

Kongreß für Laboratoriumsmedizin, Frankfurt 7. bis 9. 5. 1991

Abstracts der Posterpräsentation

P 1

Automatisierte enzymatische Bestimmung der Gallensäuren in Duodenalflüssigkeit und Stuhl mit einem Zentrifugalanalyser

A. Pickert*, E. Wolgast* und M. Müller**

Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Medizinische Klinik und Poliklinik

* Abt. IV (Direktor: Prof. Dr. M. Eggstein) und

** Abt. I (Direktor: Prof. Dr. W. Dölle)

Reagentien für die enzymatische Bestimmung von Gallensäuren im Serum sind kommerziell erhältlich. Das Testprinzip beruht auf der spezifischen enzymatischen Oxidation der 3 α -Hydroxygruppe am Steroidgerüst durch 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3 α -HSD), da 95% bis 99% aller Gallensäuren eine freie 3 α -Hydroxygruppe am Steroidgerüst tragen. Primäre Gallensäuren haben zusätzlich eine 7 α -Hydroxygruppe am Steroidgerüst; mit 7 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (7 α -HSD) können die primären Gallensäuren bestimmt werden. Die enzymatische Methode erlaubt auch andere Materialien wie Duodenalsekret oder Stuhl zu untersuchen. Die Testdurchführung läßt sich an mechanisierte Analysegeräte adaptieren. Hierdurch werden der Reagentienverbrauch, die Praktikabilität und die Präzision verbessert. Die Untersuchung von Stuhlproben wird durch ein für die Chymotrypsin-Bestimmung im Stuhl entwickeltes, patentiertes Extraktionsgefäß wesentlich vereinfacht. Die Untersuchung von Galle bzw. Duodenalflüssigkeit wird durch den Einsatz eines für den Nachweis von Lamblien entwickelten Extraktionsfadens (Enterotest®) vereinfacht.

In Wiederfindungsexperimenten (Gallensäuren in wässriger Lösung) wurden im Mittel nur 55%, bezogen auf einen Standard mit Serum-Matrix, gefunden. Dieser Effekt läßt sich weder durch die Zugabe von Albumin noch durch Detergenz kompensieren. Für Gallensäurenbestimmungen in wässrigem Milieu muß daher ein geeigneter Standard angewendet werden. Fett, Bilirubin, und das als Medikament bei Patienten mit Fettstoffwechselstörungen häufig eingesetzte Colestyramin stören bei unserem Extraktions- und Nachweisverfahren die Bestimmung der Gallensäuren nicht. Die Impräzision der Gallensäurebestimmung in wässriger Matrix betrug von Tag zu Tag 2,3% für die 3 α -HSD und 3,7% für die 7 α -HSD. Die Impräzision der Gallensäurebestimmung einschließlich Extraktion aus Stuhlproben betrug in einer artefiziellen Kontrollprobe mit erhöhter Gallensäurenkonzentration von Tag zu Tag 9% für die 3 α -HSD und 27% für die 7 α -HSD.

Entgegen entsprechenden Vorschlägen in der Literatur fand sich im mittels Enterotest®-Faden gesammelten Duodenalsekret von sieben Probanden eine sehr variable 3 α -Hydroxygallensäurenkonzentration von 0 bis 521 μ mol/l. Das Ergebnis läßt sich dahingehend deuten, daß bei einzelnen Probanden der Faden nicht oder nur geringfügig mit Gallenflüssigkeit in Kontakt kam. Um klinisch verwertbare Aussagen zu gewinnen, müßten die Applikation des Fadens standardisiert und der Gallefluß z. B. durch eine Injektion von Cholezystokinin stimuliert werden. Die Stuhlgallensäuren bei 20 gesunden Probanden waren erwartungsgemäß niedrig mit einem Mittelwert von 0,7 μ mol/g für die 3 α -Hydroxygallensäuren (δ = 0,5 μ mol/g) und einem Mittelwert von 0,5 μ mol/g für die 7 α -Hydroxygallensäuren (δ = 0,5 μ mol/g). Bei 54 unselektierten Patienten mit Morbus Crohn fanden sich meist deutlich erhöhte Werte von (Mittelwert) 4,8 μ mol/g (δ = 5,3 μ mol/g) für die 3 α -Hydroxygallensäuren und 3,8 μ mol/g für die 7 α -Hydroxygallensäuren (δ = 3,9 μ mol/g). Schlüsselt man die Daten weiter auf, so handelt es sich überwiegend um Patienten mit Ileumresektion.

P 2

Automatisierte enzymatische Bestimmung der Gallensäuren im Serum mit einem Zentrifugalanalyser – Verlaufsbeobachtungen nach ERCP und PTC

A. Pickert*, S. Assmann* und M. Scheurlen**

Eberhard-Karls-Univ. Tübingen, Med. Klinik und Poliklinik

* Abt. IV (Direktor: Prof. Dr. M. Eggstein) und

** Abt. I (Direktor: Prof. Dr. W. Dölle)

Für die Untersuchungen wurde die enzymatische Bestimmung von Gallensäuren im Serum neu validiert, da alle bisher beschriebenen Verfahren für den täglichen Routinegebrauch in einem klinisch-chemischen Zentrallabor ungeeignet sind. Die Gallensäuren im Serum wurden als 3 α -Hydroxygallensäuren mit der gebrauchsfertigen Testkombination eines Reagentienherstellers bestimmt; zusätzlich wurden mit der 7 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase die primären Gallensäuren bestimmt. Für die Messung wurde ein für den Cobas-Fara II (Roche, Diagnostika) geeignetes Analysenprotokoll entwickelt. Da ein Probenleerwert nicht programmierbar war, wurde die Methode mit einer zweistufigen Auswertung versehen. Die Wiederfindung von Gallensäuren (gallensäurefreies Serum mit Addition definierter Gallensäuren) betrug im Mittel 80% bei den primären Gallensäuren und 60% bei den sekundären Gallensäuren, trotz Verwendung eines Standards auf Serum-Basis. Die Impräzision der Gallensäurenbestimmung im Serum betrug von Tag zu Tag 4,3% für die 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase und 8% für die 7 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase. Hämoglobin und urämische Toxine zeigten keinen negativen oder positiven Störeffekt auf die Bestimmung. Eine Hyperlipidämie verursachte falsch-negative Werte, wenn nicht ein Schwellenwert für die Ausgangsextraktion im Analysengerät programmiert wurde, da die Reaktion wegen des hohen Probenvolumens sehr empfindlich auf Trübungen reagiert. Bilirubin hat einen meßbaren Einfluß auf die Gallensäurenbestimmung. Bei niedriger Gallensäurekonzentration ist der Einfluß stärker als bei hoher, die negative Abweichung der Meßwerte beträgt maximal 15%. Durch Verdünnen der Seren kann der Effekt nicht kompensiert werden.

Bei gesunden Probanden war die Gallensäuren-Konzentration im Serum unabhängig vom Zeitpunkt der letzten Nahrungsaufnahme. Als Normbereich (\pm 2s-Bereich) für nüchtern und postprandial abgenommene Seren wurden für die 3 α -Hydroxygallensäuren 0 bis 9,5 μ mol/l und für die 7 α -Hydroxygallensäuren 0 bis 8,3 μ mol/l ermittelt. In einigen Verlaufsbeobachtungen nach ERCP und PTC zeigte sich nach erfolgreicher Beseitigung einer Cholestase durch eine nasobiliäre Sonde, interne oder externe Drainage ein differenziertes Bild der Cholestase anzeigenden klinisch-chemischen Parameter im Serum. Die Gallensäuren fallen mit einer Halbwertszeit von wenigen Stunden ab, während beim Bilirubin und den Cholestase-Enzymen in diesem kurzen Zeitraum noch keine signifikanten Änderungen auftreten. Bei komplikationslosem Eingriff mit erfolgreicher Beseitigung der Cholestase normalisieren sich die Gallensäuren-Konzentrationen innerhalb von zwei Tagen, während Bilirubin und die cholestaseanzeigenden Enzyme noch mehrere Tage deutlich erhöht bleiben. Gelingt die Beseitigung einer Cholestase nur unvollständig, so bleiben die Gallensäuren, Bilirubin und Cholestase-Enzyme erhöht, der Abfall der Gallensäuren verläuft wesentlich langsamer (Halbwertszeit von Tagen). Kommt es zu Occlusion einer zuvor durchgängigen Drainage, so steigen zunächst die alkalische Phosphatase und die Gallensäuren, später das Bilirubin und mit geringer Verzögerung auch die γ -Glutamyl-Transferase erneut an.

Verbesserte Transaminasen-Bestimmung auf der Mikrotiterplatte

J. Spindler und J. Neppert
Blutspendezentrale Mannheim des DRK-Blutspendedienstes
Baden-Württemberg

Ein neues Verfahren und neue Geräte wurden entwickelt, um die Transaminasen-(GPT-)Bestimmung auf der Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen zu verbessern. Dabei werden die Seren und Reagenzien mit einer computergesteuerten 96-Kanal-Pipette verteilt. Die so verteilten Volumina zeigen eine sehr kleine Variation. Der Variations-Koeffizient (V) ist 0,6%, $n = 96$. Wiederholte Füllungen mit der 96-Kanal-Pipette lassen eine gute Reproduzierbarkeit der verteilten Volumina erkennen ($V = 0,5\%$, $n = 10$). Die Temperatur der Seren, Reagenzien und Gemische wird auch während der Fotometrie sowohl durch Kühlung als auch durch Wärmung auf 25°C in Spezialekammern geregelt ($25,0 \pm 0,05^\circ\text{C}$). GPT-Werte zeigen ebenfalls geringe Variation im niedrig-normalen ($V = 2,1\%$) und im hoch-pathologischen Bereich ($V = 2,3\%$), wenn Teilmengen derselben Probe simultan oder nacheinander untersucht werden. Gute Korrelation besteht auch zwischen der verbesserten Methode unter Verwendung der neuen 96-Kanal-Pipette und konventionellen Methoden ($r > 0,9900$) für GPT-Werte von 1 bis 154 U/l. Falsch-hohe und falsch-niedrige Werte werden durch ein spezielles EDV-Programm durch Auswertung vieler Einzelbestimmungen während der kinetischen Änderungen einer jeden Probe ausgeschlossen. Die neue Methode ist präzise und einfach, spart Zeit und könnte allgemeine Bedeutung für die Bestimmung anderer Serumbestandteile haben.

Performance des Analysensystems Boehringer Mannheim/Hitachi 747 – Ergebnisse verschiedener Evaluierungsstudien –

A. Hollmann, R. Koberstein, B. Sowodniok und W. Stockmann
Boehringer Mannheim GmbH

Das neue Analysensystem Hitachi 747 ist für große Labors konzipiert. Es erreicht einen Durchsatz von maximal 3300 Analysen pro Stunde. Am System können 35 verschiedene Analyten einschließlich der Elektrolyte bestimmt werden. Die Ergebnisse verschiedener Evaluierungsstudien werden dargestellt (1, 2). Die Prüfprotokolle beschreiben bei kompletter Durchführung folgende Aufgaben: Präzision in der Serie, Präzision von Tag zu Tag, Linearität, Drift, Verschleppung, Interferenzen und Richtigkeit.

Durch die Untersuchungen wurden Erfahrungen über ein weites Spektrum von Methoden (klinische Chemie, Elektrolyte, homogene Immuno-Assays) gesammelt. Probenmaterialien waren Sera, Plasmen sowie Urine.

Die Variationskoeffizienten (VK) für die Präzision in der Serie sind für die klinisch-chemische Analyte $< 2\%$, für die ISE-Methoden $< 1\%$ und für die untersuchten homogenen Immuno-Assays $< 5\%$ in verschiedenen Konzentrationsbereichen. Entsprechend sind die VK für die Präzision von Tag zu Tag im Schwerpunkt $< 3\%$, $< 2\%$ bzw. $< 8\%$. Die Linearitätsmessungen ergaben für die meisten Analyten einen hinreichend großen Meßbereich, so daß nur vereinzelt Wiederholungsanalysen notwendig sind. Signifikante Drifteffekte über den Meßtag wurden nicht beobachtet. Des weiteren zeigten die Driftexperimente (Analyte klinische Chemie), daß ein wöchentliches Einspülen von Reagenz (Primen) ausreichend ist. Das System verhält sich robust gegenüber Reagenz- und Probenverschleppung. Interferenzstudien ergaben, daß nur bei wenigen Methoden durch Hämolyse (CK) und Ikterie (Creatinin-Jaffe) relevante Störungen auftreten können. Die Studien zur Richtigkeit zeigten, daß die Sollwerte der eingesetzten Kontrollseren innerhalb eines Bereiches von $\pm 10\%$ wiedergefunden wurden. Die Vergleiche zu den Routinemethoden erbrachten in den meisten Fällen gute Übereinstim-

mungen mit Steigungskoeffizienten zwischen 0,95 und 1,05 bei vernachlässigbaren Achsenabschnitten. Vereinzelt beobachtete größere Diskrepanzen können durch unterschiedliche Methoden bzw. Standardisierung erklärt werden.

Die Ergebnisse bescheinigen dem Hitachi 747 Analysensystem eine ausgezeichnete Performance. Positiv bewertet werden die Benutzerfreundlichkeit und Praktikabilität.

Schrifttum:

1. POPPE, W., HOLLMANN, A., STOCKMANN, W.: Clin. Chem. 36, 1195 (1990).
2. BONINI, P., CERIOTTI, F., KELLER, F., PASCUAL, C., GARCIA BELTRAN, L., VONDER-SCHMITT, D. J., PEI, P., BABLOK, W., POPPE, W., STOCKMANN, W.: Biochimica clinica, Suppl. 2/14, 14, 59 (1990).

Technische Evaluierung eines vollmechanisierten HPLC-Systems

D. Hannak und R. Kattermann
Institut für klinische Chemie am Klinikum der Stadt Mannheim

Für die Bestimmung von Medikamenten im klinisch-chemischen Labor werden meist immunchemische Tests verwendet, die bei Adaptation auf vollmechanisierte Analysensysteme schnell durchführbar sind, aber ein eingeschränktes Methodenspektrum aufweisen. Mit der Flüssichromatographie (HPLC) lassen sich fast alle Substanzen quantitativ bestimmen. Die chromatographischen Methoden weisen eine höhere Spezifität auf, sind aber für die Routineanalytik meist zu arbeitsaufwendig und erfordern zudem hochqualifiziertes Personal. Für die klinisch-toxikologische Analytik ist ein vollmechanisiertes HPLC-System (Remedi, Fa. BIO-RAD, München) entwickelt worden mit integrierter Probenvorbereitung und Auswertung des Chromatogramms über ein Datensystem mit Vorschlägen für die Identifizierung der Substanzen anhand der Retentionszeit und der gespeicherten UV-Spektren (1). Bei der technischen Erprobung des Geräts in unserem Institut über einen Zeitraum von drei Wochen haben wir folgende Ergebnisse erhalten:

Die Handhabung des Systems ist einfach und schnell erlernbar. Innerhalb von 25 Minuten liegt das semiquantitative Analyseergebnis vor. Entgegen der Empfehlung des Herstellers wurde versuchsweise keine besondere Probenvorbereitung durchgeführt, daher war ein Vorsäulenwechsel nach ca. 100 (statt 200) Injektionen erforderlich. Der Säulenwechsel läßt sich problemlos ohne Werkzeug selbst durchführen. Bei der qualitativen Peakerkennung gibt es in der ersten Software-Version z. T. noch Probleme, wenn sehr niedrige oder sehr hohe Konzentrationen vorliegen: die Substanzen finden sich in der Vorschlagsliste, die endgültige Festlegung wird aber nicht getroffen, auch wenn die UV-Spektren bei manueller Überprüfung der im System abgespeicherten Daten gut übereinstimmen.

Eine Quantifizierung ist anhand der Peakflächen der Substanzen relativ zu den inneren Standards des Systems auch im von uns getesteten qualitativen Modus möglich. Bei der Bestimmung von Flecainid und Chinidin ergaben sich ausreichende Empfindlichkeit und gute Übereinstimmung zur Vergleichsmethode FPIA. Für Chlorpheniramin (3 mg/l) betrug die Impräzision in der Serie ($n = 6$) 12,0% VK, von Tag zu Tag ($n = 12$) 19,1% VK. Nach unseren Erfahrungen läßt sich das System auch zum Drug Monitoring speziell für basische Substanzen einsetzen.

Schrifttum:

1. BINDER, S. R., REGALIA, M., BIAGGI-McEACHERN, M., MAZHAR, M.: J. Chromatogr. 473, 325-341 (1989).

Einfache quantitative Bestimmung von Sotalol in Serum mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie

S. Humfeld, F. Susanto und H. Reinauer
Abt. f. Klin. Biochemie des Diabetes Forschungsinstitutes
an der Universität Düsseldorf
Auf'm Hennekamp 65, 4000 Düsseldorf 1

Sotalol ([RS]-4'-[1-Hydroxy-2-isopropylaminoethyl]methan-sulfonamid) ist ein spezifischer beta-Adrenozeptorenblocker und wird zur Behandlung von ventrikulären und supraventrikulären Tachyarrhythmien eingesetzt.

Voraussetzung für eine quantitative gaschromatographische Bestimmung von Sotalol aus biologischem Material ist eine Derivatisierung, da der zu untersuchende Stoff aktive funktionelle Gruppen aufweist, die zu starken Adsorptionen auf der Säule und dem Auftreten von Tailing führen. Eine solche Derivatisierungsreaktion ist allerdings zeitaufwendig.

Diese Arbeit beschreibt daher eine einfache hochdruckflüssigkeits-chromatographische Methode mittels Fluoreszenz-Detektion zur Bestimmung von Sotalol im Serum unter Verwendung von Metoprolol ([RS]-1-Isopropylamino-3-[4-(2-methoxyethyl)-phenoxy]-2-propanol) als interner Standard.

Die Probenvorbereitung für eine Analyse mit der Hochdruckflüssigkeitschromatographie benötigt keine Derivatisierungsschritte. Die Extraktion erfolgt mit einer flüssig-flüssig Extraktion bei pH 12 mit Ethylacetat.

Für die Untersuchung der Richtigkeit und der Präzision dienten aufgestockte, medikamentenfreie Plasmaproben (n = 50) im Konzentrationsbereich von 50 bis 5000 ng/ml. Die Wiederfindungsrate lag im Durchschnitt bei 98 %.

Es ergab sich ein durchschnittlicher Variationskoeffizient von 3,3% für die Plasmaanalysen im therapeutischen Bereich.

Bei der Überprüfung der Präzision von Tag zu Tag lagen die V_k-Werte bei 5,8%.

Die Nachweisgrenze betrug 50 ng/ml Serum.

Theophyllin: Isotopverdünnung-Massenspektrometrie und HPLC im Vergleich

F. Susanto, S. Humfeld und H. Reinauer
Abteilung für Klinische Biochemie, Diabetes-Forschungsinstitut
an der Heinrich-Heine-Universität, 4000 Düsseldorf 1

Ein Methodenvergleich zur quantitativen Bestimmung von Theophyllin im Serum mittels Isotopverdünnungs-Massenspektrometrie (GCV-ID/MS) und Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) wird beschrieben.

Für die GC-ID/MS-Analyse wird (1,3-¹⁵N₂-2-¹³C)Theophyllin als ein stabil isotop markierter interner Standard verwendet (1).

Nach Proteinfällung wird die Probe mit Diethylether extrahiert. Die sekundären Aminogruppen werden mit Essigsäureanhydrid und Pyridin zu einem unpolaren Acetyderivat umgesetzt. Die Fragmentationen m/e 180 und m/e 183 (M⁺-Acetylgruppe) von Theophyllin bzw. von internem Standard werden für Quantifizierung verwendet.

Die Probenaufarbeitung für HPLC-Analyse benötigt dagegen keine Derivatisierungsschritte. Nach Zugabe von β-Hydroxyethyltheophyllin als interner Standard und Ultrafiltration wird das Filtrat, ohne weitere Behandlung, direkt in die HPLC injiziert.

Die analytische Wiederfindung sowie Richtigkeit, Präzision und Reproduzierbarkeit der einzelnen Verfahren werden diskutiert.

Pasteur DIAGNOSTIKA
Kallestad

Ihr Partner in der
HIV-Diagnostik

Auf erhöhte Anforderungen
antworten wir mit innova-
tiven Lösungen.

Western Blot Analysensystem

LS 12

NEW LAV Blot System

Die Komplettlösung für die
HIV-Bestätigungsdiagnostik

NEW LAV Blot I
(Zul.-Nr.: 1269/89)

NEW LAV Blot II
(Zul.-Nr.: 1279/89)

Wir geben Ihnen Sicherheit!

PASTEUR
DIAGNOSTIKA GMBH
HABSBURGERSTR. 4
D-7800 FREIBURG
TEL.NR. (0761) 5 10 09 - 0/90
FAX-NR. (0761) 5 10 09 - 99

Unter Anwendung der hier beschriebenen Methoden werden Theophyllin in zurückliegenden Ringversuchseren bestimmt und die Ergebnisse mit den Resultaten der Teilnehmerlaboratorien verglichen.

Schrifttum:

1. SUSANTO, F., HUMFELD, S., REINAUER, H.: *Lab.mod.* 13, 197 (1989).

P 8

GC- und IR-MS: Glucosemetabolismus bei Patienten mit Sepsis und Postaggressionssyndrom

F. Susanto,¹ T. Scheeren,² P. Radermacher,² B. Santak,² J. Tarnow,² S. Humfeld¹ und H. Reinauer¹
¹Abteilung Klinische Biochemie, Diabetes-Forschungsinstitut an der Heinrich-Heine-Universität, und
²Zentrum für Anaesthesiologie, Heinrich-Heine-Universität, 4000 Düsseldorf

Patienten, die postoperativ intensivmedizinisch behandelt werden, entwickeln häufig eine Hyperglykämie, ohne daß präoperativ eine diabetische Stoffwechsellaage bestand. Diese Hyperglykämie läßt sich oft auch durch hohe Insulinzufuhr nicht durchbrechen. Es liegt also ein klassisches Beispiel einer Insulinresistenz vor, die wahrscheinlich durch das Überwiegen der kontrainsulinären, katabolen Hormone Adrenalin, Glucagon und Cortisol verursacht wird. Die Anwendung einer Periduralanästhesie zur postoperativen Analgesie erlaubt möglicherweise durch die damit verbundene Sympathikolyse eine verminderte Ausschüttung dieser Hormone. Die intravenöse Gabe von Postacyclin (PGI₂) führt zu einer Erhöhung der VO₂, deren Ausmaß als ein Hinweis auf die zelluläre Sauerstoffschuld angesehen wird (1).

Unter Verwendung von stabil markierter Glucose und unter Mitwirkung von PGI₂-Gabe werden Glucoseumsatz- und Glucoseoxidationsrate untersucht.

Für die Bestimmung der Glucoseumsatzrate wird 6,6-Dideuterglucose als Tracer verwendet, weil dieses Label nicht rezirkuliert. Unter steady state-Bedingung und konstanter Infusionsrate von (U-¹³C)Glucose wird die Glucoseoxidationsrate über die ¹³C₂-Anreicherung in der Expirationsluft bestimmt (2).

Ergebnisse: Bei Patienten mit Sepsis oder Postaggressionssyndrom zeigt sich nach einer PGI₂-Infusion von 5–10 ng/kg min eine Steigerung des Sauerstofftransports auf 591–648 ml/min m². Sie korrespondiert mit einer Steigerung von VCO₂ auf 159–165 ml/min m² und VO₂ auf 187–201 ml/min m².

Gleichzeitig erhöht sich die Glucoseumsatz- und Glucoseoxidationsrate bis auf Werte von 3,25–3,34 mg/kg min, bzw. 1,21–1,40 mg/kg min, und der Blutlactat Spiegel sinkt auf 0,89 mmol/l ab.

Schrifttum:

1. BIHARI, D., et al.: *N. Engl. J. Med.* 317, 397–403 (1987).

2. REINAUER, H., et al.: *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 28, 505–511 (1990).

P 9

Neuroblastom-Massenscreening bei Säuglingen Erste Ergebnisse der Hamburger Studie

R. Erttmann, S. Dohrmann, N. Erb und K. Winkler
Abteilung für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie
Universitätskinderklinik, Hamburg

Seit Juni 1990 wird in Hamburg in Zusammenarbeit mit 85 niedergelassenen Kinderärzten ein flächendeckendes Programm zur Früherkennung des Neuroblastoms im Säuglingsalter durch-

geführt. Die Untersuchung ist an den pädiatrischen Vorsorgetermin U 5 (6.–9. Lebensmonat) gekoppelt. Dazu wird die quantitative HPLC-Analyse von Vanillinmandelsäure (VMS) und Homovanillinsäure (HVS) aus trocken versandfähigen an Filterpapier absorbierten Urinproben durchgeführt. Nach Elution des Urins wurde zur Analyse von VMS und HVS die ClinRep®-Methode der Firma Recipe in einem vollständig automatisierten Verfahren benutzt. Die Kreatininkonzentration wurde mit Hilfe der Pikrinsäuremethode im Beckmann Kreatininanalyser bestimmt. Im Rahmen dieses Programms wurden und die folgenden altersabhängigen Normalwerte für die VMS- und HVS-Konzentration im Urin von Säuglingen und Kleinkindern ermittelt:

6 Monate	1 Jahr	2 Jahre ± 3 Mon.	2,5–3,5 Jahre	
170–190	455–357	640–820	900–1300 Tage	
n = 145	215	.39	32	
VMS 6,7 ± 2,9	6,7 ± 2,9	4,7 ± 1,9	5,5 ± 2,7	M ± SD
HVS 12,3 ± 4,9	10,8 ± 4,3	9,3 ± 3,6	10,9 ± 4,2	M ± SD

Bisher (Februar 1991) sind 8000 Säuglinge dieser Altersgruppe untersucht worden. Dies entspricht, bezogen auf die Population unseres Einzugsgebietes, einer Akzeptanz der Untersuchung von ca. 85%. Insgesamt wurden bei insgesamt fünf Säuglingen zweimalig erhöhte VMS- und/oder HVS-Urinwerte gefunden, wobei sich bei allen fünf Kindern in den bildgebenden Verfahren (Abdominelle Sonografie und Röntgenuntersuchung des Thorax) kein Tumorverdacht ergab. Zusammengefaßt zeigen die vorläufigen Ergebnisse die Praktikabilität des in Hamburg durchgeführten intergrierten Massenscreeningkonzeptes zur Früherkennung des Neuroblastoms im Säuglings- und Kleinkindesalter.

Gefördert durch: Deutsche Krebshilfe, Mildred-Scheel-Stiftung, Bonn – Förderverein zur Erforschung und Heilung von Krebskrankheiten im Kindesalter, Hamburg – Hamburger Krebsgesellschaft – Firma RECIPE, München

P 10

Ein Verfahren zur spezifischen Bestimmung der Pankreas-Amylase durch Immuninhibition

G. Klein und L. Adolph
Boehringer Mannheim GmbH

Aus klinischer Sicht ergab sich der Wunsch nach einer einfachen Routine-Methode zur Bestimmung der Pankreas- α -Amylase bei unklaren Erhöhungen der Gesamtamylase (1). Die bisherigen Methoden zur Bestimmung der Pankreas-Isoamylase, die mit der Speichel-Isoamylase im Serum von klinisch Gesunden etwa im Verhältnis 2:3 vorkommt, waren sehr aufwendig und teils unspezifisch und daher für die Routine wenig geeignet.

Boehringer Mannheim entwickelte ein neues Verfahren, das auf der Hemmung der Speichel- α -Amylase durch zwei synergistisch wirkende monoklonale Antikörper beruht (2). Dadurch kann die Pankreas-Isoamylase genauso einfach und mit den gleichen chromogenen Substraten wie die Gesamtamylase in homogener Phase an den üblichen photometrischen Analysegeräten bestimmt werden.

Zehn klinische Zentren in Italien unternahmen einen Methodenvergleich mit der für Isoenzym-Bestimmungen üblichen Elektrophorese und bewerteten die klinischen Aspekte der Pankreas- α -Amylase. Aus dem Methodenvergleich lassen sich zwei Aussagen ableiten:

1. Elektrophoretische und photometrische Bestimmung stimmen im Normalbereich gut überein und weichen bei höheren Werten systematisch voneinander ab.

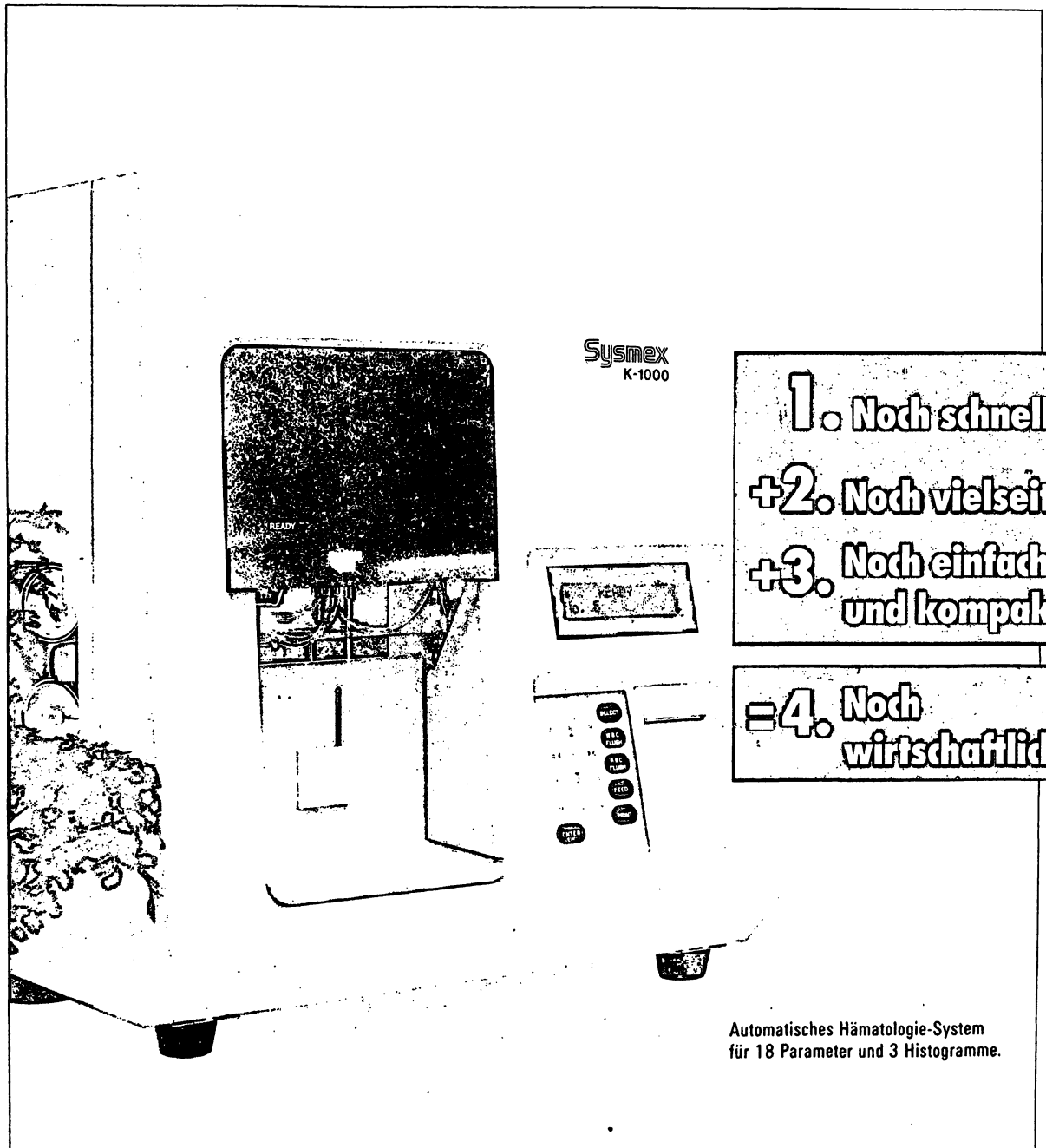
2. Die diagnostischen Aussagen beider Verfahren unterscheiden sich deutlich, wenn die Prozentwerte der Elektrophorese mit den Aktivitätswerten der Immuninhibition verglichen werden. Sie werden aber ähnlich, wenn die Elektrophorese-Prozentwerte mit

**Das DIGITANA-Programm mit Sysmex:
Ganz genau und zuverlässig.**

Für offene und geschlossene Blutproben:

Sysmex K-1000.

Der Neue Hämatologie-Automat.



Sysmex
K-1000

- 1. Noch schneller**
- +2. Noch vielseitiger**
- +3. Noch einfacher und kompakter**
- =4. Noch wirtschaftlicher**

Automatisches Hämatologie-System
für 18 Parameter und 3 Histogramme.

Die Stärken des Neuen Sysmex K-1000.

Der Sysmex K-1000 setzt bei den automatischen Hämatologie-Systemen neue Maßstäbe. Er ist zukunftsweisend.

Weil seiner überlegenen Genauigkeit, Vielseitigkeit und Schnelligkeit eine noch einfachere Bedienbarkeit mit noch kompakterem Design gegenübersteht.

1. Noch schneller

Kurze Vorlauf-Zeit

Nur 2,5 Minuten nach dem Einschalten ist der K-1000 betriebsbereit. In dieser Zeit werden automatische Selbst-Tests, Spülvorgänge, Befüllen des hydraulischen Systems und Leerwert-Kontrolle selbsttätig nacheinander durchgeführt. Gerade für Notfälle ist diese kurze Vorlauf-Zeit so dringend erforderlich.

Kurze Analyse-Zeit

- in nur 45 sec. bei Vollblut- und in nur 60 sec. bei Kapillarblut-Betrieb werden sämtliche Parameter und Histogramme analysiert und vom eingebauten Thermo-Drucker ausgedruckt.

Hohe Proben-Geschwindigkeit

- Bis zu 80 Proben pro Stunde bei Vollblut- und bis zu 60 Proben pro Stunde bei Kapillarblut-Betrieb.

2. Noch vielseitiger

Mehr Information

Neben den 8 Parametern des kleinen Blutbildes werden zusätzlich 3 Histogramme für Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten erstellt und aus diesen 10 weitere Parameter errechnet.

Der eingebaute Thermo-Drucker weist alle Meß-Ergebnisse sofort aus. Schwarz auf Weiß.

Geringes Probe-Volumen

Nur 100µl Vollblut werden für die komplette Analyse, nur 40µl werden bei Kapillarblut-Betrieb benötigt.

3. Noch einfacher und kompakter

Fertige Anwender-Programme

Acht (8!) Mikroprozessor-Programme für Standard-Messungen schaffen gravierende Arbeitserleichterungen. Der Zeit-Aufwand für Routine-Maßnahmen wird erheblich verkürzt.

Die Programme umfassen:

Qualitäts-Kontrolle + Kapillarblut-Messung + automatisches Spül-Programm + automatische Kalibrierung + Einstellen von Patienten-Grenzwerten u.a.

Leichte Bedienung

- Die Vollblut-Analyse aus offenen oder geschlossenen Proben ist denkbar einfach:
Nach Betätigung der Start-Taste wird die Probe automatisch angesaugt und verdünnt. Sekunden später liegen die Meß-Ergebnisse vor.
- Auch die Ergebnis-Auswertung ist wesentlich erleichtert: Die automatische Markierung auffälliger Werte hilft bei der schnellen Suche nach abnormalen Befunden.
- Die Anwender werden den K-1000 in kürzester Zeit sicher und problemlos bedienen können.
Dafür sorgen Status-Anzeigen, Warnungen vor Fehlbedienung und automatische Fehler-Meldungen; die auf dem LCD-Display sofort aufgezeigt und auch ausgedruckt werden.

Kompaktes Design

Auch das ist ein Merkmal der Neuen Sysmex Automaten:

Das gesamte Leistungs-Paket des K-1000 ist in einem einzigartig kompakten, platzsparenden Gehäuse untergebracht. Diese Zahlen sprechen für sich:

Die Haupteinheit wiegt nur noch 28 kg, und die Abmessungen betragen nur noch 480 x 555 x 298 mm..

4. Noch wirtschaftlicher

Seriöse Aussagen zur Wirtschaftlichkeit einer Investition sind immer nur durch Relativierung möglich.

Erst der Vergleich von Anschaffungs-Preis einerseits, Leistung und Nutzen andererseits macht eine vernünftige Wirtschaftlichkeits-Rechnung möglich.

Sein positives Preis-Leistungsverhältnis weist den Sysmex K-1000 als unersetzlichen Helfer für das moderne und kostenbewußte hämatologische Labor aus.

DIGITANA AG mit Sysmex:

Ganz genau und zuverlässig.

DIGITANA AG

D- 2000 Hamburg 76 · Weidestraße 118 b · Tel: 040/270 70 5-0
CH- 8810 Horgen · Burghaldenstraße 11 · Tel: 01/725 61 91

Gesamtamylase multipliziert und so als Aktivitätswerte verglichen werden.

Klinisch konnte gezeigt werden, daß Pankreas- α -Amylase bei der Beurteilung einer akuten Pankreatitis empfindlicher anspricht als Gesamtamylase und über die Summe der Fälle ebenso empfindlich ist wie die Lipase (turb. Methode).

Lipase und Pankreasamylase ergänzen sich insofern, als in einigen dikordanten Fällen jeweils nur ein Enzym pathologisch erhöht ist. Durch Bestimmung der Pankreas-Amylase zusätzlich zur Lipase werden 13% mehr pathologische Fälle erkannt (Referenz: Ultraschall, CT), jeweils bezogen auf die 3fache 95.-Perzentil-Obergrenze einer Kontrollgruppe.

Schrifttum:

1. JUNGE, W.: 13. Internationaler Kongreß für Klinische Chemie, Den Haag/Niederlande, 28. Juni bis 3. Juli 1987.
2. GERBER, M., WULFF, K.: Fortschritte in der spezifischen Bestimmung der Pankreas- α -Amylase. Lab.med. (Germany) 12, 110-113 (1988).

P 11

Die Bedeutung der Osmolalität in verschiedenen Körperflüssigkeiten für die Intensivmedizin

H. Fiedler und L. Lieb
Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik und Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin
Bezirkskrankenhaus Suhl

Wasser- und Elektrolytstörungen durch Flüssigkeitsverschiebungen, durch iatrogene Einflüsse und mangelhafte Nierenfunktion haben bei kritisch Kranken eine hohe Prävalenz und bedürfen der ständigen Kontrolle. Kryoskopische Osmolalitätsmessungen gehören deshalb bei folgenden Problemstellungen zur (mindestens täglichen) Standarduntersuchung:

1. Die absolute Höhe bzw. die Veränderungen der Osmolalität erlauben Aussagen zur Prognose. Bei Serumosmolalitäten über 360 mmol/kg ($n = 83$) beträgt nach 1 Tag der Letalitätsfaktor 0,4 und steigt nach 3 Tagen auf 0,92.
2. Zur Früherkennung eines norm- oder polyurischen Nierenversagens wurde der Osmolalitätsquotient Urin/Serum und/oder die osmotische Clearance eingesetzt. Diese Funktionsgrößen einschließlich der Freie-Wasser-Clearance haben bei Sepsispatienten mit abdominalen Ursachen eine abwartende Haltung durch den lebensrettenden Eingriff der Relaparotomie ersetzt. Die renalen osmolalen Ausscheidungsmengen werden in Bilanzberechnungen einbezogen, um die Zufuhr von Kalorien, Wasser, Elektrolyten und anderen osmotisch aktiven Substanzen rechtzeitig zu verändern. Der kumulative Computerausdruck aller gemessenen und berechneten Größen gewährleistet die frühzeitige Erkennung sich anbahnender Funktionseinschränkungen der Niere (1).
3. Kleinmolekulare organische Substanzen tragen zum gemessenen osmotischen Druck bei, ohne in den üblichen Formeln zur Berechnung der Osmolalität erfaßt zu werden. Die resultierende osmotische Lücke kann zur Erkennung toxischer Substanzmengen (Ethanol) und zur Steuerung von Osmotherapeutika beitragen. Kleinmolekulare Lösungsvermittler (Propylenglykol) von Medikamenten (Etomidate) können bei unkontrollierter Anwendung kritische Osmolalitätssteigerungen herbeiführen (2).

Schrifttum:

1. FIEDLER, H., LIEB, L.: Anforderungen der Intensivmedizin an die Labordiagnostik. Z. med. Labor-Diag. 31, 192-199 (1990).

P 12

Monitoring of Lithium Therapy by the Use of Saliva instead of Blood Serum

W. Tadeusiak, M. J. Krawczyński and B. Balicka
Dept. of Laboratory Diagnostics, Medical Centre of Postgraduate Education, Warsaw

The increase of interest in uninvasive methods of material taking and standardization of methods of saliva collection encouraged us to investigate the possibility to replace the blood serum by saliva in monitoring of lithium therapy.

Investigations were carried out on 31 subjects (5 women and 26 men) treated at least for one year with lithium carbonate in doses 0.5-1.0 g/d. Lithium concentration was determined with flame photometry. Saliva was taken with "Salivette" container and simultaneously blood from cubital vein. During two years 73 determinations were carried out. For one group of patients (7) the determinations were carried out several times (3-10) to establish the stability of lithium concentration ratio in saliva and serum. Both, invidual as well as interindividual stability of this ratio was stated. Its value was 2.17 ± 0.16 , $sv = 7.4\%$. Only one patient showed the value of 0.93. The correlation factor between lithium concentration in blood serum and salvia was $r = 0.9025$ (all results) and $r = 0.9858$ (two extremal results excluded).

P 13

Bestimmung von Magnesium in EDTA-haltigen Flüssigkeiten mit einer enzymatischen Methode

S. W. Golf, A. Balsler, V. Graef, N. Katz und F. Schneider¹
Klinikum Gießen und Klinikum Marburg¹

Als Referenzmethode zur Bestimmung von Magnesium (Mg) in Körperflüssigkeiten wird die Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) betrachtet. Wegen der hohen Anschaffungskosten eines AAS-Photometers wurden zahlreiche Versuche durchgeführt, eine chemische oder enzymatische Methode zu entwickeln. Bestimmungen von Mg im Vollblut oder Chelatbildner enthaltenden Lösungen waren mit chemischen Methoden allerdings nicht möglich.

Die kinetische Methode zur Bestimmung von Mg basiert auf einer magnesiuminduzierten Aktivierung der Hexokinase und anschließender Koppelung an die Reaktion der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase in Gegenwart von NADP^+ , ATP, Glucose, Digitonin und CuSO_4 bei pH 8,5. Die Probenvolumen-Fraktion am Endvolumen beträgt 1:201, eine 15minütige Vorinkubation von lysiertem Vollblut oxygeniert Hämoglobin vollständig. Die Meßzeit beträgt 2 Minuten. Die Magnesiumkonzentration wird durch Vergleich der ermittelten Extinktionsdifferenz bei 334 nm mit einer Standardkurve ermittelt. Regressionsanalysen der mit der AAS und enzymatischen Methode ermittelten Mg-Konzentrationen ergaben bei 120 Vollblut- und Serumproben eine Steigung von 1,0 und einen Korrelationskoeffizient von 0,92. Die vorgestellten methodischen Details erlauben die schnelle, automatisierbare enzymatische Bestimmung von Mg in biologischen Flüssigkeiten einschließlich EDTA-haltigem Vollblut.

P 14

Bestimmung von Pravastatin mittels Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography

R. Siekmeier, W. März und W. Groß
Gustav Embden-Zentrum der Biologischen Chemie,
Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main

Pravastatin ist ein neuer, spezifischer, kompetitiver Inhibitor der HMG-CoA-Reduktase. In vivo stimuliert die Substanz die Express-

sion von LDL-Rezeptoren und führt auf diesem Weg zur Senkung des Plasmacholesterins. Bisher war die Bestimmung von Pravastatin nur mittels aufwendiger GC/MS-Methoden möglich. Hier wird eine HPLC-Methode zur Bestimmung von Pravastatin im Plasma vorgestellt.

Die Proben wurden mittels Festphasenextraktion an Bond-Elut-Cartridges extrahiert. Triamcinolonacetat diente als interner Standard. Die Trennung erfolgte an einer C8-Matrix (250* 4 mm). Der Eluent enthielt Methanol, Acetonitril und Wasser.

Die Methode ist linear im Bereich von 5 bis 50 ng/mL Pravastatin. Der Variationskoeffizient von Lauf zu Lauf hängt von der Pravastatin-Konzentration ab, liegt aber für den gesamten Meßbereich unter 12%.

Vier gesunde Probanden erhielten eine orale Einzeldosis von 60 mg Pravastatin, und die Plasmakonzentration des Pharmakons wurde bis 5 Stunden nach der Einnahme in Intervallen von einer halben Stunde bestimmt. Um die intra-individuelle Reproduzierbarkeit des Konzentrationsverlaufs zu bestimmen, wurde ein Proband dreimal an verschiedenen Tagen untersucht. Die maximale Plasmakonzentration von Pravastatin wurde etwa eine Stunde nach oraler Einnahme gefunden, und die Plasmahalbwertszeiten lagen zwischen 1,0 und 1,5 h. Intraindividuell waren die Profile gut reproduzierbar. Inter-individuell gab es deutliche Unterschiede im Verlauf der Pravastatinkonzentrationen.

Die hier entwickelte HPLC-Methode eignet sich zur Bestimmung von Pravastatin im Plasma. Sie liefert pharmakokinetische Daten, die mit GC/MS-Messungen exzellent übereinstimmen.

P 15

Genetische Marker bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit

W. März¹, M. Proft¹, R. Siekmeier¹, Sabine Cezanne¹, J. Schreier², J. Kähler², H. Kronenberger², W. Schneider², M. Kaltenbach² und W. Groß¹

¹Gustav Embden-Zentrum der Biologischen Chemie und ²Zentrum der Inneren Medizin, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main

Genetische Polymorphismen der Apolipoproteine B und E sind mit der Höhe des Plasma- und LDL-Cholesterins assoziiert.¹ Einige Beobachtungen sprechen dafür, daß Variationen der Apolipoproteingene neben dem Lipoproteinmuster direkt das Koronarrisiko beeinflussen könnten.

In dieser Studie wurden Lipoproteine, Apolipoproteine (kinetische Nephelometrie), Lipoprotein (a) (RIA), ApoE-Phänotypen (Immuno-blotting) und ein Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus des ApoB-Gens (XbaI, polymerase chain reaction) bei 108 Patienten mit angiografisch gesicherter koronarer Herzkrankheit (KHK) und einer altersgleichen Kontrollgruppe (n = 58) untersucht. Verteilung der XbaI-Genotypen (X1/X1, X1/X2, X2/X2) und ApoE-Phänotypen sowie die Mittelwerte der Lipoproteine und Apolipoproteine [g/L] sind in der Tabelle zusammengefaßt:

	X1/X1	X1/X2	X2/X2	E2/2	E3/2	E3/3	E4/3	E4/2	E4/4
KHK [%]	28,7	45,4	25,9	0	11,1	53,7	31,5	0,9	2,8
Kontr. [%]	24,1	48,3	27,6	3,5	15,5	55,2	22,4	3,5	0

	C	TG	LDL-C	HDL-C	ApoA-I	ApoA-II	ApoB	Lp(a) ¹
KHK	2,12	1,61	1,43	0,37	1,26	0,52	0,92	0,23
Kontr.	2,16	1,08	1,47	0,47	1,47	0,47	0,88	0,115

¹ Median

Gesamt- und LDL-Cholesterin (C) diskriminieren nicht zwischen Patienten mit KHK und Gesunden. In der Verteilung der ApoB-Genotypen gab es keine Unterschiede zwischen den beiden Kollektiven. Allerdings war das X2-Allel in der Kontrollgruppe positiv mit Triglyceriden (TG), LDL-C und ApoB sowie invers mit HDL-C und ApoA-I assoziiert. Das ApoE4-Allel fand sich bei Pa-

tienten mit KHK deutlich häufiger als im Kontrollkollektiv. Ausgeprägte Unterschiede wurden bei TG und beim HDL-C beobachtet. ApoA-I war bei Patienten mit KHK erniedrigt, ApoA-II lag im Normbereich. Der Median des Lp(a) war in der Patientengruppe doppelt so hoch wie bei Gesunden. Die Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung des ApoE-Polymorphismus sowie des Lp(a) als Risikoindikatoren. Die Relevanz genetischer Variation am ApoB-Locus bedarf weiterer Untersuchungen.

Schrifttum:

1. BRESLOW, J. L.: *Physiol. Rev.* 68, 85-132 (1988).

P 16

Charakterisierung des Gens für ApoE5-Frankfurt mittels Polymerase Chain Reaction, Restriction Isotyping und Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese (TGGE)

W. März, V. Ruzicka und W. Groß
Gustav Embden-Zentrum der biologischen Chemie,
Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main

Apolipoprotein E (ApoE) ist Ligand des ApoB,E-Rezeptors. Es moduliert den Katabolismus triglyceridreicher Lipoproteine und ist an der Regulation der LDL-Konzentration beteiligt. Am ApoE-Locus kennt man die drei häufigen Allele ε2, ε3 und ε4. Der Polymorphismus beruht auf Substitutionen der Aminosäuren 112 und 158. ApoE4 enthält Arginin, ApoE2 enthält Cystein an beiden Positionen. ApoE3 enthält Cystein an Position 112 und Arginin an Position 158. In vivo wird ApoE4 schneller katabolisiert als ApoE2 und ApoE3. Dies führt zu einem erhöhten Flux von Remnant-Cholesterin in die Leber, einer Suppression von LDL-Rezeptoren und einer Erhöhung des Plasmacholesterins. Hier wird über eine Variante des ApoE berichtet, in der es offensichtlich durch Einführung einer zusätzlichen positiven Ladung in ein ApoE4-Molekül zu einer Hypercholesterinämie kommt.

Bei dem 43jährigen Patienten lag neben der Hypercholesterinämie lediglich eine essentielle Hypertonie vor. Die Lipoproteinanalyse ergab: Cholesterin (C) 2,66 g/l, Triglyceride (TG) 1,91 g/l, VLDL-C 0,34 g/l, VLDL-TG 1,05 g/l, IDL-C 0,26 g/l, LDL-C 1,85 g/l, HDL-C 0,47 g/l, ApoA-I 1,38 g/l, ApoB 1,29 g/l. Im Immunblot war der ApoE-Phänotyp des Patienten 5/3. In der SDS-PAGE hatte ApoE5 das gleiche Molekulargewicht wie ApoE3.

Mittels polymerase chain reaction (PCR) wurde ein 244 bp langes Fragment des ApoE-Gens amplifiziert und mit HhaI verdaut (1). Auf diese Weise ergab sich als scheinbarer Genotypus ε4/ε3. Damit handelt es sich bei ApoE5-Frankfurt um ein mutiertes ε4Allel. Durch vollständige PCR-Amplifikation der Exone 3 und 4 des ApoE-Gens und Analyse der Amplifikate mittels Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese (TGGE) konnte die für ApoE5-Frankfurt verantwortliche Mutation dem vierten Exon des ApoE Gens zugewiesen werden. ApoE5-Frankfurt unterscheidet sich damit von einer kürzlich beschriebenen ApoE-Mutante (2), bei der durch eine einzelne Aminosäuresubstitution (Glu₃ -> Lys) zwei zusätzliche Ladungen in ein ApoE3-Molekül eingeführt wurden.

Die Charakterisierung des Gens für ApoE5-Frankfurt illustriert die Leistungsfähigkeit der TGGE in der Diagnostik genetischer Stoffwechseldefekte. Die TGGE trennt Nucleinsäuren aufgrund ihres unterschiedlichen Schmelzverhaltens. Gegenüber anderen Verfahren der Genomanalyse setzt sie a priori keine Kenntnisse über Lage oder Art einer Mutation voraus. Sie ermöglicht die Nachweis nahezu jeder Punktmutation in Segmenten bis zu etwa 400 bp Länge. Die Methode ist einfach und erlaubt einen hohen Probendurchsatz. Sie stellt damit eine effiziente Screeningmethode im Vorfeld der DNA-Sequenzierung dar.

Schrifttum:

1. HIXSON, J. E., VERNIER, D. T.: *J. Lipid Res.* 31, 545-548 (1990).
2. TAJIMA, S., YAMAMURA, T., YAMAMOTO, A.: *J. Biochem.* 104, 48-52 (1988).

Bestimmung von Lipoprotein Lp(a): Vergleich zweier Enzymimmunoassays und eines Radioimmunoassays

R. Siekmeier, Bettina Donnerhak, W. März und W. Groß
Gustav Embden-Zentrum der Biologischen Chemie,
Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main

Lipoprotein (a) ist ein unabhängiger atherogener Risikofaktor (1). Der Proteinanteil des Lp(a) enthält Apo B-100 und Apolipoprotein (a), die durch eine oder mehrere Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind (2). Apo(a) besitzt eine hohe Homologie zu Plasminogen. Dies hat zu Spekulationen geführt, daß Lp(a) die Fibrinolyse hemmen könnte (3). Apo(a) zeigt einen genetischen Polymorphismus. Die Molekulargewichte der Isoformen liegen zwischen 400 und 700 kD. Hier wurden zwei nicht-kompetitive Enzymimmunoassays (EIA) für Lp(a) entwickelt und mit einem kommerziellen Radioimmunoassay (RIA) verglichen.

In beiden EIAs wurden polyklonale Antisera gegen Apo(a) auf Mikrotiterplatten immobilisiert. Im ersten EIA wurde Lp(a) als Lp(a):B-Komplex mit einem polyklonalen anti-ApoB ∞ -Globulin nachgewiesen. Im zweiten EIA diente der polyklonale Antikörper für Apo(a) als Tracer. Im RIA für Apo(a) (Pharmacia Diagnostics AB) wurden zwei monoklonale Antikörper gegen Apo(a) eingesetzt.

RIA und beide EIAs waren spezifisch für Lp(a). Weder Zunahmen von LDL noch von Plasminogen beeinflussten die Meßergebnisse. Im Immunblot zeigte der Festphasenantikörper des RIA, nicht aber der Tracer-Antikörper Kreuzreaktivität mit Plasminogen. Im Bereich physiologischer Plasminogenkonzentrationen störte dies den Assay nicht. In 200 Plasmaproben wurde Lp(a) mit allen drei Methoden bestimmt. Es ergab sich eine exzellente Korrelation zwischen dem EIA für Lp(a):B-Komplexe und dem RIA ($r = 0,909$). Demgegenüber fielen die Korrelationskoeffizienten für die Vergleiche des EIA mit Anti-Apo(a) als Tracer mit den beiden anderen Methoden geringer aus ($r = 0,793$ und $r = 0,763$).

Der EIA für Lp(a):B-Komplexe ist insensitiv gegenüber Unterschieden in der Größe der Apo(a)-Isoformen. Dies scheint auch für den RIA zu gelten. Demgegenüber könnte der EIA mit Anti-Apo(a) als Tracer auch durch die Größe der jeweils vorliegenden Apo(a)-Isoform beeinflusst werden.

Schrifttum:

1. SEED, M., HOPPICHLER, F., REAVELEY, D., MCCARTHY, S., THOMPSON, G. R., BOERWINKLE, E., UTERMANN, G.: *New Engl. J. Med.* 27, 1494-1499 (1990).
2. UTERMANN, G.: *Science* 246, 904-910 (1989).
3. MILES, L. A., PLOW, E. F.: *Thromb. Haemost.* 63, 331-335 (1990).

Vereinfachte Genotypisierung von Apolipoprotein E-Isoformen

M. Kohlmeier, B. Kersten, H. Neitzel und E. Köttgen
Institut für Klin. Chemie und Biochemie, und *Institut
für Humangenetik, Universitätsklinikum Rudolf Virchow, Berlin

Apolipoprotein E (ApoE) vermittelt den Abbau triglyceridreicher Lipoproteine und steuert dadurch wesentlich die Serumkonzentration der dabei entstehenden Low-density-Lipoproteine (LDL). Sequenzvarianten, die bei jedem Dritten in Deutschland gefunden werden, können Ursache von Hyper- oder Dyslipoproteinämie sein. Mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist jetzt die schnelle Untersuchung der zugrundeliegenden Polymorphismen auch im klinischen Routinelabor möglich (Emi et al. 1988; Weisgraber et al. 1988). Im folgenden wird eine Methode zur Genotypisierung von ApoE beschrieben, die verschiedene Arbeitsschritte vereinfacht und innerhalb von fünf Stunden zu eindeutigen Ergebnissen führt.

19 μ l frisches oder gefrorenes EDTA-Blut werden mit 100 μ l sterilem Wasser gemischt, 10 Minuten bei 100°C erhitzt und anschlie-

Pasteur DIAGNOSTIKA
Kallestad

Labordiagnostik opportunistischer Infektionen:

* Pneumocystosis

indirekter Immunfluoreszenztest zum Nachweis von *Pn. carinii*-Zysten

* Cryptosporidiose

direkter Immunfluoreszenztest zum Nachweis von *Cryptosporidium*-Oozysten.

* Candidosen

Latex-Agglutinationstest zum Nachweis von löslichem *Candida*-Antigen (Mannan) auf Basis monoklonaler Antikörper

* Aspergillosen

Latex-Agglutinationstest zum Nachweis von löslichem *Aspergillus*-Antigen (Galaktomannan) auf Basis monoklonaler Antikörper

PASTEUR
DIAGNOSTIKA GMBH
HABSBURGERSTRASSE 4
7800 FREIBURG
TEL.NR. (0761) 5 1009-40
FAX-NR. (0761) 5 1009-99

Rend 10 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert. Für den PCR-Ansatz werden zu 25 µl des klaren Überstands 25 µl des folgenden Gemisches gegeben: jeweils 200 µM dNTP (4 x), 10% DMSO, 0,2 µM primer 1 (5' AAGGAGTTGAAGGCCTACAAT3') und 0,2 µM Primer 2 (3'ACATGGTCCGGCCCGGGCGCT), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,001% Gelatine und 10 mM Tris-HCl pH 8,3 und mit 10 µl Mineralöl überschichtet. Nach 5 Minuten Inkubation bei 96°C erfolgt sofort die Amplifikation durch Inkubation über 30 Zyklen bei 95°C (60 Sekunden) und 50°C (45 Sekunden). Danach wird noch 5 Minuten bei 72°C inkubiert.

10 µl der wässrigen Unterphase werden nach Zugabe von 10 µl mit 100 U CfoI (Hhal) eine Stunde bei 37°C inkubiert. 2 µl des Inkubates werden auf einem 15%igen homogenen Polyacrylamid-Gel (2 M Harnstoff, 100 mM Natriumborat pH 8,8) aufgetragen und bei 500 V und maximal 1,5 Watt/cm 60 Minuten lang elektro-phoretisch getrennt. Die aufgetrennten Banden werden sichtbar nach Silberfärbung (2 x 3 Minuten in 0,5% Essigsäure/10% Äthanol; 10 Minuten in 0,2% Silbernitrat; 2 x 5 Sekunden in destilliertem Wasser; 5 Minuten in 1,5% NaOH, 0,01% Natriumborhydrid, 0,15% Formaldehyd; 1 Minute in 0,75% Natriumcarbonat).

In nicht mit Restriktionsenzym behandelten Ansätzen ist jeweils ein 299 Basen langes PCR-Produkt enthalten. Der Nachweis von Restriktionsfragmenten mit 19, 30, 48, 72, 78 bzw. 91 Basen erlaubt eine eindeutige Zuordnung zu einer der sechs häufigsten Genotypen. Vergleiche mit den Ergebnissen, die mit der Allelspezifischen Oligonucleotid-Hybridisierung (ASO) der oben beschriebenen PCR-Produkte und mit der Isoelektrischen Fokussierung von Serum gewonnen wurden, belegen die Zuverlässigkeit der Methode.

P 19

Vereinfachte Untersuchung der Apolipoprotein E-Isomorphismen im Serum

H. J. Drossel, M. Kohlmeier, P. Sinha und E. Köttgen
Institut für Klinische Chemie und Biochemie,
Universitätsklinikum Rudolf Virchow, Berlin

Apolipoprotein E (Apo E) ist ein Plasmaprotein, das am LDL-Rezeptor und an mindestens einem weiteren Rezeptor bindet. Über diese Rezeptorinteraktion ist Apo E wesentlich an Transport und Verteilung von Cholesterin im Körper beteiligt. Die in der deutschen Bevölkerung überwiegend beobachteten Sequenzvarianten von Apo E (E2, E3 und E4) binden mit deutlich unterschiedlicher Affinität an diese Rezeptoren und beeinflussen so die Konzentration atherogener Lipoproteine in unterschiedlicher Weise. Wir berichten über eine Methode der Apo E-Phänotypisierung, die schnell, einfach und kostengünstig die Untersuchung auch großer Probenzahlen ermöglicht.

Zur Auftrennung der Proteine wurden 5% Polyacrylamidgele mit immobilisiertem pH-Gradienten (pH 4-7) verwendet. Die Gele wurden nach dem Gießen zunächst gewaschen und getrocknet und konnten dann mehrere Wochen gelagert werden. Vor der Verwendung wurden die Gele in 8 molarer Harnstofflösung in Quellkassetten 2 Stunden rehydriert. 1 µl des fünf-fach mit Tris-HCl (0,2 M/L, pH 7,4) verdünntes Serum wurde direkt auf das Gel kathodisch aufgetragen. Die Fokussierung erfolgte zunächst 2 Stunden bei 300 V (max. 5 Watt und 5 mA), und dann 8 bis 10 Stunden bei 5000 V. Die Proteine wurden durch kapillare Diffusion bei 37°C in einer feuchten Kammer auf eine Polyvinyliden-difluorid-Membran übertragen (Kontaktblot), die Blotzeit betrug 1 Stunde. Die Blockierung der Blots erfolgte durch 10 Minuten Waschen in Waschlösung (0,01 mol/l Tris-HCl, pH 7,4; 0,9% NaCl) mit 0,05% Tween20. Danach wurde jeweils 1 Stunde mit Anti-ApoE vom Schaf (1:500 in Waschlösung) und mit Peroxidase-markiertem Anti-Schaf-Antikörper (1:500 in Waschlösung) inkubiert. Nach jeder Antikörperinkubation wurden die Blots zweimal 10 Minuten in Waschlösung mit 0,01% Tween20 gewaschen. Nach 5 bis 10 Minuten Inkubation in Färbelösung (3 g/l 4-Chloronaphthol, 11,6 g/l NaCl, 50 mM/l Tris-HCl pH 7,4 und 0,01% H₂O₂) wurden Bandenmuster entsprechend dem in den Proben vorliegenden Phänotyp sichtbar.

Im Gegensatz zu bisher veröffentlichten Methoden war eine Delipidierung der Proben nicht mehr notwendig. Die Apolipoprotein E-Phänotypisierung konnte in weniger als 10 Stunden durchgeführt werden. Die Ergebnisse waren konsistent mit Befunden aus molekulargenetischen Untersuchungen.

P 20

Diagnostik und Therapie zur Prävention von Thromboembolien

W. Müller-Beisenhirt
Bürgerhospital Stuttgart

Die Erfolgskontrolle der Thromboseprophylaxe erfolgt üblicherweise durch die Registrierung klinisch manifester Thromboembolien, z. B. nach Versagen der therapeutischen Maßnahmen. Dementsprechend zeigen zahlreiche klinische Studien, daß trotz Thromboseprophylaxe ein postoperatives Risiko weiter besteht, bis hin zu einer Thromboseinzidenz von 25%. Die konventionellen Laborparameter (Thrombinzeit-Bestimmung oder aPTT) können, wenn überhaupt, nur indirekte Hinweise auf eine Risikosituation liefern. Die postoperative Heparin low dose Prophylaxe wird dementsprechend ohne Laborkontrolle schematisch durchgeführt. Dagegen ist zu erwarten, daß Aktivierungsparameter der Hämostase für ein Monitoring besser geeignet sind, da sie die Kinetik der Hämostaseaktivierung direkt wiedergeben können. Da ein präthrombotischer Zustand erkannt werden kann, bevor es zur Lokalisation kommt, wird die Möglichkeit eröffnet, durch geeignete therapeutische Maßnahmen die Thrombose abzuwenden. Unter den verschiedenen Aktivierungsparametern befinden sich jedoch nur wenige, die mit einfachen Testmethoden bestimmt werden können und auch im Notfallablab einsetzbar sind. Z. B. der Erythrozytenagglutinationstest n. Largo (FM-Test) oder der D-Dimer-Test als Latexagglutinationstest. Für uns stehen beide Testmethoden in der Routine täglich 24 Stunden zur Verfügung. Es bestehen seit über drei Jahren Erfahrungen in der Anwendung zur Steuerung der Thromboembolieprophylaxe. Anhand von beispielhaften Kasuistiken sollen die verschiedenen Anwendungsmöglichkeiten dargestellt werden. An diesen Beispielen wird deutlich, daß eine individuelle Kontrolle der Thromboseprophylaxe durch die Aktivierungsparameter dazu geeignet sein kann, die Heparindosierung an den jeweiligen Bedarf anzupassen und dadurch eine höhere Effizienz als mit einer schematischen Dosierung zu erreichen.

P 21

Der Fibrinmonomer-Test identifiziert Nonresponder der postoperativen Thromboseprophylaxe

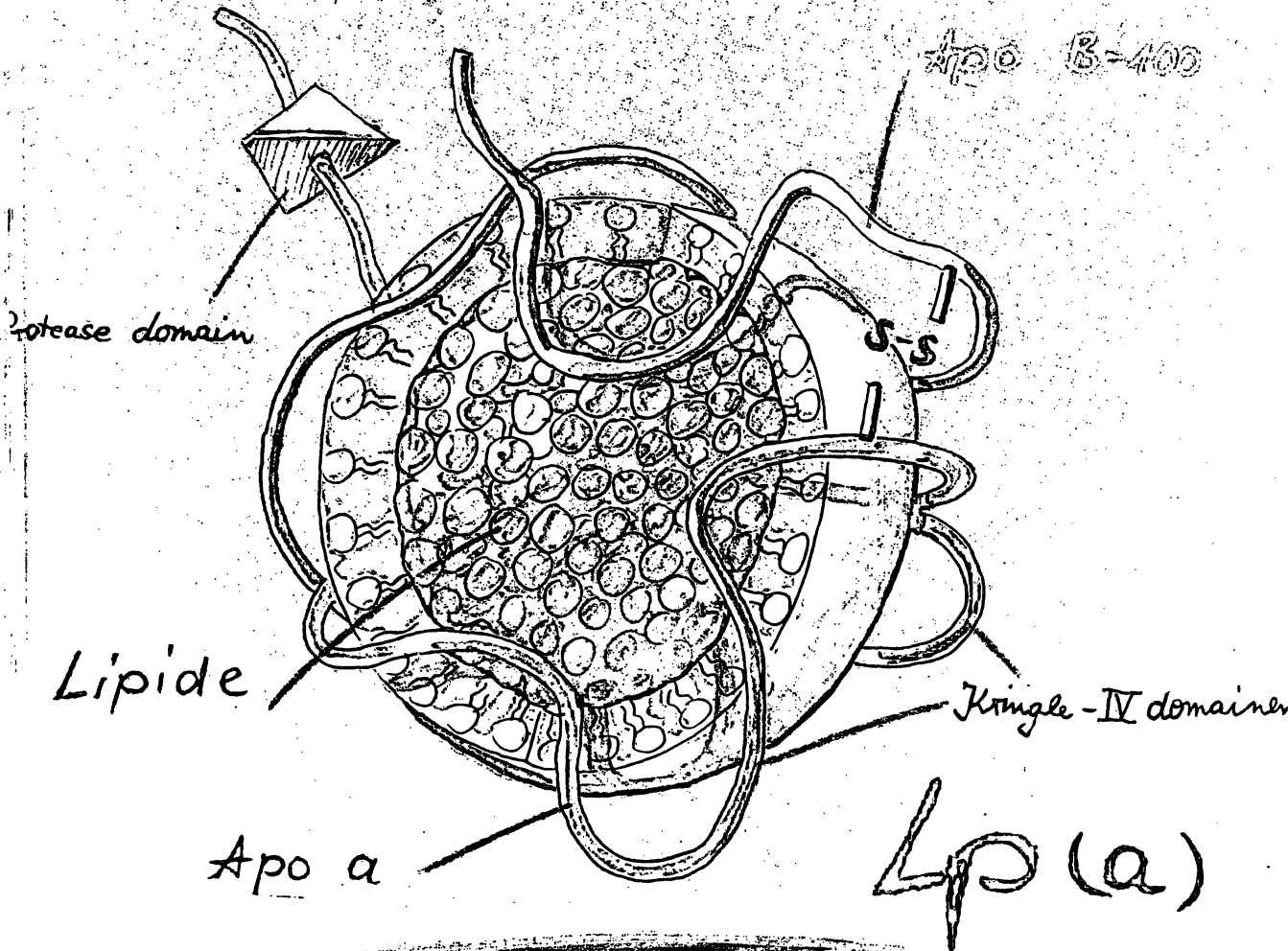
G. Vogel¹ und E. Spanuth²
¹ Medizinische Akademie Erfurt
² Boehringer Mannheim

Die intravasculäre Aktivierung des Gerinnungssystems kann einerseits eine intravasculäre disseminierte Gerinnung auslösen, die klinisch in Form von Mikrogerinnseln oder dem Bild der Verbrauchskoagulopathie imponiert, oder andererseits durch Lokalisierung des Prozesses zu einer tiefen Venenthrombose (TVT) führen. Der Aktivierungsprozeß ist dadurch charakterisiert, daß Reaktionsprodukte der Thrombinwirkung im Plasma nachweisbar sind, wie z. B. Fibrinopeptid A (FPA) und Fibrinmonomere (FM). Um den diagnostischen und prognostischen Wert der FM zu evaluieren, wurden 156 Patienten mit Oberschenkel-, Oberschenkelhals- und Unterschenkelknochenfrakturen sowie Kniegelenkoperationen und elektivem Hüftgelenkersatz in der postoperativen Phase untersucht. Alle Patienten erhielten neben den üblichen thromboseprophylaktischen Maßnahmen niedrig dosiertes Heparin (3 x 5000 E s.c./24 h). Neben gerinnungsanalytischen

Risikofaktor Lp(a):

Wir haben über 10 Jahre Erfahrung

in der Diagnostik – und Sie?



Lp(a) ist ein unabhängiger Risikofaktor für Atherosklerose. Sequenzhomologien von Apo(a) mit Plasminogen deuten auf einen Zusammenhang von thrombotischen und atherosklerotischen Prozessen hin. Lp(a)-Konzentrationen über 30 mg/dl verstärken bei gleichzeitiger LDL-Erhöhung das Atherosklerose-Risiko um ein Vielfaches.

IMMUNO ist Pionier in der Lp(a)-Diagnostik. In über 100 Publikationen wird seit mehr als 10 Jahren die Qualität von IMMUNO-Reagenzien dokumentiert.

NEU!

Mit IMMUNOZYMLp(a) steht Ihnen erstmals ein Einschritt-ELISA für die Routine-Diagnostik zur Verfügung.

Ich interessiere mich für Lp(a)-Diagnostik und bitte um Zusendung folgender Unterlagen:

- ELISA IMMUNOZYMLp(a)
- Andere Methoden (Rocket-Elektrophorese, Nephelometrie, Phenotyping)
- Preisliste Immuno-Diagnostika
- Besuch des Diagnostik-Referenten
- Sonstiges:

Name: _____

Straße: _____

PLZ/Ort: _____



Lp(a): Nutzen Sie unsere Erfahrung!

Diabetes mellitus

In der Arztpraxis eine der häufigsten Diagnosen!

Für Ihre Patienten mit Insulinbehandlung:

Mein Buch über den Diabetes mellitus

Besonders aktuell: Was ist von den Insulin-Pens zu halten? Hypoglykämie: Zeichen, Behandlung und vorbeugende Maßnahmen; Die Kost bei moderner Insulinbehandlung, Empfängnisverhütung und AIDS, gibt es deswegen Neues? u. v. m.

Für Ihre Patienten, die nicht Insulin spritzen:

Wie behandle ich meinen Diabetes

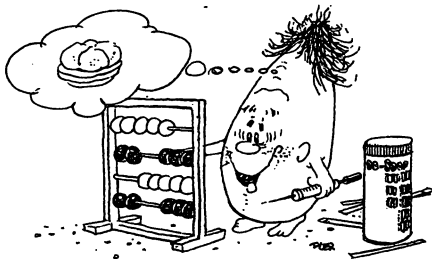
Wichtige Themen: Regelmäßige Selbstmessung des Urinzuckers: Grundlage der Selbstbehandlung des Typ-II-Diabetes. Wie mißt man Urinzucker und gegebenenfalls den Blutzucker? Diät als Grundlage der Behandlung: Was haben die Füße mit dem Diabetes zu tun? Fußgymnastik u. v. m.

Für Ihre Typ-II-Patienten mit Insulinbehandlung:

Mit Insulin geht es mir wieder besser

Dieses Buch wurde speziell für ältere Diabetiker geschrieben, die lange Jahre nur mit Diät oder mit blutzuckersenkenden Tabletten behandelt wurden, jetzt aber Insulin spritzen müssen.

Viele Praxen besitzen bereits diese Bücher von Viktor Jörgens und Michael Berger, Univ.-Klinik Düsseldorf, als Ansichtsexemplare für Ihre Patienten.



Insulinabhängig? . . .

Funktioneller Insulingebrauch: Der Weg zur Freiheit mit nahezu normalem Blutzucker

Ein Patientenlehrbuch von Kinga Howorka für die Behandlung mit Selbstkontrolle und mehrfachen Injektionen oder einer steuerbaren Insulinpumpe.

Aus dem Inhalt: Wieviel Insulin brauche ich für eine BE? Wieviel Insulin (und welches) soll ich spritzen, auch wenn ich nichts esse? Wie kann ich meinen Blutzucker gezielt senken, wenn er zu hoch ist?



Hiermit bestelle ich

- ... Expl. von Jörgens/Berger: Mein Buch über den Diabetes mellitus (für Insulinpflichtige), 108 Seiten, 19,80 DM
 - deutsch französisch türkisch
- ... Expl. von Jörgens/Kronsbein/Berger: Wie behandle ich meinen Diabetes (für Nichtinsulinpflichtige), 104 Seiten, 19,80 DM
 - deutsch französisch arabisch
- ... Expl. von Jörgens/Grüßer/Kronsbein: Mit Insulin geht es mir wieder besser, 108 Seiten, 19,80 DM
- ... Expl. von Howorka: Insulinabhängig?, 152 Seiten, 25,- DM
 - Prospektmaterial

Lab.med. 4/91

Name: _____

Straße: _____

PLZ/Ort: _____

Datum: _____ Unterschrift: _____

Empfehlen Sie Ihren Diabetikern diese didaktisch hervorragenden Informationen!

Bei Bestellung liefert der Verlag Kirchheim an Arztpraxen gratis Informationsblätter dieser Bücher, die Sie an Patienten weitergeben können. Bitte benutzen Sie hierfür den nebenstehenden Bestellcoupon.

VERLAG KIRCHHEIM MAINZ Postfach 25 24
Kaiserstraße 41
6500 Mainz

Ihr Fachverlag für Diabetes-Literatur

Präoperatives Screening der Thrombozytenfunktion mit dem In-vitro-Blutungstest

G. Dietrich und V. Kretschmer
Abt. Transfusionsmedizin und Gerinnungsphysiologie, Univ.-Klinikum Marburg

Präoperativ wird häufig nur plasmatische Gerinnung (Quick, PTT) sowie Thrombozytenzahl untersucht, nicht jedoch die Thrombozytenfunktion. Angeborene Plättchenfunktionsstörungen, wie das v. Willebrand-Syndrom oder erworbene, meist medikamenteninduzierte, fallen so erst intra- oder postoperativ durch Blutungskomplikationen auf. Mit dem In-vitro-Blutungstest (IVBT, Thrombostat® 4000, VDG, Seeon) steht uns jetzt ein einfacher Screening-Test zur Verfügung, der spezifisch und sensitiv Störungen der primären Hämostase erfaßt. Wir untersuchten den Einfluß verschiedener plasmatischer und thrombozytärer Gerinnungsstörungen auf die Meßergebnisse.

Material und Methodik: Nach Optimierung der Methode (2) untersuchten wir mit dem IVBT Blutproben von Patienten mit gesicherter plasmatischer oder thrombozytärer Gerinnungsstörung. Wir bestimmten Blutungszeit (BZ) und Blutungsvolumen (BV).

Ergebnisse und Schlußfolgerungen: Keine Abweichungen von den Normalwerten (BV 220 ± 43 µl; BZ 138 ± 66 sec; n = 37) konnten beobachtet werden bei Mangel an Faktor I (152; 155; n = 1), VIII (265; 172; n = 2), IX (194; 102; n = 1 und XII (166; 70; n = 1), bei therapeutischer Heparinisierung (241; 121; n = 7) oder Marcumartherapie (188; 112; n = 37). Alle vier untersuchten Fälle vom v. Willebrand-Syndrom hatten pathologische BV und BZ. Der Effekt einer Einzeldosis von 100 mg Acetylsalicylsäure (ASS) war fünf bis sieben Tage nachweisbar.

Der IVBT erwies sich als einfach durchführbare, sensitive und spezifische Methode, thrombozytäre Funktionsstörungen zu erfassen. Allerdings ist der Einfluß des Hämatokrits auf die Ergebnisse zu beachten (3). Wir empfehlen den IVBT als Screening-Test im Rahmen der Abklärung von Blutungsneigungen, zur Verlaufs- und Therapiekontrolle. Besonders bei der Vorbereitung von Operationen mit vermehrtem Blutungsrisiko führt die zusätzliche Durchführung des IVBT neben der plasmatischen Gerinnungsanalyse zu höherer Sicherheit.

Schrifttum:

1. KRATZER, M. A. A., BORN, G. V. R.: *Haemostasis* 15, 357-362 (1985).
2. DIETRICH, G., WEBER, D., et al.: Poster dieses Kongresses
3. DIETRICH, G., KRETSCHMER, V.: *Infusionsther.* 17, 212-213 (1990).

HLA-Typisierung bei Nierenempfängern und Spendern nach Amplifikation mit der Polymerasekettenreaktion (PCR)

G. Holzberger¹, S. Seidl¹, B. O. Boehm², B. Peschke², A. Fürsch², F. A. Scheuermann², W. Schoeppe², M. Opp³ und H. W. Doerr³
¹Institut für Immunhämatologie und Blutspendedienst Hessen
²Zentrum der Inneren Medizin der Universität Frankfurt
³Abteilung für Virologie der Universität Frankfurt

Mit der PCR (Polymerase Chain Reaction) und exonspezifischen synthetischen Primern ist es möglich, das die N-terminale Domäne kodierende 2 Exon des HLA-DRB1-Genlocus nach einem Protokoll von Saiki et al. (*Science* 230, 1350-1355, 1985) zu amplifizieren. Ausgangsmaterial ist die aus Gewebe (Lymphknoten, Milz) oder peripherem Blut (Heparin, EDTA) isolierte genomische DNA. Die pro PCR-Ansatz erforderlichen 1-5 µg DNA werden aus 1-5 x 10⁶ mononucleären Zellen isoliert. Die DNA kann in ca. 2 bis 4 Stunden nach Entfernen der Erythrozyten (Ery-Lysis Puffer) und Proteinverdau (Proteinase K und Kernlysispuffer) sowie Proteinfällung (6M gesättigte NaCl-Lösung oder Phenolextraktion) aus dem Überstand mit 96% eiskaltem Ethanol präzipitiert werden. Die thermostabile Traq-Polymerase ermöglicht es,

Routinetests wurden AT III, Heparin und FM (Erythrocytenagglutinationstest nach Largo, Boehringer Mannheim/Diagnostica Stago: FM-Test) bestimmt. Am Tag vor der Operation sowie am 1., 2., 3., 5., 7. und 9. postoperativen Tag wurden von allen Patienten Blutproben entnommen. Die Diagnose der TVT wurde durch mit dem ¹²⁵J-Fibrinogen-Test parallel dazu vorgenommen. Positive Resultate wurden durch Phlebographie am 7. oder 9. postoperativen Tag überprüft. Bei diesen Patienten ohne TVT wurden nur bei 26% positive FM-Test-Resultate erhalten, während bei 34 der 36 (94%) Patienten mit TVT erhöhte FM-Werte nachgewiesen wurden. Bei diesen Patienten wurde der ¹²⁵J-Fibrinogen-Test erst 3 bis 4 Tage später nach dem FM-Test positiv. Die Ergebnisse zeigen, daß der TM-Test einen frühzeitigen Nachweis des präthrombotischen Zustandes mit einer Sensibilität von 94% und einer Sensitivität von 86% ermöglicht. Der prädiktive Wert des FM-Tests für eine TVT an einem Zeitpunkt von 3 bis 4 Tagen vor der Diagnose mit dem ¹²⁵J-Fibrinogen-Test beträgt 67%. Der FM-Test zeigt bei tiefer Venenthrombose 3 bis 4 Tage vor dem ¹²⁵J-Fibrinogen-Test ein positives Ergebnis und korreliert mit der Heparinaktivität im Plasma. Durch frühzeitigen Nachweis von FM kann sich damit die Möglichkeit ergeben, die drohende Lokalisation des thrombogenetischen Prozesses durch angepaßte Heparindosierung abzuwenden.

Methodische Optimierung des In-vitro-Blutungstests

G. Dietrich, D. Weber und V. Kretschmer
Abt. Transfusionsmedizin und Gerinnungsphysiologie, Univ.-Klinikum Marburg

Der In-vitro-Blutungstest (Thrombostat® 4000, VDS, Seeon) simuliert die primäre Hämostase durch Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten an der Apertur einer kollagenbeschichteten Zelluloseazetatmembran. Wir untersuchten methodische Einflußgrößen und variierten sie systematisch, um den IVBT für die Routineanwendung zu optimieren.

Material und Methodik: Aus Zitratblut (1:10) von gesunden Personen wurde zunächst der IVBT, wie bereits zuvor beschrieben (2), durchgeführt, Initial Flow (IF), Blutungsvolumen (BV) und Blutungszeit (BZ) ermittelt. Dabei gingen wir von einem Standardtest aus und variierten nur jeweils einen der folgenden Parameter: a) Zeit zwischen Blutentnahme und Meßbeginn; b) verschiedene Filterchargen; c) Durchmesser von Filterapertur und Kapillare; d) Art des Aggregans; e) Konzentration des Aggregans für Lagerungsstabilität der kollagenbeschichteten Filter; g) Temperatur von Filter, Kapillare und Blut; h) Benetzung der Kapillare.

Ergebnisse und Schlußfolgerungen: a) Der IVBT liefert zwischen 30 und 180 Minuten nach Blutentnahme konstante Werte; b) Die Ergebnisse variieren abhängig von der Filtercharge; c) Eine Filterapertur von 120 µm führt zu niedrigerem BV und kürzerer BZ als 150 µm. Das Entgegengesetzte gilt für den Kapillardurchmesser; d) ADP (5 µmol/l) als Aggregans ergibt die geringsten BV und BZ, gefolgt von Ristocetin (1,5 mg/ml), CaCl₂ (2 mmol/l und NaCl (0,9%); e) BV und BZ korrelieren reziprok zur Konzentration von ADP oder Ristocetin; f) Filter sind über 14 Tage nach Öffnen der Verpackung stabil; g) Das Meßergebnis wird durch Filter- und Bluttemperatur, nicht jedoch die Kapillartemperatur beeinflusst; h) Trockene Kapillaren ergeben geringere und präzisere BV und BZ.

Folgende optimierte Methode leitet sich daraus ab: Inkubation von trockener Kapillare (Ø 200 µm), 40 µl ADP (4 µmol/l) in Filter mit Apertur 150 µm sowie der Blutprobe (1 ml) über 4 Minuten bei 37°C. Messung mit einem Unterdruck von 40 mbar. Zur Erhöhung der Sensitivität kann CaCl₂ 2 mmol/l statt ADP Verwendung finden.

Schrifttum:

1. KRATZER, M. A. A., BORN, G. V. R.: *Haemostasis* 15, 357-362 (1985).
2. DIETRICH, G., KRETSCHMER, V.: *Infusionsther.* 17, 212-213 (1990).

im Mikroprozessor-gesteuerten Thermocycler mit 3 Temperaturzyklen (Denaturierung 30 sec/97°C, Annealing 30 sec/55°C, Polymerisation 1 min/74°C) nach 30 Zyklen 10⁵- bis 10⁶-fach Kopien der 300 Nucleotide umfassenden DNA-Zielsequenz in 2 bis 3 Stunden herzustellen. Die DNA der Amplifikate wird mittels DOT-Blotting auf eine Membran (Nylon, Nitrozellulose) übertragen und durch UV-Crosslink (25 mJoules) fixiert. Anschließend wird durch die in situ Hybridisierung mit 32P-gamma ATP (10 µCi/µl) markierten 14 Oligonucleotidsonden (Eurotransplant Typing Kit) der mit der serologischen HLA-Spezifität assoziierte Strukturpolymorphismus durch Autoradiographie dargestellt.

Wir haben bei 16 Nierenempfängern und Spendern, bei denen die HLA-Typisierung einen Blank ergab oder wegen schlechter Zellqualität nicht sicher war, mittels Oligonucleotidtyping die HLA-Typisierung durchführen können. Durch Weiterentwicklung der PCR-Methode erscheint es zukünftig möglich, die HLA-Typisierung und die Virusdiagnostik zum Nachweis von HIV, CMV, HBV, HCV simultan in einem PCR-Ansatz durchzuführen, wenn die Primersequenzen so ausgewählt werden, daß sie untereinander nicht hybridisieren.

P 25

Physiological Implications of Measurement of Lymphocyte Subsets and Corticosteroid Receptors in Mononuclear Lymphocytes during Aging

E. Orlandini, I. Karbowiak, V. Zampollo, M. Scali, G. Vittadello und F. Callegari
Laboratorio Analisi and Geriatria Ospedale Civile Piove di Sacco, and Istituto Semeiotica Medica University of Padua

Lymphocyte subsets are affected by corticosteroids (increase of T-suppressor and reduction of CD4/CD8 ratio). It was previously reported that in rat plasma corticosterone is elevated and brain corticosteroid receptors are reduced (1). Aim of the study was to measure lymphocyte subsets, corticosteroid Type I (TIR) and Type II (TIIR) receptors in mononuclear leucocytes (M.N.L.), and plasma cortisol in 20 healthy aged people (60-97 y.o) and in 20 normal controls (21-50 y. o). Lymphocyte subsets were measured by cytofluorimetry (Cytoran Ortho) using monoclonal antibodies from Ortho. Plasma cortisol (F) was measured by enzyme-immunoassay. Corticosteroid Type I and Type II receptors were measured by radioreceptorassay as previously described (2-3).

Results are reported as mean ± SD (*p < 0.05; **p < 0.001).

	CD2	CD3	CD4	CD8	CD16	CD4/CD8	F	TIR	TIIR
Aged	85±6	74±8	47±9	30±11	15±10	1.8±0.9	9.8±3.7	194±78*	1829±577**
Contr	85±5	73±9	46±8	30±7	15±5	1.9±0.7	9.3±4.5	270±98	3340±941

A significant inverse correlation was found between age and CD4 and age and CD4/CD8 ratio in all cases together, but not between cortisol and age.

Conclusions: lymphocyte subsets and plasma cortisol concentration are normal during aging. CD4 and CD4/CD8 ratio which are an index of cortisol action are normal too. The isolated Type I and Type II receptors reduction seems to be a determinant of aging, without implication in the regulation of pituitary-adrenal axis.

References:

1. SAPOLSKY, R., et al.: *Endocrinol. Metab. Clinics*. (1987).
2. ARMANINI, D., et al.: *Am. J. Physiol.* (1985).
3. ARMANINI, D., et al.: *J. Endocrinol. Invest.* (1985).

* Umstellung nach Redaktionsschluß

V 13*

Sensitivity and Specificity of the Capture-R Test in the Screening for Red Cell Antibodies of the IgG Class

R. Lynen, C. Bialek und H. Neumeyer
Abteilung Transfusionsmedizin, Klinikum der Universität, Robert-Koch-Straße 40, D-3400 Göttingen, FRG.

Wie have studied the commercial Capture-R test (CR-T) for its sensitivity and specificity in the screening for red cell antibodies of the IgG class in parallel to the common Liss-Coombs-tube centrifugation test (LC-tubeCT) using the same serum samples from transfusion patients. Up to now the following results can be presented: 1. In a prospective study of the sera from pretransfusion patients for red cell IgG-alloantibodies (2409 patients) the detection rate with the CR-T (27 IgG-alloantibodies) was termed to be 100%. In comparison the detection rate with the LC-tubeCT (19 IgG-Alloantibodies) was 70%. 2. With the CR-T the rate of non-reproducible, false positive results (22/2409 = 0,91%) was comparable to the rate of these results with the LC-tubeCT (27/2409 = 1,12%). 3. In the titration of 133 different IgG-alloantibodies, the CR-T was by 2-6 titer steps more sensitive than the common LC-tubeCT. The only exception was an anti-Fy^b antibody, better demonstrable with the LC-tubeCT. 4. Further 24 IgG-alloantibodies could be identified only using the CR-T, when the LC-tubeCT failed to identify them. We must conclude that the CR-T is significantly more sensitive than the LC-tubeCT, but with approximately the same rate of false positive results. The CR-T is well suited for the multiple screening of the sera from transfusion patients and from blood donors for red cell antibodies of the IgG class. A use for antibody screening during pregnancy and for the diagnostics of IgG-dependent hemolytic conditions (MHN, AIHA) should also be possible with the CR-T. Unfortunately a modification of this test system for individual screening tests and for crossmatches is not available at present.

V 13*

Sensitivity and Specificity of the Gel-Centrifugation Test in the Screening for Red Cell Antibodies of the IgG Class

R. Lynen, Sonja Sadlowski, G. Simson und H. Neumeyer
Abteilung Transfusionsmedizin, Klinikum der Universität, Robert-Koch-Straße 40, D-3400 Göttingen, FRG

The gel-centrifugation test developed by Lapierre for the study of red cell antibodies is commercially available since about 2 years. We have compared this Liss-Coombs-gel-centrifugation test system (LC-gelCT), and the common Liss-Coombs-tube-centrifugation test (LC-tubeCT) regarding their sensitivity and specificity in the determination of red cell IgG antibodies. Up to now the following results can be presented: 1. The detection rate for red cell alloantibodies of the IgG class was definitely superior with the LC-gelCT. In a prospective screening of the sera of 2975 patients we found 31 IgG-alloantibodies (100%) with the LC-gelCT, whereas with the LC-tubeCT only 24 IgG-alloantibodies (77%) were found. 2. During this screening period the rate of non-reproducible, false positive results was considerably lower with the LC-gelCT (11/2975 = 0,37%) than with the LC-tubeCT (60/2975 = 2,02%). 3. Only with 3 out of 98 IgG-alloantibodies the titerscores (doubling master dilutions in AB-serum) were lower with the LC-gelCT whereas the titers were the same as with the LC-tubeCT. The titers of the remaining 95 antibodies were higher (2-6 Titer steps) with the LC-gelCT as compared to the LC-tubeCT. 4. Further 27 IgG-alloantibodies could be identified only when using the LC-gelCT, after the LC-tubeCT had failed. We can state that the LC-gelCT shows the better sensitivity and at the same time a considerably lower proportion of false positive results, as compared with the LC-tubeCT. From other results one can expect that the LC-gelCT will be superior also in the antibody screening during pregnancies, in the diagnostics of the mhn, and in the diagnostics of auto-immune hemolytic anemias (AIHA).

Anstiege der Cholinesterase-Aktivität bei Patienten mit dekompensierter Leberzirrhose nach Gabe von gerinnungsaktivem Frischplasma

B.-E. Braun, R. Goes, M. Tryba*, H.-D. Kuntz**, D. Hüppe** und M. Krieg

Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin

* Klinik für Anästhesiologie, Intensiv- und Schmerztherapie

** Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie der Berufsgenossenschaftlichen Krankenanstalten Bergmannsheil, Universitätsklinik der Ruhr-Universität, W-4630 Bochum 1

latrogen bedingte Veränderungen klinisch-chemischer Meßgrößen während intensiv-medizinischer Therapie sind nichts Ungeöhnliches (1, 2). Im Rahmen der Therapie von Gerinnungsstörungen bei Patienten mit dekompensierter Leberzirrhose stellte sich die Frage, inwieweit es neben der erwünschten Erhöhung von Gerinnungsfaktoren durch wiederholte Gabe von gerinnungsaktivem Frischplasma (FFP) (3) auch zur Veränderung gängiger klinisch-chemischer Meßgrößen kommen kann.

Hierzu wurden in 15 FFP-Einzelproben 31 der gängigsten klinisch-chemischen Meßgrößen bestimmt. Weiterhin wurde retrospektiv der zeitliche Verlauf der Serum-Konzentrationen bzw. -Aktivitäten von Glukose, Natrium, Chlorid und Cholinesterase exemplarisch bei vier Patienten mit dekompensierter Leberzirrhose unterschiedlicher Ätiologie verfolgt. Drei der Patienten wurden dabei mit FFP substituiert, während der vierte Patient kein FFP erhielt.

Die Ergebnisse im einzelnen: 1. 25 von 31 der im FFP bestimmten Meßgrößen liegen mit ihren Werten jeweils im laborseitig gültigen Referenzintervall. Ausnahmen bilden Natrium, Glukose und die Osmolalität, bei denen man erhöhte Werte findet, sowie Chlorid, Magnesium und Kalzium, bei denen erniedrigte Werte gefunden werden. 2. Im zeitlichen Verlauf der Cholinesterase-Aktivität ergaben sich beim Patienten ohne FFP-Gabe gleichbleibend erniedrigte Werte, während die Aktivität dieses Enzyms bei den drei substituierten Patienten stetig anstieg und präfinal im Referenzintervall liegende Werte erreichte. Alle übrigen Meßgrößen zeigten bei den vier untersuchten Patienten im zeitlichen Verlauf keine gravierenden Veränderungen. Wahrscheinlich muß die lange Halbwertszeit der Cholinesterase für deren Akkumulation im Blut von Patienten unter FFP-Substitution verantwortlich gemacht werden. Bei den übrigen untersuchten Meßgrößen scheinen die physiologischen Regelmechanismen, die diese in engen Grenzen konstant halten, auch durch das Ausmaß der hier erfolgten inadäquaten Substitution noch nicht überfordert zu sein.

Zusammenfassend belegen die dargestellten Ergebnisse, daß die Cholinesterase-Aktivität bei Patienten, die wegen einer hepato-genen Koagulopathie mit großen Volumina FFP therapiert werden, keine sichere Aussage über die Lebersyntheseleistung zuläßt. Bei den übrigen gängigen Meßgrößen ist dagegen eine Beeinflussung unter den beschriebenen Bedingungen nicht erkennbar.

Schrifttum:

1. RAUCH, H., et al.: Intensive Care Med. 15, 84-86 (1989).
2. BOLDT, J., et al.: Anaesthesist 39, 412-419 (1990).
3. KELLNER, S., et al.: Infusionstherapie 12, 208-210 (1985).

Chromosomen im Reflexionskontrast

Nelles Thomas Hygiene-Institut Gelsenkirchen

Das Reflexionskontrastmikroskop wird erstmals als Aufsicht- und Fluoreszenzmikroskop zur Analyse menschlicher Amnionzell- und Lymphozytenchromosomen in ungefärbtem Zustand eingesetzt. Unter Anwendung und Analyse physikalisch optischer Zusammenhänge bei der Entstehung von Bildeigenschaften (Refle-

Pasteur DIAGNOSTIKA
Kallestad

QUANTAFLUOR

Die sichere Wahl für Ihre Autoimmun-Diagnostik

- * **ANA:**
 - Hep-2
 - Crithidia luciliae
- * **zytoplasmatische Autoantikörper:**
 - Maus Magen/Niere
 - Affen Schilddrüse
- * **ENA:**
 - Doppelte radiale Immundiffusion
- * **Cardiolipin Autoantikörper:**
 - Mikrotiterstreifen ELISA
- * **Interpretation:**
 - Schulungsunterlagen
 - Fortbildungsveranstaltungen

Fordern Sie Informationen an!

PASTEUR
DIAGNOSTIKA GMBH
HABSBURGERSTRASSE 4
7800 FREIBURG
TEL.NR. (0761) 5 1009-40
FAX-NR. (0761) 5 1009-99

xion, Interferenz, Kontrast) wird eine Erklärung für das Erscheinungsbild von Zellen, Kernen und Chromosomen im Reflexionskontrast, d. h. für Farbgebung, Helligkeitsabstufungen und mikroskopisches Abbildungsverhalten gegeben, die Rückschlüsse auf Form und Struktur der Chromosomen ermöglichen.

Es zeigte sich, daß ein sehr komplexes Zusammenwirken der einzelnen optischen Komponenten vorliegt, die jeweils unterschiedlich an der Bildentstehung beteiligt sind. Hierbei ließ sich nachweisen, daß Helligkeitsunterschiede an Zellkernen und Chromosomen aufgrund von Interferenzerscheinungen an der Chromosomenoberfläche zustande kommen. Dadurch wird ein Bandenmuster sichtbar, das dem Bandenmuster von mit Quinacrin und Giemsa gefärbten Chromosomen entspricht.

Als Einzelergebnis ist hier die deutliche und klare Darstellung der Satelliten und sekundären Konstruktionen an akrozentrischen Chromosomen zu nennen. Mit Giemsa und Feulgen gefärbte Chromosomen zeigten im RK ein kontrastreiches, je nach Färbemethode und Farbeintensität unterschiedlich aussagekräftiges Bild. Besonders mit Feulgen gefärbte Chromosomen hatten ein stark kontrastiertes Erscheinungsbild mit scharf begrenzten Konturen, deutlich sichtbaren Centromerregionen, sekundären Einschnürungen, Satelliten, knopf- bzw. keulenartig gestalteten Telomerregionen sowie ein gut erkennbares, dem Q- bzw. G-bandig ähnlichem Bandenmuster.

P 30

Unterschiede in der Zusammensetzung des extrazellulären Gewebes von hinteren Kreuzbändern und Patellarsehnen beim Schaf

N. Gässler¹, I. Tugtekin¹, U. Bosch², W. J. Kasperczyk² und A. Delbrück¹

¹ Institut für Klinische Chemie II

² Unfallchirurgische Klinik der Medizinischen Hochschule Hannover

Einleitung: Der Ersatz des hinteren Kreuzbandes durch das mittlere Längsdrittel der gleichseitigen Patellarsehne stellt bei der chronischen hinteren Kniegelenkinstabilität die Operationsmethode der Wahl dar. Das Schaf ist dabei ein bevorzugtes Tier für chirurgisch-experimentelle Forschungsmodelle. Um die Veränderungen eines solchen Transplantates beurteilen zu können, ist es notwendig, sich mit der Feinstruktur dieser Gewebe zu beschäftigen (1). Aus biochemischer Sicht wurde bisher nur von Amiel (2) berichtet; hierin vergleicht Amiel den Gesamt-Glykosaminoglykan-Gehalt von Kreuzbändern und Patellarsehnen. In der vorliegenden Studie wurde schwerpunktmäßig die Zusammensetzung der Glykosaminoglykane als Hauptbestandteil der Proteoglykane bestimmt und miteinander verglichen.

Material und Methode: 15 zweijährige, ausgewachsene deutsche Schwarzkopfschafe wurden nach der oben erwähnten Methode am linken Bein operiert (3). Nach Versuchsende gelangten das hintere Kreuzband und das mittlere Längsdrittel der Patellarsehne des rechten Beines zur Untersuchung. Die Trennung der Glykosaminoglykane in ihre Einzelkomponenten mittels spezifischer Enzymverdauung und Quantifizierung der entstandenen Disaccharide erfolgte nach der Methode von Gurr (4).

Ergebnisse: Der Glucuronsäure-Gehalt als Maßgröße für die Gesamt-Glykosaminoglykane beträgt $21,3 (\pm 7,3) \mu\text{mol/g}$ Trockengewicht (TG) für die Kreuzbänder und $7,0 (\pm 2,8) \mu\text{mol/g}$ TG für die Patellarsehnen. Im Vergleich zu den Patellarsehnen enthalten die Kreuzbänder die 3fache Menge an Glykosaminoglykanen. Auch die Messung mit Dimethylmethylblau, welche besonders die sulfatartigen Bestandteile der Glykosaminoglykane erfaßt, ergab in den Kreuzbändern eine 4fach höhere Konzentration gegenüber den Patellarsehnen.

Im einzelnen ergab die Bestimmung der Glykosaminoglykane folgendes Muster:

In den Kreuzbändern findet man Chondroitinsulfat ($12,38 \mu\text{mol}$ Disaccharid/g TG) mit ca. 76% und Hyaluronan ($2,61 \mu\text{mol}$ Disaccharid/g TG) mit ca. 17% als Hauptbestandteile neben geringen

Anteilen an Chondroitin ($0,49 \mu\text{mol}$ Disaccharid/g TG; ca. 3%) und Dermatan und Dermatansulfat ($0,59 \mu\text{mol}$ Disaccharid/g TG; ca. 4%). Dagegen konnte in den Patellarsehnen ein größerer Anteil an Dermatansulfat, insbesondere des entsprechenden 4-Isomeren mit ca. 17% ($0,87 \mu\text{mol}$ Disaccharid/g TG) ermittelt werden. Die übrigen Glykosaminoglykane verteilen sich mit ca. 46% ($2,93 \mu\text{mol}$ Disaccharid/g TG) auf Chondroitinsulfat, ca. 30% ($1,47 \mu\text{mol}$ Disaccharid/g TG) auf Hyaluronan und ca. 7% ($0,39 \mu\text{mol}$ Disaccharid/g TG) auf die anderen Glykosaminoglykane.

Diskussion: Die ermittelten Gesamt-Glykosaminoglykan-Gehalte der Kreuzbänder und Patellarsehnen stehen im Einklang mit den berichteten Resultaten in (2). Kreuzband und Patellarsehne unterscheiden sich aber nicht nur durch ihren Gesamtgehalt an Glykosaminoglykanen, sondern auch durch das unterschiedliche Verteilungsmuster. Die Verteilungsmuster können darüber hinaus als Hilfsmittel zur Beobachtung von molekularen Heilungs- und Anpassungsvorgängen des Patellarsehnen-Transplantates dienen. Dies wird derzeit in einer Folgestudie untersucht.

Schrifttum:

1. BOSCH, U., DECKER, B., KASPERCZYK, W., OESTERN, H.-J., TSCHERNE, H.: Biological Aspects of Long-term Failure of Autografts After Cruciate Ligament Replacement. Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery 108, 368-372 (1989).
2. AMIEL, D., FRANK, C., HARWOOD, F., FRONEK, J., AKESON, W.: Tendons and Ligaments: A Morphological and Biochemical Comparison. Journal of Orthopaedic Research 1, 257 ff. (1984).
3. BOSCH, U., KASPERCZYK, W. J., OESTERN, H.-J., TSCHERNE, H.: Die Einheilungsphasen beim autogenen hinteren Kreuzbandersatz. Der Unfallchirurg 93, 187-196 (1990).
4. GURR, E., PALLASCH, G., TUNN, S., TAMM, C., DELBRÜCK, A.: High Performance Liquid Chromatographic Assay of Disaccharides and Oligosaccharides Produced by the Digestion of Glycosaminoglycans with Chondroitin Sulphate Lyases. Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry 23, 77-87 (1985).

P 31

Nachweis von normalen und pathologischen Hämoglobinvarianten mittels isoelektrischer Fokussierung auf rehydratisierten Mikrogelen*

R. J. Klosson^{1,2}, H. Barzik¹

¹ Hygiene-Institut des Ruhrgebiets (Prof. Dr. Dickgießer), 4650 Gelsenkirchen

² Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik (Ltd. Arzt: Dr. Dr. Klosson), Kreiskrankenhaus, 3588 Homberg

Bisher sind mehr als 450 Hämoglobinvarianten und -defekte bekannt (1). Von den hereditären Synthesestörungen stellt die Thalassemie in unseren Breiten die häufigste Erkrankung dar; von den Strukturvarianten wird am häufigsten HbS nachgewiesen. Zum Nachweis der normalen und pathologischen Varianten werden verschiedenste Methoden angewandt. Die isoelektrische Fokussierung ist für ihre gute Auftrennung der Hämoglobine bekannt (2), über die Einsatzmöglichkeiten teilmechanisierter Systeme liegen bisher nur wenige Erfahrungen vor (3).

Polyacrylamid-Mikrogele ($50 \times 43 \times 0,5$ mm) werden auf der planen Oberfläche einer Harstofflösung (je Gel 900 μl 1 M Harnstofflg. + 25 mg β -Alanin + 50 μl Ampholine 6-8 + 25 μl Ampholine 7-9 + 25 μl Servalyte 7-8) für 2 Stunden rehydratisiert. Mit einem IEF-Applikatorstreifen werden bis zu 8 Proben (5 μg Hb in 1 μl EDTA-Blut-Hämölysat) aufgetragen und in der Trennkammer des PhastSystems (Pharmacia LKB/Freiburg) aufgetrennt; die Bromphenolblau-Färbung erfolgt in 8 Schritten über insgesamt 37 Minuten. Es können in jedem Lauf 2 Gele bearbeitet werden.

Trennprogramm: Laufbedingungen: sample appl. down at .2: 0 Vh; sample appl. up at .3: 1 Vh; extra alarm to sound at .1: 73 Vh
1: 2000 V, 2 mA, 3,5 W, 15 C, 75 Vh;
.2: 200 V, 2 mA, 3,5 W, 15 C, 15 Vh
.3: 2000 V, 5 mA, 2,0 W, 15 C, 510 Vh

Färbeprogramm: (1) 5 min, 40 C: Fixierlg. (20% w/v TCA); (2) 0,5 min, 40 C: Aqua bidest; (3) 5 min, 40 C: Färbelsg. (0,2% w/v Bromphenolblau, 50% v/v EtOH, 5% v/v Essigs.); (4) wie (2); (5) 10 min, 40 C: Entfärbelsg. (30% v/v EtOH, 5% v/v 5% v/v Es-

sigs.); (6) 6 min, 40 C: wie (5); (7) 5 min, 40 C: wie (5); (8) 5 min, 25 C: Stopplsg. (30% v/v EtOH, 5% v/v Essigsäure, 4% v/v Glycerin)

Das trockene (gefärbte) Gel kann ohne weitere Behandlung aufbewahrt werden. Die Trennung der Hämoglobinbanden ist scharf und reproduzierbar, durch Bezug auf mitgeführte Standardpräparationen ist eine qualitative Auswertung möglich. Die Hämoglobinvarianten sind densitometrisch zu quantifizieren, mit einer akzeptablen Übereinstimmung zu anderen Verfahren.

Schrifttum:

1. WRIGHSTONE, R. N.: Hemoglobin 6, 257-346 (1982).
2. BASSET, P., BRACONNIER, F., ROSA, J.: J. Chromatogr. 227, 267-304 (1982).
3. KRAMLÓVA, M., PRISTOUPL, T. I., FRICOVA, V.: J. CHROMATOGR. 367, 443-445 (1986).

¹ die vorgestellten Untersuchungen entstanden am Hygiene-Institut Gelsenkirchen

P 32

Einfluß der Alterung und Lagerung von EDTA-Blutproben auf die Blutbildergebnisse hämatologischer Analysengeräte*

R. J. Klosson^{1,2}

¹Hygiene-Institut des Ruhrgebiets (Prof. Dr. Dickgießer), 4650 Gelsenkirchen

²Abt. f. Laboratoriumsdiagnostik (Ltd. Arzt: Dr. Dr. Klosson), Kreiskrankenhaus, 3588 Homberg

Hämatologische Analysengeräte haben die hämatologische Diagnostik standardisiert und kostengünstig gestaltet. Durch die Zentralisierung in der Labormedizin werden die „Wege“ zwischen Patient (Blutentnahme) und Labor immer länger, zwischen

Blutentnahme und Laboranalyse vergehen oft mehrere Stunden. Zur „Lagerfähigkeit“ von EDTA-Blutproben finden sich in der Literatur widersprüchliche Angaben (1). Diese Fragestellung wurde daher an einer Vielzahl von Analysengeräten untersucht: Coulter STKR, STIKS und VCS, Sysmex NE 8000, Technicon H*1.

Alle Geräte zeigen konstante Ergebnisse des „kleinen“ Blutbildes (Hämoglobingehalt, Leukozyten-, Erythrozyten- und Thrombozytenzahl) über 24, z. T. bis zu 48 Stunden „Lagerung“ bei Raumtemperatur. Auch bei MCV oder dem Hämatokrit liegen die Abweichungen vom Ausgangswert noch in einem tolerablen Rahmen.

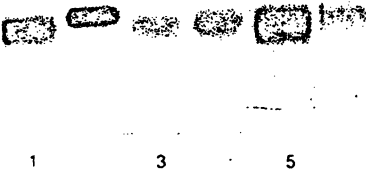
Dagegen sind z. T. bereits nach wenigen Stunden deutliche numerische Verschiebungen im Verhältnis der einzelnen Leukozytenpopulationen zu beobachten. Es fällt v. a. die relative Zunahme der Monozyten und der basophilen Granulozyten auf, während eosinophile und neutrophile Granulozyten abnehmen; der Anteil der Lymphozyten bleibt meist unverändert. Die numerischen Veränderungen sind im graphischen Ausdruck auch an der „Wanderung“ der Punktwolken durch die Felder des Scattergramms nachvollziehbar. Trotzdem sind bei einem konduktivmetrischen Gerät innerhalb der ersten 8 Stunden, bei einem cytochemischen Gerät sogar noch nach 24 Stunden verlässliche (numerische) Ergebnisse zu erhalten. Mit zunehmender Lagerdauer treten auch falsch positive „Suspect“-Meldungen (z. B. „Blasten“, „Linksverschiebung“) auf: Während nach 8 Stunden z. T. weniger als 10% der Proben „flagt“ sind, sind es nach 24 Stunden bereits über 50%.

Mit Hilfe moderner hämatologischer Analysensysteme ist bis zu 8 Stunden nach Blutentnahme (in Ausnahmefällen bis zu 24 Stunden) eine zuverlässige Blutbildanalyse möglich. Zu diesem Zeitpunkt ist z. B. eine mikroskopische Analyse nicht mehr möglich.

Schrifttum:

1. SCHNEIDER, W.: Lab.med 7, 136-142 (1983).

¹ die vorgestellten Untersuchungen entstanden am Hygiene-Institut Gelsenkirchen



Ein Gel sagt mehr als tausend Worte..

Wenn Sie die RESOLVE IEF Gele mit der klassischen Elektrophorese vergleichen, ist wohl klar, warum hier von isoelektrischer Fokussierung die Rede ist.

RESOLVE Fertigungskits gibt es für

- * Hb-Elektrophorese
- * Oligoklonale Banden in Liquor
- * Immunfixation
- * Isoenzyme der alkalischen Phosphatase



Fordern Sie weitere Informationen an.

ISOLAB Europa
W-6920 Sinsheim
Tel: 07261/62890
Fax: 07261/13990

Mikrotiterplatten-Festphasen-Sandwich-ELISA für EGF-R aus Tumormaterial

Elke Ufer¹, H. E. Manneck², G. Steinhilber³, T. Klenner¹, F. P. Armbruster², Sylvia Auferstraße⁴ und W. Roos⁵

¹ Deutsches Krebsforschungszentrum, Abt. f. Chemotherapie und Toxikologie, INF 280, D-6900 Heidelberg

² Immundiagnostik GmbH, Wilhelmstraße 7, D-6140 Bensheim

³ Friedrich-Mischer-Laboratorium, Spemannstraße 37-39, D-7400 Tübingen

⁴ Isotopen Diagnostik GmbH, Einsteinstraße 5, D-6122 Dreieich

⁵ Gemeinschaftspraxis, Im Breitspiel 15, D-6900 Heidelberg

Die diagnostische Wertigkeit der quantitativen Bestimmung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGF-R) aus Biopsie- bzw. Operationspräparaten bei Frauen mit Mammakarzinom wurde in den letzten Jahren von verschiedenen Autoren beschrieben (Costa et al., Fitzpatrick et al.). In Verbindung mit dem Östrogen- und Progesteron-Status ermöglicht die EGF-R-Bestimmung die Erstellung einer aussagekräftigen Prognose und Therapieplanung (Bolla et al., Foekens et al.).

Zur Messung des EGF-Rezeptors standen bislang die Sättigungsanalyse nach Scatchard und das Wettbewerbsverfahren zur Verfügung. Bei beiden Verfahren erfolgt die Detektion über ¹²⁵I-markiertes EGF, welches eine zeitlich limitierte Stabilität aufweist (maximal 3-4 Wochen). Wir stellen einen Mikrotiterplatten-Festphasen-Sandwich-ELISA zur quantitativen EGF-R-Bestimmung aus Tumormaterial vor. Als „Capture-antibody“ wird ein polyklonales Antiserum gegen humanen EGF-R eingesetzt. Der „Detecting-antibody“ ist ein monoklonaler anti-human-EGF-R-Antikörper, der gegen ein extrazelluläres Epitop gerichtet ist. Die Detektion erfolgt mit Hilfe eines peroxidase-markierten Schaf-anti-Maus-IgG-Antikörpers und Orthophenyldiamin als Substrat. Aus A-431-Zellen isolierte EGF-Rezeptoren dienen als Standardmaterial. Die Gesamtkubationsdauer des ELISAs beträgt 2 Stunden. Der beschriebene Test zeigt einen Meßbereich bis 200 fmol EGF-R pro Test bei einer Nachweisgrenze von 2,5 fmol pro Testansatz. Tests zur Reproduzierbarkeit ergaben Intraassay-VKs < 10% und Interassay-VKs < 15% für eine Kontrollprobe mit 25 fmol pro Test. Die Vorteile der Festphasen-Sandwich-ELISA-Technik sind I) die Vermeidung von Radioaktivität, II) die Trennung ohne Aufwendige Zentrifugation und III) die unlimitierte Laufzeit der Testreagenzien.

Schrifttum:

- COSTA, S. D., FABBRO, D., KAUFMANN, M., KÜHN, W., BASTERT, G.: *Ärztl. Lab.* 36, 185-191 (1990).
- FITZPATRICK, S. L., BRIGHTWELL, J., WITTLIFF, J. L., BARROWS, G. H., SCHULTZ, G. S.: *Cancer Research* 44, 3448-3453 (1984).
- FOEKENS, J. A., PORTENGEN, H., VAN PUTTEN, W. L. J., TRAPMAN, A. M., REUBI, J.-C., ALEXIEVA-FIGUSCH, J., KLIJN, J. G. M.: *Cancer Research* 49, 7002-7009 (1989).
- BOLLA, M., CHEDIN, M., SOUVIGNET, C., MARRON, J., ARNOUD, C., CHAMAZ, E.: *Breast Cancer Research and Treatment* 16, 97-102 (1990).

Konzentrationsmuster von Laminin, Hyaluronan und amino-terminalem Typ-III-Prokollagenpeptid in Seminalplasmen

U. Geipel¹, J. Kropf¹, W. Krause² und A. M. Gressner¹

¹ Abteilung für Klinische Chemie und Zentrallaboratorium

² Abteilung für Dermatologie mit Schwerpunkt Andrologie, Klinikum der Philipps-Universität Marburg

Komponenten der extrazellulären Matrix (z. B. Prokollagen-III-Peptid, Laminin, Hyaluronan) kommen in unterschiedlichen Konzentrationen in verschiedenen Körperflüssigkeiten vor. In der hier beschriebenen Untersuchung wurden die Konzentrationen der amino-terminalen Fraktion des Prokollagen-III-Peptid (PIIINP) (1), Laminin und Hyaluronan (HA) (2) im Seminalplasma bestimmt. Die Seminalplasmen wurden durch Zentrifugation (10 Minuten, 200 xg) der Ejakulate von 119 Patienten, im Alter von

19 bis 67 Jahren, erhalten, die sich einer Fertilitätsdiagnostik unterzogen haben (3). Die Messungen erfolgten mit einem Radioimmunoassay für das pepsinresistente Fragment P1 des Laminin (Behringwerke AG, Marburg) und mit einem neuen Radioimmunoassay, unter Verwendung monoklonaler Antikörper, für PIIINP (Behringwerke AG, Marburg) (4) sowie mit einem radio-metrischen Assay für HA (Pharmacia, Uppsala/Schweden). Die drei untersuchten extrazellulären Matrixkomponenten waren in allen Seminalflüssigkeiten enthalten. Die Konzentrationen variierten bei PIIINP von 0,24-1,63 U/ml (\bar{x} = 0,60 U/ml, SD = ± 0,29 U/ml), bei Laminin von 0,73-5,09 U/ml (\bar{x} = 2,21 U/ml, SD = ± 0,81 U/ml) und bei HA von 84-1690 µg/l (\bar{x} = 346,2 µg/l, SD = ± 220,7 µg/l). Die Normalwerte im Serum betragen für PIIINP 0,41-0,82 U/ml, für Laminin 1,0-1,9 U/ml und für HA < 100 µg/l. Somit liegen in der Seminalflüssigkeit höhere Konzentrationen von Laminin und Hyaluronan als im Serum vor. Die hier untersuchten extrazellulären Matrixkomponenten korrelieren untereinander nicht. Hingegen korreliert die HA-Konzentration negativ mit der Spermienzahl und dem Ejakulatvolumen. Laminin korreliert positiv mit der Spermienzahl und hochsignifikant mit Acrosin, einer Protease in Spermatozoen, die in die Penetration der Spermatozoen durch die Zona pellucida bei der Befruchtung der Eizelle involviert ist und als Fertilitätsmarker gilt. PIIINP korreliert hochsignifikant positiv mit Fruktose, was auf einen gemeinsamen Bildungsort (vesiculae seminales) hindeuten könnte. Durch Varianzanalyse kann eine signifikante Abnahme der Hyaluronan-konzentration bei Patienten mit Azoospermie über Oligo- zu Normozoospermie gezeigt werden. Die Gruppen der Patienten mit Terato- und Asthenospermie sind hinsichtlich der untersuchten extrazellulären Matrixkomponenten nicht signifikant unterschiedlich. Unsere Daten zeigen, daß Seminalflüssigkeit neben Hyaluronan und Prokollagen-III-Peptid auch Laminin als Bindegewebe-assoziiertes Protein enthält. Die Bedeutung der ermittelten Korrelationen für die Fertilitätsdiagnostik beim Mann ist zur Zeit Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Schrifttum:

- BÜRGI, W., OHISHI, H., KIMURA, A., SCHMID, K.: *Glycosaminoglycans of human semen. GIT Labor-Medizin* 10, 541-542 (1990).
- GRESSNER, A. M., NEU, H.-H.: Amino-terminal propeptides of type III procollagen in seminal fluid. *Clinical Chemistry* 30, 488-490 (1984).
- WHO Handbuch zur Laboruntersuchung des menschlichen Ejakulates und der Spermatozoen-Zervikalschleim-Interaktion. Schattauer Verlag, Stuttgart (1988).
- GRESSNER, A. M.: An evaluation of a monoclonal antibody-based sandwich radioimmunoassay for the col 1-3 aminoterminal propeptide of type III procollagen in serum. *Clinical Chemistry* 36, 1110 (1990).

Affinitätsbindungsassay und Immunoassay für Fibronectin mit einem neuartigen Detektionsprinzip für die zeitaufgelöste Fluoreszenzspektrometrie

J. Kropf, E. Quitte und A. M. Gressner

Abteilung für Klinische Chemie und Zentrallaboratorium, Philipps-Universität Marburg, Baldingerstraße

Fibronectin (FN), ein aus zwei nahezu identischen Untereinheiten aufgebautes multifunktionelles Glykoprotein, ist ein Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix und kommt weiterhin in relativ hohen Konzentrationen im Plasma und in geringeren Anteilen in den meisten anderen Körperflüssigkeiten vor. Die Bestimmung von FN wurde zur Diagnose und Therapieunterstützung einer Reihe von Erkrankungen vorgeschlagen. In der vorliegenden Mitteilung beschreiben wir zwei Immunoassays vom „Sandwich“-Typ zur Bestimmung von FN in biologischen Flüssigkeiten. FN in der Probenlösung wird im ersten Reaktionsschritt durch an der Oberfläche von Mikrotiterwells immobilisierte Gelatine (Variante a) bzw. einem monoklonalen anti-FN Antikörper (Variante b) gebunden. Die darauffolgenden Schritte sind für beide Assay-Varianten identisch und beinhalten die Bindung eines polyklonalen anti-FN Antikörpers vom Kaninchen an das festphasengebundene Antigen, gefolgt von einer Umsetzung mit biotinylierten anti-Kaninchen-IgG-Antikörper und Streptavidin, welches kovalent mit dem Europium-Chelatliganden 4,7-bis (Chlorosulfonyl)-1,10-Phenanthrolin-2,9-dicarbon-

säure (BCPDA) konjugiert wurde (1). BCPDA, dessen Menge direkt proportional zur FN-Konzentration in der Probe ist, wird anschließend nach Dissoziation der Festphasenkomplexe in einer Lösung aus 4 M Harnstoff / 1 % SDS / 10^{-6} M Eu^{3+} durch zeitaufgelöste Messung der Fluoreszenz des BCPDA- Eu^{3+} Komplexes mit einem LKB 1230 Arcus Fluorometer (LKB-Wallac, Turku, Finnland) quantifiziert. Der dynamische Meßbereich beider Assayvarianten erstreckt sich von 1 bis 300 $\mu\text{g/L}$ (Nachweisgrenze: 500 ng/L), bei einer Gesamt-Inkubationsdauer von 4 Stunden. Die intraserialen Variationskoeffizienten (VK) betragen 4,1 und 4,7 % ($n = 24$) für Variante a und 4,2 und 3,6 % für Variante b, bei FN-Konzentrationen von 14,9 und 72,1 $\mu\text{g/L}$. Die VKs von Tag zu Tag ($n = 10$) liegen bei 5,4 und 9,6 % (Variante a) bzw. 6,3 und 3,9 % (Variante b). In 75 Plasmaproben wurde ein Korrelationskoeffizient von 0,97 zwischen beiden Varianten ermittelt. Im Vergleich mit einer nephelometrischen Methode am Behring BNA (2) wurden Korrelationskoeffizienten $> 0,8$ erhalten.

Im Unterschied zu bisher beschriebenen Assaytypen, die auf der Messung von am Immunoreaktanten gebundenen Europium (3) bzw. der Quantifizierung von BCPDA an der Festphase (1) beruhen, basieren die beschriebenen Assays auf einer neuen Detektionsmethode des Chelatliganden BCPDA in Lösung nach Dissoziation von der Festphase, werden deshalb durch Eu^{3+} Kontaminationen nicht gestört und können mit einem Standardspektrometer für die zeitaufgelöste Fluoreszenzspektrometrie durchgeführt werden. Aufgrund ihrer hohen Sensitivität sind die Assays besonders nützlich für die Untersuchung von Proben mit niedrigen FN-Konzentrationen, wie z. B. Urin, Liquor und Zellkulturüberständen.

Schrifttum:

1. EVANGELISTA, R. A., POLLAK, A., ALLORE, B., TEMPLETON, E. F., MORTON, R. C., DIAMANDIS, E. P.: A new europium chelate for protein labelling and time-resolved fluorometric applications. *Clin. Biochem.* 21, 173-8 (1988).
2. GRESSNER, A. M., WALLRAFF, P.: Evaluation of a laser nephelometric and kinetic immunoturbidimetric method for the determination of human fibronectin (opsonic protein). *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 19, 221-2 (1981).
3. HEMMILA, I.: Fluoroimmunoassays and immunofluorometric assays. *Clin. Chem.* 31, 359-70 (1985).

P 36

Ein rasch und einfach durchführbares Färbeprogramm einer Coomassie-Färbung nach der Urineiweißaufreinigung von unkonzentrierten Harnproben auf SDS-Mikrogelen*

J. Rupert^{1,2}, H. Barzik¹ und J. Büllers³

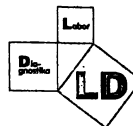
¹Hygiene-Institut des Ruhrgebiets (Prof. Dr. Dickgießer),
4650 Gelsenkirchen

²Abt. f. Laboratoriumsdiagnostik (Ltd. Arzt: Dr. Dr. Klosson),
Kreiskrankenhaus, 3588 Hornberg

³Pharmacia LKB GmbH, 7600 Freiburg

Die SDS-Urinelektrophorese hat einen festen Stellenwert in der Proteinurie-Diagnostik. Es steht auch ein teilmechanisiertes Elektrophoresesystem für die Auftrennung auf Mikrogelen zur Verfügung, das hohe Analysenzahlen sowie eine rasche Verfügbarkeit der Ergebnisse ermöglicht. Der Nachweis der Eiweißfraktionen erfolgt in einem Färbeverfahren, z. B. der Silberfärbung nach Heukeshoven ([1] hohe Empfindlichkeit, zeitaufwendig, Farbentwicklung nicht linear zur Proteinkonzentration, mechanisierbar) oder der kolloidalen Coomassie-Färbung nach Neuhoff ([2] lineares Färbeverhalten, für klinische Fragestellungen ausreichend hohe Empfindlichkeit, nicht pumpbar und nicht ohne weiteres mechanisierbar). Andere Coomassie-Färbungen sind einfacher und schneller, aber oft unempfindlicher. Im weiteren wird ein Trenn- und Färbeprogramm (Coomassie/Isopropanol) auf dem PhastSystem (Pharmacia LKB/Freiburg) vorgestellt. Je Lauf können 2 Gele mit je 8 Probenspuren bearbeitet werden. Nach Trennung der Urineiweiße in der Trennkammer werden die Gele in der Färbereinheit über insgesamt 45 Minuten einem vierstufigen Färbeverfahren unterworfen:

Trennprogramm: PhastGel (8-25% Acrylamid); 1 μl Probevolumen (nativer Harn); Laufbedingungen: sample appl. down at 1:



Labor Diagnostika

▷ wissenschaftlich vorn

Immunologie · Serologie

Virologie · Bakteriologie

Auszüge aus unserem Lieferprogramm

Bakteriologie

- Humanpathogene Hefen
- Mycoplasma hominis
- Mycoplasma pneumoniae
- Mycoplasma urealyticum
- Mycobakterien
- Staphylococcus aureus
- Empfindlichkeitstestung
 - E-Test (MHK)
 - Sensifluid (Agardilution)
 - LD 2 (Antimykotika-Ringe)

Infektionserologie

- IgG Absorbent für die IgM-Diagnostik
- Borrelien
- Epstein Barr VCA/EBNA
- Herpes simplex I und II
- Leptospiren
- Mycoplasmen
- Toxoplasmen
- Treponemen
- Yersinien

Autoimmunopathien

- ENA ELISA
- ENA Hämagglutination
- ENA Ouchterlony
- ANA, AMA, ASMA, DNA, HMA, ATA
- Spezialitäten
- Kombipräparate
- Kontrollen und Konjugate
- Waaler Rose

Immunologie

- $\beta 2$ Mikroglobulin
- Funktionelle Immunglobuline
- IgG Subklassen
- sCD 23
- Turbo RID

Bitte fordern Sie Preislisten und ausführliche Informationen an.

LD Labor Diagnostika GmbH
Industriestraße 12 · 4284 Heiden
Tel. (02867) 8083 · FAX (02867) 8477

1 Vh; sample appl. up at 1: 10 Vh; extra alarm to sound at .2: 90 Vh .1: 150 V, 5 mA, 1 W, 15 C, 10 Vh .2: 250 V, 10 mA, 3 W, 15 C, 100 Vh

Färbeprogramm: (1) 20 min bei 50 C (Färbung): 1 Tabl. Coomassie R 350 (No. 17-0518-01) + 50 ml Essigsäure + 100 ml Isopropanol + 150 ml Aqua bidest; (2) 7 min bei 50 C: 20% Isopropanol, 10% Essigsäure; (3) 15 min bei 35 C: 10% Essigsäure; (4) 3 min bei 50 C: 10% v/v Glycerin

Die Färbelösung kann 10mal ohne Intensitätsverlust wiederverwendet, nach dem Trocknen können die gefärbten Gele ohne weitere konservierende Behandlung aufbewahrt werden. Das Verfahren liefert in Qualität und Empfindlichkeit bei Einsatz nativen Urins gute Ergebnisse, die klinisch interpretierbar sind. Es kann problemlos im klinisch-chemischen Routinelabor eingesetzt werden, die Ergebnisse können densitometrisch dokumentiert werden.

Schrifttum:

1. HEUKESHOVEN, J., DERNICK, R.: Electrophoresis 9, 28-32 (1988).
2. NEUHOFF, V., STAMM, R., EIBL, H.: Electrophoresis 6, 427-448 (1985).

* die vorgestellten Untersuchungen entstanden am Hygiene-Institut Gelsenkirchen

P 37

Alpha-1-Mikroglobulin-ELISA: ein sensitives Verfahren zur Erkennung tubulo-interstitieller Nephropathien und glomerulärer Filtrationseinschränkungen

K.-G. Heinze, C. Westphal und F. da Fonseca-Wollheim
Behring-Krankenhaus Berlin, Zentrallaboratorium,
Gimpelsteig 3-5, D-1000 Berlin 37

Die hohe Stabilität von alpha-1-Mikroglobulin (α 1-MG) auch im unkonservierten Urin, geringe synthesebedingte Schwankungen und ein niedriges Konzentrationsgefälle Serum/Urin lassen dieses Protein als aussichtsreichen Kandidaten für die optimale Diagnostik und Verlaufskontrolle tubulo-interstitieller Nephropathien erscheinen (1, 2). Seine Bestimmung im Serum ist zur Erfassung einer verminderten glomerulären Filtration schon im „kreatininblinden“ Bereich geeignet (3).

Es wurde ein sensitiver Mikrotiterplatten-ELISA im Sandwich-Prinzip zur Quantifizierung von alpha-1-Mikroglobulin in Serum und Urin entwickelt. In der Enzymreaktion wird das nicht-karzinogene Tetramethylbenzidin verwendet. Die Präzision und Richtigkeitsprüfung des mit kommerziell erhältlichen Kalibratoren, Kontrollen und Antikörpern durchführbaren ELISA ist im Meßbereich zwischen 0,5–20 μ g/l gut: Präzision in der Serie im Mittel 6,3% VK, – von Tag zu Tag 9,5% VK. Bei der Richtigkeit konnte eine geringe systematische Abweichung von –3,3% von den für die radiale Immundiffusion definierten Zielwerten gefunden werden. Auch Vergleichsmessungen mit der RID zeigten eine befriedigende Übereinstimmung (Steigungsfaktor 0,97, $r = 0,98$). Die Nachweisgrenze bei Verwendung unverdünnter Probenmaterialien liegt bei 0,37 μ g/l. Als 95%-Vertrauensbereiche für Gesunde fanden sich im Serum 19,9–50,3 mg/l und 1,03–19,8 mg/l (0,54–14,1 mg/g Kreatinin) im Urin.

Im Rahmen der klinischen Nephropathiediagnostik wird die α 1-MG-Bestimmung in Abhängigkeit von der Fragestellung durch das Urin-Gesamtprotein, das Proteinurieverteilungsmuster in der Polyacrylamidgelelektrophorese sowie die Messung weiterer Marker-Urinproteine (Immunglobulin G, Transferrin, Albumin, β 2-Mikroglobulin und die N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase) flankiert (4, 5). Bei den renalen Proteinurien können die glomerulären und tubulären Anteile quantifiziert und im Verlauf besser als mit der Polyacrylamid-Gelelektrophorese verfolgt werden. Die Proteinuriediagnostik wird aus dem nativen, β 2-Mikroglobulin aus dem alkalisierten zweiten Morgenurin mit Bezug auf das Kreatinin durchgeführt. Durch den Wegfall der lästigen und fehlerträchtigen 24-Stunden-Harnsammlung wird der Einsatz dieses aussagekräftigen Testprofils für die Nierendiagnostik in der Klinik erleichtert.

Schrifttum:

1. DONALDSON, M. D. C., CHAMBERS, R. E., WOOLRIDGE, M. W., WHICHER, J. T.: Stability of alpha-1-microglobulin, beta-2-microglobulin and retinol binding protein in urine. Clin. Chem. Acta 179, 73-78 (1989).
2. WEBER, M. H., SCHOLZ, P., STIBBE, W., SCHELER, F.: Alpha-1-Mikroglobulin in Urin und Serum bei Proteinurie und Niereninsuffizienz. Klin. Wochenschr. 63, 711-717 (1985).
3. ITOH, Y., ENOMOTO, H., TAKAGI, K., KAWAI, K.: Clinical usefulness of serum alpha-1-microglobulin as a sensitive indicator for renal insufficiency. Nephron 33, 69-70 (1983).
4. BOEGE, F., LIEBERMANN, F., LUTHER, A., GILGE, U., HEILAND, A.: Quantifizierung und Differenzierung der Proteinurie durch automatisierte nephelometrische Messung von alpha-1-Mikroglobulin, Albumin und IgG: Vergleich mit der SDS-PAGE-Analyse. Lab.med. 14, 243-249 (1990).
5. HOFFMANN, W., GUDER, W. G.: A diagnostic programme for quantitative analysis of proteinuria. J. Clin. Chem. Biochem. 27, 589-600 (1989).

P 38

Multizentrische Erprobung eines immunturbidimetrischen Albumintests für Urin in acht klin.-chem. Laboratorien

A. Hubbuch, F.-S. Lang und W. Stockmann
Boehringer Mannheim GmbH, D-6800 Mannheim 31

Wir haben einen neuen immunologischen Albumintest für Urin an den Boehringer Mannheim/Hitachi Analysensystemen 704 und 717 sowie an RA 1000[®], COBAS[®] Mira und COBAS[®] Fara erprobt. Die Trübung wird im Endpunkt der Reaktion an Hitachi bichromatisch (340/700 nm), an den anderen Geräten bei 340 nm gemessen. Die Kalibration erfolgt mit 5 Standards von 0–350 mg/l.

Ergebnisse: Die Präzision ($n = 21$) in der Serie lag im Bereich von 10–260 mg/l unter 3% VK, von Serie zu Serie bei fester Kalibration unter 4% VK. Meßbereich: 3–400 mg/l an Hitachi 704 und 717. Die Kalibration ist an diesen Geräten mindestens 2 Wochen stabil. Der Vergleich zwischen Hitachi 704 (x) und 717 zeigte eine gute Übereinstimmung: $y = -0,7 + 1,00x$, $r = 0,999$. Ähnliche Ergebnisse lieferten die Vergleiche mit Applikationen auf den o. g. Geräten sowie Vergleiche mit Behring Nephelometer Analyser und einem Radioimmunoassay. Keine Verschleppung wurde mit 44 Systemreagenzien von Boehringer Mannheim beobachtet. Endogene Störfaktoren sowie 17 Arzneimittel störten nicht.

Das neue Reagenz erlaubt eine zuverlässige Albuminbestimmung im Urin. Es ist für die Messung niedriger Albuminkonzentrationen zur Diagnose der diabetischen Nephropathie gut geeignet.

P 39

Aussagekraft von Tissue Polypeptide Antigen (TPA) bei urologischen Tumoren

G. M. Oremek, W. Boeckmann und U. B. Seiffert
Zentrallabor – Zentrum der Inneren Medizin; Universitätsklinik
Frankfurt, Theodor-Stern-Kai 7, 6000 Frankfurt/M.

Wir untersuchten, ob TPA Indikator für die Infiltration eines Tumors darstellt oder einen Hinweis auf die Regression unter Chemotherapie geben kann. Bei 100 Patienten mit Urothelkarzinom ($n = 60$), Prostatakarzinom ($n = 30$) und Nierenzellkarzinom ($n = 10$) wurde TPA im Serum bestimmt. Im Serum wurde die Bestimmung mit einer radioimmunologischen Methode durchgeführt. Die Probeentnahme wurde an nüchternen Patienten durchgeführt, und das gewonnene Serum wurde unmittelbar danach bei -70°C gelagert. Die Stabilität von TPA bei -70°C erwies sich als ausreichend. Unter Lagerung bei Zimmertemperatur $+4^{\circ}\text{C}$ und -20°C ist eine signifikante Reduktion der Konzentration zu beobachten. Der Verlust der Konzentration bei $+4^{\circ}\text{C}$ betrug 62%, bei -20°C 38% im Vergleich zum Frischwert. Bei zunehmender Infiltration des Tumors, z. B. von Blasen-tumoren, zeigten sich stark erhöhte Werte für TPA im Serum. Unter neoadjuvanter Chemo-

therapie nach dem MVEC-Schema konnten keine einheitlichen Ergebnisse erzielt werden, so zeigten 4/6 Patienten einen Anstieg nach Chemotherapie trotz Remission des Tumors. Die Gefrierschnitte zeigten eine positive Reaktion nur bei Harnblasen- und Nierenzellkarzinomen.

Zur Bestimmung von TPA muß das Material unmittelbar nach der Entnahme bei -70°C tiefgefroren werden, um Konzentrationsabnahmen zu vermeiden. Die aufwendige Behandlung und Lagerung des Probematerials bei ungewisser Aussagekraft lassen TPA für den klinischen Einsatz wenig praktisch erscheinen.

P 40

Stabilität des Tumor-Nekrose-Faktors im Plasma und Serum

G. M. Oremek, U. B. Seiffert und H. Allert
Zentrallabor – Zentrum der Inneren Medizin; Universitätsklinik Frankfurt, Theodor-Stern-Kai 7, 6000 Frankfurt/M.

TNF ist ein Polypeptid, bestehend aus 157 Aminosäuren. Er wird von Monozyten/Makrophagen im Rahmen einer Immunreaktion sezerniert und fungiert sowohl als Mediator einer Entzündungsreaktion als auch direkt zytotoxisch gegen verschiedene Tumorzelllinien (1, 2, 3). Wird der TNF im Serum bei -70°C aufbewahrt, so ist er dort innerhalb weniger Tage nicht mehr nachweisbar. Mittels vier Enzymimmunoassays (EIA) und einem Radioimmunoassay bestimmten wir bei 100 Patienten den TNF-Gehalt jeweils im Serum als auch im Plasma sowohl mit als auch ohne Zusatz von Aprotinin (Trasylo[®], Proteaseinhibitor). Dabei gingen wir folgendermaßen vor:

1. Messung: Tag 0, unmittelbar nach Blutentnahme,
2. Messung: Tag 1, Lagerungstemperatur $+20^{\circ}\text{C}$
3. Messung: Tag 1, Lagerungstemperatur $+4^{\circ}\text{C}$
4. Messung: Tag 3, Lagerungstemperatur $+4^{\circ}\text{C}$
5. Messung: Tag 7, Lagerungstemperatur -20°C
6. Messung: Tag 7, Lagerungstemperatur -70°C

Wir konnten folgendes feststellen: Wird Plasma bei $+4^{\circ}\text{C}$ gelagert, ist der TNF-Gehalt schon nach 3 Tagen unter die Nachweisgrenze gesunken (10 pg/ml). Bei Lagerungstemperaturen von -20°C bzw. -70°C war es uns auch nach 7 Tagen noch möglich, TNF im Plasma auch ohne Aprotininzusatz zu messen, wobei bei -20°C ein Gehaltverlust von 38% gegenüber Tag 0 zu verzeichnen war. Die restlichen Messungen ergaben einen Gehaltverlust von 44–81,5%. Dies läßt uns annehmen, daß die Stabilität des TNF im Plasma bei einer Aufbewahrungstemperatur von -20°C am höchsten zu sein scheint. Die Zugabe eines Proteaseinhibitors hatte bei den bisherigen Messungen keinen Einfluß auf die Stabilität des Proteins. Die Stabilitätsuntersuchungen des TNF sind noch nicht abgeschlossen. Weitere Ergebnisse werden bekanntgegeben.

P 41

Die Aktivität des Angiotensin Converting Enzyme (ACE) im Serum und Plasma – ein Methodenvergleich

G. M. Oremek, U. B. Seiffert, R. Kirsten und M. Zirker
Zentrallabor – Zentrum der Inneren Medizin; Universitätsklinik Frankfurt, Theodor-Stern-Kai 7, 6000 Frankfurt/M.

Zur Zeit sind fünf Methoden zur Bestimmung des ACE mit unterschiedlichen Testprinzipien kommerziell verfügbar: Es sind kinetische, radiochemische und fluorimetrische Methoden.

Als Referenzmethode diente die radiochemische Methode, mit dieser wurden alle anderen Methoden verglichen.

Die unterschiedlichen Normbereiche der verschiedenen Methoden wurden verglichen.

PROGEN

Kompetent für Diagnostika

Pneumocystis carinii IFT

- Positive Kontrolle
- 1-Schritt-Methode
- Monoklonale Antikörper
- Detektion aller Zystenstadien und Trophozoiten

Unsere wichtigsten Parameter

... in der Infektionsserologie

- Borrelia burgdorferi quantitativer ELISA IgG/IgM und IFT
- Candida - AK - IFT und ELISA
- Hantavirus - AK - IFT
- Parvovirus B 19 ELISA IgG/IgM
- Chlamydia-Direkt-IFT

... bei Autoimmunkrankheiten

- c-ANCA - ELISA (neu) quantitativ/Screening
- Anti ds-DNA ELISA
- Scl - 70 ELISA (neu)
- C3a desArg ELISA

PROGEN Biotechnik GmbH
Im Neuenheimer Feld 519
Technologiepark
D-6900 Heidelberg
Telefon: 06221/4035-0
Telefax: 06221/403535
Telex: 461124

Stabilitätsuntersuchungen wurden bei +25°C, +4°C und -20°C durchgeführt.

Die beste Stabilität wiesen Proben auf, die bei +4°C gelagert wurden, der Aktivitätsverlust liegt bei 1,5% im Zeitraum von 6 Tagen.

Bei +25°C beträgt der Aktivitätsverlust in 12 Stunden 6,5%.

ACE deutet nicht ausschließlich auf pulmonale Erkrankungen hin. Wir haben bei 80 Patienten mit einem Lungenkarzinom (n = 25), Leberzirrhose (n = 15) und einer Virushepatitis (n = 40) die ACE-Konzentration bestimmt.

Bei Lungenkarzinom wurden niedrige Aktivitäten von 15–20 U/l gefunden, dagegen bei Leberzirrhose und Virushepatitis sehr hohe Werte bis 1500 U/l.

P 42

CRP als Diagnostikum zur Früherkennung postoperativer infektiöser Komplikationen – ein Methodenvergleich

G. M. Oremek, A. Schmidt-Matthiesen und U. B. Seiffert
Zentrallabor – Zentrum der Inneren Medizin; Zentrum der Chirurgie, Universitätskliniken Frankfurt, Theodor-Stern-Kai 7, 6000 Frankfurt/M.

Bei 50 Patienten mit infektiösen postoperativen Komplikationen nach Elektivchirurgie wurde das C-reaktive Protein (CRP) bestimmt. CRP wurde mit drei verschiedenen Methoden bestimmt: Immunologischer Trübungstest – Hitachi-System, nephelometrisch, Turbi-Timesystem und mit Immunfluoreszenz am TDx. Die Stabilität von CRP wurde bei +25°C, +4°C, -20°C untersucht. CRP ist bei +25°C 18 Stunden stabil, bei +4°C 2 Tage, am 3. Tag liegt der Aktivitätsverlust bei 2%. Der größte Aktivitätsverlust von 10% wurde beobachtet bei Lagerung von -20°C in 24 Stunden. Zusätzlich sollte die Relevanz in Diagnostik und Prognose festgestellt werden. Ein CRP-Anstieg ging bei 67,5% der Patienten den klinischen Symptomen voraus, ein Anstieg ohne faßbare infektiöse Komplikationen wurde bei 8% der Patienten beobachtet.

Veränderungen von Leukozytenzahlen und BSG waren weit weniger verlässlich im Hinblick auf postoperative Komplikationen.

Postoperative CRP-Kontrollen eröffnen die Chance, durch frühzeitige Hinweise auf mögliche Komplikationen vor ihren klinischen Zeichen eine Focussuche zu betreiben.

Schrifttum:

1. SCHMIDT-MATTHIESEN, WAAG, K. L., HELLER, K.: C-reaktives Protein in der Diagnostik der akuten kindlichen Appendizitis. *Aktuelle Chirurgie*, 25, 61 (1990).
2. BÜCHLE, M., et al.: CRP als Entzündungs- und Nekrosemarker in der Gastroenterologie. *Med. Klin.* 82, 180 (1988).

P 43

Einfluß von Medikamenten und Chemotherapeutika auf die PSA-Bestimmung

G. M. Oremek, U. B. Seiffert, R. Fehl und D. Jonas
Zentrallabor – Zentrum der Inneren Medizin; Universitätskliniken Frankfurt, Theodor-Stern-Kai 7, 6000 Frankfurt/M.

Die höhere Sensitivität des PSA bei gleicher Spezifität im Vergleich zur PAP in der Verlaufskontrolle des kapselüberschreitenden Prostatakarzinoms gilt als gesichert.

Wir haben mit neun verschiedenen Methoden die PSA-Bestimmung bei 100 Patienten überprüft.

Die Ursache der gestörten PSA-Bestimmung im Sinne falsch hoher bzw. niedriger Werte wird durch eine Gruppe unterschiedli-

cher Pharmaka und Chemotherapeutika hervorgerufen, die mit der Bestimmungsmethode des Testkits interferieren; klinisch konnte dies durch eine Normalisierung des PSA nach Absetzen der jeweiligen Medikation belegt werden. PSA-Werte können verändert werden durch ikterische und lipämische Seren; hohe Konzentration zwei- und dreiwertiger Metallionen; Purin-, Indol-, Guanidin-Analoga (z. B. Diltiazem, Isoket, Isoptin); Vitamin C; Cisplatin, Mitomycin, Estradiol, Epirubicin, Methotrexat, Eramustinphosphat.

Die Kausalgenese der beobachteten PSA-Störung konnte durch In-vitro-Untersuchungen reproduziert werden.

Die Untersuchungen werden weitergeführt.

Schrifttum:

1. FORMARA, P., et al.: Klinische Relevanz der radioimmunologischen Bestimmung des prostataspezifischen Antigens (PSA) beim Prostatakarzinom.
2. OREMEK, G. M., SEIFFERT, U. B., KIRSTEN, R., JONAS, D.: Prostataspezifisches Antigen und Prostataspezifische Phosphatase als Marker des Prostatakarzinoms. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 28, 765 (1990).

P 44

NSE Tumormarker bei Seminomen des Hodens

G. M. Oremek, U. B. Seiffert, W. Boeckmann und D. Jonas
Zentrallabor – Zentrum der Inneren Medizin; Universitätskliniken Frankfurt, Theodor-Stern-Kai 7, 6000 Frankfurt/M.

Die Neuronspezifische Enolase (NSE) ist ein etablierter Tumormarker bei Bronchialkarzinom und Neuroblastom (1, 2).

Im Zeitraum von September 1986 bis Dezember 1990 haben wir bei 70 Patienten mit einem reinen Seminom die Tumormarker NSE, HCG und AFP bestimmt. Die Bestimmungen wurden mit radioimmunologischen und enzymimmunologischen Verfahren durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung waren die Patienten zwischen 24 und 47 Jahre alt. Die Probenahme erfolgte vor der Behandlung am 1., 3., 7. Tag und weiteren Kontrollterminen. Die Stabilität von NSE bei +25°C, +4°C und -20°C wurde untersucht. Bei +25°C wurde eine Erhöhung der Konzentration von 33% beobachtet. NSE war bei 40 Patienten positiv. Unterschiedliche Therapiemodalitäten wurden angewandt; komplette Bestrahlung, Polychemotherapie und zytostatische Behandlung. Eine Metastasenentwicklung in parenchymatösen Organen wurde beobachtet. Der klinische Verlauf in Abhängigkeit vom Stadium der Erkrankung wird dargestellt. Die Wertigkeit des Markers NSE in der Verlaufskontrolle wird diskutiert. Von 70 Patienten mit einem Seminom war bei 58% NSE positiv. Der Marker ist geeignet zur Verlaufskontrolle von therapierten Patienten, da bei einem Seminom AFP und HCG negativ sind. Tumoren des Stadiums T1 werden nicht durch beide Marker erkannt.

Schrifttum:

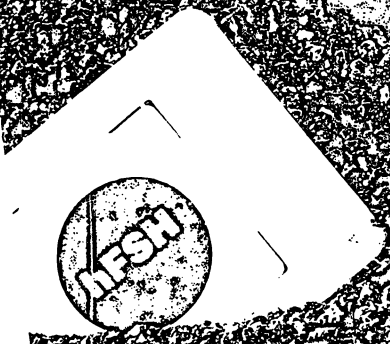
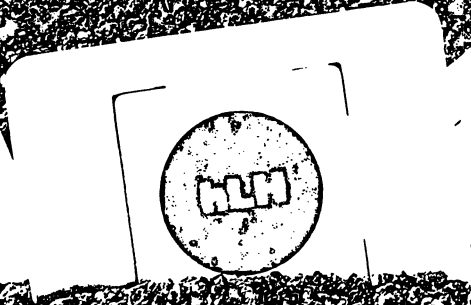
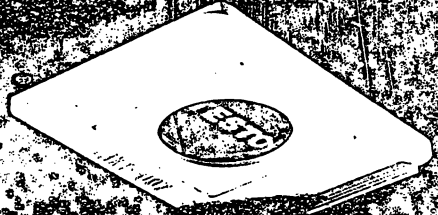
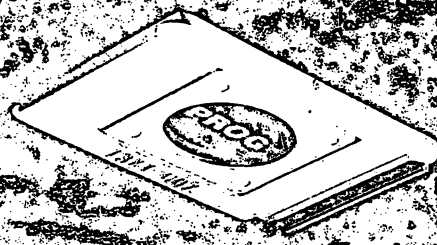
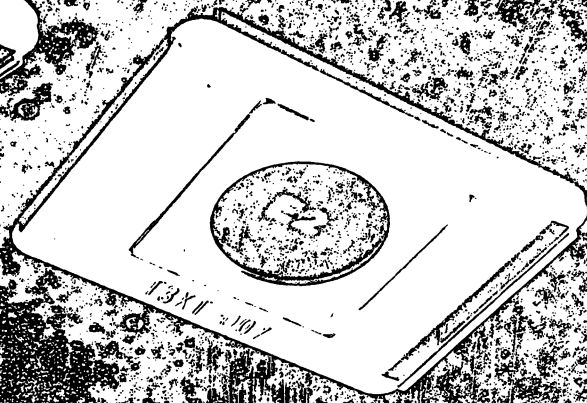
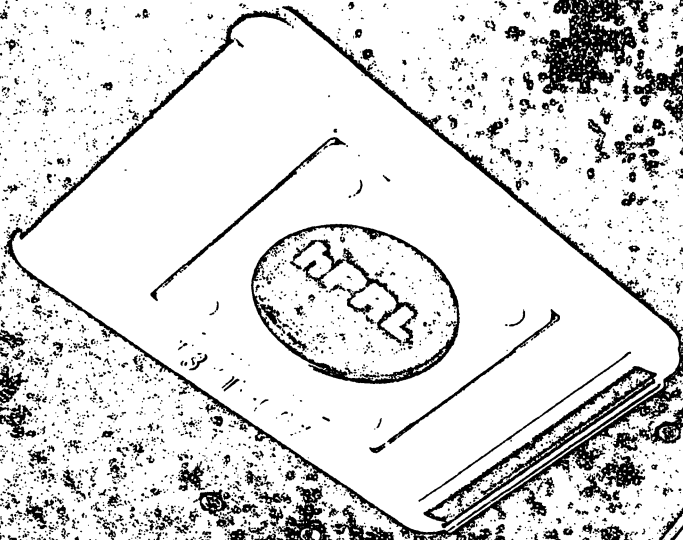
1. GERBITZ, K. D.: Wertigkeit der Enolase-Isoenzyme als Tumormarker. *Tumor Diagnostik und Therapie* 10, 45–53 (1989).
2. PANS, E.: Terje Risberg, Establishment and Evaluation of Radioimmunoassays for NSE. *Tumor Biol.* 10, 23–30 (1989).

P 45

Aussagekraft der Tumormarker SCC und CA-125 bei Zervixkarzinom

G. M. Oremek, M. Albrecht und U. B. Seiffert
Zentrallabor – Zentrum der Inneren Medizin; Zentrum der Frauenheilkunde, Universitätskliniken Frankfurt, Theodor-Stern-Kai 7, 6000 Frankfurt/M.

Wir haben bei 50 Patientinnen mit einem Zervixkarzinom in verschiedenen Stadien das SCC (squamous cellcarcinoma)-Antigen und das CA-125 (Carbohydrat-Antigen-125) bestimmt. Die Norm-



Stratus® – in 8 Minuten zum Ergebnis

Der Stratus® ist ein vollautomatisches Analysensystem für Serien- und Einzelbestimmungen.

Das erste Ergebnis liegt bereits nach 8 Minuten vor, weitere Resultate werden im Abstand von ca. 50–60 Sekunden ausgedruckt.

Die Kalibration wird im Gerät gespeichert – auch Notfallproben können so wirtschaftlich bestimmt werden. Sensitivität und Präzision entsprechen dem RIA.

Stratus® – das Testmenü

○ *Schilddrüsen Diagnostik*

Freies T4
Gesamt T4
Gesamt T3
hTSH
T uptake

○ *Endokrinologie*

Cortisol
hCG
hFSH
hLH
Prolaktin*
Steroide*

○ *Infarkt Diagnostik*

CKMB

○ *Hämatologie*

Ferritin
weitere Parameter*

○ *Allergie*

IgE

* Einführung in Kürze

○ *Aminoglykoside*

Amikacin
Gentamicin
Tobramycin

○ *Antikonvulsiva*

Carbamazepin
Phenobarbital
Phenytoin
Primidon

○ *Analeptika*

Theophyllin

○ *Antiarrhythmika*

Chinidin
Lidocain
NAPA
Procainamid

○ *Herzglykoside*

Digitoxin
Digoxin

werte wurden an 100 gesunden Probanden (50 Frauen und 50 Männer) im Alter von 18 bis 65 Jahren ermittelt.

SCC-Antigen und CA 125 wurden mit einem Radio-Immunoassay und einem Enzym-Immunoassay am IMx-Analysesystem durchgeführt. Die Stabilität von SCC-Antigen und CA 125 wurde bei +25°C, +4°C und -20°C untersucht. Zusätzlich sollte die Relevanz in Diagnostik und Prognose bei Zervixkarzinomen festgestellt werden. Bei der Normalwertgruppe lag der SCC-Antigenwert bei 1,8 µg/ml, der CA-125 Wert bei 35 U/ml.

Bei -20°C ist SCC-Antigen und CA-125 4 Wochen stabil, bei +4°C und +25°C ist die Stabilität problematisch.

Für Zervixkarzinome ist eine Kombination der Tumormarker SCC-Antigen und CA-125 sinnvoll; es führt zu einer Sensitivität von 87% bei gleich guter Spezifität.

Wertvoll sind die beiden Tumormarker vor allem zur Verlaufskontrolle bei konservativer oder nach operativer Therapie.

Schrifttum:

1. CROMBACH, G. H., WÜRZ, H., BOLTE, A.: Bestimmung des SCC Antigens im Serum von Patientinnen mit Zervixkarzinom. *Geburtsh. u. Frauenheilk.* 47, 439 (1987).
2. FISCHBACH, W., RINK, C.: SCC Antigen, ein sensitiver und spezifischer Tumormarker für Plattenepithelkarzinome? *Dtsch. med. Wschr.* 113, 289 (1988).

P 46

BCM – ein Tumormarker für Mammakarzinome?

G. M. Oremek, M. Albrecht, A. Gaussmann und U. B. Seiffert
Zentrallabor – Zentrum der Inneren Medizin, Zentrum der Frauenheilkunde, Universitätsklinikum Frankfurt, Theodor-Stern-Kai 7, 6000 Frankfurt/M.

Wir haben bei 100 Patienten mit einem Mammakarzinom in verschiedenen Stadien das BCM (Brustkrebsmucin) bestimmt. Die Normwerte ermittelten wir an 100 gesunden Probanden (80 Frauen und 20 Männer) im Alter von 18 bis 65 Jahren. Die BCM-Bestimmung wurde mit einem Radio-Immunoassay mittels monoklonaler Antikörper durchgeführt. Die Stabilität des BCM wurde bei +25°C, +4°C und -20°C untersucht. Zusätzlich sollte die Relevanz in Diagnostik und Prognose bei Mammakarzinomen festgestellt werden. Bei der Normalwertgruppe lag in 95% der BCM-Wert unter 10 U/ml. Lobuläre und mucinöse Karzinome sowie progesteron- und oestrogenrezeptor-positive und negative Karzinome bilden BCM. Andere Karzinome produzieren wenig bzw. kein BCM.

BCM ist bei +25°C 18 Stunden stabil, bei +4°C drei Tage, am 4. Tag liegt der Aktivitätsverlust bei 7,5%, bei -20°C ist bis zu 4 Wochen kein Aktivitätsverlust zu beobachten. Für Mammakarzinome ist BCM als Diagnostikum anzusehen, vor allem zur Verlaufskontrolle bei konservativer oder nach operativer Therapie. Die Aktivität von BCM liegt bei anderen Karzinomen, z. B. Ovarial-, Magen- und Kolonkarzinomen, im Normbereich.

Weitere Untersuchungen bezüglich der Relevanz und Korrelation mit anderen Tumormarkern wie CA 15-3 sind in Arbeit.

Schrifttum:

1. PAPSIDERO, L. D., NEMETO, T., GROGHAN, G. A., CHU, T. M.: Expression of ductal carcinoma antigen in breast cancer Sera as defined using monoclonal antibody. *Cancer res.* vol. 44, 4653-4657 (1984).
2. PAPSIDERO, L. D., et al.

P 47

CA 72-4 – Ein Tumormarker für Magenkarzinom?

G. M. Oremek, U. B. Seiffert, D. Kirsten und R. Kirsten
Zentrallabor – Zentrum der Inneren Medizin; Universitätsklinikum Frankfurt, Theodor-Stern-Kai 7, 6000 Frankfurt/M.

Wir haben bei 100 Patienten mit einem Magenkarzinom in verschiedenen Stadien das CA 72-4 (Carbohydrat-Antigen 72-4) be-

stimmt. Die Normwerte ermittelten wir an 100 gesunden Probanden (80 Frauen und 20 Männer) im Alter von 18 bis 70 Jahren. Die CA 72-4-Bestimmung wurde mit einem Festphasen-Radio-Immunoassay mit zwei monoklonalen Antikörpern durchgeführt. Die Stabilität des CA 72-4 wurde bei +25°C, +4°C und -20°C untersucht.

Zusätzlich sollte die Relevanz in Diagnostik und Prognose bei Magenkarzinomen festgestellt werden. Bei der Normalwert-

XVI World Congress
Vancouver, B.C., Canada
22 - 27 June 1991



The World Association of Societies of Pathology and the Canadian Association of Pathologists are pleased to announce:

The XVI World Congress of Anatomic and Clinical Pathology
Vancouver, British Columbia, Canada
June 22 - 27, 1991

A scientific program of broad general interest is planned including:

- | | |
|----------------------|--|
| General Symposia on: | Clinical Chemistry.
Hematology.
Microbiology.
Cytology, and Anatomic Pathology
Management and Informatics |
| Slide Seminar: | Topic: Gynecological Pathology |
| WASP Symposia on: | Pathology in the Developing World
Socio-economic Affairs
Utilization of Laboratory Results
Quality Assurance
World Standards |
| Workshop Program: | 28 workshops on various topics of current interest. |
| Technical Exhibits: | An important opportunity to view the latest technology. |

All this in a beautiful and exciting natural environment and with a full social program.

The WASP Auxiliary extends the invitation to bring a gift for an auction in support of the Gordon Signy Foreign Fellowships

Come join your international colleagues in beautiful British Columbia!

WASP/CAP Secretariat
Suite 645 - 375 Water Street
Vancouver, B.C., Canada
V6B 5C6

Telephone: (604) 681-5226
Telex: 04-352848 VCR
Fax: (604) 681-2503



gruppe lag in 95% der CA 72-4 unter 2,3 ng/ml und einem Graubereich bis 4 ng/ml.

CA 72-4 ist bei +25°C 12 Stunden stabil, bei +4°C drei Tage, am 4. Tag liegt der Aktivitätsverlust bis 10%, bei -20°C ist bis zu 4 Wochen kein Aktivitätsverlust zu beobachten. Für Magenkarzinome ist CA 72-4 als Diagnostikum anzusehen, vor allem zur Verlaufskontrolle bei konservativer oder nach operativer Therapie.

Die Aktivität von CA 72-4 wurde mit den Tumormarkern CA 19-9, CEA und CA 50 bei Tumorpatienten verglichen. CA 72-4 ist bei Magenkarzinomen mit einer Sensitivität von 60% und Spezifität von 95% den etablierten Tumormarkern überlegen.

P 48

Struktur einer Wissensbasis zur Unterstützung der serologischen Diagnostik bei Tetanusimpfungen

J. P. Schröder¹, M. Geßler¹, W. D. Kuhlmann² und Chr. Trendelenburg³

¹Dezernat Medizinische Informatik Sanitätsamt Bw, Bonn

²Fachbereich Immunologie, Ernst-Rodenwaldt-Institut, Koblenz

³Institut für Laboratoriumsmedizin Städtisches Krankenhaus, Ffm-Höchst

Die Notwendigkeit einer Auffrischimpfung läßt sich durch die quantitative Messung von Tetanus-Antitoxin leicht objektivieren. Lücken in dem Tetanusimmunschutz finden sich trotz angebotener Impfprogramme besonders bei der älteren Bevölkerung. Eine serologische Überprüfung des Impfstatus ist auch angezeigt, um Hyperimmunreaktionen bei ausreichend immunisierten Personen zu vermeiden. Die unterschiedliche Ansprechbarkeit des individuellen Immunsystems auf Impfungen sowie die nicht voraussehbare Reaktionsweise des Impflings lassen einerseits eine genaue Dokumentation der Impfzeitpunkte und andererseits eine strengere Indikation zur Auffrischimpfung als bisher üblich ratsam erscheinen. Die Höhe des Tetanus-Antitoxin-Titers, meßbar in IE/ml Serum, kann dabei als Entscheidungshilfe dienen (1). Zur Auswertung dient eine Wissensbasis unter Benutzung des Pro.M.D.-Systems (2). Wesentliche Eigenschaften der Struktur dieser Wissensbasis sind dargestellt.

Zur Beurteilung des Tetanus-Antitoxin-Gehalts erfolgt eine meßwertabhängige Interpretation über die voraussichtliche Dauer des Impfschutzes und eine Empfehlung für den Zeitpunkt einer eventuell notwendigen Auffrischimpfung anhand der fallbezogenen Textsynthese in den Entscheidungsregeln des Pro.M.D.-Systems. Zurückliegende Impfkomplicationen finden Berücksichtigung im Behandlungsvorschlag für den Impfarzt. Die Schlußfolgerung des Systems kann mit Hilfe des für den jeweiligen Befund bedeutsamen Regellisting logisch nachvollzogen werden, so daß der in diesem Gebiet noch in Einarbeitung befindliche Arzt eine Unterstützung auch in der Impferologie erfährt.

Das System ermöglicht die Auflistung der diagnostisch bedeutsamen Kenngrößen und eine Interpretation der gemessenen Werte. Die Befundaufbereitung stellt Erläuterungen der Tetanus-Antitoxin-Titer in fachlich fundierter Weise transparenter dar, so daß eine verbesserte Grundlage geschaffen ist, die Indikation zur Revakzination zu objektivieren sowie Impfungen ohne Kenntnis der Serum-Antitoxin-Konzentration und damit verbundene mögliche Komplikationen zu vermeiden.

Schrifttum:

1. SCHRÖDER, J. P., KUHLMANN, W. D.: Tetanusimmunität bei Männern und Frauen in der Bundesrepublik Deutschland. Immunität und Infektion 19, 14-17 (1991).
2. TRENDLENBURG, C., POHL, B.: Pro.M.D. Medizinische Diagnostik mit Expertensystemen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York (1988).

P 49

Nachweis oligoklonalen IgG in unkonzentrierten Liquorproben mittels isoelektrischer Fokussierung auf rehydratisierten Mikrogelen und anschließender Silberfärbung*

R. J. Klosson^{1,2}, H. Barzik¹ und J. Büllers³

¹Hygiene-Institut des Ruhrgebiets (Prof. Dr. Dickgießer), 4650 Gelsenkirchen

²Abt. f. Laboratoriumsdiagnostik (Ltd. Arzt: Dr. Dr. Klosson), Kreis Krankenhaus, 3588 Homberg

³Pharmacia LKB GmbH, 7600 Freiburg

Der Nachweis oligoklonalen IgG im Liquor mittels isoelektrischer Fokussierung und anschließender Silberfärbung hat eine große Bedeutung für die Diagnostik entzündlicher Prozesse des ZNS (1). Bisher liegen zur Mechanisierung der isoelektrischen Fokussierung des Liquor-IgG erst wenige Erfahrungen vor (2). In der vorliegenden Präsentation wird ein Verfahren vorgestellt, das mit Hilfe des PhastSystems (Pharmacia LKB/Freiburg) die einfache Durchführung des Nachweises oligoklonalen IgG im klinisch-chemischen Routinelabor ermöglicht.

Polyacrylamid-Mirogele (50 x 43 x 0,5 mm) werden auf der planaren Oberfläche einer Harnstofflösung (je Gel 900 µl 1 M Harnstofflösung + 50 µl Pharmalyte 3-10 + 50 µl Ampholine 3,5-9,5) für 2 Stunden rehydratisiert. Mit einem IEF-Applikatorstreifen werden 4 Liquor/Serum-Paare (0,1 µg IgG in 4 µl Probe) aufgetragen und in der Trennkammer des PhastSystems aufgetrennt; eine Konzentrierung des Liquors ist nicht erforderlich. Die 13stufige Silberfärbung erfolgt über insgesamt 40 Minuten in der Färbereinheit des Gerätes, je 2 Gele können in einem Lauf bearbeitet werden.

Trennprogramm: Laufbedingungen: extra alarm to sound at 1: 95 Vh, 1: 100 Vh, 2,5 mA, 3,5 W, 2000 V, 15 C (Vorfokussierung) 2: 30 Vh, 2,5 mA, 3,5 W, 200 V, 15 C (Probendiffusion in das Gel) 3: 600 Vh, 2,5 mA, 3,5 W, 2000 V, 15 C (Fokussierung)

Färbeprogramm: (1) 5 min, 25 C: Fixierlsg. I (20% w/v TCA); (2) u. (3) je 3 min, 50 C: Fixierlsg. II (20% v/v EtOH, 7,5% v/v Essigs.); (4) 5 min, 50 C: 0,2% w/v Natriumthiosulfat; (5) wie (3); (6) bis (8) je 3 min, 50 C: Aqua bidest; (9) 6 min, 40 C: Färbelsg. (0,1% w/v Silbernitrat); (10) u. (11) je 20 sek, 30 C: Entwicklerlsg. (200 ml 2,5% w/v Natriumcarbonat + 160 µl 37% v/v Formaldehyd); (12) 2 min, 50 C: Stopplsg. (0,4% Glyzin); (13) 3 min, 50 C: Aqua bidest

Nach dem Trocknen kann das Gel ausgewertet und ohne weitere konservierende Behandlung aufbewahrt werden. Die IgG-Banden sind scharf getrennt, das Verfahren führt bei einfacher Durchführung rasch zu reproduzierbaren, gut auswertbaren und klinisch verwertbaren Ergebnissen, das Verfahren ist auch im klinisch-chemischen Routinelabor problemlos durchführbar.

Schrifttum:

1. HOLZER, G.: Lab.med. 11, 1-6 (1987).
2. ACHERMANN, H., R. GALLUSER, R., HAAB, S., STOECKLIN, S.: Lab.Med. 14, 153-158 (1990).

* Die vorgestellten Untersuchungen entstanden am Hygiene-Institut Gelsenkirchen

P 50

Anti-HCV Seroprävalenz bei Hämodialyse-Patienten, Hämophilen und Blutspendern

G. Holzberger¹, S. Seidl¹, B. Peschke², A. Fürsch², E. H. Scheuermann², W. Mondorf², W. Schoeppe² und I. Scharrer²

¹Institut für Immunhämatologie und Blutspendedienst Hessen

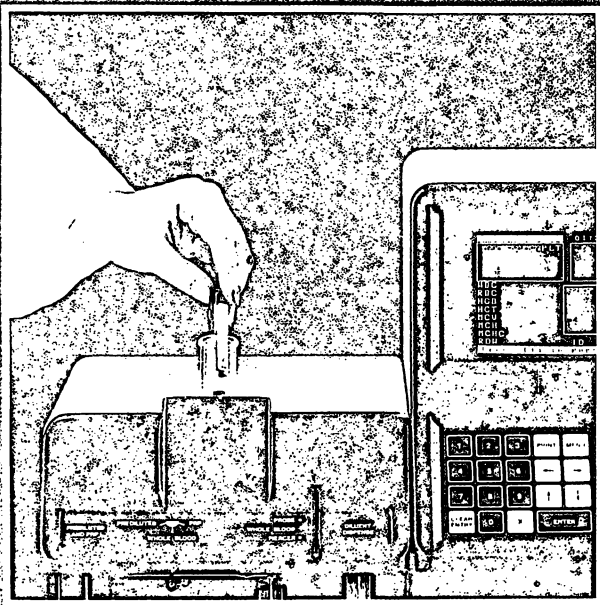
²Zentrum der Inneren Medizin der Universität Frankfurt

Mit dem seit kurzem verfügbaren HCV-EIA (enzyme-linked immunoassay)-Antikörpertest der Firma Ortho Diagnostics ist es

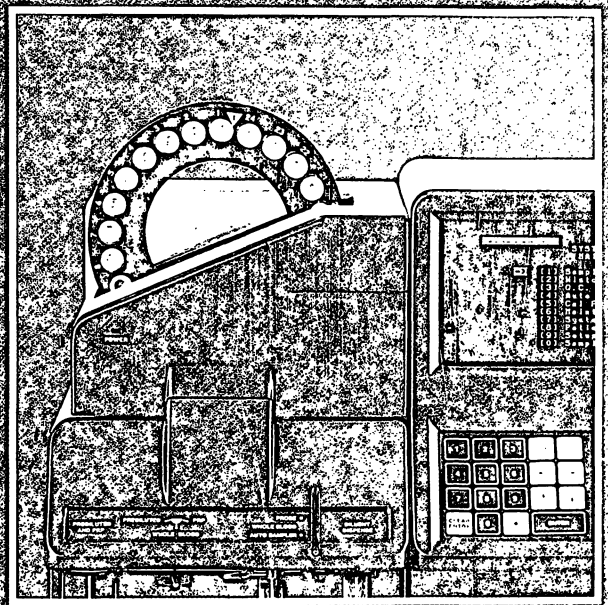
BAKER SYSTEM 9000:

Das intelligente
Hämatologie-System
von Serono Diagnostika.

Sicherheit  Automation



BAKER SYSTEM 9000 CP ermöglicht die Verwendung von Probengefäßen mit durchstechbarem Verschuß und variablem Inhalt.



Vollautomatischer Betrieb, einfach gesteuert durch bedienerfreundliches MENU.

- Mammelles Öffnen und Schließen der Behälter erfolgt.
- Keine Verschleppungen, da die Durchstechvorrichtung nach jeder Messung automatisch gespült wird.
- Datenkapazität für maximal 72 Proben, das entspricht drei vollen Probentellern.
- Notfallgeeignet: einzelne Proben können jederzeit in die Routine eingeschoben werden.

Rufen Sie uns an.
Wir informieren Sie
gerne ausführlich
07 61 / 4 01 67-0

Serono
DIAGNOSTICS

Erfahrung
schafft
Fortschritt®

Serono Diagnostika GmbH
Merzhauser Straße 134
D-7800 Freiburg

Geld-Anlage-Tips für Anfänger und Fortgeschrittene

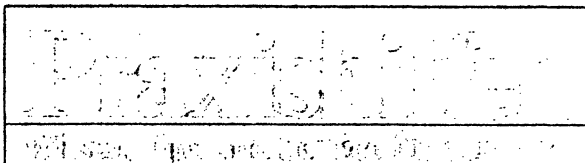
Die Zukunftssicherung des Kassenarztes

Wilhelm F. Maschner
80 Seiten, 36 DM,
ISBN 3-87409-170-8

Dieses Buch wird Sie zu zeitlich kürzeren und längeren Anlagen, die auf Erfahrungen beruhen, ermutigen. Risiken werden nicht verschwiegen. Überlassen Sie Ihre Entscheidungen nicht nur Ihren Beratern. Beim Lesen mögen Sie angeregt werden, sich allmählich selbst in den unvermeidlichen "Konjunkturzyklus" einzuleben, der rund um die Welt Geld bewegt. Zinsen steigen und fallen in einem Rhythmus von durchschnittlich vier Jahren. Man muß sich diesem Zyklus anpassen, denn die Inflation läuft synchron neben ihm her.

Planungen auf zu weite Sicht könnten scheitern, weil sie zu kühn oder zu zaghaft entworfen waren. In 10 oder 20 Jahren werden Sie wissen, welche Geldanlage wirklich richtig war. Ein Bausparvertrag kann beispielsweise die billigste oder die teuerste Investition gewesen sein.

Praxis-Investitionen, private Ausgaben und Zukunftssicherung sind z. B. "richtig", wenn sie auf der Basis wirklich erreichbarer Einnahmen geplant werden.

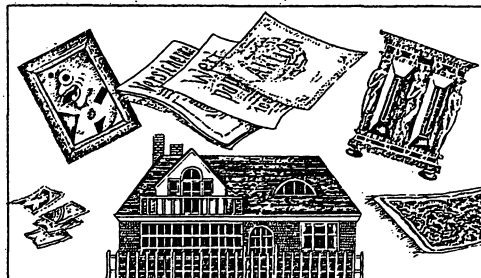


Herausgegeben von Frank H. Mader

Wilhelm F. Maschner

Geld-Anlage-Tips für Anfänger und Fortgeschrittene

Die Zukunftssicherung des Kassenarztes



Verlag Kirchheim
Mainz


KIRCHHEIM

Verlag Kirchheim
Postfach 2524
6500 Mainz 1
Telefon 0 61 31/67 10 81

Bestellcoupon

Ich bestelle ... Expl. Maschner: Geld-Anlage-Tips,
ISBN 3-87409-170-8, 36 DM.

Name _____

Straße _____

PLZ/Ort _____

Datum/Unterschrift _____

Lab.med. 4/91

möglich, einen spezifischen Marker der Hepatitis non-A-, non-B-Infektion (HNANB) nachzuweisen. Bisher war dies nur mit unspezifischen Surrogate-Tests wie der SGPT-Erhöhung möglich. Zu den Risikogruppen bezüglich einer Hepatitis non-A-, non-B-Infektion durch Blutpräparate zählen neben den Hämophilen die Patienten mit chronischer Hämodialyse, denen insbesondere vor Einführung der Erythropoietin-Therapie zur Behandlung der renalen Anämie Bluttransfusionen in größerem Umfang verabreicht wurden.

Wir haben die Anti-HCV-Seroprevalenz bei Patienten mit chronischer Hämodialyse (n = 409) in verschiedenen Zentren untersucht und Werte von durchschnittlich 4,2% Anti-HCV-Seropositive gefunden. In den einzelnen Zentren ergaben sich Werte von 2,3% bis 10,0%. Von den 17 Anti-HCV-positiven Patienten hatten zwei keine Bluttransfusionen erhalten, was auf die bei HCV-Infektionen bekannten weiteren Übertragungsmodi, wie z. B. sexuelle Kontakte oder nosokomiale Infektionen, hinweist.

Von den 49 Hämophilen, die wir untersuchten, waren 37 (75,5%) Anti-HCV-positiv. Hingegen fanden wir bei insgesamt 30 350 Blutspendern nur 0,52% (Ortho-Test) bzw. 0,87% (Abbott-Test) Anti-HCV-positiver Spender.

P 51

Immunoblot Analysis of IgG Subclass Antibodies to early Antigens of human Cytomegalovirus

A. Hamann and H. W. Doerr
Department of Medical Virology, Centre of Hygiene, University Clinics of Frankfurt/Main.

We investigated the IgG subclass reactivity pattern to early antigens (EA) of human cytomegalovirus (HCMV) in 217 EA-Ab-positive sera from immunocompetent healthy persons, renal transplant recipients and AIDS patients, by immunoblotting. Virus-specific early proteins were separated by PhastSystem™ electrophoresis system (Pharmacia, F.R.G.), and transferred to a PVDF membrane by the Modj-blot method (Braun & Abraham, 1989). All IgG subclasses are involved in the IgG immune response to HCMV early antigens. IgG1 was the major subclass reacting with HCMV early antigens (with a molecular weight ranging between 23 and 79 kDa) and was present in all sera irrespective of origin. Antibody responses of IgG isotypes 2, 3 and 4 were observed with lower frequency and reactivity, whereas IgG3 was detectable more frequently and reacted slightly stronger than IgG2 and 4. The IgG1 reactivity pattern was similar to that seen with total IgG. In contrast to total IgG and IgG1, the reactivity of the subclasses 2, 3 and 4 was not equally distributed among the early polypeptides, but was mainly directed to some of them (79, 70, 66, 43 and 38 kDa). Primary infections seem to induce the IgG3 response slightly stronger than reactivated infections. An increased IgG1 appeared to be associated with severe disease. Noteworthy was the low prevalence of IgG1 antibodies to the 70 kDa protein in HIV infected individuals. Since the IgG1 immune reaction to this protein occurred 5 to 7 times more frequently in immunocompetent healthy persons and renal transplant recipients, the lack of IgG1 antibodies to the 70 kDa protein might be a characteristic feature of HIV infection.

P 52

Produktivitätsanalyse und Personalbedarfsermittlung nach der Laboratory Workload Recording (WLR) Methode des College of American Pathologists (CAP)

U. Diekamp und I. Hillringhaus
Bluttransfusionsdienst, Zentralkrankenhaus St.-Jürgen-Straße, Bremen

Angemessene Personalausstattung? WLR ist eine 20 Jahre erprobte, fortgeschriebene Methode zur Ermittlung von Bedarf

und effektivem Einsatz nichtärztlichen Assistenzpersonals im klinischen Laboratorium. Input (Mitarbeiterzeit) und Output (Laborergebnisse) werden erfaßt und in Relation gesetzt. Der zentrale Baustein dieser Methode ist die WLR-Einheit (E). Ihre Definition und sich ableitende Produktivitätsparameter (P) sind im jährlich erscheinenden Manual for Laboratory WLR Method des CAP beschrieben. Unsere Ergebnisse seit 1985 (s. Tabelle):

Jahr	1985	1986	1987	1988	1989	1990	'85-'90
Leistungen, n x 10 ³	319,3	435,8	494,2	500,4	578,3	607,9	+90,4%
WLR-E, n x 10 ⁶	2,231	2,421	2,613	2,499	2,750	2,951	+32,3%
Bez. Std., h x 10 ³	58,02	64,09	65,00	61,11	61,46	61,13	+ 5,4%
Std. ohne E, %	20,5	19,2	16,6	14,7	15,1	15,4	- 5,1%
Bezahlte P, E/h	38,4	37,8	40,2	41,0	44,7	48,3	+25,8%
Gearbeitete P, E/h	46,2	47,5	52,3	50,4	55,4	58,9	+27,5%
Gemessene P, E/h	58,1	58,7	62,7	59,1	65,2	69,7	+20,0%
Ist-Vollkräfte, VK	28,9	31,9	32,2	30,2	31,1	31,4	+ 8,7%
Soll-Vollkräfte*, VK	29,0	32,8	35,7	32,6	36,2	38,7	+33,5%

*Pers.-bedarfsformel: 1,31 E : 60 x Jahressollstd. + Fehlzeiten : Jahresollstd.

CAP empfiehlt eine „bezahlte“ P von 40–45 E/h. Wegen der hier beobachteten Fehlzeiten von 17–23% reduzieren wir diese Empfehlung auf 37–42 E/h. Daraus folgt eine „gearbeitete“ P von 49–52 E/h. Die „gemessene“ P soll 52–54 E/h betragen, aber nicht mehr als 57 E/h. Leistungen stiegen seit 1985 um 90%, E um 32%, aber bezahlte Stunden nur um 5%. Nicht meßbare Tätigkeiten nahmen um 5% ab. Die Steigerung von Produktivität und Leistung waren 1985 bis 1988 etwa konkordant. Rationalisierung konnte bisher die Leistungsausweitung 1989–1990 und tarifliche Arbeitszeitverkürzung nicht auffangen, mit deutlichem Personaldefizit als Folge.

Schlussfolgerung: WLR erlaubt eine methoden- und gerätespezifische Produktivitätsanalyse und Personalbedarfsermittlung auch unter deutschen Gegebenheiten.

P 53

Ergebnisse der INR-Rundversuche der ÖQUASTA zur Kontrolle der oralen Antikoagulantientherapie unter Verwendung von AK-Plasmen

H. Lang, B. Moritz, V. Hinger, E. Legenstein*, M. Fischer** und E. Kaiser***
Immuno AG, Wien; ÄQUASTA, Wien*; Städtisches Krankenhaus Lainz, Zentrallaboratorium, Wien**; Institut für medizinische Chemie der Universität, Wien***; Österreich

1983 wurde das ISI/INR-Standardisierungsschema der Thromboplastinzeit zur Kontrolle der oralen Antikoagulantientherapie von der WHO verabschiedet. Bis heute wird die INR im Krankenhausbetrieb jedoch vorwiegend in Großbritannien und den Niederlanden eingesetzt, in Ländern also, in denen hauptsächlich nur ein Thromboplastin-Reagenz verwendet wird.

In zunehmendem Maß wird Kritik am ISI/INR-Konzept laut, da der ISI-Wert nicht nur vom verwendeten Thromboplastinreagenz, sondern auch von der Endpunktmethode beeinflusst wird (Poggio, M. et al.: *Thromb. Haemost.* 62 [3], 868–874, 1989). Dies hat dazu geführt, daß von einigen Thromboplastinherstellern geräteabhängige ISI-Werte angegeben werden.

In Österreich sind sehr viele verschiedene Rundversuche der Thromboplastin-Reagenzien verfügbar. Hier wurde die INR im Rahmen der Gerinnungsrundversuche der ÖQUASTA unter Verwendung von Plasmen von oral antikoagulierten Spendern auf ihre Verwendbarkeit zur Beurteilung von Rundversuchsteilnehmern geprüft. Dies ist eine der Voraussetzungen dafür, die INR im normalen Laboratoriumsbetrieb einzusetzen.

Die Ergebnisse von 13 österreichischen Rundversuchen unter statistischer Berücksichtigung der Thromboplastin-Reagenzien und der Endpunktmethoden werden dargestellt und diskutiert.

Influence of Pre-Analytic Factors on Laboratory Parameters of Hemostasis

U. Funke, G. Töpfer, M. Schulze, A. Seifert and G. Lutze
Zentrallabor des Kreiskrankenhauses, O-8800 Zittau

The validity and reliability of laboratory tests is not only influenced by the specific test and its performance but also by a variety of determinants effecting the sample before its analysis. These so-called pre-analytic conditions can have a substantial effect on the final result particularly of tests for analysis of patient's hemostasis. In order to evaluate the influence and relevance of several pre-analytic factors the following parameters were systematically varied:

- condition of blood collection
- pressure and duration of stasis
- technique of venous puncture and
- technique of blood withdrawal
- usefulness of blood from catheters
- influence of plasma expanders and other therapeutic drugs in the patient's specimen
- influence of blood/citrate relation and Ca^{++} concentration
- storage conditions
- surfaces of employed tubes, preparation of glass-surfaces.

The effect of these parameters on the results of quick-test, hepato-quick test, PTT, TT, factors I, II, V, VII, VIII, IX, XI and XII was tested. The influence upon parameters more sensitively reflecting the thrombin generation remains to be examined.

In conclusion, pre-analytic conditions are supposed to have a distinct influence upon results of several parameters in hemostatic analysis; this effect is often underestimated but has an important relevance on the validity and reliability of results.

Detection of Soluble Fibrin Monomer Complexes by its Netropsin-induced Aggregation

G. Töpfer, U. Funke, M. Schulze, A. Seifert and J. U. Wieding
Abt. Immunologie, Hämatologie u. Transfusionswesen, Städt. Kliniken O-8900 Görlitz and Universitätsklinikum W-3400 Göttingen

A simple and reliable method for the detection of soluble fibrin monomer complexes has been developed by taking advantage of its netropsin induced aggregation and subsequent precipitation. Netropsin is a antibiotic from actinomycetales which has been found to provoke an aggregation of soluble fibrin in plasma.

Citrate plasma is incubated with netropsin at pH 7,5 for 30 minutes. After centrifugation of the sample a precipitate can easily be visualized in the presence of increased soluble fibrin concentrations in plasma.

The sensitivity of this test procedure was estimated as approximately 15 ug soluble fibrin per ml plasma, which is comparable to that of the hemagglutination test according to Largo. Fibrinogen as well as late degradation products from both fibrinogen and fibrin do not influence the test results. However, similar to the hemagglutination test, positive test results due to early fibrin degradation products have to be taken into account. Heparin as well as dextran or gelatin derivatives seem to have no influence on the amount of precipitated fibrin complexes. Precipitates also do not depend on the albumin/globulin ratio, on the pH value or the number of residual platelets in platelet poor citrate plasma.

Plasma samples from intensive care patients were also examined. The netropsin test yielded a good clinical validity, practicability and sufficient sensitivity in single specimens as well as in course observations. For example, using the netropsin test the efficacy of an antithrombin III substitution during disseminated intravascular coagulation could be demonstrated by a decrease of soluble fibrin levels in plasma.

Standardisierung der Kryoproteindagnostik – von Bedeutung für den Einzelfall

G. Schwartze
Universitätshautklinik Halle

Aufgrund von Erfahrungen mit verschiedenen vorliegenden Vorschriften (1, 2, 3) wurde eine Verfahrensweise zum Kryoprotein-nachweis erarbeitet, die Grundlage einer Standardisierung sein kann.

Kryoproteine sind relativ seltene Paraproteine, die Kälteintoleranzerscheinungen hervorrufen und dadurch eine erhebliche Gesundheitsbeeinträchtigung zur Folge haben können. Für den einzelnen Fall ist daher eine zuverlässige Diagnostik von Bedeutung. Der Nachweis der Kryoproteine erfolgt aufgrund ihrer (reversiblen) Unlöslichkeit bei Temperaturen unterhalb 37°C. Bei der Gewinnung des Probenmaterials (Serum, Plasma) ist eine Temperatur von 37°C einzuhalten, um falsch negative Resultate zu vermeiden. Die Präzipitation tritt im Kühlschrank meist nach 24 Stunden, gelegentlich aber erst nach 7 Tagen (3) ein. Nach Auswaschen des Präzipitats in der Kälte erfolgt die immunchemische Charakterisierung der beteiligten Proteine durch Immunoelektrophorese oder -fixation. Eine Quantifizierung der Kryopräzipitation zum Zwecke der Verlaufskontrolle ist anhand eines in Kapillaren ermittelten Kryokritwertes möglich.

Schrifttum:

1. WINTROBE, M. M., DUELL, M. M.: Bull. Johns Hopkins Hosp. 52, 156 (1933).
2. MITTELBACH, F., STÜTTGEN, G.: Hautarzt 38, 352 (1987).
3. KYLE, R. A.: In: Manual of Clinical Laboratory Immunology (Ed. N. R. Rose, H. Friedmann, J. L. Fahey), 3rd Edition, Washington, 161 (1986).

Bestimmung der Gehirnetabolite L-Ascorbat, Acetoacetat und D(-)-3-Hydroxybutyrat im Liquor cerebrospinalis mit quantifizierten trägergebundenen Urin-Tests

T. O. Kleine, D. Rytlewski
Med. Zentrum für Nervenheilkunde (Funktionsbereich Neurochemie) der Universität Marburg

L-Ascorbat, Acetoacetat und D(-)-3-Hydroxybutyrat stellen Metabolite des Gehirnstoffwechsels dar (1). Hier wird versucht, diese Metabolite mittels quantifizierter trägergebundener Tests ohne Probenverdünnung im Liquor cerebrospinalis zu bestimmen.

Rapignost Total Screen L Urin Teststreifen und ein Rapimat II/T Urin Analysator (Behringwerke Marburg) werden modifiziert, indem die Remissionswerte (REM) on line in einen IBM AT transferiert und mittels einer 10-Punkt-Eichkurve quantifiziert werden.

L-Ascorbat-Test: 20 µl Probe werden auf das Ascorbat-Testfeld pipettiert und nach 2 min gemessen (Meßbereich: 55 bis 450 µmol/l bei einer Impräzision von 27 bis 8% VK). Der Test wird mit eingewogenen Mengen von L-Ascorbat in einer modifizierten 0,15 mol/l NaCl-Lösung kalibriert, die mit einem naßchemischen Test (2) eingestellt worden war.

Acetoacetat-Test: 10 µl Probe werden auf das Acetoacetat-Testfeld pipettiert und nach 2 min gemessen (Meßbereich: 42 bis 300 µmol/l mit Impräzisionen zwischen 22 und 8% VK). Die Kalibrierung erfolgt mit Acetoacetat-D-3-Hydroxybutrat-Standards, die in verdünntem Kontrollserum (Behringwerke; 1 + 199 mit 0,15 mol/l NaCl verdünnt) gelöst sind. Die Standards werden mit einem naßchemischen Test (4) eingestellt.

D-3-Hydroxybutyrat-Test: In einer Vorschaltreaktion (Gesamtvolumen 63 µl) werden D-3-Hydroxybutyrat in 40 µl Probe zu Ace-

toacetat mittels 75 mU D-3-Hydroxybutyrat: NAD⁺ Oxidoreduktase (EC 1.1.1.30) bei pH 8,6 oxidiert und dann im Acetoacetat-Test gemessen (Meßbereich: 58 bis 250 µmol/l mit einer Impräzision zwischen 23 und 11% VK). Der Test wird mit D-3-Hydroxybutyrat-Standards geeicht (s. o.).

Methodenvergleiche nach Passing (5) mit naßchemischen Tests zeigen eine gute Übereinstimmung für alle drei Tests bei deproteinisierten Liquorproben; bei nativen Proben kann eine Färbung des Liquors die Messung stören.

Zusammengefaßt ermöglicht die Quantifizierung der Teststreifen für L-Ascorbat, Acetoacetat und D-3-Hydroxybutyrat eine schnelle und billige Alternative zur Bestimmung dieser Gehirnmetabolite im Liquor cerebrospinalis.

Schrifttum:

1. WOOD, J. H.: Neurobiology of Cerebrospinal Fluid. Plenum Press, New York 1980.
 2. BEUTLER, H. O.: In: BERGMAYER, H. U. (ed.): Methods of Enzymatic Analysis. 3rd Vol. Verlag Chemie, 376-385 (1988).
 3. KLEINE, T. O., RYBLEWSKI, D.: J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 26, 753-754 (1988).
 4. PASSING, H., BABLOK, W.: J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 21, 709-720 (1983).
- Förderung durch Bundesminister für Forschung und Technologie 01 ZR 8513.

zeigten eine Übereinstimmung beim Nitrit-Test mit deproteinisierten Proben; die Ergebnisse des Granulozyten- und Glucose-Tests lagen etwas niedriger als diejenigen mit der Zytocentrifugungsmethode (2) bzw. mit dem ACASx ermittelten, was auf Störfaktoren hinweist, z. B. Ascorbinsäure beim Glucose-Test, farbige Liquorproben im Granulozyten- und pH-Test sowie hohe Proteingehalte.

Trotz dieser Nachteile erscheinen diese quantifizierten trockenchemischen Tests für die Notfall-Liquor-Diagnostik geeignet.

Schrifttum:

1. COLOMBO, J. P., RICHTERICH, R.: Die einfache Urinuntersuchung. Huber Verlag, Bern 1977.
2. KLEINE, T. O.: Neue Labormethoden für die Liquordiagnostik. Thieme Verlag, Stuttgart 1980.
3. SHECHTER, H., GRUENER, N., SHUVAL, H. I.: Anal. Chim. Acta 60, 93-99 (1972).
4. PASSING, H., BABLOK, W.: J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 21, 709-720 (1983).

Förderung durch Bundesminister für Forschung und Technologie 01 ZR 8513.

P 58

Entzündungsdiagnostik mit quantifizierten trägergebundenen Urin-Tests im Liquor cerebrospinalis

T. O. Kleine und D. Rytlewski

Med. Zentrum für Nervenheilkunde (Funktionsbereich Neurochemie) der Universität Marburg

Parameter einer akuten Entzündung im Zentralnervensystem sind u. a. Granulozyten, Bakterienmetabolite, z. B. Nitrit (vgl. 1), saurer pH und erniedrigte Glukosekonzentration im Liquor cerebrospinalis (vgl. 2). Deshalb wird hier versucht, trägergebundene Tests für die Urindiagnostik zu quantifizieren und an Liquor zu adaptieren.

Rapignost Total Screen L Urin Teststreifen und ein Rapimat II/T Urin-Analysator (Behringwerke Marburg) werden modifiziert, indem die Remissionswerte (REM) on line in einen IBM AT transferiert und mit einer 10-Punkt-Eichkurve quantifiziert werden:

Granulozyten-Test: je 15 µl Probe werden auf das beheizte Leukozytenfeld und ein Feld zur Farbkompensation pipettiert und nach 2 min Inkubation gemessen (Meßbereich: 1 bis > 550 Granulozyten pro µl mit einer Impräzision von 23 bis 8% VK). Die Kalibrierung erfolgt mit verdünnten und gezählten, aus Blut isolierten Leukozytenfraktionen.

Nitrit-Test: 15 µl Probe werden auf das Nitritfeld pipettiert und nach 1 min Inkubation gemessen (Meßbereich: 5,45 bis 150 µmol/l mit einer Impräzision von 11 bis 5% VK). Die Eichung erfolgt mit eingewogenen NaNO₂-Proben in einem verdünnten Kontrollserum (Behringwerke; 1 + 199 mit 0,15 mol/l NaCl-Lösung), ihre Standardisierung mit einem naßchemischen Test (3).

pH-Test: 15 µl Probe werden auf das pH-Feld pipettiert und nach 1 min Inkubation gemessen (Meßbereich: pH 5 bis pH 8 mit einer Impräzision von 0,06 bis 0,14 pH-Einheiten). Zur Kalibrierung werden standardisierte Puffer (E. Merck) verwendet, die im ABL 3 (Radiometer Deutschland) kontrolliert werden.

Glukose-Test: 10 µl Probe (5+1 mit Natriumdodecylsulfat [5 g/l] gemischt) werden auf das Glukosefeld pipettiert und nach 1 min Inkubation gemessen (Meßbereich: 2 bis 150 mg/dl mit einer Impräzision von 12 bis 9% VK). Die Kalibrierung erfolgt mit eingewogenen Mengen von α-D(+)-Glucose (Serva), die in verdünntem Kontrollserum (Behringwerke; 1 + 199 mit 0,15 mol/l NaCl-Lösung) gelöst und 10 min bei 70° C erhitzt worden waren. Die Glukose-Standards werden mit der Hexokinase-Methode im ACASx (DuPont de Nemours Deutschland) geeicht.

Methodenvergleiche nach Passing (4) mit naßchemischen Tests unter Verwendung von teilweise aufgestockten Liquorproben

P 59

Analyse von Lymphozytensubpopulationen im Liquor cerebrospinalis mittels fünfdimensionaler Durchflußzytometrie

T. O. Kleine^a, J. Albrecht^b

^a) Med. Zentrum für Nervenheilkunde (Funktionsbereich Neurochemie) der Universität Marburg

^b) Becton Dickinson, Heidelberg

Lymphozyten und Lymphozytensubpopulationen werden im fünfdimensionalen Durchfluß-Zytometersystem von Becton Dickinson (FACScan mit FACScan Research software) durch die kombinierte Analyse von vorwärts- und orthogonalem Lichtstreuungssignalen zusammen mit drei Fluoreszenzsignalen von markierten Liquorzellen wie folgt analysiert: 50 oder 100 µl frische Probe werden zu 5 µl monoklonales Reagenz A bis F pipettiert, gemischt und nach Zugabe von 10 µl einer LDS-751-Arbeitslösung zur Markierung hauptsächlich von DNS 30 min bei 4 °C inkubiert. Vor der Zellanalyse wird der Ansatz mit 250 µl einer phosphat-gepufferten NaCl-Lösung vermischt.

Die Liquorzellen werden mit folgenden Fluoreszein-Isothiocyanat-(FITC-) und Phycoerythrin-(PE-)konjugierten monoklonalen Antikörperreagenzien markiert (Simultest IMK Plus): Reagenz A: FITC-markiertes CD45 plus PE-markiertes CD14 zur Abgrenzung der Lymphozyten von anderen Liquorzellen; Reagenz B: FITC-markiertes IgG, plus PE-markiertes IgG₂ zur Leerwertkompensation; Reagenz C: FITC-markiertes CD3 (T-Lymphozyten) plus PE-markiertes CD19 (B-Lymphozyten); Reagenz D: FITC-markiertes CD4 (Helfer/Inducer-Lymphozyten) plus PE-markiertes CD8 (zytotoxische/Suppressor-Lymphozyten); Reagenz E: FITC-markiertes CD3 plus PE-markiertes HLA-DR (aktivierte Lymphozyten); Reagenz F: FITC-markiertes CD3 plus PE-markiertes CD16+CD56 (NK-Zellen).

Da für die Analyse von Liquorproben mit im Referenzbereich liegenden Leukozytenzahlen (0 bis 5 Zellen pro µl) Ausbeuten und Probensaugzeit am Zytometer zu gering bzw. zu lang sind, wird bei zellarmen Likooren die gesamte Probe einmal bei 200 xg zentrifugiert und das Zellpellet analysiert. Vergleichsuntersuchungen mit 10 Liquorproben und ihrem Pellet haben keinen signifikanten Unterschied zwischen T-Lymphozyten, ihren aktivierten Formen, B-Lymphozyten, Helfer-Lymphozyten, Suppressor-Lymphozyten und NK-Zellen in der nativen Primärprobe und den entsprechenden Subpopulationen im Zellpellet gebracht.

Damit ist das Zellpellet zellarmer Liquorproben zur Analyse geeignet; dagegen traten durch Wasch-Zentrifugations-Schritte, wie sie üblicherweise zur Entfernung ungebundener Marker verwendet werden, unkontrollierbare Zellverluste auf.

Die Analyse von Lumballiquorproben von Patienten mit Bandscheibenschaden (Leukozytenzahl 0 bis 5/µl) zeigt im Vergleich zu simultan entnommenem Vollblut weniger B-Lymphozyten, T-

Suppressor- und NK-Zellen auf sowie mehr T-Lymphozyten und T-Helfer-Zellen. Die Ergebnisse weisen in Subokzipitalliquorproben gewisse Unterschiede auf.

Zusammengefaßt erlaubt die hier vorgestellte Modifikation ohne Erythrocytenanalyse die Analyse von Lymphozytensubpopulationen im Liquor cerebrospinalis.

P 60

Diagnostik einer Blutung im Liquor cerebrospinalis mit quantifizierten trägegebundenen Urin-Tests

T. O. Kleine, D. Rytlewski

Med. Zentrum für Nervenheilkunde (Funktionsbereich Neurochemie) der Universität Marburg

Zur schnellen Diagnostik einer Blutung in die Liquorräume haben wir folgende semiquantitativen trägegebundenen Urin-Tests für die Urindiagnostik modifiziert und quantifiziert: die Hä-moglobin-Peroxidase-Reaktion, eine Azofarbstoffreaktion zum Bilirubinnachweis und eine Indikatorreaktion für Albumin.

Bestimmungen mit Rapignost Total Screen Teststreifen und Rapimat II/T Urin-Analysator werden modifiziert, indem die Remissionswerte (REM) on line in einen IBM AT transferiert und mit einer 10-Punkt-Eichkurve quantifiziert werden.

Erythrozyten-(Hämoglobin-[Hb-])Test: 10 µl Probe werden auf das Erythrozyten-Hb-Testfeld pipettiert und nach 1 min Inkubation gemessen (Meßbereich: 10 bis > 1000 Erythrozyten pro µl bzw. 0,05 bis 3,0 mg/l Hb mit einer Impräzision zwischen 25 und 14% bzw. 16 und 10% VK). Die Kalibrierung erfolgt mit verdünnten Bluterythrozyten bzw. mit Verdünnungen einer Hb-Lösung, die mittels Zählung in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (1) bzw. immunnephelometrisch (2) geeicht wurden.

Bilirubin-Test: 10 µl Probe werden auf das Bilirubintestfeld pipettiert und nach 1 min gemessen (Meßbereich: 1,4 bis 20 mg/dl mit einer Impräzision zwischen 12 und 5% VK). Die Kalibrierung erfolgt mit einem Kontrollserum (Decision, Beckman; mit 0,15 mol/l NaCl verdünnt).

Albumin-Test: 15 µl Probe werden auf das Albuminfeld pipettiert und nach 1 min gemessen. Die Eichung erfolgt mit verdünnten Human-Albumin-Lösungen bzw. verdünnten Kontrollseren (Behringwerke, Organon), die mittels Biuret-Tests standardisiert wurden (Meßbereich: 80 bis 3000 mg/l bei einer Impräzision zwischen 15 und 9% VK).

Methodenvergleiche nach Passing (3) zwischen den quantifizierten Teststreifen-Tests und naßchemischen Tests zeigen eine gute Übereinstimmung für den Hämoglobin-Test; für den Erythrozytentest werden ca. 50% niedrigere Werte erhalten, was auf Membranhemmefekte hinweist. Dagegen ist der Albumin-Test deutlich von den verwendeten Kalibratoren abhängig.

Zusammengefaßt stellen die quantifizierten Teststreifentests eine billige und schnelle Alternative dar zur Notfalluntersuchung einer Blutung in die Liquorräume.

Schrifttum:

1. KLEINE, T. O.: Neue Labormethoden für die Liquordiagnostik. Thieme Verlag, Stuttgart, 1980.
2. LAMMERS, M., GRESSNER, A. M.: J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 25, 363-367 (1987).
3. PASSING, H., BABLOK, W.: J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 21, 709-720 (1983).

Förderung durch Bundesminister für Forschung und Technologie 01 ZR 8513.

P 61

Zur Wirkung von Fischölkonzentrat auf das Lipoproteinprofil bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II

W. Herrmann, J. Biermann, K.-P. Ratzmann, H.-G. Lindhofer
Bezirkskrankenhaus Meiningen, Sanatorium Bad Colberg,
Zentralstelle für Diabetes und Stoffwechselkrankheiten Berlin

Nicht-insulinabhängiger Diabetes mellitus ist assoziiert mit erhöhten Konzentrationen an Very-low-density-Lipoproteinen (VLDL) und Triglyceriden sowie Abnormalitäten der Low-density-Lipoprotein-(LDL-)Zusammensetzung. Da Fischöl bei Nichtdiabetikern eine stark triglyceridsenkende Wirkung ausübt, untersuchten wir den Einfluß einer supplementären Fischöldiät bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II (n = 19), die bislang noch nicht medikamentös, sondern nur diätetisch behandelt worden waren.

Studieablauf: 4 Wochen Run-In-Periode (6 g Rapsöl/d), 12 Wochen Verumperiode (6 g Fischölkonzentrat/d), 4 Wochen Wash-Out-Periode (6 g Rapsöl/d). Die Fischölkapseln enthielten mindestens 50% Eicosapentaen- und Docosahexaensäure. Die Blutparameter wurden zu Beginn und am Ende jeder Periode nüchtern sowie unter Belastung bestimmt.

Verglichen mit der Placebo-Periode bewirkte die Fischöldiät eine Abnahme der Serum-Triglyceride um 29%, einen Anstieg im LDL-Cholesterol um 9%; einen Zuwachs an HDL-Cholesterol um 9% (besonders HDL2-Cholesterol), eine Erhöhung im Apo B um 4% und eine Senkung im Apo AI um 9%. Der Nüchternblutzucker, die Glucosebelastung sowie der Insulinspiegel (nüchtern und unter Belastung) zeigten am Ende der Verumphase keine signifikanten Änderungen.

Inwieweit die positiven Veränderungen des Lipoproteinprofils durch deutliche Absenkung der Triglyceride und Hebung des HDL-Cholesterol von geringen Anstiegen im LDL-Cholesterol und Apo B neutralisiert werden, muß in weiteren Untersuchungen abgeklärt werden.

P 62 bis P 68 gingen nach Redaktionsschluß ein und konnten nicht mehr veröffentlicht werden.

Entwicklung, Produktion, Vertrieb in einer Hand.

Glucose-PAP

Cholesterin-PAP

Lactat-PAP
• 5 Min.

Amylase EPS
• Blockiertes Substrat

Creatinin-UV
• enzymatisch
• kostengünstig

Creatinin-PAP
• spezifisch enzymatisch
• stabile Arbeitslösung
• hohe Linearität

Bilirubin AT
• Monoreagenz
• ohne Probenleerwert
• 5 Min. Endpunkt

Lipase-PAP
• vollautomatischer Farbttest, Kinetisch
• Stabilität nach Lösen: 2 Wochen
• Linearität: 14-fache des Normalbereichs

Klin. Chemie Rheumatexteste, Hb A₂ / Hb A₁ / Hb A_{1c}- Teste, Schwangerschaftsteste, Teststreifen



ANALYTICON GmbH · Flughafen Siegerland · W-5909 Burbach/Deutschland · Tel. 027 36/50001
FAX 027 36/5152 · Telex 87 57 47

Nach 9 Monaten
bereits die
3. Auflage

Die auslegepflichtigen Praxisvorschriften

(Ärzte, Zahnärzte, Tierärzte)

von **W. M. Nentwig (Notar)** und **R. J. Gläser (Rechtsanwalt)**

216 Seiten, Broschur, 39,80 DM, ISBN 3-87409-182-1, 3. überarbeitete Auflage

Eine komplette Sammlung aller Gesetze und Verordnungen, die in jeder Praxis ausgelegt werden müssen. Geldbußen bis zu 1.000 DM drohen, wenn auslegepflichtige Vorschriften dem (ohne vorherige Anmeldung in der Praxis erscheinenden) Beamten des Gewerbeaufsichtsamtes nicht vorgelegt werden können.

- Jugendarbeitsschutzgesetz, wenn regelmäßig mindestens ein Jugendlicher beschäftigt wird,
- Mutterschutzgesetz, wenn regelmäßig mehr als drei Frauen beschäftigt werden,
- die Arbeitszeitordnung in jedem Fall,
- die Unfallverhütungsvorschrift (Berufsgenossenschaft) in jedem Fall
- die Röntgenverordnung, wenn ein Röntgengerät betrieben wird,
- das Bestandsverzeichnis oder Gerätebuch gem. Medizingeräteverordnung, wenn energetisch betriebene med.-technische Geräte betrieben werden.

Kann ein Bestandsverzeichnis oder Gerätebuch nicht vorgelegt werden, droht eine Geldbuße bis zu 10.000,— DM!

Die Anschaffung dieses Werkes kann daher ohne Übertreibung als "Pflichtlektüre für jede Praxis" bezeichnet werden. Demgemäß sind die Anschaffungskosten selbstverständlich als Praxisausgaben steuerlich absetzbar.

Jetzt als "gesamtdeutsche" Ausgabe mit den Ergänzungen des Einigungsvertrages und dessen Auswirkungen auf Praxen und ärztlich geleitete Polikliniken in den fünf neuen Bundesländern. Darüber hinaus wurden die verlängerten Fristen zur Abnahme von Röntgengeräten gemäß § 45 Abs. 3 RöV sowie die neue Verordnung über die ärztlichen Untersuchungen nach dem Jugendarbeitsschutzgesetz eingearbeitet.


KIRCHHEIM Postfach 25 24, 6500 Mainz, Telefon 0 61 31/67 10 81

Ich bestelleExemplare:

Nentwig/Gläser:

**Die auslegepflichtigen
Praxisvorschriften**

ISBN 3-87409-182-1,
3. Auflage 1991, 39,80 DM.

Lab.med. 4/91

Name: _____

Straße: _____

PLZ/Ort: _____

Datum/Unterschrift: _____

S 1

Porphyriediagnostik: Befunderhebung und Interpretation

M. O. Doss

Abteilung für Klinische Biochemie im Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg, Deutschhausstraße 17 1/2, D-3550 Marburg

Jeder Porphyrie-Typ entwickelt ein diagnostisch-spezifisches metabolisches Syndrom bzw. eine diagnostisch-spezifische metabolische Konstellation. Sekundäre Porphyrinstoffwechselstörungen wie asymptomatische Koproporphyrinurien und Protoporphyrinämien, die keinen eigenständigen klinischen Krankheitswert haben, da sie selbst nicht zu klinischen Symptomen führen, sind häufiger als Porphyrien. Die Porphyria cutanea tarda (PCT) ist dreimal häufiger als die akute intermittierende Porphyrie (AIP). Die erythropoetische bzw. erythrohepatische Protoporphyrinurie ist die drithäufigste Porphyrie. Variiegata und hereditäre Koproporphyrinurie zeigen innerhalb der akuten hepatischen Porphyrien eigenständige Befundkonstellationen.

Aus klinischer Sicht sollten Porphyrien in akute und nichtakute differenziert werden. Akute hepatische Porphyrien sind Gegenregulationskrankheiten, so daß die Diagnose bei klinischer Expression durch Metabolitenuntersuchungen in Urin und Stuhl zu führen ist (1). Auch bei den chronischen hepatischen Porphyrien mit PCT-Manifestation und den erythropoetischen Porphyrien als Speicherkrankheiten stehen Metabolitenuntersuchungen zur Diagnostik an erster Stelle (Tab. 1). Zur Diagnose einer klinisch-symptomatischen Porphyrie und zur Therapie des Porphyriekranken bleibt der genetische Hintergrund weitgehend unberücksichtigt. Enzymuntersuchungen sind zur Diagnosesicherung einer akuten oder chronischen hepatischen Porphyrie weder geeignet noch erforderlich und haben aus klinischer Sicht keine Relevanz und Konsequenz.

Tab. 1: Untersuchungen der Parameter des Porphyrinstoffwechsels: Befunderhebung und-Interpretation

Urin		Stuhl		Erythr.	Enzymdefekt	Diagnose
ALS	PBG	Uro	Ko- pro	Ko- pro	Proto	
◆◆ (▲)	◆	◆◆	n	n	◆	PBG-Synthase (ALS-Dehydratase) Porphyrie (homozygot)
◆◆◆◆	◆◆◆◆	◆◆◆◆	v	v	n	PBG-Desaminase (Uro'gen-I-Synthase) Akute intermittierende Porphyrie
◆◆◆◆	◆	◆◆	◆◆◆◆	n	◆	Kopro'gen-Oxidase Hereditäre Koproporphyrinurie
◆◆◆◆	◆	◆◆	◆	◆◆	n	Proto'gen-Oxidase Porphyria variegata
◆◆ (▲)	◆	◆◆	n	n	◆	PBG-Synthase Bleivergiftung
n	n	◆◆◆	v	v	n	Urogen-Decarboxylase Porphyria cutanea tarda bzw. chronische hepatische Porphyrie*
n	n	n	n	n	v ◆	Ferrochelatase Protoporphyrinurie, erythropoetisch bzw. erythrohepatisch
n	n	n	◆	n	◆◆	

◆ = erhöht; ◆ = erniedrigt; n = normal; v = variabel; * außerdem Anstieg von Heptacarboxyporphyrin im Urin und von Isocoproporphyrin im Stuhl; Abkürzungen: ALS = δ -Aminolävulinsäure; PBG = Porphobilinogen; Uro, Kopro, Proto = Uro-, Kopro-, Protoporphyrin

Wenn ein komplexes klinisches Syndrom an eine AIP denken läßt, aber nur eine moderate Koproporphyrinurie bei normaler Porphyrinvorläufer-Ausscheidung festgestellt wird, dann liegt eine akute Porphyrie nicht vor. Die Diagnose einer Porphyrie kann nicht auf der Bestimmung eines einzelnen Parameters beruhen. Die Suchttest-Diagnostik für akute Porphyrien umfaßt den Nachweis sowohl von Porphobilinogen als auch der Porphyrie im Urin. Ist einer von beiden oder sind beide Parameter erhöht, werden spezielle Untersuchungen erforderlich (Tab. 1). Ohne eine gleichsinnige Erhöhung der beiden Porphyrinvorläufer, δ -Aminolävulinsäure und Porphobilinogen, bei simultaner Porphyrinurie kann die „Diagnose“ einer AIP oder einer anderen akuten hepatischen Porphyrie im klinischen Kontext einer akuten Polysymptomatik nicht verifiziert werden. Die Diagnose einer PCT bzw. chronischen hepatischen Porphyrie beruht hingegen auf einem extremen Anstieg von Uro- und Heptacarboxyporphyrin im Urin (bei normaler Porphyrinvorläufer-Ausscheidung) sowie auf einem deutlichen Vorkommen von Isocoproporphyrin im Stuhl. Bei der akuten Bleiintoxikation kann die Porphobilinogen-Synthase im Gegensatz zur homozygoten akuten Porphyrie (Tab. 1) mit Zink und Thiolen reaktiviert werden. Bei der Protoporphyrinurie ist freies Protoporphyrin in den Erythrozyten erhöht, im Gegensatz zu den in der Regel nur mäßiggradigen Zink-Protoporphyrinämien bei Anämien und homozygoten Porphyrien. Die seltene kongenitale erythropoetische Porphyrie wird durch die Isomer-I-Dominanz von Uro- und Koproporphyrin erkannt.

Extreme Metabolitenanstiege sind für klinisch manifeste Porphyriephasen verantwortlich. In der Regel bleiben die Ausscheidungsparameter in Latenzphasen noch deutlich pathologisch erhöht. Die Interpretation einer Befundkonstellation heißt, daß die Metaboliten aufgrund der unterschiedlichen Synthesekapazität der einzelnen Hämbiosyntheseenzyme (Tab. 1) in einem bestimmten molekularen Verhältnis zueinander stehen, das die reguläre und infolge eines Enzymdefekts und seiner Gegenregulation irreguläre Porphyrinbiosynthese widerspiegelt.

Laborbefunde sollen zur Klinik korrelieren: Es soll nach der klinischen Relevanz der pathobiochemischen Parameter gefragt werden. Die Frage lautet: Können die individuellen Beschwerden, Symptome und Befunde auf dem Boden einer Porphyrinstoffwechselstörung erklärt werden? Sind Art und Höhe der Exkretionswerte geeignet, die differentialdiagnostischen Überlegungen nach einer Porphyrie im klinischen Kontext zu stützen, oder ist die Mitreaktion des Porphyrinstoffwechsels Ausdruck einer andersartigen Lebererkrankung oder einer Funktionsstörung der Leber? Damit soll gesagt werden, daß Porphyrinurie in der Mehrzahl der Fälle nicht Porphyrie bedeutet und eine solche sekundäre, von seiten des Porphyrinstoffwechsels klinisch asymptotische Porphyrinopathie nicht als Interpretationsstütze für abdominale, neurologische, psychiatrische und kardiovaskuläre Beschwerden und Symptome herangezogen werden kann. Auch wenn eine sekundäre Koproporphyrinurie mit einem chamäleonartigen Krankheitsbild assoziiert ist, sollte sie nicht zur Porphyrie stilisiert werden (1). Klinische Überbewertungen dieser sekundären Porphyrinurien bei mangelnder pathobiochemischer Interpretation sind gewöhnlich Anlaß von Fehldiagnosen. Ätiologie und Pathogenese der sekundären asymptotischen Koproporphyrinurie und Protoporphyrinämie sind vielschichtig und im einzelnen nicht geklärt. Pathogenetisch kommen neben genetischen Faktoren sowohl singuläre und multiple Hemmungen von Enzymen der Porphyrin- und Hämbiosynthese in Betracht (z. B. durch Alkohol, Arzneimittel, Blei, Umweltchemikalien) als auch Transport- und Sekretionsstörungen des Koproporphyrins in und aus der Leber (2).

Schrifttum:

1. DOSS, M.: Notate zur Porphyrie. Dtsch. med. Wschr. 108, 1975-1979 (1983).
2. DOSS, M. O.: Porphyrinurias and occupational disease. Annals New York Academy of Sciences 514, 204-218 (1987).

Erythrohepatische Protoporphyrinurie: Porphyrinparameter zur Prognose und Therapiekontrolle

M. Frank und M. O. Doss

Abteilung für Klinische Biochemie im Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg, Deutschhausstraße 17 1/2, D-3550 Marburg

In einem Zeitraum von 20 Jahren wurde bei 90 Patienten mit kutaner Photosensitivität die Diagnose Protoporphyrinurie patho-biochemisch durch erhöhtes Protoporphyrin (PP) in Erythrozyten, Plasma und Stuhl gesichert. Die Porphyrine wurden durch HPTLC und HPLC analysiert und die Differenzierung des freien, nicht-zinkgebundenen Protoporphyrins spektrophotometrisch- und spektrofluorometrisch vorgenommen.

Bei 27 Patienten (30%) wiesen durchschnittlich zwei- bis dreifach erhöhte Aminotransferasen mit Dominanz der ALAT auf eine Leberbeteiligung hin. Zwölf dieser Patienten zeigten histologisch eine komplette, mikronoduläre Leberzirrhose.

Vier Patienten verstarben an den Folgen der Leberinsuffizienz. Drei Patienten wurden lebertransplantiert. Erythrozytäres PP war bei hepatisch komplizierter Protoporphyrinurie mit 38 ± 7 ($\bar{x} \pm S_M$) $\mu\text{mol/l}$ (normal $< 0,5 \mu\text{mol/l}$) signifikant höher als bei ausschließlich kutaner Verlaufsform mit $9 \pm 2 \mu\text{mol/l}$ ($p < 0,001$).

Bei den 27 Patienten mit Leberfunktionsstörung fand sich ein pathologischer Anstieg von Koproporphyrin (KP) im Urin auf $468 \pm 101 \text{ nmol/l}$ (normal $< 120 \text{ nmol/l}$) im Vergleich zur unkomplizierten Photodermatose mit $84 \pm 13 \text{ nmol/l}$ ($p < 0,001$). Der Anteil des KP-Isomer I im Urin war bei Leberkomplikationen mit $48 \pm 9\%$ (normal $< 31\%$) erhöht; bei Patienten ohne hepatische Beteiligung jedoch mit $32 \pm 4\%$ an der oberen Norm. Der Anteil des KP-Isomer I stieg bei fortschreitender, cholestatischer Leberzirrhose auf über 70% an.

Vor Transplantation wiesen die 3 Patienten mit terminaler Leberinsuffizienz mit $82 \pm 14 \mu\text{mol/l}$ eine extreme PPämie auf, die postoperativ auf 21% des präoperativen Wertes zurückging. KP fiel nach Transplantation auf durchschnittlich 45% des Ausgangswertes bei hohem Isomer I.

Die Sensitivität der pathologischen KPurie mit Anstieg des Isomer I zur Erfassung der hepatischen Komplikation war 95% bei einer Spezifität von 84%. Der prädiktive Wert der KPurie als Indikator einer hepatobiliären Beteiligung bei Patienten mit Protoporphyrinurie war 0,91. Die Erfassung der KPurie mit Isomerenkonstellation ist somit ein geeigneter Parameter zur Frühdiagnose der hepatobiliären Komponente bei der Protoporphyrinurie. Ein progredienter Anstieg von KP und Isomer I $> 60\%$ sowie eine extreme PPämie $> 30 \mu\text{mol/l}$ korrelierten mit einer fortschreitenden Leberschädigung.

HPLC der Koproporphyrin-I/III-Isomeren bei hepatischen Porphyrinopathien

Ina Sieg, Ute Kersten und M. O. Doss

Abteilung für Klinische Biochemie im Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

Die Porphyrin-Isomerenbestimmung in Urin und Stuhl ist unter klinisch-differentialdiagnostischen Gesichtspunkten bei verschiedenen Porphyrinstoffwechselstörungen eine wichtige komplementäre und unter speziellen Aspekten essentielle diagnostische Maßnahme. Von den Koproporphyrin-(KP-)Isomeren I-IV sind für die Diagnostik bislang nur die Isomere I und III relevant (1). Deren Trennung erfolgte hier mit Hilfe der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) an Octylsilan-Umkehrphasen. Als Fließmittel diente ein dreistufiger linearer Gradient aus Ammoniumacetat/Acetonitril und Methanol, die Detektion er-

folgte über UV-Absorption bei 405 nm (2). Eine Probenvorbehandlung (Adsorption an Octadecylsilan-Kartuschen) wurde durchgeführt, um einerseits die zu analysierenden Porphyrine anzureichern und andererseits störende Gallenpigmente soweit als möglich vorab zu eliminieren.

Isomerenverschiebungen werden bei Porphyrinurie wie bei sekundären Porphyrinopathien beobachtet (KP-Normalwerte im Urin: 69–83% Isomer III, 17–31% Isomer I; im Stuhl: 25–40% Isomer III, 60–75% Isomer I) (3). Von den primären Porphyrinstoffwechselstörungen führt die seltene kongenitale erythropoetische Porphyrinurie zur stärksten Isomerenverschiebung (KP-I-Anteil $> 80\%$). Auch die erythrohepatische Protoporphyrinurie geht bei Leberschädigung mit einer deutlichen KP-I-Vermehrung einher. Bei der chronischen hepatischen Porphyrinurie erreicht der KP-III-Anteil erst im voll ausgeprägten Stadium (Porphyria cutanea tarda) pathologisch erniedrigte Werte; die augenfälligste Isomerenverschiebung betrifft hier allerdings das stark vermehrte Heptacarboxy-porphyrin mit nahezu 100% Isomer III. Für die akute intermittierende Porphyrinurie ist ein erhöhter oder im oberen Normalbereich liegender KP-III-Anteil charakteristisch. Eine deutlich gesteigerte KP-III-Exkretion findet sich bei Porphyria variegata, hereditärer Koproporphyrinurie und akuter Bleiintoxikation. Mit der KP-Isomerenanalytik im Stuhl konnte der elterliche Genträger eines an hereditärer Koproporphyrinurie erkrankten Kindes erkannt werden, obwohl sich dieser in der klinischen Latenzphase mit nur geringgradigen metabolischen Veränderungen befand.

Von hereditären Porphyrinurie abzugrenzende sekundäre KPurien mit einer Isomerenverschiebung zum KP I kommen am häufigsten durch cholestatische Prozesse aller Art zustande. Auch bei hereditären Hyperbilirubinämien (Morbus Gilbert-Meulengracht, Dubin-Johnson-Syndrom, Rotor-Syndrom) werden erhebliche, differentialdiagnostisch relevante Isomereninversionen verschiedenen Grades beobachtet (4).

Schrifttum:

1. DOSS, M., SCHERMULY, E.: Urinary porphyrin excretion pattern and isomer distribution of I and III in human porphyrin disorders. In: DOSS, M. (ed.): Porphyrins in human diseases, Karger, Basel 189–204 (1976).
2. HÄBERLEIN, H., DOSS, M. O.: Bestimmung von Urin- und Stuhlporphyrinen bei hepatischen Porphyrinurie mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie. *Ärztl. Lab.* 35, 60–65 (1989).
3. DOSS, M. O.: Hepatic porphyrias: pathobiochemical, diagnostic, and therapeutic implications. In: POPPER, H., SCHAFFNER, F. (eds.): Progress in liver diseases, Grune & Stratton, New York, 573–597 (1982).
4. FRANK, M., DOSS, M. O.: Relevance of urinary coproporphyrin isomers in hereditary hyperbilirubinemias. *Clin. Biochem.* 22, 221–222 (1989).

Chronische hepatische Porphyrinurie (Porphyria cutanea tarda): Porphyrinurie und leberorientierte Parameter unter Therapiekontrolle

Erich Köstler

Hautklinik des Krankenhauses Dresden-Friedrichstadt

Die Porphyria cutanea tarda (PCT) als klinische Manifestation einer chronischen hepatischen Porphyrinurie beruht auf einer verminderten Aktivität der Uroporphyrinogen-Decarboxylase in der Leber. Eine genetische Basis muß mehrheitlich angenommen werden oder als gesichert gelten. Unter dieser Prämisse ist jede Therapie der PCT als symptomatisch anzusehen, eine hohe Rezidivquote ist zu erwarten.

Langzeitbeobachtungen des Verlaufs der PCT unter und nach Chloroquinphosphattherapie sowie Untersuchungen zu den Zusammenhängen zwischen Leberschadensbild und Porphyrinopathie sind bisher nicht umfassend bekannt geworden.

100 PCT-Patienten wurden wenigstens 1 Jahr lang mit 2 x wöchentlich 250 mg Chloroquinphosphat (CQ) behandelt. Prätherapeutisch war mindestens eines (zumeist aber mehrere) der die Leberzellintegrität bzw. Cholestase charakterisierenden Enzyme ASAT, ALAT, δ -GT, AAP im pathologischen Bereich. Unmittelbar nach Therapiebeginn stiegen die (bereits stark erhöhten) Urinporphyrine auf das Doppelte an, ein paralleles Verhalten zeigten

die ASAT und ALAT, nicht aber die δ -GT. Nach sechsmonatiger Therapie war der Urinporphyrin Gehalt annähernd im Normbereich, eine Konversion des Uroporphyrin-/Koproporphyrin-Quotienten in den physiologischen Bereich < 1 trat ebenfalls vor Jahresfrist ein. Ein Abfall der leberorientierten Enzyme war nach etwa 10wöchiger Therapie zu beobachten, innerhalb eines Jahres wurden mehrheitlich die Normwerte erreicht. 65 von 90 nach einjähriger CQ-Therapie erneut hepatohistologisch Kontrollierten wiesen einen Rückgang des Leberschadensbildes auf.

Von 88 Patienten, die in einem Zeitraum zwischen 6 Monaten und 7 Jahren posttherapeutisch untersucht wurden, entwickelten 51 eine erneute deutliche Porphyrinopathie mit dem Überwiegen des Uroporphyrins, 13 davon ein klinisches Rezidiv. Nur 6 der übrigen 37 Patienten hatten zeitweilig ein völlig unauffälliges Ausscheidungsmuster, so daß letztlich Hinweise auf eine permanente Störung des Porphyrinstoffwechsels bei allen Patienten bestanden. Zu einem erneuten Anstieg der leberorientierten Parameter und einer Zunahme der Pathomorphie der Leber kam es aber erst bei stärkerer Alteration des Porphyrinstoffwechsels, so daß eine Verschlechterung des Leberschadensbildes nicht als Voraussetzung (sondern zumindest teilweise als Folge) der Porphyrinstoffwechselstörung angenommen werden kann.

S 1

HPLC of Porphyrins

C. K. Lim

MRC Clinical Research Centre, U. K.

The development of HPLC has greatly improved the efficiency of porphyrin separation, making identification and quantitation much more exact. The porphyrins may be separated by adsorption chromatography as methyl esters or as free acids by reversed-phase or reversed-phase ion-pair chromatography, although partition and ion-exchange systems have also been described. Reversed-phase systems are much more reproducible and efficient. A linear gradient elution system with 1M-ammonium acetate buffer, pH 5.16, and acetonitrile-methanol as the gradient mixture simultaneously separated porphyrins with from two to eight carboxylic groups, including the resolution of the type I and type III isomers. Either a C_1 or C_{18} -bonded silica column can be used. The separation has been applied to the analysis of porphyrins in blood, urine and faeces to provide characteristic porphyrin excretion patterns in the diagnosis of the porphyria. The separation has also led to the development of relatively simple assays for the haem biosynthetic enzymes. A comparison of C_{18} -silica, base-deactivated C_{18} -silica and polymer-based C_{18} for the separation of porphyrins will be given.

S 1

Klinische Biochemie der Porphyrinen

Manfred O. Doss

Abteilung für Klinische Biochemie im Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg, Deutschhausstraße 17 1/2, D-3550 Marburg

Der Begriff Porphyrie umfaßt eine heterogene Gruppe von Stoffwechselkrankheiten, die vorwiegend hereditär bedingt oder bei genetischer Disposition durch „geneenvironment interaction“ klinisch manifest werden. Molekulare Ursache einer Porphyrie ist die Störung eines Enzyms in der Hämbiosynthesekette, aus deren Folgereaktionen sich die klinische Expression entwickelt.

Generell wird zwischen erythroetischen und hepatischen Porphyrinen unterschieden (Tab. 1). Aus klinischer Sicht ist eine Differenzierung zwischen potentiell akuten und nichtakuten Formen wichtig. Abdominal-neurologisch-kardiovaskuläre Symptome prägen die Krankheitsbilder bei den intermittierend auftretenden akuten hepatischen Porphyrinen und cutane Symptome bei den nichtakuten, erythroetischen und chronischen hepatischen Porphyrinen, unter denen die Porphyria cutanea tarda an erster Stelle steht. Eine Symptomkombination ist bei der Porphyria variegata und der hereditären Koproporphyrinurie möglich. Bei der erythroetischen Protoporphyrinurie sind auch hepatobiliäre Verlaufsformen nicht selten. Die akute Bleiintoxikation ist eine toxische hepatische Porphyrie mit einer sich im chronischen Verlauf zunehmend ausprägenden erythroetischen Komponente. Porphyrinen kommen in latenten (subklinischen) und manifesten (klinischen) Phasen vor, die wechselseitig ineinander übergehen können. Latenzphasen überwiegen; ihre Diagnostik erfolgt pathobiochemisch.

Tab. 1: Differenzierung der Porphyrinen und sekundären Porphyrinstoffwechselstörungen

1. Erythroetische Porphyrinen
1.1 Kongenitale erythroetische Porphyrinurie (autosomal rezessiv)
1.2 Erythroetische (-hepatische) Protoporphyrinurie (autosomal dominant)
2. Hepatische Porphyrinen
2.1 Akute hepatische Porphyrinurie
2.1.1 Porphobilinogen-Synthasedefekt-Porphyrinurie (autosomal rezessiv)*
2.1.2 Akute intermittierende Porphyrie (autosomal dominant)
2.1.3 Hereditäre Koproporphyrinurie (autosomal dominant)
2.1.4 Porphyria variegata (autosomal dominant)
2.2 Chronische hepatische Porphyrinurie (nichtakute Formen)
2.2.1 Porphyria cutanea tarda (autosomal dominant oder toxisch)
2.2.2 Hepatoerythroetische Porphyrie (homozygote PCT)
3. Bleiintoxikation (akute toxische hepatische und chronische erythrohepatische Porphyrie, toxogenetisch bei Heterozygoten mit Porphobilinogen-Synthasedefekt)
4. Sekundäre (asymptomatische) Porphyrinstoffwechselstörungen (erworben)
4.1 Sekundäre Koproporphyrinurien
4.2 Sekundäre Protoporphyrinämien

* Synonym: δ -Aminolävulinat-Synthase-Defekt

Ausschließlich bei den genuinen Porphyrinen läßt sich die klinische Symptomatik aus den pathophysiologischen Folgen der Porphyrinstoffwechselstörung erklären, nicht hingegen bei den relativ häufig auftretenden sekundären, klinisch asymptomatischen Porphyrinopathien. Bei diesen ist die Porphyrinurie, im Gegensatz zu den hepatischen Porphyrinen, metabolisches Symptom einer Grundkrankheit. Dieser sekundären hepatischen Koproporphyrinurie kommt ein eigenständiger und klinischer Krankheitswert nicht zu. Die Differenzierung der hepatischen Porphyrinen in ihre verschiedenen Formen und enzymologischen Typen, ihre Erkennung im Verlaufe der Latenzphasen und insbesondere ihre Abgrenzung von sekundären Koproporphyrinurien erfordert eine komplexe pathobiochemische Untersuchung unter Einbeziehung von Anamnese und klinischer Befunde. Die Grenzlinie zwischen primären und sekundären Porphyrinopathien kann bei komplexen Krankheitsverläufen nicht immer scharf gezogen werden; hingegen ist die Frage nach der klinischen Auswirkung der Porphyrinstoffwechselveränderung beantwortbar.

Die pathologischen Veränderungen der Hämbiosynthese vollziehen sich zwischen Störung und Krankheit. Die akute Porphyrie ist eine unterdiagnostizierte Krankheit. Die klinischen Manifestationen einer Porphyrie sind gewissermaßen nur die Spitze des Eisbergs. Bei vielen Anlageträgern wird die Anlage nicht klinisch manifest, sondern befindet sich in einer subklinischen, latenten Phase. Über die Manifestation einer akuten oder chronischen hepatischen Porphyrie entscheidet die Porphyrinbiosynthese im Gewebe, wobei für die Exazerbation der akuten hepatischen Porphyrinurie die Porphyrinvorläufersynthese entscheidend ist.

An der Hämbiosynthese sind, beginnend mit der δ -Aminolävulinat-Synthase, acht Enzyme beteiligt. Genetisch bedingte Verminderungen bei sieben Enzymen (Porphobilinogen-Synthase bzw. δ -Aminolävulinat-Synthase, Porphobilinogen-Desaminase bzw. Uroporphyrinogen-III-Synthase, Uroporphyrinogen-

gen-Cosynthase bzw. Uroporphyrinogen-III-Synthase, Uroporphyrinogen-Decarboxylase, Koproporphyrinogen-Oxidase, Protoporphyrinogen-Oxidase und Ferrochelatase) korrespondieren mit pathogenetisch-spezifischen Typen von Porphyrinen (Tab. 1). Jeder Typ entwickelt ein diagnostisch-spezifisches metabolisches Syndrom.

Schrifttum:

1. DOSS, M.: Krankheiten und Störungen der Porphyrin- und Häm synthese. In: Gross, R., Schölmacher, P., Gerok, W. (Eds.): Lehrbuch der Inneren Medizin. Schattauer Verlag, Stuttgart, 849-862 (1987).

S 2

Leistungskriterien labordiagnostischer Verfahren

Herbert Keller

Institut für Klinische Chemie der Universität Zürich

Verfahren des ärztlichen Laboratoriums werden einerseits nach ihrer analytischen Leistungsfähigkeit, andererseits nach ihrem Wert bei der Beantwortung ärztlicher Fragestellungen, ihrer „Validität“, beurteilt. Zwischen beiden Aspekten bestehen wichtige Interdependenzen.

Experimentell zu ermittelnde analytische Charakteristika sind Richtigkeit und Präzision, Spezifität und Interferenzanfälligkeit. Schwierigkeiten ergeben sich dabei z. B. bei der Definition der Richtigkeit, wenn kein Konsens über den zugehörigen Bezugsstandard besteht; oder semantische Probleme bei der Spezifität, wenn der Determinand als Methodenbezeichnung gewählt wird, obwohl viele Verfahren nur eine Eigenschaft oder nur ein Epitop des Determinanden-Moleküls zu erfassen vermögen. Bei der Festlegung der Präzision wird vielfach übersehen, daß sie stets von der Konzentration des Analyt abhängig ist, eine Beziehung die mit der „Varianzfunktion“ beschrieben werden kann. Sie erlaubt, ein Präzisionsprofil darzustellen und die Nachweisgrenze zu berechnen.

Die diagnostische Validität wird von der diagnostischen Sensitivität und Spezifität bestimmt. Beide Größen sind bedingte Wahrscheinlichkeiten, aus denen sich mittels des Bayes Theorems die prädiktiven Werte eines positiven/negativen Resultats errechnen lassen. Dafür ist zusätzlich noch die Kenntnis der Prävalenz erforderlich. Dieser epidemiologische Begriff muß für Individualdiagnosen modifiziert werden: sinnvoll ist nicht die Prävalenz in der Gesamtbevölkerung, sondern die Inzidenz in der gegebenen Situation, also etwa in der Praxis des untersuchenden Arztes. Deshalb ist die Berechnung individueller prädiktiver Werte meist nutzlos, während bei epidemiologischen Studien damit die Grenzen möglicher Erkenntnis anschaulich gemacht werden können. Sensitivität und Spezifität hängen bei binären Tests (ja/nein) ebenso wie bei Tests mit variabler Resultatskala vom „cut-off-Wert“ ab, der die Prüfkollektive trennt. Allein die ärztliche Fragestellung bestimmt seine Lage, keinesfalls aber statistische Optimierungskriterien.

Die analytische Zuverlässigkeit begrenzt auch die Kennzahlen der diagnostischen Validität. Dadurch wird die Problematik noch weniger einsichtig, und dies dürfte der Grund dafür sein, warum die theoretisch und praktisch so wichtigen Leistungskriterien unserer Verfahren in der Praxis so oft ungenügend und/oder unrichtig definiert werden.

S 3

Bewertung des automatisierten Mikrobiologischen Analysensystems Vitek AMS/IMS

Ch. Neuwald, D. Wolf, E. M. Kittl, E. Machacek und K. Bauer
Zentrallabor und Pathologisch-Bakteriologisches Institut
Kaiser Franz Josef Spital, A-1100 Wien, Österreich

Die Vorteile des Einsatzes eines kommerziell verfügbaren mechanisierten, rechnerunterstützten Analysensystems zur Keimidenti-

fizierung und Resistenzprüfung im mikrobiologischen Labor eines Großkrankenhauses sollte geprüft werden (1).

Im besonderen interessierten die Problemstellungen: Einsparung von Personal bei Routinearbeiten, rasche Verfügbarkeit der Ergebnisse, Minimierung der Kosten, Dokumentation der Ergebnisse und Aufbereitung für epidemiologische Fragestellungen, mikrobiologisches Arbeiten unter standardisierten Bedingungen und Minimierung des Infektionsrisikos im Labor. Um den Zeitbedarf und den Personalbedarf gegenüber dem herkömmlichen manuellen Arbeitsplatz abschätzen zu können, wurde eine Zeitstudie nach den Richtlinien der Arbeitsgruppe für Analysenzeitermittlung der Deutschen und Österreichischen Gesellschaft für klinische Chemie durchgeführt (2). Dabei ergab sich, daß in Abhängigkeit von der Keimart die Analysenergebnisse weitaus rascher vorlagen, es jedoch zu keiner Personaleinsparung bei Verwendung des mechanisierten Analysensystems kam. Ein zusätzlich durchgeführter Vergleich der Keimidentifikation für aerobe gramnegative, fermentierende und nichtfermentierende Bakterien am Vitek AMS/IMS und dem manuellen Arbeitsplatz ergab eine ausgezeichnete Übereinstimmung von 98,7%.

Schrifttum:

1. HASYN, J. J., CUNDY, K. R., DIETZ, C. C., WONG, W.: Clinical Laboratory Evaluation of the Auto Microbic System for Rapid Identification of Enterobacteriaceae. J. Clin. Microbiol. 3, 491-497 (1981).
2. HAECKEL, R., FISCHER, G., FISCHER, M., GERGELY, T., GIBITZ, H. J., OSBURG, K., WEIDEMANN, G.: Vorschläge zur Definition von Zeitbegriffen. Mit. Dt. Ges. Klin. Chemie 15, 187-192 (1984).

S 3

Bewertung von vollmechanisierten Hämatologie-Meßsystemen

Ch. Neuwald, R. Wejborra und H. Wiener
Zentrallaborium des Kaiser Franz Josef Spitals und Zentral-
laboratorium des Wilhelminenspitals, A-1100 Wien, Österreich

Die Entwicklung neuer Meßtechnologien in der Hämatologie lassen die Organisation der Befunderstellung im hämatologischen Labor neu überdenken. Die Durchführung von Volumsverteilungskurven für rotes Blutbild und Blutplättchen einerseits, besonders aber der Einsatz apparativer Methoden zur Blutbilddifferenzierung können zu einer wesentlichen Arbeitserleichterung und bei gezieltem Einsatz auch zu einer Qualitätsverbesserung führen. Diese Meßtechniken sind zwar keineswegs imstande, das manuell erstellte Differential-Blutbild zu ersetzen, jedoch kann der Einsatz dieser Verfahren als „Vorscreening“ die Zahl der mikroskopischen Beurteilungen wesentlich verringern.

Die vergleichende Bewertung von Hämatologie-Analysatoren mit und ohne automatische Probenzuführung sowie der Vergleich der üblichen visuellen Blutaussstrichbeurteilung mit Verfahren auf zytochemischer bzw. optischer Basis und kombinierter trimodalen Histogrammen wurde von uns versucht. Wir bedienten uns dazu des Systems der Arbeitsgruppe für Analysenzeitermittlung, das über Erhebung von Analysenzeiten und Personalkennzahlen objektive Kriterien für Wirtschaftlichkeitsprüfungen liefert.

Der gezielte Einsatz neuer Meßtechnologien in der Hämatologie kann zu einer wesentlich rascheren und kostengünstigeren Befunderstellung führen und durch das Herausfiltern von suspekten Proben und deren gesonderter Abklärung die medizinische Validität des hämatologischen Befundes beträchtlich steigern.

Schrifttum:

1. GRISWOLD, D. J., CHAMPAGNE, V. D.: Evaluation of the Coulter S-Plus IV Three-Part Differential in an Acute Care Hospital. J. Clin. Path. 38, 49-57 (1985).
2. PUM, R., FISCHER, G., MÜHL, M., WEJBORRA, R., BAYER, P. M.: Rationalisierende Maßnahmen im hämatologischen Routinelaboratorium III: Der Einsatz eines neuen Differenziergerätes (Coulter VCR). Österr. Krh.-Ztg. 29, 637-643 (1988).

Bewertung des Analysensystems Abbott IMX

Kurt Bauer und Christine Neuwald
Zentrallabor, Kaiser Franz Josef Spital, A-1100 Wien, Österreich

Die Österreichische und die Deutsche Gesellschaft für klinische Chemie haben in einer Arbeitsgruppe Richtlinien für die Analysezeitermittlung erarbeitet (1). Diese Richtlinien erlauben die Messung diverser Zeitkomponenten zur exakten Ermittlung von Analysezeiten an Geräten von unterschiedlichen Mechanisierungsgraden, unabhängig von der Serienlänge.

Das Analysensystem Abbott IMX benutzt ein neues Meßprinzip für die Quantifizierung von Enzym-Immunoassays, mit dessen Hilfe die Analysezeiten im Vergleich zu herkömmlichen Meßprinzipien stark verkürzt werden können. Angesichts des üblicherweise großen Zeitbedarfs für Enzymimmunoassays ist es wichtig, die Zeitersparnis gegenüber einem herkömmlichen System exakt festzustellen und diese Zeitersparnis den eventuell höheren Reagentienkosten gegenüberzustellen.

Die Zeiterhebung ergab, daß das Gerät in der Routine nach ca. 30 Minuten das erste Resultat lieferte, und dann je nach Test in Abständen von 1 bis 2 Minuten das nächste Resultat einer Serie verfügbar war. Der Personaleinsatz betrug ca. 15 % von der Laufzeit des Systems.

Eine Überprüfung von Richtigkeit, Präzision, Kalibrationsstabilität und Probenverschleppung erbrachte durchweg hervorragende Werte (2).

Schrifttum:

1. FISCHER, G., BAYER, P. M., HAJDUSICH, P., HOTSCHKEK, H., FISCHER, M., TREML, C., WOLFERT, H.: Ermittlung praxisnaher Durchsatzraten und des Personalbedarfs von Analysenautomaten in der klinischen Chemie. *Österr. Krh. Ztg.* 28, 399-408 (1987).
2. NEUWALD, C., BAUER, K., KITTL, E.-M., SITTE, S., FISCHER, G.: Evaluierung des Analysensystems Abbott IMX unter besonderer Berücksichtigung der Analysezeitermittlung. *Lab.med.* 14, 73-76 (1990).

Onkogene Papillomviren

Herbert Pfister
Institut für Klinische und Molekulare Virologie,
Friedrich-Alexander Universität, Erlangen

Mehr als 25 Genotypen humanpathogener Papillomviren (HPV) befallen die Haut und Schleimhaut des Anogenitalbereichs und induzieren spitze Kondylome und sogenannte intraepitheliale Neoplasien (IN) unterschiedlichen Schweregrades. Mehrere Typen zeichnen sich durch besondere transformierende Aktivität in vitro und durch häufiges Auftreten in anogenitalen Karzinomen aus (insbesondere HPV 16, 18, 33, 52). Bei Infektionen mit diesen Viren beobachtet man gehäuft eine Progression präkanzeröser Veränderungen, was für ein erhöhtes kanzerogenes Potential spricht. Dies weckte reges Interesse an einer HPV-Diagnostik. Eine Virusisolierung ist nicht möglich, da kein Tier- oder Zellkultursystem für HPV existiert. Die HPV-Serologie hat bisher keine praktische Bedeutung, da die Immunität typischerweise zögerlich und schwach ist und andererseits HPV-spezifische Antikörper auch bei fehlenden Symptomen aufgrund zurückliegender Infektionen häufig sind. Erste Hinweise auf eine Korrelation zwischen dem Vorliegen eines Cervix-Karzinoms und der Häufigkeit von Antikörpern gegen frühe virale Proteine bedürfen der weiteren Abklärung. Viruspartikel können elektronenoptisch und virale Strukturproteine immunhistochemisch mit Hilfe eines genusspezifischen Antiserums in Biopsien nachgewiesen werden. Ein positiver Befund spricht dafür, daß die fragile Läsion infektiös ist, ein negatives Ergebnis schließt eine HPV-Infektion insbesondere bei nichtproduktiven, fortgeschrittenen IN keineswegs aus. Die beste Methode zum HPV-Nachweis ist die Nukleinsäure-Hybridisierung. Hierfür stehen heute mehrere kommerziell erhältliche Tests auf die Typen 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35 und 51 über Filterhybridisierung und In-situ-Hybridisierung zur Verfügung.

Den empfindlichsten Test auf HPV-DNA stellt die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dar, die mit Typ- und genusspezifischen Reagenzien durchgeführt werden kann. Ein negativer HPV-DNA-Befund mit den verfügbaren Sonden schließt wiederum eine HPV-Infektion nicht aus. Die Spezifität des HPV-DNA-Nachweises bezüglich eines Krankheitsgeschehens wird durch die hohe, klinisch inapparente Durchseuchung der Bevölkerung eingeschränkt. Eine virologische HPV-Diagnostik erscheint gegenwärtig sinnvoll zur Differentialdiagnose unklarer Läsionen und für eine vorsichtige prognostische Bewertung eines definierten Krankheitsbildes.

Probleme der Qualitätssicherung in der HIV-Diagnostik

K.-O. Habermehl
Institut für Klinische und Experimentelle Virologie,
Freie Universität Berlin

Die Qualitätssicherung in der HIV-Diagnostik weist besondere Probleme auf. Von Seiten des Virus ist hierfür die hohe genetische Variabilität des Erregers mit Ausbildung verschiedener Typen und zahlreicher Varianten verantwortlich. Hinzu kommt, daß in den konservierten Bereichen des Genoms eine deutliche Homologie zu anderen Retroviren besteht (z. B. HTLV 1 und HTLV 2), was unter bestimmten Bedingungen zu unspezifischen Kreuzreaktionen führen kann.

Erschwert wird diese Problematik durch den Umstand, daß mit der Einführung von Testen der zweiten Generation (gentechnologisch hergestellte Rekombinantproteine) und der dritten Generation (Einsetzen synthetisierter Oligopeptide) zusätzliche Spezifitätsprobleme in bisher unvorhersehbarem Ausmaß auftreten.

Um so mehr die eingesetzten Diagnostikteste auf die Erkennung weniger Epitope eingeschränkt werden, desto eher besteht die Möglichkeit, daß bei der hohen genetischen Variabilität des Virus trotz der Auswahl hochkonservierter Epitope Fehlbestimmungen erfolgen.

Hinzu kommen die unterschiedlichen Zulassungskriterien für Tests in den USA und in der Bundesrepublik Deutschland sowie in anderen Ländern. Hier ist das Qualitätskriterium bezüglich Sensitivität und Spezifität unter Umständen ein entscheidender Faktor für die Qualität der Untersuchungsmethode.

Aus diesen Gründen sind sowohl für die externe und interne Qualitätskontrolle als auch für die Zulassungskriterien besonders ausgewählte Antigen- und Antikörperpräparationen erforderlich, die nach Möglichkeit alle oben angeführten Kriterien erfassen sollten.

Es wird eine Reihe von praktischen Beispielen angeführt.

Ringversuche in der Virusimmunologie in Deutschland seit 1988 (Röteln, HIV, Hepatitis A und Hepatitis B)

H. Zeichhardt und K.-O. Habermehl
Institut für Klinische und Experimentelle Virologie,
Freie Universität Berlin, Hindenburgdamm 27, 1000 Berlin 45

Seit November 1988 sind im Institut für Klinische und Experimentelle Virologie der Freien Universität Berlin fünf Ringversuche zur Sicherung der externen Qualitätskontrolle vorbereitet und etabliert worden. Die Ringversuche werden im Auftrag der Bundesärztekammer durchgeführt. Die Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) und die Deutsche Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) sind federführend für die wissenschaftlichen Grundlagen und die techni-

Ringversuche in der Virusimmunologie seit 1988

	HIV 1	Röteln	Hepatitis A	Hepatitis B I	Hepatitis B II
Tests	Anti-HIV 1	Anti-Röteln Anti-Röteln-IgM	Anti-HAV Anti-HAV-IgM	HBsAG Anti-HBs	HBeAG Anti-HBe Anti-HBc Anti-HBc-IgM
Nov. 1988					
Teilnehmer	82	122	n. d.	n. d.	n. d.
(Proben)	(3)	(2)			
Proben/ Ringvers.	246	244			
April, 1989					
Teilnehmer	135	156	132	205	155
(Proben)	(2)	(2)	(2)	(4)	(8)
Proben/ Ringvers.	270	312	264	820	1 240
Okt. 1989					
Teilnehmer	165	n. d.	135	195	n. d.
(Proben)	(2)		(4)	(4)	
Proben/ Ringvers.	330		540	780	
Mai 1990					
Teilnehmer	201	152	150	231	174
(Proben)	(2)	(2)	(4)	(4)	(8)
Proben/ Ringvers.	402	304	600	924	1 392
Okt. 1990					
Teilnehmer	207	176	160	262	210
(Proben)	(2)	(2)	(4)	(4)	(8)
Proben/ Ringvers.	414	352	640	1 048	1 680
Proben total	1662	1 212	2 044	3 572	4 312 Σ 12 802

sche Durchführung. Das Institut für Standardisierung und Dokumentation im Medizinischen Laboratorium (INSTAND) übernimmt die Probenversendung und Aufgaben zur statistischen Ergebnisauswertung. Nahezu 13 000 Proben sind bislang in Ringversuchen zur Serologie von HIV 1, Röteln, Hepatitis A und Hepatitis B getestet worden. Die Erfolgsquoten lagen in der Mehrzahl der Tests zwischen 90 und 100%. Seit Mai 1990 nehmen auch Laboratorien aus Ostdeutschland an den Ringversuchen teil: Die Ringversuche deckten Probleme bei der Anti-Röteln-IgM-Diagnostik sowie einigen Such- und Bestätigungstests in der Anti-HIV 1-Diagnostik auf. Ab Mai wird das Versuchsprogramm auf HIV 2, Hepatitis C und Hepatitis D erweitert.

Zukünftig wird angestrebt: 1. alle virologisch-diagnostischen Laboratorien in Deutschland in zwei- bis dreimal pro Jahr stattfindenden Ringversuchsprogrammen zur externen Qualitätskontrolle in der Virusdiagnostik (Serologie und Erregernachweis) einzubeziehen; 2. Richtlinien für die externe Qualitätskontrolle zu erarbeiten und 3. die externe Qualitätskontrolle und die interne Qualitätssicherung für die Reagenzien der verschiedenen Testhersteller in Kooperation mit dem Bundesamt für Sera und Impfstoffe (Paul-Ehrlich-Institut) abzustimmen.

S 5

Rundversuche auf dem Gebiet der Virologie in Österreich

H. Hofmann
Institut für Virologie der Universität Wien

In Österreich werden Rundversuche in der Virusdiagnostik mit Röteln, Hepatitis B und HIV durchgeführt. Die Teilnahme am Röteln-Rundversuch ist freiwillig, ein schlechtes Abschneiden hat keine Konsequenzen und dient daher nur zur eigenen Kontrolle

268 Lab.med. 15: 268 (1991)

des Labors. Seit 1983 wurden 15 derartige Versuche organisiert, wobei die Teilnehmerzahl zwischen 15 und 27 schwankte. In den letzten Jahren zeigte sich ein erfreulicher Trend: die Ergebnisse wurden zunehmend besser, vor allem wird kaum noch fälschlicherweise Immunität bestätigt.

Auch die Teilnahme an den Hepatitis-B-Rundversuchen, die seit 1984 einmal jährlich durchgeführt werden, ist völlig freiwillig. Hier hat sich seit dem ersten Versuch die Zahl der Teilnehmer verdoppelt. Leider aber ist die Fehlerquote annähernd konstant geblieben.

Sehr straff ist die HIV-Diagnostik in Österreich organisiert. Nur wer den HIV-Rundversuch fehlerfrei absolviert hat, kommt auf die vom Gesundheitsministerium herausgegebene Liste der empfohlenen Laboratorien. (Nur diese sollten von der Industrie mit Testen beliefert werden.) Dementsprechend groß ist die Zahl der Teilnehmer (sie ist rund viermal so hoch wie jene des Röteln-Rundversuches). Trotzdem sind die Ergebnisse sehr gut. In den letzten Jahren haben kaum noch Laboratorien zwei oder mehr Fehlresultate bei neun Testseren. Diese sind individuell codiert, so daß ein Abstimmen der Ergebnisse unter den Teilnehmern unmöglich ist.

S 6

Tumormarker im HNO-Bereich und Respirationstrakt

Petra Stieber und A. Fateh-Moghadam

HNO-Karzinome Da es sich bei den malignen Tumoren im HNO-Bereich trotz der zahllosen Lokalisationsvarianten fast ausschließlich um Plattenepithelkarzinome handelt, war die Einführung des squamous cell carcinoma Antigens SCC von großer Bedeutung. Benigne Erkrankungen (insbesondere der Leber) sowie Rauchen verursachen häufig falsch positive Befunde des karzinoembryonalen Antigens CEA, wohingegen SCC eine hohe Spezifität gegenüber diesen Störgrößen aufweist. In Anbetracht der hohen Inzidenz von Nikotin- und Alkoholabusus bei Patienten mit insbesondere Larynxkarzinomen ist dieser Tatbestand sehr wichtig.

Die Sensitivität des SCC-Antigens zeigt zum Zeitpunkt der Primärdiagnose eine gute Korrelation mit der Tumorgroße: T1: 12%, T4: 90%! Deutlicher ist der Stellenwert von SCC in der Rezidiverkennung eines Karzinoms im HNO-Bereich, hier beträgt die Sensitivität mit einer lead time (Zeitraum von dem ersten signifikanten Tumormarkeranstieg bis zur Manifestation klinischer Symptome) von 3 bis 6 Monaten bis zu 70%.

Nach bisherigen Kenntnissen ist die kombinierte Bestimmung von SCC und CEA empfehlenswert, da sich diese beiden Parameter komplementär verhalten und eine Steigerung der Sensitivität in der Rezidivdiagnostik auf 92% erbringen.

Bronchial-Karzinome

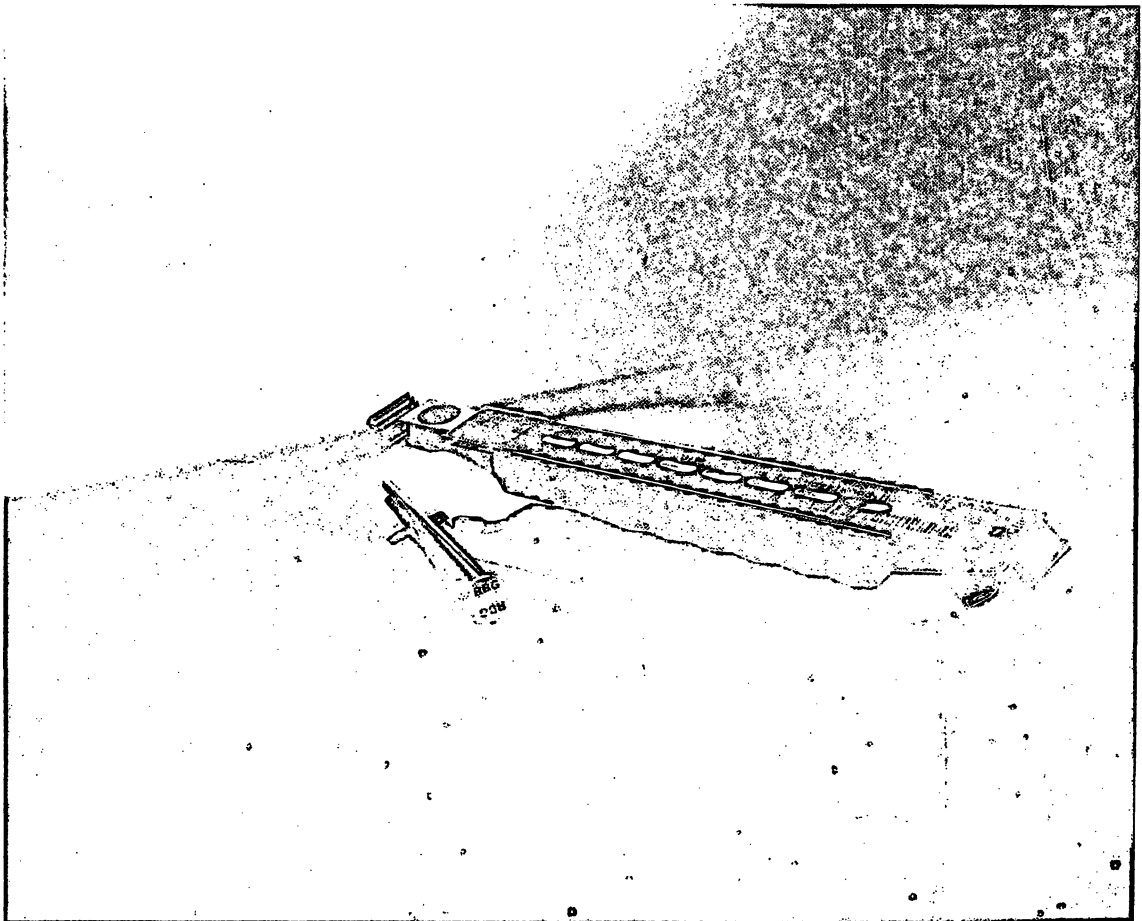
Zur sinnvollen Therapieplanung- und Überwachung des Bronchialkarzinoms, das sich je nach Histologie durch eine hohe Wachstumsgeschwindigkeit sowie frühe Metastasierungseigenschaft auszeichnet, ist eine möglichst frühzeitige histologische Sicherung und Differenzierung wünschenswert. Da sich 10 bis 30% der Bronchialkarzinome durch ungünstige Lokalisation der Diagnostik mittels Endoskopie und Spülzytologie entziehen, kann der Nachweis entsprechender tumorassoziierter Antigene hilfreich sein.

So empfiehlt sich unseren Ergebnissen zufolge bei unbekannter Histologie zum Zeitpunkt der Primärdiagnose die kombinierte Bestimmung von CEA, SCC und der neuronenspezifischen Enolase NSE, um gegebenenfalls die Differentialdiagnose NSCLC (non small cell lung carcinoma) – SCLC (small cell lung carcinoma) zu ermöglichen. Zur Verlaufskontrolle ist beim kleinzelligen Bronchialkarzinom die Kombination CEA/NSE empfehlenswert, da sich diese beiden Marker unter Therapie diskordant verhalten. (CAVE: NSE kommt in hoher Konzentration in Erythrozyten und Thrombozyten vor – Blut nach Abnahme nicht länger stehen lassen sowie Hämolyse vermeiden!)

VIDAS

DIE INNOVATION IN DER
AUTOMATISIERTEN IMMUNANALYSE
von Antikörpern und Antigenen

- „walk away“ ● „Random access“ ● Ergebnisse binnen 1 bis 2 Stunden



bioMérieux
Deutschland

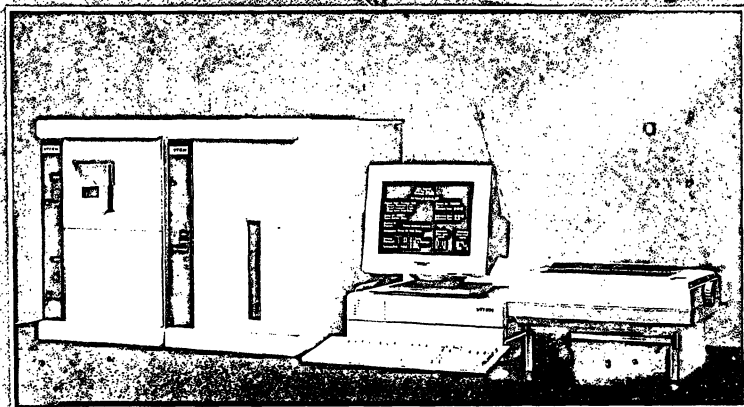
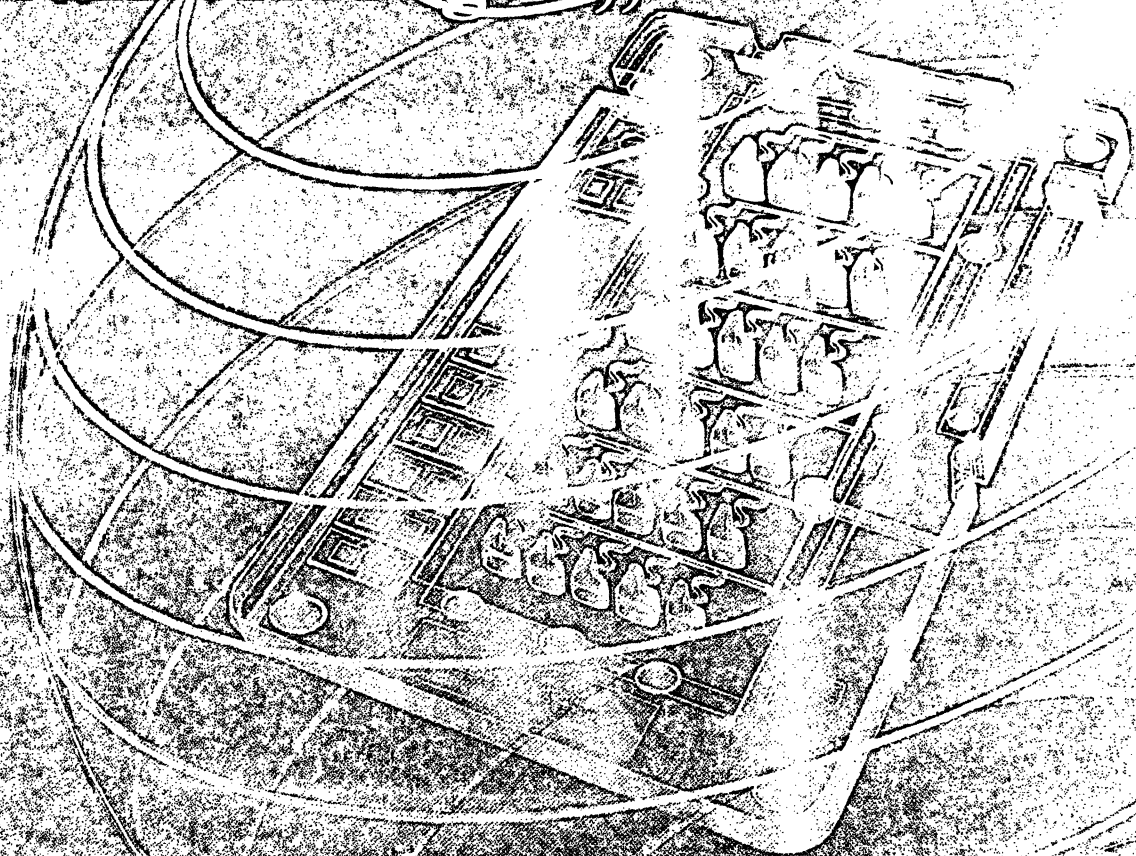
Weberstraße 8 · Postfach 1204
D-7440 Nürtingen
Telefon 0 70 22 / 30 07-0 · Fax 36 110
FS 7 267 414 biom

 bioMérieux **VITEK** 

NEU bei
bioMérieux

VITEK

Bakteriologie „à la carte“



- „walk away“-Konzept
- Identifizierung von grampositiven und gramnegativen Keimen, sowie von Pilzen
- Identifizierung von Urinkulturen direkt aus dem Untersuchungsmaterial
- Resistenzbestimmungen

Histologie	vor Therapie	Verlaufskontrolle
??	NSE, CEA, SCC	postoperativ: je nach Ergebnis der Histologie ohne Operation: je nach Ergebnis der Tumormarker
Adeno	CEA	CEA
Plattenepithel	SCC und/oder CEA	SCC und/oder CEA
kleinzellig	NSE und CEA	NSE und CEA
großzellig	CEA	CEA

Für Adeno- und großzellige Bronchialkarzinome ist die Bestimmung von CEA ausreichend, während bei Plattenepithelkarzinomen zusätzlich die Bestimmung von SCC hilfreich sein kann.

Inwieweit dem neuen tumorassoziierten Antigen CA 72-4 beim Bronchialkarzinom Bedeutung zukommt, wird derzeit bei uns noch untersucht.

S 6

Allgemeine Kriterien zur Bestimmung von Tumormarkern im Labor und Anwendung in der Klinik

R. Lamerz
Med. Klinik II, Klinikum Großhadern, Universität München

Tumormarker (TM) sind meist nur assoziierte Signalsubstanzen des Tumorgeschehens von Protein-, Lipid- und/oder Kohlenhydrat-Charakter, die in oder auf Tumorzellen vorkommen oder in ihrer Umgebung induziert werden. Ein Großteil von ihnen sind als zirkulierende Antigene im Serum oder anderen Körperflüssigkeiten meßbar, wobei ihre Konzentration als Summe aus Tumormarker-Expression, -Synthese, -Freisetzung, -Katabolismus, -Exkretion sowie der Tumorblutversorgung resultiert und in hohem Maße bei der Entstehung, Ausbreitung und therapiebedingtem Tumorverkleinerung korreliert. Ihre Bestimmung ist heute durch hochempfindliche radio- oder enzymimmunologische Tests, Fluoreszenz- oder Luminiszenz-Assays unter Verwendung poly- wie monoklonaler Antikörper möglich. Für die Beurteilung von TM-Verlaufsbestimmungen sind Kenntnisse über Intra- und Inter-Assay-Variation des Tests, über Katabolismus/Ausscheidung des TM und vorübergehende Spiegel-Änderungen durch akute Therapie-Einwirkung oder unspezifische Beeinflussung (humane Antikörper) von Bedeutung, für die Beurteilung der Brauchbarkeit eines TM die Kennwerte Sensitivität, Spezifität, Prävalenz und positiver/negativer prädiktiver Wert. Nach den potentiellen Aufgaben eines TM eignen sich zirkulierende TM nicht zum Screening oder zur Tumorklassifikation, nur bedingt zur Überwachung von Risikogruppen, Stadieneinteilung oder Prognose, im wesentlichen aber in der Nachsorge zur Verlaufskontrolle nach Operation bzw. unter Radio/Chemo-/Hormontherapie, wobei aufgrund ihres Spiegelverhaltens im günstigen Fall mit einer Vorzeitigkeit von 1 bis 6 Monaten vor anderen klinischen Verfahren das Tumorverhalten reflektiert wird: TM-Spiegelabfall innerhalb von 4 bis 6 bis 8 Wochen in Abhängigkeit von der Halbwertszeit des TM als Hinweis auf Tumorentfernung; fehlender TM-Spiegelabfall, -Persistenz oder -Weiteranstieg als Hinweis auf Residualtumor und/oder Metastasierung und TM-Spiegel-Wiederanstieg nach erfolgter Normalisierung als Hinweis auf ein Rezidiv. Die Häufigkeit von TM-Bestimmungen richtet sich nach empfohlenen Nachsorge-Terminen und z. B. nach größeren Therapie-Maßnahmen, Therapiewechsel, erneutem Staging und unklarer Änderung im klinischen Bild.

S 8

Die Standardisierung der Apolipoproteine A-I und B

F. Dati, S. Baudner und M. Lammers
Behringwerke AG, Postfach 1140, W-3550 Marburg

Apolipoprotein A-I, das Hauptprotein der „High Density Lipoproteins“ (HDL) und Apolipoprotein B, das Hauptprotein der „Low Density Lipoproteins“ (LDL) können als wichtige Indikatoren des Risikos kardiovaskulärer Erkrankungen dienen. Das Fehlen einer international gültigen Standardisierung war bisher das wichtigste Hemmnis einer breiten Anwendung der Bestimmung von Apo A-I und Apo B in der Labordiagnostik von Fettstoffwechselstörungen.

Gegenwärtig arbeiten 24 Diagnostika-Hersteller und mehrere internationale Institutionen – insbesondere die Int. Fed. of Clinical Chemistry (IFCC) – an einer praktikablen Standardisierungsprozedur zusammen, um die Harmonisierung der verschiedenen Apo A-I- und Apo B-Bestimmungsmethoden zu erreichen.

Eine gleichartige Kalibrierung aller kommerziell erhältlichen Testsysteme für die quantitative Bestimmung der Apolipoproteine A-I und B wurde unter Verwendung von drei tiefgefrorenen Serumpools, die gegen primäre Referenzmaterialien (reines Apo A-I und eine frisch isolierte LDL-Fraktion) standardisiert worden sind, unter Einhaltung eines einheitlichen Arbeitsprotokolls erzielt.

Die tiefgefrorenen Serumpools werden durch zwei stabile sekundäre Serum-Referenzmaterialien ersetzt, die unter den von Diagnostika-Herstellern angebotenen Präparationen (15 für Apo A-I und II für Apo B) ausgesucht worden sind. Sie werden zur Überprüfung der Validität der vorgenommenen Kalibrierung bzw. zu einer erneuten Standardisierung dienen. Bei diesen Materialien handelt es sich um eine lyophilisierte Referenzpräparation für Apo A-I und um eine flüssige, stabilisierte Referenzpräparation, die auf der Basis genau definierter Kriterien (keine Matrix-Wechselwirkung, optische Klarheit, Verdünnungsechtheit des Materials, nativer Zustand der jeweiligen Apolipoproteine) im Rahmen zweier internationaler Studien ausgewählt worden sind.

Die Ergebnisse dieser Studien belegen mit einer Variation < 6% sowohl für Apo A-I als auch für Apo B unter 27 verschiedenen Testsystemen, daß die Verwendung derselben Referenzmaterialien für die Kalibrierung der kommerziellen Testkits zur Bestimmung der Apolipoproteine A-I und B zu einer Übereinstimmung aller Testergebnisse führen wird.

S 8

Standardisierung der immunchemischen Plasmaprotein-Bestimmung – Stand und Perspektiven –

S. Baudner
Forschungslaboratorien der Behringwerke AG, 3550 Marburg

Human-Plasmaproteine, zum großen Teil in hochgereinigter Form verfügbar und chemisch-physikalisch recht gut charakterisiert, werden wegen ihrer Bedeutung zur Beurteilung von Krankheitszuständen hauptsächlich im Serum/Plasma quantifiziert. Dies geschieht vorwiegend mit Hilfe immunchemischer Meßverfahren. Die Ermittlung von Konzentrationen und Sollwerten ist zum Teil problematisch. Eine Referenzmethode konnte bisher nicht ausgewählt und empfohlen werden. Hingegen stellt die WHO internationale Referenzpräparationen (IRP's) für etwa 20 Human-Plasmaproteine bereit, um eine bessere Kalibrierung von Sollwerten und eine akzeptable Vergleichbarkeit der Resultate von Labor zu Labor weltweit sicherzustellen. Die Bereitstellung solcher IRP's, in denen die Quantitäten ausgewählter Human-Plasmaproteine in International Units (IU) pro Ampulle (Trockengewicht) deklariert sind, hat zu einem wesentlichen Fortschritt der Standardisierung immunchemischer Protein-Bestimmungen

geführt. Dies gilt insbesondere für die radiale Immundiffusion, mit deren Hilfe bevorzugt Umrechnungsfaktoren von IU/ml zu g/l für die im Handel befindlichen Protein-Standard- und Kontroll-Präparate einzelner Hersteller ermittelt wurden.

Nach Einführung moderner Analyseverfahren, wie z. B. der Nephelometrie, Turbidimetrie und des Enzymimmunoassays, wird in einigen Fällen eine Methodenabhängigkeit der Ergebnisse, d. h. eine unzureichende Korrelation, registriert. Die Deklaration der Ergebnisse in IU/ml wird mehr und mehr zugunsten firmeneigener g/l-Quantitäten vernachlässigt, die den Anforderungen methodenunabhängiger Resultate weitaus weniger gerecht werden. Die bei den IRP's beobachteten Probleme werden begründet u. a. durch eine relativ hohe Eigentrübung und durch eine unzureichende Charakterisierung der Protein-Strukturen. Mangelnde Konstanz kann auch durch die lange Laufzeit und den Chargenwechsel von IRP's bedingt sein.

Zum besseren Verständnis einer optimalen Standardisierung werden vier Voraussetzungen für die gewünschte Proportionalität zwischen Meßsignal und Meßwert diskutiert: Identität der physikalisch-chemischen Struktur und damit des immunchemischen Verhaltens von Proteinen in Standard-, Kontroll- und Untersuchungsmaterialien, Chargenkonstanz für antikörperhaltige Reagenzien, Matrix-Effekte und Meßprinzip-Einflüsse eines Immunoassays auf die Antigen-Antikörper-Reaktion.

Auf dieser Basis wird ein Konzept für die Entwicklung optimal geeigneter Protein-Referenz-Materialien vorgestellt. Über neue Aktivitäten nationaler und internationaler Organisationen wird berichtet.

Schrifttum:

1. BAUDNER, S.: Standardisierungsfragen zur immunchemischen Bestimmung von Plasmaproteinen. Behring Inst. Mitt. 86, 67-115 (1990).

S 9

Elektrochemische Sensoren

Sabine Koch, E. Müller und P. Woias

Lehrstuhl für Integrierte Schaltungen, Technische Universität München, Prof. Dr.-Ing. I. Ruge, Arcisstraße 21, 8000 München 2

Mit der ständig wachsenden Vielfalt an chemischen und biochemischen Substanzen, deren Erfassung in den Anwendungsbereichen Gasanalytik, Biotechnologie, Umweltanalytik und medizinische Diagnostik von Interesse ist, gewinnen chemische Sensoren zunehmend an Bedeutung. Ihre Hauptvorteile im Vergleich zu konventionellen Analysensystemen liegen in der kurzen Ansprechzeit, der einfachen Handhabung, der geringen Baugröße und der preisgünstigen Herstellbarkeit. Ein chemischer Sensor besteht im wesentlichen aus einem physikalischen Meßwandler (oder Transducer), der ein in der Regel elektrisches Ausgangssignal liefert, und einer sensitiven Schicht, welche für die Spezifität des Sensors verantwortlich ist.

Der vorliegende Beitrag wird sich mit Sensoren auf der Basis elektrochemischer Transducer beschäftigen. Daneben umfaßt die Gruppe der chemischen Sensoren eine Vielzahl weiterer Transducer, die entsprechend ihres physikalischen Grundprinzips in mechanische bzw. akustische, kalorimetrische und photometrische Sensoren eingeteilt werden.

Elektrochemische Sensoren wandeln die Information über einen chemischen Zustand mittels des Zusammenspiels zwischen Chemie und Elektrizität an der Phasengrenze Elektrode/Elektrolyt in ein elektrisches Ausgangssignal um. Entsprechend der meßtechnischen Auswertung der Vorgänge am Transducer unterscheidet man die folgenden Sensortypen:

1. Potentiometrische Sensoren, z. B. Ionensensitive Elektroden, Ionensensitiver Feldeffekttransistor;
2. amperometrische Sensoren, z. B. Clark-Zelle;
3. konduktometrische Sensoren, z. B. Gassensoren auf der Basis halbleitender Oxide, Interdigitalalkondensatoren.

In Kombination mit verschiedenen chemisch, biochemisch oder biologisch aktiven Komponenten (Ionophore, gassensitive Schichten, Enzyme, Antikörper u. dgl.) kann mit Hilfe elektroche-

mischer Transducer eine Vielzahl für die medizinische Analytik wichtiger Größen qualitativ und quantitativ erfaßt werden:

- Überwachung der Zusammensetzung von Narkosegasen;
- Bestimmung wichtiger Blutgaskonzentrationen, wie pO_2 und pCO_2 ;
- Konzentrationsbestimmung wichtiger Erdalkalitionen wie K^+ und Na^+ im Blut;
- Überwachung des Blutspiegels verschiedener für den Stoffwechsel bedeutsamer Substanzen wie Glucose, Lactat, Harnstoff;
- schnelle und einfache Diagnose viraler Erkrankungen (z. B. HIV-Infektion).

Der vorliegende Beitrag soll einen Überblick über den Entwicklungsstand auf dem Gebiet elektrochemischer Sensoren, vor allem in Hinblick auf ihre Risiken und Vorteile sowie auf die Vielfalt ihrer möglichen Einsatzbereiche in der medizinischen Diagnostik vermitteln.

S 12

Molekularbiologische Diagnostik chromosomaler Translokationen bei malignen hämatopoetischen Systemerkrankungen

G. Dölken

Abt. Hämatologie und Onkologie, Med. Universitätsklinik Freiburg

Bei definierten Entitäten maligner Lymphome und Leukämien konnten konsistente chromosomale Aberrationen nachgewiesen werden, eine Voraussetzung für eine Tumor-spezifische Diagnostik. In den letzten Jahren konnten die beteiligten Gene bei einigen Translokationen identifiziert und sequentiert werden. Dies gilt u. a. für die Philadelphia-Chromosom-(Ph1-)Translokation (t[9;22]), an der die zellulären Protoonkogene BCR und ABL beteiligt sind, sowie die 14;18-Translokation der folliculären Lymphomen, an der das BCL-2-Gen und die J-Regionen des IgH-Locus beteiligt sind. Mit Hilfe der Southern-Blot-Technik können chromosomale Translokationen mit einer Sensitivität von 1 bis 5% Tumorzellen nachgewiesen werden, die *In-vitro*-Amplifikation mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ermöglicht den Nachweis von einer Tumorzelle in $10E5 - 10E6$ normalen Zellen. Bei Patienten mit Ph1+ CML (chronisch myeloischer Leukämie), Ph1+ ALL (akuter lymphatischer Leukämie) und folliculären Lymphomen haben wir die PCR-Methode zum Nachweis hybrider BCR/ABL mRNA bzw. des hybriden BCL-2/J-Fusionsgens im Rahmen der Primärdiagnostik an Tumormaterial, frischen peripheren Blutzellen und pathologischen Gewebsschnitten eingesetzt. Unter entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen gegen akzidentelle Kontamination stellt die PCR-Analyse eine besonders rasche, extrem sensitive Methode dar, die auch an minimalen, z. T. stark degradierten DNA/RNA-Präparationen - wie aus pathologischen Gewebssproben - eine Diagnostik ermöglicht. Nach hochaggressiver Radiochemotherapie gefolgt von autologer bzw. allogener Knochenmarkstransplantation ermöglicht die PCR-Analyse peripherer Blutzellen den Nachweis minimaler residueller Tumorzellen in kompletter klinisch-zytologischer Remission, ferner kann die Elimination von Tumorzellen *in vivo* und bei sog. Purgung-Verfahren im Rahmen der autologen Knochenmarkstransplantation *ex vivo* kontrolliert werden.

S 7

Neue Techniken zum Nachweis und zur Identifizierung irregulärer Immun-Antikörper

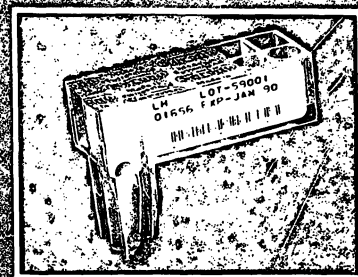
W. Hitzler

Klinisches Labor und Blutbank, Chirurgische Universitätsklinik Heidelberg

Material und Methoden: Die Grundlagen des Gelzentrifugationstests (ID-System) und von drei neueren Festphasen-Antiglobulin-

Diagnostische Transparenz. Das EIA-Testsystem der neuen Generation.

SERO



- Vollständig automatisierter Testablauf.
- Steuerung aller Gerätefunktionen elektronisch optimiert.
- ausgereifte Datenverarbeitung.
- vielfältige Möglichkeiten der Datenausgabe.
- kompaktes Tischformat.

Tests aus den Bereichen:

- Fertilitätsdiagnostik.
- Schwangerschaftsdiagnostik.
- Schilddrüsendiagnostik.
- Stoffwechseldiagnostik.
- Tumor-Therapieüberwachung.

Serono
DIAGNOSTICS

**Erfahrung
schafft
Fortschritt®**

In Deutschland:
Serono Diagnostika GmbH
Merzhauser Str. 80/84
D-7800 Freiburg
Tel. Zentrale (07 31) 40167-0

In Österreich:
Serono Diagnostika GmbH
Informationsbüro Wien
Dienstwegemarkt
A-1170 Wien
Telefon (0220) 306318



Abrechnungssystem für Privat-Patienten

Rechnungsformulare - Multiplikatorentabellen - Leistungslegenden

Das exklusive Komplett-Paket zur GOÄ '88

Teil A Rechnungs- formulare

Das Formblatt A ist das Herzstück des Abrechnungssystems. Ein Rechnungssatz besteht aus drei Blättern DIN A 4 (Original/Duplikat/zum Eigenverbleib bzw. zur Mahnung). Ein Formularsatz reicht für 200 Abrechnungen (= ca. 2 Quartale).

Auf der Vorderseite der Rechnung trägt der Arzt ein:

- Gesamtsumme • Einzelne Diagnosen • Multiplikator für persönliche Leistungen • Multiplikator für technische Leistungen • Multiplikator für Überschreitung der Regelspanne • Begründung der Überschreitung • Veranlassung durch den Patienten • Datum

Zur Absenderangabe verwenden Sie den Praxisstempel. Gegen geringen Mehrpreis übernehmen wir den Eindruck.

Auf der Rückseite der Rechnung trägt der Arzt ein:

- Jeweiliges Behandlungsdatum • Einzelne Leistungsnummer • Einzelbetrag oder Punktwert bei KVB-Beamten • Gesamtsumme oder Gesamtpunktzahl bei KVB-Beamten • Ersatz von Auslagen, wie Medikamente, Verbände.

Die Rückseite ermöglicht bequemes Dokumentieren der Behandlungszeiten und Addieren der einzelnen Leistungsbeträge bzw. Punktwerte bereits während der Sprechstunde nach Art eines "Privatärztlichen Krankenscheines" oder die systematische Erfassung zum Quartalsende.



KIRCHHEIM Kaiserstraße 41, 6500 Mainz

Teil B Multiplika- torentabellen

Ein Satz Multiplikatorentabellen (Formblatt B), abwaschbar (4 Blatt doppelseitig bedruckt), DIN A 4, ausgelegt für alle hausärztlich-relevanten 390 Leistungsnummern mit DM-Endbeträgen vom einfachen bis zum maximal möglichen Gebührensatz, in mehreren Steigerungsschriften bzw. dem jeweils geltenden Multiplikator für KVB I - III, Post B, Studentische Krankenversicherung, dadurch für alle Privatkassen systemischer.

Nur noch einfaches Ablesen des DM-Betrages, keine Eintippfehler mittels Taschenrechner mehr! Nur einmalige Anschaffung erforderlich.

Teil C Leistungs- legenden

Kurzformulierung sämtlicher hausärztlich-relevanter Leistungen (Formblatt C), jeweils 1 Blatt DIN A 4, zweiseitig bedruckt, in einem Formularsatz zu 200 Stück. Muß nach Vorschrift des Gesetzgebers der Privatrechnung beigelegt werden. Erspart mühseliges Eintippen der Leistungslegenden auf die Rechnung.

Bestellcoupon

Komplett-Paket (Erstausrüstung)

Ich bestelle . . . Paket(e) Abrechnungssystem für Privat-Patienten, bestehend aus

- Teil A: 200 Rechnungsformulare, mit je 2 Durchschlägen
- Teil B: 3 Multiplikatorentabellen, wischfest
- Teil C: 200 Leistungslegenden, zweiseitig

mit meinem Adresseneindruck und Bankverbindung auf dem Rechnungsformular zum Gesamtpreis von 158,30 DM

ohne Eindruck, zum Gesamtpreis von 110,30 DM

Einzellieferung (zur Nachbestellung)

Ich bestelle

. . . Rechnungsformulare (Teil A), mit Adresseneindruck, Mindestabnahme 200 Rechnungen 96,00 DM

. . . Rechnungsformulare **ohne** Adresseneindruck, Mindestabnahme 50 Rechnungen 12,00 DM

. . . Multiplikatorentabellen (Teil B), (je 6 Seiten) 7,50 DM je Tabelle

. . . Leistungslegenden (Teil C), zweiseitig, zu je 200 Blatt, 39,80 DM

Bitte Adressenvermerk gesondert angeben

XXXVI

Name/Stempel

Straße

PLZ Ort

Datum

Unterschrift

Lab.med. 4/91

tests (Solidscreen, Capture R und Ready ID werden ausführlich dargestellt und ihre Methodik diskutiert.

Der Gelzentrifugationstest (ID-System) (ID) wurde mit drei Festphasen-Antiglobulintest (Solidscreen [SC], Capture R [CR], Ready ID [RID]) und dem konventionellen Röhrchentest (TT) im Antikörpersuchtest und in der Antikörperidentifizierung untersucht und verglichen. In dieser Studie wurden 131 bekannte Antikörper (AK) eingesetzt: 69 Antikörper im Rhesussystem, 21 coombswirksame Antikörper (IgG-AK), 30 Kälteantikörper (IgM-AK) und 11 kombinierte Antikörper (coombswirksame AK und Kälteantikörper/coombswirksame AK und AK im Rhesussystem/Kälteantikörper und AK im Rhesussystem). Der Antikörpersuchtest/die Antikörperidentifizierung wurde in den Techniken durchgeführt, die vom Testprinzip her möglich waren: ID-System, Röhrchentest: Enzym-, LISS/Coombstechnik, Test für Kälteantikörper; Solidscreen, Capture R, Ready ID: LISS/Coombstechnik. Antikörper, die nur in einer Methode nachgewiesen werden konnten, wurden mit Hilfe der Elutions-/Absorptionstechnik bestätigt.

Ergebnisse:

1. Antikörpersuche und Antikörperidentifizierung:

- 98% aller AK (n = 131) konnten im ID nachgewiesen werden, 83% im TT, 66% im CR, 60% im SC und 58% im RID.
 - AK im Rhesussystem und coombswirksame AK (n = 101): 99% im ID, 82% im TT, 75% im CR, 71% im RID und 68% im SC.
 - Nur coombswirksame AK (n = 21): 95% im ID und TT, 76% im CR, RID und SC.
 - AK im Rhesussystem (n = 69): 100% im ID, 74% im TT und CR, 66% im RID und 65% im SC.
 - Kälteantikörper (n = 30): 93% im ID, 83% im TT, 37% im CR, 33% im SC und 9% im RID.
 - Im ID wurden bis 40% mehr AK gegen Rhesusuntergruppen bei Rh (D) positiv gefunden; zusätzliche AK bei einem nachgewiesenen AK fanden sich häufiger im ID und TT.
- Benötigte Menge von Plasma/Serum pro Phase: ID 25 µl, CR und RID 50 µl, SC 100 µl, TT 100 µl.
 - Reine Arbeitszeit: RID 16–61 min, CR 21–66 min, ID 25 min, TT (22)–37–40 min, SC 80 min.
 - Pipettierschritte pro Phase: ID 3*, RID 3, SC 4 CR 5* und TT 5**.
 - Waschvorgang: ID keinen, TT 1 (3×), RID 1 (4–6×), SC 1 (7–8×), CR 2 (8–12×).
 - Die Interpretation der Testergebnisse ist im ID einfacher und leichter zu dokumentieren als in den anderen Methoden.

Diskussion: Der Gelzentrifugationstest und die Festphasen-Antiglobulintests sind in der Antikörpersuche und -identifizierung von coombswirksamen Antikörpern einsetzbar und vergleichbar mit dem konventionellen Röhrchentest. Allerdings ist die Testinterpretation der Ergebnisse im Gelzentrifugationstest klarer und graduierter als in den Festphasen-Antiglobulintests. Im Gelzentrifugationstest können wie auch im Röhrchentest alle Techniken, z. B. Enzym-, LISS/Coombstechnik und Test für Kälteantikörper, durchgeführt werden. Dies trifft nicht für die Festphasen-Antiglobulintests zu. Der Gelzentrifugationstest hat aufgrund seiner höheren Empfindlichkeit eine eindeutige Überlegenheit im Nachweis von AK im Rhesussystem, vor allem AK gegen Rhesusuntergruppen bei Rh (D) positiv (Leitantikörper Anti-E). Hier stellt sich die Frage, ob künftig nicht Rhesus-verträglich transfundiert werden sollte, vor allem bei Frauen im gebärfähigen Alter und Kindern (Lynen et al. Infusionstherapie 16: 273–275, 1989).

S 8

Plasmaproteinringversuche: Erfahrungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie

D. Niese¹, G. Röhle²

¹ Medizinische Universitätsklinik Bonn, ² Institut für Klinische Biochemie

Die Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie führte seit 1988 vierzehn Ringversuche für elf Plasmaproteine durch, an denen

sich derzeit ca. 500 Laboratorien beteiligen. Die Ergebnisse dieser Ringversuche können wertvolle Hinweise über den aktuellen Stand der Analytik vermitteln, die mit den klassischen Verfahren kaum zu erlangen sind.

75% der Teilnehmer benutzten eine von fünf weit verbreiteten Methoden: a) fixed time Nephelometrie (21%), b) vollkinetische Nephelometrie (18%), c) radiale Immundiffusion (16%), d) Turbidimetrie Selektivanalyser (10%) und e) Turbidimetrie TurbiTime. Das übrige Viertel der Teilnehmer verteilte sich auf insgesamt 20 methodische Unterkollektive mit jeweils 1–4 Teilnehmern. Diese Kleingruppen sind nicht Gegenstand dieser Auswertung. Vorgelegt werden hier Resultate für die Analyte Albumin (A1), C3-Komplement (C3), IgG, IgA, IgM, Transferrin (Trans) und α 1-Antitrypsin (α 1-A). Die Methoden unterscheiden sich z. T. in bezug auf die Spezifität der verwendeten Antikörper (C3, α 1-Antitrypsin), z. T. in bezug auf die zur Kalibration verwendeten Primärstandards (Immunglobuline). Deshalb ist eine Auswertung der Ringversuchsergebnisse anhand methodenunabhängiger Referenzmethodenwerte derzeit nicht möglich. Auch ist die Ermittlung methodenabhängiger Sollwerte kaum praktikabel. Die Ringversuchsauswertung beschränkt sich vielmehr auf die Beschreibung von Lage und Streuung der Werte: für jede Methode werden der Median bzw. 16. und 84. Perzentile angegeben. Bezogen auf den Median aller Methoden ergaben sich aus den bisherigen Ringversuchen für die Mediane der Unterkollektive folgende mittleren relativen Abweichungen in Prozent:

Meth	Alb	C3	IgA	IgG	IgM	Trans	α 1-A
a)	-5,1	37,8	-10,1	-7,4	-17,9	2,9	-24,8
b)	1,2	-4,4	7,1	9,0	6,3	-2,5	7,3
c)	7,9	-8,0	6,3	5,1	13,2	3,3	2,3
d)	5,2	-11,8	-7,5	-4,5	-2,2	-13,2	5,2
e)	8,3	4,3	6,7	-3,4	1,3	1,8	-

Die durchschnittlichen Streuungen (VK) für die sieben Analyte lagen bei den nephelometrischen Methoden (a + b) bei $6 \pm 2\%$, bei der radialen Immundiffusion (c) bei $10 \pm 4\%$ und bei den turbidimetrischen Methoden bei $8 \pm 2\%$. Eine Abhängigkeit der Streuung von der Analytkonzentration war nicht zu beobachten.

S 9

Infrarot-Spektroskopie und ihre potentiellen Möglichkeiten in der Klinischen Chemie

H. M. Heise

Institut für Spektrochemie und angewandte Spektroskopie

Die Einsatzmöglichkeiten der Infrarot-Spektroskopie für die Klinische Chemie sind in den letzten Jahren dank verbesserter Spektrometer und Techniken gewachsen. Prinzipiell sind zwei unterschiedliche Anwendungen für den klinischen Analytiker von Interesse. Dies ist zum einen die diskrete Probenahme von Blut, Gewebe u. a. mit nachfolgender Analyse und zum anderen der Einsatz von On-line-Sensoren, die hauptsächlich extrakorporal für den Arzt wichtige Parameter zu messen erlauben. Für den ersten Anwendungsbereich ist als etablierte Methode die qualitative Harnsteinanalyse zu nennen, die über den Vergleich von Bibliotheksspektren vorgenommen wird. Hier sind kürzlich Entwicklungen zu einer quantitativen Komponentenbestimmung vorgestellt worden.¹⁾ Der Einsatz der FT-IR-Spektroskopie in Kombination mit chromatographischen Methoden zur Untersuchung von Medikamenten, toxischen Substanzen und ihren Metaboliten ist nach entsprechender Probenaufbereitung noch nicht ausgeschöpft, da eine weitere Reduzierung der IR-spektroskopischen Nachweisgrenzen möglich ist.

Einen großen Raum im Routinebetrieb der Klinischen Chemie nimmt die Bestimmung von Bluts substraten wie Glucose u. a. ein. Die Untersuchung biotischer wässriger Proben im mittleren IR wurde hauptsächlich durch die Technik der abgeschwächten Totalreflexion mit leistungsstarken Fourier-Transform-Spektrometern ermöglicht. Durch die Verwendung breitbandiger spek-

traler Informationen kann reagenzlos und zerstörungsfrei bei kleinen Probevolumina von ca. 100 µl eine quantitative Bestimmung durchgeführt werden²⁾, wobei weitere Verbesserungen anzustreben sind, so daß für diesen Anwendungsbereich mit ähnlicher Technik On-line-Sensoren vorstellbar sind. Auch der Einsatz der Nahinfrarot-Spektroskopie mit einfacher Transmissionstechnik erscheint möglich³⁾. Erprobte Sensoren für die medizinische Gasanalytik zur Überwachung von z. B. Narkosegasen basieren ebenfalls auf IR-spektrometrischen Grundlagen und sind kommerziell erhältlich, während die apparative Entwicklung zur nichtinvasiven Bestimmung von u. a. Bluts substraten und der Sauerstoffsättigung des Blutes noch im Stadium der Grundlagenforschung steht.

Schrifttum:

1. HESSE, A., GERGELEIT, M., SCHÜLLER, P., MÖLLER, K.: J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 27, 639 (1989).
 2. JANATSCHEK, G., KRUSE-JARRES, J. D., MARBACH, R., HEISE, H. M.: Anal. Chem. 61, 2016 (1989).
 3. LODDER, R. A., HIEFTJE, G. M., MOOREHEAD, W., ROBERTSON, S. P., RAND, P.: Talanta 36, 193 (1989).

S 11

Klinische Anforderungen an ein wissenschaftliches System zur Schilddrüsenhormonbefundung

R. Hehrmann, C. Bepperling
 Medizinische Klinik I, Diakonissenkrankenhaus Stuttgart

Die Messung der Schilddrüsenhormone im Blut dient der Erfassung der Schilddrüsenfunktion. Die Schilddrüsenhormonkonzentrationen hängen aber außer vom Funktionszustand der Schilddrüse von einer Reihe anderer Faktoren ab, ohne deren Kenntnis die Interpretation der Hormonkonzentrationen im Sinne der Funktionsdiagnostik nicht möglich ist. Diese Faktoren sind:

a) Erhöhung oder Erniedrigung der Bindungsproteine
 b) Veränderungen des Schilddrüsenhormonstoffwechsels
 c) Blockierung der Hormonbindung an die Bindungsproteine
 d) Beeinflussung der thyreotropen Regulation.

Solche Veränderungen können jeweils sowohl durch Begleiterkrankungen als auch durch Medikamente hervorgerufen werden. Auch physiologische Situationen wie Neugeborenenperiode, Schwangerschaft, hohes Alter bedingen meßbare Veränderungen. Da die Auswahl der sinnvollerweise zu bestimmenden Parameter auch von der klinischen Fragestellung abhängt, muß diese bekannt sein. Sie läßt sich kategorisieren in:

1. Bestätigung einer Euthyrose
2. Ausschluß einer Hyperthyrose
3. Bestätigung einer Hyperthyrose
4. Ausschluß einer Hypothyrose
5. Bestätigung einer Hypothyrose
6. Therapiekontrolle bei . . .

Sofern Fragestellung und die o. g. Informationen bekannt sind, sind die klinischen Voraussetzungen für ein wissenschaftliches System zur SD-Hormonbefundung erfüllt.

Die klinische Anforderung an ein solches System ist dann, daß die Datenbasis ausreicht, um alle denkbaren und praktisch möglichen Konstellationen zu erkennen und zu beantworten auf der breiten diagnostischen Skala vom ambulanten Patienten, der bis auf eine kleine Struma gesund ist, bis hin zum multimorbiden Schwerstkranken auf einer Intensivstation, der mit Medikamenten wie Heparin und Katecholaminen behandelt wird und möglicherweise eine Schilddrüsenfunktionsstörung hat.

Einige Kurzfassungen der Symposien und Plenarvorträge gingen nach Redaktionsschluß ein und konnten deshalb nicht unter oder nicht in der entsprechenden Reihenfolge veröffentlicht werden.

LABORATORIUMS MEDIZIN

vereinigt mit **Das Medizinische
Laboratorium**

Offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin e.V.
 Offizielles Organ des Berufsverbandes Deutscher Laborärzte e.V.
 Offizielles Organ der Österreichischen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin
 Offizielles Organ des Institutes für Standardisierung und Dokumentation im medizinischen Laboratorium e.V. (INSTAND e.V.)

Einladung
zum
Abonnement

Bitte senden Sie mir ab sofort 2 Ausgaben von LABORATORIUMSMEDIZIN, vereinigt mit „Das Medizinische Laboratorium“, für mich kostenlos zur Probe.
 Gebe ich Ihnen 10 Tage nach Erhalt des zweiten Heftes keine gegenteilige Nachricht, bin ich mit der regelmäßigen Weiterbelieferung bis auf Widerruf einverstanden. Ich zahle dann den Abonnentenpreis von 12,- DM pro Ausgabe = 132,- DM im Jahr.
 Ich nehme Ihr Angebot an und möchte die Probehefte an folgende Anschrift erhalten:

Name: _____

Straße: _____

PLZ: _____ Ort: _____

Datum: _____ Unterschrift: _____

Sie garantieren mir, daß ich berechtigt bin, diese Vereinbarung schriftlich innerhalb einer Woche durch Mitteilung an den Verlag Kirchheim, Kaiserstraße 41, 6500 Mainz 1, zu widerrufen. Zur Wahrung der Frist genügt die rechtzeitige Absendung des Widerrufs.

Datum und Unterschrift _____

Wir laden Sie ein, diese Fachzeitschrift für 2 Ausgaben kostenlos kennenzulernen.
 Ein Jahresabonnement kostet 132,- DM.
 Wir garantieren Ihnen, daß Sie berechtigt sind, diese Vereinbarung schriftlich innerhalb einer Woche durch Mitteilung an den Verlag Kirchheim, Kaiserstraße 41, 6500 Mainz 1, zu widerrufen. Zur Wahrung der Frist genügt die rechtzeitige Absendung des Widerrufs.

**VERLAG
KIRCHHEIM
MAINZ**

Postfach 2524
 6500 Mainz 1

**Sie erhalten umgehend Ihr
erstes Heft.**

Lab.med. 4/91

Praktikabilitätsbewertung des Boehringer Mannheim/Hitachi 747 Analysen-Systems – Eine Multicenter Evaluierung

P. Bonini¹, F. Ceriotti¹, F. Keller², P. Brauer², H. Stolz², C. Pascual³, L. García Beltrán³, D. J. Vonderschmitt⁴, P. Pei⁴, W. Bablok⁵, W. Poppe⁵ und W. Stockmann⁵

¹ Ospedale San Raffaele, I-Mailand

² Medizinische Universitätsklinik Würzburg, D-Würzburg

³ Hosp. Gen. Valle de Hébron, E-Barcelona

⁴ Universitätsspital Zürich, CH-Zürich

⁵ Boehringer Mannheim GmbH, D-Mannheim

Die Bewertung der Praktikabilität ist neben der Darstellung der analytischen Performance ein wesentlicher Beitrag der Evaluierung eines Analysensystems in der klinischen Chemie.

Diese kann nur schwer in standardisierter Form quantifiziert werden, und die Bewertung ist häufig subjektiv.

Wir haben einen Fragebogen mit 190 Fragen entworfen, der alle wichtigen Eigenschaften der Praktikabilität eines Analysensystems erfaßt. Dieses Schema erlaubt innerhalb einer festgesetzten Skala eine weitgehend objektive Bewertung der entsprechenden Merkmale und bietet die Möglichkeit zum Vergleich mit der gegenwärtigen Laborsituation.

Die Bewertungsskala reicht von 1 bis 10. Die Note 1 für ein Merkmal bedeutet unwichtig oder wenig nützlich, die Bewertung 10 steht für ausgezeichnet oder absolut notwendig. Die Punktzahl 5 wird als akzeptabel oder vergleichbar mit der jetzigen Laborsituation interpretiert.

Die 190 Fragen verteilen sich auf 14 unterschiedliche Themenkomplexe: Umgebung, räumliche Anordnung, Bedienungs-freundlichkeit, „Start-up/shut-down“-Phase, Probenverarbeitung, Reagenzhandhabung, Kalibration, Überwachung, Qualitätskontrolle, Ergebnisverarbeitung, Wartung, Flexibilität, Software und Zeitverhalten.

Die Praktikabilität des neuen Boehringer Mannheim/Hitachi 747 Analysen-Systems wurde in vier Prüfstellen nach diesem Schema bewertet. Für jeden Themenkomplex wird die gemittelte Benotung über die vier Prüflaboratorien in einer Graphik eingetragen. Die Benotung ist in drei Klassen eingeteilt, entsprechend drei Feldern in der Graphik mit der Bewertung: entspricht nicht den Erwartungen (0–3,5), entspricht den Erwartungen, die an ein Analysensystem gestellt werden (3,6–6,4) und übertrifft die Erwartungen (6,5–10).

Die Ergebnisse der Praktikabilitätsstudie aus den vier Prüflaboratorien zeigen, daß das Vergleichsgerät (größtenteils BM/Hitachi 737) dem mittleren Feld – entspricht den Erwartungen – zugeordnet wird, und daß das neue Analysensystem BM/Hitachi 747 bei 10 von 14 Bewertungsthemen die Erwartungen, die an ein Analysensystem gestellt werden, übertrifft.

Elastase-Bestimmung bei AIDS – Entscheidungshilfe zwischen bakteriellen und opportunistischen Infektionen

T. Berg und R. Averdunk

AIDS-Arbeitsgruppe im Auguste Viktoria-Krankenhaus, Berlin, Rubensstraße

Nachdem die Elastase-Bestimmung mit fast allen in der klinisch-chemischen Routine eingesetzten Laborautomaten möglich ist, steht die Prüfung der Aussage bei Erkrankungen an. Dabei erscheint gesichert, daß erhöhte Werte des PMN-Elastase- α_1 -Proteinase-Inhibitor-Komplexes (Elastase) im Zusammenhang mit bakteriellen Infektionen wichtige Informationen geben.

Wir untersuchten im Rahmen von 177 stationären Aufenthalten von HIV-Patienten folgende Kenngrößen: Elastase, Leukozyten-

Bestimmung der enzymatischen Aktivität der sauren Prostataphosphatase in menschlichem Serum mit einem spezifischen kinetischen Test

S. Zinn, S. Golf, V. Graef, H. Temme und N. Katz
Institut für Klinische Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der sauren Prostataphosphatase mittels Tartrathemmung ist unbefriedigend. Das natürliche Substrat der sauren Prostataphosphatase ist noch unbekannt. Für Phosphorylcholin ist eine Hydrolyse ausschließlich durch saure Prostataphosphatase beschrieben, während saure Phosphatasen anderer Gewebe dieses Substrat nicht hydrolysieren (1). Im folgenden wird ein Testansatz zur kinetischen Messung der sauren Prostataphosphatase beschrieben, der auf der Hydrolyse des spezifischen Substrates Phosphorylcholin beruht.

Die saure Prostataphosphatase der Probe hydrolysiert das in einer Konzentration von 100 mmol/l eingesetzte Phosphorylcholin in einem 9,2 mol/l Citratpuffer bei 37°C und einem pH von 6,6. Das entstehende Cholin wird mittels Cholinoxidase (EC 1.1.3.17) (2,5 U/Ansatz) zu Betain oxidiert. Die bei dieser Reaktion anfallenden zwei Moleküle Wasserstoffperoxid oxidieren in Gegenwart von Peroxidase (EC 1.11.1.7) das Indikatorsystem 3,5-Dichlor-2-hydroxy-benzolsulfonsäurechlorid (2,25 mg/Ansatz)/4-Aminoantipyrin (0,375 mg/Ansatz). Der Farbstoffumschlag nach violett wird nach einer Präinkubationszeit von 10 Minuten als kontinuierliche Extinktionszunahme bei 546 nm während der folgenden 10 Minuten am Photometer abgelesen. Die Extinktionszunahme eines mitgeführten Leerwertes während der 10minütigen Meßzeit wird von der des Probenansatzes subtrahiert. Nach Multiplikation der so ermittelten Extinktionsänderung/10 min mit dem Faktor 64 erhält man die Aktivität der sauren Prostataphosphatase in der Einheit U/l. Das Volumen des gesamten Ansatzes beträgt 2,3 ml bei einem Probenvolumen von 0,2 ml.

Die Regressionsanalyse der beschriebenen Methode im Vergleich zur p-Nitrophenylphosphatmethode von 32 Seren zeigte eine Steigerung von 1,0, einen y-Achsenabschnitt von 0,15 und einen Korrelationskoeffizienten von 0,988. Die Empfindlichkeit betrug 1,57 U/l, die Präzisionskontrolle von Tag zu Tag ergab einen Fehler von 5,4%. Die Richtigkeit mittels der Kontrollseren Kontrolllogen L und LP der Firma Behring betrug $4,25 \pm 0,7$ U/l und $11,14 \pm 0,6$ U/l. Für die p-Nitrophenylphosphatmethode werden für Kontrolllogen L 4,4–8,8 U/l und für Kontrolllogen LP 10,7–21,3 U/l Aktivität an saurer Prostataphosphatase angegeben. Seren weiblicher Patienten und hämolytische Seren, die im p-Nitrophenylphosphatetest eine hohe Aktivität an saurer Phosphatase aufwiesen, zeigten im beschriebenen Test keine oder nur sehr geringe Extinktionszunahmen. Im Vergleich zur p-Nitrophenylphosphatmethode bietet die beschriebene Methode folgende Vorteile:

1. Keine Endpunktmethode, sondern kinetische Meßmethode.
2. Möglichkeit der Automatisierung.
3. Enzymatische Reaktion und Farbumschlag bei gleichem pH-Wert, somit vereinfachte Durchführung.
4. Keine Tartrathemmung notwendig, da spezifisches Substrat.
5. Fünffach größere Empfindlichkeit durch größeres Signal (Extinktionsänderung), welche kürzere Meßzeit ermöglicht.

Schrifttum:

1. CHOE, B. K., PONTES, E. J., McDONALD, L., ROSE, N. R.: Purification and characterization of human prostatic acid phosphatase. *Preparative Biochemistry* 8, 73–89 (1978).

zahl, LDH, α -HBDH, CRP, Haptoglobin, Albumin. Die Ergebnisse wurden Diagnosen bzw. Krankheitsverläufen zugeordnet.

Methode: Im Zeitraum von 8 Monaten wurden 160 Patienten mit 177 stationären Aufenthalten – hiervon 74% mit AIDS, 19,8% mit ARC, 8% mit LAS und 1,7% symptomlose HIV – untersucht. Die Elastase wurde mit dem kommerziell von der Firma Merck erhältlichen Immunassay IMAC auf dem HITACHI 705 bestimmt. Normbereich: 10 bis 35 $\mu\text{g/l}$.

Ergebnisse: Die Elastase und die o. a. klinisch-chemischen Kenngrößen wurden folgenden Diagnosen zugeordnet: Toxoplasmosen, CMV-Enteritis, Retinitis, Encephalitis, Chryptosporidiosen, atypische Mykobakteriosen, Mucormykose; bakterielle Pneumonie und schwere eitrige Bronchitis, Pneumonien und Sepsis, leichte Bronchitis, Hautabzesse, Harnwegsinfekte, Abszesse mit Endocarditis, Tuberkulose, Herpes Zoster, Lues, Hepatitis B, Kaposi-Sarkom, Arzneimittelallergie.

Die Differenzierungsmöglichkeiten zwischen opportunistischen und bakteriellen Infektionen sind besonders bei pulmonaler Infektion klinisch relevant. Bei bakteriellen Infektionen waren 94% der Elastasewerte erhöht. Sie betragen im Mittel 107 $\mu\text{g/l}$, bei opportunistischen Infektionen waren sie zu 92% erhöht, Mittelwert 58 $\mu\text{g/l}$. Betrachtet man den Elastasewert über 105 $\mu\text{g/l}$, also den 3fachen Wert der Norm, war der positive prädiktive Wert für eine schwere pulmonale bakterielle Infektion 0,79 und die Sensitivität, daß keine Pneumocystis carinii-Pneumonie (PCP) vorlag, 0,94. Das bedeutet: hohe Elastase-Werte bei einer Pneumonie bei AIDS-Patienten sprechen gegen eine PCP und machen eine bakterielle Genese wahrscheinlich. Alle Patienten mit Elastase über 400 $\mu\text{g/l}$ zeigten ein septisches Bild, so daß solche massiven Erhöhungen – ähnlich wie bei nicht HIV-infizierten Patienten – eine entsprechende Diagnose rechtfertigen. Elastase korreliert nicht mit dem C-reaktiven Protein (CRP) oder einem anderen Laborparameter.

V 4

Schnelldiagnose von Influenza-Infektionen durch Antigennachweis in Nasen-Rachen-Sekret

G. Döller¹, W. Schuy², K. Y. Tjhen³, B. Stekeler⁴ und H.-J. Gerth¹

¹ Abt. Med. Virologie, Hygiene-Institut, 7400 Tübingen

² Behringwerke AG, 3550 Marburg

³ Kinderarzt, 7404 Rottenburg a. N.

⁴ Allgemeinmediziner, 7450 Hechingen

Da eine Influenza-Infektion klinisch nicht sicher von Infekten des Respirationstraktes anderer Ätiologie abgegrenzt werden kann, muß die Verdachtsdiagnose mit virologischen Methoden bestätigt werden. Die Virusisolierung zur Diagnose einer Influenzavirus-Infektion ist sehr arbeits- und zeitaufwendig. Daher haben wir einen Enzymimmuntest (ELISA) zum schnellen Nachweis von Influenza A Virus-Antigenen entwickelt.

Die bisher beschriebenen Tests (Immunfluoreszenztest, Radioimmuntest, ELISA) zur Schnelldiagnose einer Influenzavirus-Infektion haben aus unserer Sicht gewisse Nachteile, wie Ultraschallbehandlung der Patientenproben, Über-Nacht-Inkubation oder der Gebrauch von Zellkulturen. Es wird ein einfach zu handhabender ELISA zum Schnellnachweis von Influenzavirus-Antigenen in Nasen-Rachen-Sekret (NPS) vorgestellt. Die Ultraschallbehandlung wurde durch ein Puffersystem ersetzt, und die Testergebnisse können 4 Stunden nach Eintreffen der Patientenproben im Labor erhalten werden. In 79 Zellkultur-positiven NPS für Influenza A konnten in 70 (88,6%) mit dem ELISA die Infektion erkannt werden. Der ELISA kann auch als Zellkulturbestätigungstest verwendet werden, mit dem noch vor Auftreten eines CPES Virusantigene nachgewiesen werden können. Sieben der neun negativen NPS wurden mit dem Zellkulturbestätigungstest untersucht. Vier wurden nach 24 und drei nach 72 Stunden als positiv erkannt.

Alle ($n = 21$) Zellkultur-positiven Rachenpflüssigkeiten für Influenza A reagierten im ELISA negativ, obwohl in sieben hohe,

mit NPS vergleichbare Viruskonzentrationen vorlagen. Faktoren, wie Inhibitoren oder Verdünnung, die den Antigennachweis in Rachenpflüssigkeiten verhindern, bedürfen weiterer Untersuchung.

Aufgrund der von uns gewonnenen Erfahrung mit dem vorgestellten ELISA zum Nachweis von Influenza A Virus-Antigenen in Nasen-Rachen-Sekret kann dieser Test auch in Laboratorien, denen keine Zellkulturen zur Verfügung stehen, zur Schnelldiagnose einer Influenzavirus-Infektion aus Nasen-Rachen-Sekret eingesetzt werden.

V 5

Eine verbesserte Hämolyserlösung zur Bestimmung der Glucosekonzentration

R. Birkhan, J. Stemme und R. Vormbrock
Diagnostica Forschung, E. Merck, Darmstadt

In der Literatur wurde beschrieben, daß die Hämolyserlösung, wie sie zur Zeit von E. Merck vertrieben wird, gelegentlich zu ungewöhnlich viskosen Hämolyse führt. Dieser Effekt wird durch die DNS von Leukozyten hervorgerufen, die in der Hämolyserlösung auffaltet. Bei Leukozytenzahlen von 70000/ μl oder darüber ergab sich dadurch eine so hohe Viskosität der Lösung, daß die Präzision der Pipettierung beeinträchtigt wurde, was in der Glucosebestimmung zu Variationskoeffizienten von bis zu 90% führte.

Unglücklicherweise konnten diese viskosen Hämolyse optisch nicht von normalen unterschieden werden, so daß kritische Hämolyse unerkannt blieben.

Um diese Störung zu beheben, wurde die Natriumchloridkonzentration erniedrigt, um ein Auffalten der DNS zu verhindern. Mit dieser neuen Hämolyserlösung wurde bis zu einer Leukozytenzahl von 515000/ μl keine sichtbare Erhöhung der Viskosität festgestellt, der Variationskoeffizient bleibt über den ganzen untersuchten Bereich auf dem niedrigen Niveau, das für normale Proben gilt. Statt der Viskosität tritt jedoch mit der neuen Lösung ab Leukozytenzahlen von 30000/ μl ein Niederschlag auf, der leicht erkannt und durch Zentrifugation abgetrennt werden kann. Dieser Zentrifugationsschritt wird nur dann notwendig, wenn die Glucosebestimmung auf einem Analysator mit sehr geringem Totvolumen im Probengefäß durchgeführt wird.

Zusätzlich wird in der neuen Hämolyserlösung ein anderes Tensid verwendet, um zu vermeiden, daß durch Schaumbildung auf dem Hämolyse die Füllstahnsensoren mancher klinischer Analysatoren gestört werden.

V 6

Präoperative Diagnostik vor planbaren Eingriffen in Allgemein- und Regionalanaesthesie

Lothar H. Schmidt
Institut für Klinische Chemie und Labordiagnostik,
Kliniken Stadt Görlitz

Ausgehend von den Diskussionen zum Thema präanaesthetischer Patientenvorbereitung, speziell die Labordiagnostik betreffend, wird ein auf Anamnese und klinischer Untersuchung basierendes und das Alter, Begleiterkrankungen, Umfang und Schwere des Eingriffes berücksichtigendes Laborprogramm vor planbaren Eingriffen vorgestellt. Es wurde in einer Arbeitsgruppe mit Anaesthesisten erarbeitet und in einem großen Rahmen diskutiert. Das Programm umfaßt bei kleineren und mittleren Eingriffen für 6- bis 40jährige Hämoglobin oder Hämatokrit, Leukozytenzahl i. Bl. sowie die Untersuchung des Urins. Bei über 40jährigen kommen Glucose i. Bl., Creatinin, Alaninaminotransferase sowie das EKG und eine Röntgenthoraxaufnahme dazu. Bei größeren Eingriffen (Dauer mehr als 45 min) werden zusätzlich zur

Bestimmung empfohlen: Säure-Basen-Analyse, Natrium, Kalium, Protein i. S., Thrombozyten i. Bl., Quickwert, aktivierte Rekalzifizierungszeit oder partielle Thrombinzeit. Bei vorbestehenden Erkrankungen bzw. Verdacht auf solche werden diese und weitere Laborparameter sowie Untersuchungen genannt, die einer Verbesserung der Prognoseeinschätzung und Patientensicherheit dienen.

Schrifttum:

1. SCHMIDT, L. H., RESCHKE, B., KUNZE, D.: Präoperative Diagnostik vor planbaren Eingriffen in Allgemein- und Regionalanästhesie. *Z. Klin. Med.* 45, 2315-2318 (1990).

S 12*

The Rhombotin T Cell Oncogene Family

Thomas Boehm, Letizia Foroni and Terence H. Rabbitts
MRC Laboratory of Molecular Biology

Human T-cell tumours carry specific chromosomal abnormalities, many of which involve, on one side of the aberrant junction, a T-cell receptor gene locus, and newly defined presumptive oncogenes on the other (reviewed in 1). Chromosomal abnormalities involving the short arm of chromosome 11 involve two loci, at band 11 p 15 and 11 p 13. The translocations disrupt two genes, designated rhombotin (at 11 p 15) and rhom-2 (at 11 p 13). Recent analyses (2, 3) show that both genes encode proteins with two tandemly arranged cysteine-rich regions (designated LIM domains) and thus constitute a new class of genes, designated the rhombotin gene family. Although the function of LIM domains is as yet unknown, it has been suggested to be in protein-protein interactions regulating the activity of transcription factors carrying LIM domains appended to DNA binding domains (4).

Schrifttum:

1. BOEHM, T., RABBITS, T. H.: *FASEB J* 3, 2344-2359 (1989).
2. BOEHM, T., GREENBERG, J. M., BULUWELA, L., LAVENIR, I., FORSTER A., RABBITS, T. H.: *EMBO J* 9, 857-868 (1990).
3. BOEHM, T., FORONI, L., FORSTER, A., CAMPBELL, J., KANEKO, Y., PERUTZ, M. F., RABBITS, T. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, in press (1991).
4. RABBITS, T. H., BOEHM, T.: *Adv. Immunol.* 50, in press (1991).

V 8

Immobilized pH Gradients for the Analysis of Hemoglobinopathies

P. Sinha, M. Kohlmeier, E. Kötting, P. G. Righetti*

Insitut für Klin.Chemie und Biochemie, Universitätsklinikum
Rudolf Virchow, Berlin

*Dip. Scienze e Tecn. Biomediché, Università di Milano,
Via Celoria 2, Milano 20133

Immobilized pH gradients (IPGs) are based on the principle that the pH gradient exists prior to the isoelectric focusing (IEF) run itself and is co-polymerized into the polyacrylamide matrix. This is achieved by using, as buffers, a set of seven non-amphoteric weak acids and bases (immobilinés), with pK's of 3.6, 4.6, 6.2, 7.0, 8.5 and 9.3, having the following general formula $H_2C=CH-CO-NH-R$, where R denotes either weak carboxyl or tertiary amino groups. During gel polymerization, these buffering species are efficiently incorporated into the gel. Immobiline based pH gradients are cast in the same way as conventional polyacrylamide gradient gels, by using a density gradient to stabilize the immobiline concentration gradient, with the aid of a standard, two-chamber gradient mixer. The immobiline buffers are not amphoteric, as in conventional IEF, but are bifunctional: the buffering group is located at one end of the molecule, and at the other end there is an acrylic double bond which will disappear during the polymerization reaction.

Linear gradients spanning from 0.1 to 1 pH units are designated as ultra-narrow and narrow gradients. Within these limits only

* Umstellung nach Redaktionsschluss

two immobilines are needed, the buffering and non-buffering species, the amounts of which are calculated using the Henderson-Hasselbalch equation. Formulations for optimized linear extended pH gradients were calculated with a new computer program written in USCD Pascal. Routine haemoglobin electrophoresis is performed in our laboratory using such linear narrow immobilized pH gradients in the range of pH 7.0-8.0. In this pH range, practically all common haemoglobin variants (HbA, HbA_{1c}, HbF, HbS, HbC, HbE and HbA₂) are fully resolved, thus making the identification of common haemoglobinopathies easy. Gradient engineering, i. e. pH expansion or reduction, reveal previously unresolved rare haemoglobin disorders thus demonstrating the flexibility of the IPG technology.

The IPG technology has a resolving power or pl (the difference in isoelectric points between a protein and its nearest resolved component) of 0.001 pH units and can separate even neutral mutants, i.e. those carrying a spot mutation involving amino acids with no ionizable side chains, thus called "electrophoretically silent" mutants. One of these electrophoretically silent mutants is Hb San Diego (a valine to methionine substitution) which can be resolved from HbA in a pH gradient spanning 0.8 pH units. The same is possible for HbS and HbD which cofocus in the same zone.

V 9

Bestimmung der Thromboplastinzeit am ACA (Du Pont)

S. W. Golf, F. Blecher-Steines, N. Katz, K. Klapetteck und L. Róka
Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Klinikum der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Zur Bestimmung der Thromboplastinzeit wird in der Mehrheit der Routinebestimmungen das Patientenplasma durch Zusatz von Rhomboplastin und Calcium zur Gerinnung gebracht. Die Einführung chromogener Substrate in die Gerinnungsdiagnostik ermöglichte die fibrinunabhängige Bestimmung von Gerinnungsabläufen, z. B. auch der Thromboplastinzeit. Ein chromogenes System zur Messung der Thromboplastinzeit läßt sich auch an dem ACA installieren.

Methodik: In das Probengefäß wurden 1,075 ml 0,233 mmol/l Hespesspuffer, 1,25 Einheiten Plasmin, 0,186 mmol Ca⁺⁺/l, und 300 µl Citratplasma vorgegeben. Das ACA-Pack durchlief die Brechermischer-, Vorheizer- und Photometerstationen mit 004 Inkubationszyklen, 027 Brechermischer-I- und -II-Impulsen sowie einer Packvorlaufzeit von 10 Sekunden. Das Ergebnis wurde in Millex-tinktionseinheiten bei 405 nm ausgegeben. Der Linearterm beträgt 3,515. Zur Verwendung kamen ACA-Packs mit 90 µl Trasyloil-Lösung, 100 µl Thromboplastin, 60 µl Chloramin T, 100 µl S-2238, 100 µl S-2238 in den jeweiligen Taschen 1,2,4,5,7 des ACA-Packs. Die Standardkurve wurde mit Precichrom (Boehringer) ermittelt, der Methódenvergleich zwischen ACA (Y) und einem KC10 (X) durchgeführt.

Die Steigung der Ausgleichsgerade aus den mit beiden Methoden ermittelten Werten betrug 1,15, der Achsenabschnitt 5,62, der Korrelationskoeffizient 0,99.

Die hier vorgestellte Bestimmung der Thromboplastinzeit beruht auf der Spezifität von Thrombin zum chromogenen Substanz S-2238, sowie der Interaktion von Chloramin T mit Antithrombin III und α2-Antiplasmin.

V 10

Immunologische Diagnostik von Schilddrüsenerkrankungen

G. Hellthaler, C. Zahn und O. Bätz
Institut für Pathologische Biochemie der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle - Wittenberg

Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse gehören zu den häufigsten Endokrinopathien. Zu den klassischen autoimmunen

Schilddrüsenerkrankungen gehören der Morbus Basedow, die idiopathische lymphozytäre Thyreoiditis und polytope Autoimmunerkrankungen. Die post partum und z. T. auch die silent Thyreoiditis haben ebenfalls eine autoimmunale Genese. Durch plazentare Übertragung von Autoantikörpern, die größtenteils zu den IgG zu zählen sind, können transiente connatale Hyper- und Hypothyreosen hervorgerufen werden.

Die Pathogenese der Autoimmunerkrankungen ist z. Z. noch nicht vollständig geklärt und wird heute über einen Bruch der Immuntoleranz interpretiert. Als spezifische Immunphänomene werden gegenwärtig Veränderungen der Immunregulation (z. B. organspezifischer und unspezifischer Defekt der Funktion von Suppressor-T-Zellen) und die Expression von HLA Klasse II-Molekülen auf der antigenpräsentierenden Zelle betrachtet. Die Differenzierung autoimmuner und nichtautoimmuner Schilddrüsenerkrankungen ist klinisch oft schwierig und muß durch Laborkenngrößen ergänzt werden. Dabei stehen in der derzeitigen Routinediagnostik nur der Nachweis humoraler Immunreaktionen (Autoantikörperbestimmung) zur Verfügung. Zelluläre Immunmechanismen spielen momentan aufgrund der Komplexität der Nachweismethoden nur eine untergeordnete Rolle. Hier werden noch vorwiegend aus wissenschaftlichem Interesse die Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut bestimmt, wobei sowohl die Antigenspezifität als auch die tatsächlichen Verhältnisse innerhalb der Schilddrüse unberücksichtigt bleiben.

Bei den Autoantikörperbestimmungen haben sich Bestimmungen der TSH-Rezeptor-, der Thyreoglobulin- und der mikrosomalen Peroxidase-Antikörper in der Routinediagnostik etabliert. Die Bedeutung der einzelnen Antikörper für die Pathogenese der Erkrankungen ist unterschiedlich und nicht in jedem Fall geklärt. So werden mit allen kommerziellen Testbesteckungen nur das Vorhandensein von Autoantikörpern belegt, deren biologische Effekte (Stimulierung bzw. Hemmung des TSH-Rezeptors, Hemmung der Peroxidase, antikörpervermittelte Zytotoxizitäten nach einer Antigen-Antikörper-Reaktion) *in vivo* bleiben vollständig unberücksichtigt. Schlußfolgerungen aus den Antikörperkonstellationen auf die Krankheitsprognose sind somit nur bedingt möglich. Aus der humoralen Immundiagnostik kann eigentlich nur die Frage autoimmun ja/nein bzw. die Progredienz eines Prozesses beantwortet werden.

In Zukunft könnte die Bestimmung antigenspezifischer zellulärer Reaktionen und eine Antikörpercharakterisierung (Subklassen- und Epitopdiagnostik) an Bedeutung gewinnen und eindeutige Aussagen ermöglichen.

V 11

Differentialdiagnostik von Hyperthyreosen

C. Zahn, O. Bätz, G. Hellthaler und M. Klaua*
Institut für Pathologische Biochemie und Radiologische Klinik
 der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle –
 Wittenberg*

Hyperthyreosen gehören mit einer Prävalenz von 0,8% zu den häufigen Erkrankungen in der Normalbevölkerung (2). Die zwei Hauptformen der Hyperthyreose, der Morbus Basedow und die Autonomie, die in uni-, multilokulärer oder dissimierter Form auftreten kann, umfassen 98% aller Hyperthyreosen. Zur Klärung der Pathogenese und zur Einleitung einer gezielten Therapie ist eine Klassifikation erforderlich. Während bei der immunogenen Form, dem Morbus Basedow, neben ablativen Maßnahmen konservative Behandlungsformen möglich sind bzw. auch zur Heilung führen können, empfehlen sich bei den Formen der Autonomie ablativ Maßnahmen.

Neben einer klinischen und nuklearmedizinischen Untersuchung ist in vielen Fällen eine immunologische Schilddrüsendiagnostik erforderlich. So ist eine dissimierte Form der Autonomie von einem Morbus Basedow ohne Exophthalmus ohne immunologische Parameter nicht abgrenzbar. Bisher erschien für die immunologische Diagnostik vor allem die Bestimmung der TSH-Rezeptor-Antikörper, die sich allerdings nur mittels radioimmunologischer Methoden realisieren läßt, sowie der mikrosomalen Antikörper (Ak) bzw. Peroxidase-Ak am besten geeignet.

Mittels zweier Festphasenzymimmunoassays zur Bestimmung von Schilddrüsenmembran- (Mb-Ak) bzw. Thyreoglobulin-Ak (Tg-Ak) bestimmten wir die Spezifität und Sensitivität für die Klassifikation von Hyperthyreosen (1, 3). Dafür verwendeten wir zwei Patientengruppen, die aus klinischer und nuklearmedizinischer Sicht eindeutig der Morbus Basedow-Gruppe (Grundlage für die Sensitivitätsberechnung) bzw. der Autonomie-Gruppe (Grundlage für die Spezifitätsberechnung) zuzuordnen waren.

Nach Austestung verschiedener Grenztiter für die Ak-Bestimmungen ergaben sich für die Mb-Ak/Tg-Ak bei einem cut off Wert von $> 1:400$ eine Spezifität von 89%/85% und eine Sensitivität von 91%/71%. Bei gleichzeitiger Bestimmung beider Ak-Arten erhöhte sich die Sensitivität auf 97%. Die Brauchbarkeitskriterien entsprechen bzw. liegen über den Literaturangaben für die TSH-Rezeptor- bzw. TPO-Ak.

Wir empfehlen die gemeinsame Bestimmung der Membran- und Thyreoglobulin-Ak auf einer Mikrottestplatte nicht nur bei Hyperthyreosen, sondern auch allen anderen Funktionsstörungen der Schilddrüse, da die Bestimmung einfach, schnell und sehr preiswert ist. Die durchgeführten Titerbestimmungen sind visuell und photometrisch auswertbar. Kostenaufwendigere TSH-Rezeptor-AK- bzw. TPO-AK-Bestimmungen sollten unklaren Fällen vorbehalten bleiben.

Schrifttum:

- BÄTZ, O., BLOTTNER, A., HELLTHALER, G.: Nachweis von Antikörpern gegen Schilddrüsenmembranen. *Z. med. Lab.diagn.* 31, 314–320 (1990).
- KLEINAU, E., et al.: Epidemiologische Studie über die Häufigkeit von Schilddrüsenerkrankungen. *Z. Klin. Med.* 43, 165–167 (1988).
- ZAHN, C., BÄTZ, O., HELLTHALER, G.: ELISA auf Mikrottestplatten zum Nachweis von Antikörpern gegen Thyreoglobulin. *Z. med. Lab.diagn.* 31, 310–313 (1990).

V 12

Personalbedarf in der Transfusionsmedizin: Gegenüberstellung zweier Methoden: „Anhaltzahlen aus Erfahrung“ (AZAE) und „Laboratory Workload REcording“ (WLR)

U. Diekamp und I. Hillringhaus
*Bluttransfusionsdienst, Zentralkrankenhaus St.-Jürgen-Straße,
 Bremen*

Anlaß des Berichts ist der Entwurf der Wirtschaftlichkeitsanalyse eines namhaften Gutachters für 1988. Dessen Methode zur Ableitung der AZAE wurde nicht offengelegt. Der Gutachter erhielt zuvor unsere WLR-Daten, erhoben nach dem jährlichen Manual für Laboratory WLR Method des College of American Pathologists. Hier geben wir, aus Platzmangel nur die Gesamtergebnisse für Funktionsdienst und Med.-Techn. Dienst (mit allen Verwaltungskräften); diese Bereiche umfassen alle Aufgaben unseres nicht-ärztlichen Personals. Für folgende tabellarische Darstellung wurde der Personalbedarf in Vollkräften (VK) anhand der im Gutachten genannten AZAE und entsprechend WLR für die beiden Jahre nach dem Gutachten fortgeschrieben, entsprechend der Praxis der Kostenträger:

Bereich	Jahr	AZAE		Workload Recording Methode		
		Leistungen	VK*	Leistungen	WLR-Einh.	VK*
Funktionsdienst	1988	50 434	8,33	65 282	714 256	9,54
	1989	55 558	9,16	71 301	802 209	10,54
	1990	56 945	9,56	73 031	848 068	11,35
Med.-Techn. Dienst	1988	359 840	21,89	435 089	1 784 386	22,09
	1989	407 214	23,04	506 992	1 948 086	24,67
	1990	427 406	24,22	534 917	2 103 050	27,06

* Enthält die vom Gutachter geforderten hypothetischen Fehlzeiten von 15%.

Variierende Leistungszahlen reflektieren Nichtanerkennen von Arbeitsabläufen durch den Gutachter. Trotzdem ermitteln beide Methoden 1988 ähnlichen Personalbedarf, der aber schon nach kurzer Fortschreibung deutlich auseinanderdriftet. Da die AZAE-Methode nicht auf veröffentlichten, nachprüfbareren Berechnungen beruht, liegt der Schluß nahe, daß die ähnlichen Ergebnisse 1988 kein Zufall sind. *Schlußfolgerung:* WLR ist eine veröffent-