsstellen nachgewiesen. Neben den sekretorischen Immunglobulin A kann der Oligosaccharidanteil von Glykokonjugaten die Lektin-Oligosaccharid vermittelte Bindung hemmen, sofern zu den Lektinen komplementäre Strukturen vorhanden sind. Damit kommt der Zusammensetzung der Oligosaccharide der Glykokonjugate in Sekreten eine entscheidende Bedeutung für die Inhibition der Lektin-vermittelten mikrobiellen Adhäsion zu.

Am Beispiel der Mundhöhle und ihren sekretorischen Drüsen sollen Einflußfaktoren auf die Sekretion von Oligosaccharidstrukturen des Speichels untersucht werden.

Die antiadhäsive Aktivität des Speichels wird mit einem kompetitiven Test gemessen, bei dem immobilisierte Glykokonjugate die Oligosaccharide der Schleimhaut repräsentieren, an welche markierte hochgereinigte pflanzliche Lektine bekannter Spezifität binden, die ihrerseits stellvertretend für mikrobielle Lektine eingesetzt werden. Die Zugabe von Glykokonjugaten mit Oligosacchariden komplementärer Struktur führt zu einer Inhibition der pflanzlichen Lektine an die immobilisierten Glykokonjugate. Durch Vergleich mit der antiadhäsiven Aktivität eines Kohlenhydrates bekannter Struktur wird eine Eichung des Test über eine Standardkurve durchgeführt.

Ratten erhielten das  $\beta$ -Mimetikum Isoproterenol in verschiedenen Dosierungen in die Schwanzvene injiziert und der spontan produzierte Speichel wurde mittels des oben dargestellten Test untersucht. Die Daten zeigen, daß die antiadhäsive Aktivität des Speichels gegenüber Mannosyl-spezifischen Lektinen nach Injektion innerhalb von 60 Sekunden erheblich ansteigt, während die antiadhäsive Aktivität gegenüber Lektinen mit anderer Oligosaccharid-Spezifität keine Unterschiede zeigt.

Lassen sich in derzeit durchgeführten Experimenten derartige Veränderungen auch beim Menschen nachweisen, so ergeben sich neue pathobiochemische Ansätze zum Verständnis psychoimmunologischer Phänomene.

## 74 GraphROC for Windows - software for the estimation of basic clinical characteristics of quantitative laboratory tests

V. Kairisto<sup>1,3</sup>, A. Poola<sup>1,2</sup>, V. Nääntö<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Chemistry University of Turku, Turku, Finland

<sup>2</sup>ProExpert Ltd., Tallinn, Estonia

<sup>3</sup>Central Laboratory, University Hospital of Turku, FIN-20520 Turku, Finland

Large sets of quantitative results from routine laboratory tests are readily available in the databases of computerized clinical laboratories and systems are available for combining patient information with laboratory data without violating patient data secrecy. We have developed a computer program, GraphROC for Windows, for the utilization of database information in the estimation of clinical characteristics of quantitative laboratory tests. Source

data is read in as an ASCII-file containing all original numerical observations. In data management graphical and numerical presentations are combined. Numerical data can be „picked up“ from the graph by simple mouse operations. Non-parametric reference limits, median or any percentile in the distribution with corresponding confidence limits can be calculated. In sensitivity-specificity analysis both the „diseased“ and „healthy“ distributions are shown in the same graph, from which any cut-off limit can be evaluated. Clinical sensitivity and specificity values update with cursor/mouse movement. Their confidence limits, as well as positive and negative likelihood ratios, are shown in a separate click-window. Predictive values are calculated assuming the same disease prevalence as in source data, but the prevalence (pre-test probability) can also be manually entered to obtain predictive values which correspond to the actual clinical situation. Receiver operating characteristics (ROC)-curves can be generated and combined into the same graph for comparison of several different tests. Area under curve with corresponding confidence interval is calculated for each ROC-analysis. The results and corresponding graphs of all analyses can be printed or exported to other Microsoft Windows programs. The following features, which have previously been described by us, have also been included in GraphROC for Windows: (1) optimization of bin widths in frequency histograms and in ROC-analysis, (2) estimation of reference change limits and (3) optional rough indirect estimation of „health“ related intervals from mixed distributions, i.e. from unselected or partially selected patient data.

1. Nääntö, V.; Kairisto, V.; Kouri, T. (1992): Production of reference values from hospital data. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 5 (Suppl. 21 I): 39 - 42.

2. Kairisto, V.; Virtanen, A.; Uusipaikka, E., et al. (1993): Method for determining reference changes from patients serial data: Example of cardiac enzymes. *Clin. Chem.* 39(11): 2298 - 2304.

## 75 Praktische Erfahrungen mit dem vollmechanisierten Gerinnungsanalyse-automaten STA

C. Kaiser, H. A.G. Müller

Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinik am Eichert, 73035 Göppingen

STA (Hersteller Diagnostica STAGO, Asnieres, Frankreich) ist ein selektives Mehrkanal-Analysensystem, mit dem sowohl Basis- als auch Spezialtests der Gerinnungsanalytik vollmechanisiert bearbeitet werden können. Wir berichten über erste praktische Erfahrungen mit dem Gerät unter Routinebedingungen. Untersucht wurden die Parameter Quick, PTT, Fibrinogen und Thrombinzeit (TZ), Methode bei Heparintherapie, Thrombinkonzentration im Test  $\geq 3$  NIH/ml) mit koagulometrischen und Antithrombin III (AT 3) und Protein C mittels chromogener Methoden. Die Kalibration der Tests Quick und Fibrinogen erfolgt chargenspezifisch durch Einlesung des Barcodes auf der Reagenzienpackung und konnte durch eigene Messung eines gefrorenen Plasmapools bestätigt werden; die Tests AT 3 und Protein C werden über einen gemeinsamen Kalibrator kalibriert. Die Präzision in der Serie lag bei den Clotting-Tests bei 1 - 3%. Die Präzision von Tag zu Tag wurde an Kontrollseren ermittelt und mit den Ergebnissen am halbmechanisierten System KC 40 (Fa. Amelung, Lemgo) verglichen. Der Variationskoeffizient lag für Quick, PTT und TZ am STA zwischen 2 und 4% (KC 40 2 - 7%), für die Fibrinogen-Bestimmung bei 4 - 8% (KC 40 9 - 20%). Die Interassay-Präzision der photometrischen Tests AT 3 und Protein C war mit 2 - 4% ebenfalls sehr gut. Die Ergebnisse der einzelnen Tests sind zwischen STA und KC 40 mit gleichem Reagenz über den gesamten Meßbereich sehr gut vergleichbar, ebenso die mit unterschiedlichen Reagenzien am STA. Die Haltbarkeit der Reagenzien für die chromogene Bestimmung von AT 3 kann durch Verwendung eines „Reduktors“ auf über 7 Tage verlängert werden. Die Bedienung des Gerätes ist einfach und schnell zu erlernen. Die Proben, (Primärrohren) können nach Einlesen des Barcodes an beliebiger Stelle im Probenrack plaziert werden, ein Vertauschen ist durch die posi-

tive Identifikation im Probenrack ausgeschlossen. Auch bei laufender Routine ist ein Nachladen von Proben – auch Eilproben – jederzeit möglich.

Der Gerinnungsautomat STA ermöglicht die routine- und notfallmäßige Bestimmung von Routine- und Spezialtests und überzeugt durch kurze Analysenzeiten und hohe Präzision. Der bidirektionale EDV-Anschluß garantiert ein hohes Maß an Bedienungskomfort.

## 76 Muster der duodenalen Sekretion und fäkalen Exkretion der pankreatischen Elastase-1 bei Gesunden und Patienten mit exokriner Pankreasinsuffizienz

M. Katschinski, J. Schirra, A. Broß, R. Arnold, B. Göke  
Abteilung Gastroenterologie Zentrum für Innere Medizin der Philipps-Universität Marburg

Die pankreatische Elastase-1 (E1) wird während der Darmpassage nicht degradiert und deshalb im Stuhl angereichert. Ziel der Studie war, die diagnostische Wertigkeit der fäkalen E1-Konzentration für die exokrine Pankreasinsuffizienz (EPI) zu untersuchen. Darüber hinaus wurden die zeitlichen Muster der postprandialen Enzymsekretion bei chronischer Pankreatitis mit exokriner Insuffizienz und Gesunden verglichen.

### Methodik

Bei 23 Patienten mit klinischem Verdacht auf EPI und 10 gesunden Kontrollpersonen wurde die duodenale Sekretion von Amylase, Lipase, Trypsin, Chymotrypsin und E1 interdigestiv (60 min) und während endogener Stimulation unter duodener Perfusion eines Lundh-Mahls (150 min, 2,5 kcal/min) gemessen. Postprandiale sekretorische Peaks wurden analog zu Zimmermann et al, Gastroenterology 1992; 102:1378-84, identifiziert. Die Stuhlkonzentrationen von E1 und Chymotrypsin wurden als Mittelwert von zwei Proben verschiedener Tage bestimmt. E1 wurde mit einem ELISA gemessen, der 2 monoklonale Antikörper einsetzt (ScheBo Tech Wettenberg).

### Ergebnisse

Die endogene Stimulation zeigte bei 11 Patienten eine EPI (alkoholisch: n = 6) und bei 12 Patienten eine normale Pankreasfunktion (NPF). Mittelwert ± SEM; \*p < 0.05 vs Kontrolle, #: p < 0.05 vs NPF

Parameter	Pankreassekretion (AUC-150min über basal)			Stuhl/konzentration	
	Amylase (kU)	Lipase (kU)	E1 (µg)	E1 (µg/g)	Chymotrypsin (U/g)
Kontrolle	26.1 ± 5.0	725.5 ± 80.0	96.5 ± 13.5	1118.5 ± 265.5	16.5 ± 3.8
NPF	30.1 ± 4.1	741.9 ± 130.3	97.4 ± 13.5	1275.8 ± 286.8	17.3 ± 4.5
EPI	1.9 ± 1.4*#	100.1 ± 18.2*#	22.7 ± 4.6*#	197.1 ± 43.7*#	8.4 ± 1.8*#

Parameter	Sekretorische Peaks (Ampl.: Amplitude)			
	Peaks/150 min	Ampl. Amylase (kU)	Ampl. Lipase (kU)	Ampl. E1 (µg)
Kontrolle	1.0 ± 0.2	42 ± 0.8	140 ± 43	16 ± 3.5
NPF	1.0 ± 0.2	4.8 ± 0.6	126 ± 29	18.1 ± 3.4
EPI	0.7 ± 0.1	1.1 ± 0.3*#	29 ± 7*#	6.1 ± 1.0*#

Parameter	Spearman Rang Korrelationskoeffizienten (*: p < 0.05, **: p < 0.005)		
	Duod. Amylase (U/g)	Duod. Chymotrypsin	Duod. E1
Chymotrypsin i. Stuhl	0.35*	0.43*	0.34*
E1 i. Stuhl (µg/g)	0.80**	0.75**	0.65**

Parameter	Diagnostische Wertigkeit	
	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
Chymotrypsin i. Stuhl (U/g; cut-off: < 3.5)	0.27	0.95
E1 i. Stuhl (µg/g; cut-off: < 400)	0.91	0.91

### Diskussion

Die Bestimmung der E1 im Stuhl ist ein einfacher und nichtinvasiver Test zur Diagnostik der EPI. Aufgrund ihrer Stabilität während der Darmpassage ist die fäkale E1 repräsentativ für die postprandiale

exokrine Pankreassekretion und deshalb bei hoher Spezifität erheblich sensitiver als die Chymotrypsinkonzentration im Stuhl. Sekretorische Peaks sind typisch nicht nur für die interdigestive sondern auch für die postprandiale Pankreassekretion. Sie sprechen dafür, daß eine Mahlzeit das interdigestive Muster nicht beseitigt, sondern modifiziert. Bei chronischer Pankreatitis mit exokriner Insuffizienz sind die Amplituden, nicht die Frequenz, der Peaks reduziert. Dies spricht für eine intakte neurohormonale Kontrolle.

## 77 Geschlechtsspezifische Lokalisation der hepatischen Lipogenese in periportalen und pericentralen Hepatocyten der Ratte

N. Katz, A. Schuld  
Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Justus-Liebig-Universität Giessen

Wesentliche Teile des hepatischen Kohlenhydrat- und Aminosäurestoffwechsels werden bevorzugt periportal (pp) oder pericentral (pc) katalysiert. Diese Heterogenität wird mit dem Begriff der „Metabolischen Zonierung“ des Leberparenchyms beschrieben (1). Kontroverse Befunde liegen über die Lokalisation der Lipogenese im Leberacinus vor (2).

In der vorliegenden Studie wurden periportale bzw. pericentrale Hepatocyten weiblicher bzw. männlicher Wistar-Ratten mittels Digitonin/Collagenase-Perfusion isoliert. Durch Bestimmung der pp bzw. pc Markerenzyme Glucose 6-Phosphatase und Glutaminsynthetase wurde die Selektivität der jeweiligen Hepatocytenpopulation überprüft.

In weiblichen Ratten wiesen die lipogenen Enzyme ATP-Citrat-Lyase und Fettsäure-Synthase ca. 50% höhere Aktivitäten in pc gegenüber pp Hepatocyten auf. Die Lipogenese aus Acetat war 75% höher in pc Hepatocyten.

In männlichen Ratten wiesen die lipogenen Enzyme dagegen im Mittel um 50% höhere Aktivitäten in pp gegenüber pc Hepatocyten auf.

Entsprechend war auch die Lipogenese in pp Hepatocyten um 40% höher als in pc Zellen. Diese geschlechtsspezifischen Unterschiede erklären zumindest teilweise die bislang widersprüchlichen Befunde verschiedener Arbeitsgruppen.

1. Jungermann, Katz (1989): *Physiol. Rev.* 69, 708.
2. Quistorff, et al. (1992): *Enzymes* 46, 59.

## 78 Vergleich der IFCC-Methoden für ALAT, ASAT und GGT bei 37° C mit den eingeführten Standardmethoden bei 25° C und 37° C

G. Klein, P. Lehmann, E. Michel, H. Regenauer  
Boehringer Mannheim GmbH

Die derzeit in Deutschland für die Durchführung bei 25° C gültigen Standardmethoden zur Bestimmung der ALAT, ASAT und GGT wurden mit Standardmethoden für 37° C, die in der Reagenzzusammensetzung den IFCC-Empfehlungen entsprechen, verglichen. Die für 25° C definierten Methoden wurden bei 25° C und 37° C, die ursprünglich für 30° C definierten IFCC-Methoden bei 37° C durchgeführt. Die Messungen von ALAT und ASAT erfolgten am EPOS® 5060 mit Applikationen analog der manuellen Durchführung, von GGT am Hitachi 717 mit Kalibratoren, die an der manuellen Durchführung abgeglichen waren.

Beim Methodenvergleich mit durchschnittlich 40 Patientenserum besteht zwischen den bei 25° C und 37° C erhaltenen Meßwerten für

alle 25°C-Methoden eine sehr geringe Streuung um die Regressionsgerade und ein vernachlässigbarer Achsenabschnitt. Die Steigung der Regressionsgeraden ( $x = 25^\circ\text{C}$ ) beträgt für ALAT = 1,84 (Bereich bis 150 U/l, 37°C) ASAT = 2,12 (Bereich bis 150 U/l, 37°C) GGT = 1,75 (Bereich bis 1500 U/l, 37°C).

Werden die 25°C-Methoden mit den IFCC-Methoden bei 37°C verglichen, so nimmt bei ALAT und ASAT aufgrund der Aktivierung mit Pyridoxalphosphat die Streuung um die Ausgleichsgerade zu. Als Geradensteigungen ( $x = 25^\circ\text{C}$ -Standardmethode) ergeben sich: ALAT = 2,23; ASAT = 2,57. Achsenabschnitte sind: ALAT = 1,8 U/l; ASAT = 4,6 U/l. Für GGT bleibt beim Vergleich der Methode nach Szasz (25°C) mit der IFCC-Methode (37°C) die Streuung um die Ausgleichsgerade gering und der Achsenabschnitt vernachlässigbar. Steigung der Regressionsgeraden ( $x = \text{Methode nach Szasz, } 25^\circ\text{C}$ ) ist 2,02, Achsenabschnitt -0,4 U/l.

Während Ergebnisse der Standardmethode GGT bei 25°C in Patientenproben näherungsweise auf die 37°C-Methode nach IFCC umgerechnet werden können, ist diese Umrechnung bei ALAT und ASAT ohne systematische Fehler nicht möglich.

## 79 Comparison of HPLC procedure with ACAsx adapted Enzyme Multiplied Immunoassay Technique (EMIT) in determination of benzodiazepine levels in serum

T.O. Kleine<sup>1</sup>, C. Naumann-Haak<sup>1</sup>, R. Hackler<sup>1</sup>, M. Hess<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Med. Zentrum für Nervenheilkunde, Funktionsbereich Neurochemie, der Universität Marburg; <sup>2</sup>Laboratorium Dr. M. Hess, Kassel

Since under benzodiazepine treatment primary compounds and their metabolites appear to be biologically active (1) determination of serum levels should measure derivatives as much as possible. Therefore, we compared the following two procedures: High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Benzodiazepines together with an internal standard were eluted isocratically from a nucleosil C 18 column with 0.05 mol/l ( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Acetonitril (62 : 38; v/v; pH 4.0; flow rate 1.45 ml/min) and quantified by UV detection at 230 nm (Waters) after sample pretreatment with Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> solution and diethyl ether. Benzodiazepines were quantified kinetically with DuPont-EMIT reagents using the ACAsx discrete analyzer (DuPont de Nemours) with 0.100 ml sample in 5.0 ml total volume (2). Results ( $\mu\text{g/l}$ ) obtained by HPLC procedure were evaluated with those of EMIT ACAsx procedure (cf. 3). Analysing control sera (Ciba-Corning, Sigma) diluted with negative serum pools ( $n = 20$ ) similar results were obtained using the HPLC procedure (sum of benzodiazepines) and EMIT-ACAsx. Evaluating serum levels from patients under treatment with bromazepam, clobazam, diazepam, flurazepam, lorazepam, or oxazepam, similar results were obtained only when the sum of benzodiazepines determined by HPLC were compared with EMIT-ACAsx. Thus the fast EMIT ACAsx procedure quantifying the sum of benzodiazepine applied plus its metabolites proves to be an accurate screening test in contrast to the time consuming HPLC procedure which measures single components.

1. Rall, T.W. (1990): in: Pharmacological Basis of Therapeutics. (L.S. Goodman, A. Gilman eds.) 8th ed. Pergamon Press, New York pp. 345 - 382.
2. Kleine, T.O. (1983) in: InCom'90 (W. Günther, J. P. Mathes, H. H. Perkampus eds.) GIT, Darmstadt pp. 100 - 103.
3. Passing, H.; Bablok, W. (1983): J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 21, 709 - 720.

## 80 Determination of different tricyclic antidepressant derivatives in human serum by Enzyme Multiplied Technique (EMIT) in comparison to HPLC technique

T.O. Kleine<sup>1</sup>, C. Naumann-Haak<sup>1</sup>, R. Hackler<sup>1</sup>, M. Hess<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Med.Zentrum für Nervenheilkunde, Funktionsbereich Neurochemie, der Universität Marburg; <sup>2</sup>Laboratorium Dr. M. Hess, Kassel

Under the treatment with tricyclic antidepressants their serum levels as well as levels of derivatives were determined in blood serum using two different procedures: High performance liquid chromatography (HPLC): tricyclic antidepressants and their secondary amine derivatives together with an internal standard were eluted isocratically from a nucleosil C 18 column with 0.05 mol/l ( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/acetonitril (70 : 30; v/v; pH 3.0; flow rate 1.30 - 1.45 ml/min) and quantified by UV detection at 215 nm (Waters) after a sample pretreatment with Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> solution and n-hexane. Enzyme Multiplied Immunoassay Technique (EMIT): Tricyclic antidepressants together with their metabolites were determined by the quantified EMIT tox Serum Tricyclic Antidepressants assay (Syva) as nortriptyline equivalents (1) adapted to the ELAN Analyzer Eppendorf (0.006 ml sample in 0.295 ml total volume) (2). Results ( $\mu\text{g/l}$ ) of the HPLC procedure were evaluated with those of EMIT procedure by linear regression. Although both procedures measured similar amounts of tertiary tricyclic antidepressants and their secondary amines in control sera (Ciba Corning, Sigma) higher amounts were found with the EMIT procedure in sera from patients under treatment with doxepin or amitriptyline by a factor of  $\approx 2$ , under treatment with imipramine, resp. clomipramine by a factor of  $\approx 3$ , resp.  $\approx 7$ . Thus the HPLC procedure measures tertiary tricyclic antidepressants and their secondary amines whereas EMIT procedure records the sum of these compounds plus additional metabolites e.g. 2- and 10-hydroxylated metabolites each in comparable amounts (1). As ring-hydroxylated compounds have similar pharmacological effects as tertiary tricyclic antidepressants (3) these metabolites should be considered under therapeutical and toxicological conditions.

1. Kleine, T.O. (1987): Fresenius Z. Anal. Chem. 327, 76 - 77.

2. Kleine, T.O.; Hackler, R. (1992): In InCom'92 (W. Günther et al. eds.) Vogel, Würzburg pp. 10 - 11.

3. Potter, W.Z. et al. (1979): Biol. Psychiatr. 14, 601 - 613.

## 81 Sensitivity of urine drugs of abuse screen tests can be increased by quantification of Enzyme Immunoassay Technique (EMIT)

T.O. Kleine, C. Naumann-Haak, R. Hackler

Med.Zentrum für Nervenheilkunde, Funktionsbereich Neurochemie der Universität Marburg

In emergency diagnosis of drug abuse or intoxication EMITs were often used as urine screen tests setting cut off values to get „negative“ or „positive“ results. Detection and decision limits of the tests should be low (1, 2), in contrast to those of eight available DuPont tests. Therefore, we increased sample volume from 0.040 to 0.500 ml (total volume: 5000 ml) and quantified eight urine EMIT tests at the ACAsx Discrete Clinical Analyzer DuPont (test range): amphetamines (UAMP: 0 - 800  $\mu\text{g/l}$ ), barbiturates (UBARB: 0 - 400  $\mu\text{g/l}$ ), benzodiazepines (UBENZ: 0 - 400  $\mu\text{g/l}$ ), cannabinoids (UTHC: 0 - 75  $\mu\text{g/l}$ ), cocaine (UCOC: 0 - 1000  $\mu\text{g/l}$ ), methadone (UMETH: 0 - 100  $\mu\text{g/l}$ ), opiates (UOPI: 0 - 400  $\mu\text{g/l}$ ), phencyclidine (UPCP: 0 - 50  $\mu\text{g/l}$ ), using a 5-point logit log calibration of urine drugs of abuse calibrators diluted with negative urine pools (coefficient of correlation  $r = 0.99$ ; stability of calibration: 1 to 4 months with UTHC, resp. other EMITs). Detection limit (3 S. D. of drug free urine samples ( $n = 30$ )) decreased with UAMP by a factor of 15, UBARB by 8, UBEZ by 20, UTHC by 5, UCOC by 20, UMETH by 30, UOPI by 15, UJPCP by 25. Imprecision from day to day ranged between 10 to 20% CV at low

drug levels. Recovery in negative urine pools spiked with Lyphocheck<sup>®</sup> controls averaged 84 and 118% exhibiting higher values with amphetamine derivates in UAMP ( $\approx$  135%) and benzoylecgonine in UCOC (136%). Samples contaminated with blood ( $\leq$  1 g/l hemoglobin) did not interfere. In summary, the quantified EMIT tests appear to be practicable and more sensitive in urine diagnosis of drug abuse than unmodified ones.

1. Deutsche Forschungsgemeinschaft (1982): J. Clin. Chem. Clin. Biochem 20, 695 - 696.
2. Arbeitsgruppe Klinisch-Toxikologische Analytik (1993): DG Klinische Chemie Mitteilungen 24, 212 - 214.

## 82 Vergleichende Gegenüberstellung der Ergebnisse von vier Verfahren zum Nachweis bzw. zur Bestätigung von HCV-Ig- und HCV-IGM-Antikörper

R. J. Klosson

Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik, Krankenhausbetrieb des Schwalm-Eder-Kreises, 34576 Homberg/Efze

Der Nachweis von IgG-Antikörpern gegen putative HCV-Antigene (z.B. Abbott HCV EIA 2nd gen.) erlaubt keine sichere Aussage über die Aktivität der Erkrankung. Die Bestätigung erfolgt durch den differenzierten Nachweis von Antikörpern gegen strukturelle und nichtstrukturelle Antigene im Supplement Test (HCV FIA Suppl. Assay) oder mit einem rekombinanten Immunoblot mit 4 HCV-spezifischen Antigenen. Seit kurzem sind ein Test zum Nachweis von HCV IgM Antikörpern gegen ein strukturelles Antigen (Abbott HCV IgM EIA) und ein dem Immunoblot entsprechender Dot-Festphasen-EIA (Abbott MATRIX HCV) zur Bestätigung von IgG-Antikörpern gegen 4 rekombinante HCV Antigene verfügbar. Mit Ausnahme des MATRIX Testes können die Verfahren mit einem Spektralphotometer ausgewertet werden. Für den MATRIX-Test wird ein spezielles Gerät (Abbott MATRIX Analyzer) benötigt; der Arbeitsaufwand für den über 5 Stunden laufenden Test ist gering.

Bei Seren von Hepatitispatienten und Blutspendern mit positiver Reaktion im o. g. HCV-IgG-EIA – ohne serologischen Anhalt für eine Hepatitis anderer Genese – wurden Untersuchungen mit den Suppl.-Test, den Dot-EIA und den HCV-IgM-EIA angeschlossen. Eine zweite Serie bestand aus Seren von Patienten mit nachgewiesener Hepatitis A- oder B-Infektion.

Es fanden sich gute Übereinstimmungen des HCV-IgG-EIA mit den Ergebnissen beider Bestätigungsteste bei HCV-IgG-positiven Proben; Kreuzreaktionen mit Hepatitis A und B wurden nicht festgestellt. In Einzelfällen wurden bei HCV-positiven Proben nur Antikörper gegen das Core-Antigen nachgewiesen. In Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen (1) war die ALT Aktivität bei Patienten mit positivem Nachweis im Mittel höher als bei Patienten, die nur im HCV-IgG-EIA eine positive Reaktion zeigten. Dies bekräftigt die Vermutung, daß der HGV-IgG-Test ein Maß für die Aktivität der Erkrankung ist und zur Kontrolle des Spontanverlaufs und des Therapieerfolgs eingesetzt werden kann.

1. Brillanti, et al. (1992): Hepatology 15: 998 - 1001.

## 83 Subclass typing of IgG-paraproteins in human sera by immunofixation electrophoresis

Mariam Klouche, Dorothea Wilhelm, H. Kirchner  
Institute of Immunology and Transfusion Medicine, University of Lübeck Medical School

The distribution and types of paraprotein subclasses were analyzed in 48 sera in which the presence of an IgG-paraprotein was previously demonstrated by conventional immunofixation electrophoresis using anti-IgG antisera. After separation by agarose gel electrophoresis, the proteins were precipitated in situ using sheep anti-human monospecific IgG1-IgG4 antibodies. The frequency of the paraprotein subclasses was approximately 60% IgG1, 17% IgG2, 17% IgG3 and 6% IgG4. The IgG-subclass typing revealed 13 additional monoclonal bands in 12 of the sera analyzed, which were not detected after immunofixation electrophoresis with anti-IgG antisera. Additional monoclonal bands occurred mostly with IgG1-paraproteins. Nine of the 13 additional bands belonged to a different IgG-subclass type, including four IgG1 – IgG2, four IgG1 – IgG3 and one IgG2 – IgG4 paraprotein combination. No association of the paraprotein subclass and a particular light chain type (kappa, lambda) could be detected. The electrophoretic mobility reflecting charge and mass of the paraprotein showed a considerable heterogeneity particularly for IgG1-paraproteins. This was represented by extreme cathodal location in six, moderate anodal movement in four and no mobility in further 12 IgG1-paraproteins. The method described may add to clarify the diagnostic and prognostic significance of the IgG-subclass type of paraproteins in different B-cell neoplasias.

## 84 Verlaufskontrolle der radiogen induzierten Lungenfibrose durch Serum-PIIIP - Bestimmungen (IRMA-Technik) am Tiermodell des Minischweines

A. Knorr<sup>1</sup>, A. Dörfler<sup>1</sup>, S. Albrecht<sup>2</sup>, Th. Herrmann<sup>1</sup>, R. Kumpf<sup>1</sup>, L. Voigtmann<sup>1</sup>, P. Geyer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universitätsklinikum Carl Gustav Carus der TU Dresden, Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie; <sup>2</sup>Universitätsklinikum Carl Gustav Carus der TU Dresden, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik

Die radiogen induzierte Lungenfibrose gilt als eine der schwersten Komplikationen der Strahlentherapie. Dabei ist die fibrotische Umwandlung durch eine Imbalance zwischen Synthese und Abbau von Matrixbestandteilen gekennzeichnet (1). Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, an einem Tiermodell mit Hilfe geeigneter Untersuchungen den Verlauf der Fibrosierung zu beschreiben: Der rechte Lungenflügel von Minischweinen wurde mit klinisch relevanten Dosiswerten (5 x 4 bis 5 x 7 Gy) an einem Beschleuniger Neptun 10p bestrahlt. Der Prozeß der Fibrosierung ließ sich durch Röntgen- und CT-Untersuchungen während des Beobachtungszeitraumes von 9 Monaten post radiationem nachweisen. Parallel dazu wurde als Serumparameter für die Verlaufskontrolle das aminotermine Prokollagen-III-Peptid (PIIIP) mit dem IRMA-Testkit Riagnost der Fa. Behring bestimmt, da hinsichtlich der Immunreaktivität des PIIIP eine weitgehende Übereinstimmung bei Mensch und Schwein besteht (2, 3). Die Ausgangswerte der Seren unbestrahlter Tiere lagen mehrfach höher als der im Testkit für Humanseren angeführte Normalbereich. Die Meßergebnisse bestrahlter Tiere steigen während des Beobachtungszeitraumes an und kehren bei Erreichen des fibrotischen Endstadiums wieder zum Ausgangswert zurück. Die unbestrahlten Kontrolltiere zeigten keine Veränderung. Damit erwies sich das PIIIP als geeigneter Parameter zur Verlaufskontrolle der radiogenen Lungenfibrose beim Minischwein.

1. Kleesiek, K.; Reinards, R.; Greiling, H. (1988): Z. med. Lab. diagn. 29 67 - 83.
  2. Kropf, J.; Gressner, A.M. (1991): Z. med. Lab. diagn. 32 150 - 158.
  3. Jensen, L.T., et al. (1992) Matrix 11 73 - 79.
- Die Arbeit wurde vom BMFT (Reg. Nr. FKZ 07 NBL 03) unterstützt.



## 85 Multicenter Evaluierung des STA Systems für Gerinnungsanalysen

R. Koberstein, B. Sowodniok, K.E. Stötzer  
Boehringer Mannheim GmbH

Das neu eingeführte STA ist für die Gerinnungsanalytik zur Durchführung sowohl von Clotting, als auch von photometrischen Testen konzipiert. Mit einem für ein Gerinnungslabor typischen Anforderungsprofil können 240 Bestimmungen pro Stunde aus Primärgefäßen probenorientiert durchgeführt werden. Methoden zur Bestimmung von Einzelfaktoren, Protein C und Protein S sind ebenfalls problemlos zu applizieren. In Anlehnung an die ECCLS-Empfehlungen wurde das Analysensystem STA in 14 verschiedenen Laboratorien evaluiert. Das Prüfprogramm enthielt Aufgaben zur Impräzision in der Serie und von Tag zu Tag sowie zur Richtigkeit, Drift, Verschleppung, zum Meßbereich und zu Methodenvergleichen. Zu folgenden Methoden wurden Untersuchungen durchgeführt: Thromboplastinzeit (Quick), partielle Thromboplastinzeit (aPTT), Thrombinzeit (TZ), Fibrinogen (Claus) und Antithrombin III (Chromogen). Die Impräzision ist durch Variationskoeffizienten für die Serie von  $VK < 2\%$  und von Tag zu Tag von  $VK < 5\%$  charakterisiert. Die Wiederfindung der Sollwerte in den Kontrollplasmen PreciClot I/II lag im Bereich 95 – 105%. Weite Meßbereiche mit der Option, gewünschte Probenvorverdünnungen am System selbstständig durchführen zu lassen, erübrigten eine Probenvorbehandlung. Es wurde über den Meßtag keine Drift sowie keine Verschleppung (insbes. Heparin und Thrombin) beobachtet. Der Einsatz gleicher Reagenzien an verschiedenen Analysensystemen erbrachte im Ergebnis vergleichbare Meßwertepaare. Wurden bei Globaltesten (Quick, aPTT und TZ) Reagenzien verschiedener Hersteller geprüft, konnten die schon durch andere Untersuchungen festgestellten Unterschiede (therapeutische Bereiche) bestätigt werden. Insgesamt zeigt sich die Performance der Gerinnungsanalytik am STA als gleichwertig oder überlegen zur Routineanalytik bei deutlichen Vorteilen im Handling und der Integration in die Laborroutine. Damit ist das STA als echte Innovation für die Gerinnungsanalytik zu bewerten.

## 86 Störungen der Kreatinin- und Harnsäurebestimmungen im Serum von Patienten nach Lebertransplantation

R. Kock<sup>1</sup>, B. Delvoux<sup>1</sup>, M. Neumaier<sup>2</sup>, H. Greiling<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, RWTH Aachen

<sup>2</sup>Abteilung für Klinische Chemie, UKE Hamburg-Eppendorf

Wir haben die analytische Validität der Resultate von derzeit auf vollmechanisierten Analysen eingesetzten Methoden für die Bestimmung von Harnsäure und Kreatinin an  $n = 20$  Seren von Patienten nach Lebertransplantation mit den Ergebnissen einer unter Verwendung der ID-GC-MS validierten HPLC-Methode verglichen. Geprüft wurden die Jaffe-Methode und vollenzymatische PAP-Methode zur Bestimmung von Kreatinin und die Uricase-PAP-Methode zur Bestimmung von Harnsäure. Im Vergleich zur HPLC-Referenzmethode ergaben sich erhebliche Abweichungen, bei der Jaffe-Methode lagen sie zwischen  $-50\%$  bis  $+75\%$ , bei der vollenzymatischen PAP-Methode zur Bestimmung von Kreatinin zwischen  $-85\%$  und  $+170\%$ , bei der vollenzymatischen Harnsäurebestimmung zwischen  $-80\%$  und  $-30\%$ . Es ergab sich keine Korrelation dieser Abweichungen zur Konzentration des gesamten oder direkten Bilirubins im Serum. Diese Resultate zeigen, daß bei Proben von Patienten nach Lebertransplantation, die ja in der Regel nur durch ihr erhöhtes Bilirubin auffallen, die derzeit gebräuchlichen Methoden zur Bestimmung der Harnsäure und des Kreatinins in nicht vorhersagbarer Weise zu klinisch relevant falschen Resultaten führen. In diesen Fällen erfolgt häufig eine Multimedikation und krankheitsbedingt liegen auch andere Störsubstanzen im Serum vor, die offensichtlich in verschiedener Weise bei den hier untersuchten photometrischen Verfahren zur Bestimmung der Analyte Harnsäure und Kreatinin interferieren. Es muß daher zwingend auf Referenzmethoden für diese Analyte zurückgegriffen werden, wenn das Monitoring des Kreatinins und/oder der Harnsäure in solchen Fällen von erheblicher klinischer Relevanz ist. Hierfür eignet sich beispielsweise auf das in dieser Arbeit eingesetzte HPLC-Verfahrens zur simultanen Bestimmung von Harnsäure und Kreatinin. In jedem Fall sollten weitergehende Interferenzstudien für diese Parameter durchgeführt werden.

## 87 Einsatzmöglichkeiten der Vielwinkel-laserstreulichtphotometrie in der klinischen Biochemie am Beispiel der Molekulargewichtsbestimmung des Hyaluronans

R. Kock, H. Greiling

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, RWTH Aachen

Die Lichtstreuung ist als Meßprinzip für die Durchführung von Antigenbestimmungen in der Laboratoriumsmedizin etabliert. Darüberhinaus ermöglicht die derzeit zur Verfügung stehende Vielwinkellaserstreulichttechnologie als eichfähige Absolutmethode zur Bestimmung von Molekulargewichten von Biopolymeren zusätzliche Untersuchungsmöglichkeiten. Intensiv wurde von uns die Kopplung einer Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPGPC) mit dem Wyatt DAWN DSP-F Vielwinkellaserlichtstreuung (MALLS) zur Untersuchung des in der klinischen Therapie bereits lange im Einsatz befindlichen Hyaluronans geprüft. Im Gegensatz zur Kleinwinkellaserlichtstreuung (Kock, 1992) ist die neue Technologie wesentlich weniger störanfällig und ermöglicht durch Messung der Winkelabhängigkeit der Streulichtintensität die Bestimmung von Trägheitsradien von Biopolymeren und Biopolymeraggregaten. Mit dieser Technik konnte nachgewiesen werden, daß ein in der Therapie eingesetztes Hyaluronan statt des angegebenen Molekulargewichtes von 4 Mio. D nur ein mittleres Molekulargewicht von  $M_w = 935\,000$  D aufwies, sein mittlerer Trägheitsradius wurde zu 58 nm ermittelt. Die Empfindlichkeitsgrenze liegt bei der Kopplung einer HPGPC mit dem MALLS bei  $5\ \mu\text{g}$  Hyaluronan. Mit dieser Technik konnte daher auch erfolgreich nachgewiesen werden, daß unter dem Einfluß der Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  in Zellkulturen von Synovialzellen die Biosynthese eines hochpolymeren Hyaluronans erfolgt. Diese Technik ist daher bei der Qualitätssicherung in der Produktion von medizinisch eingesetzten Polymeren ebenso einsetzbar wie für biochemische Studien der Biosynthese und Degradation von Biopolymeren.

Literatur:

Kock, R.; Greiling, H. (1992): Size-Exclusion Chromatography with simultaneous Low-Angle Laser Light Scattering, Ultraviolet and Refractive Index Detection: Absolute Molecular Mass Determination with online Determination of the Specific Refractive Index Increment. Fresenius (1992) J. Anal. Chem. 343, 76 - 77.

## 88 Eine Vitamin E-Bestimmung auf der Basis der Isotopenverdünnungsanalyse

R. Kock, S. Seitz, H. Greiling

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, RWTH Aachen

Sauerstoffradikale spielen bei der Pathogenese einer Vielzahl von Erkrankungen eine erhebliche Rolle, ihre Bedeutung für die Kanzerogenese wird zunehmend erkannt. Bereits 1984 konnten Newberne et al. tierexperimentell die Kanzerogenesehemmung durch Vitamin E nachweisen. Daher gewinnt Vitamin E im Rahmen der Prävention diagnostisch zunehmend an Bedeutung. Wir haben, basierend auf dem Prinzip der Isotopenverdünnungs-Gaschromatographie-Massenspektrometrie ein Verfahren zur Bestimmung von Vitamin E entwickelt. Zusätzlich zu einer flüssig-flüssig-Extraktion der mit ( $d_8$ )D,L- $\alpha$ -Tocopherol als internem Standard versetzten Se-



rumproben wird bei dieser Methode zusätzlich eine Festphasenextraktion über C18-Kartuschen als Probenvorbereitung vor der Derivatisierung zu Trimethylsilylderivaten für die Gaschromatographie durchgeführt. Die massenspektrometrische Detektion erfolgt über selective ion monitoring bei  $m/e = 502$  und  $508$ . Die Nachweisgrenze lag für Serum bei  $20 \text{ ng/ml}$   $\alpha$ -Tocopherol, der typische Variationskoeffizient für verschiedene Serumpools mit Konzentrationen im Normalbereich lag zwischen  $1,6\%$  und  $1,8\%$ . Wiederfindungsversuche mit tocopherol-depletierten Seren ergaben für Zusätze von  $3,75 \mu\text{g/ml}$  bis  $6,25 \mu\text{g/ml}$  Wiederfindungen von  $98,5\%$  –  $98,8\%$ . Der Normalbereich ( $n = 130$ ) wurde für Serum zu  $4,7 - 20,6 \mu\text{g/ml}$  ermittelt. Diese Methode kann als Referenzmethode zur Validierung von analytischen Verfahren, die in der Klinik eingesetzt werden sollen, verwendet werden.

#### Literatur:

Newberne, P. M.; Sulphakarn V. (1984): Influence of the antioxidants Vitamin C and E and of Selenium on cancer. In: Vitamins, Nutrition and Cancer (Ed.: K. N. Prasad). Carger-Verlag, Basel, New York, 46 - 67.

## 89 Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von HBV-DNA: Hybridisierung und nested PCR

A. Krenz-Weinreich<sup>1</sup>, R.H. Dennin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Gemeinschaftspraxis für Laboratoriumsmedizin, Dres. Kramer, 21494 Geesthacht; <sup>2</sup>Institut für Medizinische Mikrobiologie, Medizinische Universität, 23538 Lübeck

#### Hintergrund

Der Nachweis von HBV-DNA im Serum-/Plasma ist für zahlreiche klinische und wissenschaftliche Fragestellungen zu einem unverzichtbaren Bestandteil im Rahmen der virologischen Diagnostik geworden.

#### Fragestellung und Untersuchungsgut

Vergleich eines kommerziellen HBV-DNA-Testkits (Hybridisierung) mit nested PCR; im Fall der PCR interner Vergleich mit primers aus verschiedenen Regionen des HBV-Genoms. Seren aus der Eingangsroutine wurden nach verschiedenen anti-HBV-Antikörper-/Antigenspezifitäten selektiert: 1. isoliert anti-HBc positiv; 2. HBs-Antigen positiv mit „positive/negativ“ Konstellation für das HBc-Antigen.

#### Ergebnisse

Von 109 isoliert anti-HBc-positiven: 26 (23,8%) positiv mit PCR, kein positiver Befund mit Hybridisierung. Von 128 HBs-Antigen positiven Seren: 30 (23,4%) mit Hybridisierung positiv – nur jene, die auch HBc-AG-positiv waren; 93 (72,6%) positiv mit, der PCR (HBc-Ag positiv bzw. negativ).

#### Schlußfolgerungen

Für den qualitativen wie quantitativen Nachweis hochvirämischer Seren erweist sich das Hybridisierungsverfahren (Grenzbereich hier ca.  $2,5 \text{ pg HBV-DNA/ml}$ ) als geeignet; für den niedrigvirämischen Bereich, der häufig bei isoliert anti-HBc positiven Personen anzutreffen ist, muß mit sensitiveren Verfahren wie der nested PCR oder anderen Kombinationen untersucht werden; vor allem deshalb, weil bei solchen inapparenten HBV-Trägern ein Potential für Übertragungen gegeben ist, das durch verfügbare serologische Marker derzeit nicht erkennbar wird.

## 90 Development of a sensitive time-resolved immunofluorometric assay for cellular fibronectin

J. Kropf, A.M. Gressner, M. Kothe

Dept. for Clinical Chemistry and Central Laboratory, Philipps University, Marburg, Germany

A two-stage, sandwich type immunoassay for determination of cellular fibronectin (cFN) in cell-culture supernatants and in human plasma was established. The assay principle is based on the binding of both, cFN and plasma fibronectin (pFN) from the sample on gelatine coated microwells followed by an incubation with a monoclonal antibody directed against the EDA sequence (1), which is specific for the cellular form of human and rat fibronectin. For further enhancement of the assay sensitivity a streptavidin/biotin amplification step using a biotinylated anti mouse IgG antibody and streptavidin covalently labelled with the  $\text{Eu}^{3+}$  chelator BCPDA was employed. Time-resolved fluorescence spectrophotometry using measurement of the long lived fluorescence of the  $\text{Eu}^{3+}$  complexes of BCPDA was used as detection method after dissociation of the solid phase complexes with urea/sodium dodecyl sulphate in presence of excess  $\text{Eu}^{3+}$  (2).

For calibration of the assay rat cellular fibronectin purified by gelatine affinity chromatography from cell culture supernatants of rat fibroblasts grown in fibronectin free medium was used. The minimum detectable concentration was  $2.6 \text{ ng/ml}$  cFN (median value of 18 runs) with an assay range of  $12 - 1000 \text{ ng/ml}$ . Between-run and within-series coefficients of variation at a concentration of  $200 \text{ ng/ml}$  were  $11.4$  and  $4.3\%$ , respectively. The assay was applied for the determination of cFN in human plasma and in other body fluids, like , bile and seminal plasma. Because in addition to the human antigen rat cFN is also recognised by the employed antibody, this highly sensitive assay is further useful for investigations in animal cell culture experiments.

1. Vartio, T.; Laitinen, L.; Närvänen, O.; Cutolo, M.; Thornell, L.-E.; Zardi, L.; Virtanen, I. (1987): J. Cell. Sci. 88, 419.

2. Kropf, J.; Quitte, E.; Gressner, A.M. (1991): Anal. Biochem. 197, 258.

## 91 Zytokine und Aktivitätsparameter in frühen Stadien der chronischen Polyarthrit

W. Krüger, Leipzig

Verschiedene Zytokine gelten als wichtige Mediatoren des Entzündungs- und Destruktionsprozesses bei der RA. Obwohl die lokalen Wirkungen der Zytokine im Gelenkbereich im Vordergrund stehen dürften, ist von Interesse, in wieweit im Serum zirkulierende Zytokine an der Unterhaltung des Entzündungsprozesses beteiligt sind und welche Aussagekraft diese Werte besitzen.

In dieser Studie untersuchten wir bei 28 Patienten mit einer RA und einer Krankheitsdauer von maximal 2 Jahren den zeitlichen Verlauf der Serumspiegel der Interleukine 6 (IL-6) und IL-8 in 211 bzw. 82 Serumproben und verglichen sie mit konventionellen klinischen und paraklinischen Befunden.

Die IL-6-Spiegel waren im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöht, sie zeigten keine Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und Krankheitsdauer. Sie unterliegen starken Schwankungen mit Erhöhung in Phasen klinischer Aktivität und Verringerung nach erfolgreicher medikamentöser Therapie (MTX, Sulfasalazin). So finden sich auch signifikante Korrelationen zu klinischen Aktivitätsparametern (Griffstärke, Bewegungsfunktionstest nach Keitel, Anz. d. geschw. Gelenke) als auch bioch. Entzündungsparametern (CRP, BSR,  $\alpha_2$ -Glob.). Im Gegensatz dazu war IL-8 nur in 10 der untersuchten 82 Seren nachweisbar und zeigte keinerlei Korrelationen zu klin. oder bioch. Parametern.

Zusammenfassend scheinen Serum-IL-6-Spiegel als Marker der systemischen Entzündungsaktivität und zum Monitoring des

Krankheitsverlaufes unter Basistherapeutika geeignet zu sein. Ihre Wertigkeit bleibt jedoch aufgrund der komplexen biologischen Regulation im Zytokin-Netzwerk eingeschränkt.

## 92 Interleukin-10 in Plasma of Patients with Acute Pancreatitis

D. Kunz<sup>1</sup>, H. U. Schulz<sup>2</sup>, A. Sokolowski<sup>1</sup>, C. Luley<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Institut für Klinische Chemie; <sup>2</sup>Zentrum für Chirurgie, Universität Otto von Guericke Magdeburg, Universitätsklinikum

The cytokin pattern in plasma of patients with acute pancreatitis is complex. Most of currently available laboratory parameters are of little use for the clinician to predict a complicated course or a fatal outcome of this disease. Only IL-6 and IL-8 are established parameters correlating to the clinical immune response. In contrast to this early activating interleukins IL-10 is known to prevent an excessive immune response. In this study IL-10 was determined in plasma or ascites fluid of patients with acute pancreatitis during the time of clinical treatment. The concentration of IL-10 was three times higher in ascites ( $145 \pm 45$  pg/ml) compared to the corresponding plasma levels ( $29 \pm 9$  pg/ml). Furthermore, IL-10 levels remaining; elevated for several days predict a fatal outcome. Excessively high values were found either prior death or immediately after operation (400 pg/ml). In the latter case they returned to the normal range (lower than 25 pg/ml) during following days. Initial high values with a continuous decrease to the normal range seem to predict a favourable clinical outcome. However, further investigations of IL-10 in combination with other interleukins may help to describe the individual immune response in acute pancreatitis.

## 93 Evaluation of mitochondrial function in digitonin-permeabilized mononuclear cells and cultured skin fibroblasts of patients with mitochondrial defects in skeletal muscle

D. Kunz, K. Winkler, S. Fritz, P. von Bossanyi, K. Dietzmann, J. Haas, H. Feistner, B. Frank, W. Kunz  
Institut für Klinische Chemie, Institut für Biochemie, Institut für Neuropathologie, Klinik für Neurophysiologie und Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Magdeburg, Leipziger Straße 44, 39120 Magdeburg

The respiratory activities of a well characterized preparation of digitonin-permeabilized mononuclear cells from venous blood of six patients with mitochondrial myopathies (four cases of chronic progressive external ophthalmoplegia, CPEO, and two cases of mitochondrial myopathy) were compared to age matched healthy controls. For three cases of CPEO with diminished activities of cytochrome c oxidase and NADH:cytochrome c reductase in the biopsy sample between 30% to 50% decreased respiration rates of permeabilized mononuclear cells with glutamate + malate, pyruvate + malate and succinate + rotenone were detected, while in one CPEO case the succinate oxidation rate was solely diminished. In the two cases of mitochondrial myopathy only the pyruvate + malate oxidation rates were affected. Additionally, for two of these patients the mitochondrial defects were proven to be present in extramuscular tissue by the determination of maximal oxygen consumption rates of digitonin-permeabilized cultured skin fibroblasts. The results of the evaluation of mitochondrial function in mononuclear cells and cultured skin fibroblasts were for all

described cases in complete agreement with the data obtained with saponin-permeabilized muscle fibers and the enzyme activity measurements from muscle biopsy samples of these patients indicating the presence of the defects in extramuscular tissue.

## 94 Diagnostische Wertigkeit des Monitoring der monozytären HLA-DR-Antigen-Expression bei Sepsis

Irina Lehmann, Susanne Hilbert, U. Sack  
Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Leipzig

Monozyten fungieren als akzessorische Zellen, indem sie Antigene internalisieren, prozessieren und in Verbindung mit einem HLA-Klasse-II-Antigen den T-Helfer-Lymphozyten präsentieren. Im Verlauf einer septischen Erkrankung kann z. B. über Endotoxin, TNF-alpha oder andere Sepsismediatoren die HLA-Klasse-II-Expression der Monozyten herunterreguliert werden. Dieser Verlust der HLA-Klasse-II-Expression wird als Immunsuppression bezeichnet und kennzeichnet einen Status, in dem das Immunsystem nicht mehr in der Lage ist, eine systemische Infektion zu bekämpfen.

Zur Einschätzung der diagnostischen Relevanz der Bestimmung der monozytären HLA-DR-Expression wurden Patienten mit unterschiedlichen Primärerkrankungen bei Verdacht auf Sepsis und im Verlauf der Erkrankung im Abstand von 2 bis 3 Tagen untersucht. Die Bestimmung der HLA-DR-Expression erfolgte im Vollblut (EDTA) mittels Durchflußzytometrie über eine Doppelmessung CD 14/HLA-DR.

Während eine über mindestens 5 Tage anhaltende drastisch verringerte HLA-DR-Expression der Monozyten (< 40%) immer mit einer infausten Prognose der septischen Erkrankung korrelierte, konnte bei einer nicht verminderten HLA-DR-Expression jedoch keine Aussage zur Prognose gemacht werden. Die Wertigkeit dieses Parameters für die Prognose einer septischen Erkrankung wird deshalb kritisch diskutiert.

## 95 Reliable diagnosis of whooping cough using competitive PCR amplification of a repetitive DNA sequence of bordetella pertussis

R. Lichtinghagen, R. Glaubitz  
Institut für Klinische Chemie I, Medizinische Hochschule Hannover, 30623 Hannover

We developed an assay for identification of *B. pertussis* in nasopharyngeal swabs (1). The assay involved an amplification of a specific, repetitive DNA sequence of *B. pertussis* (2) by polymerase chain reaction (PCR) and a subsequent detection of the amplified DNA using Enzymun Test® DNA Detection with a specific probe (Boehringer Mannheim).

In order to estimate clinically relevant quantities of *B. pertussis* in nasopharyngeal swabs, internal controls were generated. For this purpose we cloned parts of the repetitive DNA sequence of *B. pertussis* with short artificial sequence additions or substitutions. The differentiation between internal control DNA and *B. pertussis* DNA is based on hybridisation with two different probes using Enzymun Test® DNA Detection.

Samples derived from patients with typical clinical presentations and a positive serology for *B. pertussis* were compared with samples

derived from patients who were tested serologically negative, although these patients had proven contact with *B. pertussis*. Our data show that the use of the internal control DNA severely reduced the risk of false-positive and false-negative results.

1. Lichtinghagen, R.; Diedrich-Glaubitz, R.; von Hörsten, B. (1994): Identification of *Bordetella pertussis* in nasopharyngeal swabs using the polymerase chain reaction: Evaluation of detection methods. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 32, 161 - 167.

2. Glare, M.G.; Paton, R.P.; Lawrence, J.L.; Nisnet, I.N. (1990): Analysis of a repetitive DNA sequence from *Bordetella pertussis* and its application to the diagnosis of pertussis using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1982 - 1987.

## 96 Influence of L-carnitine on ventricular parameters of the Langendorff-heart in relation to the perfusion of glucose and various concentrations of fatty acids during the reperfusion period

H. Löster<sup>1</sup>, M. Punzel<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Clinical Chemistry and Pathobiochemistry; <sup>2</sup>Center of Internal Medicine; Medical Clinic II; University of Leipzig

The myocardial ischemia leads to impaired metabolic and ventricular functions of the heart. To investigate the influence of L-carnitine Langendorff-perfused rat hearts were used, which were subjected to 20 min of total no-flow ischemia and reperfused for 60 min with normal perfusate (modified Tyrode solution with glucose or equilibration) or perfusate containing palmitic acid (0,4 and 1,2 mmol/l resp.) with or without glucose. Left ventricular pressure, contractility and relaxation, coronary flow, and the electrocardiogram were measured.

Under perfusion without L-carnitine but with glucose, an clearly proved postischemic performance was found after no-flow ischemia by the hearts perfused with 1,2 mmol/l palmitate in comparison with 0,4 mmol/l. This is remarkable because it is well known that in ischemia higher concentrations of fatty acids result in an increased degree of postischemic radical injury. Furthermore in low-flow ischemia an influx of fatty acids is possible.

Applying perfusates with high concentrations of fatty acids (1,2 nmol/l), but without glucose and without L-carnitine the left ventricular pressure was decreased. Thus, glucose exerts a protective effect on the ischemic heart, whereas in the early reperfusion period a markedly preference to fatty acids was observed.

Addition of L-carnitine (5 mmol/l) resulted in a highly improved recovery of reperfusion in all groups. Perfusion without glucose leads to a clear improvement, too. The coronary flow was increased after addition of L-carnitine, when hearts were perfused with low concentrations of palmitate (0,4 mmol/l) or without glucose.

These results support the hypothesis that L-carnitine exerts a beneficial effect to the ventricular parameters in ischemic LANGENDORFF-hearts, suggesting a new therapeutic concept in chronic ischemic heart disease.

## 97 Direct radioimmunoassays of urinary normetanephrine, metanephrine and 3-methoxy-tyramine: comparison with an isotope dilution ammonia chemical ionisation mass fragmentographic method

B. Manz\*, R. Wesemann\*, I.P. Kema

\*Repromed GmbH, Hamburg, Germany and Laboratory for Clinical Chemistry, University Hospital of Groningen, The Netherlands

Sensitive and specific radioimmunoassays of N-acylated urinary normetanephrine, metanephrine and 3-methoxytyramine were developed. The antibodies were raised in rabbits by immunization with bovine serum albumin conjugated with the corresponding N-acyl hemisuccinate haptens. <sup>125</sup>I Bolton Hunter reagent labeled N-acyl analogues were used as tracers. Hydrolyzed (total metanephrines) or normal (free metanephrines) urine samples, standards and controls were diluted with phosphate buffered saline and pipetted into the respective assay tubes. Only 10 µl of urine was needed to determine all parameters at least in duplicate. Acylation and radioimmunoassay was performed within the same set of tubes. For this purpose the bottom of disposable glass tubes was coated with a film of µg amounts of the active ester 3-(p-hydroxyphenyl)propionic acid N-hydroxysuccinimide. This ester is able to acylate primary and secondary amines without influencing the binding characteristics of the respective antibody. The assays were validated by comparison with a previously published isotope dilution ammonia chemical ionisation mass fragmentographic method (Kema et al. *J. Chromatography* 617 (1993) 181 - 189). The detection limits of the normetanephrine, metanephrine and 3-methoxytyramine radioimmunoassays were 1.0, 1.0 and 2 pg/tube, respectively. Mean urinary values for 56 normal subjects (ranging from 3 - 27 years, median 8.8) were median 856 (range 179 - 2457) [mass fragmentography: 929;111 - 2814], 651 (149 - 1837) [307;115 - 1123] and 582 (190 - 2124) [498; 171 - 1234] nmol/day, and correlation coefficients were 0.93, 0.83 and 0.94, respectively.

## 98 Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH): Diagnose und therapeutische Ergebnisse - Ein Fallbericht

U. Marr<sup>1</sup>, A. Öhring<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Klinikum Suhl, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik; <sup>2</sup>Klinikum Suhl, Klinik für Innere Medizin

Ein bislang unauffälliger 27-jähriger Patient wurde 8 Tage nach Auftreten von Abgeschlagenheit, Blässe und multiplen Lymphknotenschwellungen (infolge einer Toxoplasmose) stationär eingewiesen.

Die ungewöhnliche Kopplung einer ausgeprägten Eisenmangelanämie (Hämatokrit 0.22, Ferritin 11,5 µg/l) mit Hämolyse (Retikulozytose 80 Promille, freies Serumhämoglobin 50 µmmol/l; Haptoglobin < 0,2 g/l; HBDH 24 µkat/l; Gesamtbilirubin 24 µmmol/l) lenkte den Verdacht auf eine PNH. Im hyperplastischen Knochenmark war die massiv gesteigerte Erythropoese plasmatisch reifungsgestört, die Granulo- und Megakaryozytopoese normoplastisch und dezent linksverschoben.

Der nächtliche, dunkelfarbene Urin wies im Gegensatz zu den Tagesfraktionen eine erhöhte Hämoglobin- und Eisenkonzentration auf.

Neben pathologischen Sucrose- und Wärmeresistenztests war die Aktivität der alkalischen Leukozytenphosphatase vermindert. Ergebnisse der zytofluorometrischen Bestimmung der Phosphatidylglycan-(PIG)-verankerten Moleküle ergaben eine massive Verminderung der CD14-(LPS-Rezeptor)-Expression auf Monozyten, eine deutliche Reduktion des Fc-Gamma-III-Rezeptors (CD16) der Granulozyten sowie eine markante Erniedrigung von CD55 und CD59 auf den Leukozyten und Erythrozyten des Patienten, wodurch die Diagnose PNH gesichert wurde.

Neben der Gabe von Erythrozytenkonzentraten, oraler Eisensubstitution und Thromboseprophylaxe durch Antikoagulation mit Cumarinderivaten wurde eine Testosterontherapie eingeleitet, deren Einfluß auf das subjektiven Befinden sowie die klinischen und paraklinischen Hämolysezeichen diskutiert wird.

## 99 Identification of point mutations in colon cancer susceptibility genes by automated DNA sequencing

J. Maurer<sup>1</sup>, E. Thiel<sup>1</sup>, R. Reinhardt<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Internal Medicine, Hematology/Oncology, Klinikum Steglitz, Free University of Berlin, Hindenburgdamm 30, 12200 Berlin, FRG  
<sup>2</sup>Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Abt. Wittmann, Ihnstraße 71 - 73, 14195 Berlin (Dahlem), FRG

Recently two genes involved in human hereditary non-polyposis colon cancer (HNPCC) were identified and cloned. Both genes, named hMLH1 and hMSH2, were located on chromosomes 3 and 2, respectively and show a high degree of homology to E. coli DNA mismatch repair genes. HNPCC seems one of the most common genetic diseases with an estimated frequency of one affected individual in 200. The identification of subtle genetic changes such as point mutations or small deletions in those genes is associated with early onset of gastrointestinal, endometrial and pancreatic tumors. Because of the relatively high frequency of HNPCC, the identification of people with a high risk of developing colon cancer, which is now possible, and the high cure rates for detecting colon cancer at early stages, we developed a diagnostic test system for the identification of hMLH1 and hMSH2 mutations in patients with early onset of colon cancer and for patients with high risk of colon cancer because of their family history. The diagnostic test is based on automated DNA-sequencing of the whole coding region of hMLH1 and hMSH2 mRNA. The trait of HNPCC is autosomal dominant, so the sequencing of the genes and the base-calling algorithm has to detect heterozygous mutations in every case. mRNA is isolated from leukocytes, subsequently reverse transcribed at 8° C using a MMLV reverse transcriptase without any RNase activity. PCR amplification of the resulting cDNA is performed by using specific oligo nucleotide primers for both genes and a heat stable DNA polymerase mixture (Taq-polymerase: Pfu-polymerase 20 : 1) for increased yield of the desired amplified gene. We have seen no specific amplified DNA without using the modified reverse transcriptase and the 5'-3'-polymerase, 3'-5'-exonuclease mix, possibly due to the relatively large transcript size of both genes (> 2000 bp). The amplified PCR product is sequenced in both directions either by using T7-DNA-polymerase, unlabeled sequencing primers and FITC-labeled nucleotide triphosphates or by cycle sequencing using a new heat stable DNA-polymerase with labeled primers. Automated pipetting robots were used for the setup of the sequencing reactions. With this highly automated DNA-sequencing system it is now possible to detect persons with a high risk for gastrointestinal cancer routinely. Supported by Berliner Krebsgesellschaft e.V.

## 100 Automated genetic analysis for linkage, mutation detection and diagnostics

G. Mertes

Applied Biosystems GmbH, A division of Perkin Elmer

A flexible platform for molecular scientists which enables them to (I) rapidly identify genes of inherited diseases (via linkage analysis), (II) to efficiently study the diverse mutations associated with the disease and (III) to perform precise genetic diagnosis via sequencing and fragment analysis is given with the Applied Biosystems 373 DNA Sequencer™/Genescan™ system.

4 different fluorescent labels can be detected in the same lane in the same run (4 dye-1 lane concept) so that (a) lane to lane variations are eliminated and (b) an internal lane standard can be used in fragment analysis to achieve precise, absolute sizing of PCR-products in basepairs. The capacity of 36 lanes per gel and 5 gel sizes (48, 34, 24, 12, 6 cm) provide maximum throughput options.

For sequencing the ideal strategies can be chosen from combination of 2 labeling strategies (DyePrimer, DyeTerminator) and 2 DNA polymerase (Taq, T7) to perfectly fit the needs of the experiment. ABD offers more than 20 different kits for specific experimente approaches like heterocygote detection, quality control, gene walking a. s. o. .

Fluorescing PCR-products for fragment analysis with Genescan can easily be achieved by marking oligos at their 5' end via PRISM Dye Amidites™ (during synthesis) or Aminolink II™ and NHS-esters of the 4 different dyes.

Additional software products for optimal downstream-processing of all sequencing- and Genescan-data is provided with the Sequence Navigator™, the Genotyper™ and Auto-Assembler™ or with the integrated hard-/software product Inherit™.

For scientific approaches to genetic questions the Applied Biosystems 373/Genescan system provides an excellent tool with maximum reliability, reproducibility and accuracy.

## 100a Kapillarelektrophorese: Stand der Technik und Perspektiven in der Anwendung

C. Möllers, Judith Ploch, A. Böttcher, G. Schmitz

Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Universität Regensburg, Franz-Josef-Strauss Allee 11, 93042 Regensburg

Die Kapillarelektrophorese (CE) als eine sehr vielseitige, mikroanalytische Technik hat sich in den letzten Jahren in vielen Laboratorien und Arbeitsgebieten etablieren können. Die hohe Sensitivität bei sehr geringem Probenvolumen, die leichte Automatisierbarkeit und die sehr kurze Trennzeit haben diese Technik speziell zur Analytik von biologisch aktiven Substanzen attraktiv gemacht.

Die Analytik von Serumproteinen durch konventionelle Agarose-Gel-Elektrophorese konnte auf CE-Systeme mit einer Trennzeit von 8 min reproduzierbar übertragen werden. Auch die Paraproteindagnostik ist inzwischen mittels Kapillarelektrophorese möglich. Hämoglobin-Varianten wurden innerhalb von 10 min vollständig getrennt. Mit der analytischen Kapillar-Isotachophorese (ITP) lassen sich Nucleotide, wie ATP, ADP, AMP, GTP, GDP und GMP aus Blutzellen, insbesondere Thrombozyten, quantifizieren. In der klinischen Routine ist eine detaillierte Analyse von Lipoprotein-Subklassen zur Beurteilung von Störungen im Lipoprotein-Stoffwechsel von besonderem Interesse. Mit Hilfe der ITP lassen sich Lipoproteine in menschlichem Serum innerhalb von 10 min in 14 Subklassen unterteilen, wobei die High Density Lipoproteine die Peaks 1 bis 6 und die apo B-haltigen Lipoproteine die Peaks 7 bis 14 ausmachen. Mit dieser detaillierten Trennung von Lipoproteinen lassen sich die Edukt/Produkt Beziehungen sowie die Aktivitäten der wesentlichen lipolytischen Enzyme und der Transfer-Faktoren im Serum abschätzen. Desweiteren korrelieren die Daten der High und Low Density Lipoproteine sehr gut mit den bisher etablierten Trenntechniken, wie z.B. Lipoprotein Elektrophorese oder HDL-Cholesterinbestimmung durch Präzipitation. Die Vorteile der ITP sind die hohe Sensitivität bei sehr geringem Probenvolumen, die geringe Probenvorbereitung zur Analyse aus Serum, Plasma, Lymphe oder anderen Körperflüssigkeiten und die extrem kurze Trennzeit bei voller Automatisierung.

Zusammenfassend stellt die CE eine Technik dar, die im Gegensatz zur konventionellen Elektrophorese in der Lage ist, Analyte aus komplexen Mischungen schnell, automatisch und mit hoher Sensitivität und Reproduzierbarkeit zu trennen.

## 101 Detection of Kras oncogene mutations in stool from patients with colorectal cancer

C. Moser, P. Nollau, S. Jeremias, G. Weinland\*, Ch. Wagener  
Abt. f. klinische Chemie, Medizinische Klinik, Universitätskran-  
kenhaus Eppendorf, Martinistraße 52, 20246 Hamburg, Germany  
\*Chirurgische Abt., Israelitisches Krankenhaus, Orchideenstieg 14,  
22297 Hamburg, Germany

Colorectal cancer is the second leading cause of death from cancer in Western societies. Cure can be obtained in more than 90% of cases when diagnosed at an early stage. Therefore, new tests specific for colorectal cancer would have an evident impact on therapy and survival.

Mutations in oncogenes and tumor-suppressor genes play an important role in colorectal tumorigenesis. One candidate is the Kras oncogene in which point mutations occur in 30 - 50% of colorectal tumors (1). Thus, Kras mutations may provide a tumor-specific marker for colorectal cancer.

We established a PCR based technique for detection of Kras mutated tumor cells in stool samples from patients with colorectal neoplasms. First, 50 colorectal tumors were screened for Kras mutations; 32% of tumors were found to be positive. Subsequently, stool samples were analysed by mutant enriched PCR. Stool samples were positive for Kras mutations in patients with mutated Kras oncogenes in the their tumors. Furthermore, sequencing revealed the same nucleotide exchange in stool samples and corresponding tumors.

Thus, it appears that a non-invasive, non-radioactive PCR based assay can be used to identify patients with colorectal cancer by analyzing the stool of these patients for mutations of the Kras oncogene.

1. Vogelstein, B.; Fearon, E.R.; Hamilton, S.R.; Kern, S.E.; Preisinger, A.C.; Leppert, M.; Nakamura, Y.; White, R.; Smits, A.M.M.; Bos, J.L.

## 102 Die Leukozytenfunktion als neuer Parameter zur Diagnose und Verlaufsbeurteilung der Akut-Phase-Reaktion

T. Nebe<sup>1</sup>, P. Geßler<sup>2</sup>, A. Richter<sup>3</sup>, M. Quintel<sup>4</sup>, R. Kattermann<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Inst. f. Klinische Chemie, <sup>2</sup>Kinderklinik, <sup>3</sup>Chirurgische Klinik, <sup>4</sup>Inst. f. Anästhesiol. u. Intensivmedizin, Med. Fakultät d. Universität Heidelberg, Klinikum Mannheim, 68135 Mannheim

Bei schwerkranken Patienten in der Akut-Phase-Reaktion weisen konventionelle klinische und Laborparameter diagnostische Probleme auf: Beispiele sind Früh- und Neugeborene mit Verdacht auf Sepsis und Patienten mit akuter Pankreatitis bezüglich der Differentialdiagnose ödematöse und nekrotisierende Erkrankung mit einer Gesamtleitlätät von 20 - 25%.

Die früheste Reaktion des Organismus stellen die invadierenden Leukozyten dar, welche konsekutiv Zytokin-vermittelt die hepatische Synthese der Akut-Phase-Proteine induzieren. Wir untersuchten daher neben dem zellulären Differentialblutbild die Antigenpräsentationsfähigkeit der Monozyten und den oxidativen Burst der Granulozyten als frühen Indikator bezüglich einer Sepsis und Multiorganversagen bzw. eines nekrotisierenden Verlaufs und evtl. letalem Ausgang.

Die HLA-DR-Expression der Monozyten und der respiratory Burst der neutrophilen Granulozyten weisen bei der Untersuchung von 200 Kindern bereits in den ersten Lebensstunden auf die septische Komplikation hin bzw. auch später auf eine Verschlechterung, z. B. durch Intoxikation bei Stickoxyd-Beatmung.

Die Untersuchung von über 30 an akuter Pankreatitis Erkrankten deckte einen effizienten zellulären Score zur Frühdiagnose der o. g. Kategorien auf und zeigte frühzeitig eine Rekonvaleszenz an (Rückkehr auf Normalstation).

Damit leistet die zelluläre Diagnostik einen wichtigen neuen Beitrag im Bereich der Intensivmedizin.

## 103 NIR-spektroskopische Stuhluntersuchung auf Fett, Stickstoff, Wasser

V. Neumeister<sup>1</sup>, J. Henke<sup>2</sup>, G. Kaltenborn<sup>3</sup>, C. Spröbig<sup>2</sup>, W. Jaroß<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>TU Dresden, Universitätsklinikum C. G. Carus, Inst. f. Klin. Chem. u. Laboratoriumsmedizin; <sup>2</sup>TU Dresden, Universitätsklinikum C. G. Carus, Klin. u. Polikl. f. Kinderheilk.; <sup>3</sup>Martin-Luther-Universität Halle, Inst. f. Exp. Oper. Med.

### Einleitung

Fett-, Stickstoff- und Wasser-Bestimmungen im Stuhl besitzen für die Diagnostik von Malassimilationsstörungen eine hohe Aussagekraft. Die Fettbestimmung ist weiterhin wichtig zur Einschätzung der Therapie mit Pankreasenzymen. Die Nahinfrarot-Spektroskopie ist eine einfache, schnelle, nicht-invasive Analysetechnik, mit der mehrere Parameter gleichzeitig bestimmt werden können.

### Methodik

NR-Spektren (1000 - 2000 nm) wurden mit dem InfraAlyzer 450 der Firma Bran + LÜbbe aufgenommen. Von jeder Stuhlprobe wurden 8 Spektren aufgenommen (2 Stichproben, je 4 Messungen durch 90° Drehung der Probencups). Die Auswertung erfolgt mit einer multiplen linearen Regressionsgleichung. Die Koeffizienten werden durch Vergleich der spektralen Daten mit den chemisch bestimmten Ergebnissen eines Kalibrations-Sets errechnet. Die chemische Bestimmung des Fettgehaltes erfolgte nach van de Kamer, die Stickstoffbestimmung mittels coulometrischer Titration und die Wasserbestimmung durch Gefriertrocknung.

### Ergebnisse

Fett-Bestimmung: Kalibrationsgrundlage 63 Patienten 4,79 - 292,5 mg Fett/g Stuhl), statistisch bester Zusammenhang bei 4-Wellenlängenkalibration (1680/1734/2336/2348 nm)  $r = 0,980$ . 66 Patienten wurden auf Grundlage dieser Kalibration gemessen und mit der chem. Bestimmung verglichen:  $r = 0,978$ . Stickstoff-Bestimmung: Kalibrationsgrundlage 24 Patienten (5,36 - 19,28 mg N2/g Stuhl), statistisch bester Zusammenhang bei 7-Wellenlängenkalibration (1722/1818/2100/2139/2190/2230/2348 nm)  $r = 0,950$ . 18 Patienten wurden auf Grundlage dieser Kalibration gemessen und mit der chem. Bestimmung verglichen:  $r = 0,941$ . Wasser-Bestimmung: Kalibrationsgrundlage 22 Patienten (60,1 - 82,2% Wassergehalt), statistisch bester Zusammenhang bei 6-Wellenlängenkalibration (1680/1734/1818/2190/2270/2310 nm)  $r = 0,97$ . 20 Patienten wurden auf Grundlage dieser Kalibration gemessen und mit der Gefriertrocknung verglichen:  $r = 0,958$ . Die Streuung zwischen den 8 Spektren einer Probe beträgt für Fett 5 - 10%, für Stickstoff 5 - 10% und für Wasser 0,5 - 2,0%. Sie kann als Maß für die Homogenität einer Probe betrachtet werden (Probenahmefehler).

### Diskussion

Wir erarbeiteten NIRS-Kalibrationen, mit denen eine sehr gute Korrelation und keine statistisch signifikanten Unterschiede ( $p = 0,01$ ) zwischen den Ergebnissen der chemischen Bestimmungsmethoden und den NIRS-Ergebnissen erreicht wurden. Diese Ergebnisse stimmen mit denen anderer Arbeitsgruppen überein (1, 2), obwohl sie andere optimale Wellenlängenkombinationen errechneten. Eine befriedigende Antwort darauf kann nicht gegeben werden. Unsere analytischen Ergebnisse, verbunden mit der Analysenschnelligkeit (10 min. pro Probe), die simultane Bestimmungsmöglichkeit mehrerer Komponenten und die leichte Handhabung begründen es, die Nahinfrarot-Spektroskopie als routinemäßige Methode zur Stuhlanalyse in der klinischen Praxis einzusetzen.

### Literatur:

1. Peuchant, E., et al. (1988): Value of a spectroscopic fetalogram in determining the etiology of steatorrhea. Clin. Chem. 34/1: 5 - 8.
2. Verfueth, M.O. (1990): Die NIR-Spektroskopie. Dissertation, Med. Fakult. L.-M.-Univers. München, München.

## 104 DR-Subtypisierung

C. Neviny-Sticke<sup>1</sup>, J. Kürschner<sup>1</sup>, A. Volgger<sup>2</sup>, J. Bönisch<sup>2</sup>, E.D. Albert<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Medizinisch Immunologische Laboratorien München; <sup>2</sup>Labor für Immungenetik, Kinderpoliklinik der Universität München

Unbedingte Voraussetzung für eine Knochenmarkstransplantation ist die exakte Typisierung der HLA-Merkmale von Spender und Empfänger. Wir haben eine Strategie für die Typisierung von HLA-DRB1-Merkmalen entwickelt, die auf sequenzspezifischer Amplifikation (PCR-SSP) und Oligonukleotid-Hybridisierung beruht. Aus 5 ml EDTA-Blut wird genomische DNA extrahiert, die anschließend in 14 verschiedenen PCR-Ansätzen unter gleichen Reaktionsbedingungen amplifiziert wird. Dabei werden die Primer spezifisch gewählt, so daß nur bestimmte Allele amplifiziert werden. In einer darauffolgenden Oligonukleotid-Hybridisierung kann anschließend die genaue Typisierung erfolgen.

Die sequenzspezifische Amplifikation erlaubt bereits eine „low resolution“ Typisierung, die einer serologischen Typisierung entspricht. Die Primer werden so gewählt, daß die spezifischen Amplifikate sämtliche hypervariable Regionen des 2. Exons des DRB1-Gens enthalten. In einem 2. Schritt werden die erhaltenen Amplifikate auf positiv geladene Nylonmembranen aufgetragen und mit Oligonukleotiden hybridisiert (high resolution).

Diese Vorgehensweise erlaubt eine schnelle Grobtypisierung und anschließende Bestätigung des Amplifikates. Heterozygote Kombinationen, die üblicherweise nicht aufgelöst werden, können typisiert werden und neue Allele fallen auf.

## 105 Anreicherung und Charakterisierung fetaler erythrozytärer Vorstufen aus mütterlichem Blut als Grundlage nichtinvasiver pränataler Diagnostik

C. Neviny-Sticke<sup>1</sup>, J. Kürschner<sup>1</sup>, P. Dörffler<sup>2</sup>, J. Koch<sup>2</sup>, W. Bieger<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Medizinisch Immunologische Laboratorien, München; <sup>2</sup>Paracelsus Klinik, München

### Fragestellung

Die Anreicherung fetaler Zellen aus maternalem Blut ist die Voraussetzung für eine nichtinvasive pränatale Diagnostik. Wir haben mit unterschiedlichen Separationsverfahren erythrozytäre Vorstufen aus mütterlichem Blut angereichert und mit Hilfe der in situ Hybridisierung und PCR in dieser Fraktion enthaltenen Zellen charakterisiert und deren genetisches Geschlecht bestimmt.

### Methode

Aus 20 ml ACD-Blut schwangerer Frauen wurden kernhaltige erythrozytäre Zellen (nucleated red blood cells, NRBC) über Dichte-Gradienten-Zentrifugation und magnetische Zellseparation angereichert. Der Anteil der fetalen NRBC's wurde lichtmikroskopisch bestimmt. Die anschließende in situ Hybridisierung mit Y-spezifischen Digoxigenin-markierten Sonden bei einer Anreicherung von mindestens 6% NRBC's ermöglichte eine eindeutige Charakterisierung männlicher fetaler Zellen.

### Ergebnisse

Eine Anreicherung erythrozytärer Vorstufen war bis zu einem prozentualen Anteil von 24% möglich. Es konnten mit Hilfe von sequenzspezifischer PCR und Oligonukleotid-Hybridisierung der HLA-DRB1-Genorte eindeutig paternal vererbte Merkmale detektiert werden.

### Schlußfolgerung

Aus mütterlichem Blut können fetale NRBC angereichert und eindeutig identifiziert werden. Die in situ Hybridisierung erlaubt unter nichtinvasiven Bedingungen den Ausschluß bzw. Nachweis numerischer Chromosomenaberrationen (z.B. Trisomie 21, 18, 13) in einem frühen Stadium der Schwangerschaft.

## 106 Therapieabhängige NK-Zell-Veränderungen

R. Nowack, J. Muche, J. Oppermann, Dagmar Möbius  
Institut für Klin. Chemie und Lab.-diagn. und Kinderklinik des Carl-Thiem-Klinikums, Cottbus

Bei der Therapie von Kindern mit Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, meist Rheumatoid-Arthritis, wurden zwei unterschiedliche Therapieschemata angewandt.

Eine Gruppe wurde mit Methylprednisolon (Bolus, hochdosiert) behandelt, während in einer anderen Gruppe Immunglobuline zur Anwendung kamen.

Beide Medikationen wurden i.v. verabreicht. Zusätzlich zu den „üblichen“ krankheitsassoziierten Untersuchungen wurde die Lymphozytenpopulation des peripheren Blutes und in einzelnen Fällen auch in Synovialflüssigkeit ermittelt.

Neben einem ausgesprochen individuellen Verlauf für einzelne Patienten, der während der Therapie reproduzierbar war, wurde in einigen Fällen auch eine Zunahme der CD 57<sup>+</sup> NK-Lymphozyten-Population beobachtet.

Besonders interessant war das Auftreten einer CD 57<sup>+</sup>/CD 8<sup>+</sup> doppelt positiven Population bei einigen Patienten unter Methylprednisolon-Therapie.

Interleukine wurden begleitend bestimmt. Gleichzeitig war bei diesen Patienten eine Zunahme der B-Lymphozyten (CD<sup>+</sup> 19 und CD 20<sup>+</sup>) festzustellen.

Eine T-Lymphozyten-Aktivierung, beurteilt durch das Auffinden CD 3<sup>+</sup>/CD 25<sup>+</sup> und CD 3<sup>+</sup>/HLA DR doppelt positiver Zellen, war nicht feststellbar. Eine befriedigende Erklärung dieses Phänomens steht für uns noch aus.

Möglicherweise sind dafür Zell/Zell-Interaktionen, entweder auf Interleukin-Ebene oder auf der Ebene von Adhäsions(protein)molekülen, verantwortlich.

## 107 Aussagekraft von Pyruvatkinase Typ Tumor M 2 bei Patienten mit einem Seminom

G.M. Oremek, U.B. Seiffert, D. Jonas, U. Scheefers-Borchel, H. Scheefers

Universitätskliniken, Zentrallabor – ZIM, 60590 Frankfurt/Main

Die quantitative Bestimmung der Pyruvatkinase Typ Tumor M2 ist bei Patienten mit Malignomen erhöht. Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die Aussage bei Patienten mit einem Seminom zu überprüfen. Untersucht wurden 70 Patienten mit einem gesicherten Seminom. Die Bestimmung der Pyruvatkinase erfolgte mit einem Elisa der Fa. Sche Bo. Tech. Dieser Test erfaßt mit zwei monoklonalen Antikörpern die TU M2-PK. Nicht erfaßt werden die anderen Isoenzyme der Pyruvatkinase. Zusätzlich wurden die Tumormarker NSE,  $\beta$ -HCG und AFP bestimmt. Für das gesunde Kollektiv wurde bei einer Spezifität von 95% ein cut-off von 17 U/ml ermittelt. Als Ergebnis kann mitgeteilt werden, daß der Pyruvatkinase Typ Tumor M2 in 71% der Fälle deutlich erhöht war. Die Konzentrationen lagen im Bereich von 9,6 U/ml bis 272 U/ml Die etablierten Tumormarker: AFP lag im Normbereich,  $\beta$ -HCG war in 10% der Fälle erhöht und NSE in 58% erhöht. Die Bestimmung von NSE und Pyruvatkinase Typ Tumor M2 bei Patienten mit Seminomen erscheint sinnvoll und hilfreich in der Diagnostik.

## 108 Zusammenfassende Betrachtung der Tumormarker CEA, CA 19-9, CA 15-3 und CA 125 anhand vorliegender Ringversuchergebnisse der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie

H. Pfuhl, R. Ziergöbel, E. Spanuth  
Boehringer Mannheim GmbH, Wissenschaftliches  
Referat Diagnostica, Sandhofer Straße 116, 68305 Mannheim

Die Ergebnisse der Ringversuche der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie werden erstmals über den Zeitraum eines Jahres aufgearbeitet und für alle namhaften Hersteller zusammenfassend graphisch dargestellt.

Hierbei wird der jeweilige Gesamtmedian auf 100% gesetzt und die Mediane sowie die Streubereiche (16 – 84% Perzentile) für einzelne Methoden über einen Zeitverlauf der letzten vier Ringversuche prozentual zum Gesamtmedian dokumentiert. Die Lage der Mediane und Streubereiche beschreiben hierbei näherungsweise die Qualität (Präzision, Chargenkonstanz) der betrachteten Methoden.

Für einen klassischen Verlaufparameter wie die Tumormarker läßt sich auf diese Weise kontinuierlich die Testqualität einzelner Methoden im Vergleich beurteilen.

## 109 Bedeutung der Serum Thymidinkinase in lympho- und myeloproliferativen Erkrankungen

S. Poley<sup>1</sup>, P. Stieber<sup>1</sup>, V. Nüssler<sup>2</sup>, H. Pahl<sup>1</sup>, M. Wick<sup>1</sup>,  
A. Fateh-Moghadam<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Institut für Klinische Chemie; <sup>2</sup>Medizinische Klinik III, Klinikum  
Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München

Es wird über eine methodische und klinische Evaluierung eines Radioimmunoassays zur Bestimmung der Serum Thymidinkinase (S-TK) berichtet.

Wir untersuchten die Seren von 86 klinisch unauffälligen Probanden und folgender Patienten: 20 mit Virusinfektionen, 52 mit chronischer Niereninsuffizienz, 50 mit polyklonaler Gammopathie, 112 mit verschiedenen monoklonalen Gammopathien, 60 mit weiteren Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL), 30 mit myeloproliferativen Erkrankungen und 14 mit myelodysplastischem Syndrom. Zusätzlich erfolgten bei 51 Myelom- bzw. Lymphompatienten drei bis sieben Serum-Thymidin-Kinase-Bestimmungen im Krankheitsverlauf.

Neben einer hohen Wiederfindungsrate und einer guten Linearität von 1 – 70 U/l hatte der Assay für eine manuelle Methode eine gute Präzision (Intra-Assay-Varianz: 3,6 – 4,3%; Inter-Assay-Varianz: 6,3 – 9,5%).

Anhand der Normalpersonen konnte für die S-TK ein cut off von 8,5 U/l bei 95% Spezifität definiert werden. Gegenüber benignen Referenzkollektiven wie monoklonalen Gammopathien unbestimmter Signifikanz (MGUS) bzw. polyklonalen Gammopathien ergab sich ein cut off von 10 U/l bzw. 25 U/l. Hohe S-TK-Konzentrationen wurden bei Patienten mit Mononukleose (bis 215 U/l), aber auch bei Hepatitis- und HIV-Virusinfektionen gemessen. Niereninsuffizienz hatte keinen Einfluß auf die S-TK-Werte.

Bei Patienten mit Plasmozytom zeigte die S-TK nach der Stadieneinteilung von Durie und Salmon eine signifikant ( $p < 0,01$ ) zunehmende Erhöhung vom Stadium 1 bis 3. Patienten mit sogenanntem „Smouldering Myeloma“ hatten alle innerhalb des Referenzbereichs liegende Konzentrationen. Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie wiesen eine strenge Korrelation der S-TK zur Lymphozytenzahl auf ( $r = 0,84$ ) und hatten in den Stadien 3 und 4 nach Rai eine signifikante S-TK Erhöhung ( $p < 0,01$ ) gegenüber den Stadien 0, 1 und 2. Die Gruppe der übrigen NHL (Zentrozytome, Lympho-

blastome u.a.) zeigte während einer Progression S-TK-Erhöhungen in 50% der Fälle bei einem cut off von 16, der anhand von NHL in Remission definiert wurde (95% Spezifität). Auch im Krankheitsverlauf ließ sich eine gute Übereinstimmung der S-TK zur Klinik darstellen. Bisweilen traten Konzentrationsanstiege 1 – 6 Monate vor einer Progression auf. Die massivsten S-TK-Erhöhungen zeigten Patienten mit myeloproliferativen Erkrankungen, insbesondere mit Osteomyelofibrose (bis 1125 U/l). Hier konnte eine Korrelation zur Leukozytenkonzentration ( $r = 0,73$ ), aber nicht zur prognostisch bedeutsamen Blastenvermehrung nachgewiesen werden. Hingegen wurden bei Patienten mit Myelodysplasie eher niedrigere S-TK-Werte gefunden (Median: 8,5 U/l).

Anhand dieser Resultate kann die Bestimmung der S-TK zur Verlaufskontrolle von Patienten mit NHL herangezogen werden, insbesondere bei Lymphomen, die nicht leukämisch verlaufen.

## 110 A highly sensitive non-radioactive cytotoxicity assay for human target cells

T. Porstmann, L. Franke\*  
Seramun Diagnostica GmbH, Dolgenbrodt; \*Institut für Medizinische Immunologie, Universitätsklinikum Charité, Humboldt Universität zu Berlin

Cytotoxic reactions are basic immunological mechanisms in the defence of virus particles and bacteria but also in autoimmune disorders. Cell destruction can be detected by (i) penetration of dyes into damaged cells, (ii) by release of intracellular substances from damaged cells or (iii) indirectly by measurement of metabolic activity of the non-damaged cells. Detection of release of low molecular substances became an attractive alternative to the quantitation of <sup>51</sup>Cr release, which requires metabolic labelling of the target cells.

We have chosen immunochemical quantitation of the enzyme Cu/Zn superoxide dismutase as a parameter for cell destruction for the following reasons: (i) Cu/Zn SOD is a low molecular weight (33 kD) cytoplasmic protein which is present in all cell types, (ii) Cu/Zn SOD is very restricted in its concentration range in different cell types (erythrocytes  $14.9 \pm 1.2$ , granulocytes  $11.7 \pm 1.4$ , monocytes  $25.5 \pm 3.5$ , lymphocytes  $52.3 \pm 8.8$  ng/l Mill cells), (iii) Cu/Zn SOD is not induced by different cytokines during cell activation e.g. interleukin 12, 4, 10,  $\gamma$ IFN or TNF, which is a prerequisite for quantitation of damaged cells. Release of Cu/Zn SOD from damaged cells into the supernatant is determined by a super rapid enzyme linked immunosorbent assay (SURALISA) using two different monoclonal antibodies. The SURALISA was compared with the Cyto Tox assay of Promega, which determines activity of LDH released into the supernatant. Using H9 and Molt4 cells, a minimum of about  $3 \times 10^3$  damaged cells per ml was detectable with the SURALISA which corresponds to about 1 ng/ml of Cu/Zn SOD. The Cyto Tox assay was at least 10 times less sensitive and is greatly influenced by the LDH activity of the fetal calf serum very often an essential component of the cell culture medium. If necessary, the sensitivity of the SOD quantification can be increased by extending the incubation time, e.g. overnight. About 300 lysed cells per ml can be detected corresponding to 100 pg SOD/ml. The SURALISA as cytotoxicity assay has the following advantages: (i) high sensitivity in a short assay time (results are available within 30 min), (ii) easy handling, (iii) no interference by cell culture medium or FCS.

### References:

1. Porstmann, T., et al. (1990): J. Immunol. Methods, 127, 1; 2. Franke, L. and Porstmann, T. (1994): J. Immunol. Methods, 171(94), 259.



## 111 Isokratische Trennung der Katecholamine und deren Metabolite mit einer einzigen mobilen Phase mittels HPLC

M. Radjaipour, H. Raster  
Med. Klinik und Poliklinik, Abt. IV, der Univ. Tübingen  
(Kommissarischer Leiter Prof. Dr. F.J. Seif)

### Problemstellung

Katecholamine und deren Metabolite werden nach Extraktion aus dem Urin meist mittels drei unterschiedlichen komplexen Fließmitteln im HPLC-System aufgetrennt und quantifiziert. Wir haben die Auftrennung wesentlich vereinfacht und verwenden hierfür nur noch eine einzige mobile Phase.

### Material und Methode

Das Fließmittel besteht aus 21 g Zitronensäuremonohydrat, 3,9 g 3-Lithiumzitat-tetrahydrat, 0,15 Na-EDTA, 0,3 g Oktansulfonsäure-Natrium, 900 µl Diäthylamin, 15 ml Methanol und 15 ml Acetonitril, mit H<sub>2</sub>O ad 1 Liter (pH 3,0) aufgefüllt. Trennsäule (3 µm, 4 X 125 mm, SuperPac Spherisorb ODS2) und HPLC-System sind von Pharmacia-LKB, Freiburg. Die Detektion der Komponenten erfolgte elektrochemisch mit dem ECD von Waters, Eschborn.

### Ergebnisse

Nach separater Extraktion der Katecholamine, ihrer Methoxyderivate und ihrer sauren Metabolite aus dem Urin wurden 10 – 50 µl des jeweiligen Eluats nacheinander in das HPLC-System injiziert. Die Retentionszeiten aller Komponenten (Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin, Metanephrin, Normetanephrin, 3-Methoxytyramin; Vanillinmandelsäure, Homovanillinsäure und 5-Hydroxyindolessigsäure) lagen zwischen 2,5 und 31,0 Minuten. Die Intra-Assay-Impräzision lag zwischen 1,6 und 6,5%, die Inter-Assay-Impräzision zwischen 4,1 und 7,8%. Die Wiederfindungsrate bewegte sich zwischen 95 – 111%.

### Schlußfolgerung

Durch die Verwendung von Oktansulfonat und Diäthylamin als Ionenpaar in einem Fließmittel mit pH 3 wird die Auftrennung der basischen und sauren Gruppen der Katecholamine und deren Metabolite in nur einem Arbeitsgang möglich. Dadurch wird nicht nur Material eingespart, sondern auch erheblich Zeit gewonnen. Darüber hinaus erlaubt unsere Methode in einem einzigen Arbeitsgang zwischen den Metaboliten der Phäochromozytome und jener der Neuroblastome zu unterscheiden.

## 112 Automatisierung der Hämostaseuntersuchungen mit dem CA-1000. – Vergleich mit dem KC 40

D. Ratge, H. Wisser  
Institut für Klin. Pathologie, Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart

Stetig steigende Analysenzahlen bei kurzer, „reponse“-Zeit bedingen auch im Gerinnungslabor eine automatisierte Abarbeitung der Proben. Bei bidirektionaler Arbeitsweise erfolgt die selektive Abarbeitung aus Primärröhrchen nach Probenidentifikation durch einen integrierten Barcodeleser. Für die Thromboplastinzeit (PT), aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT), Thrombinzeit (TZ) und Fibrinogenbestimmung ergab sich eine Impräzision in der Serie von 0,9 bis 3,1%, was die Durchführung von Einfachbestimmungen erlaubt.

Die Meßpunkte des nephelometrisch registrierten Fibrinumsatzes können so gewählt werden, daß eine optimale Anpassung mit vorhandenen Gerinnungssystemen resultiert. Vergleichsmessungen von Patientenproben am CA-1000 und am KC 40 ergaben bei Korrelationskoeffizienten von  $r = 0.991$  für die PT,  $r = 0.989$  für die aPTT und  $r = 0.979$  für die Fibrinogenbestimmung nach Clauss eine ausgezeichnete Übereinstimmung. Nach Abschätzung des ISI-Wertes für das System CA-1000/Thromborel S von 0,95 zeigte sich auch

nach Umrechnung der Quick-Prozentwerte in INR eine gute Vergleichbarkeit ( $r = 0.994$ ). Größere Abweichungen bei heparinisierten Plasmen bedingten für die TZ nur eine mäßige Vergleichbarkeit ( $r = 0.921$ ). Die Bestimmung des abgeleiteten Fibrinogens simultan mit der PT zeigte eine gute Übereinstimmung mit der Methode nach Clauss. Das Verfahren ist über den ganzen Meßbereich von 0,5 bis 10 g/l bei guter Präzision ohne Probenverdünnung durchführbar. Bei guter Vergleichbarkeit mit den etablierten Verfahren am KC 40 erwies sich der CA-1000 als zuverlässig und kostengünstig arbeitendes „walk away“-System.

## 113 Labordiagnostik zur Erfassung möglicher Schädigungen von Niere und oberen Harnwegen nach ESWL-Behandlung von Calciumoxalat (CaOx) – Steinträgern

G. Rebentisch, K. Schöneborn, J. Muche  
Carl-Thiem-Klinikum Cottbus, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik

44 (26 ♂, 18 ♀) CaOx-Steinträger wurden der ESWL am Dornier Lithotripter Compact unterzogen. Einen Tag vor und einen Tag nach ESWL wurden 15 Serum-, 22 Urin- und 7 Blut-Parameter untersucht. Die dU-Ca-Ausscheidung lag in 33% vor und in 25% nach ESWL über 5,0 mmol/d, dU-Ox nur in 10% über 0,5 mmol/d. Die Inhibitoren der Ca OX-Kristallisation – Citrat, Mg und Tamm-Horsfall-Protein – wurden zu 30 – 70% vermindert ausgeschieden. Eine Hyperuricosurie als Promotor der Ca OX-Genese fand sich zu 30%.

Korrelationen ergaben sich vor ESWL für dU-Ox/dU-Ca, S-PTH/dU-Ca und dU-Ci/dU-Ox und nach ESWL für U-Ery/dU-Prot, U-Ery/dU-Alb und U-Ery/dU-IgG. Die U-Ery-Zahl stieg nach ESWL auf durchschnittlich 3400 Mpt/l an (Ery-Clearance: 70,8 ml/min x 1,73m<sup>2</sup>).

Mit Phasenkontrastmikroskopie stellten sich die Ery zu 95% als eumorphe und nur zu 5% als dysmorphe Zellen dar, so daß die Makrohämaturie als postrenal eingestuft werden kann.

Durch die Erythrozyturie bedingt findet man auch eine Proteinurie, Albuminurie und IgG-urie. Vorwiegend tubuläre Marker (α1-Makroglobulin, β2-Mikroglobulin, β-NAG) zeigten kaum Veränderungen, so daß eine tubuläre Läsion untergeordnet scheint.

Ähnliche Größenordnungen der Quotienten S-Alb/S-IgG und dU-Alb/dU-IgG weisen auf eine postreale Proteinurie hin.

## 114 Untersuchungen zum löslichen interzellulären Adhäsionsmolekül-1 (sICAM-1) und dessen Beziehung zur unspezifischen Akute-Phase-Reaktion bei chirurgisch-onkologischen Patienten

K.M. Reinhardt, D. Zillig<sup>1</sup>, H.R. Nagel, A.D. Blann<sup>2</sup>, M. Steiner  
Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie und Klinik für Chirurgie<sup>1</sup>, Universität Rostock; Department of Surgery<sup>2</sup>, University Hospital of South Manchester, United Kingdom

Bestimmungen des sICAM-1 bei Tumorpatienten lassen einen prognostischen Wert vermuten (Banks et al.: Br. J. Cancer 1993; 68: 122 - 124). Im Rahmen einer prospektiven Studie zu prognostisch relevanten Laborparametern bei gastrointestinalen Malignomen wurde der Zusammenhang zwischen sICAM-1 und positiven Akute-Phase-Proteinen (C-reaktives Protein, Haptoglobin, Coeruloplasmin, saures α1-Glykoprotein) bei 78 Patienten untersucht. sICAM-1 wurde mit einem ELISA (British Bio-technology), die Akute-Phase-Proteine mit dem Behring Nephelometer 100 immunnephelo-



metrisch bestimmt. Gegenüber dem an einem gesunden Kontrollkollektiv (n = 76) erstellten Normalbereich konnte bei den Patienten keine Erhöhung des sICAM-1 gefunden werden (Median: 292 vs 268 ng/ml, p = 0,11.). Patienten mit erhöhtem CRP (> 5,0 mg/l, n = 32) wiesen im Vergleich zu Patienten mit normalem CRP (n = 46) signifikant erhöhte sICAM-1-Konzentrationen auf (Median: 335 vs 266 ng/ml, p = 0,0008). Ein ähnlicher Unterschied wurde für sICAM-1 bei der Analyse von saurem  $\alpha$ 1-Glykoprotein nachgewiesen (Median: 339 vs 269 ng/ml, p = 0,005). sICAM-1 von Patienten mit normalem Haptoglobin bzw. Coeruloplasmin unterscheidet sich nicht gegenüber Patienten mit erhöhten Konzentrationen der Proteine. Korrelationsanalysen mittels linearer Regression erbrachten für die Patienten mit vorliegender Akute-Phase-Reaktion keine signifikanten Zusammenhänge zwischen sICAM-1 und den Akute-Phase-Proteinen. Die Ergebnisse zeigen, daß bei der Beurteilung von sICAM-1 als prognostischer Parameter bei onkologischen Patienten das Vorliegen einer Akute-Phase-Reaktion berücksichtigt werden sollte, um unspezifische Erhöhungen zu erfassen. Verschiedene Cytokine (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6) sind sowohl in der Induktion der Akute-Phase-Reaktion als auch bei tumorbiologischen Phänomenen (Progression, Metastasierung) sowie bei der zellulären Regulation von Adhäsionsmolekülen partiell beteiligt, was die Nutzbarkeit des sICAM-1 bei der Beurteilung onkologischer Prozesse erschwert.

## 115 Regulation des Kohlenhydrat-Stoffwechsels und der Hämodynamik der Rattenleber durch arterielles und portales Angiotensin II

F. Reisenleiter, N. Katz, A. Gardemann  
Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Justus-Liebig-Universität, 35392 Gießen

### Einleitung

Die (Patho)biochemie des Angiotensin II (All) hat in den letzten Jahren eine Neubewertung erfahren. Es wurde nachgewiesen, daß All nicht nur während der Passage durch die Lungen-Zirkulation, sondern auch in vielen Geweben (u.a. Herz, Nebenniere, Milz, arterielle Gefäße) in hohen Konzentrationen gebildet und in das Gefäßsystem abgegeben wird. Die Freisetzung des All führt u.a. zu deutlichen Anstiegen des All im portalvenösen und leberarteriellen Blut. Es war unbekannt, ob lokale Anstiege der arteriellen oder portalen All-Spiegel ausreichen, um Veränderungen des Kohlenhydratstoffwechsels und der Hämodynamik der Leber hervorzurufen.

### Methoden

Rattenlebern wurden unter physiologischen Bedingungen über die Leberarterie und Portalvene perfundiert. All wurde in drei sinusoidalen Konzentrationen (0,2 nM, 5 nM, 25 nM) jeweils für 5 min über die Leberarterie oder Portalvene infundiert. Zusätzlich wurde 5 nM leberarterielles und portales All in Gegenwart des ATI-Rezeptor-Antagonisten Losartan (1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M) zugegeben.

### Ergebnisse

1. Arteriell All steigerte im Vergleich zu portalem All die Glucose-Freisetzung in geringeren und die Lactat-Abgabe in gleichem Ausmaß; 5 nM All führte jeweils zu nahezu maximalen Veränderungen der Glucose- und Lactat-Bilanzen. 2. Portales All verringerte den portalvenösen Fluß etwa gleich stark (5 nM) oder sogar stärker (0,2 nM, 25 nM) als leberarterielles All den arteriellen Fluß. Arteriell und portales All reduzierten jeweils auch den kontralateralen Fluß stark. 3. Die metabolischen und hämodynamischen Wirkungen des arteriellen und portalen All wurden jeweils über AT1-Rezeptoren vermittelt.

### Schlußfolgerung

Offensichtlich reichen lokale Konzentrationsanstiege in der Leberarterie oder der Portalvene aus, um eine Steigerung der hepatischen

Glucose- und Lactat-Freisetzung und eine ausgeprägte Reduktion nicht nur des ipsilateralen, sondern auch des kontralateralen Flusses hervorzurufen.

## 116 Sensitivity and prognostic significance of CA 72-4-, CEA- and CA 19-9-serum levels in patients with gastric carcinoma pretherapeutically

W. Reiter, Petra Stieber, C. Reuter<sup>1</sup>, C. Cramer<sup>1</sup>, A. Fatheh-Moghadam  
<sup>1</sup>Institut für Klinische Chemie und Chirurgische Klinik und Poliklinik; Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München, FRG

We investigated the relevance of CA 72-4 in gastric carcinoma in comparison to CEA and CA 19-9 and focused our interest on the question of prognostic significance of these markers.

Life table analysis was calculated according to Kaplan-Meyer. The patients were divided into two groups, respectively, according to the preoperative marker levels. Two cut off levels (which discriminate best) were used: < 3 U/mL versus  $\geq$  3 U/mL for CA 72-4, < 4 ng/mL for CEA and < 60 U/mL versus  $\geq$  60 U/mL for CA 19-9. The statistical significance between the survival curves was calculated using chisquare (logrank)-test.

Investigation was done using frozen sera (stored at -70° C) of 216 patients. The patient group included sera of 146 patients with histologically proven gastric carcinoma: 112 at the time of primary diagnosis, 18 with distant metastases and 16 patients with local relapse. As a clinically relevant reference group we investigated the CA 72-4, CEA and CA 19-9-levels in 70 patients with benign disorders of the gastrointestinal tract. Fixing specificity at 95% versus a clinically relevant reference group CA 72-4 showed at the time of primary diagnosis, a sensitivity of 36% for CA 72-4, 14% for CEA and 20% for CA 19-9. At the time of local relapse respectively distant metastases the sensitivities were elevated (CA 72-4 56% (56%)/CEA 19% (33%)/CA 19-9 18% (28%). There was good correlation of CA 72-4 levels and tumor stage (UICC) in gastric cancer. The simultaneous determination of CA 72-4 and CEA showed the highest additive sensitivity.

The survival rates in the group of patients with serum concentrations  $\geq$  60 U/mL for CA 19-9 were in 81% of the cases < 2 years versus 19%  $\geq$  2 years (CEA:  $\geq$  4 ng/mL in 79% < 2 years versus 21%  $\geq$  2 years/CA 72-4:  $\geq$  3 U/mL in 67% < 2 years versus 33%  $\geq$  2 years). The preoperative value of CA 19-9 (log-rank = 13.8) represents the best prognostic factor besides CEA (log-rank = 12.2). CA 72-4 shows a log-rank of 6.9.

## 117 Mechanisms of regulation of actin synthesis in cultured hepatocytes

K.H. Reuner, M. Wiederhold, A. v. d. Does, P. Dunker, N. Katz  
Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Gaffkystraße 11, 35392 Gießen

In non-muscle cells, cytoskeletal actin is involved in several motile processes and is an essential element of the cellular architecture (1). Moreover, actin synthesis is under autoregulatory control on the base of the equilibrium between monomeric G-actin and filamentous F-actin (2).

The present study demonstrates that in cultured rat hepatocytes a shift of the G-/F-actin equilibrium to the filamentous form by the actin polymerizing mycotoxin phalloidin or by osmotic stress increases the transcription rate of actin mRNA as demonstrated by means of nuclear run on transcription assay. On the other hand a

shift of the G-/F-actin ratio towards the monomeric form by means of the actin ADP-ribosylating botulinum C2 toxin caused a decrease of actin mRNA but no alterations of the transcription rate of actin genes.

Furthermore microinjection of ADP-ribosylated G-actin into immortalized hepatocytes caused inhibition of actin synthesis. It is concluded that in rat hepatocytes the actin synthesis is under autoregulatory control based on a transcriptional mechanism after decrease of monomeric G-actin and on a posttranscriptional mechanism after increase of G-actin. The cellular level of monomeric G-actin is assumed to be the regulator of actin synthesis.

1. Pollard, T.D.; Cooper, J.A. (1986): *Annu. Rev. Biochem.* 55, 987 - 1035.  
2. Reuner, K.H.; Schlegel, K.; Just, I.; Aktories, K.; Katz, N. (1991): *FEBS Lett.* 286, 100 - 104.

## 118 Lipoproteinstoffwechsel – und weitere klinisch-chemische Kenngrößen bei vegetarischer Ernährungsweise

V. Richter, A. Bohusch, W. Reuter, B. Vorberg, W. Rotzsch  
*Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Medizinische Klinik und Poliklinik III der Universität Leipzig*

Mit der Zielstellung des Vergleichs von Allgemeinbevölkerung und Vegetariern wurden im Rahmen eines Lipid-Screening Projekts, in das 11 085 Personen einbezogen waren, auch 119 Vegetarier unterschiedlicher Ernährungstypen (Veganer, Lacto-Vegetarier, Lacto-Ovo-Vegetarier) erfaßt. Neben Gesamt- und HDL-Cholesterol wurden verschiedene weitere Atherosklerose-Risikofaktoren ermittelt. Unabhängig hiervon erfolgte bei Vegetariern eine Lipoprotein-Analytik, speziell auch unter dem Aspekt der Zusammensetzung von HDL-Subfraktionen sowie der Untersuchung weiterer klinisch-chemischer Kenngrößen unter Einschluß von Parametern des antioxidativen Potentials ( $\alpha$ -Tocopherol, Ascorbinsäure, Selen).

Die auf Bevölkerungsebene durchgeführten Untersuchungen zeigen ein günstiges Lipidprofil bei Vegetariern, das in einer niedrigen mittleren Relation Cholesterol/HDL-Cholesterol zum Ausdruck kommt sowie eine geringere Prävalenz von Hypercholesterolämie und weiterer Atherosklerose-Risikofaktoren. Die detaillierte Analyse der Plasma-Lipoproteinkonstellation weist bezüglich der HDL-Zusammensetzung einen hohen Anteil der HDL<sub>2</sub>-Subfraktion und an LpA-I Partikeln aus. Bei mittleren und hohen Vitamin-E-Plasmakonzentrationen ergibt sich für Vegetarier eine günstige Relation LDL-Cholesterol/Vitamin E. Eisen- und Vitamin B<sub>12</sub>-Konzentration lagen als Ausdruck einer kritischen Aufnahme mit der Nahrung speziell bei Veganern an der unteren Grenze des Referenzbereichs.

## 119 Regulation of lipoprotein metabolism by thyroid hormones

W.F. Riesen, H. Engler  
*Institute for Clinical Chemistry and Hematology, Kantonsspital, 9000 St. Gallen, Switzerland*

The effect of thyroid hormones on cholesterol metabolism is well studied. The data have shown that thyroid hormones are affecting mRNA synthesis for the LDL receptor which results in an increased number and activity of this receptor in hyperthyroidism. Less data are available on the regulation of Lp(a) and of triglycerides by thyroid hormones.

We measured cholesterol, triglycerides, LDL-C, HDL-C, Lp(a) and the apolipoproteins A-I, A-II, B, C-II, C-III and E in 46 hyperthyroid patients (TSH: 0.03 [0.00 - 0.07] mU/l, FT4: 39.8 ± 1.5 pmol/l, T3: 4.1 ± 2.3 nmol/l), in 36 hypothyroid patients (TSH: 63.7 [40.5 - 100]

mU/l, FT4: 7.1 ± 4.2 pmol/l, T3, 1.1 ± 0.6 nmol/l) and in 43 euthyroid controls (TSH: 1.19 [0.51 - 2.76] mU/l, FT4: 16.6 ± 3.7 pmol/l, T3: 1.8 ± 0.4 nmol/l).

The data are summarized in the following table.

Parameter	Hyperthyroidism	Euthyroidism	Hypothyroidism	ANOVA
Lp(a) (mg/l) <sup>1</sup>	58 (10 - 343)	68 (26 - 179)	94 (21 - 422)	p = 0.008
Cholesterol (mmol/l)	4.7 ± 1.1	6.1 ± 1.1	7.6 ± 2.2	p < 0.0001
Triglycerides (mmol/l)	1.4 ± 0.5	1.6 ± 0.7	1.9 ± 1.0	p = 0.006
Apo A-I (g/l)	1.48 ± 0.27	1.65 ± 0.34	1.63 ± 0.47	p = 0.046
Apo A-II (g/l)	0.40 ± 0.09	0.46 ± 0.11	0.44 ± 0.16	p = 0.040
Apo B (g/l)	0.95 ± 0.24	1.25 ± 0.30	1.49 ± 0.56	p < 0.0001
Apo C-II (g/l)	28.2 ± 11.9	34.5 ± 12.9	38.0 ± 21.4	p = 0.018
Apo C-III (g/l)	74.2 ± 22.8	94.3 ± 27.5	107.8 ± 49.5	p < 0.0001
Apo E (mg/l)	26.9 ± 6.6	32.2 ± 14.5	30.1 ± 12.2	p = 0.099
LDL-C (mmol/l)	2.76 ± 0.90	3.91 ± 1.12	4.82 ± 2.19	p < 0.0001
HDL-C (mmol/l)	1.35 ± 0.81	1.45 ± 0.52	1.75 ± 1.50	NS

<sup>1</sup>Two-way ANOVA incl. phenotypes as second variable.

The data show that thyroid hormones do not only influence the cholesterol metabolism but also Lp(a), triglycerides and the apolipoproteins C-II and C-III. The changes in Lp(a) parallel those of LDL, apo B and total cholesterol, but are less pronounced as compared to those. At the present time it is not possible to decide whether the Lp(a) decrease in hyperthyroidism is due to an increased catabolism caused by increased receptor activity, or due to a decreased synthesis of apo(a).

Higher levels of apo C-II and especially C-III and a lower ratio of C-II/C-III are found in hypothyroidism compared to hyperthyroidism. Since these proteins act as regulators of lipoprotein lipase this might affect lipoprotein lipase activity which is known to be influenced by thyroid function.

## 120 Hämatologische Veränderungen unter Mikrogravitationsbedingungen (Ergebnisse aus SL-1, D-1, MIR'92, D-2 Missionen)

L. Röcker  
*Physiologisches Institut der FU Berlin*

Das Blutvolumen nimmt unter Weltraumbedingungen erheblich ab (1, 2, 3, 4). Dabei ist sowohl das absolute Erythrozytenvolumen (2 - 21%) als auch die absolute Hämoglobinmenge (12 - 33%) bei den sowjetischen und bei den US-Raumflügen erniedrigt gefunden worden. Gleichzeitig war auch das Plasmavolumen erniedrigt (4 - 16%).

Die Erythrozyten- und Hämoglobinkonzentrationen bleiben nahezu konstant.

Die Ursache dieser Veränderungen ist noch nicht eindeutig erklärt. Aus diesem Grunde wurde vor und nach der MIR'92-Mission bei einem Kosmonauten die Erythropoietin (EPO)-Konzentration gemessen. Während eine Kontrollgruppe keine wesentlichen Veränderungen zeigte, war bei dem Kosmonauten EPO am Ende des Fluges leicht supprimiert und stieg 7 Tage nach dem Flug im Vergleich zur Kontrollgruppe erheblich an.

### Schlußfolgerung

Die Abnahme von Erythrozyten und Hämoglobinmenge scheint durch eine Hemmung der Erythropoese unter Mikro-g-Bedingungen bedingt zu sein, die im Anschluß an den Flug durch einen Anstieg von EPO normalisiert wird.

### Literatur:

1. Cogoli, A. (1981): Hematological and immunological changes during space flight. *Acta Astronautica* 8 (No. 8-10): 995 - 1002.

2. Dunn, C.D.R.; Lange, R.D. (1979): Erythropoietic effects of space flight. *Acta Astronautica* 6: 725 - 732.
3. Kimzey, S.L.; Johnson, P.C.; Ritzman, S.E.; Mengel, Ch.E. (1976): Hematology and Immunology Studies: The Second Manned Skylab Mission. *Aviat. Space Environ. Med.* 47(4): 383 - 390.
4. Röcker, L.; Kirsch, K.A.; Molz, A.B.; Heyduck, B.; Gunga, H.-Ch. (1993): Auswirkungen der Mikrogravitation auf Volumen-regulierende Hormone und Plasmaproteine. *Jahrbuch 1993 (Österreichische Gesellschaft für Alpin- und Höhenmedizin)*, S. 157 - 167.

## 121 Endothelinkonzentration vor und nach maximaler ergometrischer Leistung (Relation zur Hämostase)

L. Röcker<sup>1</sup>, K.-P. Westpfahl<sup>1</sup>, B. Heyduck<sup>1</sup>, M. Möcke<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Physiologisches Institut der FU Berlin; <sup>2</sup>Universitätsklinikum Rudolf Virchow

Das Gefäßendothel spielt eine Hauptrolle bei der Regulation von Gerinnung und Fibrinolyse (1). Körperliche Aktivität kann durch mechanische Einwirkungen auf das Endothel (z.B. vergrößerte Scherkräfte) die Endothelzellen zur Freisetzung prokoagulatorischer und fibrinolytischer Substanzen stimulieren (3). Ein sensibler Marker von Endothelstörungen ist das Endothelin, dessen erhöhte Konzentration eine Endothelschädigung empfindlich anzeigt (2).

In der vorliegenden Studie wurde deshalb bei 18 gesunden männlichen Testpersonen vor und nach ergometrischer Leistung die Gesamt-Endothelinkonzentration analysiert. Weiterhin wurden als sensitive Marker des Gerinnungssystems die Prothrombinfragmente F1+F2 und TAT, als sensitive Marker des Fibrinolyse-systems t-PA und PAI-1 bestimmt.

Die Ergebnisse zeigen einen signifikanten Anstieg von Endothelin (Ruhe: 11.0 pg/ml; nach Ergometrie: 17.2 pg/ml). Entsprechende Veränderungen zeigten Gerinnungs- und Fibrinolysemarker.

Es wird vermutet, daß die erhöhte Endothelinkonzentration als potentielle Ursache für Veränderungen von Gerinnung und Fibrinolyse in Frage kommt.

### Literatur:

1. Kapiotis, S.; Speiser, W. (1993): Die Bedeutung der Endothelzelle bei Hämostase und Fibrinolyse. *Labmed.* 17: 142 - 145.
2. Malek, A.; Izumo, S. (1992): Physiological fluid shear stress causes downregulation of endothelin-1 mRNA in bovine aortic endothelium. *Am. J. Physiol.* 263 (Cell Physiol. 32): C389 - C396.
3. Röcker, L. (1993): Einfluß körperlicher Leistungen auf das Hämostasesystem. Erfassung durch sensitive biochemische Marker. *Dtsch. Med. Wschr.* 118: 348 - 354.

## 122 Reaktionsverhalten von Anti-B Seren gegenüber Erythrozyten mit erworbenem B-Antigen

T. Rogge, H.A. Fabricius  
 Abt. f. Laboratoriumsmedizin, Krankenhaus Am Urban, Berlin

Das erworbene B-ähnliche Antigen kann sich bei A1-Individuen unter der Einwirkung einer bakteriellen Deacetylase bilden (1). Gewöhnlich liegt eine entzündliche oder maligne Darmerkrankung vor (2).

Wir berichten über eine 78jährige Patientin mit einem Karzinom des Collum uteri, bei der durch die Diskrepanz bei zweimaliger Blutgruppenbestimmung mit einem polyklonalen und einem monoklonalem Anti-B Serum ein erworbenes B-ähnliches Antigen diagnostiziert wurde.

Die Erythrozyten dieser Patientin wurden im Röhrchen-Zentrifugationstest mit 14 verschiedenen kommerziell erhältlichen Anti-B-Ser-

ren auf ihre Reaktionsstärke untersucht. Für die untersuchten polyklonalen Seren humanen Ursprungs fanden sich schwach positive Reaktionen. Vier monoklonale Seren reagierten negativ, zwei monoklonale Seren zeigten dagegen maximal positive Reaktionen, die sich nicht in der Stärke von Reaktionen mit „echten“ B-Antigenen unterschieden. Beide Seren stammten von unterschiedlichen Herstellern aber vom selben Klon. Wir folgern daraus, daß

1. bei gleichzeitiger schwacher Ausprägung der Isoagglutinine eine Fehltypisierung der Blutgruppe als AB möglich erscheint und
2. die Hersteller von monoklonalen Seren zur ABH-Blutgruppenbestimmung den verwendeten Klon mit ausweisen sollten, um der Forderung nach Verwendung unterschiedlicher Seren Rechnung tragen zu können.

### Literatur:

1. Gerbal, A. et al. (1975): *Vox Sang.* 28: 398 - 403.
2. Beck, M.L. et al. (1992): *Immunohematology*, 8: 22 - 23.

## 123 Spontaneous abortion in nonselected SLE patients: Diagnostic value of anti-cardiolipin antibodies

C. Sachse, K. Lüthke, K. Hartung, M. Fricke, B. Liedvogel, J.R. Kalden, H.H. Peter, H.J. Lakomek, E. Henkel, H. Deicher  
 University Clinics of Hannover, Erlangen, Freiburg, Düsseldorf and Dresden; Hospital Reinkenheide, Bremerhaven; Elias GmbH, Freiburg; Germany

Antibodies to cardiolipin have been associated with spontaneous abortion (Lockshin et al., 1985). We determined the diagnostic value and optimum cut-off points of these antibodies with regard to spontaneous abortion in a large group of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) not selected on the basis of clinical features of antiphospholipid syndrome.

The obstetric histories of 194 female patients, who fulfilled the ARA classification criteria for SLE and were not older than 45 years at the time of diagnosis, were recorded on standardized registration sheets. Antibodies to cardiolipin were measured using a commercial ELISA kit (Elias, Freiburg).

Anti-cardiolipin IgG- and IgM-levels were elevated in 118 (60.8%) and 66 (34.0%) patients, respectively. Increased anti-cardiolipin IgG was associated with spontaneous abortion: While there was a single abortion in 76 women with normal values, 31 abortions occurred in 20 of 118 patients with elevated levels ( $p < 0.001$ , chi-square test). Moreover, a dose-effect was observed. The test showed a sensitivity of 95%, but a specificity of only 43%. Therefore the predictive value of a positive result was low (17%). Shifting of the cut-off point to two times the upper reference limit improved the diagnostic value of anti-cardiolipin IgG-testing with regard to spontaneous abortion. Sensitivity is now 71%, while specificity rises to 81%, and the predictive value of a positive result becomes 31%. Taking into account the facts that some abortions occur without relation to antiphospholipid antibodies and that some patients with high anti-cardiolipin IgG cannot become pregnant for medical or nonmedical reasons, the latter values can be regarded as satisfactory. Elevated anti-cardiolipin IgM and spontaneous abortion showed an association of questionable significance ( $p = 0.06$ ).

### Literatur:

1. Lockshin, M.D. et al., (1985): Antibody to cardiolipin as a predictor of fetal distress or death in pregnant patients with systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* 313, 152 - 156.

## 124 Die Nutzung der Durchflußzytometrie im postoperativen Monitoring von nierentransplantierten Patienten

U. Sack, Kathrin Rotzsch, Irina Lehmann  
Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Leipzig

Bei der immunsuppressiven Therapie nach Nierentransplantation ist es notwendig, eine Rejektion des Transplantates zu verhindern, ohne daß das Immunsystem in seiner Funktion so beeinträchtigt wird, daß es zum Auftreten von Infektionen kommt.

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie wurden im peripheren Blut die Zusammensetzung und der Aktivierungszustand von Lymphozytenpopulationen erfaßt. Unter Berücksichtigung von Markerkombinationen ist es dabei möglich, Aussagen über Abstoßungsprozesse oder virale Infekte zu treffen. Eine Erhöhung der CD4/8-Ratio, Zunahme der aktivierten T-Zellen (HLA-DR positiv, CD25+) und Verschiebung der T-Zellen von CD45RA zu CD45RO werden dabei als Hinweise auf eine Transplantatrejektion gewertet, während ein früher oder subklinisch verlaufender Virusinfekt durch ein Absinken der CD4/8-Ratio, Anstieg aktivierter HLA-DR-positiver T-Zellen bei gleichbleibender Anzahl IL-2R-positiver T-Zellen und den Anstieg von HLA-DR-positiven CD57-positiven NK-Zellen charakterisiert ist. Eine zu starke Immunsuppression kann über Erniedrigung der HLA-DR positiven Monozyten diagnostiziert werden.

Die Wertigkeit eines durchflußzytometrischen Monitorings der Patienten innerhalb der hochspezialisierten Betreuung wird unter Berücksichtigung des erheblichen zusätzlichen diagnostischen Aufwandes anhand nierentransplantierten Patienten kritisch diskutiert.

## 125 Wertigkeit von fünf PSA-Assays aus methodischer und klinischer Sicht

C. Schambeck<sup>1</sup>, P. Stieber<sup>1</sup>, N. Schmeller<sup>2</sup>, H. Pahl<sup>1</sup>, W. Reiter<sup>1</sup>, A. Fateh-Moghadam<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Institut für Klinische Chemie; <sup>2</sup>Urologische Klinik, Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München

Untersucht wurde methodische und klinische Vergleichbarkeit von fünf verschiedenen Assays zur Bestimmung des Prostata-spezifischen Antigens (PSA). Das PSA wurde analysiert mittels des Tandem-E EIA (Hybritech), des IMx MEIA (Abbott), des CobasCore EIA (Roche), des Enzymun EIA (Boehringer Mannheim) und schließlich des ACS180 Chemilumineszenz-Assays (Ciba Corning).

Die Analysen wurden anhand tiefgefrorener Seren (-80° C) von 82 Patienten mit Prostatakarzinom durchgeführt. Unser Vergleichskollektiv umfaßte 51 Gesunde bzw. 127 Patienten mit Prostatahyperplasie.

Alle getesteten Assays zeichnete eine sehr gute Korrelation gegenüber dem Hybritech-Assay aus ( $r > 0,95$ ), wurden alle Männer, Karzinompatienten oder Hyperplasiepatienten berücksichtigt. Wurden Regressionen nur für gesunde Männer berechnet, so war der Korrelationskoeffizient stets  $> 0,70$ . Bei einer 95%igen Spezifität gegenüber gesunden Männern ergaben sich folgende Grenzwerte: Tandem-E 2,0 ng/ml, IMx 2,6 ng/ml, CobasCore 3,2 ng/ml, Enzymun 2,5 ng/ml, ACS180 1,9 ng/ml. Daraus resultierte stets eine Sensitivität von  $> 85\%$ .

Bei einer 95%igen Spezifität gegenüber dem klinisch relevanten Vergleichskollektiv, den Patienten mit Prostatahyperplasie (Grenzwert für Tandem-E: 15,2 ng/ml, IMx: 15,0 ng/ml, CobasCore: 13,1 ng/ml, Enzymun: 14,8 ng/ml, ACS180: 28,8 ng/ml), berechnete sich eine Gesamtsensitivität von 53–59%. Die Unterschiede der Sensitivitäten aller fünf Assays sind klinisch nicht bedeutsam. Der ACS180 PSA Assay zeichnet sich durch eine nahezu doppelt so hohe Wertlage gegenüber den anderen vier untersuchten Assays aus. Dies dürfte im klinischem Alltag große Probleme bereiten. Die Anstiegssteilheit

des ACS180 PSA im Falle einer Progression ist aber größer als die des Tandem-E PSA.

## 126 ELISA zur quantitativen Bestimmung des Pyruvatkinase-Isoenzym Typ: Tumor M2 – ein neues, generelles Tumortestsystem?

U. Scheefers-Borchel<sup>1</sup>, H. Scheefers<sup>1</sup>, A. Michel<sup>1</sup>, H. Will<sup>1</sup>, G. Fischer<sup>2</sup>, N. Dahlmann<sup>3</sup>, R. Laumen<sup>4</sup>, S. Mazurek<sup>5</sup>, E. Eigenbrodt<sup>6</sup>  
<sup>1</sup>ScheBo Tech GmbH, 35435 Wetténberg; <sup>2</sup>Zentrum f. Pathologie, Uni. Göttingen; <sup>3</sup>Inst. f. Klin. Biochemie, Uni Bonn; <sup>4</sup>Klinik Seltersberg, Gießen; <sup>5</sup>Inst. f. Veterinärbiochemie, Uni Gießen

Untersuchungen bei einer großen Anzahl von verschiedenen Tumoren des Menschen haben gezeigt, daß in allen Tumoren ein bestimmtes Isoenzym der Pyruvatkinase erhöht ist (1). Der Gehalt dieses Pyruvatkinase-Isoenzym in den Tumoren ist mit der Malignität der Tumore korreliert. Das Isoenzym wird aus diesem Grund als Pyruvatkinase Typ Tumor M2 (TU M2-PK) bezeichnet. ScheBo Tech hat einen Test entwickelt, mit dem die TU M2-PK direkt im Serum nachgewiesen werden kann. Der Test basiert auf monoklonalen Antikörpern, die hochspezifisch für die TU M2-PK sind und deshalb nicht mit den anderen Isoenzymen der Pyruvatkinase (Typ L, R, M1 und M2) reagieren. Die gemittelten Variationskoeffizienten der Intra-assay- ( $n = 30$ ) und der Inter-assay-Präzision ( $n = 10$ ) betragen 3,5% und 5,5%. Bei einer Untersuchung von 800 Seren verschiedener Lungenpatienten wurde für das Adenokarzinom eine Sensitivität von 73%, für das Plattenepithelkarzinom von 78% und das kleinzellige Bronchialkarzinom von 50% festgestellt. Für das gesunde Kontrollkollektiv wurde eine Spezifität von 95% bei einem cut off von 17 U/ml Serum festgelegt. Bei benignen Erkrankungen sowie bei Entzündungen der Lunge war kein signifikanter Anstieg der TU M2-PK nachweisbar. In einer anderen Studie wurden 102 Seren von Patienten mit unterschiedlichen Tumoren untersucht. Hierbei wurden folgende Sensitivitäten bestimmt: Mamma-Ca.: 74%, Prostata-Ca.: 76%, Rectum-Ca.: 75%, Colon-Ca.: 87%, Magen-Ca.: 58%. Erste Studien belegen, daß der ELISA auch zur Verlaufskontrolle von Tumoren geeignet ist. Der ELISA steht zur routinemäßigen Anwendung automatisierbar zur Verfügung.

1. Eigenbrodt, E. et al. (1992): Critical Reviews in Oncogenesis. 3 (1, 2): 91–115.

## 127 Vergleichende Messung von 412 Myelom-proben mittels kinetischer Nephelometrie (Array-System, Fa. Beckman) und der fixed-time-Kinetik (BN 100, Behringwerke)

F.-J. Schmitz, G. Schmitz, H. Reinauer  
Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Abweichende Ergebnisse bei der Bestimmung unterschiedlicher Immunglobulinklassen treten auf, wenn statt der Vielfalt ein einzelnes Immunglobulin dominiert, wie z. B. bei monoklonalen Gammopathien. Einzelne monoklonale Immunglobuline können mit einem Antiserum anders als ein polyklonales Immunglobulinalgemisch reagieren. Die Unterschiede können die Kinetik der Reaktion und die Größe des Meßsignals zu einem fixierten Zeitpunkt betreffen. Nachfolgend untersuchten wir 400 bekannte monoklonale Gammopathien (bestätigt durch Immunfixationselektrophorese, Paragon, Fa. Beckman) mit Hilfe der kinetischen Nephelometrie (Array, Fa. Beckman, [BE]) und der fixed-time-Kinetik (BN 100, Behringwerke, [BW]). Wir analysierten die Immunglobuline A und M sowie die freien Leichtketten kappa u. lambda im Vergleich beider Meßsysteme. Die stati-

stische Auswertung nach Passing/Bablok ergibt folgende Ausgleichsgeraden:

Monoklonale Gammopathie IgG, Typ kappa (n = 100):  
IgG, BW (X), BE (Y):  $Y = -53,5 + 0,81X$   
IgM, BW (X), BE (Y):  $Y = -8,28 + 0,52X$   
IgA, BW (X), BE (Y):  $Y = -25,6 + 0,79X$   
Kappa, BW (X)BE (Y):  $Y = -92,4 + 2,97X$   
Lambda, BW (X), BE (Y):  $Y = 15,9 + 2,45X$   
Monoklonale Gammopathie IgG, Typ lambda (n = 100):  
IgG, BW (X), BE (Y):  $Y = 37,9 + 0,76X$   
IgM, BW (X), BE (Y):  $Y = 14,5 + 0,43X$   
IGA, BW (X), BE (Y):  $Y = -16,4 + 0,75X$   
Kappa, BW (X), BE (Y):  $Y = 61,3 + 2,74X$   
Lambda, BW (X), BE (Y):  $Y = 126,7 + 3,00X$   
Monoklonale Gammopathie IgA, Typ kappa (n = 41):  
IgG, BW (X), BE (Y):  $Y = 42,1 + 0,85X$   
IGM, BW (X), BE (Y):  $Y = 4,66 + 0,45X$   
IgA, BW (X), BE (Y):  $Y = 21,1 + 0,84$   
Kappa, BW (X), BE (Y):  $Y = 223 + 2,76X$   
Lambda, BW (X), BE (Y):  $Y = 45,6 + 2,47X$   
Monoklonale Gammopathie IgA, Typ lambda (n = 34):  
IgG, BW (X), BE (Y):  $Y = 14,6 + 0,78X$   
IgM, BW (X), BE (Y):  $Y = 11,8 + 0,44X$   
IgA, BW (X), BE (Y):  $Y = 25,2 + 0,90X$   
Kappa, BW (X), BE (Y):  $Y = 2,98 + 2,54X$   
Lambda, BW (X), BE (Y):  $Y = -227 + 2,9X$   
Monoklonale Gammopathie IgM, Typ lambda (n = 41)  
IgG, BW (X), BE (Y):  $Y = 46,6 + 0,78X$   
IgM, BW (X), BE (Y):  $Y = -41,2 + 0,67X$   
IgA, BW (X), BE (Y):  $Y = 15,8 + 0,84X$   
Kappa, BW (X), BE (Y):  $Y = 41,6 + 2,77X$   
Lambda, BW (X), BE (Y):  $Y = -810 + 7,16X$

Die Ergebnisse zeigen, daß durch die fehlende Standardisierung sowie die unterschiedlichen kinetischen Meßsysteme gravierende Abweichungen in den Analyseresultaten entstehen, wobei ohne Standard nicht zu entscheiden ist, welches System korrekter mißt.

## 128 Bestimmung der fäkalen $\alpha$ 1-Antitrypsin-Ausscheidung mit einem vereinfachten nephelometrischen Verfahren

F.-J. Schmitz<sup>1</sup>, G. Schmitz<sup>1</sup>, K. Becker<sup>2</sup>, C. Lindner<sup>2</sup>, H.J. Lübke<sup>2</sup>, H. Jablonski<sup>2</sup>, H. Reinauer<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik  
<sup>2</sup>Abt. für Gastroenterologie, Medizinische Klinik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

### Einleitung

Die Quantifizierung der  $\alpha$ -Antitrypsin-Ausscheidung im Stuhl als Maß für den intestinalen Eiweißverlust ist etabliert in der Diagnostik und Verlaufskontrolle exsudativer und chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen. Üblicherweise wird dazu die Bestimmung der  $\alpha$ -Antitrypsin-Clearance über drei Tage mittels Radialer Immundiffusion (RID) durchgeführt. Wir untersuchten die Handhabbarkeit eines stark vereinfachten und kostengünstigeren Verfahrens mittels Nephelometrie bei 55 Patienten in der Einmalstuhlprobe und präsentieren erste Ergebnisse an darmgesunden Probanden und ausgewählten Patienten.

### Methodik

Ca. 5 g frischen Stuhls werden in einer Gefriertrockenanlage Gamma IA<sup>R</sup> bei -40° C für 48 h lyophilisiert. 1 g des Lyophilisats (Trockenstuhl) werden mit 20 ml Reaktionspuffer (Fa. Behring) für 30 min auf einem Rollenmischer resuspendiert. Anschließend wird die Probe für 30 min bei 4000 Upm zentrifugiert und der Überstand durch einen Einmalmembranfilter (Porengröße 5  $\mu$ m) filtriert. Das Filtrat kann jetzt nephelometrisch (BNA, Fa. Behring) auf seinen  $\alpha$ -Antitrypsingehalt hin analysiert werden.

### Ergebnisse

1. Probanden ohne gastrointestinale Erkrankung weisen eine fäkale  $\alpha$ -Antitrypsin-Ausscheidung unter 2 mg/g Trockengewicht Stuhl (TGS) auf (Median 1.28 mg/g TGS) was gut mit den in der Literatur angegebenen Werten korreliert.
2. Patienten mit floriden chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (M. Crohn Colitis ulcerosa) zeigen mit Werten über 2 mg/g TGS (Median 6,98 mg/g TGS) eine deutlich erhöhte fäkale  $\alpha$ -Antitrypsin-Ausscheidung.
3. HIV-infizierte Kontrollen mit akuten infektiösen Enteritiden (CMV-Infektionen, intestinale atypische Mykobakteriosen Strongyloides stercoralis-Befall) weisen eine fäkale  $\alpha$ -Antitrypsin-Ausscheidung im Normbereich auf.
4. Patienten mit florider HIV-assoziiertes Enteropathie zeigen eine teils erhöht teils normale fäkale  $\alpha$ -Antitrypsin-Ausscheidung (Median 2.14 mg/g TGS).
5. AIDS-Patienten mit ausgeprägtem intestinalen Befall durch mukokutane Kaposi-Sarkome weisen eine erhöhte fäkale  $\alpha$ -Antitrypsin-Ausscheidung aus mit Werten bis zu 21 mg/g TGS. Bei geringem oder mäßigem Befall scheint die fäkale  $\alpha$ -Antitrypsin-Ausscheidung jedoch nicht beeinflusst zu werden.

### Diskussion

Nach unseren vorläufigen Ergebnissen liefert das hier vorgestellte stark vereinfachte Verfahren zur Bestimmung der fäkalen  $\alpha$ -Antitrypsin-Ausscheidung gut reproduzierbare Ergebnisse, die gut mit der Klinik korrelieren.

Zur Beurteilung der klinischen Wertigkeit in der (Differential-)Diagnostik und Verlaufskontrolle diverser Darmerkrankungen erscheinen umfangreiche prospektive Untersuchungen vielversprechend.

## 129 Cytokine plasma levels in septic patients

F.-J. Schmitz<sup>1</sup>, G. Schmitz<sup>1</sup>, K.O. Kliche<sup>2</sup>, A. Wehmeier<sup>2</sup>, W. Schneider<sup>1</sup>, H. Reinauer<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Department of Clinical Chemistry and Laboratory Diagnostic  
<sup>2</sup>Department of Hematology, Oncology and Clinical Immunology, University of Düsseldorf, Moorenstraße 5, 40225 Düsseldorf

Septic reactions are mediated by an array of cytokines. Determination of cytokine plasma levels promises insights into pathophysiological mechanisms as well as new therapeutical strategies, e. g. antagonization. We analyzed the endogenous cytokine pattern in a group of intensive care patients in order to find prognostic parameters for these severely ill patients.

We analyzed 8 complete courses of ICU therapy in patients eventually dying from their diseases. All of them fulfilled criteria for sepsis including a need for mechanical ventilation and high doses of catecholamines.

We determined plasma levels of Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleukin-1-receptorantagonist (IL-1-RA), TNF  $\alpha$ , soluble-TNF-receptor (s-TNF-r), Interleukin-6, Interleukin-6-receptor (s-IL-6-r), Interleukin-8 and Interleukin-10. Due to short half life of cytokines serial EDTA blood samples were collected in an intensified protocol three times per day. Samples were immediately centrifuged and stored at 80° C until analysis by ELISA using commercially available kits (Dianova, Laboserv and R & D Systems).

IL-1 $\beta$  as well as TNF  $\alpha$  were found in low concentrations and did not show a constant correlation to the severity of the disease. In contrast IL-6 as well as IL-1-RA increased significantly in 6 of 8 patients until death demonstrating a more than 20-fold-increase. Interestingly, IL-1-RA increased very early preceding death for several days, while IL-6 concentrations rose with significant delay. IL-10 was detectable in all patients, increasing remarkably in 5 of 8 patients (more than 10-fold-increase, maximal concentration 820 pg/ml). IL-8, s-TNF-r and s-IL-6-r could be measured in all patients, but a clear cut correlation

to the course of the disease could not be established (4 increases, 3 no change, 1 decrease).

Several conclusions can be drawn from these results: 1. IL-1-RA, IL-6 and IL-10 are the most promising analytes reflecting the fatal outcome of sepsis.

2. IL-8, s-TNF-r and s-IL-6-r are detectable, but lack a general correlation to the course of the disease.

3. IL-1  $\beta$  and TNF are inconsistently detectable and do not reflect the severity of the disease.

## 130 Auftreten von autoreaktiven, humanen anti-p53-Antikörpern und humanem löslichem CD58 (sCD58) im Serum von Patienten mit hämatologischen Systemerkrankungen mittels ELISA

F.-J. Schmitz<sup>1</sup>, G. Schmitz<sup>1</sup>, J. Zahner<sup>2</sup>, A. Ried<sup>2</sup>, W. Schneider<sup>2</sup>, H. Reinauer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik

<sup>2</sup>Klinik für Hämatologie: Onkologie und Klinische Immunologie Heinrich-Heine-Universität, Moorenstraße 5, 40225 Düsseldorf

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden 86 Seren von Patienten mit hämatologischen Systemerkrankungen hinsichtlich des Auftretens humaner anti-p53-Antikörper und löslichem sCD58 untersucht. Das Patientenkollektiv wurde in 4 Gruppen - wie folgt gegliedert:

- Gruppe 1: AML (Akute myeloische Leukämie), n = 26
- Gruppe 2: ALL (Akute lymphatische Leukämie), n = 15
- Gruppe 3: Niedrigmaligne Non-Hodgkin-Lymph., n = 25
- Gruppe 4: Hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome, n = 20

Dem Tumorsuppressor-Genprodukt p53 wird eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von malignen Tumoren zugeschrieben. Wildtyp-p53 steuert die Zelldifferenzierung, die Zellreifung und spielt eine wichtige Rolle in der Apoptose. Mutationen im p53-Gen stellen die häufigste genetische Veränderung bei der Entwicklung und Progression humaner Tumore in den verschiedenen Geweben dar. Diese Alterationen äußern sich teils in einer vollständigen Eliminierung des p53-Gens, meist aber in der Überexpression mutierten p53-Proteins. Die Überexpression sowie die stark erhöhte Stabilität des Proteins führt zur massiven Akkumulation des mutierten p53-Proteins in der Zelle. Bei verschiedenen soliden Tumoren konnten im Serum der Patienten Autoantikörper gegen p53 nachgewiesen werden. Bei den o.g. hämatologischen Systemerkrankungen ergab sich folgender Prozentsatz anti-p53-Ak positiver Seren:

- Gruppe 1: 12 %; n = 3
- Gruppe 2: 13 %; n = 2
- Gruppe 3: 12 %; n = 3
- Gruppe 4: 10 %; n = 2

Diese anti-p53-Ak positiven Patienten hatten bei der klinischen Beurteilung eine schlechtere Prognose als die entsprechende Vergleichsgruppe ohne Nachweis von anti-p53-AK. Der humane Adhäsionsrezeptor CD58 ist ein wichtig für die Antigen-spezifische T-Zellaktivierung und Antigen-Rezeptor-unabhängige T-Zell-Aktivierungsprozesse (wie z.B. für NK-Zellen). Weiterhin ist CD58 an Interaktionen beteiligt, die wichtig für die Biologie der Leukämie akuten Leukämie sind. Für die Prognose der akuten Leukämie soll CD58 von zentraler Bedeutung sein. Die statistische Auswertung für die einzelnen Gruppen ergab folgendes Bild: Der Median in der Gruppe 1 lag bei 8,3 ng/ml, in der Gruppe 2 bei 10 ng/ml, in der Gruppe 3 bei 13,2 ng/ml und in der Gruppe 4 bei 14,2 ng/ml.

Zwischen den Gruppen 1 - 4 ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. Es fiel aber auf, daß deutlich erhöhte Einzelwerte innerhalb der jeweiligen Gruppen mit einer schlechteren klinischen Situation bzw. Prognose für den betroffenen Patienten verbunden waren.

Schlußfolgerungen: 1. Humane anti-p53-Antikörper sind als Screening-Marker im Serum für maligne hämatologische Erkrankungen nicht geeignet.

2. Das Auftreten von anti-p53-Antikörpern scheint aber mit einer schlechteren klinischen Prognose verbunden zu sein.

3. Zwischen den 4 Gruppen gab es bei der CD58-Bestimmung keine statistisch signifikanten Unterschiede. Einzelne deutlich erhöhte Werte weisen eher auf eine schlechtere Prognose hin.

## 131 CA 125 - ein Tumormarker in der Inneren Medizin?

F.-J. Schmitz<sup>1</sup>, G. Schmitz<sup>1</sup>, J. Zahner<sup>2</sup>, W. Schneider<sup>2</sup>, H. Reinauer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik

<sup>2</sup>Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Während der Stellenwert des CA 125 in der Gynäkologie - insbesondere in Diagnostik und Verlaufsbeurteilung des Ovarialkarzinoms - bekannt ist, sind Spezifität, Sensitivität und prognostische Wertigkeit dieses Markers für Tumorerkrankungen in der Inneren Medizin umstritten.

Innerhalb von 2 Jahren wurden vom Institut f. Klin. Chemie u. Laboratoriumsdiagnostik 658 CA 125-Bestimmungen im Serum mittels Radioimmunoassay (Fa. Isotopendiagnostik) für die Innere Klinik durchgeführt.

Dabei zeigte sich bei 147 Patienten (22%) ein erhöhter CA 125-Wert - bei einem cut-off von < 37 U/ml.

76 Patienten (51 Frauen und 25 Männer) standen für die retrospektive Auswertung zur Verfügung. Der höchste CA 125-Wert bei einem männl. Patienten betrug 83 239 U/ml und wurde bei einem metastasierenden Plattenepitel-Carcinom der Lunge beobachtet. Unter den Patientinnen lag der höchste CA 125 Wert bei 3274 U/ml; dieser fand sich bei einem metastasierenden Pankreaskarzinom.

33 der 76 nachuntersuchten Patienten (43 %) zeigten eine maligne Grunderkrankung (12 Bronchial-, 7 Mammakarzinome, 5 hochmaligne Non-Hodgkin Lymphome, je 2 Pankreas-, Ösophagus-, Leberzellkarzinome und je 1 Magen-, Blasen- und Nierenzellkarzinom). Bei 43 Patienten (57%) mit erhöhtem CA 125 im Serum ergab sich kein Hinweis auf eine maligne Erkrankung. Am häufigsten wurden Leberschäden unterschiedlicher Ätiologie (10 x), Herzinsuffizienz (7 x) oder Pneumonie (1 x) als Ursache dieser CA 125-Erhöhung angenommen. Dabei zeigte sich, daß Markererhöhungen > 350 U/ml ausschließlich bei Malignomen (Pankreas, Lunge Mamma, Niere, Leber) und bei Patienten mit Leberzirrhose zu finden waren, während Herzinsuffizienz, Pneumonie und andere nicht-maligne Krankheiten nur im Zusammenhang mit Erhöhungen < 350 U/ml beobachtet werden konnten. Der Anteil der Patienten mit Körperhöhlenergüssen betrug 21 (29%); 15 Pleura- und Perikardergüsse sowie 6 Fälle mit Aszites wurden registriert.

Präliminäre Folgerungen sind:

1. Internistische Patienten mit erhöhtem CA 125 können in zwei, in unserem Falle etwa gleichgroße Gruppen mit maligner und nicht-maligner Grunderkrankung aufgeteilt werden
2. Mit steigendem CA 125-Wert nimmt der Anteil maligner Erkrankungen zu.
3. Hohe CA 125-Werte (> 1000 U/ml) gehen gehäuft mit ausgeprägter Metastasierung eines Malignoms einher.
4. CA 125-Serumerhöhungen finden sich überdurchschnittlich häufig im Zusammenhang mit Pleura-, Perikardergüssen und Aszites.

### 132 Evaluierung eines neuen in-vitro-Verfahrens zur quantitativen Ferritin-Bestimmung mittels partikelverstärkter Nephelometrie

F.-J. Schmitz<sup>1</sup>, G. Schmitz<sup>1</sup>, M. Lammers<sup>2</sup>, H. Reinauer<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf; <sup>2</sup>Behringwerke Marburg

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde der neu entwickelte N-Latex-Ferritin-Test<sup>®</sup> (Behringwerke = BW) mit dem Enzymtest Ferritin<sup>®</sup> (Boehringer Mannheim = BM) sowie dem Tandem E Ferritin-Test<sup>®</sup> (Hybritech = HY) verglichen. Die Messungen wurden am BNA, dem ES 700 sowie einem Photon Era durchgeführt.

Zunächst wurden 100 zufällig ausgewählte Seren mit allen drei Regentien analysiert. Dabei zeigten sich nach der statistischen Berechnung mittels Passing/Bablok folgende Ausgleichsgeraden ( $Y = a + bX$ ):

X (BW); Y (HY);  $Y = 10,63 + 1,11X$   
 X (BM); Y (BM);  $Y = 2,97 + 1,05X$

Vergleichbare Korrelationen ergaben sich auch bei Seren von Normalpersonen (n = 104), bei Fe-Mangel-Anämie-Patienten (n = 33), bei Niereninsuffizienten (n = 47) sowie bei Patienten mit bekannten Tumor-Erkrankungen (n = 87). Der Vergleich von 89 Serum- bzw. EDTA-Plasma-Paaren mit dem BW-Test ergab: X (Serum); Y (Plasma);  $Y = -1,54 + 0,92X$ .

Um die Probenstabilität zu prüfen, wurden 20 Serumproben am Tag ihrer Gewinnung analysiert und aliquotiert; dabei wurde je ein Aliquot anschließend nochmals nach Lagerung von 2 Tagen bei Raumtemperatur, 8 Tagen im Kühlschranks und 4 Wochen bei 25° C gemessen. Die Resultate der Sofort-Analysen wurden gleich 100% gesetzt, so daß sich folgende durchschnittliche Wiederfindungswerte ergaben: nach 2 Tagen konnten noch 96,6%, nach 8 Tagen 95,3% und nach 4 Wochen 92,6% der ursprünglichen Ausgangskonzentrationen nachgewiesen werden. Die Wiederfindung bei den Testen von BM und HY lag jeweils ca. 2% niedriger.

Die Intra-Assay Präzision wurde anhand von je 20 Messungen für drei Poolseren mit verschiedenen Konzentrationen ermittelt:

1. BW:  $x = 20,24 \mu\text{g/l}$ ; Std. Dev:  $0,58 \mu\text{g/l}$ ; CV: 2,85%  
 BM:  $x = 26,37 \mu\text{g/l}$ ; Std Dev:  $0,83 \mu\text{g/l}$ ; CV: 3,14%  
 HY:  $x = 24,11 \mu\text{g/l}$ ; Std Dev:  $2,00 \mu\text{g/l}$ ; CV: 8,28%  
 2. BW:  $x = 147,4 \mu\text{g/l}$ ; Std Dev:  $4,45 \mu\text{g/l}$ ; CV: 3,02%  
 BM:  $x = 146,10 \mu\text{g/l}$ ; Std Dev:  $3,54 \mu\text{g/l}$ ; CV: 2,42%  
 HY:  $x = 165,35 \mu\text{g/l}$ ; Std Dev:  $4,46 \mu\text{g/l}$ ; CV: 2,70%  
 3. BW:  $x = 388,20 \mu\text{g/l}$ ; Std Dev:  $6,12 \mu\text{g/l}$ ; CV: 1,58%  
 BM:  $x = 407,35 \mu\text{g/l}$ ; Std Dev:  $6,04 \mu\text{g/l}$ ; CV: 1,48%  
 HY:  $x = 456,50 \mu\text{g/l}$ ; Std Dev:  $21,4 \mu\text{g/l}$ ; CV: 4,92%

Die Inter-Assay Präzision wurde für den N-Latex-Ferritin-Test<sup>®</sup> mittels der packungsinternen Behring-Kontrollen Level 1 und 2 (jeweils n = 10) bestimmt:

Level 1:  $x = 19,11 \mu\text{g/l}$ ; Std Dev:  $0,44 \mu\text{g/l}$ ; CV: 2,32%  
 Level 2:  $x = 15,26 \mu\text{g/l}$ ; Std Dev:  $5,02 \mu\text{g/l}$ ; CV: 3 29%

Die Analysen dreier voneinander unabhängiger Verdünnungsreihen ergaben eine sehr gute Verdünnungslinearität für den BW Test.

Mit dem N-Latex-Ferritin-Test<sup>®</sup> steht ein in Handling Zuverlässigkeit und Inter- bzw. Intra-Assay-Präzision guter partikelverstärkter nephelometrischer Test zur Verfügung.

### 133 Evaluation of EQA surveys in therapeutic drug monitoring '93

P. Schneiderka, M. Hostlovská, L. Loub  
 Dept. Clin. Biochem., Charles Univ. Hospital, Praha and Inst. Pharm. Bioanal., Postgraduate Medical School, Praha, Czech Republic

As a part of national external quality assessment (EQA) scheme, two control surveys in therapeutic drug monitoring (TDM) were organized in 1993. Involvement in EQA scheme is voluntary until now. Control cycles '93 used commercially available, human serum based control materials, which were retested in 5 laboratories by means of immunochemical and chromatographical methods in order to obtain target values. Controls were focused on 6 anticonvulsants (phenobarbital, phenytoin, primidon, carbamazepin, ethosuximide, valproic acid) and two cardiac-antiasthmatic drugs (digoxin, theophyllin). Documentation is presented about the choice of control material. We describe the influence of constitution and kind of matrix upon method dependent values and discuss the practicability of the material for EQA. From the summary of EQA results we can conclude, that better accuracy and more narrow variance was achieved in the group of immunochemical methods, namely when using automation technique. Problems with use of various chromatographical methods and evaluation of their results in EQA are discussed.

### 134 Bestimmung von Aminosäuren zur Beurteilung der extrakorporalen Leberperfusion von Primaten

M.R. Schön<sup>1</sup>, W. Heiß<sup>1</sup>, H. P. Lemmens<sup>1</sup>, P. Neuhaus<sup>1</sup>, D.G. Padvaš<sup>2</sup>, Ch. Pöhlein<sup>3</sup>, C. Hammer<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Abteilung für Allgemeinchirurgie, Freie Universität Berlin, Klinikum Rudolf Virchow; <sup>2</sup>Zentrallabor Universität Witten-Herdecke, Klinikum Wuppertal-Barmen; <sup>3</sup>Abteilung für Experimentelle Chirurgie, L. Maximilians Universität München, Klinikum Großhadern

Bei Patienten im fulminanten Leberausfall (FHF) finden sich regelmäßig exzessiv veränderte Aminosäuren (AA) Konzentrationen im Plasma. Während der überwiegende Anteil der AA ansteigt (insbesondere die aromatischen AA), sind die verzweigtkettigen AA (BCAA) Valin, Isoleucin und Leucin erniedrigt. Eine Normalisierung der AA führt regelmäßig zu einer Besserung der Enzephalopathie. Während einer extrakorporalen Leberperfusion, wie sie zum Bridging von Patienten vor Lebertransplantation eingesetzt werden kann, mußte es deshalb zum Abfall der AAA und zu einem Anstieg der BCAA kommen. In der vorliegenden Studie haben wir AA Profile mit Hilfe einer Kationenaustauschchromatographie während extrakorporaler Leberperfusionen analysiert. Rhesus Affenlebern wurden mit humanem Blut perfundiert. Die durchschnittlichen AA Konzentrationen ( $\mu\text{mol/l}$ ) von sechs Versuchen sind in der Tabelle zusammengefaßt. Die Bestimmungen wurden vor Perfusion sowie nach 30 und 240 Minuten durchgeführt.

$\mu\text{mol/l}$	0 min	30 min	240 min
Threonin	25,8	21,2	9,6
Serin	17,5	35,7	13,9
Glutamat	36,5	82,7	118,6
Glutamin	43,1	105,0	96,4
Glycin	40,6	65,5	105,0
Alanin	94,3	67,0	28,7
Valin	30,8	73,0	141,0
Isoleucin	2,8	32,2	73,0
Leucin	25,8	77,8	167,0

$\mu\text{mol/l}$	0 min	30 min	240 min
Tyrosin	17,1	5,5	n.d.
Phenylalanin	6,1	19,2	31,2
Histidin	16,4	23,6	38,8
Lysin	39,2	30,9	53,2
Galle ml/100g	-	0,8	11,9
Hst mmol/l	2,8	4,1	6,9
LDH U/l/100 g	115	150	171
GOT U/l/100 g	8	22	27



Die Produktion von Galle und Harnstoff sowie die minimale Freisetzung der GOT, GPT und LDH belegen eine sehr physiologische Leberperfusion. Während der vierstündigen Leberperfusion kam es zu einem Anstieg aller BCAA und einer Metabolisierung des Tyrosins. Hieraus schließen wir auf eine gute Leberfunktion. Zusätzlich läßt die Normalisierung der AA Konzentrationen das beschriebene extrakorporale Perfusionsverfahren als geeignetes therapeutisches Mittel erscheinen, Patienten im hepatischen Coma vor einer Verschlechterung des Hirnödems zu bewahren.

### 135 Evaluation of surgical trauma by cell surface markers and cytokines

M. Schöndorf<sup>1</sup>, D. Decker<sup>2</sup>, A. Hirner<sup>2</sup>, F. Bidlingmaier<sup>1</sup>, A. von Ruecker<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Clin. Biochemistry; <sup>2</sup>Dept. of Surgery, Univ. of Bonn, Germany

The advantage of laparoscopic cholecystectomy over conventional open surgery in the treatment of symptomatic cholelithiasis has been shown by elaborate clinical studies. In order to facilitate comparisons of different surgical approaches, we evaluated the cell biological characteristics of tissue trauma in cholecystectomy by measuring changes of various cell surface markers and cytokines.

In a screening study, we examined 17 cell surface markers on different cell populations and cellular subsets in 18 laparoscopic and 15 open-surgery patients. Flow cytometry was used, employing commercially available fluorescent monoclonal antibodies and whole blood techniques. Also, the shedding of 3 cell surface markers and 6 cytokines in plasma were measured with the help of sandwich-ELISA kits. Blood samples were drawn 24 h before surgery, immediately before incision (after anaesthesia), 2 h, 24 h and 48 h after incision.

Six cell markers/cytokines that best distinguish laparoscopic procedures from conventional surgery were first determined by statistical analyses (multivariate regression analysis, Student's test, Wilcoxon-Mann-Whitney's rank sum test). These were 1. the interleukin-2 receptor and its soluble form (CD25/sCD25); 2. the activation antigen Ki-1 (CD30), a member of the nerve-growth-factor receptor family which may typify Th-2 helper cells; 3. the CD45RO epitope which characterizes T memory cells; 4. the transferrin receptor CD71; 5./6. the cytokines interleukin-6 and interleukin-8. On the basis of these results, a tissue trauma activation (TTA) index was created by combining 3 parameters (CD30/CD71/IL-6) that proved to characterize surgical procedures reliably and sufficiently.

In conclusion, our results demonstrate that changes in cell surface markers and cytokines can help evaluate the magnitude of tissue trauma in different surgical approaches.

### 136 Automatisierte molekulargenetische Diagnostik im Mikrotiterformat am Beispiel der HIV-Diagnostik – Perspektiven für die Transfusionsmedizin?

B. Schöttler, T. Heyduck\*, R. Zotz, H. T. Brüster

Institut für Blutgerinnung und Transfusionsmedizin der Medizinischen Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität, Moorenstraße 5, 40225 Düsseldorf

\*Fa. Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt

Molekulargenetische Untersuchungsverfahren zum direkten Nachweis proviraler HIV-DNA-Sequenzen sowie zum Nachweis von HIV-RNA können über eine weitere Einengung des diagnostischen Fensters zu einer Steigerung der Transfusionsicherheit beitragen. Aufgrund der in einer transfusionsmedizinischen Einrichtung anfal-

lenden täglichen hohen Probenzahl ist bei routinemäßigem Einsatz der DNA- bzw. RNA-Diagnostik eine Automatisierung von Vorteil. Unter Einsatz eines vollautomatischen DNA/RNA-Extraktors (Autogen 540, Fa. Zinsser Analytic) (3) und eines automatischen Pipettiersystems (APS, Fa. Zinsser Analytic) wurde ein System zur Automatisierung molekulargenetischer Diagnostik entwickelt und evaluiert. Die Bearbeitung der Proben erfolgt im Mikrotiterformat unter Einsatz des Gen-Eti-K HIV-1 SK19 Kit (Fa. Sorin Biomedica). Die Detektion wird nach reverser Festphasenhybridisierung denaturierter Amplifikate auf einer Oligonukleotid beschichteten Mikrotiterplatte über einen Peroxidase gekoppelten Antikörper gegen doppelsträngige DNA (anti dsDNA-Ak) durchgeführt (1, 2). Die Auswertung erfolgt photometrisch bei 450 nm/630 nm und schließt positive und negative Kontrollen sowie eine cut-off-Berechnung ein. Durch die Automatisierung wird eine Bearbeitung von bis zu 300 Proben täglich möglich. Der Gesamt-VC% des Systems wurde mit 16,6% bestimmt, wobei die PCR mit 10,3% den größten Anteil am Gesamt-VC% ausmacht. Bei Proben von bekannt HIV-1-Akseropositiven Patienten, die mit dem vorgestellten System untersucht wurden, verlief in allen Fällen (n = 52), auch bei p24Ag negativen Patienten, der Nachweis von proviraler HIV-1-DNA bzw. von HIV-1-RNA positiv. Sensitivitätsuntersuchungen ergaben einen positiven Nachweis von proviraler-HIV-1-DNA bis zur 10.000fachen Verdünnung. Die molekulargenetische Diagnostik ist insgesamt eine aufwendige aber spezifische und sensitive Methode, die mit Hilfe des hier vorgestellten Systems zur Automatisierung auch als routinemäßige Diagnostik bei hoher Probenzahl durchführbar ist.

#### Reference:

1. Mantero, G. (1991): Clin. Chem. 37, 3.
2. Schöttler, B.; Kuntz, B.M.E.; Brüster, H.T. (1993): Kongr. d. Dt. Ges. f. Immunogenetik, München.
3. Chomczynski, P. (1987): Anal. Biochem. 162, 156 - 159.

### 137 Molekulargenetische HLA-Typisierung im Mikrotiterformat mit reverser Festphasenhybridisierung Digoxigenin markierter Amplifikate

B. Schöttler, B.M.E. Kuntz

Gewebetypisierungslabor, Institut für Blutgerinnung und Transfusionsmedizin (Direktor: Professor Dr. H.T. Brüster), Medizinische Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität, Moorenstraße 5, 40225 Düsseldorf

Wir stellen eine Methode zur HLA-Typisierung auf DNA-Ebene vor, bei der die Analyse des genetischen Polymorphismus der Klasse II-Antigene durch Hybridisierung amplifizierter DNA auf Oligonukleotid beschichteten Mikrotiterplatten erfolgt.

5'biotinylierte sequenzspezifische Oligonukleotide (SSO) (2) werden primär auf einer Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte (MTP) fixiert. Aus EDTA-Blut isolierte genomische DNA wird zur Exon 2-spezifischen Amplifikation des DRB-Gens eingesetzt. In der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgt eine Digoxigeninmarkierung der Amplifikate mit Digoxigenin-11-2'-desoxy-uridin-5'triphosphat (Dig-11-dUTP). Das Amplifikat wird in Form einer Festphasenhybridisierung mit den auf der MTP gebundenen SSO's hybridisiert. Nach stringenter Waschen wird die Detektion mit Peroxidase (POD) gekoppelten anti-Dig-Antikörpern unter Verwendung von o-Phenylendiamin (OPD) als Substrat photometrisch bei 492 nm/650 nm durchgeführt.

Im Vergleich zu Cros et al. (1) wird ein zusätzliches Detektionsoligonukleotid bei dem hier vorgestellten HLA-DNA-Enzymimmunoassay (HLA-DEIA) nicht benötigt, und die Flüssigphasenhybridisierung, wie von Nevinny-Stickel et al. (3) beschrieben, wird durch die schnellere Festphasenhybridisierung ersetzt. Typisierungsergebnisse können jetzt 90 Minuten nach der Amplifikation erhalten werden. Weitere Vorteile sind insbesondere die Möglichkeit der

Vollautomatisierung bei Bearbeitung hoher Probenzahlen und andererseits die individuelle Einzeltypisierung durch Einsatz der reversen Hybridisierungstechnik sowie durch individuelle Auswahl der SSO's zur Fixierung auf der MTP. Zusätzlich ist, wie erste Ergebnisse zeigen, eine Lagerung der vorbereiteten SSO-beschichteten Platten möglich.

#### Literatur:

1. Cros, P., et al. (1992): Lancet 340, 870 - 873.
2. Giphart, M.J., et al. (1991): Eur. J. Immunogenetics 18, 57 - 68.
3. Neviny-Stickel, C. et al. (1993): Eur. J. Immunogenetics 20, 419 - 427.

## 138 Ein seltener Fall mit familiärer Hypobetalipoproteinämie

M. Schröder, S. Weidinger, W. P. Bieger  
Medizinisch Immunologische Laboratorien, Mittererstraße 3,  
80336 München

Die Diagnose von primären Fettstoffwechselstörungen kann in vielen Fällen durch biochemische und/oder molekulargenetische Untersuchungen gesichert werden. Eine wichtige Kenngröße ist dabei die Serumkonzentration von LDL. Bedeutsame zusätzliche Informationen ergeben sich oftmals aus der quantitativen und qualitativen Bestimmung von VLDL, HDL und Lp(a). Wir untersuchten die Familie eines 17jährigen Patienten, der klinisch durch Neuropathie und deutlich erniedrigte Cholesterin- und Triglyzeridwerte aufgefallen war. Bei den Eltern, dem Patienten und seinem jüngeren Bruder wurde eine Bestimmung der verschiedenen Lipoproteinfraktionen und Apolipoproteine durchgeführt. Es fiel auf, daß beim Patienten und seiner Mutter, die wahrscheinlich heterozygote Träger eines Apolipoprotein B (Apo B)-Defektes sind, Apo B100 in signifikant erniedrigten Konzentrationen vorlag (18.7 bzw. 31.8 mg/dl). Entsprechend der Bedeutung von Apolipoprotein B als elementarem Bestandteil von LDL und VLDL fanden sich beim Patienten und - weniger ausgeprägt - bei der Mutter, erniedrigte Cholesterin- (95 bzw. 131 mg/dl) und Triglyzeridwerte; (31 bzw. 35 mg/dl) sowie in der Cholesterinelektrophorese ein sehr niedriger LDL/HDL-Quotient (0.33 bzw. 0.73). Eine SDS-Gradientengel-Elektrophorese (8 - 18% PAG) ergab aus den durch Ultrazentrifugation gewonnenen LDL-Fractionen bei Patient und Mutter eine zusätzliche Bande, die mit dem bereits beschriebenen Apo B89 (I) identisch sein könnte. Die Unterschiede der bei Patient und Mutter gefundenen Werte lassen sich durch die Ergebnisse der ApoE-Genotypisierung erklären (Mutter und Bruder  $\xi$  3/3; Vater und Patient  $\epsilon$  2/3).

#### Literatur:

1. Parhofer, K.G.; Daugherty, A.; Kinoshata, M.; Schonfeld, G. (1990): J Lipid Res 31 2001 - 2007.

## 139 RT-PCR in CMV-Diagnostics in HIV seropositive patients

I. Schuller, K. Arasteh\*, M. L'age\*  
Klinikum Steglitz FU Berlin, \*Augusta Viktoria Hospital, Berlin

The clinical value of PCR on the DNA level in the diagnosis of active CMV disease has been controversial due to latency of the virus and to the fact that, even if CMV activity is being controlled by high specific immunoglobulin levels, a viral load can in some cases still be detected. The aim of this study was to assess the value of RT-PCR in diagnosing active CMV disease by directly detecting viral specific transcripts in PBL of HIV seropositive individuals. The complete PCR procedure (PCR and RT-PCR) was carried out as described (1). In 83 patients, 110 blood samples were collected and examined without

knowledge of the patients clinical status. Thirty nine patients were CMV positive on the genomic (PCR) and transcript level (RT-PCR). Only in 8 cases had CMV not been confirmed by another method. However in 6 cases the patients were in an absolute final stage and no other revealing diagnostic measures pursued (complete deterioration of the immune response). In 10 follow-up samples collected within weeks after initiating antiviral therapy, CMV-DNA could still be detected by PCR, while RT-PCR for CMV transcripts had become negative. Forty patients were CMV negative in both assays. In 30 cases no CMV disease was confirmed in other diagnostic assays. In 10 cases of confirmed CMV disease, patients were subjected to long-term anti-viral therapy and were as the above also CMV negative in other diagnostic assays. In four cases, a positive PCR result (CMV-DNA) and a negative RT-PCR result were seen in patients without confirmed CMV and without therapy. In contrast to earlier reports regarding PCR and CMV diagnostics in immunocompromised individuals, we definitely cannot detect a globally present viraemia independent of the clinical status of the patient. The sensitivity of the combined application of PCR and RT-PCR was 95% (37/39), and the specificity 91% (40/44) testifying a good correlation between CMV disease and positivity as well as between lack of CMV manifestation and negativity in both assays (PCR and RT-PCR). Further, whether CMV positive or negative on the genomic level, all patients responding to anti-viral therapy were negative in the RT-PCR assay. Besides employing RT-PCR to monitor drug response, our data showed that, even if only a minor suspicion of manifest CMV disease existed, a positive CMV RT-PCR was always verified by a positive CMV organ manifestation despite later detection. Finally, this method can be applied to a broad selection of specimens, even if only small amounts of material are available, and can be carried out within one and a half days.

## 140 Kontrolle der postpartalen Anti-D-Prophylaxe bei Rhesus-negativen Frauen mittels Röhrchentest, Säulenagglutination und Capture®

M. Sefertova, B. Haustein  
Institut für Transfusionsmedizin der Universität Leipzig

Eine der Möglichkeiten zur Kontrolle der Wirksamkeit der Rhesus-Prophylaxe ist der Nachweis von freiem Anti-D im Serum mit dem indirekten Antiglobulintest (IAT). Dieser Test kann mit verschiedenen Techniken durchgeführt werden, die unterschiedliche Sensitivität aufweisen.

In unseren Untersuchungen haben wir die Sensitivität von Röhrchentest, DiaMed-ID-System, ortho BioVue und Capture R/Immucor untersucht und verglichen. Im Röhrchentest wurde der IAT mit Albumin und Liss-Lösungen der Fa. Baxter, Fresenius und Immucor durchgeführt. Zusätzlich wurde im Röhrchentest ein Einstufen-Enzymtest mit Papain-Cystein-RL der Fa. Sifin durchgeführt.

Im Zeitraum von 6 Monaten wurden 58 Seren von Rh-negativen Frauen untersucht, denen 24 bis 48 Stunden vor der Probenentnahme die Standarddosis von 300 µg Anti-D-Immunglobulin Rhesogam appliziert worden war. 30 Seren wurden zu einem früheren Zeitpunkt gewonnen und vor der Untersuchung etwa 6 Monate bei -20° C aufbewahrt.

Von allen Seren wurden 2<sup>n</sup> Verdünnungsreihen mit isot. NaCl-Lösung bzw. AB-Seren hergestellt und die einzelnen Verdünnungsstufen im indirekten Antiglobulintest mit den angegebenen Methoden parallel untersucht. Um eine bessere Quantifizierung der Unterschiede zu erzielen, wurden den Agglutinationsstärken 4+, 3+, 1+ und 0 die Score-Werte 12, 10, 8, 5 und 0 zugeordnet und für jede Titrationsreihe der Gesamtscore berechnet.

Die durchschnittlichen Gesamtscore-Werte liegen bei den frisch untersuchten Seren bei 13,2 (Albumin), 18,1 (Liss-Lsg.), 20,2 (Enzym), 18,6 (BioVue), 20,5 (ID) und 48,5 (Capture R). Mit den eingefrorenen Seren wurden ähnliche Werte ermittelt: 16,3 (Albumin), 19,9

(Liss-Lsg.) 21,2 (Enzym), 24,7 (BioVue), 21,2 (ID) und 49,0 (Capture R). Für Capture<sup>®</sup> wurden auch signifikant höhere Titer nachgewiesen.

Bei der Titrierung von Rhesogam /200 µg/ml) in AB-Serum waren bis zu folgenden Titerstufen noch einfach positive Reaktionen nachweisbar: 32 x 10<sup>3</sup> für Albumin und Liss-Lösungen, 64 x 10<sup>3</sup> für Röhren-Enzym, BioVue sowie ID und 256 x 10<sup>3</sup> für Capture<sup>®</sup>.

Zur Kontrolle der Resus-Immunoprophylaxe im Antiglobulintest erwies sich der Capture<sup>®</sup> gegenüber dem Röhrentest und den Säulenagglutinationstests überlegen.

## 141 Secondary carnitine deficiency in children under complete, balanced liquid diet

H. Seim<sup>1</sup>, Th. Richter<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Clinical Chemistry and Pathobiochemistry; <sup>2</sup>Children's Hospital, University of Leipzig

L(-)-Carnitine is essential for the β-oxidation of long chain fatty acids in mitochondria. Whereas primary systemic carnitine deficiency is described rarely, systemic deficiencies linked to a variety of disorders are frequently found. Out of 612 patients of a children's hospital, 282 had a carnitine deficiency and 185 had carnitine insufficiency in addition (Winter, S. C. et al.: „Carnitine deficiency in paediatrics.“ In: Ferrari, R., DiMauro, S., Sherwood, G. (eds.) „L-Carnitine and its role in medicine: From function to therapy.“ Academic Press; London 1992).

Considering the incidence of carnitine deficiency in paediatric disorders the fractions of free, esterified, and total L(-)-carnitine were determined by radiochemically enzymatic method in serum and urine of 38 patients of a unit for metabolism and nutrition of a children's hospital.

The most drastic decrease in carnitine level was found in 5 children fed a so-called complete, balanced liquid diet by a gastric tube (free carnitine 9.9 ± 3.2 µmol/l; total carnitine 12.4 ± 5.2 µmol/l) and in a child with medium chain acylCoA dehydrogenase deficiency. The formula for tube feeding contained less than 2 µmol/l L(-)-carnitine, but human milk about 50-80 µmol/l in comparison. After application of 1 g L-carnitine/day the serum concentrations increased significantly into the normal range. The renal handling was not responsible for the carnitine deficiency in children fed a carnitine-free liquid diet. Under the restricted intake only 0.7 and 1.0 mg/day of free and total carnitine were excreted in urine.

As already recommended for total parenteral nutrition children under long term tube feeding should be checked for carnitine deficiency, and if confirmed, the diet should be supplemented by L-carnitine to ensure physiological state.

## 142 Molecular characterization of the duarte variant of galactose-1-phosphate uridylyltransferase (GALT)

M. Sommer, A. Braun, A. Roscher, T. Podskarbi, Y. S. Shin  
Univ.-Kinderklinik, Lindwurmstraße 4, München

Classical galactosemia (Mc Kusick 230400) which is caused by deficiency of GALT, is characterized by hepatomegalia, jaundice, cataracts and mental retardation with a frequency of 1 : 50,000 newborns. The GALT gene is described to be a compact gene with 11 exons spanning about 4 kb of genomic DNA. Numerous missense

mutations including the most common Q188R and several polymorphisms have been already identified. We present in this study the molecular characterization of the most common GALT polymorphism, replacement of asparagine-314 by aspartate in the Duarte variant (D). Biochemically D1 allele represents app. 105 - 115% of normal (N) GALT activity and D2, about 35%. The isoelectrofocusing pattern of D1 is, however, identical to those of D2.

Biochemical Allele	N314D	Q188R	R333W
Duarte	75/75	0/75	0/75
D1	5/5	0/5	0/5
D2	73/73	0/73	0/73
Galactosemia (G)	2/92	54/92	4/92
Normal (N)	0/52	0/52	0/52

The results shown here indicate that the D variant is encoded by the N314D polymorphism. The N314D testing is therefore useful for identification of the D allele in a population, since it is sometimes difficult to distinguish the variants from the carriers, such as D2-D2 from N-G or D1-G biochemically. This technique can also be applied to reevaluation of false positive samples and detection of D2-G without the renewed blood sampling.

## 143 Kohlenhydrat-defizientes Transferrin (CDT): Ein Marker zur Detektion des chronischen Alkoholabusus bei Trauma?

C. Spies<sup>1</sup>, C. Müller<sup>2</sup>, H. Rommelspacher<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Klinik für Anaesthesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Benjamin Franklin; <sup>2</sup>Abt. für Neuropsychopharmakologie, <sup>3</sup>Abt. für Klinische Chemie und Biochemie (DFG (HE 916/7-1), Universitätsklinikum Rudolf Virchow, Freie Universität Berlin

### Fragestellung

Jeder 2. traumatisierte Patient betreibt chronischen Alkoholmißbrauch (1). Die posttraumatische Morbidität dieser Patienten ist erhöht. Durch geeignete Prophylaxe können Komplikationen vermieden werden. Die diagnostischen Möglichkeiten auf einer Intensivstation beschränken sich auf Fremdanamnese und Laborparameter. Konventionelle Laborparameter sind oft nicht ausreichend sensitiv und spezifisch (2). Ziel der Untersuchung war, bei traumatisierten Patienten den Stellenwert von CDT als Marker des chronischen Alkoholabusus zu prüfen.

### Material, Methodik

105 traumatisierte Patienten wurden in die prospektive, von der Ethikkommission genehmigte Studie eingeschlossen. Alle Patienten wurden posttraumatisch auf die Intensivstation aufgenommen. Die Diagnostik umfaßte den CAGE (3), die konventionellen Laborparameter (MCV, GGT, GOT, GPT) und CDT, das mittels Mikroanionenaustausch-Chromatographie und Turbidimetrie (MAEC/TD) (4) und mittels kommerziellem Kit (CDTect<sup>®</sup>: MAEC/Radioimmunoassay(RIA)). Die Gruppeneinteilung erfolgte nach folgenden Kriterien: Patienten ohne chronischen Alkoholabusus (≤ 25g Alkohol/d, CAGE = 0; Kontrollgruppe) bzw. Patienten mit chronischem Alkoholabusus (≥ 60g Alkohol/d, CAGE ≥ 3). Der Volumenumsatz vor Abnahme des CDT wurde genau dokumentiert. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Wilcoxon-Rangsummentest.

### Ergebnisse

Der intensivstationäre Aufenthalt der alkoholkranken Patienten war im Mittel um 7 Tage verlängert, obwohl sich die Patienten nicht signifikant hinsichtlich des Alters, des TRISS-Score und des APACHE Score bei Aufnahme unterschieden.

	Sensitivität	Spezifität
CDT MAEC/TD mg/l	70 %	100 %
Transfusion < 2000 ml	83 %	100
CDTect <sup>®</sup> MAEC/RIA (U/l)	65 %	95 %
Transfusion < 2000 ml	74 %	95 %
Mittleres Corpusculäres Volumen	15 %	98 %
Gamma-Glutam I-Transferase	36 %	95 %
Glutamat-Oxalacetat-Transaminase	85 %	36 %
Glutamat-Pyruvat-Transaminase	63 %	62 %

Der positive prädiktive Wert war 100% für CDT (MAEC/TD) bzw. 94% für CDTect<sup>®</sup> (MAEC/RIA), der negative prädiktive Wert war 73% für CDT (MAEC/TD) bzw. 69% für CDTect<sup>®</sup> (MAEC/TD).

#### Schlussfolgerungen

CDT hat sich bei Berücksichtigung des initialen Volumenumsatzes in unserer Untersuchung als ein ausreichend sensitiver und hochgradig spezifischer Marker zur Detektion des chronischen Alkoholabusus erwiesen.

#### Literatur:

- Hervé et al. (1986): J Trauma. 26: 1123.
- Stibler et al. (1991): Clin Chem. 37: 2029 - 2037.
- Ewing (1984) JAMA 252: 1905.
- Müller et al. (1993): Europ. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 31: A42.

## 144 Immunological changes induced by growth hormone (hGH) supplementation

W. Springer, L. Sommer, D. Klingmüller, F. Bidlingmaier, A. von Ruecker  
Units for Immunology and Endocrinology, Dept. of Clin. Biochemistry, Univ. of Bonn, Germany

In a double-blind study, 10 patients (female/male 3 : 7; mean age 34.6 a, range 24 - 47 a) with hGH deficiency due to pituitary tumors (mainly adenomas) were treated with hGH (0.04 - 0.125 units/kg body weight/week; max. daily dose: 4 units) or a placebo for 6 months.

Immunological evaluations were carried out prior to hGH therapy, as well as 1, 3 and 6 months after therapy and included A) IgG, IgM, IgA in plasma, B) CD4<sup>+</sup>- and CD8<sup>+</sup>-T cells, CD19<sup>+</sup>-B cells and CD16<sup>+</sup> + CD56<sup>+</sup>-NK cells along with their surface markers CD25, HLA-DR; CD45RO, CD45RA, CD36, CD38 and B-7 C) IL-4, IL-6 and IFN- $\gamma$  cytokine patterns after cell stimulation in vitro.

Group studies show that patients with hGH supplementation tend to feel better (i. e. less complaints, more physical strength, more active) than their untreated counterparts and have less infections along with distinct increases in plasma somatomedin C. Flow-cytometric analysis of blood cells from hGH-treated patients revealed in comparison to placebo-treated patients

- a significant 32 - 287% increase in interleukin-2 receptors (CD25) on monocytes, B and T cells;
- 2-3fold higher levels of activated CD38<sup>+</sup>-B cells; increased amounts of HLA-DR on monocytes and a transient increase of HLA-DR on T cells;
- an increase in CD45RA<sup>+</sup> monocytes.

Also, an increase in IFN- $\gamma$  production of in vitro stimulated leukocytes from hGH-treated patients could be detected, suggesting an elevation in Th-1 cells.

These results suggest that hGH supplementation of hGH deficient patients has immunological consequences which may also be

important in other hGH deficient situations. Furthermore our results imply that hGH should not be used in patients with a imbalance of T-helper cells (Th 1 > Th2).

## 145 Spezifische Detection von bcr-abl Transkripten mittels DNA-Enzymimmunoassay

Gudrun Stamminger, Dorothea Przybilla  
Universitätsklinikum Charité, Institut für Pathologische und Klinische Biochemie

Zum Nachweis der bcr-abl Translokation t(9;22) als spezifischer Marker des Philadelphia-Chromosoms führen wir eine nested RT-PCR mit Nachweis im Ethidiumbromid-Gel durch. Hybridisation mit spezifischen Sonden dient zur Bestätigung des Befundes bzw. läßt eine halbquantitative Auswertung zu. Wir führen einen DNA-EIA auf Microtiterplatten durch, der auf Bindung eines anti-dsDNA-monoklonalen Antikörpers an das Hybrid biotinylierte Sonde/Amplifikat beruht. Die Detection erfolgt spectrophotometrisch nach Reaktion mit einem TMB-Derivat als Chromogen.

Der Assay wird mit einem externen Standard durchgeführt. Wir benutzen die Zelllinie K562 für das b3a2-Fragment bzw. eine Patienten-RNA für das b2a2-Transcript. Von den bisher untersuchten 129 Patienten konnte in 20 Fällen ein b2a2-Fragment und in 25 Fällen ein b3a2-Fragment detektiert werden.

Bei Durchführung des Tests unter laborintern standardisierten Bedingungen lassen sich insbesondere in der Verlaufskontrolle nach Knochenmarktransplantation Aussagen über die Dynamik der Grunderkrankung treffen, die genauer und zuverlässiger sind, als die RT-PCR allein.

Bei 84 Patienten bestätigte sich der negative Befund der PCR nach Inkubation mit beiden Sonden.

## 146 Fecal elastase-1 in pancreatic insufficiency: correlation with the secretin-pancreozymin test

J. Stein, M. Jung, S. Zeuzem, B. Lembcke, W.F. Caspary  
Div. of Gastroenterology, 2nd Dept. of Internal Medicine, University of Frankfurt, Germany

#### Background/Aims

Aim of this study was to evaluate the potential and precision of the fecal elastase (IRE) test in comparison to the secretin-pancreozymin-test in the diagnosis of exocrine pancreatic insufficiency.

#### Methods

We studied 313 stool samples from 149 individuals both without malabsorption and with various types and degrees of nonpancreatic and pancreatic maldigestion syndromes. Pancreatic elastase was measured immunologically, using a new enzyme immunoassay following the sandwich technique.

#### Results

Spot stool immuno-reactive elastase activity in controls ranged from 136 to 4440  $\mu\text{g/g}$ . Ninety five percent of all values were within 175  $\mu\text{g/g}$  to 1500  $\mu\text{g/g}$ . The lower limit of normal was defined as 150  $\mu\text{g/g}$ . No significant decrease of immunoreactivity was found when stool samples were stored at room temperature over one week. The assay variability calculated from 10 consecutive assays of a single fecal sample gave coefficients of variation ranging from 3.3 to 6.3% for intraassay-variability and from 4.1 to 10.2% for interassay-variability. There was a good correlation between the output of elastase

compared to amylase, lipase, and trypsin with correlations coefficients of 0.825; 0.821 and 0.844 in controls (n = 34), respectively and 0.857; 0.905; 0.906 in patients with impaired pancreatic function (n = 22), respectively. In stool samples of 47 patients with exocrine pancreatic insufficiency (cystic fibrosis, n = 25; positive SPT, n = 22) the concentration of IRE was significantly lower (p < 0.001) compared to controls (n = 53), two patients with celiac disease (n = 12), with inflammatory bowel disease (n = 19), and two patients with diarrhea of miscellaneous or unknown origin (n = 33). In contrast to fetal chymotrypsin, the test results were unaffected by pancreatic enzyme replacement therapy.

#### Conclusion

These results indicate that fecal immunoreactive elastase may be recommended as a new, noninvasive easy-to-perform tubeless pancreatic function test with a high (sensitivity and specificity).

## 147 Aktivierung von Blutgerinnung und Fibrinolyse während und nach extrakorporaler Zirkulation

B. Steinbrückner<sup>1</sup>, F. Keller<sup>1</sup>, U. Buttke<sup>1</sup>, K. Neukam<sup>2</sup>, O. Elert<sup>2</sup>, J. Babin-Ebell<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zentrallabor der Medizinischen Universitätsklinik Josef Schneider-Straße 2, 97080 Würzburg; <sup>2</sup>Universitätsklinik für Herz- und Thoraxchirurgie Josef Schneider-Straße 6, 97080 Würzburg

Gerinnungsstörungen zählen zu den häufigsten Komplikationen bei operativen Eingriffen unter Verwendung eines kardiopulmonalen Bypasses. Als ursächlich wird dabei vor allem die Kontaktaktivierung von Gerinnung und Fibrinolyse durch Fremdoberflächen angesehen. Zur Untersuchung dieser hämostaseologischen Veränderungen während und nach extrakorporaler Zirkulation wurde vorliegende prospektive Studie durchgeführt.

Eingeschlossen wurden 33 Patienten, bei denen im Rahmen eines kardiochirurgischen Eingriffs der Einsatz einer extrakorporalen Zirkulation erforderlich war. Blutabnahmezeitpunkte waren präoperativ, zu Beginn und alle 20 min während des Bypasses, unmittelbar nach Protamingabe sowie, 20, 44 und 68 Stunden postoperativ. Prothrombinfragment (F1+2) und Thrombin-Antithrombinkomplex (TAT) waren von Beginn des Bypasses an erhöht und stiegen mit zunehmender Bypassdauer weiter an. Die Veränderung von TAT war dabei, möglicherweise in Folge der massiven Heparinisierung, stärker ausgeprägt. Plasmin-Antiplasmin Komplex als Maß für die fibrinolytische Aktivität war nach 40 min erhöht und stieg im weiteren nicht mehr wesentlich an. Postoperativ fielen die Parameter innerhalb von 20 Stunden deutlich ab, um 68 Stunden nach Bypassende erneut anzusteigen. Zu diesem Zeitpunkt konnten auch D-Dimere erstmals während des Beobachtungszeitraumes vermehrt nachgewiesen werden.

Diese Daten zeigen, daß es bei extrakorporalem Kreislauf trotz hochdosierter Heparin-gabe zu einer massiven Gerinnungsaktivierung kommt. Die Fibrinolyse kann dabei nicht primär als Funktion der Thrombinentstehung aufgefaßt werden.

## 148 Nachweis und Differenzierung von humanen Papillomviren der Typen 6, 11, 16, 18 und 33 in Portio- und Cervixabstrichen von Dysplasiepatientinnen

Marina Steinke<sup>1</sup>, Ursula Geissler<sup>2</sup>, S. Bergander<sup>2</sup>, S. Gehrlich<sup>1</sup>, W. Jaross<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin; <sup>2</sup>Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Universitätsklinikum Carl Gustav Carus der TU Dresden

Humane Papillomviren (HPV) befallen Haut und Schleimhäute und induzieren Warzen, Kondylome und intraepitheliale Neoplasien. Die Typen HPV 16, 18 und 33 zeichnen sich durch häufiges Auftreten in anogenitalen Karzinomen aus.

Wir untersuchten 60 Portio- und Cervixabstriche von Patientinnen der Dysplasiesprechstunde nach DNA-Schnellisolierung mittels eines nichtionischen Detergenzienpuffers und Proteinase K mit PCR sowohl mit den Konsensusprimern MY09 und MY11(1) als auch mit typenspezifischen HPV-Primern für HPV 6, 11, 16, 18 und 33 (2). Außerdem wurde von jeder Patientin ein Histogramm durch interaktive Zellanalyse (Methode: CYDOK, Zytophotometer der Firma Hilgers) erstellt.

Von 60 Patientinnen zeigten 21 im Histogramm einen aneuploiden Befund. Davon waren 17 Patientinnen mit Konsensus-Primern HPV positiv (81%). 76% der HPV-positiven Patientinnen waren mit HPV 16 infiziert, 18% mit HPV33, 12% mit HPV 18,6% mit HPV11 (3 Doppelinfektionen). In 5 Fällen wurde bei euploidem Histogramm eine HPV16-Infektion nachgewiesen.

64% der in der PCR HPV 11, 16, 18 oder 33 positiven Patientinnen waren im Histogramm aneuploid. Die Befunde der HPV-Bestimmung unterstützen die Befundung in der Gynäkologie.

1. Manos, M. M., et al. (1990) *Cancer Cells* 7: 209 - 214.

2. Van den Brule, A., et al. (1990) *J. Clin. Microbiol.* 28: 2739 - 2743.

## 149 Study of the human cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) promoter in transgenic mice

Uta Griesenbach, Ting-Chung Suen, J. Chamberlain, K. Olek, Lap-Chee Tsui

Research Institute, the Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, Canada and Institut für Klinische Biochemie, Bonn, Germany

Expression of CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator) is developmentally and tissue-specifically regulated. Previous DNA transfection studies in our laboratory showed that the human CFTR promoter contained at least 2 positive and one negative regulatory element. Weak basal promoter activity was demonstrated with a 300 bp fragment upstream of the transcription initiation sites. Our recent data also indicated that the general transcription factor SP-1 could interact directly and indirectly with various regions of the minimal promoter region. To determine the relevance of these sequences in-vivo we have generated transgenic mice with different putative promoter fragments in front of a lacZ reporter gene. These fragments include 0.3, 0.8, 3.8 and 19 kb of the 5' region of the CFTR gene, respectively. Multiple transgenic lines have been established for each of these constructs and examined for lacZ expression in cryostat sections. No appreciable lacZ activity could be detected in any of the tissues normally expected to show CFTR expression. More sensitive RT-PCR experiments and in situ hybridization are currently being performed to detect possible low level expression of the transgenes. In an attempt to enhance expression of these promoter fragments, the MAR sequence from the chicken lysozyme gene was coinjected with the 3.8 kb construct and, a GC box from the

SV 40 regulatory region with the 0.3 kb construct. Multiple transgenic lines have been established and the results of these latter studies will be described.

## 150 Eine Kandidat-Referenzmethode zur Bestimmung von Valproinsäure im Serum mittels Isotopenverdünnung Massenspektrometrie (IDMS)

*F. Susanto, N. Niederau, H. Reinauer  
Abteilung für Klinische Biochemie des Diabetesforschungsinstitutes  
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf,  
Auf dem Hennekamp 65, 40225 Düsseldorf*

Ziel dieser Referenzmethode ist die Bestimmung von Valproinsäurekonzentrationen in biologischen Proben mit hoher Richtigkeit und gemäß den Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien eine Methode zu beschreiben, die für die Referenzwertermittlung geeignet ist. Die Bestimmung von Valproinsäure in menschlichem Serum basiert auf dem Prinzip der massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsanalyse.

Die Aufarbeitung der Proben erfolgte nach Zugabe von internen Standard über Proteinfällung mittels Perchlorsäure und einer Extraktion mit n-Hexan.

Als interner Standard diente  $d_3$ -isotopenmarkierte Valproinsäure (2-(Propyl 3,3,3- $d_3$ )pentan(5,5,5- $d_3$ )säure).

Die Fragmentionen m/z 102 von Valproinsäure und m/z 105 des  $d_3$ -markierten Standards werden für die Quantifizierung mittels Multiple Ion Detektor des Massenspektrometers verwendet. Aus dem Verhältnis der Peakflächen, der nicht markierten und der isotopmarkierten Valproinsäure und aus der bekannten Menge an markierter Standardsubstanz, die zu Beginn der Analyse zugegeben wurde, wird die Konzentration an Valproinsäure in der Probe berechnet.

Die Präzision der IDMS-Methode, ermittelt aus Mehrfachanalysen, zeigte im Konzentrationsbereich von 25–500 mg/l einen Variationskoeffizienten  $V_k < 1.5\%$ .

Unter Verwendung der hier beschriebenen Referenzmethode wurde in zurückliegenden Ringversuchsproben Valproinsäure bestimmt und die Ergebnisse der Referenzlaboratorien mit den massenspektrometrischen Resultaten verglichen.

## 151 Einfache quantitative HPLC-Bestimmung von Lamotrigin im Serum

*F. Susanto, S. Humfeld, H. Reinauer  
Abteilung für Klinische Biochemie des Diabetes-Forschungsinstitutes  
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf,  
Auf'm Hennekamp 65, 40225 Düsseldorf*

Lamotrigin (3,5-Diamino-6-[2,3-dichlorphenyl]-1,2,4-triazin) findet als ein neues Triazin Antiepileptikum in der letzten Zeit eine zunehmende Verwendung.

Es wird ein isokratisches hochleistungsflüssigkeitschromatographisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Lamotrigin in Serum unter Verwendung von Pyrimethamin (5-[4-Chlorphenyl]-6-ethyl-2,4-pyrimidindiamin) als interner Standard beschrieben. Die Aufarbeitung dieses hydrophilen Antiepileptikums erfolgt über Proteinfällung mittels Acetonitril ohne Vorbehandlung des Serums. Der Vorteil dieser Aufarbeitungsmethode liegt darin, daß der abgetrennte Gesamtüberstand zum direkten Einspritzen in das HPLC-System, ohne einen weiteren Reinigungsschritt, geeignet ist.

Zur HPLC-Analyse und Quantifizierung wird eine Reversed-Phase Säule NC 18 und ein UV-Detektor verwendet.

Die mobile Phase besteht aus 0.05%  $H_3PO_4$ /Acetonitril (70/30; v/v) und die Detektion erfolgt bei 270 nm.

Für die Untersuchung der Präzision und Wiederfindung dienten aufgestockte, medikamentfreie Seren im Konzentrationsbereich von 0.05–10.0  $\mu\text{g/ml}$ . In diesem Konzentrationsbereich ergaben die Meßwerte eine Regressionsgerade ( $r = 0.989$ ) und stimmten somit mit den erwarteten Serumspiegeln überein. Es ergab sich ein durchschnittlicher Variationskoeffizient von 3.2% für die Serumanalyse. Bei der Überprüfung der Präzision von Tag zu Tag lagen die V<sub>k</sub>-Werte bei 4.8%.

Die Nachweisgrenze betrug 0.05  $\mu\text{g/ml}$  Serum, die Wiederfindungsrate lag im Durchschnitt bei 96.9%.

## 152 Die fäkale Pankreaselastase 1, ein neuer, verlässlicher Parameter zur Überprüfung der exokrinen Pankreasfunktion in der Pädiatrie unter besonderer Berücksichtigung von Mukoviszidose-Patienten

*H.G. Terbrack, G. Hüls, K.H. Gürtler, P. Bittner, H. Lindemann  
Univ.-Kinderklinik, Feulgenstraße 12, 35385 Gießen*

### Einleitung

Ein einfacher Test zur Kontrolle der exokrinen Pankreasfunktion stellt die Bestimmung der pankreas-spezifischen Elastase 1 (E1) im Stuhl dar. Wir überprüften die Validität des Testes unter besonderer Berücksichtigung des ersten Lebensjahres und definierten Normalwerte für das Kindesalter.

### Methode

Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe eines Enzymimmunoassay, der auf der Verwendung von 2 monoklonalen Antikörpern basiert, die spezifisch für die pankreatische Elastase 1 sind (ELISA: ScheBo Tech GmbH). Stuhlproben von 220 Patienten mit normaler Pankreasfunktion im Alter von 1 Lebenstag bis 13 1/2 Jahren wurden untersucht. Weiterhin wurden 51 Patienten mit gesicherter Mukoviszidose im Alter zwischen 12 Monaten und 31 Jahren untersucht.

### Ergebnisse

Der Meßbereich für die Pankreas-Elastase E1 im Mekonium lag im Bereich von 15 bis 195  $\mu\text{g/g}$  Mekonium. Bereits im ersten Lebensmonat konnten bei keinem Kind E1-Werte unter 200  $\mu\text{g/g}$  Stuhl gefunden werden. Vom 3. Lebensmonat an lagen 78% der E1-Werte > 500  $\mu\text{g/g}$  Stuhl. Bei 44 von 51 Patienten mit Mukoviszidose waren die E1-Werte (unter Enzymsubstitution) im Stuhl hochpathologisch mit < 15  $\mu\text{g E1/g}$  Stuhl. Bei 5 Mukoviszidose Patienten mit normaler Pankreasfunktion lagen die E1-Werte > 390  $\mu\text{g E1/g}$  Stuhl.

### Schlußfolgerung

Die Studien zeigen, daß bereits im ersten Lebensmonat die fäkale Pankreaselastase sich als ein neuer verlässlicher Parameter zur Überprüfung der exokrinen Pankreasfunktion darstellt (Spezifität 100%). Bei 92,2% der Mukoviszidose-Patienten ( $n = 51$ ) lagen die Werte auch unter Substitution unter 15  $\mu\text{g/g}$  Stuhl. Von einer regulären Organfunktion des Pankreas ist bei Elastase 1-Werten von > 200  $\mu\text{g E1/g}$  Stuhl auszugehen.

## 153 Lymphozytensubpopulationen während der Zytostatika-Therapie von Kindern mit akuter lymphoblastischer Leukämie

H. Thulin<sup>1</sup>, N. Pargac<sup>2</sup>, Elke Siegert<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut für Klin. Chemie und Laboratoriumsmedizin und <sup>2</sup>Kinderklinik Univ.-Klinikum der TU Dresden

Ziel der Studie war es, die Zytostatika-bedingte Immundepression bei Kindern mit akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) durch wiederholte Untersuchungen der Lymphozytensubpopulationen während der Therapie besser zu erkennen.

Von 7 Kindern mit ALL, die nach dem Protokoll der COALL-Studien-gruppe (Prof. Dr. Janka, Univ.-Kinderklinik Hamburg) chemotherapeutisch behandelt wurden, untersuchten wir an bestimmten Therapietagen im peripheren Blut die folgenden Oberflächenantigene der Lymphozyten mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern am Flow-Zytometer: T-Zellen: CD 3, 4, 5, 8, B-Zellen: CD 19, 23, 10, NK-Zellen: CD 16, 56 sowie HLA-DR und IL2-Rezeptor (CD 25). Als Bezugswert wählten wir den Tag 28, an dem die Induktionstherapie beendet war und eine komplette Remission vorlag. Danach erfolgten Kontrollen während der Intensivtherapie am 56., 92. und 120. Behandlungstag und am 1. Tag der Reinduktionstherapie.

Bei alle zur Verminderung der Leukozytenzahlen, vorwiegend auf Kosten der neutrophilen Granulozyten und der Monozyten. Bei den Lymphozyten sinken die B-Zellen immer ab, oft bis auf 0, die T-Zellen dagegen steigen in einigen Fällen an. Bei den meisten Patienten sinkt der Anteil der NK-Zellen. Wenn es zur relativen Lymphozytose kommt, ist diese immer durch eine T-Zellzunahme bedingt.

Als Risikoparameter unter der Zytostatika-Therapie sollte neben der Neutrophilen-, der Monozyten- und der Lymphozytenzählung auch die Menge der B-Lymphozyten bestimmt werden.

### Literatur:

Komada, Y., et al. (1992): Cellular immunosuppression in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer-Immunology-Immunother.* 35, 271 - 276.

## 154 Serologische Wertigkeit kationischer lysosomaler Proteine aus Eosinophilen und Neutrophilen bei reaktiv-entzündlichen, proliferativen und parasitären Erkrankungen

F. W. Tischendorf, M. Lintzel, N. W. Brattig, A. Pieper, D. W. Büttner  
Abt. f. Klinische Chemie: (Leiter. Priv.-Doz. Dr. F. W. Tischendorf) und  
Abt. f. Helminthologie (Wiss. Dir., Prof. Dr. D. W. Büttner), Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg

Eosinophile und neutrophile Granulozyten sind Effektorzellen der Wirtsabwehr gegen eindringende Erreger. Den kationischen Granulaproteinen ist dabei wegen ihrer Helminthotoxizität bzw. Bakterizidie eine besondere Rolle zuzuschreiben. Die Serumspiegel der kationischen Granulaproteine haben differentialdiagnostische und prognostische Wertigkeit. Bestimmt wurden Myeloperoxidase, Lysozym, CLA, ECP und EPX. Die Befunde zeigen, daß Myeloperoxidase- und Lysozym-Marker neutrophiler Reaktionen und myeloischer Proliferationen (Leukämien) darstellen, CLA und EPX Marker sowohl eosinophiler als auch neutrophiler Reaktionen sind und ECP allein bei Fällen mit Eosinophilenerhöhung vorkommt. Untersucht wurden eine größere Zahl von Patienten mit Protozoen-Erkrankungen (Malaria, Leishmaniasis, Amoebiasis), Helminthiasen (Bilharziose, Onchozerkose, Lymphatische Filariasis) und reaktiven Neutrophilien unterschiedlicher Genese. Die Befunde wurden mit den bei lymphatischen und myeloischen Leukämien erhobenen

verglichen. Bei der Onchozerkose konnten zwei prognostisch unterschiedliche polare Gruppen mit Hilfe der ECP-Bestimmung charakterisiert werden.

## 155 Erfahrungen zur Einpunktquantifizierung mit dem Enzymimmunoassay bei der Serodiagnostik und Überwachung von Masern Mumps, Röteln

A. Tischer

Robert Koch-Institut, Berlin

Bei der Einpunktquantifizierung mit dem Enzymimmunoassay ( $\alpha$ -Methode,  $\alpha$ -EIA) wird die bei einer Serumverdünnung von 1 : 231 gemessene Extinktion in eine einfache Exponentialformel eingesetzt und so ein Titer bzw. IU/ml berechnet (1).

Zur Untersuchung der Serumpaare von 320 Schulkindern und jungen Erwachsenen, die vor und  $\geq$  4 Wochen nach Impfung gegen Masern, Mumps, Röteln (MMR-SI) entnommen waren und der Serumpaare von 52 Patienten mit Verdacht auf Masern bzw. Mumps bzw. Röteln setzten wir den  $\alpha$ -EIA und folgende konventionelle Techniken ein: Hämagglutinationshemmtest (HHT), Hämolysis-in-Gel-Test (HIG) und Plaque-Neutralisations-Test (PNT). Beurteilt wurden die Sensitivität, Spezifität, Korrelation der Antikörper und die Titerbewegung im Serumpaare. Alle durch den  $\alpha$ -EIA als positiv/grenzwertig ausgewiesenen Ergebnisse konnten mit dem PNT bestätigt werden, wobei der  $\alpha$ -EIA, als auch der HHT und HIG die Sensitivität des PNT nicht erreichen.

Die Reproduzierbarkeit des  $\alpha$ -EIA ist sehr gut. Titeranstiege in den Serumpaaren Geimpfter als auch Erkrankter lassen sich daher mit dem  $\alpha$ -EIA eher erkennen als mit konventionellen Techniken. Die Korrelation zwischen den quantitativen Werten der verglichenen Methoden ist positiv mit  $r = 0.6$ . Das ist nicht ausreichend, um von einem mit den klassischen Techniken ermittelten Titer auf einen  $\alpha$ -Titer schließen zu können. Die Bewertung einzelner  $\alpha$ -Titer wird anhand der Ergebnisse zur Boosterfähigkeit seropositiver Impflinge versucht. Wegen der guten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und des Bezugs auf internationale Einheiten liefert der  $\alpha$ -EIA einen Beitrag zur Standardisierung in der Serodiagnostik.

1. Dopatka et al. (1992) *J. Clin. Lab. Analysis* 6: 417 - 422.

## 156 Untersuchung der $\beta_2$ -Rezeptordichte und der beta-2-adrenergen mRNA ( $\beta$ ADRmRNA) in humanen mononukleären Leukozyten (MNL)

Viola Tittelbach, D. Ratge, Jeanette Giray, V. Dangel, H. Wisser  
Abteilung für Klin. Chemie, Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart, Deutschland

Humane MNL sind leicht zugängliche Zellen, welche  $\beta_2$ -Rezeptoren exprimieren. In der Zellkultur wurde gezeigt, daß Veränderungen in der Expression der  $\beta$ ADR auch zu Veränderungen in der steady-state-Menge an  $\beta$ ADRmRNA z. B. nach Stimulation mit  $\beta_2$ -Agonisten (Haddock, J. R., 1989) führen. Es sollte geklärt werden, ob diese Wechselwirkung auch in MNL nachweisbar ist. MNL sind als Modell für weniger zugängliches Gewebe zum Studium des  $\beta$ -Rezeptorstatus in Abhängigkeit von Alter und zahlreichen Erkrankungen geeignet (Basso, A. et al., 1992).

Die MNL wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation mit einer Ausbeute von 45 - 48% isoliert. Die  $\beta_2$ -Gesamt-rezeptordichtebestimmungen erfolgten mittels radioaktiv markiertem <sup>125</sup>I-iodo-



cyanopindolol. Der unspezifische Anteil der Gesamtbindung wurde mittels 1-Propranolol ( $10^{-6}$  M) bestimmt. Die Zahl der Oberflächenrezeptoren konnte durch Zugabe des hydrophilen Liganden CGP-12177 bestimmt werden. Mittels Scatchard-Auswertung konnten im Durchschnitt 2310  $\pm$  70 Oberflächen- und 2410  $\pm$  310 Gesamt-rezeptoren pro Zelle ( $n = 5$ ,  $K_D = 157$  pmol/l) errechnet werden. Durch Inkubation der MNL bis zu 48 Stunden in DMEM und 10% FCS und Stimulation mit Isoproterenol ( $10^{-6}$  M) konnte gezeigt werden, daß die Oberflächenrezeptordichte nach 24 Stunden auf 11% und die Gesamtrezeptordichte auf 1% des Basalwertes sank. Im Kontroll-experiment betrug die Oberflächenrezeptordichte 61%, die Gesamtrezeptordichte 70% des Ausgangswertes.

Aufgrund der sehr geringen Menge an  $\beta_2$ ADRMRNA wurde zu deren Quantifizierung die PCR-Methode angewandt. Zur Kontrolle der „tube-to-tube-variability“ wurde ein interner Standard (IS) wie folgt hergestellt: In das pGEM-4Z-Plasmid wurden die Primeranlagerungssequenzen von  $\beta_2$  und dazwischen ein 338 bp-Fragment des pBR328-Plasmids eingebaut. Durch in vitro Transkription konnte die RNA dieses Inserts erhalten werden, welche dann als Kompletor (479 bp) der nativen  $\beta_2$ -RNA (396 bp) in der RT-PCR diente. Der Nachweis der analogen Effizienz beider RT-PCR-Amplifikate konnte geführt werden. Aus  $10^7$  MNL wurden im Mittel 13  $\mu$ g Gesamt-RNA erhalten. Mittels quantitativer RT-PCR-Titration, bei der Target-RNA und IS bereits in der RT zugesetzt wurden, konnten pro  $\mu$ g Gesamt-RNA  $3 \times 10^8$  Moleküle bzw. 0,5 fmoI  $\beta_2$ ADRMNA bestimmt werden. Die Kinetik der Änderung von  $\beta_2$ ADRMNA nach Stimulation mit Isoproterenol wird vorgestellt.

Basso, A.; Rossolini, G.; Viticchi, C.; Zaia, A.; Piantanelli, L. (1992): The Human Lymphocyte as a Model of  $\beta$ -Adrenoceptor Regulation in Aging and Disease. Arch. Gerontol. Geriatr. suppl.3,37 - 46.

Hadcock, J.R.; Wang, H.; Malbon, C.C. (1989): Agonist-induced Destabilization of  $\beta$ -Adrenergic Receptor mRNA. J. Biol. Chem., 264, No.33: 19928 - 19933.

## 157 Ansätze zur Standardisierung der Lipoproteinlipase-Aktivitätsbestimmung

S. Turwitt, O. Selberg, E. Henkel  
Abteilung Klinische Chemie II, Medizinische Hochschule Hannover, Pasteurallee 5, 30655 Hannover

Referenzbereiche für die Lipoproteinlipase (LPL)-Aktivität im Postheparinplasma variieren je nach Labor um den Faktor 10, Unterschiede für die Aktivität der Lipoproteinlipase im Fettgewebe um den Faktor 15 – 20 (Taskinen, M. R., 1987. In: Lipoprotein Lipase; Eds: J. Borenstajin, S. 201, Evener, Chicago). Ziel der Studie war die Identifizierung kritischer und unkritischer Reaktionsbedingungen und damit die Optimierung und Standardisierung der LPL-Aktivitätsbestimmung. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die Standardisierung der Substratemulsion erfordert den Einsatz käuflicher, gut charakterisierter Fettemulsionen von gleichbleibender Zusammensetzung (z. B. Lipofundin LCT, B. Braun Melsungen). Die Standardisierung auf Grundlage selbst hergestellter Emulsionen auf Glycerinbasis ergibt keine Vorteile (Präzision, Ausbeute).
2. Für die Proben reicht die Extraktion nach Belfrage und Vaughan (ca. 80%) aus [P. Belfrage and M. Vaughan, J. Lip. Res. 1969, 10: 341 – 344]. Der Einsatz der Dole-Extraktion ergibt zwar eine geringgradig höhere Ausbeute (ca. 85%), ist jedoch mit einem deutlich höheren Arbeitseinsatz und einem hohen Materialverbrauch verbunden [V.P. Dole, J. Clin. Invest 1956, 35: 150 - 154]. Die Präzision der Messung wird nicht verbessert.
3. Es sollte bei 37° C gemessen werden. Die Inkubationstemperatur hat keinen signifikanten Einfluß auf die Enzymstabilität. Auch bei 25° C ist ein signifikanter Abfall der Enzymaktivität – unabhängig von der Enzym- und Substratkonzentration – bereits nach 60 minütiger Inkubation um ca. 20% zu messen.
4. Die Salzkonzentration in der Substratemulsion sollte bei 0.2 M NaCl liegen. Die LPL zeigt hier ihre maximale Aktivität.
5. Als Szintillator kommen neuere Lösungen wie Aquasafe 300 (Zinsser Analytik, Frankfurt, Germany) in Betracht. Zwar liefert Aquasol (DuPont, Bad

Homburg) bessere Zählausbeuten, es verursacht aber im Gegensatz zu Aquasafe 300 eine stärkere Geruchsbelästigung und ist schwieriger zu entsorgen. 6.) Messungen sollten immer im Triplikat erfolgen, um Ausreißer zu erfassen.

Die vorgestellte Methode eignet sich für die direkte Messung der LPL-Aktivität. Die Messung der hepatischen Triglyzeridlipase (HTGL) muß separat unter anderen – optimalen – Bedingungen erfolgen. Unter den genannten Bedingungen beträgt der Anteil der HTGL an der Gesamtaktivität ca. 35% (ermittelt durch Salzhemmung).

## 158 The role of IGF-binding-proteins and urinary hydroxypyridinium crosslinks in monitoring of bone resorption in patients with kidney transplantation

J. van Helden Th. Itel, H. Greiling  
Institut f. Klinische Chemie u. Pathobiochemie, Medizinische Klinik II, RWTH Aachen, Pauwelsstraße 30, 52057 Aachen

The insulin-like growth factors (IGF-I and IGF-II) form a family of peptides, involved in the regulation of cell growth. The actions of the IGF's are mediated by binding to a family of receptors, the insulin-like growth factor-binding proteins. At least six binding proteins have been characterized at this moment, called IGFBP-1 to IGFBP-6. In human blood IGFBP-3 was found to be the predominating binding protein. IGFBP-1 and -3 are known to be elevated in the serum of patients with chronic renal insufficiency. Another marker of increased bone resorption in these patients is the measurement of urinary excretion of pyridinoline and deoxypyridinoline crosslinks. In our study, we investigated the influence of the plasma levels of IGFBP-1 and -3 and the crosslinks excretion on the follow up of patients with kidney transplantations to get additional informations of the bone metabolism. We could demonstrate a good correlation between these parameters and the transplantate function measured by the creatinine clearance. Especially the plasma levels of parathormone and  $1,25-(OH)_2D_3$  show direct correlations to the concentration of IGFBP-1 and -3, which is in good agreement with other studies that report these two substances to induce the IGF-BP production in osteoblasts and the storage of IGF's in the bone matrix. Inverse correlation was observed for endogenous cortisol- and ACTH- secretion. No significant correlation was found with osteocalcin and the steroid hormones estradiol, progesterone, and testosterone, thus these substances are known to induce the mRNA expression of some IGF-BP's. The presented study shows that the IGF-BP's and the pyridinoline crosslinks are suitable parameters in the follow up of kidney transplantation and may provide the earlier diagnosis of complications like renal osteopathia or secondary hyperparathyroidism.

## 158a Cyclosporin a induced lymphoma in heart and lung transplant recipients

M. Vogl\*, A. Griesmacher\*\*, W. Klepetko\*\*, M.M. Müller\*  
\*Institute of Laboratory Diagnostics, Kaiser-Franz-Josef Hospital, Vienna; \*\*Department of Cardiothoracic Surgery, University of Vienna, Austria

Introduction: During recent years, thoracic organ transplantation has become an increasingly therapeutic modality for patients with end stage heart or lung diseases. Since the introduction of Cyclosporin A as immunosuppressant, a cyclic endecapeptide of fungal origin, the survival rates increased significantly. However, one complication under Cyclosporin A therapy is the development of B-lymphoproliferative-disorders, reaching from benign reactive hyperplasia to malignant lymphoma. The recognition of them

remains difficult and still must be made by invasive findings. An early and uncomplicated recognition made by laboratory analyses would permit to reduce the dose of Cyclosporin A, followed by regression of the tumor. The aim of this retrospective study (112 observations from 25 patients after heart transplantation (HTX) and 70 observations from 52 patients after lung transplantation (LuTX)) was to prove Tissue Polypeptide Specific Antigen's (TPS) usefulness in detecting development of lymphomas during the postoperative course of heart and lung transplant recipients under Cyclosporin A therapy. TPS serum levels were compared with those of neopterin, C-reactive protein and  $\beta$ 2-Microglobulin.

**Results/Discussion:** From the analytes investigated only TPS exhibited increased serum concentrations when lymphoma developed in patients; TPS in controls:  $64 \pm 20,4$  U/L, TPS in lymphomas:  $150 \pm 81,6$  U/L. The diagnostic validities of the analytes and the individual courses of patients will be presented.

The link between immunosuppression and development of malignancies is well recognised. Postgraft lymphoproliferative disorders, predominantly of large B-cell type, constitute the most common malignancy in transplant recipients. The B-cell proliferation is probably associated with the Epstein-Barr virus. Typically these tumors show an aggressive clinical behaviour and a rapid growth, reversible by reduction of Cyclosporin A dose. TPS, an established tumormarker, is released in the late S and G2 phase of mitosis cell cycle and this is the reason for TPS being a proliferation marker. Therefore, it is not surprising that TPS is able to detect the growth of a postgraft associated lymphoma. Remarkable is the fact that TPS seems to detect it in an early stage, when no clinical signs indicate the presence of a lymphoma. This would mean that the dose of Cyclosporin would be reduced in time, followed by an early regression of a still small tumor. Therefore TPS can be used as a meaningful and easy to perform diagnostic tool in the monitoring of transplant recipients.

## 159 Detektion von Aberrationen der erb B-1, erb B-2, erb B-3 und c-myc Onkogene mit Hilfe der doppelt-differentiellen PCR für die Diagnose des Mammakarzinoms

U. Vogt<sup>1,4</sup>, B. Brandt<sup>1</sup>, C. Jackisch<sup>2</sup>, B. Bier<sup>3</sup>, K. S. Zänker<sup>4</sup>, G. Assmann<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin; <sup>2</sup>Universitätsfrauenklinik; <sup>3</sup>Institut für Pathologie, Westf. Wilhelms-Universität Münster und <sup>4</sup>Institut für Immunologie, Universität Witten.

Die Wahrscheinlichkeit von Genaberrationen (Amplifikation/Deletion) in normalen Zellen ist sehr gering. Aus diesem Grund sind Amplifikationen und Deletionen von erb B Onkogenen spezifische Indikatoren von Tumorzellen, die durch sie invasive oder metastasierende Eigenschaften erlangen können. In der Vergangenheit zeigten Studien, daß eine Amplifikation vom erb B-2-Onkogen in primären Mammakarzinomen mit einem kürzeren rezidiv-freien Intervall korreliert. Wir entwickelten eine reproduzierbare Methode für die simultane Detektion der mittleren Kopienzahl (Q) von erb B-1 (EGF-R), erb B-2, erb B-3 und c-myc aus Tumorgewebe. Die Methode basiert auf einer quantitativen Polymerase-Kettenreaktion, die doppelt-differentielle PCR (ddPCR). Q stellt dabei das Verhältnis der Konzentration des jeweiligen Onkogens zur Konzentration eines single-copy Referenzgenes dar. Eine statistische Analyse des Zeitraumes bis zur Progredienz der Erkrankung bei den Brustkrebspatientinnen in Abhängigkeit von den Parametern erb B-1, erb B-2, erb B-3 und c-myc wurde durchgeführt. Ein signifikant verkürztes metastasierenfreies Intervall hatten Patientinnen mit erb B-1 < 0,4, erb B-2 > 2,0 und erb B-3 < 1,75. Mit Hilfe der Cox-Regression wurde als Parameter mit der höchsten Signifikanz für das metastasierenfreie Intervall das Verhältnis der Q-Werte von erb B-1/erb B-2 (< 0,15) entdeckt ( $p < 0,001$ ). Lag eine c-myc Amplifikation vor, entwickelte in der Gruppe mit einem erb B-1/erb B-2 Quotienten > 0,15 in 5 Jahren kein Patient eine Metastase.

## 160 Anti-p53 Autoantikörper als serologischer Marker bei verschiedenen Tumorentitäten

M. Volkmann<sup>1</sup>, M. Müller<sup>2</sup>, M. Meyer<sup>2</sup>, W. Fiehn<sup>1</sup>, P. R. Galle<sup>2</sup>, H. Zentgraf<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Zentrallabor der Medizinischen Universitätsklinik und -Poliklinik, <sup>2</sup>Medizinische Klinik IV, Bergheimer Straße 58, 69115 Heidelberg <sup>3</sup>Angewandte Tumorstudiologie, DKFZ, INF 242, 69120 Heidelberg

Akkumulation eines funktionslosen p53 Tumor-Suppressors nach Punktmutation ist die häufigste bisher nachgewiesene Aberration in menschlichen Tumoren. In verschiedenen Arbeiten wurde darüber hinaus eine assoziierte p53-spezifische Autoimmunantwort (anti-p53) beschrieben(1). In eigenen Untersuchungen konnten wir mittels eines Immunoblot mit rekombinantem p53 bei 20/80 Patienten mit hepatozellulärem Karzinom anti-p53 Autoantikörper nachweisen (2). Zur Untersuchung der klinischen Verwendbarkeit dieses Tests wurde diese Studie erweitert und ein p53-ELISA entwickelt (3).

Es wurden bisher weitere 452 Seren untersucht, darunter Patienten mit Karzinomen des Oesophagus (n = 47), Magen (n = 128) Kolon (n = 182) Rektum (n = 35), Pankreas (n = 17), der Mamma (n = 24) und des Urogenitaltrakts (n = 19). Insgesamt waren 166 der 532 Fälle (21,8%) anti-p53 positiv (Verteilung 6 bis 33%) bei Titern bis 1 : 130000. Immundominante Epitope konnten in den terminalen Bereichen des Proteins lokalisiert werden. Keines der 67 Kontrollseren war anti-p53 positiv. Zur Reaktivität konventioneller Tumormarker war bisher keine signifikante Assoziation nachzuweisen. In Verlaufskontrollen im Immunoblot und ELISA konnte dagegen eine Serokonversion zu anti-p53 beim progredienten Kolonkarzinom (10/25 Fälle), oder ein postoperativer Titerabfall beobachtet werden.

Die Detektion von p53-spezifischen Autoantikörpern erweist sich damit als ein serologischer Parameter mit klarer Assoziation zum Vorliegen einer Tumorerkrankung ( $p < 0,0003$ ), mit dem eine Subgruppe anderweitig serologisch negativer Patienten erkannt und im klinischen Verlauf beobachtet werden kann.

### Literatur:

- Harris, C.C.; Hollstein, M. (1993): Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *New Engl. J. Med.*, 329: 1318 - 1327.
- Volkmann, M.; Müller, M.; Hofmann, W.J.; Meyer, M.; Hagelstein, J.; Räh, U.; Kommerell, B.; Zentgraf, H.; Galle, P.R. (1993): The humoral immune response to p53 in patients with hepatocellular carcinoma is specific for malignancy and independent of the alpha-fetoprotein status. *Hepatology* (a); 18: 559 - 565.
- Müller, M.; Volkmann, M.; Zentgraf, H.; Galle, P.R. (1994): Clinical implications of the p53 tumor suppressor gene. *New Engl. J. Med.* (letter), 330: 864 - 865.

## 161 Minimum influence of heparin cofactor II in a thrombin based antithrombin III assay

K.W. v. Pape, J. Bohner

Institut für Laboratoriumsmedizin, Städtisches Klinikum Fulda

Thrombin based antithrombin III (AT III) assays can be influenced by heparin cofactor II (HC II), especially in patients on heparin treatment (Bohner et al., *Thromb Haemostas* 71, 280 - 283, 1994), whereas a method based on the inhibition of factor Xa by AT III (Bohner et al., *Labmed* 15, 296 - 298, 1991) is not affected by HC II. In our previous study we could demonstrate already that the effect of HC II showed quantitative differences between various commercial kits for AT III. Recently a new kit for AT III was introduced in which the manufacturer claims that the kit is not influenced by HC II due to optimized reaction conditions (Baxter Diagnostics, Unterschleissheim, „B“). This kit employs bovine thrombin from which it is known that the reactivity of this species with HC II is much lower than with human thrombin. We have adapted this assay to the Hitachi 704 analyzer (without sample predilution) and studied the performance. The method was linear from 0 to 125% AT III. The intra assay precision (n = 12) was

0.59% in the normal and 1.96% in the pathological range. The inter assay precision was similar. The influence of HC II in assay „B“ was investigated by spiking a AT III deficient plasma with purified AT III and subsequent determination of AT III. The dose response curves for kit „B“ and our procedure with factor Xa were almost superimposable. In the low concentration range, however, the thrombin based kit „B“ showed an apparent AT III activity of only 3%, which indeed indicates that this procedure shows a similar specificity as the anti-FXa based technique. In 48 unselected patients without heparin treatment the mean values of both methods were identical (84.4% with anti-Xa vs 84.5% with „B“). In 22 patients with heparin therapy (> 15 000 U/day) the respective mean values were 68.9% vs 73.7% AT III. The slightly higher value with method B was not dependent on the AT III activity of the sample and was found in the same extent in all patients. The small difference could be related to the fact that we used an incubation time of 5 min on the Hitachi whereas the original recommendation for „B“ is 1 min only. We conclude that the two AT III kits assays are almost equally specific for AT III and that the minimum difference in patient samples with heparin therapy is clinically not important.

## 162 Klinische Fischölstudien: Die Bedeutung der Furanfettsäuren als Inhaltsstoffe von Fischölpräparaten

H. G. Wahl\*, M. Enderle, M. Pfohl, H. M. Liebich  
Medizinische Universitätsklinik, Zentrallabor, 72076 Tübingen

Furanfettsäuren wurden 1974 zum ersten Mal als Bestandteil von Fischlipiden beschrieben (1) und inzwischen auch in anderen tierischen, pflanzlichen und humanen Lipiden nachgewiesen. Hauptkomponenten sind die fast immer in höheren Konzentrationen vorliegenden Furanfettsäuren 12,15-Epoxy-13,14-dimethyl-12,14-eicosadiensäure (F6) und 12,15-Epoxy-13,14-dimethyl-12,14-octadiensäure (F4). Die 1980 von Spiteller et al. (2) in Urin und Serum nachgewiesenen tetrasubstituierten Furancarbonsäuren stellen Furanfettsäurenmetabolite dar. Die beiden Hauptkomponenten 3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure (Propylfuranensäure) und 3-Carboxy-4-methyl-5-pentyl-2-furanpropionsäure (Pentylfuranensäure) leiten sich von den Furanfettsäuren F4 bzw. F6 ab. Propylfuranensäure, die zu über 90% an Albumin gebunden ist, wirkt als ein potenter Bindungsinhibitor für zahlreiche Medikamente. Die bei Dialysepatienten stets erhöhte Propylfuranensäurekonzentration im Serum kann mit den üblichen Dialyseverfahren nicht gesenkt werden (3). Weitere Bedeutung kommt der Propylfuranensäure als möglicher Inhibitor der Erythropoese (4), der Glutathion-S-Transferase und der oxidativen Phosphorylierung zu. In einer randomisierten, placebokontrollierten und doppelblind durchgeführten Studie an Hyperlipämikern wurden über einen Zeitraum von 10 Wochen täglich 9 g Fischöl bzw. Placebo verabreicht. In der mittels multidimensionaler GC-MS durchgeführten Fettsäureanalyse konnten vierzehn, zum Teil neue Furanfettsäuren in dem verabreichten Fischölpräparat nachgewiesen werden. Dagegen war das Placebo frei von Furanfettsäuren. Unter Einfluß der Fischölgabe stieg die Propylfuranensäurekonzentration im Serum von  $4,9 \pm 0,5$  mg/l auf  $14,6 \pm 1,4$  mg/l und im Urin von  $0,39 \pm 0,16$  mg/l auf  $2,03 \pm 0,40$  mg/l an.

1. Glass, R.L.; Krick, T.P.; Eckhardt, A.E. (1974): *Lipids*, 9, 1004.
2. Spiteller, M.; Spiteller, G.; Hoyer, G.-A. (1980): *Chem Ber.* 113, 699.
3. Liebich, H.M.; Reichenmiller, A.; Wahl, H.G.; Tetschner, B.; Rislser, T.; Eggstein, M. (1992): *HRC*, 15 601.
4. Niwa, T.; Yazawa, T.; Kodama, T.; Uehara, Y.; Meada, K.; Yamada, K. (1990): *Nephron*, 56, 241.

## 163 Detection of hepatitis B viral genome in persons with isolated anti-HBc markers by HBVcore and HBVx specific polymerase chain reaction

Chwan-Heng Wang, B. Flehmig, G. Jahn  
Abt. Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten,  
Hygiene-Institut, Eberhard-Karl-Universität Tübingen,  
Silcherstraße 7, 72076 Tübingen

It was generally accepted that persons with isolated anti-HBc marker after convalescence own protective immunity against hepatitis B virus (HBV). Recently, HBV-DNA was demonstrated in 25 - 30% persons with single anti-HBc markers (Ref). Questions concerning whether HBV-DNA analysis should be introduced in the routine hepatitis B diagnostic arise. We tested 100 serum samples with single anti-HBc markers collected in our laboratory by HBVcore-gene-specific and HBVx-gene-specific polymerase chain reaction (PCR) for hepatitis B genome. As a result, 11 persons (11%) were found to contain HBV-DNA tested by HBVcore-specific primer pairs. 16 persons (16%) were shown to have HBV-DNA when HBVx-specific primer pairs were used. Furthermore, HBV-DNA in these positive sera was quantitated with serial limiting dilution method. On average, HBV-DNA were still detectable even after 10-5 dilutions in these samples. Our data suggest that these persons with single anti-HBc markers could contain infectious particles of HBV in their bloods. A simple, rapid and unexpensive HBV-DNA routine diagnosis should be developed and introduced in the near future in blood tested positive for anti-HBc.

### Reference:

Schätzl, H.M. (1994): *Methodik und Aussagekraft der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*, in „Virushepatitis A bis E: Diagnose, Therapie, Prophylaxe“, Kilian Verlag, s. 112 - 125

## 164 Five serum markers for the diagnosis of carbohydrate-deficient glycoprotein (CDG) syndromes

S. Weidinger<sup>1</sup>, M. Schröder<sup>1</sup>, W.P. Bieger<sup>1</sup>, K. Heyne<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Medizinisch Immunologische Laboratorien, Mittererstraße 3, 80336 München; <sup>2</sup>Illerweg 73, 24146 Kiel

The carbohydrate-deficient glycoprotein (CDG) syndromes are a new group of metabolic disorders characterized by glycosylation defects of secretory glycoproteins, hormones and lysosomal enzymes. CDG syndromes are multisystemic diseases (1) which have their basic defects probably in the glycosylation pathway (ER = endoplasmic reticulum, golgi apparatus). Three clinically and biochemically distinct types have been detected. There is indirect evidence for a deficiency of Asn-N-linked oligosaccharide transfer in the „classical“ CDG type I (ERdefect) and for a deficiency of Glc N Ac-transferase II in „type II (golgi defect). Approximately 150 patients have been described worldwide for type I. We report on 12 young patients (8 females and 4 males) who were investigated for these syndromes.

Biochemical diagnoses are usually made by isoelectric focusing (IEF) of serum transferrin which shows a significant increase of the asialo- and disialo-fractions (2). We analyzed transferrin,  $\alpha$ 1-antitrypsin, antithrombin III, orosomucoid and  $\alpha$ 2-HS-glycoprotein in the sera of the affected children using IEF followed by immunoblot with specific antibodies. These highly glycosylated proteins were separated on thin-layer polyacrylamide gels with distinct pH gradients. For each marker we found abnormal cathodic isoforms beside normal fractions.

The 5 glycoproteins are useful markers in the diagnosis of these multisystemic disorders. However, it is necessary to differentiate

them from „secondary“ or „tertiary“ CDG syndromes such as alcoholism and galactosemia (3).

References:

1. Jaeken, J.; Carchon, H. (1993): *J. Inher Metab. Dis.* 16 813 - 820.
2. Stibler, H., Jaeken, J., Kristiansson, B. (1991) *Acta Paediatr. Scand Suppl* 375 21 - 31.
3. Heyno, K.; Weidinger, S. (1994): *Med Genetik* 6, 98.

## 165 Adhesion molecule induction in heart transplantation

G. Weigel, M. Kindhauser, M. Grimm, A. Griesmacher  
Dept. Cardiothoracic Surgery, Clin. Biochem., University Vienna, Austria

Adhesion molecules are cell surface proteins with important functions in leukocyte adhesion and cell-cell interactions of the immunological response. Although some biochemical analytes have been suggested as markers for rejection and infection, a reliable diagnosis can only be made by endomyocardial biopsy. In the present study serum levels of routine parameters (C-reactive protein CRP,  $\alpha$ 1-antitrypsin [AAT]; complement factors [C3, C4];  $\beta$ 2-microglobuline [b2M]) and the circulating adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1 and ELAM were measured during cardiac allograft rejection and infections. A total of 27 heart transplant recipients were investigated, whereby 15 underwent one or more episodes of acute rejection (Billingham grade  $\geq$  1.5) and 22 patients developed infections during the observation period.

	Control (n = 91)		Infection (n = 89)		Rejection (n = 22)	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
CRP (mg/dl)	1,29	0,16	4,60+	0,44	0,99	0,23
AAT (mg/dl)	234	6	294+	7	230	11
C3 (mg/dl)	182	4	179	4	174	9
C4 (mg/dl)	21,4	0,7	22,8	0,6	20,0	1,6
b2M (mg/l)	3,18	0,17	4,53*	0,31	3,78	0,45
ICAM (ng/ml)	367	9	500+	16	523+	42
VCAM (ng/ml)	1151	41	1383+	62	1335	181
ELAM (ng/ml)	38	2	42	3	46	7

SEM = Standard error of mean; + p < 0.05, \* p < 0.001

CRP, AAT, b2M, ICAM-1 and VCAM-1 are significantly elevated in infections states. During rejection only b2M and ICAM-1 are increased, whereby the ICAM-1 serum level is elevated days before the verification of rejection. This observation is in accordance to Lautenschlager (2), who suggested that the early upregulation of ICAM-1 is mediated by  $\gamma$ -interferon. None of all parameters yielded sufficient sensitivity and specificity for discriminating between infection and rejection. According to Müller (1) the diagnostic validity can be improved by multivariate combination of the routine analytes. It might be suggested that ICAM-1 by combination with routine parameters in a useful tool for the diagnosis of rejection or infection.

1. Müller, M.M., et al. (1990): *Labmed* 14, 51 - 61.
2. Lautenschlager, I.T. (1993): *Transplantation* 56, 1495 - 1499.

## 166 Cell-cell communication in liver fibrosis: Identification of syndecans on rat liver cells

O.H. Weiner, A.M. Gressner  
Dept. of Clinical Chemistry and Central Laboratory, Philipps-University, 35033 Marburg, FRG

Although the transition of fat-storing cells (FSC) towards myofibroblasts (MFB) is a key element in liver fibrosis, the activation mechanism remains unclear. After elucidation the role of soluble factors produced by Kupffer cells (KC), hepatocytes and MFB we focused our attention on the role of cell-cell-interactions between the various hepatic cells. Syndecans, a family of membrane bound heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) are candidates for interactive cell-cell adhesion molecules (1). In order to identify syndecans on isolated rat hepatocytes, FSC, MFB and KC we performed Northern blot analysis with syndecan-I and II specific probes.

Methods: Rat hepatocytes and FSC were isolated by using the collagenase or pronase/collagenase reperfusion method. To obtain myofibroblasts FSC were cultered in Dulbecco's modified Eagle s medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) for 8 days. Total RNA was isolated according to (2) and Northern blot analysis according to (3).

Results: Northern blot analysis of RNA from isolated rat hepatocytes, FSC, MFB and KC using rat syndecan-I cDNA probes showed that a 2.5 kb and additionally a less abundant 3 kb syndecan-I mRNA is present in all cell types. During transformation of FSC into MFB the concentration of both syndecan-I mRNAs increased about 3 fold. High syndecan-II mRNA levels were found in hepatocytes, and FSC and increased during transformation of FSC into MFB. Interestingly all cell types contained 3.4, 2.2, 1.1 and 0.8 kb syndecan-II mRNAs. No detectable amounts of syndecan-II mRNA were found in KC.

Conclusion: We could show that rat hepatocytes and FSC contain different syndecan-I and II mRNA transcripts and that the concentration of these mRNAs increases during transformation of FSC into MFB. Expression of syndecan on cell surfaces might provide an efficient way of cellular interactions.

References:

1. Rapraeger, A. (1993): *Curr. Opp. Cell Biol.* 5, 844 - 853.
2. Chomczynski, P.; Saachi, V. (1987): *Anal. Biochem.* 162, 156 - 159.
3. Noegel et al. (1985): *EMBO J.* 4, 3797 - 3803.

## 167 Einfluß systemischer Glukokortikoidgabe auf hämatologische und klinisch-chemische Kenngrößen

H. Weisser, S. Tünn, H. Möllmann\*, J. Barth\*, U. Herberg, M. Krieg  
Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin  
\*Medizinische Klinik, Universitätsklinik Bergmannsheil, Bochum

Bei einer Vielzahl unterschiedlicher Erkrankungen werden heute Glukokortikoide therapeutisch eingesetzt. Aus labormedizinischer Sicht setzt die Beurteilung der unter dieser medikamentösen Therapie erhobenen klinisch-chemischen Befunde umfangreiche Kenntnisse über Glukokortikoide als Einflußgröße voraus. Um in diesem Zusammenhang die durch Glukokortikoide bewirkten dosis- und zeitabhängigen Effekte zu beschreiben, wurde der in-vivo-Einfluß von Methylprednisolonphosphat auf insgesamt 49 hämatologische und klinisch-chemische Kenngrößen bestimmt. Die Untersuchungen erfolgten im Blut von 12 männlichen gesunden Probanden zwischen 18 und 40 Jahren zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0.2 - 168 h; 6 Abnahmen) nach einmaliger intravenöser Gabe von insgesamt 7 verschiedenen Methylprednisolonphosphatkonzentrationen (16 - 1000 mg): Die statistische Signifikanz der Zeit- und Dosiseffekte wurde mittels ANOVA bzw. Scheffe-Test ermittelt. Signifikanzniveau: p < 0.05.

## Ergebnisse

1. Folgende Kenngrößen zeigten keine signifikanten Veränderungen: Ery, Hb, MCV, Baso, TPZ, PTT, PTZ, Fibrinogen, Krea, Chol, Bili, K, Ca, Mg, C1, Prot, Alb,  $\alpha$ 1-Glob,  $\alpha$ 2-Glob,  $\beta$ -Glob, IgG, IgA, IgM,  $\alpha$ 1-PI, AST, ALT,  $\gamma$ -GT, AP, LAP, CHE, LDH, CK, Amy, Lip. 2. Hochsignifikante Veränderungen [Ausgangswert/SD vs. Maximalresponse  $\pm$  SD (Dimension) / Dosis; Zeitpunkt] wurden bei folgenden Kenngrößen gefunden: Leukozyten [6.5  $\pm$  1.9 vs. 17.5  $\pm$  4.3 (1/nl) / 1000 mg; 24 h], Glukose [4.89  $\pm$  0.33 vs. 9.77  $\pm$  2.05 (mmol/l) / 500 mg; 12 h], Triglyzeride [1.73  $\pm$  1.24 vs. 0.57  $\pm$  0.15 (mmol/l) / 1000 mg; 12 h], anorganisches Phosphat [4.3  $\pm$  0.9 vs. 2.6  $\pm$  0.7 (mmol/l) / 500 mg; 4h]. 3. Der signifikante Anstieg der Gesamtleukozytenzahl ist durch eine signifikante Zunahme der segment- [3.1  $\pm$  0.9 vs. 13.8  $\pm$  3.5 (1/nl) / 1000 mg; 24 h] und stabkernigen [0.02  $\pm$  0.03 vs. 0.46  $\pm$  0.47 (1/nl) / 1000 mg; 24h] Granulozyten und der Monozyten [0.37  $\pm$  0.20 vs. 1.14  $\pm$  0.89 (1/nl) / 500 mg; 24 h] bedingt, während die Zahl an Lymphozyten [2.4  $\pm$  0.6 vs. 0.9  $\pm$  0.2 (1/nl) / 500 mg; 12 h] und Eosinophilen [0.12  $\pm$  0.16 vs. 0.0  $\pm$  0.0 (1/nl) / 500 Omg; 12 h] signifikant abnimmt. 4. Die gefundenen signifikanten Effekte sind hinsichtlich ihrer Zeit- und Dosisabhängigkeit kenngrößenspezifisch. 5. Die dosis- und zeitabhängigen Effekte unterliegen einer durch ein Pharmakokinetik-Pharmakodynamik-Modell vorhersagbaren Gesetzmäßigkeit.

## Schlußfolgerungen

1. Eine adäquate Interpretation klinisch-chemischer/hämatologischer Befunde nach Bolusgabe von Glukokortikoiden kann nur unter Berücksichtigung der obengenannten Veränderungen erfolgen. 2. In der Transfusionsmedizin lassen sich die gesetzmäßigen dosis- und zeitabhängigen Leukozytenveränderungen zur optimierten Herstellung von Granulozytenkonzentraten nutzen. 3. Die Veränderungen der Leukozyten lassen darüber hinaus im Sinne eines „Bioassays“ Rückschlüsse auf Ausmaß und Dauer pharmakodynamischer Wechselwirkungen von Glukokortikoiden zu.

## 168 Plasmakatecholaminkonzentration und Hämodynamik bei linksventrikulärer Funktionsstörung

H. Weisser, D. Jäger\*, S. Tunn, A. Machraoui\*, B. Lemke, M. Krieg  
Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin,  
\*Abteilung für Kardiologie, Universitätsklinik Bergmannsheil,  
Bochum

Bei linksventrikulären Funktionsstörungen stellt die sympathoadrenerge Aktivitätserhöhung einen wichtigen Kompensationsmechanismus dar. Die Plasmakatecholaminkonzentration kann hierbei als Indikator für das Ausmaß der Aktivitätserhöhung dienen. Ziel unserer Untersuchung war, zu prüfen, inwieweit Plasmakatecholaminkonzentration und Hämodynamik bei linksventrikulärer Funktionsstörung unterschiedlichen Grades miteinander korrelieren und ob hierbei Unterschiede hinsichtlich der Genese der Erkrankung (regionale Schädigung durch KHK versus globale Schädigung durch Hypertonie/dilatative Kardiomyopathie) bestehen. Bei 172 Patienten mit gestörter Hämodynamik wurden insgesamt 200 Einschwemmkatheteruntersuchungen durchgeführt. Als Meßgrößen zur hämodynamischen Klassifizierung nach Roskamm und Reindell (Stadium I – IV) dienen der Füllungsdruck und Cardiac Index (CI). Blut wurde aus der A. pulmonalis zum Zeitpunkt der Ruhehämodynamik in eisgekühlten EDTA-Röhrchen aufgefangen. Die Noradrenalin (NA)- und Adrenalin (A)-Bestimmung im Plasma erfolgte mittels HPLC (Reversed-Phase Chromatographie) und elektrochemischer Detektion, die statistische Auswertung der Daten mittels linearer Regression nach Pearson bzw. U-Test nach Wilcoxon. Signifikanzniveau:  $p < 0.05$ . Die Ergebnisse sind: 1. Es besteht eine negative exponentielle Abhängigkeit ( $r = -0.499$ ;  $p < 0.0001$ ) zwischen NA-Konzentration und CI, wobei sich Patienten mit regionaler Schädigung nicht von denen mit globaler Schädigung unterscheiden. 2. Die mittlere NA- bzw. A-Konzentration [ng/l  $\pm$  SEM] beträgt im Stadium I 313  $\pm$  19 und 78  $\pm$  7, im Stadium II 461

$\pm$  39 und 104  $\pm$  12, im Stadium III 603  $\pm$  32 und 123  $\pm$  10 und im Stadium IV 1193  $\pm$  63 und 210  $\pm$  27. 3. Die mittleren NA-Konzentrationen in Stadium III und IV sind somit erhöht (normal bis 475 ng/l) und unterscheiden sich hochsignifikant von der im Stadium I gefundenen. 4. Im Stadium III liegt bei 50% der Patienten mit einem pathologischen Ruhe-CI (< 2.1) die NA-Konzentration > 500 ng/l, wohingegen im Stadium IV 95% aller Patienten mit pathologischem Ruhe-CI eine NA-Konzentration > 500 ng/l aufweisen. 5. Die Stadien unterscheiden sich auch hinsichtlich ihrer mittleren A-Konzentration, jedoch sind die gefundenen Unterschiede aufgrund der höheren Streuung nicht signifikant.

Bei den verschiedenen Schweregraden linksventrikulärer Funktionsstörung finden sich somit signifikant unterschiedliche NA-Konzentrationen. Hierbei zeigt sich, daß die kompensatorische sympathoadrenerge Aktivitätssteigerung in Stadium III einsetzt. Ab diesem Stadium bzw. ab einer NA-Konzentration von > 500 ng/l sollte die Therapie mit einem Phosphodiesterase-Hemmer erfolgen, da die üblicherweise bei Herzinsuffizienz eingesetzten  $\beta$ -Mimetika zur einer weiteren Down-Regulation der  $\beta$ -Rezeptoren führen und somit keine Verbesserung der Hämodynamik mehr erwarten lassen.

## 169 Neuartige Reinigung von ApoE PCR Produkten durch Exonuklease I und AP vereinfacht die direkte nicht-radioaktive Sequenzierung

E. Werle, M. Völker, Ch. Schneider, W. Fiehn  
Zentrallabor, Med. Klinik und Poliklinik, Universität Heidelberg

### Fragestellung

Drei häufige kodominante Apolipoprotein E (Apo E) Allele ( $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3,  $\epsilon$ 4) kodieren für Isoformen mit unterschiedlicher Rezeptoraffinität und führen zu Störungen insbesondere im Metabolismus von Chylomikronen und VLDL Remnants.

Mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) können diese drei häufigen Genotypen bestimmt werden und der „Single Strand Conformation Polymorphismus“ (SSCP) erlaubt in einem hohen Prozentsatz den Nachweis von seltenen Mutationen. Zur Bestätigung von Mutationen ist die Sequenzierung erforderlich. Ziel unserer Versuche war die Entwicklung einer nicht-radioaktiven Methode zur Sequenzierung von ApoE PCR (Polymerasekettenreaktion) Produkten unter Umgehung einer chromatographischen oder elektrophoretischen Reinigung der PCR Produkte von störenden Nukleotiden und Primern.

### Methoden und Ergebnisse

Mittels PCR wurde ein 244 bp langes Genfragment (70% GC) amplifiziert. Durch anschließende Inkubation (30 min, 37° C) mit Exonuclease I und Shrimp alkalischer Phosphatase wurden die Primer und die nicht verbrauchten dNTP's degradiert. Die Enzyme wurden dann thermisch inaktiviert. Aliquota dieses gereinigten PCR Produktes wurden in einer zweiten PCR mit dem gleichen Temperaturprogramm mit nur einem biotinylierten Primer nach der Sanger Methode sequenziert („Cycle Sequencing“). Nach Elektrophorese wurde die DNA auf eine Membran transferiert und mit Streptavidin-AP Konjugat inkubiert. Nach Zugabe eines Chemilumineszenzsubstrates wurde ein Röntgenfilm belichtet. Wir erhielten die erwarteten Sequenzen aller 6 häufigen ApoE Genotypen.

### Schlußfolgerung

Diese neue Methode, PCR Produkte einfach von den nachfolgenden Sanger-Sequenzierung störenden Oligonukleotiden und dNTP's durch Inkubation mit zwei Enzymen zu befreien, bietet Vorteile gegenüber der aufwendigeren Reinigung durch Chromatographie oder Elektrophorese. In vielen Bereichen könnte diese Methode die radioaktive Festphasensequenzierung ersetzen.

## 170 Gangliosiddiagnostik meningealer Tumoren

S. Westphal, H. J. Synowitz\*, W. Augustin, A. Rosé  
Bereich Pathologische Biochemie, Uni-Klinikum Magdeburg  
\*Abteilung für Neurochirurgie, Uni-Klinikum Magdeburg

Gangliosidmoleküle sind ubiquitäre Bestandteile der Zellmembran. Die Bedeutung der Ganglioside für die zelluläre Funktion ist offenbar vielfältig, jedoch noch nicht vollständig untersucht. Beim Menschen werden sie besonders hoch im Zentralnervensystem exprimiert. Nakakuma et al. zeigten, daß Ganglioside (z. B. GM3 und GD3) auch auf epidermalen Zellen und Tumoren (z. B. Melanomen) regelmäßig nachweisbar sind, jedoch als Zeichen der neoplastischen Transformation Veränderungen ihrer Konzentration und der Verteilung der Einzelganglioside aufweisen (Shinoura et al.). Die Darstellung dieser Veränderungen stellen einen möglichen Ansatzpunkt für eine weiterführende Diagnostik cerebraler Tumoren dar.

### Methodik

Das Gangliosidmuster und die Konzentration an gangliosidgebundener Neuraminsäure wurden im Biopsiematerial intrakranieller Meningiome (n = 46) mittels Methoden der Lipidanalytik und der HPTLC-Auftrennung untersucht.

### Ergebnisse

Die Konzentration an gangliosidgebundener Neuraminsäure betrug 245 nmol/gFG. Die 9 Einzelganglioside der untersuchten Meningiome wurden anhand eines Vergleichsstandards densitometrisch ausgewertet. Auf der Grundlage des Syntheseschemas nach van Echten und Sandhoff wurden die Meningiome unabhängig von ihrer Histologie in drei Gruppen zusammengefaßt. 20% gehörten zur „A-Serie“ (GM3, GM2, GM1, GD1a), 44% zur „B-Serie“ (GD3, GD2, GD1b, GT1b, GQ1b) und 36% wurden als Intermediärgruppe bezeichnet. Das erhöhte prozentuale, statistisch signifikante Auftreten gering sialinierter Einzelganglioside (GD3 und GM3) im Tumormaterial kann als möglicher Tumormarker geeignet sein und stellt einen Hinweis auf tumorveränderte Sialyltransferase-Aktivitäten dar.

### Literatur:

- Nakakuma, H.; Horikawa, K. et al. (1992): Common phenotypic expression of gangliosides GM3 and GD3 in normal human tissues and neoplastic skin lesions. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 22, 308 - 312.  
Shinoura, N.; Dohi, T. et al. (1992): Ganglioside composition and its relation to clinical data in brain tumors. *Neurosurgery* 31, 541 - 549.  
v. Echten, G.; Sandhoff, K. et al. (1993): Ganglioside Metabolism. *J Biol. Chem.* 268, 5341 - 5344.

## 171 Bestimmung von Plättchenaktivierendem-Faktor (PAF) im Plasma: Schnell, spezifisch und sensitiv

C. Wieber, C. Heuer, A. Opitz\*, H. Bossekert, G. Kleber  
Innere Medizin I, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Innere Medizin II, Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München

### Einleitung

PAF (1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholin) ist ein Lipidmediator mit starker vasoaktiver und proentzündlicher auto-, para- und endokriner Wirkung auf verschiedene Organsysteme wie Leber, Intestinum und Niere. Für Untersuchungen zur Pathophysiologie Lipopolysaccharid- oder Oxidationsstressabhängiger hepatischer, intestinaler und renaler Funktionsstörungen könnte die Bestimmung von PAF in biologischen Materialien von hohem diagnostischen Wert sein. Wir erarbeiteten eine Methode zur Bestimmung von PAF im Plasma.

### Methodik

Plasma aus 5 ml Vollblut in modifiziertem ACD-Puffer wird einer Lipid-Extraktion mit CHC13/CH3OH/H2O (1 : 1 : 0,9) unterzogen und

der Lipidextrakt über HPLC gereinigt (CH2Cl2/CH3OH/H2O: 52 : 43,3 : 4,7; 3,9 x 300 mm µPorasil® Waters, Beckman System Gold®). Die PAF-analoge Elutionsfraktion wird in modifiziertem HEPES-Puffer aufgenommen und die PAF-Rezeptorbindung an intakten, gewaschenen Schweinethrombozyten anhand der Verdrängung von 3H-PAF ermittelt.

### Ergebnisse

Die HPLC erlaubte eine vollständige Trennung von PAF gegenüber Phosphatidylcholin, Sphingomyelin und Lysophosphatidylcholin relative Elutionszeiten 0,78, 0,89 und 1,24. Die Bindung von 3H-PAF an Schweinethrombozyten wurde durch den spezifischen PAF-Antagonisten WEB2170 (10-3M) vollständig aufgehoben. Die reproduzierbar meßbaren PAF-Konzentrationen lagen im Bereich von 25 - 500 pg / Testansatz bzw. 90 - 1800 pg/ml Plasma. Die Wiederfindungsraten für 3H-PAF betrugen, extrahiert aus Vollblut, Plasma oder Testpuffer 80, 84 und 90%, die für Hexadecyl-PAF (500 und 250 pg) extrahiert aus Serum, 69 und 66%. Die mittlere Intra- und Interassay-Abweichung betrugen 15 ± 13% (n = 12) bzw. 16 ± 15% (n = 6). PAF-freies Serum zeigte keine Rezeptorverdrängung. Die PAF-Konzentrationen im Plasma (x ± SEM) lagen bei Patienten mit Leberzirrhose (n = 7) mit 125 ± 31 pg/ml niedriger als bei Normalpersonen (458 ± 235; n = 5) oder Patienten mit akuter Hepatitis (1139 ± 494; n = 13).

### Schlußfolgerung

Die PAF-Bestimmung im Plasma stellt ein einfaches und reproduzierbares Verfahren dar. Die Ergebnisse weisen auf eine mögliche Rolle von PAF in der Pathogenese akuter Hepatitiden hin.

## 171a Neue Entwicklungen in der HIV-Diagnostik

Hannelore Willkommen  
Paul-Ehrlich-Institut, Langen

Die HIV-Diagnostik ist im wesentlichen auf die sichere, frühzeitige Erkennung der Infektion gerichtet. Sie basiert auf dem Antikörpernachweis, d. h. Prüfung des Serums in einem HIV-1- und HIV-2-Kombinationstest und - bei einem im Screening-Test reaktiven Ergebnis - Erhebung des negativen oder positiven Befundes mit einem Bestätigungstest (Western Blot). HIV-Diagnostika zum Nachweis von HIV-Antigen bzw. -Antikörpern sind zulassungspflichtig. Gegenwärtig sind 44 Tests auf dem Markt; jährlich werden ca 400 Chargen für die Anwendung freigegeben. Für Screening-Teste sind die wichtigste Testparameter Sensitivität und Spezifität. Die Anforderungen an diese Parameter sind ständig zu überprüfen und bei Erfordernis zu modifizieren. Neue wissenschaftliche Erkenntnisse, z. B. das Auftreten von HIV-1-Stämmen vom Subtyp O, sind zu berücksichtigen.

Neue Testentwicklungen sind insbesondere gerichtet auf

- eine noch frühere Erkennung einer HIV-Infektion, z. B. durch weitere Entwicklung von Testen, die IgG- und IgM-Antikörper erfassen,
- die Entwicklung von Kombinationstesten, die eine rationelles Screenen durch kombinierten Nachweis verschiedener Parameter (z. B. anti-HIV/HBsAg) erlauben und
- die Entwicklung kommerzieller Teste auf der Basis der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Aus der Literatur wird deutlich, daß auch an der Entwicklung von

- Testen zum HIV-Antikörpernachweis in Urin oder Speichel und
- Schnelltesten, deren Durchführung so vereinfacht ist, daß der Hausarzt oder sogar der Patient selbst sie durchführen kann,

gearbeitet wird. Die Diagnostik der HIV-Infektion durch Untersuchung von Urin oder Speichel ist erst dann zu akzeptieren, wenn belegt ist, daß Antikörper nach HIV-Infektion generell ebenso frühzeitig in diesen Körperflüssigkeiten nachweisbar sind wie im Serum. Ihr Einsatz für epidemiologische Untersuchungen ist zu diskutieren. Die Einführung von Schnelltesten, die vom Patienten selbst

durchgeführt werden können (Heimteste), wird gegenwärtig international kontrovers diskutiert. In Deutschland wurde sie aus ethischen Gründen abgelehnt (Votum des Nationalen AIDS-Beirats, 1990).

## 172 Analytische Aspekte einer exzessiven Pseudo-Hyperdigitoxinämie

C. Windmeier, T. Arndt, M.G. Bachem, T. Daldrup, A.M. Gressner  
Abt. Klinische Chemie u. Zentrallabor, Philipps-Universität, 35033 Marburg; \*Institut f. Rechtsmedizin, Heinrich Heine Universität, 40225 Düsseldorf

Bei der immunologischen Quantifizierung von Digitalisglycosiden wurden wiederholt Fälle mit erhöhten Konzentrationen im Serum beschrieben, die nicht durch das applizierte Pharmakon oder seine Metabolite bedingt waren und mit dem Vorliegen von „Digitalis-Like-Substances“ erklärt wurden (1). Bei einer 63jährigen hämodialysepflichtigen Patientin, die wegen Herzinsuffizienz Digitoxin (Digimerck 0,1 mg/die) seit ca. 2 Jahren erhielt, wurden bei einer routinemäßigen Kontrolle massiv erhöhte Digitoxinwerte (bis 530 µg/l) gemessen. Klinik und EKG gaben keinen Hinweis auf eine Digitalis-Intoxikation. Derart hohe Digitoxinwerte stellten in der Krankengeschichte der Patientin eine einmalige Episode dar. Die Digitoxinbestimmung im Serum erfolgte nach Enteiweißung mit einem Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassay (TDx, Abbott). Die Ergebnisse wurden mit einem Enzym- (CEDIA, Boehringer Mannheim) und einem Radio-Immunoassay (DPC) überprüft. Zusätzlich wurden höhermolekulare Serumbestandteile durch Ultrafiltration (cutoff 20 kD) abgetrennt, und anschließend das Filtrat auf Digitoxin analysiert. Für die HPLC-Analyse wurden 0,2 ml Serum auf 20 ml mit Aqua aufgefüllt, 10 min auf einer Clin-Elut Säule (Analytichem Int.) inkubiert, Digitoxin und seine Metabolite mit Ethylacetat extrahiert, der Extrakt eingeeengt und der Rückstand in mobiler Phase aufgenommen. Die chromatographische Auftrennung erfolgte nach Plum und Daldrup (2). Ein Aliquot des Extraktes wurde immunologisch auf Digitoxin untersucht. Die am zweiten Untersuchungstag gemessenen Spitzenkonzentrationen variierten, abhängig vom eingesetzten Immuno-Assay, zwischen 237 und 530 µg/l. Im Ultrafiltrat waren ca. 10% des ursprünglichen Digitoxinwertes von 530 µg/l nachweisbar. Nach Ethylacetat-Extraktion wurden Werte von 20 µg/l gemessen. Die HPLC-Fraktionierung erbrachte keine ungewöhnlichen Metabolitenmuster. Derartig hohe „Digitoxinspiegel“ wie im vorliegenden Fall wurden bislang in der Literatur nicht beschrieben. Fehlende Symptomatik und unauffälliges EKG schlossen eine Digitoxin-Intoxikation aus. Eine Störung der immunologischen Nachweismethoden durch Kreuzreaktion der Digitoxin-Antikörper mit „Digitalis-Like-Substances“ war anzunehmen. Im Gegensatz zu Digitoxin und seinen Metaboliten war die Substanz nicht mit Ethylacetat extrahierbar und deshalb eindeutig von diesen abzugrenzen. Weitere Analysen zur Identifizierung werden durchgeführt.

1. Valdes, R. (1985): Clin. Chem., 31, 1525 - 1532.
2. Plum, J.; Daldrup, T. (1986): J. Chromatography, 377, 221 - 231.

## 173 Darstellung einiger Qualitätsmerkmale von Hormonbestimmungen anhand der Ringversuchsergebnisse 2/93 bis 2/94 der DGKC

Dagmar Winnefeld, H. Pfuhl, E. Spanuth  
Boehringer Mannheim GmbH, Wissenschaftliches Referat  
Diagnostica, Sandhofer Straße 116, 68305 Mannheim

Die Ergebnisse der fünf Ringversuche 2/93 bis 2/94 der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie werden für die Parameter Östradiol, Progesteron, FSH, LH und Prolaktin als Übersicht und im Verlauf dargestellt. Damit wird – zusätzlich zur Präzision und Richtigkeit – die Kontinuität der Ringversuchsergebnisse als weiteres Qualitätsmerkmal eingeführt.

Die Auswertung des Verlaufes ist möglich, weil je nach Analyt der Gesamtmedian für die Proteohormone bzw. der Referenzmethodenwert für die Steroidhormone eines jeden Ringversuches als Bezugspunkt relativiert (abstrahiert) wird, indem er als 100% definiert wird. Daraus resultiert, daß die methodenspezifischen Mediane (sowie deren Streubereiche [16–84% Perzentile]) der fünf Ringversuche im Vergleich zu einem einzigen Bezugspunkt beurteilt werden können.

Zusätzlich kann durch dieses Verfahren zu den üblichen Informationen über Präzision und Richtigkeit die Langzeitqualität von Testmethoden und die Chargenkonstanz beurteilt werden.

Die aktuellen Ergebnisse des Ringversuchs 2/94 der Steroidhormone Östradiol und Progesteron sowie der Proteohormone LH, FSH und Prolaktin werden für verschiedene Testmethoden vergleichend graphisch dargestellt. Durch die Einbeziehung des zeitlichen Verlaufes über fünf Ringversuche eines Jahres wird die Meßwertqualität der unterschiedlichen Methoden vergleichend über den betrachteten Zeitraum verfolgt.

Wird diese Auswertemethode kontinuierlich weitergeführt, so kann die Kontinuität der Testqualität dokumentiert und bei Veränderungen frühzeitig Fehler vermieden werden.

## 174 Follow-up of serum concentrations of bone alkaline phosphatase and the carboxyterminal extension peptide of type I procollagen for monitoring of osteoblast activity in patients following renal transplantation

W. Withold<sup>1</sup>, S. Degenhardt<sup>2</sup>, M. Heins<sup>1</sup>, B. Grabensee<sup>2</sup>, H. Reinauer<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Institute for Clinical Chemistry and Laboratory Diagnostics; <sup>2</sup>Clinic for Nephrology, Heinrich-Heine-University of Düsseldorf

In patients following renal transplantation a rise of bone alkaline phosphatase (BAP) (EC 3.1.3.1) can be observed which is possibly due to an activating effect of cyclosporine A upon osteoblasts in these patients (1). Here we compare the values of BAP following renal transplantation with those of the carboxy-terminal extension peptide of type I procollagen (CICP) which may be considered as another bone formation marker. BAP was determined by an immunoradiometric assay (Tandem®-ROstase™) (reference interval: 3.4 – 15.0 µg/l [females] and 3.8 – 21.3 µg/l [males]) and CICP by an enzyme immunoassay (Prolagen-C™) (reference interval: 50 – 145 µg/l [females] and 50 – 180 µg/l [males]). Serum/plasma samples were obtained from 13 patients before renal transplantation as well as 1 week, 1 month and 3 months following transplantation, respectively. All patients were treated with cyclosporine A, azathioprine and methylprednisolone.

There was a significant correlation between BAP and CICP values in the whole of 52 serum/plasma samples examined ( $r = +0.770$ ;  $p < 0.0001$ ). Before transplantation BAP ( $p < 0.0001$ ) – but not CICP ( $p >$



0.1) – was correlated with intact parathyrin levels. BAP values increased from  $7.9 \pm 1.2 \mu\text{g/l}$  (mean + SEM) before transplantation to  $14.6 \pm 1.8 \mu\text{g/l}$  three months after transplantation ( $p < 0.01$ ). There was a concomitant rise of C1CP concentrations from  $119 \pm 19 \mu\text{g/l}$  to  $179 \pm 27 \mu\text{g/l}$  ( $p < 0.05$ ). No correlation could be observed between BAP and C1CP levels on the one hand and intact parathyrin levels on the other hand at any time following renal transplantation ( $p > 0.5$ ). Three months after transplantation parathyrin levels ( $12.6 \pm 2.3 \text{ pmol/l}$ ) did not significantly differ from those before transplantation ( $19.6 \pm 6.8 \text{ pmol/l}$ ) ( $p > 0.5$ ) (normal range: 1.1 – 5.8 pmol/l). In conclusion, following renal transplantation both BAP and C1CP levels may be suitable for monitoring the activation of osteoblast activity.

1. Withold, W.; Degenhardt, S.; Castelli, D.; Heins, M.; Grabensee, B. (1994): Clin. Chim. Acta 225: 137 - 146.

## 175 Monitoring of bone metabolism following allogeneic bone marrow transplantation with two biochemical markers of bone formation

W. Withold<sup>1</sup>, H.-H. Wolf<sup>2</sup>, S. Kollbach<sup>1,2</sup>, A. Heyl<sup>1</sup>, H. Reinauer<sup>1</sup>, W. Schneider<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute for Clinical Chemistry and Laboratory Diagnostics; <sup>2</sup>Clinic for Hematology, Heinrich-Heine-University of Duesseldorf

Osteoporosis is one of the problems for which bone marrow transplant (BMT) recipients are at increased risk (a. o. due to an immunosuppressive therapy with cyclosporine A or glucocorticoids as well as sex hormone deficiency after chemotherapy and whole-body radiation) (1).

For assessment of bone metabolism before and after BMT we determined the values of bone alkaline phosphatase (BAP) (EC 3.1.3.1) (Tandem<sup>R</sup>-R Ostase<sup>TM</sup>) (reference interval: 3.4 – 15.0  $\mu\text{g/l}$  [females] and 3.8 – 21.3  $\mu\text{g/l}$  [males]) and of the carboxy-terminal extension peptide of type I procollagen (C1CP) (reference interval: 50 – 145  $\mu\text{g/l}$  [females] and 50 – 180  $\mu\text{g/l}$  [males]) which may be considered as markers of bone formation. Nine patients (age:  $35 \pm 2.2 \text{ y}$ ) (mean  $\pm$  SEM) (5 males, 4 females) (4 CML, 3 AML, 2 NHL) were examined before BMT; 14 patients  $335 \pm 82$  days after BMT (age:  $37 \pm 2.3 \text{ y}$ ) (10 males, 4 females) (7 CML, 4 AML, 1 ALL, 2 NHL). None of the patients had prior bone disease. All patients received cyclosporine A monotherapy (4 mg/kg/day p. o.) for  $216 \pm 45$  days.

Following BMT female patients showed significantly higher BAP values:  $14.4 \pm 2.0 \mu\text{g/l}$  (after) vs  $7.3 \pm 1.0 \mu\text{g/l}$  (before) ( $p < 0.05$ ). This did not apply to male patients:  $13.1 \pm 1.9 \mu\text{g/l}$  (after) vs  $13.1 \pm 1.8 \mu\text{g/l}$  (before) ( $p > 0.5$ ). After BMT both female and male patients were characterized by significantly higher concentrations of C1CP:  $118 \pm 9 \mu\text{g/l}$  vs  $65 \pm 5 \mu\text{g/l}$  ( $p < 0.01$ ). However, there was a concomitant increase of  $\gamma\text{GT}$  activity following BMT ( $33 \pm 7 \text{ U/l}$  vs  $14 \pm 3 \text{ U/l}$ ). Increase of BAP after BMT in females but not in males may be due to estrogen deficiency caused by whole-body radiation before BMT. Cyclosporin A which is capable of activating the osteoblast activity possibly reinforces this effect. A possible explanation for the increase of C1CP following BMT is an impaired hepatic clearance of this marker substance (f. i. due the hepatotoxicity of cyclosporine A, episodes of GvHD or chemotherapy) associated with  $\gamma\text{GT}$  increase.

1. Kelly, P. A. et al. (1990): Reduced bone mineral density in men and women with allogeneic bone marrow transplantation. Transplantation 50: 881 - 882.

## 176 Neither the urinary excretion of neopterin nor the serum concentrations of sICAM-1 (CD 54) are associated with metastatic spread into bone in patients with malignant tumors

W. Withold<sup>1</sup>, G. Georgescu<sup>2</sup>, H. Vosberg<sup>2</sup>, H.W. Mueller-Gaertner<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Institute for Clinical Chemistry and Laboratory Diagnostics  
<sup>2</sup>Department for Nuclear Medicine, Heinrich-Heine-University of Duesseldorf

Intercellular adhesion molecule-1 is a cytokine inducible adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily. Neopterin is produced by human macrophages when stimulated by interferon gamma. Both immune activation markers are reported to be elevated in cancers (1, 2).

We investigated if there is a difference in the release of these immune activation markers in cancer patients without and with presence of bone metastases. The urinary excretion of neopterin (E. Merck) was determined in second morning urine samples and compared with the serum concentrations of sICAM-1 (British Bio-Technology Products). A series of thirty-nine tumor patients (examined by bone scintigraphy with <sup>99m</sup>Tc-methylene diphosphonate) was divided into two groups: (1) Absence of pathological findings in bone scintigraphy (n = 25). (2) Appearance of typical signs of bone metastases in bone scintigraphy (n = 14).

Neither the urinary excretion of neopterin nor s-ICAM-1 serum concentrations differed between these two groups (neopterin:  $128 \pm 13 \mu\text{mol/mol}$  creatinine [group (1)] vs  $133 \pm 39 \mu\text{mol/mol}$  creatinine [group (2)];  $p > 0.1$ ) (s-ICAM-1:  $284 \pm 18 \mu\text{g/l}$  [group (1)] vs  $312 \pm 37 \mu\text{g/l}$  [group (2)];  $p > 0.1$ ) (median + SEM is given). Additionally there was no correlation between the two immune activation markers in either of the groups ( $p > 0.1$ ).

In conclusion, our preliminary results do not indicate a systemic immune activation being associated with metastatic spread into bone. However, this does not exclude a local action of immune mediators within bone tissue.

1. Gearing, A.J.H.; Newman, W. (1993): Circulating adhesion molecules in disease. Immunology Today 14: 506 - 512.  
2. Wachter et al. (1992): Neopterin. Biochemistry - Methods - Clinical Application. Walter de Gruyter, Berlin New York

## 177 Immunoblotting following agarose gel electrophoresis is superior to immunofixation with respect to detection of Bence Jones proteinuria

W. Withold<sup>1</sup>, M. Aivado<sup>1</sup>, H.-H. Wolf<sup>2</sup>, A. Heyl<sup>1</sup>, W. Schneider<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Institute for Clinical Chemistry and Laboratory Diagnostics  
<sup>2</sup>Clinic for Hematology, Heinrich-Heine-University of Duesseldorf

An immunoblotting method for the sensitive detection of Bence Jones proteinuria following agarose gel electrophoresis was developed. After immunonephelometric determination of urinary  $\kappa$  and  $\lambda$  chains (employing antisera to human  $\kappa$  and  $\lambda$ , light chains (free + bound); Behringwerke AG, Marburg) urine samples (diluted to 2.5 mg/l  $\kappa$  and  $\lambda$ , light chains, respectively) were electrophoretically separated using the Paragon<sup>®</sup> system (Beckman Instruments) and blotted by capillary diffusion onto nitrocellulose. Rabbit anti-human  $\kappa$  and  $\lambda$ , light chains (free + bound) (DAKO Diagnostika, Hamburg) diluted 1 + 100 reacted to  $\kappa$  and  $\lambda$  chains attached to the membrane. Goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate was employed as second antibody (Immun-Blot<sup>®</sup> Assay Kit, Bio-Rad).

Immunofixation following agarose gel electrophoresis (Paragon<sup>®</sup> system) was performed according to the recommendations of the

manufacturer employing urine specimens which were concentrated to 10 g/l total, protein.

The detection limit of the immunoblotting procedure (as determined by serial dilutions) was 0.3 mg monoclonal component/l urine. Among 65 urine specimens received for routine testing for Bence Jones proteinuria, 32 monoclonal components were found by immunoblotting compared with 10 by immunofixation.

In conclusion, the immunoblotting method is superior to immunofixation with respect to the diagnostic sensitivity for detection of Bence Jones proteinuria. Moreover, Bence Jones proteins may be detected successfully over a wide concentration range without several specimen or antibody dilutions.

## 178 Comparison between bone alkaline phosphatase and the carboxy-terminal extension peptide of type I procollagen for detection of bone metastases in patients with malignant tumors

W. Withold<sup>1</sup>, H. Khakzad<sup>1</sup>, G. Georgescu<sup>2</sup>, M. Heins<sup>1</sup>, H. Vosberg<sup>2</sup>, H.W. Mueller-Gaertner<sup>2</sup>, H. Reinauer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Clinical Chemistry and Laboratory Diagnostics

<sup>2</sup>Department for Nuclear Medicine, Heinrich-Heine-University of Duesseldorf

We compared the diagnostic validity of an immunoradiometric assay (Tandem<sup>®</sup>-R Ostase<sup>™</sup>) for bone alkaline phosphatase (BAP) (EC 3.1.3.1) mass concentration with an enzyme immunoassay (Prolagen-C<sup>™</sup>) for the carboxy-terminal extension peptide of type I procollagen (CICP) with respect to detection of bone metastases in a consecutive series of 89 tumor patients examined by bone scintigraphy (with <sup>99m</sup>Tc-methylene diphosphonate). According to scintigraphic criteria the patients were divided into the following groups: (a) There are no pathological findings (= group 0; n = 29). (b) In compliance with the pathological findings (as judged by bone scintigraphy) the presence of bone metastases seems to be improbable (= group 1; n = 33), possible (= group 2; n = 13) and probable (= group 3; n = 14).

There was a significant correlation between BAP and CICP values in the whole of 89 patients examined ( $r = +0.529$ ;  $p < 0.0001$ ). The discriminant power of BAP and CICP was determined by Z score analysis (group 1 vs group 0:  $+0.43$  [BAP]/ $-0.76$  [CICP]; group 2 vs group 0:  $+2.00$  [BAP]/ $+0.85$  [CICP]; group 3 vs group 0:  $+8.12$  [BAP]/ $+2.12$  [CICP]). At a threshold value of 11.0  $\mu\text{g/l}$  BAP and 100  $\mu\text{g/l}$  CICP, respectively, diagnostic efficiency (= sum of diagnostic sensitivity and diagnostic specificity) was found to be maximal for discriminating between groups 0 and 1 on the one hand and groups 2 and 3 on the other hand. Accuracy (as determined by the area under the ROC curve) was 0.84 (BAP) and 0.82 (CICP), respectively. For these threshold values the diagnostic sensitivity was 70% (BAP)/81% (CICP); the diagnostic specificity was 89% (BAP)/79% (CICP); the predictive value of a positive test result was 73% (BAP)/63% (CICP); and the predictive value of a negative test result was 87% (BAP)/91% (CICP).

In conclusion, both BAP and CICP may be suitable for detection of bone metastases in patients with malignant tumors. Due to its higher discriminating power, however, BAP seems to be preferable.

## 179 Relationship of inflammatory mediators to peritoneal permeability for macromolecules in patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) without peritonitis

W. Withold<sup>1</sup>, J. Plum<sup>2</sup>, T. Busch<sup>2</sup>, K. Brenner<sup>1,2</sup>, M. Heins<sup>1</sup>, B. Grabensee<sup>2</sup>, H. Reinauer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Clinical Chemistry and Laboratory Diagnostics

<sup>2</sup>Clinic for Nephrology, Heinrich-Heine-University of Duesseldorf

In patients undergoing CAPD the transport of macromolecules is restricted in a size-selective way by the intrinsic permeability of the peritoneal membrane. Little is known, however, about the relationship between the intraperitoneal appearance of inflammatory mediators and the peritoneal permeability (as determined by marker substances for peritoneal membrane characteristics). In 12 CAPD patients not suffering from peritonitis in the preceding three months (dialysate leukocyte count  $< 100/\mu\text{l}$ , dwell time: 2–10 h) we examined the dialysate/serum (plasma) concentration quotients Q of cytokines (IL-6/TNF $\alpha$ ), the soluble (=s) fractions of cytokine receptors (= R) (sIL-6 R/sTNF RI/sTNF RII), adhesion molecules (sVCAM-1/sICAM-1) and arachidonic acid derivatives (PGE<sub>2</sub>) with commercially available radio- and enzyme immunoassays (AMI/R&D Systems/British Bio-Technology Products). The dialysate/serum ratios of the permeability markers albumin, IgG and  $\beta_2$ -microglobulin were determined immunonephelometrically (albumin/IgG) as well as by the MEIA technology ( $\beta_2$  microglobulin).

A linear relationship is given between the hydrodynamic radii r of the permeability markers and their concentration quotients when plotted on a double logarithmic scale:  $\log Q = -0.22 - 2.18 \log r$  [nm]. There was also a strong linear relationship between the Q values of TNF $\alpha$ , sIL-6 R, sTNF RI, sTNF RII, sICAM-1 and sVCAM-1 and the concentration quotient of albumin ( $p < 0.01$ ; range of r: 0.77–0.98). In contrast, neither  $Q_{\text{IL-6}}$  (range: 1.4–30.0; mean: 11.8) nor  $Q_{\text{PGE}_2}$  (range: 0.11–1.06; mean: 0.45) did significantly correlate with  $Q_{\text{Alb}}$  ( $p > 0.1$ ).

In conclusion, in CAPD patients without peritonitis appearance of inflammatory mediators in dialysate seems to be mainly due to diffusion across the peritoneum. Evidence of local synthesis is given for IL-6. Lack of correlation between  $Q_{\text{Alb}}$  and  $Q_{\text{PGE}_2}$  may be due to the fact that the concentration quotients of molecules with low relative molecular mass rather reflect the effective surface area than the intrinsic permeability of the peritoneal membrane.

## 180 Bestimmung der Aminopropeptid Typ III Prokollagen (P<sub>III</sub>NP) Serumkonzentration bei 4 Patienten mit „Venocclusive Disease“, (VOD) nach Knochenmarktransplantation (KMT)

Ch. Wolf, B. Hertenstein\*, R. Wennauer, H. Heimpel\*, A. Grünert  
Inst. f. klinische Chemie, Abt. \*Innere Med III; Univ. Ulm

Leberfunktionsstörungen nach KMT (ca. 50% der Patienten) sind durch Medikamententoxizität, VOD, „Graft Versus Host Disease“ (GVHD) oder infektionsbedingte Hepatitis bedingt. Für die VOD existiert bislang keine etablierte Labordiagnostik. Das klinische Bild einer VOD findet sich nach allogener (20–30%) wie nach autologer (5–15%) KMT. Die Diagnosesicherung erfolgt momentan histologisch. Dies ist kurz nach einer Knochenmarktransplantation risikant. Aktuelle Untersuchungen beschreiben erhöhte P<sub>III</sub>NP Serumkonzentrationen (sc) bei VOD-erkrankten Patienten. Wir untersuchten 5 KMT-Patienten mit Leberfunktionsstörung (VOD: n = 4, akute GVHD: n = 1) und 10 unauffällige KMT-Patienten (C). Über 20 Tage bestimmten wir die P<sub>III</sub>NP-sc (RIA)1 und klinisch-chemische Kenngrößen der Leberfunktion. Virale Hepatiden oder Medikamententoxizität waren nicht nachweisbar. Neben unspezifischen klinischen

Symptomen waren erköhte klinisch-chemisch T-Bil- und  $P_{mNP}$ -sc die frühesten Kennzeichen der Funktionsstörung/VOD. Bei VOD stieg die  $P_{mNP}$ -sc kontinuierlich auf  $42.2 \pm 1.1 \mu\text{g/l}$  ( $\pm$  SD; Referenzbereich: 0 - 6  $\mu\text{g/l}$ ), bei GVHD erreichte die  $P_{mNP}$ -sc kurzfristig 22.7  $\mu\text{g/l}$ . Bei C fanden sich keine Veränderungen.

Tag n. KMT	0	4	10	20
VOD	$6.1 \pm 0.2$	$14.5 \pm 0.9$	$46.4 \pm 6.2$	$42.2 \pm 1.1$
GVHD	7.2	22.7	9.5	11.9
C	$4.3 \pm 1.5$	$13.5 \pm 2.1$	$8.9 \pm 1.7$	$6.7 \pm 2.8$

Bei VOD ist die  $P_{mNP}$ -sc über mehrere Tage deutlich erhöht. Die  $P_{mNP}$ -sc ist eine frühzeitig veränderte Kenngröße. Die eindeutige Zuordbarkeit dieses Indikators zu der Diagnose VOD ist mit bislang vorliegenden Daten nicht möglich.

1. Risteli, J., et al. (1988): Clin. Chem. 34: 715 - 718.

## 181 Screening for viruses and plasmodium falciparum by „multiplex PCR“ assays in blood donors from Namibia

C. Wolff, D. Hörschemeyer, K. Seidel\*, K. Kleesiek  
 Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin, Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen, Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum, 32545 Bad Oeynhausen; \*Blood Transfusion Service of Namibia, Windhoek, Namibia

Transmission of virus infections via donated blood may occur during many weeks before seroconversion. The probability of such an event is directly linked to the prevalence of such infections in the donor population. Therefore, donated blood should be screened for viraemia in order to avoid virus transmission. In regions with endemic malaria, donated blood should also be screened for the presence of plasmodium falciparum.

The polymerase chain reaction (PCR) permits the detection of very small numbers of viruses or plasmodia by in vitro nucleic acid amplification. We developed a set of oligonucleotides specific for HBV, HCV, and HIV 1 genomic RNA and DNA which enables the simultaneous detection of these viruses by nested PCR in one multiplex PCR assay, and used it for the screening of donated blood. Another multiplex nested PCR system combined specificity for HIV 1 and plasmodium falciparum.

We investigated 2585 unselected blood donors from the northern part of the country. HIV 1 provirus DNA was detected in 12 (0,5%) donors, of whom 9 (0,35%) also had HIV 1 RNA in the plasma. 16 donors (0,6%) were anti-HIV 1 positive, including all 12 donors positive by PCR. No donor was positive for HIV 1 P24 antigen. No HIV 1 infected donor was detected in serolatenzy. HCV RNA was detected in none of 9 (0,35%) anti-HCV positive donors. However only the plasma fraction was tested in this survey. The wide spread of hepatitis B was reflected in 1239 (47,9%) anti-HBc positive donors, of whom 105 (4%) were H BsAg positive, 10 of these donors (0,39%) were HBV DNA positive. No donor was detected in hepatitis B serolatenzy. Plasmodium falciparum was detected in 11 donors (0,4%), of whom 8 had donated 2 - 3 months after the rainy season.

Our results reflect the efficiency of stringent donor selection in combination with serologic screening in these donors, and the usefulness of a direct test for plasmodium falciparum. It was demonstrated that screening of donated blood by PCR is practicable.

## 182 Monitoring of heart transplant patients for CMV replication by nested PCR

C. Wolff, M. Skurtopulos, K. Kleesiek  
 Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin, Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen, Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum, Bad Oeynhausen, Germany

A single-tube nested PCR with a detection limit of a single infected cell, which may be completed within six hours, was used for the determination of CMV DNA in the peripheral blood of HTX patients, under cyclosporin A therapy (n = 94), and of healthy anti-CMV positive blood donors (n = 1000). 232 blood samples from the HTX patients were assayed for CMV DNA in leukocytes and plasma, for CMV pp 65 antigen in peripheral blood leukocytes, and for anti-CMV IgM.

Primary CMV infections and CMV reactivations showed the same diagnostic pattern: CMV DNA appeared first in peripheral leukocytes, then in plasma, followed by CMV pp 65 antigen in peripheral blood granulocytes, and eventually by anti-CMV IgM.

No CMV DNA was detected in 158 blood samples from asymptomatic HTX patients. 30 samples contained CMV DNA only in leukocytes, they were all obtained from asymptomatic patients. 44 samples contained CMV DNA in leukocytes and in the plasma fraction; these samples were all from symptomatic patients with CMV disease and/or graft rejection. Only 13/44 samples were also positive for CMV pp 65 antigen.

No CMV DNA was detected in the peripheral blood of 1000 healthy anti-CMV positive blood donors.

In conclusion, CMV DNA in peripheral blood is a marker of CMV disease (reactivation or primary infection), and not of asymptomatic persistence of the virus. CMV specific PCR, which detects CMV DNA in the peripheral blood leukocytes already at very low levels, is therefore the appropriate method for the monitoring of CMV replication in immunosuppressed HTX patients.

## 183 Rapid screening for transfusion-relevant viruses with single tube nested PCR and multiplex PCR

C. Wolff, D. Hörschemeyer, K. Kleesiek  
 Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin, Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen, Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum, Bad Oeynhausen, Germany

Transmission of virus infections during serolatenzy is a serious problem in transfusion and transplantation medicine. A rapid direct detection method for viruses is therefore required. The polymerase chain reaction (PCR) permits the detection of nucleic acids with great specificity and sensitivity, but present standard PCR techniques have two major drawbacks: (1) They require too much work and too much time, since every infectious agent requires a PCR of its own (2) they are prone to self-contamination with amplified nucleic acids („carry-over“).

We used two approaches to overcome these problems: (1) Multiple PCR assays on one sample were united in one multiplex PCR assay. (2) Nested PCR was performed within a single tube with preformulated vitrified reagents. We found EDTA blood to be the best test material: HIV 1 DNA and HCV (-) strand RNA are found in leukocytes, and HBV DNA, HIV 1 RNA and HCV RNA in plasma.

Multiplex PCR: We combined the specificities for (1) hepatitis B virus (HBV), HCV cDNA and HIV provirus DNA, (2) CMV and HIV provirus DNA in two multiplex PCR assays. Handling time was thus reduced by 66 and 50%, respectively. Oligonucleotide primers were designed which did not interact with each other, and the lower detection limits were determined: HBV ca. 100 particles, HCV ca. 160 particles, HIV

and CMV: One infected cell. These PCR systems were used to screen Namibian blood donors.

Single tube nested PCR: Preformulated reagent mixes for first and second round PCR were spotted into bottom and top of reaction tubes and vitrified by air drying in the presence of trehalose. Target DNA was introduced, and after first round PCR, the second round was started by inverting the tubes, dissolving the reagent mix, and reverting the closed tubes before second round PCR. This procedure cuts handling time by about one hour and completely excludes the problem of amplificate carry-over. Sensitivity was improved by transferring the whole volume of the first round PCR. The detection of HIV provirus DNA is the most sensitive signal of the virus infection. These techniques permit the detection of transfusion-relevant viruses within six hours.

## 184 Durchflußzytometrische Bestimmung der Myeloperoxidase (MPO) und ihrer Freisetzung aus Granulozyten nach Behandlung mit fMLP

M. Zipfel, G. Bruchelt, T.L. Carmine, D. Niethammer  
Univ. Kinderklinik, Abteilung für Hämatologie und Onkologie,  
72070 Tübingen

Neutrophile Granulozyten und Monozyten werden in der durchflußzytometrischen Analyse mit Hilfe des Technicon-H3 (Bayer Diagnostics) u. a. über die Bestimmung der Aktivität der Myeloperoxidase charakterisiert. Dieses Enzym ist in den azurophilen Granula gespeichert und kann physiologischerweise durch chemotaktische Faktoren teilweise freigesetzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob diese Freisetzung durch in vitro Inkubation von isolierten Granulozyten bzw. von Vollblutproben mit N-fMet-Leu-Phe (fMLP) mit Hilfe des H3 charakterisiert werden kann, wobei die in den Granulozyten verbleibende Aktivität gemessen wird. Parallel dazu wurde die freigesetzte MPO enzymatisch, mit Hilfe eines EIA und über Luminol verstärkte Chemilumineszenz gemessen. Granulozyten wurden mit Hilfe eines 2-Stufen Gradienten (Histopaque, Sigma) isoliert. Inkubation der isolierten Zellen mit 10<sup>-7</sup>M fMLP über 20 Minuten führte zu einer deutlich meßbaren Abnahme zellulären MPO (Abnahme des MPXI, mittlerer Peroxidase-Index) und zu einem MPO Anstieg im Zellüberstand. Vollblutproben wurden teilweise unbehandelt, teilweise nach 2stündiger GM-CSF Vorinkubation mit fMLP inkubiert. Vollblut, das nicht mit GM-CSF vorinkubiert wurde, zeigte am H3 innerhalb der ersten 5 Minuten einen signifikanten Anstieg der neutrophilen MPO Aktivität, die anschließend allmählich unter die Ausgangswerte abfällt. GM-CSF vorbehandelte Proben reagierten gleich mit meßbarer Abnahme der zellulären MPO Aktivität. Eine praktisch sofortige und vollständige Entleerung der zellulären MPO nach Verabreichung von fMLP erfolgte, wenn das Vollblut mit Cytochalasin B vorinkubiert wurde. Die Daten dieser Untersuchungen zeigen, daß mit Hilfe des H3 eine Charakterisierung der Freisetzung von MPO aus Granulozyten möglich ist. Die erhaltenen Daten weisen darauf hin, daß es durch die Bindung des Chemotaktikums vor der Freisetzung der MPO möglicherweise zu einer Aktivierung des Enzyms kommt.

## 185 FACS-analysis of peripheral blood lymphocytes in lung transplant recipients

A. Zott<sup>1</sup>, T. Sichrovsky<sup>2</sup>, A. Griesmacher<sup>1</sup>, W. Klepetko<sup>1</sup>,  
M.M. Müller<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Cardiothoracic Surgery, University of Vienna; <sup>2</sup>Dept. of Laboratory Diagnostics, Kaiser-Franz-Josef Hospital, Vienna

### Introduction

Until today diagnosis of lung graft rejection is difficult and to some extent imprecise being based on roentgenological and clinical findings only. In a retrospective study on 50 patients after lung transplantation we evaluated the lymphocytes and their subsets in peripheral blood in order to investigate immunological activation during episodes of rejections and infections. Different percentages and/or absolute numbers of circulating immunocompetent cells should reflect the postoperative course.

### Methods and Material

199 observations taken from 50 patients after lung transplantation were investigated. Lymphocyte count was performed with a blood cell counter. Lymphocyte subsets were measured by means of flow cytometry (FACScan flow cytometer; Becton Dickinson). Fluorochrome-labeled antibodies against the following cell surface markers were applied: CD 3, CD 4, CD 14, CD 16, CD 19, CD 45, CD 56 and HLA-DR (Becton Dickinson).

### Results

Comparing the groups with complications to the control group some statistical significant differences were observed: The infection group showed lower percentage of lymphocytes, decreased absolute T-cell count as well as cytotoxic T-lymphocyte count and percentage; the two latter ones were also decreased in comparison to the rejection group. Furthermore B-lymphocytes (count and percentage) were increased during rejection episodes.

### Discussion

On basis of the obvious changes of peripheral blood lymphocyte subsets during postoperative complicated course there might be the chance to support diagnosis of rejections and infections in transplant recipients by FACS analysis. In addition individual as well as multivariate treatment of data obtained might improve the diagnostic validities.

## 186 Quantitative Leberfunktionstests und spenderspezifische Faktoren in der Vorhersage der frühen postoperativen Transplantatfunktion

R.B. Zott<sup>1</sup>, T. Müller<sup>2</sup>, J. Erhard<sup>2</sup>, R. Lange<sup>3</sup>, M. Beste<sup>2</sup>,  
J. v. Schönfeld<sup>2</sup>, B. Schöttler<sup>1</sup>, N. Breuer<sup>2</sup>, H. Goebell<sup>2</sup>, F.-W. Eigler<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institut für Blutgerinnungswesen und Transfusionsmedizin;

<sup>2</sup>Universitätsklinikum Düsseldorf, Abt. für Gastroenterologie und

<sup>3</sup>Abt. für Allgemeinchirurgie, Universitätsklinikum Essen

### Fragestellung

Für die Beurteilung der präoperativen Spenderleberfunktion konnte der Lidocainmetabolit MEGX15, gemessen 15 Minuten nach i.v. Infusion von Lidocain, als prognostischer Indikator identifiziert werden (1). Ziel der vorliegenden Studie war es, neue spenderspezifische Faktoren zur Vorhersage der postoperativen Transplantatfunktion zu erfassen.

### Methodik

Bei 51 Organspendern wurden die folgenden dynamischen Leberfunktionstests durchgeführt: MEGX 15, 30 und 60 Minuten nach Infusion, das Maximum von MEGX (MEGXmax), Lidocain-HWZ, ICG-HWZ, GEK. Als weitere Spender-Parameter wurden analysiert: Alter, Geschlecht, Zahl der Tage auf Intensivstation, Zeit nach Hirn-

tod, Hb, PTT, TPZ, Fibrinogen, ATIII, GOT, GPT, GLDH, GGT, Bilirubin, makroskopischer Aspekt der Leber, Kalt- und Warmischämiezeit. Die Leberfunktion nach Transplantation wurde als gut klassifiziert, wenn die TPZ bis Tag 4 über 65% oder die Fibrinogenkonzentration bis Tag 7 über 300 mg/dl betrug.

#### Ergebnisse

Die Parameter MEGX60 (Effizienz = 67%), MEGXmax (Effizienz = 64%), MEGX30 (Effizienz = 64%) und MEGX 15 (Effizienz = 59.5 %) wurden in nicht parametrischen Testverfahren als signifikante ( $p < 0.05$ ) prognostische Indikatoren identifiziert. Eine Optimierung der Trennfunktion konnte mittels einer schrittweisen Diskriminanzanalyse unter gleichzeitiger kombinierter Verwendung der Parameter MEGX15, MEGX30 und MEGX60 erreicht werden (Effizienz = 74%). Keine der anderen präoperativen Kenngrößen diskriminierte auf signifikantem Niveau zwischen guter und schlechter postoperativer Transplantatfunktion.

#### Schlußfolgerung

Unsere Ergebnisse bestätigen die Überlegenheit von MEGX im Vergleich zu anderen Leberfunktionstests für die Prognose der frühen postoperativen Transplantatfunktion. Die hier erstmals untersuchte MEGX Kinetik über 60 Minuten ermöglicht eine bessere Diskriminierung, als die bisher übliche Messung nach 15 Minuten.

#### Literatur:

1. Transplant Proc 23 (1991): 1575 - 1578.

Nach Redaktionsschluß eingegangen:

## 187 Grundlagen diagnostischer Strategien allergischer Erkrankungen

H. Renz

Institut für Klinische Chemie und Biochemie  
Universitätsklinikum Rudolf Virchow  
Spandauer Damm 130, 14050 Berlin

In den letzten Jahren wurden erhebliche Fortschritte in dem Verständnis der Immunpathogenese allergischer Erkrankungen gewonnen. Hierzu zählt insbesondere die Erkenntnis, daß CD4-positive T-Zellen ganz wesentlich an der Ausbildung der Allergie beteiligt sind. Sie sind charakterisiert durch eine überschießende Interleukin-4- (IL-4) und unterdrückte Interferon Gamma- (IFN- $\gamma$ ) Produktion. Über diese Achsen wird die Ausbildung der allergischen Reaktion ganz wesentlich kontrolliert. Aus diesen und anderen Erkenntnissen ergeben sich über die gegenwärtig vorhandenen diagnostischen Strategien hinaus neue Ansätze für die Diagnose allergischer Erkrankungen. Hierzu zählt die qualitative und quantitative Analyse der Allergenexposition, die Messung der Zytokinproduktion, die Analyse von Produkten, die aus eosinophilen Granulozyten freigesetzt werden. Hierzu zählt z.B. das Eosinophile Cationische Protein (ECP). Neben diesen relativ neuen diagnostischen Ansätzen steht nach wie vor im Mittelpunkt die qualitative und quantitative Analyse des Gesamt-IgE's und der allergenspezifischen IgE-Antikörper. Verbesserung der Meßmethodik und Standardisierung der eingesetzten Antigene führen hierbei in letzter Zeit zu einer erheblichen Verbesserung in der Interpretation der Testergebnisse.

## Verschiedenes

**AIP** von Laborarztpraxis mit angeschlossener Laborgemeinschaft in Kaiserslautern für sofort oder später gesucht. Weiterbildungsermächtigung liegt vor.

Angebote unter Chiffre-Nr. 2633 an den Verlag.

Zuschriften bei Chiffre-Anzeigen bitte an:  
**Verlag Kirchheim + Co GmbH**  
Postfach 25 24, 55015 Mainz

**Klin. Chemiker**, prof. Wissen i. allen Bereichen d. Labormedizin, Administration (EDV), Laborrationalisierung, Umweltanalytik, > 15jährige Berufserfahrung i. führ. Pos. u. Mitarbeiterführung, belastbar, pragmatisch, sucht neuen Aufgabenbereich in Klinik o. Privatlabor.

Angebote unter Chiffre 2630 an den Verlag Kirchheim Postfach 25 24, 55015 Mainz

### Achtung! Aus Fachlaborauflösung div. Analysengeräte

Z. B. neuwert. kpl. Olympus-BH2 Fluor-Mikroskop, Sysmex CC-780 Cellcounter, Epend. Flamme FCM 6341, Epend. PCP 6121, etc. zu inter. Kond. abzugeben. Geräte sind d. Service i. einwandfreiem techn. Zustand.

Info: ☎ (0 81 31) 5 83 98  
Fax (0 81 31) 5 83 98