

# Chymotrypsin im Stuhl: Vergleich der titrimetrischen und photometrischen Methode bei Kindern und Erwachsenen

W. Appel<sup>1</sup>, M. Jesper<sup>2\*</sup>, S. Appel<sup>1</sup>, unter technischer Mitarbeit von I. Kirstein<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Zentrallaboratorium der St.-Vincentius-Krankenhäuser Karlsruhe (Prof. Dr. med. P. M. Reisert) und

<sup>2</sup> Kinderklinik Mannheim der Universität Heidelberg (Prof. Dr. med. E. Huth)

## Zusammenfassung:

Die Chymotrypsinaktivität im Stuhl wurde titrimetrisch-kinetisch (pH-Stat) mit  $N_\alpha$ -Benzoyl-L-argininethylester (Referenzmethode) und photometrisch mit  $N_\alpha$ -Succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-prolyl-L-phenylalanin-p-nitranilid (Routinemethode) bestimmt. Die photometrische Bestimmung erfolgte mit selbsthergestellten Reagenzienlösungen und mit Monotest® Chymotrypsin (Boehringer Mannheim). Solubilisierreagenz war meist Lauryltrimethylammoniumchlorid. Untersucht wurden 453 Stuhlspezimen von 334 Erwachsenen, Kindern, Säuglingen, Neu- und Frühgeborenen.

Beide photometrische Bestimmungsvarianten verhalten sich gleichartig. Homogenisierung, Extraktion, Abtrennung und Enzymstabilität im Extrakt befriedigen. Dies gilt auch bei Verwendung des vom Hersteller entwickelten Probenaufbereitungssystems. Linearität des Meßsignals bis 30 min und 30 U/g Stuhl sind gegeben. Je nach Konzentrationsbereich beträgt die Unpräzision in Serie 3-12%, von Tag zu Tag (an Kontrollproben) 1,5-6%. Der Vergleich Titrimetrie (x) zu Photometrie (y) (2 Kollektive in 2 Jahren) ergibt:  $y = -0,39 (2,30) + 0,36 (0,40)x$ ,  $r = 0,793 (0,839)$ ,  $n = 107$  (Erwachsene);  $y = -0,47 + 0,41x$ ,  $r = 0,872$ ,  $n = 92$  (Kinder) und  $y = 0,11 + 7,03x$ ,  $r = 0,441$ ,  $n = 43$  (Neugeborene). Die technische Sensitivität und Spezifität befriedigen. Kontrollproben können mitgeführt werden. Neugeborene mit Mukoviszidose zeigten Werte von 1-7 U/g (Photometrie). Die Grenze des vorläufigen Richtwertes für Erwachsene und Kinder bei der Photometrie sollte auf 4 U/g Stuhl angehoben werden. Die mittels Monotest®-Chymotrypsin mit Probenvorbereitungssystem erhaltenen Werte bestätigen die der titrimetrischen Methode.

## Schlüsselwörter:

Chymotrypsin - Stuhl - Titrimetrische Bestimmung - Photometrische Bestimmung - Qualitätssicherung - Richtwerte - Kinder - Neugeborene - Mukoviszidose - Monotest®-Chymotrypsin

## Summary:

The activity of fecal chymotrypsin was determined by kinetic titration (pH-stat) with  $N_\alpha$ -benzoyl-L-argininethylester (reference method) and photometrically with  $N_\alpha$ -succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-prolyl-L-phenylalanin-p-nitranilid (routine method). The photometric test was carried out with selfmade reagent solutions and with Monotest®-Chymotrypsin. Solubilisation was achieved in most cases by lauryltrimethylammoniumchloride. 453 specimen of stool of 334 adults, children and newborns have been analyzed.

Both kinds of photometric methods behave equally. Homogenization, extraction, separation and stability of the enzyme in the extract are satisfying. This also is true when using sample-processing unit developed by the manufacturer. According to the range of concentration the imprecision in serie shows CV's of 3-12%, day-to-day (with control material) 1.5-6%. Linearity of signals up to 30 min and 30 U/g stool are given. Comparison of titrimetric (x) and photometric (y) determination by regression analysis (2 collectives in 2 years) result in  $y = -0.39 (2.30) + 0.36 (0.40)x$ ,  $r = 0.793 (0.839)$ ,  $n = 107$  (adults);  $y = -0.47 + 0.41x$ ,  $r = 0.872$ ,  $n = 92$  (children); and  $y = 0.11 + 7.03x$ ,  $r = 0.441$ ,  $n = 43$  (newborn). The technical sensitivity and specificity are satisfying. Control material may be used. Newborns with cystic fibrosis showed values of 1-7 U/g (photometry). The preliminary normal borderline for the photometric method for adults and children should be elevated up to 4 U/g. The values obtained with the kit Monotest®-Chymotrypsin with sample processing unit prove the values found by the titrimetric method.

## Keywords:

Chymotrypsin - stool - titrimetric method - photometric method - quality insurance - normal values - children - newborns - cystic fibrosis - Monotest®-Chymotrypsin

## Einleitung

„Das Fehlen des Trypsins im Stuhl hat uns die Wahrscheinlichkeit einer Pankreaserkrankung angezeigt.“ Diese experimentell durch Gelatine-Abbau begründete Aussage von Staniek 1908 (1) hat sehr früh die klinische Enzymologie mitbegründet. Trotz der großen Fortschritte in der Biochemie und Pathobiochemie proteolytischer Enzyme (E. Fischer, Willstätter, Wieland, Waldschmidt-Leitz, Grassmann, Werle) verstrichen bis zum generellen Einsatz der Stuhlenzymdiagnostik über 55 Jahre. Die Grundlagen schufen die Untersuchungen von Haverback et al. 1963 (2) und Ammann et al. 1966 (3–10) mit der titrimetrischen pH-Stat-Methode.

Ihre Anwendung zur klinisch-chemischen Diagnostik der exokrinen Pankreasfunktion beim Erwachsenen (3–22) und der Mukoviszidose bei Kindern (23–41) sicherte den Stellenwert der Stuhlenzymdiagnostik. Fortschritte erbrachten die Selektion des Chymotrypsins gegenüber Trypsin und anderen Proteasen (5), auch des biochemisch bevorzugten Substrats  $N_\alpha$ -Benzoyl-L-tyrosin-ethylester, BTEE (42) gegenüber den Acetylderivaten (2, 3, 43). Weitere Entwicklungsstufen waren die Einführung der Aminosäure-p-nitranilide zur Aktivitätsbestimmung von Trypsin und Chymotrypsin („chromogene Substrate“) durch Nagel et al. 1965 (44); ihre Anwendung auf Stuhl durch Willig et al. 1967 (45); die Verwendung von Succinyl-L-phenylalanin-p-nitroanilid durch Willig 1970 (46) und Löffler et al. 1975 (47); von Succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-prolyl-L-methionin-p-nitranilid durch Del Mar et al. 1979 (48, 49); und von Succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-prolyl-L-phenylalanin-p-nitranilid durch Achstetter et al. 1981 (50). Vorläufiger Abschluß dieser Entwicklung ist die erfolgreiche Ablösung des Chymotrypsins von den Stuhlpartikeln unter Erhalt von Aktivität und Stabilität, die Optimierung des chromogenen Bestimmungsverfahrens, die Erfindung eines speziellen Probenvorbereitungssystems und die Zusammenfassung zu einer handelsfähigen Reagenzienkombination durch Kaspar, Möller, Wahlefeld und Staehler 1982 (51).

Nachfolgend seien die Ergebnisse unserer Vergleichsuntersuchungen zwischen dieser Reagenzienkombination und der bei uns seit vielen Jahren durchgeführten kinetisch-titrimetrischen Methode dargestellt.

## Methodisches Prinzip

Chymotrypsin wird durch Homogenisieren in Gegenwart von Detergentien und hohen Salzkonzentrationen von Stuhlpartikeln abgelöst. Das im klaren Zentrifugationsüberstand aktive und stabile Enzym spaltet aus dem Tetrapeptid  $N_\alpha$ -Succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-prolyl-L-phenylalanyl-p-nitranilid (Succ-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA) hydrolytisch freies 4-Nitranilin ab. Dessen Konzentrationszunahme wird photometrisch bei 405 nm über mehrere Minuten kinetisch gemessen. Aus der Extinktionszunahme  $\Delta E/\text{min}$  wird die katalytische Aktivität des Chymotrypsins in U/l Zentrifugat bzw. U/g Stuhl berechnet.

## Untersuchungsmaterial

Das Untersuchungsmaterial bestand aus Stuhlproben von Erwachsenen und Kindern verschiedenem Geschlechts und Alters aus dem Zentrum für Innere Medizin unseres Hauses, den Universitätskinderkliniken Freiburg, Tübingen, Mannheim, Würzburg und Homburg (Saar) sowie aus Einsendungen verschiedener niedergelassener Allgemein- und Kinderärzte.

## Reagenzien

Titrimetrie: Reagenzien, Herstellung der Lösungen und Geräte siehe (42).

Photometrie:

1. N-Succinyl-L-Ala-l-Ala-L-Pro-L-Phe-p-nitranilid, Firma Bachem, CH-4416 Bubendorf, Schweiz.
2. Lauryltrimethylammoniumchlorid, Reinheit > 92%, Serva 20771.
3. Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) zur Analyse, Merck 8382.
4. Calciumchlorid,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , zur Analyse, Merck.
5. Natriumchlorid, NaCl zur Analyse, Merck.
6. Salzsäure, 0,1 mol/l, Merck, Titrisol.
7. Dimethylformamid, Merck.
8. Chymotrypsin  $A_4$  ( $\alpha$ -Chymotrypsin) aus Rinderpankreas, lyophilisiert, salzfrei. 72 U/mg, Boehringer Mannheim 103306.  $\alpha$ -Chymotrypsin, 3 $\times$  kristallisiert, lyophilisiert, salzfrei, ca. 45 U/mg, Serva, 17160.

Monotest®-Chymotrypsin Boehringer Mannheim, 20  $\times$  2 ml; Solvens 1000 ml sowie Probendosiergefäß und Homogenisier-Stahlfeder.

## Herstellung der Lösungen

- I. Tris-Stammlösung, 0,2 mol/l  
24,23 g Tris in 1000 ml bidest. Wasser lösen.
- II. Tris-Pufferlösung, 50 mmol/l, pH 9,0  
125,0 ml Tris-Stammlösung I mit 26,5 ml 0,1 mol/l HCl mischen und mit A. dest. auf 500 ml auffüllen.
- III. Substrat-Pufferlösung  
7,31 g NaCl + 1,47 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  in 500 ml Tris-Pufferlösung II auflösen.
- IV. Substratlösung  
13,4 mg Succ-Ala-Ala-Pro-Phe-p-NA in ca. 1 ml Dimethylformamid lösen und mit Substrat-Pufferlösung III auf 50,0 ml im Meßkölbchen auffüllen. pH-Wert kontrollieren.
- V. Solubilisierungslösung  
29,22 g NaCl + 14,70 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  in 1000 ml bidest. Wasser lösen.
- VI. Solubilisierungsmedium  
2,5 g Lauryltrimethylammoniumchlorid mit ca. 10–20 ml Lösung V in einem Becherglas unter längerem magnetischem Rühren bei Vermeidung von Klumpen- und Schaumbildung lösen und auf 100 ml mit Lösung V auffüllen.
- VII. NaCl-Lösung, 0,9 g/dl.

## Herstellung eines 1:10-Stuhlhomogenats

Auf einer oberhalbigen Waage wird ein geöffnetes Polyethylenbeutelchen in einen Urinbecher gestellt und austariert. Mit dem Löffel eines Stuhlversandgefäßes oder einem Spatel gibt man 2–3 g Stuhl in das Beutelchen, verschließt dieses weitgehend, stellt das Nettogewicht genau fest, gibt mit einer Pipette mit Gummiball solange

# Harnstoff UV Test (Roche)

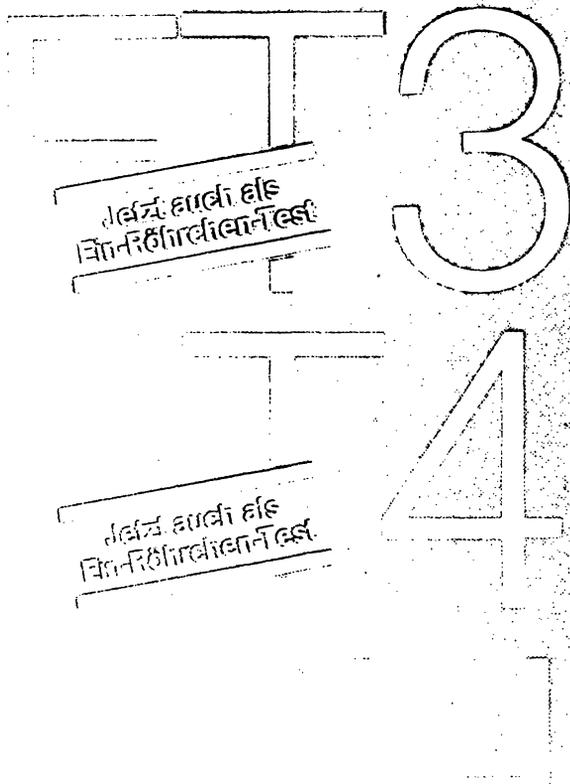
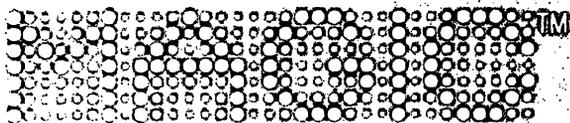
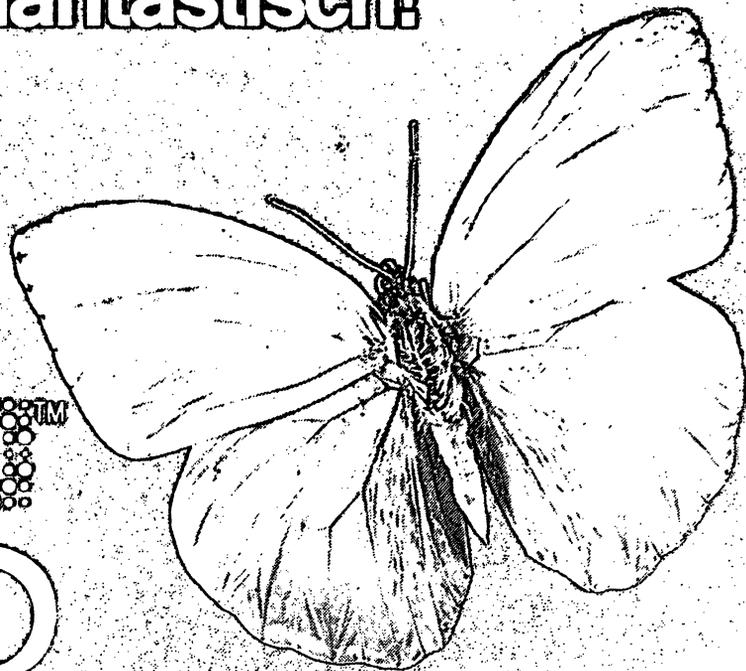
Kinetische Messung

## optimal

## automatengängig

- ▶ Schnelle Reaktion, großer Analysendurchsatz
- ▶ Hervorragende Stabilität der Reagenzien
- ▶ Linearität: bis 200 mg/100 ml
- ▶ Bedarfsgerechte Portionierung

**Phantastisch einfach . . .  
 . . . einfach phantastisch!**



**Das vielfältige Programm  
 zur Schilddrüsen-  
 in vitro-Diagnostik**



- Magnetsches Trennsystem = ohne Zentrifugation.
- Kürzere Reaktions- und Inkubationszeiten durch homogene Verteilung der Partikel.
- Kein Schütteln und Mischen der Reagenzien während des Reaktions- und Inkubations.
- Absolut zuverlässige Trennung im geringen Volumen.

Jetzt auch  
 als Ein-Röhrchen-Test  
 für die Schilddrüsen-Diagnostik

Corning Medical GmbH  
 Postfach 5708 · D-6300 Gießen  
 Tel.: (06 41) 40 03-0

**CORNING**

NaCl-Lösung VII dazu, bis die Waage genau das 10fache des Stuhlgewichts anzeigt. Das Beutelchen wird ganz verschlossen, manuell oder mittels eines „Stomachers“ zum Homogenisieren des Inhalts geklopft und – nach Sichtprüfung – mit dem beschrifteten Urinbecher eingefroren oder an den Arbeitsplatz weitergeleitet. Ein Abzug ist vorteilhaft, aber nicht unbedingt erforderlich. Dieses Homogenat wird direkt für die titrimetrische Bestimmung verwendet; für die photometrische Bestimmung wird 1:10 (v/v) mit NaCl-Lösung VII (1:100-Homogenat) oder Solubilisierungslösung VI (1:100-Extrakt) verdünnt.

Solubilisierung (für Photometrie)

1. Aus dem 1:10-Homogenat 100 µl des 1:10-Homogenats werden mit einer Kolbenhubpipette, deren Pipettenspitze am Auslauf etwas abgeschnitten wurde (größeres Lumen für größere Partikel), in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 0,900 ml Solubilisierungsmedium versetzt. Nach Verschließen mit dem anhängenden Stopfen wird manuell oder an einem Vibrationsmischer (z.B. Vortex) 1–2 min gemischt und 2 min bei 12000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wird der photometrischen Bestimmung zugeführt (1:100-Extrakt).

2. Aus dem Stuhlspezimen mit dem Probenvorbereitungssystem

Die Probendosierung erfolgt durch Entnahme einer Stuhlprobe mit einem (mitgelieferten) Spatel und Einstreichen in die Dosierkammer eines Bodens, etwa 0,10 ml. Nach Eindrücken des gefüllten Bodens in ein Gefäß und Zugabe von 10 ml des (mitgelieferten) Solvens wird die Probe mit einem Vibrationsmischer (z. B. Vortex) 2, bisher 3 min, homogenisiert. Dabei ist auf ein rotierendes Auf- und Absteigen der Stahlfeder zur Partikelzertrümmerung zu achten (1:100-Extrakt).

Photometrische Bestimmung

1. Monotest®-Chymotrypsin mit einem 1:100-Extrakt, siehe Herstellervorschrift.

2. Labormethode mit 1:100-Homogenat oder 1:100-Extrakt.

Homogenat oder Extrakt 0,100 ml  
 Substratlösung IV 1,900 ml  
 Leerwert: Küvette und Lösung IV; t = 25,0°C; λ = 405 nm;  
 d = 10 mm; s = 10–20 nm; nach ca. 1 min Extinktion E<sub>0</sub> und  
 exakt 1 min – 2 min – 3 min Extinktionen E<sup>x</sup> ablesen. Mittelwert ΔE/min bilden.

Berechnung der Chymotrypsinaktivität: U/g Stuhl = ΔE / min × 212 oder mittels Wertetabelle.

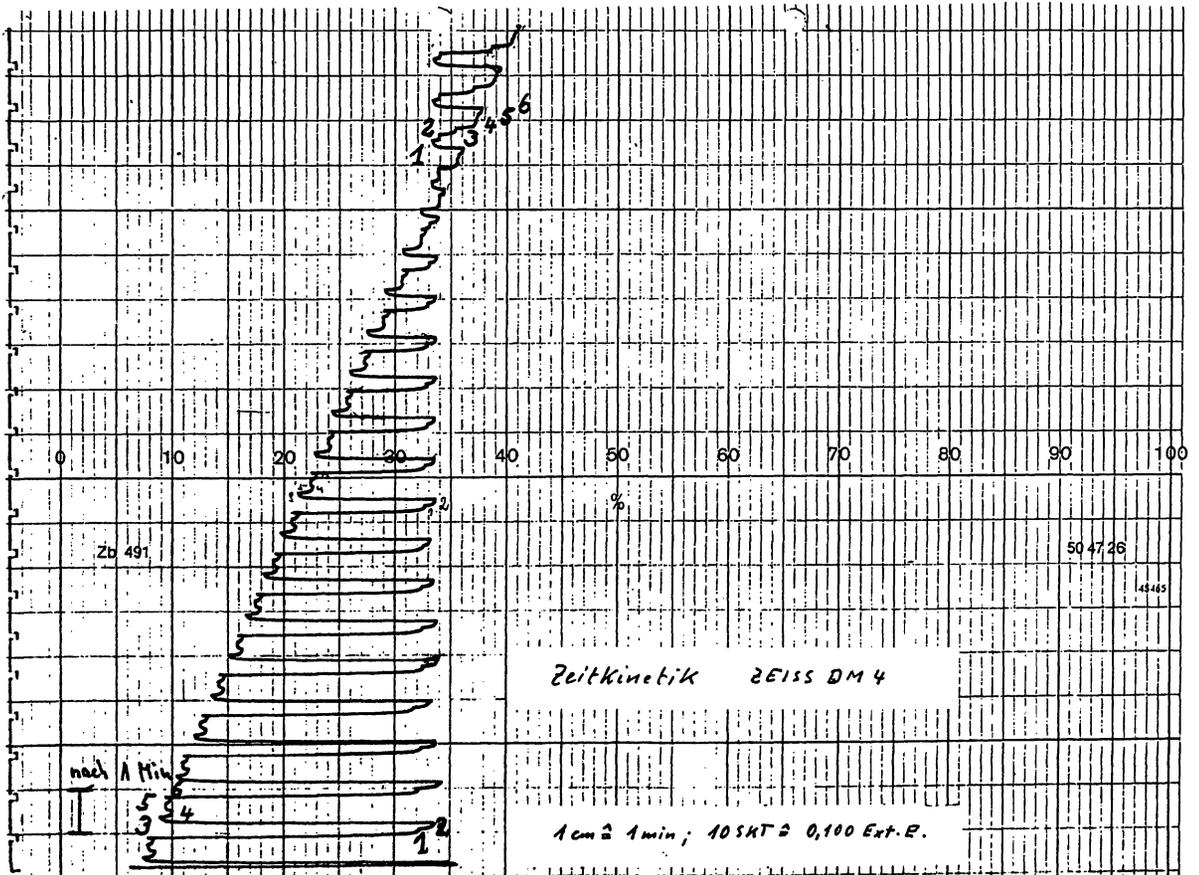


Abb. 1: Kinetik der photometrischen Messung. Originalregistrierung, Zeiss-Spektralphotometer DM 4 mit Küvettenwechsellautomatik ZVS 9 und Registrierschreiber Servogor Z 10. Zeitachse von unten nach oben, 1 cm = 1 min. Extinktionsachse von links nach rechts, 0 bis 100 SKT = E = 0 bis 1,0 (1 cm, 405 nm, 25°C). Position 1 und 3 sind 1:100-Extrakte zweier Stuhlspezimen; Position 2: Leerwert ohne Probe; Positionen 4, 5 und 6: Kontrollstuhlproben

## Statistik

Die mathematisch-statistische Auswertung erfolgte nach den üblichen Methoden auf einem Taschen-Computer Sharp PC-1500 mit Drucker, Plotter und Bandspeicher. Ausreißer wurden nach dem r-Test (56), Drift-Korrekturen nach Haeckel (57) durchgeführt. Alle Ausgleichsgeraden wurden nach Bablok-Passing berechnet. Die Beurteilung der „technischen“ Zuverlässigkeit basiert auf Werner (58–60). Für die Berechnung der Hauptkomponentenanalyse nach Bablok-Passing (61, 62) sei der Firma Boehringer ausdrücklich gedankt\*.

## Ergebnisse

### 1. Analytik der photometrischen Bestimmung

#### 1.1 Messung

##### 1.1.1 Meßsignal

Die optischen Eigenschaften des Reaktionsansatzes weisen keine Besonderheiten auf. Der Leerwert (Reagenzien + Serum) liegt um  $E_0$  (405 nm, 10 mm, 2 nm) = 0,01, die Extinktionszunahme bei Ansätzen mit Aktivitäten im Normalbereich um  $\Delta E = 0,1/\text{min}$ . Substrateigenhydrolyse innerhalb der Reaktionszeit tritt nicht auf (Abb. 1). Die lag-Periode liegt bei 2 bis 3 min, je nach Ausgangsextinktion. Die Messung erfolgt wie bei allen derartigen Messungen bei 405 nm in der steilen Flanke der Absorptionskurve:  $E_{390} = 0,62$ ;  $E_{400} = 0,45$ ;  $E_{410} = 0,35$  (Beispiel); die Eigentrübung des 1:100-Homogenats oder 1:100-Extrakts spielt keine Rolle mehr.

##### 1.1.2 Zeitabhängigkeit

Das Meßsignal steigt über mindestens 45 min linear an (Abb. 1).

##### 1.1.3 Konzentrationsabhängigkeit

Die Reaktionsgeschwindigkeit im klinisch wichtigen Aktivitätsbereich von 0 bis 30 U/g Stuhl folgt einer Reaktion 0. Ordnung. Die Regressionsanalyse ergibt eine lineare Beziehung mit einer hohen Korrelation der Meßwerte zwischen Konzentration und Extinktion,  $y = -0,0909 + 0,250x$ ,  $r = 0,9991$  (Abb. 2).

##### 1.1.4 Meßbereich

Überstände von Stuhlhomogenaten und Kontrollstuhlproben (Boehringer Mannheim) ergaben lineare Regressionskurven bei Extinktionsdifferenzen zwischen  $\Delta E/10 \text{ min} = 0,01$  bis 1,5.

Die untere Nachweisgrenze liegt bei 0,2–0,3 U/g (10 min-Messung). Bei höheren Aktivitäten, ab etwa 30 U/g sollte das Stuhlhomogenat 1:5 (v/v) verdünnt werden; dies bedeutet die obere Grenze des Meßbereichs bei Routinemessungen.

#### 1.2 Temperaturabhängigkeit

Die photometrische Aktivitätsbestimmung eines 1:100 Extraktes zweier Stuhlproben einer Patientin mit exokriner Pankreasinsuffizienz ergab einwandfreie Meßbarkeit bei verschiedenen Temperaturen mit vergleichbaren Quotienten (Tab. 1).

#### 1.3 Probenahme

##### 1.3.1 Verteilung im Stuhl

Bei 24-Std.-Stühlen mit fester, jedoch uneinheitlicher Konsistenz wurden je 20 Proben zu je ca. 100 mg an

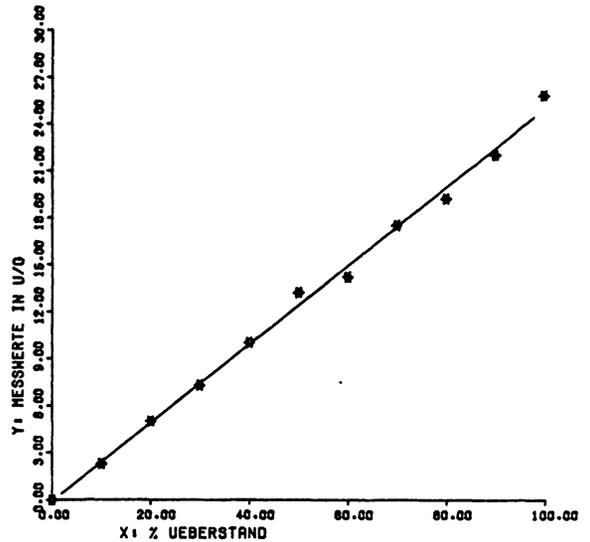


Abb. 2: Linearitätsbereich der photometrischen Messung. Abszisse: % Überstand eines 1:100-Extraktes. Ordinate: Meßwert in U/g

verschiedenen Stellen entnommen, in 10,0 ml Solvens 3 min homogenisiert und photometrisch analysiert. Die gefundenen Chymotrypsinaktivitäten lagen bei einem Stuhl zwischen 9,0 und 15,0, im Mittel 12,2 U/g, bei einem anderen Stuhl zwischen 20,0 und 25,0, im Mittel 22,6 U/g. Vergleiche mit der Titrimetrie an NaCl-Homogenaten ergaben ähnliche, nicht stärker streuende Werte.

##### 1.3.2 Dosierung nach Gewicht und Volumen

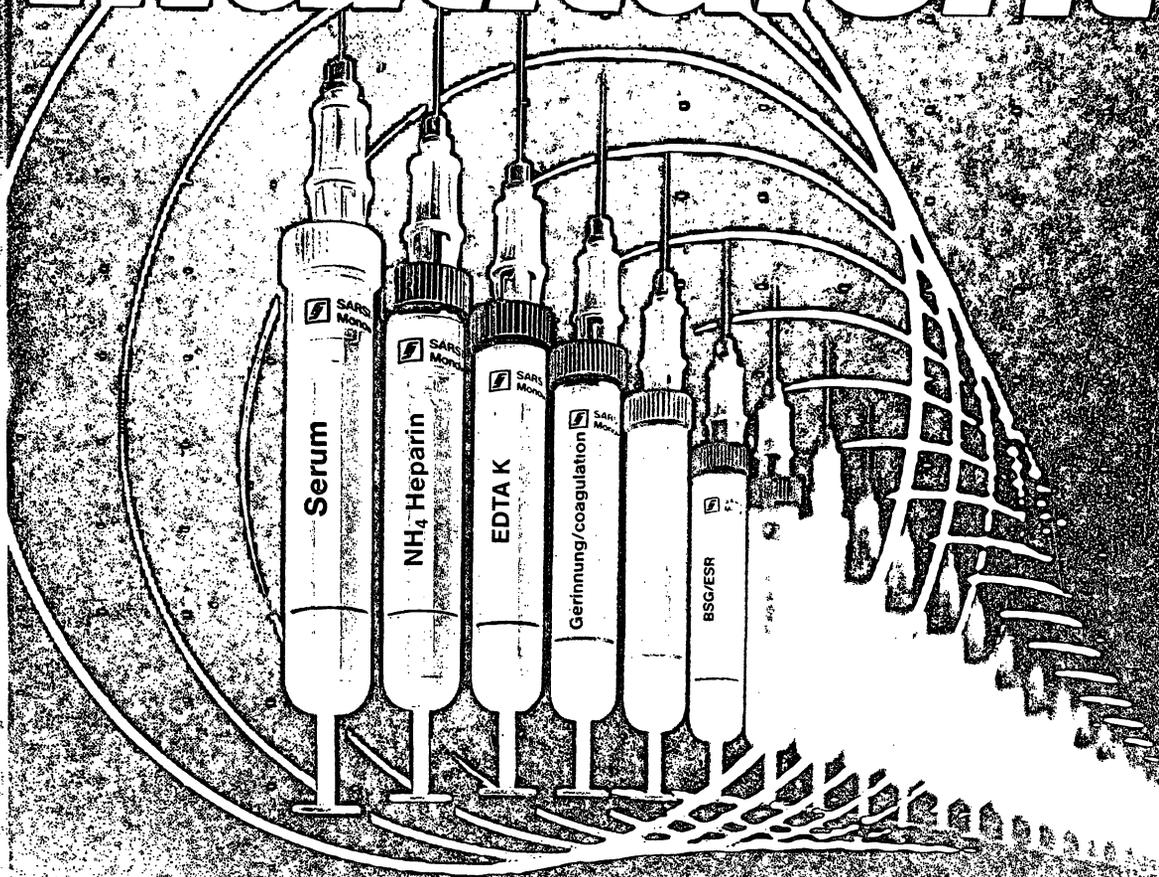
Die Ermittlung der eingesetzten Stuhlmenge erfolgte stets durch Wägung. Für die Praxis wurde vom Hersteller ein besonderes Probendosiergefäß entwickelt, das eine Mengenbestimmung über ein „eingestrichenes“ Volumen von ca. 100 µl vorsieht. – Bei 20 verschiedenen Stuhlproben mit titrimetrisch ermittelten Chymotrypsinaktivitäten von 3–35 U/g wurden aus zwei eng benachbarten Stellen je eine Probe zu 100 mg eingewogen bzw. in den Boden des Dosiergefäßes eingestrichen. Nach Homogenisieren unter gleichen Bedingungen im Probendosiergefäß und Zentrifugieren wurde die Aktivität bestimmt. Die Regressionsanalyse ergab eine sehr gute Übereinstimmung,  $r = 0,937$ . Die Mittelwerte differieren um 0,68 U/g entsprechend 6,4%. Die Regression von y (Einstrich) auf x (Einwaage) lautet:  $y = -0,451 + 0,986x$ ; von x auf y:  $y = -2,647 + 1,122x$ ; die standardisierte Hauptkomponentenanalyse:  $y = -1,514 + 1,051x$ ,  $r = 0,937$  (Abb. 3).

Tab. 1: Temperaturabhängigkeit. Photometrische Bestimmung mit Monotest®-Chymotrypsin an 1:100-Extrakten von zwei Stuhlproben bei drei Meßtemperaturen. n = Anzahl der Bestimmungen;  $\bar{x}$  = Arithmetischer Mittelwert in U/g; T = Temperatur in °C

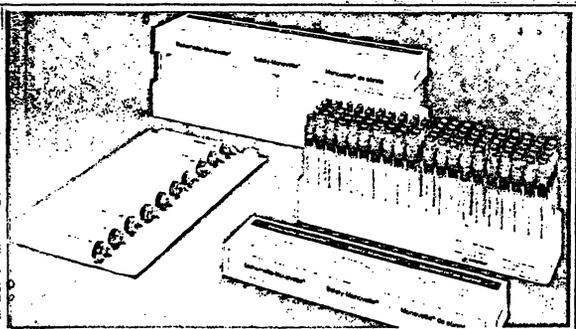
Stuhlprobe	n	Spezifische Aktivität $\bar{x}$ bei T =			$\bar{Q}_{37/25^\circ\text{C}}$
		25,0 °C	30,0 °C	37,0 °C	
1	5	8,06	9,74	15,3	1,89
2	5	7,52	8,95	12,7	1,68

\* Die neueste Abhandlung (63) kam uns erst nach Manuskriptabfassung zur Kenntnis.

# Das Multitalent



## Sicherheits-Monovette



**sterilisiert**  
**in praktischer Ständerverpackung**  
– Packung in zwei Hälften teilbar –  
**oder einzeln steril**  
**in Blisterverpackung**

Die Monovette®  
für jeden individuellen  
Anspruch!

 **SARSTEDT**

IG SARSTEDT · Rommelsdorf · 5223 Nümbrecht · Telefon (0 22 93) 523  
SARSTEDT AG · Postfach · 9475 Sevelen/SG · Telefon (0 85) 522 22

Wir bitten um nähere Informationen  
über die Sicherheits-Monovette

enter

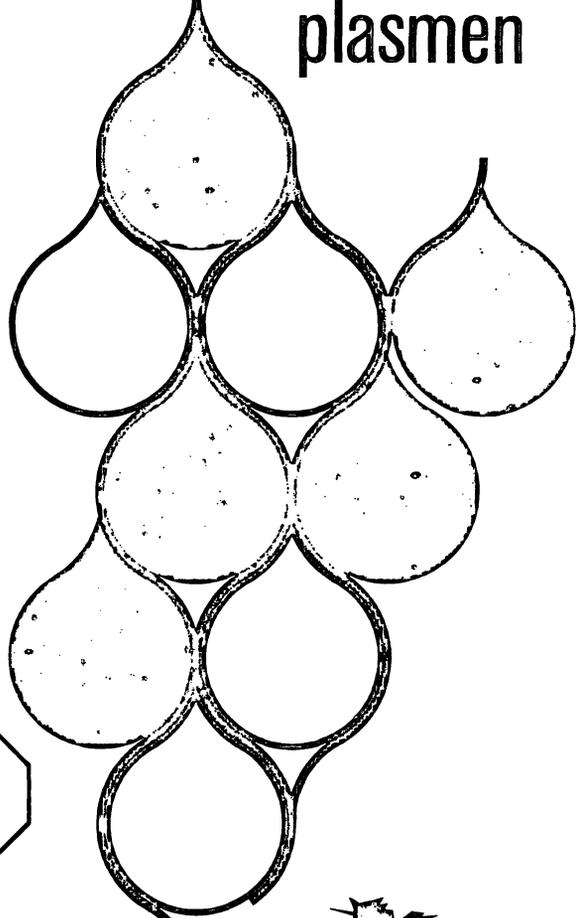
# Diacrom<sup>®</sup>

Gerinnungsdiagnostica  
mit Chromogenen  
Substraten

messen exakt

- nur ein Pipettivolumen
- auch automatengerecht
- standardisiert

AT III  
Heparin  
Faktor X  
PLG  
+ Kontroll-  
plasmen



Deutsche Wellcome GmbH  
Abteilung Diagnostica  
Postfach 109  
3006 Burgwedel 1  
Telefon (0 51 39) 30 01  
Telex 09 22 799 welco d



**Wellcome  
Diagnostica**

## 1.4 Ablösung der Enzymaktivität von den Stuhlpartikeln

### 1.4.1 Extraktion und Zentrifugierung

An Stuhlspezimen von 3 Patienten mit und ohne exokriner Pankreasinsuffizienz wurden je 20 Proben zu je 100–150 mg eingewogen und im Extraktionsmedium homogenisiert. Jeweils aliquote Teile wurden zusätzlich 5 min bei 4400 UpM (=2000×g) zentrifugiert und die Überstände photometriert. Alle Proben wurden auch titrimetrisch analysiert. In den 1:100-Extraktionen fanden sich durchwegs etwas geringere Enzymaktivitäten als in den 1:100-Homogenaten. Ursache ist nicht eine Instabilität des Chymotrypsins unter den Bedingungen der Zentrifugation und im Extraktionsmedium (Tab. 2).

### 1.4.2 Zentrifugierdauer

Ein Stuhl eines Patienten mit exokriner Pankreasinsuffizienz wurde unter den bei 1.4.1 genannten Bedingungen verarbeitet. Es ergaben sich im Homogenat (Fünffach-Bestimmungen) 6,06 U/g, nach 5 min Zentrifugieren 5,96 U/g und nach 15 min 5,90 U/g. Damit war eine Zeitabhängigkeit der Zentrifugierung in diesem Bereich auszuschließen.

### 1.4.3 Homogenisierungsdauer

Untersuchungen mit dem vom Hersteller entwickelten Probendosiersystem erbrachten Hinweise, daß Art oder Beschaffenheit des Stuhles nicht ohne Einfluß ist. Von 20 Stühlen wurden je eine Probe zu ca. 100 mg in die Dosierkammer des Probendosiergefäßes eingestrichen, mit 10 ml Extraktionsmedium wie vorgeschrieben im System homogenisiert, zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen, zentrifugiert (= 1:100-Extrakte) und analysiert. Mit zunehmender Homogenisierzeit nimmt die Enzymaktivität in vielen Fällen zu (Abb. 4 und Tab. 3). In der Praxis dürfte eine Homogenisierzeit von 3 min ausreichen. Bei der konventionellen Herstellung von 1:10- und 1:100-Homogenaten ist nach 1–2 min eine Konstanz festgestellt worden.

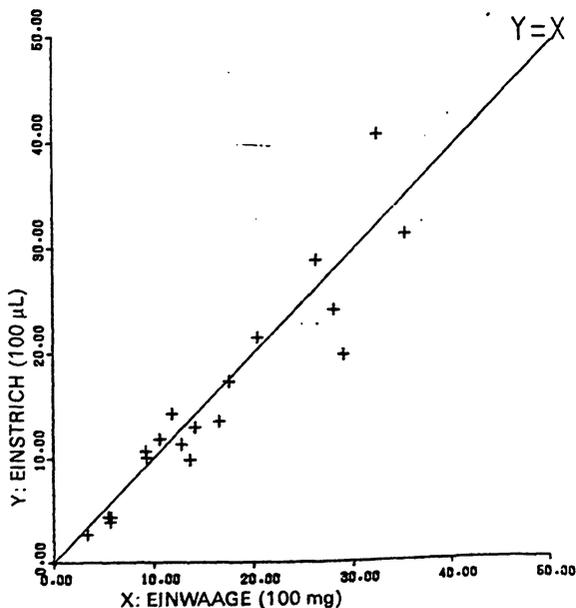


Abb. 3: Dosierung der Stuhlprobe für die photometrische Bestimmung. Abszisse: Einwaage der Stuhlprobe in mg. Ordinate: Einstrich der Stuhlprobe in µl in den Boden des Dosiergefäßes des Probenvorbereitungssystems. Vergleich der gefundenen Chymotrypsinaktivitäten in U/g für beide Verfahren

Tab. 2: Extraktion und Zentrifugation. Photometrische Bestimmung mit Monotest®-Chymotrypsin an 1:100-Homogenaten und 1:100-Extrakten (Herstellung siehe Text) von drei Stuhlspezimen in zwei Aktivitätsbereichen. n = Anzahl der Bestimmungen;  $\bar{x}$  = Arithmetrischer Mittelwert in U/g; s = Streuung in U/g; V = Variationskoeffizient in %

Stuhlprobe Nr.	1:100-Homogenate				1:100-Extrakte			
	n	$\bar{x}$	s	VK	n	$\bar{x}$	s	VK
1	20	7,49	0,98	13,1	20	6,35	0,38	5,39
2	20	7,54	0,90	11,9	20	6,33	0,44	6,98
3	20	33,1	1,90	5,69	20	23,0	1,55	6,76

Tab. 3: Homogenisierungsdauer. Einfluß der Homogenisierzeit auf die Chymotrypsin-Aktivität im 1:100-Extrakt. 20 verschiedene Stühle in verschiedenen Aktivitätsbereichen. Zahlenwert in U/g

Stuhlprobe	Homogenisierzeit (min)		
	0,5	1	3
1	28,8	33,7	36,3
2	18,4	33,8	56,8
3	14,0	28,8	39,2
4	40,9	43,4	42,0
5	46,2	45,8	49,8
6	16,7	18,4	18,2
7	38,8	38,0	42,6
8	5,3	21,4	24,8
9	20,8	21,6	26,9
10	20,1	23,3	24,4
11	11,9	13,8	14,4
12	15,7	28,2	32,4
13	11,7	21,0	27,6
14	11,0	23,3	46,7
15	17,2	21,4	22,1
16	17,2	18,5	20,7
17	16,1	17,9	20,2
18	17,2	20,0	23,4
19	20,4	26,9	27,7
20	27,2	38,4	59,0

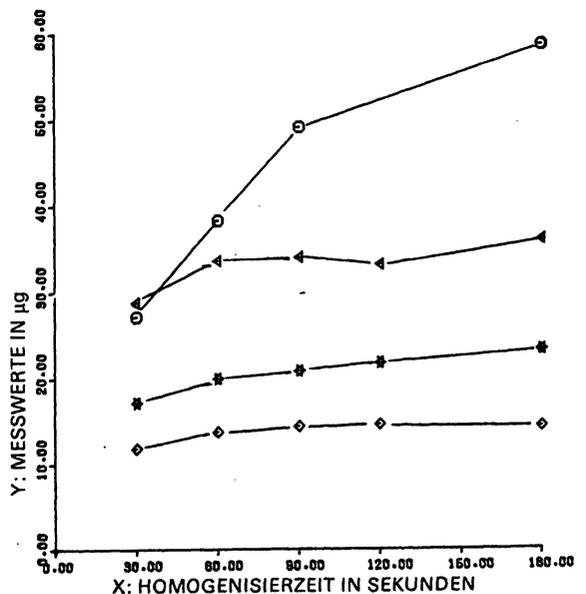


Abb. 4: Homogenisierungsdauer der Stuhlprobe für die photometrische Bestimmung. Abszisse: Homogenisierungsdauer im Probenvorbereitungssystem. Ordinate: Meßwerte im 1:100-Extrakt in U/g. Die verschiedenen Symbole bedeuten verschiedene Stuhlspezimen von 4 Patienten

## 2. Qualitätssicherung

### 2.1 Präzision

#### 2.1.1 Präzision in Serie

Die Präzision der photometrischen Bestimmung in Serie ist praktisch unabhängig von der Beschaffenheit der Stühle. Der Gesamtbereich der Unpräzision  $VK_s$  (6 Stuhl-spezimen, 67 Homogenate, 93 Messungen) liegt zwischen 2,55 bis 13,1%, im Mittel aus 2 Homogenaten und 2×20 Messungen bei 9,4%. Im niedrigen Bereich ergeben sich  $VK$ 's von 11,9%, im höheren von 5,7%. Bei zentrifugierten Extrakten finden sich bessere Präzisionen:  $VK = 6,1\%$  (normaler Bereich), 7,7% (erniedrigter) und 4,7% (höherer Bereich). Eine sehr gute Präzision erhielten wir an den vom Hersteller zur Verfügung gestellten Kontrollproben,  $VK_s = 2,55\%$  (Tab. 4).

#### 2.1.2 Präzision von Tag zu Tag

Für diese Untersuchungen wurden zwei vom Hersteller zur Verfügung gestellte Kontrollproben eingesetzt. Homogenisierung, Extraktion und Zentrifugation erfolgten nach der Herstellervorschrift. Messungen in unabhängigen Serien erbrachten gute, teilweise sehr gute Präzisionswerte von  $VK = 1,57-5,77\%$  (Tab. 5). Titrimetrische Bestimmungen an den gleichen Kontrollmaterialien ergaben deutlich geringere Präzisionen:  $\bar{x} = 27,7$  U/g,  $VK = 14,6\%$  ( $n = 5 \times 2$ );  $\bar{x} = 52,0$  U/g,  $VK = 7,69\%$  ( $5 \times 2$ ). Die interne tägliche Präzision im Untersuchungszeitraum mit eingefrorenen, portionierten Proben eines gepoolten Stuhlhomogenats ergab über 4 Monate hinweg bei 27 U/g  $VK$ -Werte von 11,0–14,5%, bei 52 U/g solche von 9,2%.

### 2.2 Richtigkeit

Zur Spezifität der Chymotrypsinbestimmung wurden keine systematischen Studien durchgeführt. Orientierende photometrische Messungen mit 4× krist. Trypsin ergaben eine lineare Regression mit relativ hohen Enzymkonzentrationen bis zu 1260 µg/ml; bei der Entscheidungsgrenze von 3 U/g entspricht dies einer Spezifität von wenigstens 99,9% für α-Chymotrypsin.

### 2.3 In vitro-Interferenzen

Entsprechende Untersuchungen sind für spätere Studien vorgesehen.

## 3. Methodenvergleich

### 3.1 Erwachsene, Kinder, Kleinkinder, Säuglinge

Untersucht wurden 453 Stuhlproben von 334 Patienten. Das Kollektiv bestand aus 157 Erwachsenen, 98 Kindern und Kleinkindern, 22 Säuglingen und 47 Neugeborenen, darunter 6 Mekonium-Stühle, und 10 Stühle von 4 Patienten mit cystischer Fibrose sowie 3 Frühgeborenen. Bei 281 Stühlen von 228 Patienten konnten beide Methoden an dem gleichen Stuhl-Spezimen vergleichend durchgeführt werden (Tab. 6 und 7). Mittelwerte, Mediane, Standardabweichungen, 1-s-Bereiche, Regressionsdaten und Aktivitätsquotienten für die Unterkollektive sind in Tab. 6 dargestellt. Die Histogramme zeigen durchwegs rechtsschiefe Verteilungen mit verschiedener Spannweite (Abb. 5).

Die arithmetrischen Mittelwerte und Mediane liegen zwischen 32,6 bis 35,2 U/g und 24–35 U/g bei der Titrimetrie, zwischen 4,8 bis 15,4 U/g und 11–16 U/g bei

Tab. 4: Präzision in Serie. Variationskoeffizienten bei verschiedenen Stuhlspezimen, verschiedenen Temperaturen und verschiedener Probenvorbereitung. Photometrische Bestimmung mit Monotest®-Chymotrypsin. A–F: Stuhlspezimen verschiedener Konsistenz. Homogenat und Extrakt: 1:100; n = Anzahl der Homogenate bzw. Extrakte pro Spezimen; m = Anzahl der Bestimmungen pro Homogenat bzw. Extrakt; T,  $\bar{x}$ , VK = siehe Legende Tab. 1 und 2. \* Mit Kontrollproben und Probenvorbereitungssystem des Herstellers

Stuhl	Konsistenz	Probematerial	n	m	T (°C)	$\bar{x}$ (U/g)	VK (%)
A	weich, homogen	Homogenat	1	20	25	7,49	13,1
B	fest, homogen	Homogenat	1	20	25	33,1	5,69
C	fest, inhomogen	Homogenat	10	1	25	8,06	7,44
C	fest, inhomogen	Homogenat	5	2	25	8,08	7,47
C	fest, inhomogen	Homogenat	5	2	30	9,74	9,07
C	fest, inhomogen	Homogenat	5	2	37	15,3	6,19
D	fest, homogen	Homogenat	20	1	25	12,6	6,63
E	flüssig	Homogenat	20	1	25	3,53	11,9
A	weich, homogen	Extrakt	1	20	25	6,53	5,35
B	fest, homogen	Extrakt	1	20	25	22,9	6,75
C	fest, inhomogen	Extrakt	10	1	25	5,69	10,1
F	Kontrollstuhl	Extrakt	5	3	25	18,7	2,55*
Insgesamt	Normalbereich	Homogenat			25	60	8,66
	erniedrigter Bereich	Homogenat			25	20	11,9
	erhöhter Bereich	Homogenat			25	20	5,69
	Normalbereich	Überstand			25	30	7,71
	erhöhter Bereich	Überstand			25	35	4,65
	Kontrollstuhl	Überstand			25	19	2,55

Tab. 5: Präzision von Tag zu Tag. Siehe Legende zu Tab. 4

Stuhl-Spezimen	Probematerial	n	m	T (°C)	$\bar{x}$ (U/g)	VK (%)
Kontrollproben	Lösung	5	2	25	5,74	1,57
Kontrollproben	Lösung	11	2	25	5,72	5,77
Kontrollstuhl	Überstand	5	10	25	18,8	5,30

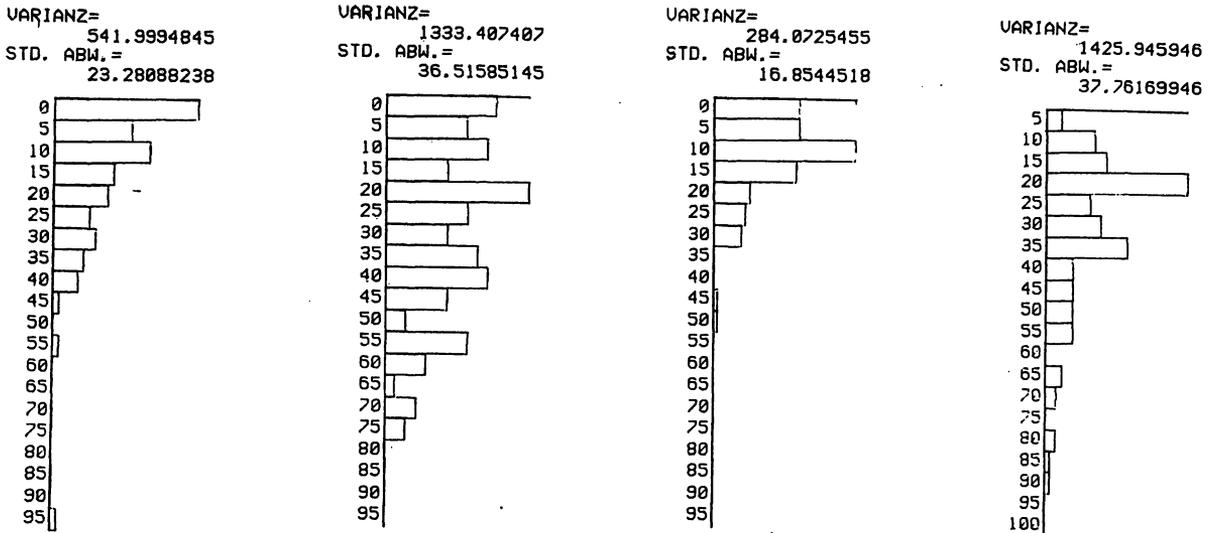


Abb. 5: Histogramme der Chymotrypsin-Aktivitäten im Stuhl bei Erwachsenen und Kindern, titrimetrische und photometrische Methode. Von rechts nach links: Erwachsene (n = 111) Titrimetrie - Photometrie; Kinder (n = 108) Titrimetrie - Photometrie

der Photometrie. Letztere zeigt deutlich geringere Streuungen. Eine Altersabhängigkeit ist nicht erkennbar, bei Neugeborenen noch unklar. Die Regressionsanalyse ergibt Hinweise für unterschiedliches Verhalten. Die Geraden  $y = a + bx$  gehen bei allen Kollektiven mit gewissen Schwankungen von a durch den Nullpunkt, unterscheiden sich aber hinsichtlich ihrer Steigungen und Korrelationen: für Erwachsene und Kinder wird  $b = 0,36-0,41$ , für Säuglinge und Neugeborene  $b = 7,03$  und  $7,91$ . Bei Erwachsenen und Kindern korrelieren die Wertepaare mit  $r = 0,793$  bis  $0,872$ , im Mittel  $0,816$ , recht gut, bei Säuglingen und Neugeborenen mit  $0,399$  und  $0,441$  kaum mehr. Die Mittelwerte der Titrimetrie sind um den Faktor  $f = 2,00$  bis  $2,69$ , im Mittel  $2,38$  Erwachsene und Kinder) bzw.  $f = 2,67$  bis  $2,79$  (Säuglinge und Neugeborene) höher als die der Photometrie.

Einzelwerte bei Neugeborenen sind in Tab. 7 aufgeschlüsselt. Frühgeborene weisen keine Besonderheiten auf. Auch Mekonium-Stühle ergeben mit beiden Methoden Werte wie die Stühle unauffälliger Neugeborener im Bereich von 18-44 und 16-93 U/g (Titrimetrie) bzw. 9-20 und 7-16 U/g (Photometrie). 3 von 4 Neugeborenen mit cystischer Fibrose zeigen bei der Titration aller 7 untersuchten Stühle erniedrigte Werte von 4-15 U/g. Bei der Photometrie sind die Stuhlaktivitäten zwar ebenfalls erniedrigt, liegen mit 1,6-7,3 U/g jedoch meist über dem vom Hersteller angegebenen vorläufigen Richtwert von 3 U/g als Normgrenze.

Die Einzelauswertung der Krankenblätter zeigt allerdings, daß eine Enzymsubstitution in einigen Fällen angenommen werden muß, manche der aufgeführten Daten daher

Tab. 6: Methodenvergleich und Altersabhängigkeit. Photometrische Bestimmung mit Monotest®-Chymotrypsin in 1:100-Extrakten und titrimetrische Bestimmung nach (42) in 1:10-Homogenaten. M = Median; Bereich:  $-1s \leq M \leq +1s$  bei rechts-schiefer Verteilung; f = Quotient  $\bar{x}/\bar{y}$ ; r = Korrelationskoeffizient;  $y = a + bx$  = Regressionsgeradengleichung; n = Anzahl der Patienten; m = Anzahl der untersuchten Stühle dieser Patienten. Sonstige Abkürzungen siehe Tab. 2

Patienten	Alter	Anzahl	Titrimetrie				Photometrie				Vergleich					
			n	m	$\bar{x}$	s	M	Bereich	$\bar{y}$	s	M	Bereich	f	r	$y = a + bx$	
Erwachsene I	16a	50	50	37,7	13,2	35	24,5-50,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Erwachsene II	16a	58	61	38,3	18,2	34	19,0-55,4	13,2	8,4	14	5,4-22,2	2,69	0,793	-0,39-0,36x		
Erwachsene III	16a	49	49	29,2	8,9	27	19,3-38,1	14,0	9,9	13	5,1-22,9	2,08	0,839	2,30+0,40x		
Kinder	2-14a	92	104	34,5	27,2	32	7,3-61,7	17,7	15,4	16	2,3-33,1	2,00	0,872	-0,47+0,41x		
Kleinkinder	1-3a	6	18	33,4	14,8	32	18,6-48,2	-	-	-	-	-	-	-		
Säuglinge I	3-9m	8	19	28,3	20,8	24	7,4-49,1	10,6	4,8	11	5,8-15,4	2,67	0,399	0,09+7,91x		
Säuglinge II	2-6m	14	40	40,7	23,0	34	17,7-63,7	-	-	-	-	-	-	-		
Neugeborene	1-30d	43	79	32,6	20,0	31	12,6-52,6	13,7	6,4	14	7,4-20,1	2,79	0,441	0,11+7,03x		
Alle Erwachsenen				35,2	13,4	(n=157,m=160)	13,6	8,7	(n=107,m=110)	2,38	0,816					
Kinder				34,0	21,0	(n=98,m=122)	17,7	15,4	(n=92,m=104)	2,00	0,872					
Säuglinge				34,5	21,9	(n=22,m=59)	10,6	4,8	(n=8,m=19)	2,67	0,309					
Neugeborene				32,6	20,0	(n=43,m=79)	13,7	6,4	(n=7,m=15)	2,79	0,441					

Tab. 7: Methodenvergleich an Neugeborenen. 7 Neugeborene mit 15 Stuhlspezimen, darunter 6 Mekoniumstühle; 4 Neugeborene mit Hinweis oder Verdacht auf Vorliegen einer Mukoviszidose; 3 Frühgeborene. Insgesamt 333 Stuhlspezimen. Spanne: Aktivitätsbereich zwischen Minimal- und Maximalwerten. Zahlenwerte in ( ) = unerwartete, nicht plausible, nicht als Ausreißer deklarierbare und daher nicht eliminierbare Meßwerte. Vorgehen wie bei Tab. 6

Patienten		Alter (d)	Titrimetrie		Photometrie		f (x/y)
			x	Spanne	y	Spanne	
Frühgeborene:	M. ♂	2	58		12,6		4,60
		3	20		5,3		3,80
	Sch. A. ♀	45	15		3,7		4,05
		46	24	14-61	6,6	4-14	3,65
		49	22		8,2		2,68
	Sch. E. ♀	29	14		5,5		2,54
		30	61		14,4		4,10
31		28		5,9		4,74	
Neugeborene: unauffällig	K. ♀	7	16		14,2		1,12
		8	24		7,4		3,24
		9	25		11,2		2,23
	K. ♂	7	38	16-93	11,8	7-16	3,22
		8	39		15,1		2,58
		9	38		12,2		3,11
	St. ♂	2	84		15,9		5,28
		3	93		14,4		(6,46)
		4	36		11,2		3,21
Neugeborene: Cystische Fibrose	Co. ♀	2	13		5,7		2,27
		3	8		4,0		1,99
		4	10		4,8		2,05
	Th. ♂	3	13		5,3		2,46
	Schm. G. ♀	3	(49)	4-36	(17,3)	2-12	2,82
		4	36		11,9		3,09
		6	18		6,9		2,60
	Schm. J. ♀	3	4		1,6		2,45
4		11		6,1		1,80	
5		15		7,3		2,05	
Neugeborene: Mekonium	Ab. ♂	2	21		8,9		2,35
	Ro. ♂	3	9		10,6		0,84
	Schl. ♂	2	18	18-44	11,2	9-20	1,60
	Wa. ♀	2	19		12,5		1,52
		3	21		17,4		1,21
4	44	20,1	21,8				

Tab. 8: Vorläufige Grenzwerte. Versuch einer Festlegung eines vorläufigen Grenzwertes für die photometrische Bestimmung

Patienten	n	Methode	Bereich	Anteilsquoten
Erwachsene	111	Titrimetrie Photometrie	bis 17 U/g	14/111 = 12,6%
			bis 3 U/g	3/111 = 2,7%
			bis 4 U/g	13/111 = 11,7%
			bis 5 U/g	31/111 = 27,9%
Kinder	106	Titrimetrie	bis 17 U/g	31/106 = 29,2%
			bis 3 U/g	15/106 = 14,1%
			4 U/g	35/106 = 34,0%
			5 U/g	60/106 = 56,6%

Tab. 9: Ermittlung der technischen Verlässlichkeit. Technische Spezifität und Sensitivität der photometrischen Methode bei einem Grenzwert von 4 U/g, bezogen auf die titrimetrische Methode mit einer Normbereichsgrenze von 17 U/g. Nach Werner (58)

Kollektiv	Titrimetrie	Photometrie		
		bis 4 U/g	über 4 U/g	Σ
Erwachsene (n = 111)	bis 17 U/g	11	9	20
	über 17 U/g	1	90	91
	Σ	12	91	111
Kinder (n = 106)	bis 17 U/g	20	10	30
	über 17 U/g	1	75	76
	Σ	21	85	106
Technische	Sensitivität	P (T/K)	Spezifität	P (T̄/K̄)
Erwachsene		0,92		0,95
Kinder		0,81		0,88

relativiert werden müssen. Hier scheint die Titrimetrie treffsicherer zu sein.

### 3.2 Vorläufige Normwerte

Die Ergebnisse an Kindern, Säuglingen und Neugeborenen deuten darauf hin, daß bei der Titrimetrie die für Erwachsene geltende Normbereichsgrenze von 17 U/g auch für Kinder, Kleinkinder, Säuglinge und Neugeborene angenommen werden kann.

Bis zum Vorliegen sorgfältiger Studien wird daher auch für Kinder im Alter von 5 Tagen bis 14 Jahren eine Normwertgrenze von 17 U/g vorgeschlagen. Für die Photometrie dürfte die vom Hersteller angegebene vorläufige Richtwertgrenze von 3 U/g zu niedrig angesetzt sein, zumindest für Kinder (Abb. 5). Eine Analyse der Trefferquote zeigt, daß bei Annahme einer Grenze von 4 U/g eine deutlich bessere Übereinstimmung zur Titrimetrie resultiert. Bei Erwachsenen werden mittels Titrimetrie 12,6% mit Werten unter 17 U/g, mittels Photometrie 11,7% mit Werten unter 4 U/g als verdächtig pathologisch erniedrigt selektiert; für Kinder lauten die Werte 29,2% und 34,0% (Tab. 8). Für Neugeborene lassen sich noch keine Normwerte vorschlagen.

Als vorläufiger Richtwert für die Photometrie werden 4 U/g vorgeschlagen. In diesem Fall ergibt die Beurteilung der technischen Verlässlichkeit nach Werner (58), bezogen auf die Ergebnisse der Titrimetrie, sinnvolle und recht gute Daten von 0,92–0,95 für die technische Sensitivität und 0,81–0,88 für die technische Spezifität (Tab. 9).

## Diskussion

Die vorgestellten Ergebnisse fügen sich gut in den Rahmen der Literaturangaben.

Die Frage der Dosierung der eingesetzten Stuhlmenge nach Gewicht und Volumen, d. h. Einwaage oder Einstreichen in das Probenvorbereitungssystem erscheint unterschieden. Theoretisch sollte eine Einwaage von 3–5 g (42) für die Titrimetrie gegenüber der von ca. 100 µg für die Photometrie präzisere und richtigere Ergebnisse erwarten lassen. Unsere Vergleichsmessungen zeigten jedoch eine gute Übereinstimmung. Das „Einstreichverfahren“ kann aufgrund der empirischen Erfahrungen nicht mehr nur auf der Grundlage theoretischer Überlegungen abgelehnt werden. Trotzdem ziehen wir bei pathologischen oder inhomogenen Stühlen eine Dosierung mittels Einwaage vor.

Die Chymotrypsin-Aktivität dürfte in einem Stuhl von normaler Beschaffenheit ziemlich gleichmäßig verteilt sein. Unsere Ergebnisse an 20 Proben von verschiedenen Stellen eines Stuhlspezimens zeigten für beide Analyseverfahren eine relativ geringe Streuung. Die Reproduzierbarkeit reicht für Routineuntersuchungen mit „ja-nein“-Aussagen (< oder > 4 U/g) sicher aus.

Die Angaben zur Dauer der Homogenisierung variieren. Bei manchen Stühlen fanden wir noch nach 2 min Aktivitätszuwachs, obgleich die Konsistenz der meisten Stuhlproben schon nach kürzeren Zeiten eine vollständige Ablösung ermöglicht. Wir schlagen daher eine generelle Homogenisierzeit von 3 min vor. Dies gilt auch bei Verwendung des Probenvorbereitungssystems bei ca. 100 µg Einwaage. Für andere Homogenisierungsarten, z. B. Einwaage von 3–5 g in Kunststoffbeutelchen und Homogenisierung in einem „Stomacher“ (42) reichen 1–2 min aus.

Die Angaben des Herstellers über die Ablösbarkeit des Chymotrypsins werden, wenn auch quantitativ etwas differenziert, bestätigt (Tab. 2). Die Ergebnisse der Titrimetrie gleichen denen der Photometrie. Der Hersteller gibt an:  $y$  (Homogenat) =  $-0,353 + 0,897x$  (Extrakt) ( $r = 0,9903$ ;  $n = 97$ ; 0–70 U/g Photometrie) (51) und  $y = -0,162 + 0,962x$  ( $r = 0,990$ ;  $n = 57$ , 0–40 U/g Photometrie) (54, 55); mittlere Differenz der Mittelwerte: 3%. Die Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{max}$  erhöht sich daher von 16 auf 142 U/l, der  $K_m$ -Wert nähert sich dem des reinen Chymotrypsins (Kaspar).

Die von uns angegebene Verdünnungsgrenze von ca. 30 U/g entspricht der vom Hersteller des photometrischen Tests angegebenen Grenze von ca. 20 U/g (BM-Info) bzw.  $\Delta E/\min = 0,100$  (BM Wien).

Die anschließende Zentrifugierung birgt keine Schwierigkeiten: 4 min bei 1700 × g (3000 UpM) in einer normalen Laborzentrifuge oder 20 sec bei 12000 × g in einer Mikroliterzentrifuge reichen zur Sedimentierung aus. Reste flotierender oder suspendierter Partikel stören bei der anschließenden photometrischen Bestimmung nicht. Längeres Zentrifugieren ist unnötig. Das Enzym ist nach dem Ablösen hinreichend stabil; erst nach 50 Std. treten bei Raumtemperaturen 20–50% Verluste auf (Kaspar, 51b). Die ermittelten Daten für die Präzision der photometrischen Bestimmung entsprechen ebenfalls denen der Literatur. Für die Präzision in Serie liegen folgende Angaben vor:  $VK_s = 3,7\%$  (in zwei Bereichen,  $n = 2 \times 10$ ) (10); 2,0% (4,6 U/g,  $n = 20$ ) und 1,9% (17,7 U/g,  $n = 20$ ), sowie 9,8% (1,3 U/g), 3,5% (8,1 U/g) und 3,1% (26 U/g) (54) und weiterhin 3% (8,0 U/g,  $n = 6$ ), 5% (95 U/g,  $n = 6$ ) und 8% (1,32 U/g,  $n = 6$ ) (55). Realistischer und unseren Werten näherstehend erscheinen die Angaben von Junge: 13,9% (1,51 U/g,  $n = 10$ ) und 3,9% (22,4 U/g,  $n = 10$ ) (22). Alle Daten gelten für die Photometrie, die damit in der gleichen Größenordnung wie die der Titrimetrie liegen: 1,8% (zwei Bereiche,  $n = 2 \times 10$ ) (10) oder 11,2% (23,5 U/g,  $n = 19$ ) und 6,4% (48,5 U/g,  $n = 10$ ) (42).

Die Angaben zum Methodenvergleich seien tabellarisch zusammengestellt; die vorgelegten Ergebnisse ergänzen diese sinnvoll:  $y = 0,072 + 0,034x$ ,  $r = 0,931$ ,  $n = 64$ , Erwachsene 0–7 U/g (10);  $y = 0,338 + 0,028x$ ,  $r = 0,975$ ,  $n = 123$ , Erwachsene (10);  $y = 0,173 + 0,192x$ ,  $r = 0,932$ ,  $n = 48$ , Erwachsene (22);  $y = 0,187 + 4,640x$ ,  $r = 0,9738$ ,  $n = 97$ , Homogenat (51, 55);  $y = 4,129 + 5,018x$ ,  $r = 0,9542$ ,  $n = 97$ , Überstand (51).

Hinsichtlich der Grenzen der guten Übereinstimmung zwischen beiden Methoden bei Säuglingen, Neugeborenen oder Kindern mit Mukoviszidose sei auf den Abschnitt „Ergebnisse“ verwiesen. Die Ursache der geringeren Korrelation bei Neugeborenen könnte mit systematischen Differenzen zwischen beiden Methoden erklärt werden.

Nach wie vor unsicher ist die Frage der Normwertgrenzen bei der photometrischen Chymotrypsinbestimmung. Der vom Hersteller als „vorläufig“ angegebene Richtwert von 3 U/g bedarf einer gründlichen Überprüfung. Dies gilt vor allem für Neugeborene und Säuglinge als Entscheidungshilfe für die Diagnosestellung „Mukoviszidose“, aber auch bei Erwachsenen zur Beurteilung des Schweregrades einer exokrinen Pankreasinsuffizienz bzw. der Restfunktion des Pankreas.

Aufgrund der vorgelegten Befunde wird als Richtwert für die photometrische Bestimmung 4 U/g unter Beibehal-

tung von 17 U/g für die titrimetrische Bestimmung (bislang bei uns über 8000 Analysen) vorgeschlagen.

Auf die klinische diagnostische Relevanz beider Verfahren sei hier nicht eingegangen.

#### Schrifttum

1. STANIEK, A. Beitrag zur Funktionsprüfung des Pankreas. *Med. Klin.* 26, 1023-1025 (1908).
2. HAVERBACK, B. J., DYCE, B. J., GUTENTAG, P. J., MONTGOMERY, D. W.: Measurement of Trypsin and Chymotrypsin in Stool. *Gastroenterology* 44, 588-597 (1963).
3. AMMANN, R., DYCK, W., ROSENEMUND, H., BEN ABRAHAM, R.: Bestimmung der Trypsin- und Chymotrypsinaktivität im Stuhl. Eine sensible, spezifische Methode zum Nachweis der exokrinen Pankreasinsuffizienz. *Klin. Wschr.* 42, 553-555 (1964).
4. AMMANN, R., KASHIWAGI, H.: Pancreatic exocrine insufficiency and proteolytic enzymes in stool. *Helv. med. Acta* 33, 220-228 (1966).
5. AMMANN, R., TAGWERCKER, E., KASHIWAGI, H., ROSENEMUND, H.: Diagnostic value of fecal chymotrypsin and trypsin assessment for detection of pancreatic disease. *Amer. J. Digest. Dis.* 13, 123 (1968).
6. AMMANN, R.: Die moderne Stuhlenzymmethode als Pankreasfunktionstest. In: ENGLHARDT, A., LOMMEL, H., Methodische Fortschritte im medizinischen Laboratorium. Band 2, Malabsorption, Maldigestion. Verlag Chemie, Weinheim 1974.
7. AMMANN, R., AKOBIANTZ, A., HACKI, W., LARGIADER, F., SCHMID, M.: Diagnostic value of the fecal chymotrypsin test in pancreatic insufficiency, particular chronic pancreatitis. *Digestion* 21, 281-289 (1981).
8. BUHLER, H., AMMANN, R.: PAPA-Test versus Chymotrypsin- und Fettbestimmung im Stuhl in der Pankreasfunktionsdiagnostik. *Schweiz. med. Wschr.* 109, 597-598 (1979).
9. MÜNCH, R., BÜHLER, H., AMMANN, R.: Chymotrypsinaktivität im Stuhl: Vergleich eines neuen photometrischen Verfahrens mit der titrimetrischen Standardmethode. *Schweiz. med. Wschr.* 113, 1794-1797 (1983); ferner:
10. MÜNCH, R., BÜHLER, H., AMMANN, R.: Chymotrypsinaktivität im Stuhl: Vergleich eines neuen photometrischen Verfahrens mit der titrimetrischen Standardmethode, siehe (53).
11. GROSSMANN, M. I., GREENGARD, H., IVY, A.: Fecal Enzymes of dogs with pancreatic exclusion. *Proc. Soc. Biol. Med.* 110, 41-49 (1962).
12. GOLDBERG, D. M., CAMPBELL, R., ROY, A. D.: Interaction of trypsin and chymotrypsin with intestinal cells in man and several animal species. *Comp. Biochem. Physiol.* B 38, 697-708 (1971).
13. MOELLER, D., DUNN, G. D., KLOTZ, A. P.: Diagnosis of pancreatic exocrine insufficiency by fecal chymotrypsin activity. *Am. J. Dig. Dis.* 18, 792-796 (1973).
14. SCHNEIDER, R., DÜRR, K. H., BODE, J. C. H.: Diagnostische Wertigkeit der Bestimmung von Chymotrypsin im Stuhl für die Erfassung einer exokrinen Pankreasinsuffizienz. *Dtsch. med. Wschr.* 99, 1449-1454 (1974).
15. BORNSCHEIN, W.: Klinische und methodische Untersuchungen zur Bestimmung des Chymotrypsin im Stuhl. *Leber Magen Darm* 7, 334-340 (1977).
16. GILAT, R., GELMAN-MALACHI, R.: Chymotrypsin Output in the Stools in Pancreatic and other Diseases. *Gastroenterology* 66, 140-145 (1976).
17. DÜRR, K. H., SCHNEIDER, R., BODE, J. C. H.: Fecal Chymotrypsin: Study on some Characteristics of the Enzyme. *Digestion* 17, 396-403 (1978).
18. DÜRR, K. H., OTTE, M., FORELL, M. M., BODE, J. C. H.: Fecal Chymotrypsin: A study on its Diagnostic Value by Comparison with the Secretin-Cholecystokinin-Test. *Digestion* 17, 404-409 (1978).
19. MAY, H., GRIES, G.: Trypsin und Chymotrypsin in der Differentialdiagnose entzündlicher Kolonerkrankungen. *Münch. med. Wschr.* 121, 783-784 (1979).
20. HASCHEN, R.: Enzymdiagnostik, 2. Aufl. G. Fischer Verlag, Stuttgart, S. 134 (1981).
21. ROSE, J. J., BANFIELD, W., HANDE, W.: A Method for Determining Chymotrypsin in Faeces. *Z. Med. Lab. Diagn.* 22, 119-124 (1981).
22. JUNGE, W.: Diagnostische Bedeutung der Chymotrypsinbestimmung im Stuhl. *GIT-Supplement* 3/84, Pankreasdiagnostik, S. 45-47 (1984) s. a. Chymotrypsinbestimmung im Stuhl. Erste praktische und klinische Erfahrungen mit einem neuen photometrischen Test. *Medica* 1983 (Vortrag).
23. MULLINGER, M., PALASI, M.: Trypsin and chymotryptic activity of stools of newborn infants. *Pediatrics* 38, 657-661 (1966).
24. DYCK, W.: Titrimetric measurement of fecal trypsin and chymotrypsin in cystic fibrosis with pancreatic exocrine insufficiency. *Am. J. Digest. Dis.* 12, 310-316 (1967).
25. HERMIER, M., MATHIEU, M., FILLAT, M., GILLY, R., CHAZALETTE, I. P., LOTTE, J.: Etude de la fonction pancreatique exocrine dans la mucoviscidose. *Rev. Franc. Etud. Clin. Biol.* 14, 867-878 (1969).
26. MÜLLER, L., WISNIEWSKI, Z. S., HANSKY, J.: The measurement of fecal Chymotrypsin: a screening test for pancreatic exocrine insufficiency. *Anst. Ann. Med.* 1, 47 (1970).
27. WEISE, J., KOBAYASAKI, Y., TOLCKMITT, W.: Untersuchungen über die Anwendbarkeit tryptischer und chymotryptischer Aktivitätsmessungen im Stuhl in Diagnostik und Therapie der Mucoviscidose. *Europ. J. Pediatr.* 122, 107-115 (1976).
28. SÄLZER, K., KOBAYASAKI, Y., TOLCKMITT, W.: Tryptische und chymotryptische Aktivität im Stuhl von Kindern verschiedener Altersgruppen. *Europ. J. Pediatr.* 121, 279-286 (1976).
29. BHAVANI, S., EGGERMONT, E., STANDUERT, L. et al.: Stool-Chymotrypsin in the preterm infant. *Acta Paediatr. Belgica* 32, 51-58 (1979).
30. FORSTNER, G. G., DAVIDSON, G.: Amylase isoenzymes in cystic fibrosis. *Pediatric Research* 13, 1077-1078 (1979).
31. SZIBOR, R., GEDSCHOLD, J., THAL, W.: Zur Problematik der Mukoviscidose-Frühdagnostik. *Z. ärztl. Fortbild.* 73, 1068 (1979) zit. in *diagnostik* 6, 109 (1980).
32. WOLF, R. O., TAUSSING, L.: Serum salivary amylase in cystic fibrosis. *Pediatric Research* 13, 1076-1077 (1979).
33. LISOWSKA-MYJAK, B., TOMASZEWSKI, L.: Trypsin Inhibitor and Proteolytic Activity in Meconium and Faeces During Perinatal Period of Life. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 19, 754 (1981).
34. ADRIAENSSENS, K., VAN RIEL, L.: Serum pancreatic lipase as a screening test for cystic fibrosis. *Arch. of Dis. in Childhood* 57, 553-559 (1982).
35. BORGSTROM, A.: Immunoactive Trypsin Screening for cystic fibrosis. *Acta Paed. Scand.* 71, 621-628 (1982).
36. KUSTER, M.: Diagnostik der cystischen Fibrose. *mta-Journal* 4, 380-381 (1982).
37. SITZMANN, F. C., DOCKTER, G.: Chymotrypsin-Bestimmung im Stuhl bei der Therapiekontrolle der Mukoviscidose. *Klin. Pädiat.* 194, 283-287 (1982).
38. STIER, R., APPEL, W.: Chymotrypsin-Bestimmung im Stuhl. *Vortr. 3. Ambulanzleiter-Tagung Univ. Kinderkliniken, Titisee* (1982).
39. TRAVERT, G.: Screening auf zystische Fibrose: RIA für immunoaktives Trypsin. *Laboratoriumsblätter* 32, 183-187 (1982).
40. WONG, L. T. D., TURTLE, S. et al.: Screening Pancreocymrin Stimulation Test and Confirmation of the Diagnosis of cystic fibrosis. *Gut* 23, 744-750 (1982).
41. GREINER, P., STIER, R., JESPER, M., APPEL, W.: Stellenwert der Chymotrypsin-Bestimmung im Stuhl für die Erkennung, Verlaufsbeobachtung und Therapiekontrolle der Mukoviscidose. *Lab.med.* 7, 287-288 (1983).
42. APPEL, W., STIER, R., GREINER, P., JESPER, M.: Wertigkeit der Chymotrypsin-Bestimmung im Stuhl für die Erkennung, Verlaufsbeobachtung und Therapiekontrolle der Mukoviscidose. *Lab.med.* 7, 202-207 (1983).
43. SCHLAEGER, R., RÖHR, A.: Fecal Chymotrypsin - A New Photometric Method Using N-Acetyl-L-Tyrosine Ethyl Ester as Substrate. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 20, 147-150 (1982).
44. NAGEL, W., WILLIG, F., PESCHKE, W., SCHMIDT, F. H.: Über die Bestimmung von Trypsin und Chymotrypsin mit Aminosäure-p-nitroaniliden. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 340, 1-10 (1965).
45. WILLIG, F., KÖRBER, W.: Eine Methode zur Bestimmung von Trypsin und Chymotrypsin im Stuhl mit Aminosäure-p-nitroaniliden. *Z. Gastroenterologie* 5, 33-36 (1967).
46. WILLIG, F.: Über verschiedene Formen der durch Enzymmangel bedingten Verdauungsinsuffizienz. *Therapiewoche* 20, 43, 2715 (1970).
47. LÖFFLER, A., ERNST, R., MIEDERER, S. E., STADELMANN, O.: Bestimmung von Chymotrypsin im Stuhl mit Succinyl-L-Phenylalanin-p-Nitraniliden (Suphepa) in der Diagnostik von Pankreaserkrankungen. *Med. Klin.* 70, 1755-1758 (1975).
48. DEL MAR, E. G., BRODRICK, J. R., GEOKAS, M. C., LARGMANN, C.: Effect of Oxidation of Methionin in a Peptide Substrate for Human Elastase: A Model for Inactivation of  $\alpha_1$ -Protease-Inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 88, 348-350 (1979).
49. DEL MAR, E. G., LARGMANN, C., BRODRICK, W., GEOKAS, M. C.: A sensitive new Substrate for Chymotrypsin. *Ann. Biochem.* 99, 316-320 (1979).
50. ACHSTETTER, T., EHMANN, C., WOLF, D. H.: New Proteolytic Enzymes in Yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 207, 445-454 (1981).
51. KASPAR, R., MOELLER, G., WAHLEFELD, A. W., STAHLER, W.: A New Photometric Method for the Determination of Chymotrypsin in Stool. *Vortrag Analytica 1982 und Fresenius Z. Anal. Chem.* 311, 391-392 (1982). S. a. KASPAR, P., HENKE, A., VOSS, I.: Determination of Chymotrypsin in Stool with a Chromogenic Substrate. *Vortrag Analytica 1983*.
52. DECY, R., KASPAR, P., PORTENHAUSER, R., MÖLLER, G.: Photometrische Methode zur Bestimmung von Chymotrypsin im Stuhl - Erste Ergebnisse aus der klinischen Erprobung. *Lab.med.* 7, 111 (1983).
53. Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim: Workshop: Externe Erprobung der photometrischen Methode zur Bestimmung von Chymotrypsin im Stuhl mit Monotest® Chymotrypsin, Altenberg, Nov. 1983, Report in Vorbereitung. S. a. *diagnostica dialog* 3/83, S. 17 und 1/84, S. 13.
54. Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim: Monotest® Chymotrypsin + Solvens, Firmeninformation 483-3-4256-CD (1983).
55. Boehringer Mannheim GmbH, Wien: Test-Profil „Chymotrypsin im Stuhl“ (1984).
56. HAECKEL, R.: Statistische Probleme bei Vergleich von klinisch-chemischen Analyse-Verfahren. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 18, 433-437 (1980).
57. HAECKEL, R., SCHNEIDER, B.: Detection of Drift Effects before Calculating the Standard Deviation as a Measure of Analytical Imprecision. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 21, 491-497 (1983).
58. WERNER, M.: Ein dreischichtiges Modell zur Bewertung der Wirksamkeit von Analysen und Befunden. *Med. Welt* 28, 1254-1257 (1977).
59. BÜTTNER, J.: Die Beurteilung des diagnostischen Wertes klinisch-chemischer Untersuchungen. *J. Clin. Chem. Biochem.* 15, 1-12 (1977).
60. GERBIG, K.: Neue Kriterien für die Interpretation von Laborwerten und für die Beurteilung der diagnostischen Relevanz. *mta-praxis* 28, 81-84 (1983).
61. PASSING, H., BABLOK, W.: A New Biometric Procedure for Testing the quality of Measurements from two Different Analytical Methods. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 21, 709-720 (1983).
62. PASSING, H., BABLOK, W.: Comparison of Several Regression Procedures for Method Comparison Studies and Determination of Sample Sizes. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 22, 431-445 (1984).
63. EISENWIENER, H.-G., BABLOK, W., BARDORFF, W., BENDER, R., MARKOWITZ, D., PASSING, H., SPAETH, R., SPECHT, W., VÖLKERT, W.: Statistische Auswertungen beim Methodenvergleich. *Lab.med.* 8, 233-244 (1984).

#### Anschrift des Verfassers:

Prof. Dr. rer. nat. Walter Appel  
Zentrallaboratorium der St.-Vincentius-Krankenhäuser  
Südenstraße 32  
7500 Karlsruhe 1

# CEA-EIA Test «Roche»

jetzt auch  
als Tagesansatz!

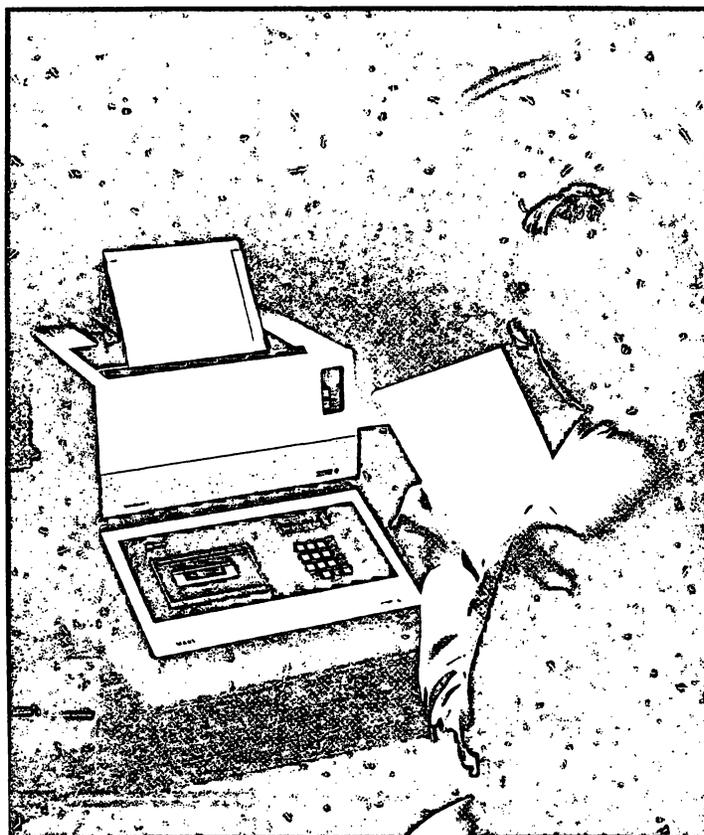
- Mit monoklonalen Antikörpern zur postoperativen Verlaufs- und Therapiekontrolle bei Karzinomen

Nähere Information durch:  
Hoffmann-La Roche AG - Diagnostica - 7889 Grenzach-Wyhlen, Tel. (07624) 14-352  
CEA-EIA Test «Roche» in-vitro-Test zur enzymimmunologischen Bestimmung  
des Carcino-Embryonic-Antigens

## MEDILOG 4000 LANGZEIT-EKG

# OXFORD

Das Medilog 4000, das einzige System, das jeden Herzschlag analysiert und **registriert** am Patient und in Echtzeit.



- EKG Analyse im Echtzeit-Verfahren
- Gleichzeitige, kontinuierliche Registrierung von 2 Kanälen über 24 Stunden
- Totalausschrieb und/oder Vergrößerungen der interessierenden Episoden
- Analyse und Patientenbericht in weniger als 6 Minuten
- Vollautomatische Analyse

Oxford Instruments Deutschland GmbH, Wandersmannstr. 39,  
6200 Wiesbaden, Tel. 0 61 21/70 28 51, Telex: 4 186 152 oxfo

Bitte besuchen Sie unseren Stand 530, Saal 5.