

# Kongreß für Laboratoriumsmedizin, Frankfurt

Abstracts der Posterpräsentation vom Dienstag, dem 30. Mai 1989

D 1

## Schnellidentifizierung von *Escherichia coli* aus Urinproben mit Fluorocult-Brolacin-Agar

P. C. Döller, W. R. Heizmann und H. Werner  
Abteilung für Medizinische Mikrobiologie, Hygiene-Institut  
Universität Tübingen, Silberstraße 7, 7400 Tübingen

Durch Nachweis der  $\beta$ -Glucuronidase kann *Escherichia coli* schnell und einfach identifiziert werden (1). 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Glucuronid (MUG) kann in geeignete Nährmedien inkorporiert werden und dient als Substrat für die  $\beta$ -Glucuronidase. Die Spaltung des MUG führt zu einem blau fluoreszierenden Metaboliten, welcher unter einer langwelligen UV-Lampe sichtbar gemacht werden kann. Da *E. coli* zu den häufigsten Erregern von Harnwegsinfektionen zählt, haben wir 4853 Urinproben aus der Routinediagnostik auf Fluorocult-Brolacin-Agar (Merck, Darmstadt, FRG) untersucht.

Die Auswertung der Platten erfolgte im normalen Raumlicht unter einer UV-Lampe. Dabei zeigten Kolonien von  $\beta$ -Glucuronidase-positiven Mikroorganismen blaue Fluoreszenz. Bei Nachweis blauer Fluoreszenz sollte zur Sicherung der Diagnose ein Indolspotttest eingesetzt werden (1). Durch Säuerung infolge Lactoseabbau wurde die Fluoreszenzintensität reduziert. Auftropfen von 1 N NaOH auf die Kolonien intensiviert diese jedoch wieder. Als Referenzmethode für die Identifizierung der Enterobacteriaceae bis zur Speziesebene diente Enterotube II bzw. api 20E.

Für die Identifizierung von *E. coli* aus Urinproben auf Fluorocult-Brolacin-Agar ergaben sich folgende statistische Werte: Sensitivität 70,8%; Spezifität 95,7%; positiver „Predictive Value“ 98,2%; negativer „Predictive Value“ 49,8% und Effizienz 76,6%. Falsch-positive Ergebnisse waren mit *Morganella morganii*, *Klebsiella oxytoca* und *Serratia liquefaciens* zu verzeichnen, welche durch Nachuntersuchungen jedoch nicht bestätigt werden konnten. Fluoreszierende *S. liquefaciens*-Isolate wurden als *E. coli* nachidentifiziert. Die o.g. Werte sind hinsichtlich der Ergebnisse aus den Nachuntersuchungen nicht korrigiert.

Ca. 30% der Shigellen und Salmonellen zeigen ebenfalls eine positive Fluoreszenz, sollten aber aufgrund ihrer niedrigen Inzidenz in Urinproben sowie ihrer Lactose- und Tryptophanase-negativität kein Problem [0,03–0,06% falsche Identifizierungen (1)] darstellen. In unseren Untersuchungen waren Vertreter dieser beiden Gattungen nicht nachweisbar.

Fluorocult-Brolacin-Agar erlaubt eine zeit- und kostensparende Identifizierung von *E. coli* direkt auf den Primärplatten. Obwohl Fluorocult-Brolacin-Agar etwa doppelt so teuer ist wie CLED-Agar, lagen die Materialkosteneinsparungen bei unseren Untersuchungen bei ca. 23%.

Schrifttum:

1. HEIZMANN, W. R., DÖLLER, P. C., GUTBROD, B., WERNER, H.: Rapid identification of *Escherichia coli* by Fluorocult Media and Positive Indole Reaction. *J. Clin. Microbiol.* 26 (12), 2682–2684 (1988).

D 2

## Nachweis von Infektionen des Urogenitaltraktes durch *Ureaplasma urealyticum* und *Mycoplasma hominis*

E. Jacobs, U. Goerendt und W. Bredt  
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene,  
Universität Freiburg, Hermann Herder-Str. 11, 7800 Freiburg

Die nicht gonorrhoeische Urethritis und Prostatitis wird in 10–20% aller sogenannten „abakteriellen“ männlichen Genitalerkrankungen von *U. urealyticum* hervorgerufen. Isoliert wurden *U. urealyticum* und *M. hominis* aus dem weiblichen Urogenitaltrakt als einziges nachgewiesenes pathogenes Agens bei Salpingitis, Endozervicitis, Kolpitis, post abortum Infektionen etc. (1). Für die Bewertung ist der Erregernachweis aber auch die Bestimmung der Keimzahl wichtig, da *U. urealyticum* und *M. hominis* als fakultativ-pathogene Keime im Urogenitaltrakt vorhanden sein können. *U. urealyticum* Keimzahlen von  $\geq 10^4$ /ml werden als relevant angesehen (2).

Für die Routinediagnostik ist ein Nachweissystem (Mycoscreen-Kit, Mecconti GmbH, Bad Homburg) entwickelt worden, das die nur in wenigen bakteriologischen Laboratorien zugängliche Kultivierung und Differenzierung von Mycoplasmen des Urogenitaltraktes vereinfacht. 30 Urethralabstriche und 330 Cervixabstriche wurden mit der konventionellen Kultivierung nach Shepard (3) und mit dem Mycoscreen-Kit auf Mycoplasmen untersucht. In 16 von 30 Urethralabstrichen wurden Mycoplasmen nachgewiesen, wobei die Keimzahl in 8 Fällen  $\geq 10^4$ /ml betrug. In zwei von drei Fällen mit *M. hominis*-Nachweis lag eine Doppelinfection vor. Die Untersuchung der Cervix-Abstriche ergab in 11 Fällen den Nachweis von  $\geq 10^4$  *U. urealyticum* und in 7 Fällen *M. hominis*. Auffallend war, daß in 29 bakteriologisch nachgewiesenen Aminkolpitis-Infektionen 12 mit einer Besiedlung von *U. urealyticum* und 6 mit *M. hominis* in hohen Keimzahlen einhergingen. In 3 Fällen mit vorzeitigem Blasensprung und Schwangerschaftsabbruch konnte als einziger Erreger *U. urealyticum* nachgewiesen werden.

Die vergleichende Untersuchung erbrachte eine gute Übereinstimmung zwischen der konventionellen Methode und dem Mycoscreen-Kit.

Schrifttum:

1. BREDT, W.: Mycoplasma-Infektionen des Menschen. Eine kritische Betrachtung. *Med. Klinik* 70, 1 (1975).
2. BRUNNER, H., WEIDNER, W., SCHIEFER, H.-G.: Quantitative studies on the role of *Ureaplasma urealyticum* in non gonococcal urthritis and chronic prostatitis. *Yale J. Biol. Med.* 56, 545 (1983).
3. SHEPARD, U. C.: Culture media for ureaplasmas. In: *Methods in Mycoplasmaology*, Vol. I, S. 137. RAZIN, S., TULLY, J. G. (eds.), Academic Press, New York (1989).

D 3

## Nicht invasiver Nachweis von *Campylobacter pylori* in Patienten mit Antrum Gastritis mittels Isotop-ratio Massenspektrometrie

F. Susanto, S. Humfeld und H. Reinauer  
Abteilung für klinische Biochemie des Diabetes-Forschungsinstitutes an der Universität Düsseldorf, Auf'm Hennekamp 65, 4000 Düsseldorf 1

Es wird eine einfache und nicht-invasive Methode zum Nachweis von *Campylobacter pylori* im Magen beschrieben. *Campylobacter pylori* gilt als Erreger der chronischen Gastritis und spaltet Harnstoff zu Ammoniak und  $\text{CO}_2$ .

Eine erhöhte Ureaseaktivität weist somit *Campylobacter pylori* bei Patienten nach und kann durch den Einsatz von  $^{13}\text{C}$ -markiertem Harnstoff mit einem Isotop Ratio-Massenspektrometer bestimmt werden. In dieser Pilotstudie wurden insgesamt 11 gastroskopierte Patienten, 6 *Campylobacter pylori* negativ und 5 mit Antrumgastritis untersucht. Die Patienten erhielten 2,5 mg/kg  $\text{KG } ^{13}\text{C}$ -Harnstoff peroral, 10 min nach einer standardisierten Mahlzeit. Unmittelbar vor der Einnahme und dann in halbstündlichen Abständen wurden Atemluftproben gesammelt.

Bei *Campylobacter pylori* positiven Patienten wurde eine signifikante Erhöhung der  $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ -Relation in der Atemluft festgestellt. Der Anstieg war bereits nach 30 min nachweisbar und erreichte seinen Maximalwert zwischen der 60. und 90. Minute.

Die Ergebnisse stimmten sowohl mit denen der endoskopischen Biopsie, als auch mit den histologischen Untersuchungen überein.

Die Präzision der  $^{13}\text{CO}_2$ -Messung war kleiner als 0,5%.

Die beschriebene Methode ist nicht invasiv, sensitiv und zeigt sehr gute Reproduzierbarkeit. Sie eignet sich für alle Patienten mit Gastritis und besonders für epidemiologische Studien der *Campylobacter pylori*-Infektion.

Schrifttum:

GRAHAM, D. Y., KLEIN, P. D., EVANS Jr., D. J., EVANS, D. G., ALPERT, L. C., OPEKUM, A. R., BOUTTON, T. W.: *Lancet* 23, 1174 – 1177 (1987).

V 7

## Quantitative determination of carbohydrates in breathing air

Ch. Antz, R. Röper and W. Kochen  
University of Heidelberg, Children's Hospital,  
Central Laboratory

Free radicals of oxygen (reactive oxygen intermediates ROI) are formed in all aerobic organisms under strict control of a complex defence system against free radical reactions. The recognition of a new group of disease entities ("free radical diseases") may be expected. The role of ROI in the pathogenesis of diseases is often speculative due to a lack of experimental laboratory data. Besides the possible determination of malondialdehyde there are no methods available to applicate in human clinical diagnostics. The quantitative analysis of exhaled carbohydrates (CH) as fragmentation products of peroxidized polyunsaturated fatty acids offers a new aspect of methodology especially in respect of specificity and the non-invasive application. In spite of the high standard in environmental gas-analysis there are specific problems to analyze breathing air due to interferences by  $\text{CO}_2$  and water vapor.

We developed a new concept of analytical methodology: Pre-concentration of the HC (ppc-ppt range in breath) by repeated cryo-focusing under "steady state conditions" without any purification steps. Sampling and storage of breath air is performed in special SS-bottles. The gaschromatographic analysis is based upon a new megabore capillary column. The principle of the CH analysis is demonstrated and first results from patients with different diseases are reported. The method also includes the analysis of higher molecular compounds. Thus the exhalation of accumulated pollutants may be detected.

D 5

## Dot-Blot auf Immobilon<sup>TM</sup> zum Nachweis von Zytomegalievirus (HCMV) in Patientenurin – ein alternatives Verfahren zur konventionellen Virusanzucht

R. Thiele, W. Braun, A. Hamann und H. W. Doerr  
Univ.-Klinikum, Zentrum der Hygiene, Abt. Virologie,  
6000 Frankfurt/M.

Zytomegalievirus (HCMV)-Infektionen stellen beim immunsupprimierten Patienten eine häufige und zunehmend gefürchtete Komplikation dar. Die serologische Diagnose versagt hier häufig. Alternativ dazu bietet sich der Erregernachweis an, da das Virus beim akut Infizierten regelmäßig in Körperflüssigkeiten (z. B. Urin) erscheint. Der konventionelle Erregernachweis ist technisch schwierig (Zellkultur-gebunden), stellt hohe Anforderungen an die Probenqualität und bleibt daher versierten Laboratorien vorbehalten. Anders als bei HSV hat sich der Antigennachweis mit Enzym-Immunoassays bei HCMV bisher nicht bewährt. Wir haben ein hochempfindliches und hochspezifisches dot-plot-Verfahren zum Nachweis von HCMV in Patientenurin entwickelt und mit dem konventionellen Zellkulturverfahren verglichen. Das SDS-denaturierte Virusantigen wird auf einer PVDF-Membran (Immobilon<sup>TM</sup>) immobilisiert. Ein monoklonaler Antikörper gegen HCMV-Strukturproteine bindet an das Antigen. Diese spezifische Bindung wird auf der Membran nach Biotin/Steptavidin-Amplifikation enzymatisch als blauer Fleck sichtbar gemacht. Die Nachweisgrenze liegt bei einer Antigenmenge, die im Infektionstest ca. 50 PFU (= infektiöse Viren) entspricht. 217 Urine von Patienten mit Verdacht auf floride Zytomegalie wurden mit dem neuen Verfahren getestet und die Resultate mit denen der konventionellen Virusanzucht verglichen. Dabei zeigte das enzymatische Verfahren vergleichbare Sensitivität bei wesentlich verbesserter Praktikabilität gegenüber der Anzucht in der Zellkultur.

D 6

## Adenovirusinfektionen – Klinische Bedeutung und Diagnostik

W. Schoenemann  
Hygiene-Institut des Ruhrgebiets, Gelsenkirchen

Adenoviren sind als Ursache von Erkrankungen des Respirationstraktes weit verbreitet. Ob sie darüber hinaus auch für Durchfallerkrankungen verantwortlich gemacht werden können, war lange Zeit umstritten, weil sie auch nach einem respiratorischen Infekt über den Darm ausgeschieden werden. Für Adenoviren der Typen 40 und 41 ist heute jedoch ein Zusammenhang zur akuten Gastroenteritis gesichert. Sie sind sogar nach den Rotaviren die zweithäufigste Ursache dieses Krankheitssyndroms.

In einer klinischen Studie mit Kleinkindern wurden aus 418 rotavirus-negativen Stuhlproben 45mal (10,8%) Adenoviren nachgewiesen, davon gehörten 13 zu den Typen 40 und 41. 85% der Kinder mit Adenoviren 40/41 erkrankten im ersten Lebensjahr. Gastroenteritiden wurden fast ausschließlich bei Adenoviren 40/41 beobachtet, respiratorische Infekte waren dagegen bei allen Typen gleich häufig. Lagen gleichzeitig ein respiratorischer Infekt und eine Durchfallerkrankung vor, wurden die Enteritiden lediglich als Begleitenteritis eingestuft. 74% der Kinder wurden stationär behandelt.

Ein oft schwerer Verlauf von Adenovirusinfektionen, die Abgrenzung gegenüber anderen Krankheitserregern und das Interesse an epidemiologischen Zusammenhängen erfordern eine spezifische Laboratoriumsdiagnostik. Hierbei kommt den Verfahren des Virusnachweises gegenüber der unbefriedigenden Serologie die größere Bedeutung zu. Die Virusanzüchtung in der Zellkultur verfügt über eine hohe Sensitivität und Spezifität. Sie führt innerhalb relativ kurzer Zeit (ca. 1 Woche) zu einem Ergebnis und erlaubt außerdem eine Typen-Differenzierung. Die Antigen-Nachweise mit Hilfe immunologischer Verfahren (Latex-Agglutination, ELISA) sind wesentlich schneller (20 min bzw. 2 Std.),

aber nicht so empfindlich, und erfassen meist nur Adenoviren 40/41. Sie eignen sich als Zellkultur-Bestätigungstest für alle Adenovirustypen, was zu einer Verkürzung des Virusnachweises um mehrere Tage führt. Die Adenoviren 40/41 lassen sich so innerhalb von ein bis drei Tagen nachweisen.

Wer nur an den Typen 40/41 interessiert ist, erzielt mit ELISA oder Latex-Agglutination gute Resultate. Wer auch nach anderen Adenovirustypen als Ursache von respiratorischen Infekten und Durchfallerkrankungen sucht, sollte den Virusnachweis in der Zellkultur mit einem immunologischen Verfahren als Bestätigungstest wählen.

D 7

## Vergleich einer Typ- und Subtyp-spezifischen Immunantwort nach Influenza A- und B-Infektionen

G. Döller und H.-J. Gerth  
Abt. f. Med. Virologie, Hygiene-Institut, Silberstraße 7,  
7400 Tübingen

Zur Ergänzung der laborüblichen Methoden für die Serodiagnose der Influenza insbesondere der Komplementbindungsreaktion (KBR) und neuerdings Enzymimmunoassay (EIA), haben wir kürzlich die Möglichkeiten eines Immunfluoreszenztests (IFTE, 1) exploriert. Dieser Test reagiert subtyp-spezifisch und erlaubt die Bestimmung der Immunglobulinklassen-spezifischen Immunantwort. Die in diesen wie mit anderen Tests gemessenen Immunantworten zeigen große individuelle Schwankungen (2). Obwohl der Test einfach durchzuführen ist, läßt er sich derzeit nicht automatisieren. Da alle hier erwähnten Tests auf verschiedenen Prinzipien beruhen und bestimmte Vorteile aufweisen, ermittelten wir die diagnostische Wertigkeit der Tests mit 122 Seren von 57 Patienten nach Influenza A- und mit 114 Seren von 57 Patienten nach Influenza B-Infektion. Bei diesen Untersuchungen zeigten die Seren von 29 Influenza A-Patienten (50,9%) in der KBR entweder keinen oder einen Titeranstieg auf nur 20 oder 40. Bei Vorhandensein von nur einer Serumprobe wäre die kürzlich stattgefundene Infektion nicht erkannt worden. Mit dem IFTE hingegen wäre die Infektion nach den von uns angesetzten Grenzwerten (3) in 17,5% (10 Patienten) und mit dem EIA in 28% (15 Patienten) nicht erkannt worden. Für Influenza B sind die Ergebnisse der KBR und des EIAs bei einer Einzelerumdiagnose besser: 17,5% (10 Patienten) zeigten Titeranstiege auf nur 20 oder 40 in der KBR, mit dem IFTE wäre die Infektion bei 8,8% (5 Patienten) und mit dem EIA bei 5,3% (3 Patienten) bei einer Einzelerumdiagnostik nicht erkannt worden. Die Korrelationskoeffizienten von KBR, EIA und IFTE variieren von 0,5–0,77. Bessere Korrelationen wurden zwischen IgG-IFTE und Hämagglutinationshemmtest gefunden: Influenza A/H3N2,  $r = 0,88$ ; Influenza B,  $r = 0,81$ ; Influenza A/H1N1 jedoch nur 0,63. Dies bestätigt die Ergebnisse anderer Autoren (4).

Schrifttum:

1. DOLLER, P. C., DOLLER, G., GERTH, H.-J.: *Med. Microbiol. Immunol.* 173, 291–296 (1985).
2. DOLLER, G., DOLLER, P. C., GERTH, H.-J.: *J. Biol. Standard.* 14, 163–175 (1986).
3. DOLLER, G., DOLLER, P. C., GERTH, H.-J.: *Lab. med.* 10, 291–296 (1986).
4. SMITH, T. L., JENNINGS, R., POTTER, C. W.: *Med. Microbiol. Immunol.* 71, 329–339 (1987).

D 8

## IgM-Antikörpernachweis gegen Coxsackie-B-Viren mit einer modifizierten Western-Blot-Technik

M. R. Zuniga, W. Braun, J. Reichardt, M. Roggendorf  
und H. W. Doerr  
Univ.-Klinikum, Zentrum der Hygiene, Abt. Virologie,  
Frankfurt

In dem vorliegenden Beitrag wird ein modifiziertes Western-Blot-Verfahren zur Bestimmung von CBV (Coxsackie-B-Viren)-spe-

zifischen IgM-Antikörpern vorgestellt. Im Gegensatz zu den gängigen Immunoblot-Techniken wird hierzu das Antigen in der PhastSystem Unit™ — einer automatisierten Elektrophoreseapparatur — elektrophoretisch aufbereitet. Mittels eines in unserem Labor entwickelten Diffusionsblot wird dann das Antigen auf eine immobilisierende Matrix übertragen. Anschließend erfolgt der Antikörpernachweis unter Verwendung von Biotin-Avidin amplifizierten Reaktionen.

In dieser Arbeit wird eine qualitative Bewertung der Typenspezifität der Antikörperbestimmung gegen drei verschiedene Serotypen (CBV1, CBV2 und CBV4) in 51 Patientenserum mit Verdacht auf eine akute Enterovirusinfektion vorgenommen, um die Leistungsfähigkeit des Tests abzuschätzen.

D 9

## Serologische Diagnostik und Differenzierung von HSV-1- und HSV-2-Virusinfektionen mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) und Western Blot.

J. Eibner, G. Bauer und H. W. Doerr  
Zentrum der Hygiene, Abt. Med. Virologie, Univ.-Klinikum,  
6000 Frankfurt/M.

Die Differenzierung zwischen HSV-1- und HSV-2-Antikörpern im Serum ist wegen der hohen Kreuzreaktivität der beiden Viren oft schwierig. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA) zeigen oft falsch-positive Kreuzreaktionen. Wird der ELISA jedoch durch einen Western Blot ergänzt, lassen sich spezifische Aussagen über HSV-1- und HSV-2-Antikörper im Patientenserum machen. In einem von uns modifizierten ELISA- und Western-Blot-Verfahren wurden 3 verschiedene Patientenkollektive getestet. Nach Koppelung von Virusantigenen auf 96-Lochplatten (Nunc), werden die Seren appliziert. Sind Antikörper im Serum enthalten, bildet sich eine spezifische Bindung aus, die nach Biotin/Streptavidin-Amplifikation sichtbar gemacht wird. Beim Western-Blot wird das elektrophoretisch aufgetrennte Antigen auf eine PVDF-Membran (Immobilon™) übertragen und mit Patientenserum inkubiert. Die spezifische Antigen-Antikörperbindung weist nach Visualisierung mit Biotin/Streptavidin-Peroxidase je nach Virus ein spezifisches Bandenmuster auf. Die Diagnose einer bereits bestehenden, jedoch latenten HSV-2-Infektion ermöglicht die Prophylaxe des im Neugeborenenalter vorkommenden Herpes neonatorum in gynäkologisch-geburtshilflichen Bereichen.

D 10

## Referenzbereiche für LH und FSH im LHRH-Test bei Kindern verschiedener Pubertätsstadien, erstellt mit einem monoklonalen immunoradiometrischen Assay

C.-J. Partsch, R. Hümmelink und W. G. Sippell  
Pädiatrische Endokrinologie, Abt. Allgemeine Pädiatrie,  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Die pädiatrisch-endokrinologische Diagnostik bei Störungen von Wachstum und Pubertätsentwicklung bei Kindern beinhaltet in den meisten Fällen die Bestimmung von LH und FSH im Plasma vor und nach Stimulation mit intravenös verabreichtem synthetischen LHRH (1, 2). Die für die Interpretation der Testergebnisse unerlässlichen Referenzbereiche für die einzelnen Pubertätsstadien (P1 bis P5) sind für RIAs mit polyklonalen Antikörpern bereits bekannt (1). Für die Erstellung von Referenzbereichen für einen neu entwickelten IRMA mit 2 monoklonalen Antikörpern (LH und FSH MAIA Clone®, Serono Diagnostika, Freiburg) wurden die Plasmaproben von insgesamt 87 Mädchen und 105 Jungen, davon 61 bzw. 66 nach LHRH-Stimulation

(60 µg/m<sup>2</sup> KOF i.v.), verwendet. Alle Kinder hatten sich als endokrinologisch gesund erwiesen und wurden nach Pubertätsstadien in Gruppen eingeteilt. Die Intra- und Interassay-Variationskoeffizienten lagen zwischen 4 und 6% bzw. bei 6% für LH und zwischen 1 und 2,8% bzw. bei 4,4% für FSH. Der Vergleich zwischen RIA und IRMA zeigte deutlich niedrigere Werte für den IRMA für LH ( $y = 0,73x - 0,28$ ,  $r = 0,916$ ,  $n = 100$ ), während die FSH-Werte sehr gut übereinstimmten ( $y = 1,03x + 0,34$ ,  $r = 0,980$ ,  $n = 56$ ). Der IRMA ergab kontinuierlich ansteigende basale und stim. LH-Werte (Median) im Verlauf der Pubertät bei beiden Geschlechtern (Mädchen basal P1 bis P5 von 0,3 bis 3,9 mIU/ml ansteigend, stim. von 2,1 bis 17,1 mIU/ml; Jungen basal P1 bis P5 von < 0,3 bis 1,8 mIU/ml ansteigend, stim. von 3,6 bis 17,6 mIU/ml). Signifikant höhere stim. Werte bei Jungen als bei Mädchen fanden sich bei unmittelbar präpubertären Kindern (> 9 Jahren  $p < 0,05$ ). Für FSH sind die Referenzbereiche vom RIA gut auf den IRMA übertragbar. Mädchen zeigten in allen Reifestadien höhere FSH-Werte als Jungen (signifikant bei P2–P4 für stimulierte Werte).

Zusammenfassend zeigte sich die Notwendigkeit zur Erstellung neuer Referenzbereiche für LH, da im IRMA wesentlich niedrigere Werte gefunden wurden. Die Entwicklung der Gonadotropine im Plasma im Verlaufe der Pubertät ist im IRMA im Prinzip der im RIA sehr ähnlich.

Schrifttum:

1. JOB, J.-C. et al.: *Horm. Res.* 8, 171–187 (1977).
2. PRADER, A.: In „Clinical Endocrinology“, 2. Aufl. (Labhart, A., Ed.), Springer-Verlag, New York, S. 1013–1059 (1986).

D 11

## Ein HPLC-Analysensystem mit Nachsäulenderivatisierung zur vollautomatischen Bestimmung der Vanillinmandelsäure im Urin

B. Wilmers<sup>1</sup>, K.-S. Boos<sup>1</sup> und R. Sauerbrey<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorium für Biologische Chemie, Universität Paderborn, 4790 Paderborn, Postfach 1621  
<sup>2</sup> E. Merck, 6100 Darmstadt, Postfach 4119

Die Vanillinmandelsäure (VMA, 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure) ist der Hauptmetabolit der Catecholamine Noradrenalin und Adrenalin im peripheren, vegetativen Nervensystem. Ihre Quantifizierung im klinisch-chemischen Labor dient der Differenzialdiagnose bei Hypertonie und wird als Indiz für Catecholamin-produzierende Tumoren (Phäochromozytom, Neuroblastom) herangezogen (1).

Neben der photometrischen Bestimmung der VMA nach Pisano (2) finden heute Verfahren der Dünnschichtchromatographie, der Gaschromatographie und der Hochleistungsflüssigchromatographie verstärkter Einsatz. Als praktikable und leistungsfähige Quantifizierungsmethoden haben sich in der Praxis HPLC-Verfahren herauskristallisiert, die in der Mehrzahl, analog der anderen chromatographischen und photometrischen Methoden, eine externe und manuelle Probenaufarbeitung durch flüssig-flüssig- oder flüssig-Festphasenextraktion voraussetzen. In den bislang publizierten, automatisierten HPLC-Analysenverfahren werden zur Extraktion der Vanillinmandelsäure aus der Urinmatrix Anionenaustauscher (3) oder RP-Phasen (4) auf Kieselgelbasis eingesetzt. Die Detektion der Vanillinmandelsäure erfolgt mittels UV-, Fluoreszenz- oder elektrochemischer Detektoren, wobei letztere nur bedingt für die Routineanalytik geeignet sind.

In dieser Arbeit wird ein vollautomatisches HPLC-Analysensystem mit Nachsäulenderivatisierung zur Quantifizierung der Vanillinmandelsäure vorgestellt, welches von der Injektion der auf pH 3,0 eingestellten Urinproben weder eine manuelle Probenaufarbeitung noch ein Verdünnen der Proben erfordert. Die systeminterne, „on-line“-Probenaufarbeitung erfolgt in einer selbstpräparierten Vorsäule, die mit einem sphärischen, mechanisch und chemisch stabilen, C-18-modifizierten Polyol-Copolymer gepackt ist. Unter alkalischen Pufferbedingungen (pH 8,5) bricht die Vanillinmandelsäure nach erfolgter Urininjektion auf

der Vorsäule durch ( $k' = 0,8$ ; „front-cut“) und wird über eine Säulenschaltung „on-line“ auf eine analytische Säule (LiChrospher, RP-Select B, 5 µm, 250 × 4 mm I.D.) transferiert. Neutrale und basische Matrixkonstituenten werden auf der Vorsäule retiniert und über eine Rückspülung („back flush“) in den Abfall eluiert. Die Trennung der Vanillinmandelsäure auf der analytischen Säule erfolgt unter isokratischen, ionenpaarchromatographischen Bedingungen (5 mM Tetrabutylammoniumhydrogensulfat). In dem der analytischen Säule nachgeschalteten Reaktionssystem zur Nachsäulenderivatisierung wird die Vanillinmandelsäure bei 60°C unter der Wirkung des Oxidationsmittels Natriumperjodat (20 mM) oxidativ zum stark UV-aktiven Vanillin decarboxyliert. Die Detektion des gebildeten Vanillins erfolgt, im Gegensatz zur photometrischen Bestimmung nach Pisano, im Absorptionsmaximum bei 345 nm. Das vorgestellte HPLC-Analysensystem zeichnet sich durch seine systeminterne, selektive Probenaufarbeitung, seine Stabilität und Präzision, die quantitative Wiederfindung des Analyten (vgl. Tabelle), die selektive Detektion, den breiten linearen Meßbereich (von 0,5 bis 100 nmol/ml), seine Nachweisgrenze (150 pmol/ml) und durch seine Routineteuglichkeit aus.

Tabelle: Wiederfindung und Präzision des vollautomatischen HPLC-Analysensystems zur Quantifizierung der VMA im Urin

Probe	Wiederfindung (%)		Variationskoeffizienten (%)			
	$\bar{x}$	$\sigma$	Konzentrationsbestimmung		Retentionszeit	
			Serie (n=15)	Tag/Tag (n=7)	Serie	Tag/Tag
Standard	99,3	2,8	1,8	4,3	0,8	4,8
Urin	98,4	4,6	4,4	—	0,6	—

$\bar{x}$ : Mittelwert;  $\sigma$ : Standardabweichung

Schrifttum:

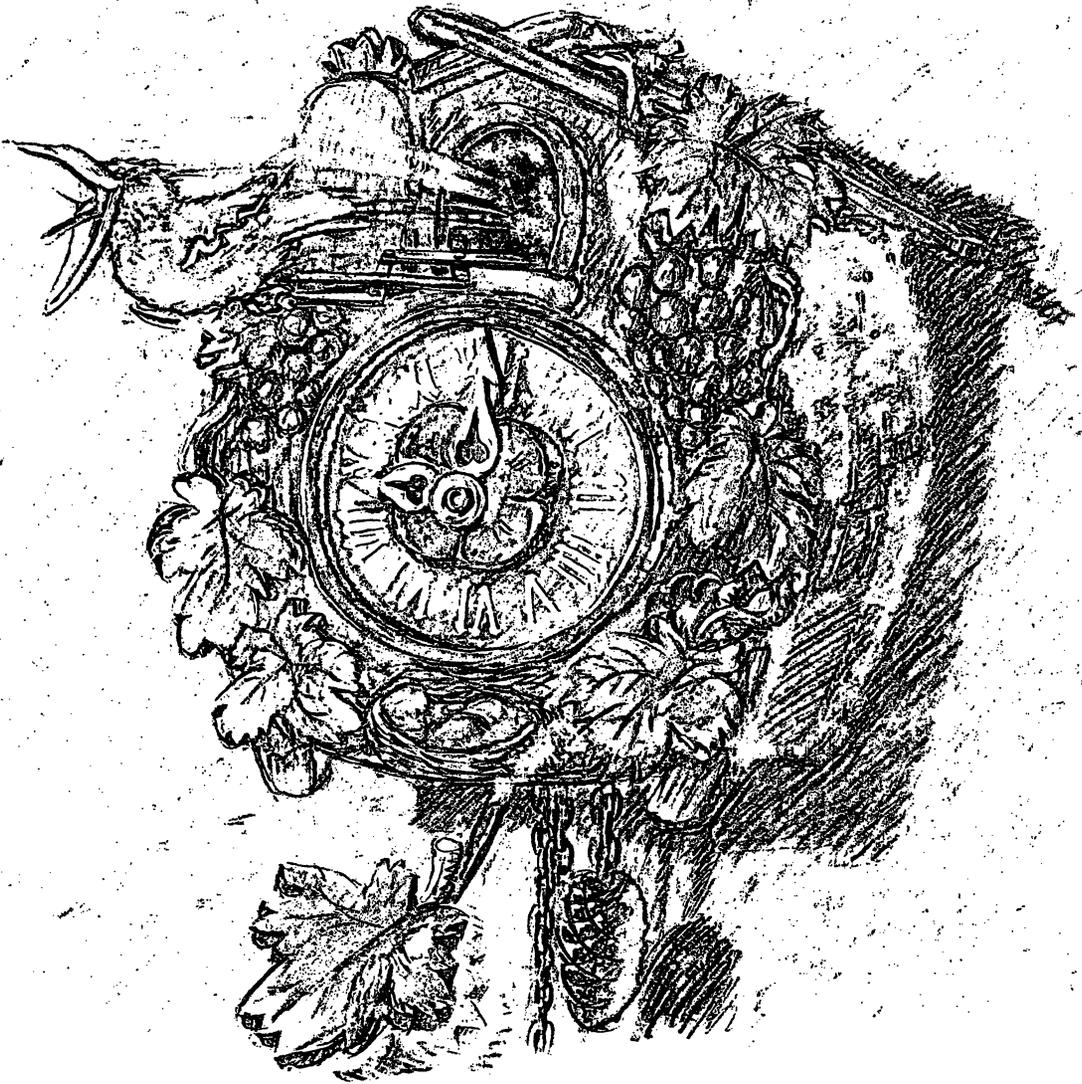
1. KRSTULOVIC, A. M., ZAKARIA, M., LOHSE, L., BERTANI-DZIEDIC, J. *Chromatogr.* 186, 733 (1979).
2. PISANO, J. J., CROUT, J. R., ABRAHAM, D.: *Clin. Chim. Acta* 7, 285 (1962).
3. KAGEDAL, B., GOLDSTEIN, D. S.: *J. Chromatogr.* 429, 177 (1988).
4. NEBINGER, P., KOEL, M.: *J. Chromatogr.* 434, 43 (1988).

D 12

## Die Anwendung des Bio-Rad-HPLC-Verfahrens zur Bestimmung von 4-Hydroxy-3-Methoxy-Mandelsäure (Vanillinmandelsäure) im Urin als Routinediagnostik

M. Oppitz und J. Hilgenfeldt  
 Zentrallaboratorium am Klinikum der BfA, Bad Kissingen

Die Inzidenz von Phäochromozytomen unter Hypertonikern beträgt lt. Literaturangaben 0,5% (1), einzelnen Autoren zufolge ist diese Zahl wesentlich kleiner (2). Jedoch müssen beim Auftreten der Symptomtrias Kopfschmerz, Palpitationen und Hyperhidrosis bei bestehender Hypertonie weiterführende Untersuchungen zum Ausschluß eines Phäochromozytoms durchgeführt werden. Der erste diagnostische Schritt zur Abklärung ist die Messung der 4-Hydroxy-3-Methoxy-Mandelsäure (Vanillinmandelsäure), die wegen ihrer relativ hohen Harnkonzentrationen ohne größere Schwierigkeiten meß- und quantifizierbar ist. Ältere Bestimmungsmethoden waren langwierig, umständlich durchzuführen und technisch aufwendig. Wegen mangelnder Spezifität der Verfahren wurden damit bis zu 30% der pathologischen Proben als innerhalb des Normbereichs liegend ermittelt (3). Der neue HPLC-Test (Bio-Rad, München) ist hochspezifisch. Im Hinblick auf seine Verwendbarkeit im Kliniklabor wurde das Verfahren auf Präzision und Zeitaufwand untersucht. Die Proben-



## Made for Germany

ABBOTT erzielt mit dem Bereich Diagnostika heute über 1 Milliarde Dollar Jahresumsatz. Um dabei immer höchste, gleichbleibende Qualität zu gewährleisten, werden die Produkte nach strengen Qualitätsnormen geprüft. ABBOTT genießt dafür weltweit hohes Ansehen.

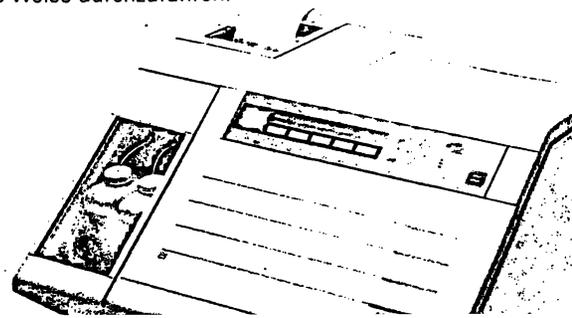
### IMx, der vollautomatische Immunoassay-Analyzer

Durch Kombination verschiedener Technologien in einem System und den Vorzügen eines schnellen Automaten sind Sie in der Lage, in den Bereichen Schilddrüsen-, Tumor- und Hormondiagnostik zukünftig jeden Parameter jeden Tag auf wirtschaftliche Weise durchzuführen.



# ABBOTT

Abbott GmbH Diagnostika  
Max-Planck-Ring 2  
6200 Wiesbaden-Delkenheim  
Telefon 06122/501-01



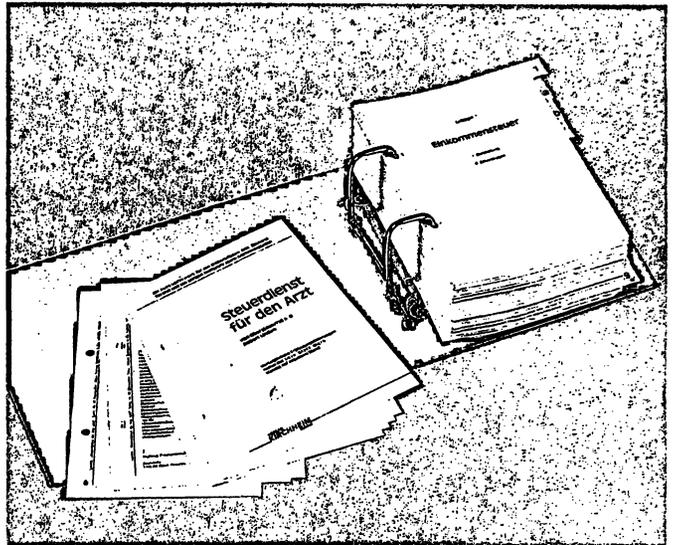
# Steuerdienst für den Arzt

Die für den Arzt einschlägigen Urteile finden Sie – nach Stichworten geordnet – in dem Loseblattwerk von Oberstueerrat Robert Linden.

Das Werk enthält u. a. die statistischen Kostensätze der Ärzte aller Fachrichtungen sowie Testbögen, die eine genaue Kostenanalyse der Praxis ermöglichen. Der Rationalisierung Ihrer Praxis dient das ausführliche „ABC der abzugsfähigen Ausgaben bei der Einkommensteuer“.

## Hand aufs Herz

- \* Verschenken Sie nicht auch Jahr für Jahr viel Geld an das Finanzamt?
- \* Nehmen Sie alle legalen Steuerminderungsmöglichkeiten in Anspruch?
- \* Stellen Sie rechtzeitig die notwendigen Anträge?
- \* Haben Sie Zeit und Gelegenheit, sich über Ihre berufsspezifischen Steuerfragen in den Steuerfachzeitschriften zu orientieren?
- \* Verlassen Sie sich ganz auf Ihren Berater?
- \* Haben Sie schon einmal einen Praxiskostentest gemacht?
- \* Wissen Sie, ob Sie mehr oder weniger als Ihre vergleichbaren Kollegen verdienen?



**VERLAG  
KIRCHHEIM** Postfach 25 24, 6500 Mainz 1  
**MAINZ**

Hiermit bestelle ich ein Grundwerk „**Steuerdienst für den Arzt**“ zum Preis von 79,80 DM und die künftig vierteljährlich erscheinenden Ergänzungslieferungen zum Seitenpreis von – ,37 DM.

Sie garantieren mir, daß ich diese Bestellung binnen einer Frist von einer Woche schriftlich widerrufen kann. Der Widerruf ist an den Verlag Kirchheim, Postfach 25 24, 6500 Mainz, zu richten. Zur Wahrung der Frist genügt die rechtzeitige Absendung des Widerrufs.

Anschrift:

Name: \_\_\_\_\_

Straße: \_\_\_\_\_

PLZ/Ort: \_\_\_\_\_

Datum/Unterschrift: \_\_\_\_\_

Datum

Unterschrift

vorbereitungszeit einer Meßreihe dauerte ca. 75 min, eine hochdruckflüssigkeitschromatographische Analyse nahm ca. 6 min in Anspruch. Die Evaluation für die Präzision in der Serie einen VK von 4,2% im niedrigen, 2,4% im mittleren und 0,9% im erhöhten Bereich. Im Vergleich von Tag zu Tag lag der VK für die Normwerte bei 5%. Der dynamische Arbeitsbereich verlief von 1–40 mg/l linear. Der Vergleich mit einer Routinemethode (Photometrischer Säulentest, Bio-Rad, München) ergab eine gute Korrelation zwischen den Wertepaaren ( $r = 0,97$ ,  $f(x) = 0,97 + 0,07$ ,  $S_{xy} = 0,79$ ). Bei im Vergleich zum Säulentest höherer Präzision und geringerem Arbeitsaufwand, erwies sich das Verfahren für den täglichen Einsatz im Routinelabor als gut geeignet.

Schrifttum:

1. HICKLER, R. B., THORN, G. W.: Principles of Internal Medicine (Hrsg.: HARRISON, T.), McGraw Hill 1986.
2. SCHOFER, J.: Med. Klin. 83, 841–843 (1988).
3. GITLOW, S. E., MENDLOWITZ, M., BERTONI, L. M.: The Am. J. of Cardiology 26, 270–279 (1970).

D 14

## Heterogenität des hCG in der Schwangerschaft und bei Tumoren

J. S. E. Dericks-Tan und H.-D. Taubert  
Abt. für Gyn. Endokrinologie, ZFG, J. W. Goethe Universität,  
6000 Frankfurt

Der Anteil der hCG $\beta$ -Sekretion im Verhältnis zum biologisch-aktiven holo-hCG ist in der Schwangerschaft sehr gering, während diese Ratio bei pathologischen Zuständen höher ist (1–4). Wir untersuchen die hCG-Aktivitäten nicht nur hinsichtlich quantitativer, sondern auch qualitativer Unterschiede in der Schwangerschaft und bei Patienten mit Chorionkarzinom (ChCA) bzw. Hodenteratom, und zwar mit Hilfe von 2 unterschiedlichen immunometrischen Methoden und der Gelfiltration (Sephadex-G100). Die erste Methode erfaßt nur das holo-hCG (hCG $\alpha\beta$ ), während die zweite sowohl das holo-hCG als auch seine  $\beta$ -Untereinheit (hCG $\alpha\beta$  + hCG $\beta$ ) mißt.

In der Schwangerschaft unterscheidet sich der Spiegel von hCG $\alpha\beta$  nicht signifikant von hCG $\alpha\beta$  + hCG $\beta$ . Beim Chorionkarzinom dagegen sind die hCG $\alpha\beta$  + hCG $\beta$ -Spiegel eindeutig höher als die des hCG $\alpha\beta$  ( $p \leq 0,001$ ). Die qualitative Analyse nach Gelfiltration der Serumproben von Schwangeren und des Patienten mit Hodenteratom zeigte ein gleiches Elutionsprofil, wenn die Fraktionen mit beiden Methoden gemessen wurden. Im Gegensatz hierzu wurde in den Fraktionen nach Gelfiltration der ChCA-Seren ein unterschiedliches Elutionsprofil der hCG-Aktivität gefunden, wenn die Fraktionen mit beiden Immunoassays gemessen wurden. Das Maximum der hCG $\alpha\beta$ -Aktivität in den Chromatogrammen der ChCA-Seren ist vergleichbar mit denen in der Schwangerschaft bzw. beim Hodenteratom. Die hCG $\alpha\beta$  + hCG $\beta$ -Aktivität dagegen wurde in verschiedenen Fraktionen gefunden, die sich über einen großen Bereich erstrecken und nicht nur dem hCG $\alpha\beta$  und hCG $\beta$  zugeordnet werden können. Möglicherweise handelt es sich um größere bis kleinere Moleküle mit hCG-ähnlicher immunologischer Aktivität. Es kann gefolgert werden, daß sich die höheren hCG $\alpha\beta$  + hCG $\beta$ -Aktivitäten im Serum von Patientinnen mit ChCA nicht mit einem höheren hCG $\beta$ -Anteil erklären lassen, sondern vermutlich mit anderen hCG-immunaktiven Substanzen mit unterschiedlichen Zuckeranteilen begründet werden können.

Schrifttum:

1. GASPARD, U. J. et al.: Clin. Endocrinol. 13, 319 (1980).
2. FAN, C. et al.: J. Clin. Endocrinol. Metab. 64, 313 (1987).
3. Ozturk, M. et al.: Am. J. Obstet. Gynecol. 158, 193 (1988).
4. WIDE, L., HOBSON, B.: Acta Endocrinol. 116, 465 (1987).

D 15

## Automatische Bestückung von Objektträgern mit Biochips: Eine neue Technologie für die indirekte Immunfluoreszenz

W. Stöcker, E. Horbach, W. Slenczka<sup>1</sup>, J. Schaper,  
Kirstin Böttger und Claudia Herrmann  
Klinik für Innere Medizin der Medizinischen Universität Lübeck;  
<sup>1</sup> Institut für Virologie der Universität Marburg;  
EUROIMMUN Lübeck

Für die Immunfluoreszenz-Diagnostik von Autoimmun- und Infektionserkrankungen steht eine rationale Methode zur Verfügung [Acta histochem. Jena 31, Suppl., 269–281 (1985)], bei der die antigenhaltigen Substrate (Gewebeschnitte, Zellrasen oder Zellausstriche) nicht direkt auf Objektträger gebracht werden, sondern zunächst auf Kunststoff-Folien oder auf Deckgläser. Diese werden dann manuell in Fragmente von etwa 2 mm  $\times$  2 mm unterteilt (BIOCHIPS). Die Fragmente werden anschließend auf Reaktionsfelder besonders konfigurierter Objektträger geklebt — je Reaktionsfeld ein Fragment, bei Bedarf aber auch mehrere Fragmente mit unterschiedlichen Substraten nebeneinander (BIOCHIP-MOSAIC). Zur Herstellung und Weiterverarbeitung

D 13

## Ein neues Konzept zur radioimmunologischen Bestimmung (RIA) des Noradrenalins und Adrenalins sowie des Normetanephrens und Metanephrens

B. Manz und K. Pollow  
Abteilung für Experimentelle Endokrinologie,  
Johannes Gutenberg Universität, Mainz

Die Bestimmung des Noradrenalins (NA) und des Adrenalins (A) wird im Routinelabor entweder fluorimetrisch, radioenzymatisch oder durch HPLC-Chromatographie mit elektrochemischer Detektion durchgeführt. Diese Methoden sind entweder störanfällig und/oder zeitaufwendig. Im Folgenden werden radioimmunologische Methoden beschrieben, die eine sehr einfache und daher gut reproduzierbare Probenvorbereitung mit der Spezifität und hohen Empfindlichkeit des RIAs verbinden. Bestimmt werden nicht das Noradrenalin und Adrenalin, sondern ihre Derivate N-Acetylnormetanephrin und N-Acetylmetanephrin. Die Probenvorbereitung für beide Parameter erfolgt in einem Polyethylenzentrifugenröhrchen, beschickt mit 50  $\mu$ l eines m-Aminoborsäuregels. Die Katecholamine binden bei pH 8,5 quantitativ an dieses Gel, die Metanephrene werden beim nachfolgenden Waschschriff entfernt. Anschließend werden durch Zugabe von Sorbitol-HCl die Katecholamine freigesetzt und durch 90minütige Inkubation mit Catechol-o-methyltransferase/S-Adenosylmethionin p-toluenesulfonat zu Normetanephrin (NMN) und Metanephrin (MN) umgewandelt. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe einer die Aminogruppen vollständig acetylierenden Lösung von Acetanhydrid in Aceton (1) gestoppt. Die so erhaltenen Derivate werden in spezifischen RIAs für NMN (2) und MN bestimmt.

Die verwendeten Antikörper sind hochspezifisch für N-Acetylnormetanephrin bzw. N-Acetylmetanephrin. Die analogen <sup>125</sup>I-Bolton-Hunter-Konjugate des NMN und MN dienen als Tracer. Die Trennung von gebundenem und freiem Tracer erfolgt im Doppelantikörper-Verfahren. Die Nachweisgrenzen für NA liegen bei 1 pg/Röhrchen, für A bei 5 pg. Es werden 100  $\mu$ l Urin zur Bestimmung von NA und A, 1 ml Plasma zur Bestimmung des NAs benötigt. Die Metabolite NMN bzw. MN lassen sich in den gleichen RIA-Ansätzen bei entsprechender Verdünnung der Urinprobe (die Acetylierung stellt dabei den Verdünnungsschritt dar) direkt bestimmen.

Schrifttum:

1. MANZ, B. et al.: Direkte radioimmunologische Bestimmung des Serotonins in normalen und pathologischen Seren. Arztl. Lab. 32, 135–140 (1986).
2. MANZ, B. et al.: Screening for pheochromocytoma by direct radioimmunoassay of urinary normetanephrine. Acta Endocrinol. Suppl. 287, 245 (1988).

der BIOCHIPS wurde nun ein Handhabungssystem entwickelt, bei dem das Fragmentieren der Deckgläser elektronisch gesteuert wird und die BIOCHIPS automatisch aufgeklebt werden:

Gewebeschnitte für die Autoantikörper-Diagnostik wurden auf Deckgläser aufgebracht und mit Hilfe einer Fernsehkamera auf einem Bildschirm dargestellt. Ein Rastergitter wurde eingeblendet und von einer Bedienungsperson so über die einzelnen Gewebeschnitte gelegt, daß sich eine optimale Untergliederung in jeweils mehrere virtuelle Gewebeschnitt-Fragmente ergab. Dann wurden die Deckgläser entlang der vorgegebenen Rasterlinien automatisch geritzt und zerteilt. Nur Fragmente mit relevanten Gewebebezirken wurden weiterverwendet, die übrigen wurden automatisch ausgesondert. Für den Transfer der Fragmente auf die Objektträger wurde eine Palettiervorrichtung konstruiert, mit der die ausgewählten, einwandfreien Fragmente zielgenau und reproduzierbar auf Reaktionsfelder geklebt wurden: Sie bestand aus einem Vorlagetisch für die vorbereiteten Fragmente, einer Transfereinheit und einem Positioniertisch zur Aufnahme der Objektträger. Diese wurden nach jedem Bestückungsvorgang um jeweils ein Reaktionsfeld verschoben.

Präparate für die Infektions-Serologie: Vero-Zellen wurden mit verschiedenen Viren infiziert und auf Deckgläser aufgetragen. Sobald sie angewachsen waren und ausreichende Mengen Virus-Antigene exprimiert hatten, wurden sie fixiert und getrocknet. In Suspension wachsende HIV-infizierte H-9-Zellen, Bakterien und Parasiten (*Treponema pallidum*, *Borrelia burgdorferi*, *Taxoplasma gondii*) wurden großflächig ausgestrichen und ebenfalls fixiert und getrocknet. Fragmentieren und Palettieren wie oben. Die Zellen zeigten eine besonders gleichmäßige Verteilung, da sie einem Zellrasen entnommen waren und nicht auf die Reaktionsfelder der Objektträger getropft zu werden brauchten.

Die beschriebenen Techniken erlauben eine breite Anwendung von BIOCHIPS. Sie ermöglichen eine Miniaturisierung und Standardisierung histochemischer und cytochemischer Analysen. Die BIOCHIP-Technologie läßt sich darüberhinaus auch für Radio-, Enzym-, Lumineszenz- und andere Immuntests nutzen.

D 16

## Klonierung retroviraler DNA aus Patienten mit systemischem Lupus Erythematoses

F. Krapf, W. Leitmann, M. Herrmann und J. R. Kalden  
Institut für klinische Immunologie und Rheumatologie,  
Med. Klinik III der Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen

Wie wir bereits früher zeigen konnten, enthält Plasma-DNA von Patienten mit systemischem Lupus Erythematoses (SLE) Abschnitte, die homolog zu retroviralen Genen sind; gezeigt wurde dies zunächst für den Klon E6, der eine 85%ige Homologie über 159 bp zur gag-pol-Region des HIV 1 aufweist. Dot Blots mit Hilfe dieses Klons zeigten retrovirale DNA in Plasmaproben verschiedener, nicht miteinander verwandter SLE-Patienten, jedoch nicht in einem Patienten mit gemischter Kryoglobulinämie Typ II; aus diesem Patienten konnten wir als einzigem vergleichbare Mengen an Plasmankleinsäuren isolieren. Für den Nachweis von E6-homologer DNA in B-Zelllinien bzw. peripheren Blutlymphozyten durch DNA-Amplifikation wurden Oligonukleotidprimer synthetisiert und in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt. Bis jetzt fanden wir PCR-Produkte nur bei SLE-Patienten (7/30), AIDS-Patienten (4/4) sowie einem Patienten mit rheumatoider Arthritis (1/3), nicht aber in gesunden Kontrollen ( $n = 10$ ), was eher für ein exogenes virales Agens spricht. Bei SLE-Patienten konnten diese Resultate durch Northern-Blots mit dem Klon E6 bestätigt werden.

In einem in vitro-System wurde eine von einem Normalspender etablierte humane B-Zelllinie (B62) mit Gesamt-Plasmankleinsäure transfiziert; obwohl keine Viruspartikel im Überstand der Zelllinie auftauchten, zeigten die Zellen verschiedene Charakteristika einer Transformation durch Retroviren. So zeigte sich ein zu den Patienten-PBL-Proben ähnliches Reaktionsmuster im Northern Blot und der PCR-Reaktion, ein für retroviral infizierte Zellen typisches Muster an myristylierten Proteinen sowie weitere viral induzierte Effekte. Es wurde daher eine cDNA-Bank vom

mRNA aus transfizierten B62-Zellen angelegt, mit Klon E6 gescreent und auf diese Weise zwei Klone mit 8 bzw. 9 kbp Inserts isoliert. Diese wurden in geeignete Plasmidvektoren subkloniert und werden nun sequenziert, um detaillierte Daten bezüglich der Herkunft dieses retroviralen Genoms zu erhalten. Die Verwandtschaft der Sequenzen zu bekannten Retroviren sowie ihre Assoziation zum Krankheitsbild des SLE werden diskutiert.

D 17

## Monoklonale Antikörper gegen den Insulinrezeptor aus Humanplacenta

J. O. Weiß, R.-R. Flörke, M. Koenen, W. Paßlack, H. Klein,  
H. Kolb und H. Reinauer  
Diabetes-Forschungsinstitut, Düsseldorf

Der Insulinrezeptor ist ein integrales Membranglykoprotein, das aus zwei  $\alpha$ -Untereinheiten ( $M_r$  135000) und zwei  $\beta$ -Untereinheiten ( $M_r$  95000) besteht. Diese Bindung des Insulins an seinen Rezeptor erfolgt an die extrazelluläre  $\alpha$ -Untereinheit, während auf der intrazellulären Domäne der  $\beta$ -Untereinheit eine durch Insulin stimulierbare Tyrosinkinase lokalisiert ist.

Monoklonale Antikörper können aufgrund der hohen Spezifität für ein Epitop zur Untersuchung von Struktur-Funktionsbeziehungen verwendet werden. Über die immunochemische Struktur des Insulinrezeptors ist noch nicht sehr viel bekannt, so daß das Mapping immunogener Regionen weitere Informationen über die funktionelle Bedeutung von Rezeptorstrukturen liefern kann.

Zur Produktion monoklonaler Antikörper wurde gereinigter Insulinrezeptor als Antigen eingesetzt und unterschiedliche Immunisierungsverfahren durchgeführt (1-3).

Aus Milz oder Lymphknoten immunisierter Balb/c-Mäuse wurden stimulierte Lymphozyten isoliert und mit Myelomzellen fusioniert. Das Screening der Hybridomüberstände wurde mit einem ELISA durchgeführt. Insgesamt wurden 15 positive Klone identifiziert. Monoklonale Antikörper erhielten wir mit der „limiting dilution technique“. Ausgewählte Klone wurden im Aszitestumor syngener Mäuse vermehrt und als IgM, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> und IgG<sub>2b</sub> bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß dieser Antikörper auf die Bindung von <sup>125</sup>I-Insulin an die dimere ( $\alpha\beta$ ) und die tetramere Form ( $\alpha_2\beta_2$ ) des Rezeptors untersucht. Die Bindung des Hormons an den Rezeptor wurde durch zwei der getesteten Antikörper unterschiedlich stark gehemmt. Ein dritter Antikörper zeigte einen biphasischen Effekt, der konzentrationsabhängig war.

Schrifttum:

1. HOLMDAHL, R. et al.: J. Immunol. Meth. 83, 379-384 (1985).
2. KÖHLER, G., MILSTEIN, C.: Nature 256, 495-497 (1975).
3. WEISS, J. O. et al.: Biol. Chem. Hoppe-Seyler 368, 1124 (1987).

D 18

## Transthyretin – Das wichtigste Schilddrüsentransportprotein?

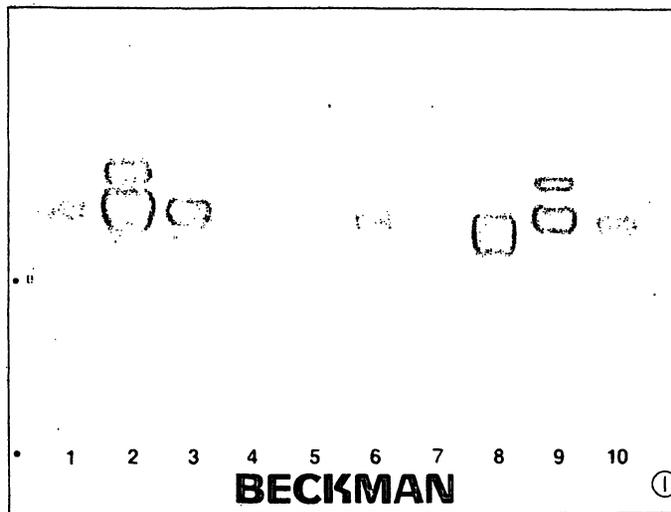
Jutta Ramaker<sup>1</sup>, G. Baretton<sup>2</sup> und W. G. Wood<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinik für Innere Medizin

<sup>2</sup> Institut für Pathologie

Medizinische Universität zu Lübeck, Ratzeburger Allee 160,  
2400 Lübeck 1

Transthyretin (thyroxinbindendes Präalbumin – TBPA) ist als Schilddrüsenhormontransportprotein seit über 30 Jahren bekannt (1). Abdugarimov (2) beschrieb TBPA-Rezeptoren im Kern, im Zytoplasma und in den Zellorganellen und zeigte, daß TBPA durch die Zellwand transportiert wird. Dies wertet die Bedeutung des TBPA als Schilddrüsenhormontransportprotein erheblich auf. Gleichzeitig wird das thyroxinbindende Globulin (TBG) einer Pufferkapazitätsfunktion untergeordnet. Um die Bedeutung des TBPA zu erforschen, wurden 787 Personen in einer



## Angezeigt

bei Knochenerkrankungen, hepatobiliären Erkrankungen,  
Hyperphosphatasämien, Gammopathien,  
unbegründbaren Beschwerden und in der Onkologie.

# Neu! ISOPAL

## Alkalische Phosphatase-Isoenzyme

Der neue Paragon Elektrophorese Kit ISOPAL von Beckman bietet nicht nur die klare und genaue Auflösung der Knochen- und Leberfraktion, sondern darüber hinaus die Separierung intestinaler Fraktionen sowie den Nachweis atypischer Varianten. Detaillierte Informationen erhalten Sie von uns gerne auf Anfrage.



Beckman Instruments GmbH  
Diagnostic Systems,  
Frankfurter Ring 115,  
8000 München 40,  
Telefon 089/3887-1

Beckman Instruments Ges.m.b.H.  
Diagnostic Systems Group  
Stefan-Esders-Platz 4,  
1190 Wien,  
Telefon 0222/322557

Beckman International S.A.  
Diagnostische Systeme,  
Förrlibuckstraße 150,  
8005 Zürich,  
Telefon 01/44 16 44

**BECKMAN**  
*die intelligente Alternative*

# EDITION

# DEUTSCHER SCHRIFTSTELLERARZTE

## Literaturpreis 1988 der Bundesärztekammer



WILHELM THEOPOLD

### Doktor und Poet dazu

Dichterärzte  
aus sechs  
Jahrhunderten

428 Seiten, geb., 39,80 DM, 2. Aufl.  
ISBN 3-87409-032-9



HARALD NEUMANN

### Alfred Döblin

Leben und Werk  
Krankheit und Tod

112 Seiten, Broschur,  
18,00 DM  
ISBN 3-87409-031-0



ALFRED RÖTTLER

### C'est la vie

Nachlese eines  
Nürnberger Arztes

108 Seiten, geb.,  
19,80 DM  
ISBN 3-87409-034-5



HANS SPIECKER

### Hinter Bremsspur und Blaulicht

Ein Geschenk für  
Unfallverletzte und  
ihre Angehörigen

69 Seiten, 16,80 DM  
ISBN 3-87409-033-7



HANS SPIECKER

### Trotz Rollstuhl und Sozialdienst

Ein Angebot für  
Behinderte und  
ihre Freunde

64 Seiten, Broschur,  
16,80 DM  
ISBN 3-87409-029-9



HELMUT KAATZSCH

### Der Schwimmgürtel

Optimistisches,  
gedacht und erlebt

40 Seiten, Broschur,  
15,80 DM  
ISBN 3-87409-027-2



GERLINDE NYNCKE

### Wenn Zaun- pfähle nicht so schwer wären

Gedanken und  
Aphorismen

48 Seiten, Broschur,  
12,80 DM  
ISBN 3-87409-028-0



## Bestellschein

Ich bestelle folgende Titel (bitte ankreuzen):

- Doktor und Poet dazu 39,80 DM
- Wenn Zaunpfähle nicht so schwer wären 12,80 DM
- Der Schwimmgürtel 15,80 DM
- Hinter Bremsspur und Blaulicht 16,80 DM
- Trotz Rollstuhl und Sozialdienst 16,80 DM
- C'est la vie 19,80 DM
- Alfred Döblin 18,00 DM
- Sterne über fernen Ländern 24,80 DM
- Die Porzellanpendüle 29,80 DM
- Der Schneemann 19,80 DM

Name \_\_\_\_\_

Straße \_\_\_\_\_

PLZ Ort \_\_\_\_\_

Datum/Unterschrift \_\_\_\_\_

XXVIII



HANSGEORG  
SCHMIDT-GLINTZER

### Der Schneemann

und andere  
Geschichten

92 Seiten,  
Leineneinband  
19,80 DM  
ISBN 3-87409-037-X



WOLFGANG  
LOHMANN

### Die Porzellan- pendüle

und andere  
Geschichten

224 Seiten,  
Leineneinband,  
29,80 DM  
ISBN 3-87409-036-1



URSULA RAMM

### Sterne über fernen Ländern

Ein Weltspaziergang

148 Seiten  
Leineneinband  
24,80 DM  
ISBN 3-87409-035-3

## Bestellungen

über jede Buchhandlung  
oder direkt beim

VERLAG  
**KIRCHHEIM**

Postfach 2524, 6500 Mainz

dreijährigen Periode untersucht. Darunter waren 261 Gesunde in drei Altersgruppen, 45 Intensivstationpatienten (Beobachtungszeitraum 3–121 Tage), 423 Schwerkranke (Krebs-, Dialyse- und Lungenobstruktionspatienten) und 58 Hyper- und Hypothyreoten vor und unter Therapie.

Ein Teil der Ergebnisse sind als Abstrakt vor kurzem erschienen (3). Das Verhältnis des TBPA zu den freien Schilddrüsenhormonen wurde durch die Bildung zweier Produkte, das Thyroxinverfügbarkeitsindex ( $T_4AI$ ) und das Triiodthyroninverfügbarkeitsindex ( $T_3AI$ ) erstellt. Die  $T_4AI$  und  $T_3AI$  stellen die potentiellen Mengen von Schilddrüsenhormonen, die entweder an TBPA gebunden oder als „freie Hormone“ in die Zelle gelangen. Immunohistochemische Darstellung von TBPA in Herz-, Nieren-, Lungen-, Schilddrüsen- und Muskelgewebe wurden durchgeführt. Die wichtigsten Ergebnisse sind in den folgenden Abschnitten zusammengefaßt. Das wichtigste Parameter zur Feststellung der Schilddrüsenhormonfunktion auf zellulärer Ebene ist das  $T_4AI$ . Die Werte der Schilddrüsenkranken sind in Tab. 1 gezeigt. Wie schon vorher veröffentlicht wurde (3) ist das  $T_4AI$  normal bei schwerkranken Patienten, obwohl einzelne Schilddrüsenparameter schon oft in pathologischen Bereichen zu finden sind. Bei Schwerkranken, die z. T. bis 20 verschiedene Medikamente gleichzeitig bekommen, versagen oft auch das  $T_4AI$  und das  $T_3AI$ . Bei Akutintensivpatienten (z. B. Verkehrsunfall, Blitzschlag) sind die absinkenden  $T_4AI$ - und  $T_3AI$ -Werte nur vorübergehend, die sich nach der Krise rasch normalisieren.

Tab. 1: Schilddrüsenparameter bei Hyper- und Hypothyreoten Patienten – Medianwerte

Parameter	Hyperthyreote unbehandelt (n = 13)	Hyperthyreote behandelt (n = 19)	Hyperthyreote unbehandelt (n = 13)	Hyperthyreote behandelt (n = 13)
$fT_4$ pmol/l	42	18*	6,6	9,7*
$fT_3$ l	12,5	8,18	3,89	8,24*
TBG mg/l	17,1	19,0	17,5	16,0
TSH mE/l	< 0,03	< 0,03	35,0	18,0
TBPA g/l	< 0,24	0,15	0,16	0,46*
$T_3AI$	3,36	1,51*	0,45	3,40*
$T_4AI$	11,2	2,52*	0,87	3,88*

\* = Signifikanter Unterschied ( $p \leq 0,01$ ) zwischen Unbehandelten und Behandelten. Euthyreote Referenzbereiche:  $T_3AI = 0,5-3,2$ ;  $T_4AI = 1,25-6,25$ ;  $fT_3l = 7,5-9,5$ ; TSH = 0,2–3,5; TBPA = 0,1–0,5; TBG = 12–31;  $fT_4 = 10-25$ .

#### Schrifttum:

1. INGBAR, S. H.: Pre-albumin: a thyroxine-binding protein of human plasma. *Endocrinol.* 63, 256–259 (1958).
2. ABDUKARIMOV, A.: Regulation of genetic activity by thyroid hormones. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 15, 17–48 (1983).
3. RAMAKER, J., SCRIBA, P. C., WOOD, W. G.: Transthyretin – a forgotten thyroid hormone transport protein. *Acta Endocrinol. (Kbh)* 120, Suppl. 1, 44–45 (1989).

D 19

## Messung von Anti-Bet v 1-spezifischen IgE-Antikörper vor und nach Hyposensibilisierungstherapie mittels eines ELISAs unter Verwendung monoklonaler Anti-Bet v 1-Antikörper

H. Rumpold, R. Steiner, T. Birkner, M. Rohac, O. Scheiner, M. Breitenbach und D. Kraft  
 Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, Institut für Mikrobiologie und Genetik und Institut für Allg. und Exp. Pathologie, Universität Wien

Bei Typ-I-Allergien gegen Birkenpollen wurde ein 17-kD-Protein Bet v 1 als Hauptallergen beschrieben (1). Durch Immunisierung von Mäusen mit wäßrigen Pollenextrakten wurden monoklonale Antikörper gegen Birkenpollenproteine nach Stan-

darotechniken hergestellt (2). Zwei Antikörper, BIP 1 und BIP 4, reagierten spezifisch mit einem 17-kD-Protein in Immunoblotexperimenten. Mittels hochauflösender 2D-Elektrophorese/Immunoblot und dem Vergleich mit der Reaktivität von IgE-Antikörpern konnte gezeigt werden, daß dieses 17-kD-Protein dem Hauptallergen des Birkenpollen Bet v 1 entspricht. Die monoklonalen Antikörper wurden aus dem Aszites von Mäusen mittels Protein-A-Sepharose-Chromatographie gereinigt. Unter Verwendung dieser Antikörper gelang es, einen für Bet v 1-spezifischen ELISA zur Messung von Anti-Bet v 1 IgE-Antikörpern zu etablieren (Kurzbeschreibung: Beschichtung von Mikrotiterplatten mit monoklonalen Antikörpern [20 µg/ml], Inkubation mit Pollenproteinextrakt [100 µg/ml], Absättigung mit 1% HSA, Inkubation mit Patientensera-Nachweis von IgE mittels eines mit alkalischer Phosphatase markierten anti-IgE-Antikörpers [Verdünnung 1:2]. Die optimalen Konzentrationen der einzelnen Reagenzien wurden mittels Schachbrettiteration bestimmt). Der von uns etablierte ELISA wurde zur Messung von Anti-Bet v 1-spezifischen IgE-Antikörpern vor und nach einer Hyposensibilisierungstherapie eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, daß es nach der Hyposensibilisierungstherapie zu einer signifikanten Abnahme (25–50%) der Bet v 1-spezifischen IgE-Antikörper kommt. Es bestand jedoch keine Korrelation zwischen der Abnahme der Anti-Bet v 1-spezifischen IgE-Antikörper und dem klinischen Ergebnis der Therapie. Da im Zusammenhang mit Hyposensibilisierungstherapie die Bedeutung von verschiedenen IgG-Subklassen diskutiert wird, versuchen wir gegenwärtig, den von uns entwickelten ELISA für die Messung von IgE-Subklassen zu optimieren.

#### Schrifttum:

1. MARSH, D. G., GOODFRIED, L., KING, T. P. et al.: Allergen nomenclature. *Bull. WHO* 64, 767–770 (1986).
2. JAROLIM, E., TEIKL, M., ROHAC, M., SCHLERKA, G., SCHEINER, O., KRAFT, D., RUMPOLD, H.: *Int. Arch. Allergy Appl. Immun.* (im Druck) (1989).

D 20

## Heterogenität von Birkenpollenallergenen: Darstellung mittels hochauflösender zweidimensionaler Elektrophorese und Immunoblot

M. Rohac<sup>1</sup>, T. Birkner<sup>2</sup>, M. Tejkl<sup>2</sup>, I. Reimitzer<sup>1</sup>, O. Scheiner<sup>2</sup>, M. Breitenbach<sup>3</sup>, D. Kraft<sup>1</sup> und H. Rumpold<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> Inst. Klin. Chem. Lab. Diagn.  
<sup>2</sup> Inst. Allg. Exp. Path.  
<sup>3</sup> Inst. Mikrobiol. Gen. Univ. Wien, Wien, Österreich

Das Allergenspektrum von Birkenpollen umfaßt das Hauptallergen, Bet v 1 (1) mit einem Molekulargewicht von 17 kilo Dalton (kD) und mehrere Nebenallergene (13 kD–68 kD) (2). Mittels Ionenaustauschchromatographie und isoelektrischer Fokussierung wurde eine Heterogenität von Bet v 1 gezeigt (3). Zur Abklärung der Fragestellung, ob mit dieser Heterogenität auch eine unterschiedliche Immunogenität verbunden ist, wurde Extrakt von Birkenpollen mittels hochauflösender zweidimensionaler Elektrophorese aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf Nitrocellulose wurden die Reaktionsmuster der IgE-Antikörper von Patienten mit Typ-I-Allergie gegen Birkenpollen ( $n = 12$ ) sowie die von monoklonalen Anti-Bet v 1-Antikörpern (BIP 1, BIP 4) mittels Immunoblot untersucht. Im Bereich von Bet v 1 erkannten sowohl Patienten IgE als auch BIP 1 und BIP 4 zehn Proteinflecken mit pH-Werten von 4,9–5,9. Ein Nebenallergen mit 13 kD wurde in 4 Flecken (pH 4,4–6,0) aufgelöst. Diese Ergebnisse zeigen, daß Bet v 1 und das 13-kD-Protein jeweils eine Gruppe von immunologisch verwandten Isoallergenen darstellen.

#### Schrifttum:

1. MARSH, D. G., GOODFRIED, L., KING, T. P. et al.: Allergen nomenclature. *Bull. WHO* 64, 767–770 (1986).
2. JAROLIM, E., RUMPOLD, H., ENDLER, A. T. et al.: *Int. Arch. appl. Immun.* (im Druck) (1989).
3. IPSEN, H., LOEWENSTEIN, H.: *J. Allergy Clin. Immunol.* 72, 150–159 (1983).

## HLA-Typisierung mit Immunomagnetic Beads oder Standard-NIH-Technik – ein Vergleich beider Methoden

H. von Keyserlingk, U. Angelides, U. Geidner, B. Kirschbaum, N. Wöllert und E. Thiel

Abteilung für Hämatologie und Onkologie, Labor für Gewebetypisierung, Klinikum Steglitz, Freie Universität Berlin

Die Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut mit Hilfe von Immunomagnetic Beads (Dynabeads®) ist eine neue Methode im Rahmen der Gewebetypisierung; sie findet in unserem Labor bei Patienten mit hämatologisch-onkologischen oder Autoimmunerkrankungen, potentiellen Empfängern von Herz, Niere, Hornhaut und in der Organspendertypisierung routinemäßig Verwendung.

Eine retrospektive Analyse von 480 mittels der Standard-NIH-Methode mit über Nylonwolle separierten T- und B-Zellen durchgeführten Untersuchungen (344 Organempfänger und 136 sonstige Patienten) ergab, daß die HLA-A,B,C-Bestimmung bei insgesamt 2 Patienten nicht möglich, bei 6 Patienten fraglich war. Die HLA-DR,DQ-Bestimmung (insgesamt 417 Untersuchungen bei 292 Organempfängern und 125 sonstigen Patienten) war dagegen 82mal fraglich bzw. nicht möglich (67 Organempfänger, 15 sonstige Patienten). Die ergänzend durchgeführte Typisierung mit Immunomagnetic Beads ergab bei den Klasse-1-Antigenen nur 1mal ein fragliches Ergebnis. Bei den Klasse-2-Antigenen war die Dynabeads®-Methode der NIH-Methode überlegen: es zeigten sich 10 fragliche Befunde, 4mal war kein Ergebnis zu erheben, allerdings nur bei Organempfängern.

Ein Vergleich beider Methoden ergibt somit bei der HLA-DR, DQ-Typisierung mittels der Standard-NIH-Methode die Notwendigkeit zur Wiederholung der Untersuchung in 19,66% für das gesamte Patientenkollektiv (16,06% Organempfänger und 3,6% sonstige Patienten), mit der Dynabeads®-Methode ließ sich dieser Prozentsatz auf 3,35% senken. Auch erste Ergebnisse der Organspendertypisierung bestätigen mit nur 11,1% fraglichen Befunden diese Tendenz bei allerdings noch kleiner Fallzahl (n = 18).

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß bei Schwierigkeiten mit der Typisierung HLA-Klasse-2-Antigenen die Immunomagnetic Beads-Methode die NIH-Technik erfolgreich ergänzen bzw. sogar ersetzen kann, um Doppelbestimmungen zu vermeiden.

Schrifttum:

1. VARTDAL, et al.: Transplantation Proceedings (3) 20, 384 (1988).
2. VARTDAL, et al.: Tissue Antigens 28, 301–312 (1986).

## Nachweis erythrozytärer Antigene mit der Immunperoxidase-Methode: Klinische Fragestellungen

M. U. Heim, D. Jähne, B. Süskind, Ch. Clemm, U. Pachmann und W. Mempel  
Transfusionszentrum Med. III, Klinikum Großhadern, Universität München

Die meisten Methoden zur Darstellung erythrozytärer Antigene können wegen des technischen Aufwandes nur in wenigen Laboratorien angewendet werden. Wir haben daher in Anlehnung an die Immunfluoreszenz-Technik von A. Poschmann [Vox Sang. 24, 489 (1973)] eine Immunperoxidase-Methode etabliert. Hierzu werden gewaschene, in Rinderalbumin suspendierte Erythrozyten auf Objektträger ausgestrichen. Nach Trocknung wird eine perforierte Klebefolie aufgebracht, die als Reservoir für die nachfolgenden Inkubationen der Testseren dient:

1. Anti-A, -B oder -D (monoklonal oder human), danach
2. Peroxidase-(POX)konjugiertes Anti-Maus-Immunglobulin

oder POX-konjugiertes Anti-human-IgG von Kaninchen, danach  
3. POX-konjugiertes Anti-Kaninchen-Immunglobulin vom Schwein.

Zwischen den Inkubationsschritten erfolgt jeweils eine Spülung mit PBSB. Zur Anfärbung wird eine Peroxidasereaktion sowie eine Gegenfärbung mit Mälaunlösung durchgeführt. Abschließend werden die Objektträger eingedeckt und die Antigenpositiven (braun) sowie -negativen Erythrozyten (blau/lila) im Lichtmikroskop ausgezählt.

Wir erzielten eine unterschiedliche Anfärbbarkeit der Erythrozyten gemäß den bekannten Antigen-differenzen im ABO-System im Gegensatz zu einer homogenen Anfärbung bei der Rhesus-Antigendarstellung. Kleinste Antigen-differente Populationen (1:1000) ließen sich in künstlich gemischten Proben, wie auch nach Fehltransfusionen nachweisen. Eine wichtige klinische Anwendung ergibt sich bei Knochenmarktransplantierten Patienten, da das Persistieren von Empfänger-Erythrozyten (Split-Chimärismus) oder deren Wiederauftreten nach einem vorherigen kompletten Chimärismus als Frühzeichen für ein drohendes Leukämie rezidiv gewertet werden kann.

## Screeningverfahren zur Bestimmung von Tetanus-Antikörperkonzentrationen in Blutprodukten

M. Pietsch<sup>1</sup> und K.-H. Schütt<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Hygiene-Institut der Universität Mainz

<sup>2</sup> Transfusionszentrale der Universitätskliniken Mainz

Bei starken Blutverlusten, beispielsweise infolge eines Traumas oder intraoperativ, kommt es im Plasma zu einem Absinken von Antikörperkonzentrationen, das durch Gabe von bestimmten Blutprodukten ausgleichbar ist. Insbesondere posttraumatisch kann dabei ein Verlust von Tetanusantikörpern bedeutungsvoll sein. Empfohlen wird in solchen Fällen die Gabe von 500 IE homologes Tetanusimmunglobulin zur Verhinderung eines Wundstarrkrampfes. Durch die Verabreichung von Blutprodukten, insbesondere FFP, mit hohen Tetanus-Antikörperkonzentrationen könnte diese zusätzliche Immunglobulingabe entfallen. Ein weiterer Vorteil dabei ist die intravenöse Verabreichung mit einer schnelleren korporalen Umverteilung.

Zur Bestimmung solcher hohen Konzentrationen wurde ein Screeningverfahren in der Technik des indirekten ELISA entwickelt (Konjugat: Peroxidase-markierte Kaninchen-Antikörper anti-IgG (human), Substrat: ABTS). Durch die Messung einer einzelnen Serumverdünnung im Doppelsatz (1:130 in PBS) und das Mitführen einer positiven Kontrolle eines Immunglobulinpräparates mit definiertem Tetanus-Antikörpergehalt ist der Test schnell und leicht handhabbar zu praktizieren. Zur Entwicklung des Tests wurden 50 unausgesuchte Seren von männlichen Blutspendern verwendet. Davon hatten 18% bei der quantitativen Antikörperbestimmung keinen nachweisbaren Titer, bei 24% lag er bei 5 IE/ml und darüber. Als erforderlich für das Screeningverfahren wurde diese Mindestkonzentration definiert. Maximale OD-Werte (405 nm) lagen dann bei 1,1. Ab einem Wert von 0,5 betrug die Sensitivität des Verfahrens 100%, die Spezifität 45,5%. Die zu fordernde Spezifität von 100% wurde ab einem Wert von 0,8 erreicht, die Sensitivität lag dann bei 58,3%. Der Bereich von 0,5 bis 0,8 ist bei dieser Testkonzeption demnach als Grauzone zu betrachten, die eine weitere quantitative Bestimmung des Titers erfordert. Ab einer OD von 0,8 werden dagegen sicher erhöhte Tetanus-Antikörperkonzentrationen gemessen, die mit einer Mindestkonzentration von 5 IE/ml angegeben werden können.

## Fallstudie: Gelierung durch Kryoglobuline (IgA $\kappa$ ) bei Non-Hodgkin-Lymphom IV

E. Strutzenberger<sup>1</sup>, M. Jung<sup>2</sup>, M. Rohac<sup>1</sup>, A. Lapin<sup>1</sup> und F. Gabl<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Inst. f. Klin. Chem. u. Lab. Diagn., Lazarettgasse 14, 1090 Wien

<sup>2</sup> Abt. f. Angiologie d. I. Med. Univ.-Klinik, Lazarettgasse 14, 1090 Wien

Das Auftreten von Kryoglobulinen ist fast immer mit der Bildung von Paraproteinen im Rahmen von multiplen Myelomen, M. Waldenström oder malignen Lymphomen assoziiert (1). Bei einem Patienten, 81a, mit niedrig malignem Non-Hodgkin-Lymphom IV kam es im Rahmen der routinemäßig durchgeführten Blutabnahmen zu einer massiven Gelierung des Blutes, die bei Abkühlung auf Raumtemperatur sofort auftrat und bei Erwärmung reversibel war. In der Serumelektrophorese fand sich ein atypischer Extragradient zwischen der  $\beta$ - und der  $\gamma$ -Fraktion. In der Immunfixation wurde eine monoklonare Gammopathie vom Typ IgA  $\kappa$  identifiziert. Ig quantitativ (Nephelometer/Behring): IgA 3610 mg/dl  $\kappa$  450 U/l. Im Harn fand sich keine Ausscheidung der Paraproteine. Rheumafaktor: neg. Um den Einfluß der Kryoglobuline auf die Serumviskosität zu untersuchen, beurteilten wir mittels eines Harkness-Kapillarviskosimeters sowohl die Konzentrationsabhängigkeit bei verschiedenen Temperaturen in einer Verdünnungsreihe bei 25, 30, 37°C als auch definierten wir den kritischen Punkt des Überganges in den Gelzustand (26°C). Um eine Quantifizierung der für die Gelierung verantwortlichen Globuline vorzunehmen, erhoben wir folgende Parameter (T-Prot., Ig quant., Serumelektrophorese, Immunfixation) in der Urprobe sowie nach Kühlzentrifugation (Sorvall, Du Pont, 30 min, 15000 U/min, 4°C) ebenso im entstandenen Niederschlag und im Überstand. „Kryokrit“ (prozentueller Anteil des Gels am Gesamtserum nach Kühlzentrifugation): 28,8%. Des Weiteren wurden sowohl Präzipitat als auch Überstand 2D-elektrophoretisch analysiert. Auch hier fand sich eine Konzentrierung der bekannten Paraproteine IgA  $\kappa$ . Atypische Fragmente wurden nicht identifiziert. Der Übergang in den Solzustand durch Zugabe von konzentrierter Harnstofflösung konnte nicht notiert werden.

	Urprobe (Serum)	Überstand nach Kühlzentrifugation	Differenz
T-Prot.	95,1 g/l	67,7 g/l	- 27,4 g/l
IgA	3610 mg/dl	595 mg/dl	- 3015 mg/dl
$\kappa$	450 U/l	105 U/l	- 345 U/l

Schrifttum:

1 MELTZER, M., FRANKLIN, E. C.: Am. J. Med. 40, 828-836 (1966).

## Neopterin und zelluläre Immunaktivierung bei malignen Tumoren und bei HIV-1-Infektion

G. Reibnegger<sup>1,5</sup>, H. Denz<sup>2</sup>, D. Fuchs<sup>1,5</sup>, L. C. Fuith<sup>3</sup>, M. P. Dierich<sup>4,5</sup> und H. Wachter<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Institut für Medizinische Chemie und Biochemie

<sup>2</sup> Univ.-Klinik für Innere Medizin

<sup>3</sup> Univ.-Klinik für Frauenheilkunde

<sup>4</sup> Institut für Hygiene

<sup>5</sup> Ludwig Boltzmann Institut für AIDS-Forschung, Universität Innsbruck, A-6020 Innsbruck

Neopterin wird in vitro von humanen Monozyten/Makrophagen nach Stimulation mit Interferon  $\gamma$  gebildet. Bei Patienten mit verschiedenen malignen Erkrankungen eignet sich die Bestimmung des Neopterin zur Erfassung des Aktivierungszustandes

Erfolg mit DELAB  
Personalberatung GmbH

Partner, Personal,  
Marketing.

LABOR-  
Bewertung  
Assoziation  
Übergabe  
Konzentration

Vermittlung,  
Beratung,  
Vertragsgestaltung.

Interessiert?

Industrie  
Laborärzte  
Laboratorien  
Krankenhäuser  
Kliniken

Beauftragt...



DELAB

Partner im  
Management

Personalberatung GmbH  
Schusterstraße 13  
6500 Mainz 1  
Telefon 0 61 31/ 22 58 28

der zellvermittelten Immunität. Die Wertigkeit der Neopterinbestimmung zur Prognose und Verlaufskontrolle bei Patienten mit malignen Erkrankungen wurde bei 74 Patientinnen mit Ovarialkarzinom (Beobachtungsdauer 5 Jahre) und 186 mit Zervixkarzinom (4 Jahre), sowie bei 85 Patienten mit hämatologischen Neoplasien (8 Jahre) und 92 mit Lungenkarzinom (2 Jahre) untersucht. Bei allen Tumorarten konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen erhöhten prätherapeutischen Neopterinwerten und einer schlechteren Prognose nachgewiesen werden, der vom Einfluß anderer Variablen statistisch unabhängig ist. Ebenso zeigt ein steigender Neopterinwert während der Verlaufskontrolle mit hoher statistischer Signifikanz eine Verschlechterung des klinischen Zustandes an. Bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien wurde zirkulierendes Interferon  $\gamma$  gefunden, dessen Konzentration mit der Höhe der Neopterinwerte positiv korreliert ist. Des weiteren wurden bei 43 HIV-1-seropositiven Personen Neopterin und Interferon  $\gamma$  gemessen. Beide Variablen waren signifikant und positiv miteinander korreliert, und beide korrelierten signifikant mit dem CDC-Stadium der Erkrankung. Diese Resultate weisen auf das Vorliegen einer persistierenden Immunaktivierung bei diesen Erkrankungen hin.

D 26

## Das karzinoembryonale Antigen (CEA) – unterschiedliche Differenzierung bei verschiedenen gynäkologischen Karzinomen

P. Rahn, W. Jäger und L. Wildt  
Universitäts-Frauenklinik Erlangen

Das CEA ist ein hochmolekulares Glykoprotein. Es ist charakterisiert durch mindestens sechs verschiedene Epitope, die auf dem Proteinanteil lokalisiert sind. Wahrscheinlich in Abhängigkeit von dem Grad der Glykosylierung kann ein Teil dieser Determinanten maskiert werden. Dadurch können Epitope dem immunologischen Nachweis entzogen werden.

Um den Einfluß dieses Phänomens auf die im Serum gemessenen CEA-Werte zu überprüfen, haben wir die CEA-Konzentrationen in 11 260 Seren von 3350 Patientinnen mit Mamma-, Kollum-, Korpus- und Ovarialkarzinomen mit zwei immunologischen Nachweismethoden bestimmt. Die eine enthält eine Mischung polyklonaler Anti-CEA-Antikörper (CEAK-PR, ID-CIS, Dreieich, BRD), während die andere aus drei monoklonalen CEA-Antikörpern besteht (ELSA-CEA, ID-CIS), und somit nur drei unterschiedliche Epitope erkennen kann. Die CEA-Standards des monoklonalen Assays wurden im polyklonalen Assay und die Standards des polyklonalen Assays wurden im monoklonalen Assay gemessen. Durch die Regressionsanalyse der so ermittelten Konzentrationen wurde ein Referenzbereich für die CEA-Konzentrationen beider Assays definiert.

Von den 718 Patientinnen, die erhöhte CEA-Serumkonzentrationen aufwiesen, zeigten je nach Art des Tumors zwischen 4 und 17% Werte, die nicht in dem definierten Referenzbereich lagen. Sie waren nicht durch die Varianz der Assays zu erklären. Im einzelnen waren dies die CEA-Serumkonzentrationen von 78 von 467 Patientinnen mit Mammakarzinom, 13 von 117 Patientinnen mit Kollumkarzinom und 3 von 69 Patientinnen mit Ovarialkarzinom. Bei den 65 Patientinnen mit Korpuskarzinom konnte kein unterschiedlich immunreaktives CEA festgestellt werden. Weiterhin wurde das Auftreten unterschiedlicher CEAs mit dem Krankheitsverlauf verglichen. Diese Analyse ergab keine Hinweise auf eine besondere Histologie, Ausbreitung oder einen bevorzugten Metastasierungstyp bei den verschiedenen Karzinomen. Unsere Ergebnisse zeigen, daß während des Krankheitsverlaufs unterschiedlich immunreaktives CEA gebildet werden kann, das von den verschiedenen Nachweismethoden in unterschiedlichem Ausmaß erfaßt wird.

D 27

## CA 19-9: diagnostischer Tumormarker für gastrointestinale Tumoren?

G. Oremek, U. B. Seiffert, R. Baum und M. Lorenz  
Zentrallabor-Zentr. Inn., Zentr. d. Nuklearmedizin, Zentr. d. Chirurgie, Universitätsklinikum Frankfurt, Theodor-Stern-Kai 7, 6000 Frankfurt

Zur Zeit sind 8 Methoden zur Bestimmung des Carbohydrat-Antigens 19-9 (CA 19-9) mit unterschiedlichen Testprinzipien kommerziell verfügbar: es sind enzymimmunologische (EIA), radioimmunologische (RIA) und lumineszenzimmunologische (LIA) Methoden. Als Referenzmethode diente die radioimmunologische Methode, mit dieser wurden alle anderen Methoden verglichen. Für den CA 19-9 EIA und den LIA-mat-Ca 19-9 wurden an 100 gesunden Probanden die Normwerte ermittelt. Für den RIA lagen die Normwerte zwischen 1–37 U/ml, die EIA-Normwerte lagen im Bereich von 3–30 U/ml, die LIA-Normwerte lagen im Bereich von 8–25 U/ml. Die Stabilität im Probenmaterial wurde bei +25°C, +4°C und –20°C untersucht. Die Proben, die bei –20°C gelagert wurden, weisen bis zu 3 Monaten keinen Aktivitätsverlust auf. Bei +25°C beträgt der Aktivitätsverlust in 12 Std. 6,5%, bei +4°C 3,4%.

Wir haben bei 100 Patienten mit einem gastrointestinalen Tumor die CA 19-9-Konzentration gemessen. Es handelte sich hierbei um Pankreaskarzinome, Magen-, Colon- und Rektumkarzinome in den Stadien T<sub>1</sub>–T<sub>4</sub>. Bei Pankreaskarzinomen fanden wir mit dem Enzymimmunoassay Werte, die zwischen 160–300 U/ml lagen, bei Pankreatitis lagen die Werte zwischen 60–90 U/ml. Bei Magenkarzinomen, abhängig vom Stadium, haben wir zwischen 100 U/ml im Stadium T<sub>1</sub> und bis zu 1500 U/ml im Stadium T<sub>4</sub> gemessen. Bei Colon- und Rektumkarzinomen streuen die Werte im Bereich von 80 U/ml bis 800 U/ml. Tumoren im Stadium T<sub>1</sub> konnten mittels CA 19-9 nicht sicher erkannt werden.

Schrittum:

1. BUAMAH, P. K., CORNELL, C. VENABLES, C. W., SKILLEN, A. W.: An initial appraisal of the value of serum carbohydrate antigenic determinant (CA 19-9) levels in patients with pancreatic cancer. *Europ. J. Cancer Clin. Oncol.* 23, 87–91 (1987).
2. MALESCI, A., TOMMASINI, M., BONATO, C., BOCCIA, P., BERSANI, M.: Determination of CA 19-9 in serum. *Gastroenterology* 92, 60–67 (1987).

D 28

## Diagnostische Aussagekraft des Tumornekrosefaktors (TNF)

G. Oremek, U. B. Seiffert und J. Weygandt  
Zentrallabor – Zentrum der Inneren Medizin, Universitätsklinikum Frankfurt, 6000 Frankfurt, Theodor-Stern-Kai 7

Wir prüfen an einem Kollektiv von 208 Patienten mit unterschiedlichen Tumoren im Stadium T<sub>1</sub>–T<sub>4</sub> die diagnostische Aussagekraft des Tumornekrosefaktors (TNF). Die Probenahme erfolgte präoperativ und am 1., 3. und 7. postoperativen Tag. Die Normwerte ermittelten wir an 100 gesunden Probanden im Alter von 18–65 Jahren. Die TNF-Bestimmung wurde mit einem Enzymimmunoassay (ELISA) und einem Radio-Immunoassay (RIA) mittels monoklonaler Antikörper durchgeführt. Die Stabilität des TNF im Probenmaterial wurde im Zeitraum von 24 Std. bei +25°C, +4°C und –20°C untersucht. Nach 3 Std. Lagerung bei +25°C liegt der durchschnittliche Aktivitätsverlust bei 12,5%. Bei +4°C beträgt der Verlust in 3 Std. 8,6%, lediglich bei Lagerung von –20°C finden wir keinen Aktivitätsverlust. Bei dem Normalkollektiv lag der Mittelwert des TNF bei 8,5 pg/ml. Patienten mit Prostatakarzinomen (n = 50) zeigten in 80% einen normalen TNF-Wert. Patienten mit einem Epithelzellkarzinom der Prostata (n = 10) zeigten zu 100% Werte von im Mittel 855 pg/ml. Bei Patienten mit einem Hodentumor (n = 38) lag der TNF-Wert in 86% im Normbereich. Bei 5 kleinzelligen Hodenkarzinomen lag der Mittelwert bei 950 pg/ml. Bemerkenswert ist hier, daß bei allen Patienten dieser Gruppe völlig unauffällige PSA, PAP, AFP und  $\beta$ -HCG-Werte vorlagen, trotz fortgeschrittener Tumorstadien. Bei Patienten mit Magenkarzinom (n = 57), Ova-

rialkarzinom (n = 50), Pankreaskopfkarzinom (n = 13) bewegten sich die TNF-Mittelwerte im Normbereich.

Zusammenfassend stellen wir fest, daß der TNF sich bei bestimmten Tumorarten häufiger erhöht erweist als die bisher bekannten Tumormarker. Weitere Untersuchungen bezüglich der Relevanz sind in Arbeit.

D 29

## MCA — ein Tumormarker für Mammakarzinome?

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

Wir haben bei 100 Patientinnen mit einem Mammakarzinom in verschiedenen Stadien das MCA (mucin like carcinoma associated antigen) bestimmt. Die Normwerte ermittelten wir an 100 gesunden Probanden (80 Frauen und 20 Männer) im Alter von 18–70 Jahren. Die MCA-Bestimmung wurde mit einem Enzym-Immunoassay mittels monoklonaler Antikörper durchgeführt. Die Stabilität des MCA 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 MCA-Wert unter 9 U/ml. Lobuläre und mucinöse Karzinome sowie progesteron- und oestrogenrezeptorpositive und negative Karzinome bilden MCA. Andere Karzinome produzieren wenig bzw. kein MCA.

MCA ist bei +25°C 18 Std. 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 MCA als Diagnostikum anzusehen, vor allem zur Verlaufskontrolle bei konservativer oder nach operativer Therapie. Die Aktivität von MCA liegt bei anderen Karzinomen, z. B. Ovarialkarzinomen, Magen- und Kolonkarzinomen im Normbereich.

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

Schrifttum:

1. STÄHLI, C., TAKACS, B., MIGGIANO, V., STAEHELIN, T., CARMAN, H.: Monoclonal Antibodies Against Antigens on Breast Cancer Cells. *Experientia* 41, 1377–1381 (1985).
2. MÜLLER-BRAND, J., CARAVATTI, M., MÄCKE, H., KNÜSLI, C.: MCA, a New Monoclonal Antibody (b-12) for in Vitro Monitoring of Breast Cancer Patients. *Nuclear Medicine Communication* 8, 297 (1987).

D 30

## Prostata-spezifisches Antigen (PSA) und Prostata-spezifische Phosphatase (PAP) als Marker des Prostatakarzinoms

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

Bei 50 Patienten mit Prostatakarzinom wurde die Aktivität von Prostata-spezifischer Phosphatase (PAP) und Prostata-spezifischem Antigen (PSA) überprüft mit immunologischen und radioimmunologischen Methoden sowie der postoperative Verlauf im Zeitraum von 1 Jahr untersucht. Die beiden Methoden wurden untereinander verglichen. Das operative Procedere umfaßt die transurethrale Elektroresektion der Prostata bei Tumoren der Stadien T<sub>3</sub>–T<sub>4</sub> mit Obstruktion der prostatichen Harnröhre und signifikanter Restharnbildung. Bei den Patienten wurde ein präoperativer Basalwert bestimmt und die Aktivität der Tumormarker am 1., 3., 7., 60., 120., 180., 270. und 360. postoperativen Tag bestimmt. Für die PAP wurde am 1. postoperativen Tag eine Aktivitätszunahme zu 29,1% gemessen, am 3. postoperativen Tag ist die Enzymaktivität gegenüber dem Ausgangswert um 15,3%

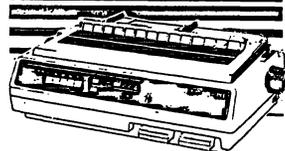
## Produktivitäts-Steigerung für das medizinische Labor

Mehrplatzfähige Gesamtlösung zur Optimierung des Arbeitsablaufs:

- alle notwendigen Arbeitslisten, Kumulativ-Befunde, Statistiken etc. für die Labor-Routine
- komplette Abrechnung für Kassen-, Privat-, Sammelrechnung incl. Mahnwesen (ZI-Genehmigung)
- viele Spezial-Programme wie z. B. das separate Bakteriologie-Programm incl. Keim- und Resistenz-Statistiken
- Datenfernübertragung (DFÜ) und Online-Anschluß aller Analysegeräte
- Funktions-Sicherheit des Gesamtsystems durch eigenen Service und bewährte Hardware, z. B. Drucker von OKI

Fordern Sie unverbindlich ausführliches Informationsmaterial und Preisbeispiele an.

DER ML 393.



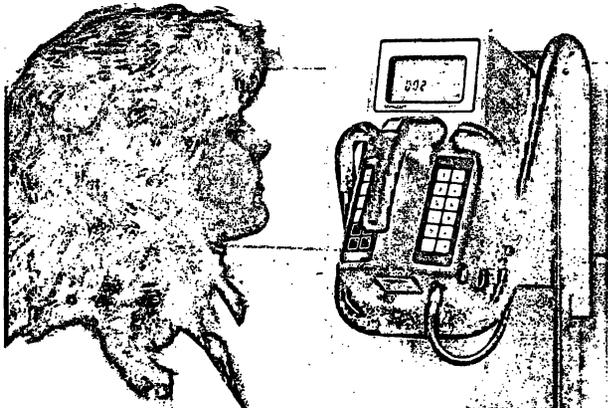
- 24-Nadel-Drucker
- 450 Zeichen/Sekunde im Schnelldruck
- 360 Zeichen/Sekunde in Datenverarbeitungsqualität
- 180 Zeichen/Sekunde in Schönschriftqualität
- 120 Zeichen/Sekunde in Briefqualität
- komfortables, ergonomisches Bedienungsfeld

## OKI. Der beste Freund Ihres Computers.

LDS Labor-Daten-Systeme GmbH  
Steinbeisstraße 12  
7140 Ludwigsburg  
Telefon (071 41) 4 1096



## AUS DER HAND AN DIE WAND.



**MicroCont** Der vielseitige Kontaminations-Monitor

### Anwendungsbeispiel Nr. 2:

Unsere preiswerte Lösung für Ihr Isotopenlabor: Schnelle Kontrolle der Hände in der Wandstation, einfach herausnehmbar zur Kontrolle des Arbeitsplatzes.

Herfurth GmbH · Postfach 50 06 48 · 2000 Hamburg 50  
Telefon: 040/89 69 4-0 · Telefax: 040/89 69 4-112



abgefallen. Diese Tendenz setzt sich fort bis zum 7. postoperativen Tag, an dem der Aktivitätsverlust 43,9% betrug. Das PSA zeigte einen ähnlichen Aktivitätsverlauf. Am 1. postoperativen Tag war eine Zunahme von 12,8% zu beobachten gegenüber dem Basalwert, am 3. postoperativen Tag war die Aktivität um 14% gesunken und am 7. reduzierte sich der Wert um 29,5% gegenüber dem Basalwert. Im Normalbereich stabilisiert sich die Aktivität der beiden Marker. Bei 11 Patienten mit gesicherten Metastasen zeigt das postoperative Tumormarkerprofil folgendes Bild: am 1. postoperativen Tag steigt PAP um 28% an, am 3. postoperativen Tag um 13,85% und am 7. um 46,25% gegenüber dem präoperativen Wert. PSA zeigt geringere Unterschiede der Serumaktivität im zeitlichen Verlauf. Das PSA ist in der Verlaufskontrolle des Prostatakarzinoms im Gegensatz zum PAP sensitiver bei vergleichender Spezifität. Die PSA-Konzentrationen werden von den Manipulationen der Prostata geringer beeinflusst als das PAP (Belstungs-EKG, TUR, rektale Palpation).

Für Prostatakarzinome ist die PAP und das PSA als geeignetes Diagnostikum anzusehen, vor allem zur Verlaufskontrolle bei konservativer oder operativer Therapie.

D 31

## Erhöhung der Serum-AFP-Konzentration nach vorheriger KCl-Inkubation?

G. Fischer und W. Jäger  
Frauenklinik der Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen

In früheren Untersuchungen von amerikanischen und japanischen Arbeitsgruppen wurde nachgewiesen, daß nach Inkubation mit 0,4 M KCl-Lsg. höhere Serum-AFP-Werte gemessen wurden als in den entsprechenden unbehandelten Seren. Dieser Effekt wurde dadurch erklärt, daß durch die KCl-Inkubation aus dem hochmolekularen AFP kleine Fragmente freigesetzt werden können, die ebenfalls mit den AFP-Antikörpern reagieren. Dies kann zu höheren AFP-Konzentrationen im Serum führen. Da dieser Effekt auch in Seren von postmenopausalen Mammakarzinompatientinnen nachgewiesen wurde, diskutierte man, ob durch diese Modifikation des Assays AFP als Tumormarker bei diesen Patientinnen eingesetzt werden kann.

Wir haben die Seren von 40 Schwangeren, 15 gesunden Probanden und 40 Mammakarzinompatientinnen ohne (20) und mit (20) nachgewiesenen Fernmetastasen nach dem normalen Verfahren und nach einstündiger Inkubation mit 0,4 M KCl-Lsg. bestimmt. Die Bestimmung beider Ansätze erfolgte jeweils in einem Assay. Zur Messung wurden einerseits ein IRMA mit zwei monoklonalen Anti-AFP-Antikörpern (AFP-2 ELSA, ID-CIS, Dreieich), andererseits ein polyklonaler RIA (AFP-RIA, Amersham-Buchler, Braunschweig) angewandt.

Die Serumkonzentrationen der Gesunden und der Patientinnen mit nichtmetastasiertem Mammakarzinom lagen jeweils unterhalb der Meßbereiche der Assays. Dies galt auch für die KCl-inkubierten Seren.

Bei metastasierten Patientinnen lagen 13 von 20 Seren unterhalb des Meßbereichs und 7 im Meßbereich. Nach Inkubation mit KCl-Lsg. waren im IRMA keine Konzentrationsänderungen nachweisbar, jedoch im RIA bei zwei Patientinnen. Die Konzentrationen dieser Patientinnen waren zirka doppelt so hoch, wie ohne KCl-Inkubation. Der Verlauf der AFP-Konzentrationen von zwei Patientinnen vom Zeitpunkt der Primäroperation bis zur Metastasen diagnose lag jeweils im Normbereich. Nach KCl-Inkubation waren die Seren wiederum leicht erhöht, jedoch wurde auch dann nicht der Normbereich überschritten. Die Seren der 40 Schwangeren lagen alle im Meßbereich. Nach Inkubation konnten bei 13 Frauen höhere AFP-Konzentrationen im RIA, nicht jedoch im IRMA gemessen werden. Die Konzentrationen überstiegen jedoch nicht die zweifache Standardabweichung der Mittelwerte der herkömmlichen Meßmethode. Aufgrund dieser Untersuchung können wir eine Erhöhung der Serum-AFP-Konzentration nach vorheriger Inkubation mit 0,4 M KCl-Lsg. nicht ausschließen, jedoch müssen weitere Untersuchungen zeigen, ob dadurch AFP als Tumormarker für Mammakarzinompatientinnen geeignet ist.

D 32

## RIA für PDN-21: Empfindlicher Nachweis für einen Tumormarker des medullären Schilddrüsenkarzinoms

T. Klaiber, E. Blind, F. Raue und R. Ziegler  
Abteilung Innere Medizin I, Endokrinologie und Stoffwechsel,  
Universität Heidelberg

PDN-21 (Katacalcin) ist ein Expressionsprodukt des Calcitonin-gens und wird als Peptid mit 21 Aminosäuren (Mol.-Gew. 2600) vom Procalcitonin abgespalten und dann sezerniert. Es eignet sich daher als weiterer Tumormarker des medullären Schilddrüsenkarzinoms (MTC), neben dem schon länger hierfür verwendeten Calcitonin (CT).

Methode: Ziegen wurden über 8 Monate mit an Thyreoglobulin gekoppeltem synthetischen PDN-21 immunisiert. Ein geeignetes Antiserum wurde in einer Verdünnung von 1:500 zum Aufbau eines homologen Radioimmunoassays (RIAs) eingesetzt; synthetisches PDN-21 diente zur Herstellung von Standards, das radiojodmarkierte, tyrosylierte Peptid als Tracer. Als Trennmethode wurde die Fällung mit Polyethylenglykol eingesetzt. Das Inkubationsschema umfaßte 3 Tage Vorinkubation und 1 Tag Inkubation mit dem Tracer.

Ergebnisse: Der Assay besitzt eine untere Nachweisgrenze von 40 ng/l (15 pmol/l). Keine Kreuzreaktionen ergaben sich mit humanem Calcitonin, Lachs-Calcitonin und Parathormon, eine geringe Kreuzreaktion von 0,1% mit Calcitonin Gene-Related Peptide. Probenverdünnungsreihen von Patienten mit MTC wiesen eine gute Parallelität zur Eichkurve auf. 35 von 36 Patientinnen mit MTC hatten PDN-21-Werte zwischen 40 und 17300 pmol/l, bei einem Patienten lagen die Serumspiegel unter der Nachweisgrenze. Seren von 17 Patientinnen mit MTC zeigten eine Korrelation der PDN-21-Werte des vorgestellten Assays mit einem kommerziell erhältlichen Assay der Firma IRE ( $r = 0,64$ ) sowie mit einem weiteren Assay für PDN-21 ( $r = 0,64$ ; Raue et al. [Klin. Wochenschr. 65,82–86 (1987)]). Die PDN-21-Spiegel korrelierten gut mit den CT-Spiegeln bei 36 MTC-Patienten (hauseigener Assay,  $r = 0,91$ ). Im Pentagastrintest beobachteten wir einen parallelen Anstieg von PDN-21 und CT. In Langzeitverläufen von Patientinnen mit MTC zeigte sich meist ein äquimolekulares Sekretionsverhalten der beiden Tumormarker, im Einzelfall jedoch findet sich eine starke Diskrepanz (im Vergleich zu PDN-21 verhältnismäßig niedrige CT-Werte), deren Ursache noch nicht geklärt werden konnte.

Schlußfolgerung: PDN-21 bietet sich somit als Tumormarker an zur Ergänzung der Diagnostik beim medullären Schilddrüsenkarzinom.

D 33

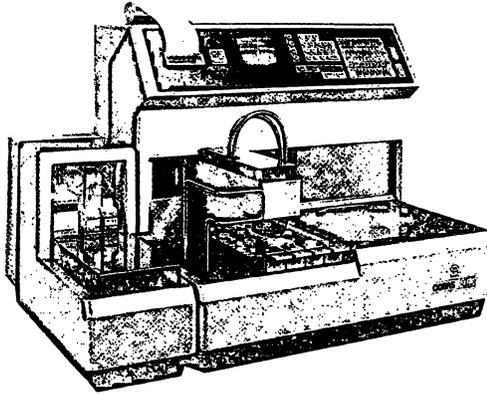
## Massenscreening zur Früherkennung des Neuroblastoms im Säuglingsalter mit Hilfe einer hochautomatisierten Hochleistungsflüssigkeitschromatographie- (HPLC) -Methode\*

R. Erttmann und N. Erb  
Abt. Hämatologie u. Onkologie, Universitäts-Kinderklinik  
Hamburg

Das Neuroblastom ist der häufigste solide Tumor des Kindesalters. Er wird in der BRD bei ca. 70–100 Kindern pro Jahr mit einem Altersgipfel in den ersten beiden Lebensjahren diagnostiziert. Die derzeitigen Heilungschancen variieren in Abhängigkeit vom Ausbreitungsstadium der Erkrankung zwischen 10% und 100%. Leider werden wegen der ungünstigen anatomischen Lage dieses Tumors 70% der Patienten erst in fortgeschrittenen Krankheitsstadien klinisch erfaßt. Hieraus ergibt sich die dringende Notwendigkeit einer praktikablen Frühdiagnostik. Aufgrund der histologischen Zugehörigkeit des Neuroblastoms zum autonomen sympathischen System scheiden Patienten mit diesem Tumor in erhöhtem Maße die Katecholaminmetaboliten

# COBAS MIRA SELEKTIVANALYSATOR

Die Automation mit den entscheidenden Pluspunkten



## Automationskomfort

Automatische Vorverdünnung der Proben und Standards  
Automatische Nachverdünnung, Konzentration der Proben  
Variables Rackkonzept für Notfall-, Routine-  
und Sonderanalysen

## Logik

DENS-Programm mit 5 Berechnungsmodellen  
für nichtlineare Kurven  
Antigen-Exzess-Programm  
bei immunchemischen Bestimmungen  
Komplexes Kontrollprogramm (self monitoring)

## Vielseitigkeit

Notfallanalytik  
Routine  
Sonderanalysen  
– EIA  
– TDM  
– Gerinnung

## Wirtschaftlichkeit

geringe Volumina  
– mittl. Reagenzvolumen = 180  $\mu$ l  
reduzierte Personalbindung  
Lang haltbare, maßgeschneiderte  
Reagenzien: UNI-KIT's «Roche»

## Service

Ein erfahrener  
und effizienter Service von  
der Technik und vom Labor

3. Auflage  
Gültig bis mindestens  
1990!

# Abrechnungssystem für Privat-Patienten

Rechnungsformulare – Multiplikatorentabellen –  
Leistungslegenden

**Das exklusive Komplett-Paket zur GOÄ '88**

**Das erste Abrechnungssystem, das speziell auch auf die neue Form der Privat-Abrechnung  
für Bundesbahnbeamte der Beitragsklasse I–III (KVB I–III) vom 1. 10. 1988 abgestellt ist.**

**zeitsparend – praxisrelevant – systemgerecht – kostensparend**

## Teil A Rechnungsformulare

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:

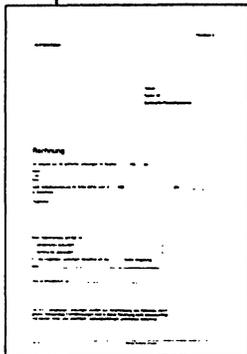
- Gesamtsumme ● Einzelne Diagnosen ● Multiplikator für persönliche Leistungen ● Multiplikator für technische Leistungen ● Multiplikator für Überschreitung der Regelspanne ● Begründung der Überschreitung ● Veranlassung durch den Patienten ● Datum

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

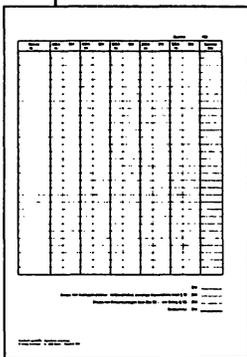
Auf der Rückseite der Rechnung trägt der Arzt ein:

- 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.



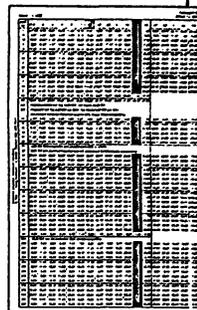
Vorderseite



Rückseite

## Teil B Multiplikatorentabellen

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 Leistungslegenden

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.

**Verlag Kirchheim, Kaiserstraße 41, D-6500 Mainz**  
**Fachverlag für Allgemeinmedizin**

### ■ 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

■ Bitte Adressenvermerk gesondert angeben

XXX

### ■ 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

Verlag Kirchheim, Kaiserstraße 41,  
D-6500 Mainz 1

Name/Stempel

Straße

PLZ

Ort

Datum

Unterschrift

Vanillinmandelsäure (VMA) und Homovanillinsäure (HVA) als Tumormarker mit dem Urin aus, so daß deren Bestimmung als Neuroblastomsuchtest dienen kann.

Damit sind die biologischen und therapeutischen Voraussetzungen für ein Massenscreening gegeben. Aufgrund der bisher vorliegenden Daten aus den bundesdeutschen Neuroblastom-Therapiestudien von 1979–1988 dürfte eine Urinkatecholaminbestimmung im 6. bis 10. Lebensmonat geeignet sein.

Hierzu wurde eine Methode zur praktikablen Uringewinnung mittels brieflich trockenversandfähiger Papierwindeleinlagen entwickelt. Nach Elution der absorbierten Urinmenge kann mittels HPLC die VMA und HVA bezogen auf die Urin-Kreatininkonzentration quantitativ bestimmt werden. Dabei werden wegen des großen Probenaufkommens im Rahmen eines Massenscreeningsprogrammes höchste Anforderungen an Analysezeit und Automatisierbarkeit der HPLC-Methode gestellt.

In der vorgestellten Arbeit werden erste Erfahrungen unseres Labors mit diesem integrativen Massenscreeningkonzept anhand von 300 Säuglingen unter Einbeziehung von 20 Kinderarztpraxen und 3 Kinderkliniken in der BRD vorgestellt.

\* Gefördert von der Werner-Otto-Stiftung, Hamburg; der Fördergemeinschaft zur Erforschung und Heilung von Krebskrankheiten im Kindesalter, Hamburg; der Firma RECIPE, München.

ten-Subpopulationen verbergen. Lymphozyten aus EDTA-Vollblutproben von 94 klinisch gesunden Kindern wurden ohne Gradientenisolierung mit monoklonalen Antikörpern markiert (OKT4/CD4, OKT8/CD8, OKT11/CD2, Anti-Leu 10/CD19, Anti-Leu 7/NK-Zellen) und mit einem Durchflußzytometer analysiert. Es zeigte sich eine signifikante Abhängigkeit vom Alter. Im Vergleich zu Erwachsenenwerten waren die absoluten Zellzahlen für die Gesamt-T-Zellen und B-Zellen bei der Geburt erhöht, nahmen in den ersten vier Lebensmonaten weiter zu und fielen dann mit zunehmendem Alter auf Erwachsenenwerte ab. Die absoluten Zellzahlen der Helfer- und Suppressor-Population folgten dem gleichen Trend. Der Anstieg der Suppressorzellen war jedoch weitaus geringer als der der Helferzellen, was zu einem deutlichen Anstieg der Ratio CD4/CD8 im Säuglingsalter führte. Die NK-Zellen stiegen kontinuierlich an und lagen auch im Alter von 13 Jahren unter den Erwachsenenwerten. Nach diesen Ergebnissen ist es nicht zulässig, Meßwerte von Kindern anhand der Erwachsenen-Referenzwerte zu beurteilen. Mit der Erstellung von orientierenden Referenzbereichen soll unsere Arbeit dazu beitragen, das Einordnen pathologischer Befunde bei Kindern zu erleichtern. Wichtiger Hinweis: Unsere Referenzwerte gelten für die Vollblutmethode.

Schrifttum:

- HICKS, et al.: Arch. Pathol. Lab.med. Vol. 107, 518–523 (1983).
- RODECK, et al.: DMW 108, 1880–1883 (1983).

D 34

## Lymphozyten-Subpopulationen bei Neugeborenen, Säuglingen und Kindern

P. Kapaun<sup>1</sup>, U. Schledt<sup>2</sup>, L. J. Behnken<sup>1</sup> und B. Kornhuber<sup>3</sup>  
<sup>1</sup> BIOSCIENTIA; Institut für Laboruntersuchungen GmbH, Ingelheim

<sup>2</sup> Berufsgenossenschaftl. Unfallklinik, Frankfurt

<sup>3</sup> Zentrum der Kinderheilkunde, Universität Frankfurt

Durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern und standardisierten Meßverfahren ist die Lymphozyten-Differenzierung zu einem wichtigen Bestandteil in der Diagnostik und Verlaufskontrolle verschiedener Erkrankungen geworden. Die Interpretation der Befunde bleibt jedoch problematisch, da es sich neben der großen biologischen Varianz mehrfach beschriebene Hinweise auf eine alters- und geschlechtsabhängige Variabilität der Lymphozyten-Subpopulationen finden (1, 2). Durch die Zunahme der HIV-Infektionen im Säuglings- und Kindesalter wird es notwendig, Ergebnisse der Lymphozyten-Differenzierungen in diesen Altersgruppen zu interpretieren. Uns interessierte deshalb vor allem die Frage, ob sich innerhalb der Gruppe 0–13 Jahre altersspezifische Unterschiede in der Verteilung der Lymphozy-

D 35

## Erstmalige verteilungsfreie 95% „Normal“bereiche für Leukozyten und Thrombozyten bei deutschen Gesunden Erwachsenen (n = 162)

D. Oppermann  
 Uniklinik Mainz

Für deutsche Erwachsene existieren keine präzise definierten (1) Blutbild-„Normal“bereiche. Bei Schilling gilt als „normal“: 5000–8000 Leukozyten/µl, 54–72% Neutrophile, 51–67% Segmentkernige, 21–35% Lymphozyten. Ganz anders bei Undritz (3): 3500–10000 Leukozyten/µl (nüchtern, morgens), 45–70% Segmentkernige, 20–45% Lymphozyten. Wieder anders bei Begemann (4): siehe Tabelle. Bodemann (5) empfiehlt 20 Jahre alte US-Referenzwerte [(6) zitiert in Wintrobe's Clinical Hematology 1981], die nicht für Deutsche 1988 gelten können, da die Referenzindividuen in 1400 m Höhe (Salt Lake City) lebten, 65 der 291 Referenzindividuen Schwarze mit niedrigeren Leukozytenzahlen waren, und die deutsche Ernährungslage 1988 anders ist als die der US-Referenzindividuen: 188 Studenten (Caucasier, 166 M + 22 F), 39 Gefängnisinsassen

Orientierende Referenzbereiche (90% Konfidenzintervall) zur Beurteilung von Meßdaten bei Neugeborenen, Säuglingen und Kindern<sup>1</sup>

Parameter	Neugeborene n = 20	< 1 Jahr n = 23	1–5 Jahre n = 27	6–13 Jahre n = 24
Lymphozyten/µl	2248–6688	2619–8889	1466–7982	922–3795
Rel. %	22,8–64,2	41,2–80,6	25,7–71,6	25,2–80,2
Gesamt-T-Zellen/µl	1438–3863	1581–6020	967–6155	697–2864
Rel. %	46,0–80,1	52,4–82,8	54,9–83,8	54,3–97,1
Gesamt-B-Zellen/µl	234–1231	415–2621	193–1451	104–871
Rel. %	7,1–24,3	9,4–37,1	7,1–35,2	6,5–29,1
Helferzellen/µl	957–3106	1143–4380	511–3774	355–1685
Rel. %	22,9–61,6	38,0–59,8	30,1–54,6	26,3–50,9
Suppressorzellen/µl	315–1420	244–1521	260–1374	216–940
Rel. %	10,1–30,5	9,0–23,6	9,7–28,9	10,4–29,6
Ratio	1,1–4,5	2,0–5,9	1,3–5,4	1,4–3,5
NK-Zellen/µl	1–18	11–190	70–519	52–592
Rel. %	0–0,5	0,2–3,2	1,7–13,3	2,9–18,6

<sup>1</sup> Als Dissertation eingereicht am Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt a.M. (Dez. 1988)

Referenzindividuen:	jetzige Studie n = 162 Deutsche gesunde Blutspender	Begemann 1986 (4) n = ? ?, Erwachsene	Orfanakis 1970 (5, 6) n = 226 US-Caucasier Gefängnisinsassen, Studenten, Soldaten
Referenzbereich:	95%-Range: berechnet 2,5–97,5 Perzentilen	?, „Normal“ werte ?, Grenzen nicht definiert ?	95%-Range: grafisch 2,5–97,5 Perzentilen
Methode	Ortho ELT-15	?	Coulter A&F + Visuell
Blutentnahme	8–20 Uhr	?	?
Leukozyten/ $\mu$ l	3900–11 700	4000–9000	4550–10100
Lymphozyten/ $\mu$ l	1200–4000	1000–3600	1500–4000
Monozyten/ $\mu$ l	300–1000	80–540	220–950
Granulozyten/ $\mu$ l	2000–7900	–	–
Neutrophile/ $\mu$ l	–	2200–6300	2050–6800
Lymphozyten %	21,2–46,1	25–40	–
Monozyten %	5,0–12,5	2–6	–
Granulozyten %	44,0–73,0	–	–
Thrombozyten/ $\mu$ l	145 000–380 000	150 000–250 000 Zählkammer	–

mit Vitaminmangelernährung (14 Schwarze + 15 Caucasier), 74 Soldaten (51 Schwarze + 23 Caucasier), Alter: 16–49 Jahre.

Die **jetzige Studie** präsentiert „Normalwerte“ (zentrale 95%-Bereiche) gesunder deutscher Erwachsener. Die Messung erfolgte mit dem Ortho ELT-15 Laser-Hämatologie-Zellzähler, der ein 3teiliges Diff.-Blutbild (Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten) herstellt. Als Referenzindividuen dienten alle konsekutiven Thrombozytenspender im Juli 1988, die offensichtlich gesund waren und eine normale GTP hatten: 162 Spender (10 Frauen, 152 Männer), 20–64jährig. Die 2,5 und 97,5 Perzentilen wurden mit einem Apple Macintosh Computer bestimmt, *nonparametrisch* (1) wegen der schiefen Verteilungen der Blutzellen. Die **Ergebnisse** zeigt die folgende **Tabelle**:

#### Schrifttum:

1. SOLBERG, H. E.: Establishment and use of reference values. In: TIETZ, N. W. (Hrsg.) Textbook of Clinical Chemistry. WB Saunders, Philadelphia. 356–386 (1986).
2. SCHILLING, V.: Das Blutbild. Fischer, Jena. 207–213 (1943) und Praktische Blutlehre. Fischer, Jena (1959).
3. UNDRITZ, E.: Hämatologische Tafeln. Seite 45 Sandoz (1972).
4. BEGEMANN, H., RASTETTER, J.: Klinische Hämatologie. Thieme, Stuttgart 1986.
5. BODEMANN, H. H. et al.: Blutbild. In: THOMAS, L. (Hrsg.) Labor und Diagnose. Med. Verl. Ges. 559–564 (1988).
6. ORFANAKIS, N. G. et al.: Normal blood leukocyte concentration values. Am. J. Clin. Pathol. 53; 647 (1970).

D 36

## Vergleich der automatisierten Blutbild-Differenzierung durch Streulicht-cytochemische (H1) und Streulicht-konduktometrische Analyse (VCS)

B. Marti, T. Lenz und N. Katz  
Zentrallabor am Universitätsklinikum Freiburg  
Institut für Klin. Chemie und Pathobiochemie  
Klinikum Giessen

Für die automatisierte Differenzierung der fünf klassischen Leukozytenpopulationen stehen derzeit die cytochemisch-streulichtcytometrische Analyse am H1 und H6000 (Technicon) und die kombinierte Impedanz-Leitfähigkeit-Streulicht-Messung am VCS (Coulter) zur Verfügung. An 834 unausgewählten Blutproben erwachsener Patienten eines Universitätsklinikums wurden beide Analysenverfahren miteinander verglichen und der mikroskopischen Auswertung gegenüber gestellt. 375 Proben wurden von allen drei Analysatoren nicht als kontrollbedürftig signalisiert. Zwischen allen Systemen war eine gute Übereinstimmung der neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten zu beobachten. Die Monozyten wurden am VCS im Mittel um 18% höher als an den beiden cytochemischen Analysatoren bestimmt. Die Korrelation der Neutrophilen, Eosinophilen und Lymphozyten zwischen den verschiedenen Geräten war mit  $r = 0,97–0,99$  deutlich höher als die Korrelation der Monozyten mit  $r = 0,88–0,94$ . Die basophilen Granulozyten wurden am VCS um 50% niedriger bestimmt als an den cytochemischen Analysatoren.

123 Proben wurden von allen drei Geräten übereinstimmend als kontrollbedürftig signalisiert. Die mikroskopische Kontrolle ergab in nahezu allen Fällen eine qualitative Abnormalität und damit eine richtig-positive Signalisierung.

336 Proben wurden divergierend von den Analysatoren als kontroll- oder nicht kontrollbedürftig gekennzeichnet. Die mikroskopische Untersuchung ergab, daß  $\frac{1}{3}$  dieser Proben leicht- bis mittelgradige qualitative Abnormalitäten aufwiesen, die z. T. nicht signalisiert wurden. Insgesamt lag die Rate falsch-positiver Befunde und damit die Zahl „unnötiger“ mikroskopischer Kontrollen an allen Systemen weit höher als die Zahl falsch-normaler Befunde, die zum „Übersehen“ einer qualitativen Abnormalität führen würden.

D 37

## Vergleich der Ergebnisse cytometrischer, cytochemischer, konduktometrischer und mikroskopischer Verfahren zur Differenzierung der Leukozyten – ein Erfahrungsbericht

R. J. Klasson  
Hygiene-Institut des Ruhrgebiets, Gelsenkirchen  
(Direktor: Prof. Dr. N. Dickgießer)

Neben der mikroskopischen Differenzierung des weißen Blutbildes stehen heute mehrere Analysengeräte zur Verfügung, die mit verschiedenen Verfahren die fünf „Standardzellen“ unterscheiden können. Im Rahmen einer Geräteerprobung konnten die Ergebnisse von zwei Analysengeräten (Coulter VCS, Technicon H1) mit den Ergebnissen der trimodalen Leukozytenverteilung (Coulter Stacker) und mit der mikroskopischen Analyse verglichen werden. Zur Untersuchung kamen 169 (VCS) bzw. 160 (H1) unselektierte EDTA-Blutproben aus dem Einsendelabor einer Laborgemeinschaft. Mit einer begrenzten Probenanzahl ( $n = 20$ ) konnte im Laufe einer Geratedemonstration auch ein erster Eindruck über ein neues Analysengerät (Sysmex NE 8000) gewonnen werden, das demnächst erhältlich sein wird.

H1, Stacker und NE 8000 ermitteln auch die Parameter des sog. „kleinen Blutbildes“. Hier zeigte sich eine sehr gute Übereinstimmung der Ergebnisse für Hämoglobin, Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenzahl.

Für die neutrophilen Granulozyten und die Lymphozyten zeigten VCS, H1, und soweit bei der kleinen Probenzahl beurteilbar auch der NE 8000 eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Stackers sowie der mikroskopischen Analyse. Dagegen waren für die Zählrate der sog. „monozytären Zellen“ z. T. beachtliche Unterschiede feststellbar. So zeigte der Stacker keine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen des mikroskopischen Befundes oder mit den Ergebnissen der übrigen Analysengeräte. Beim VCS war keine zufriedenstellende Korrelation der Monozytenzahl mit den mikroskopischen Ergebnissen feststellbar. Für den H1 konnte zwar eine gute Korrelation zu den mikroskopischen Befunden festgestellt werden, das Gerät gab aber im Mittel

eine etwas höhere Zellzahl an als bei der mikroskopischen Beurteilung gesehen wurde. Eosinophile Granulozyten werden dagegen von beiden Analysengeräten (VCS, H1) sicher und in guter Übereinstimmung zum mikroskopischen Befund erkannt. Zum NE 8000 waren wegen der geringen Probenzahl im Rahmen dieser Untersuchung keine gesicherten Aussagen zu erhalten, analog verhält es sich auf Grund der kleinen Zellzahlen auch für die Interpretation der Ergebnisse der Basophilenzählung.

Der Anteil der zur mikroskopischen Kontrolle gekennzeichneten Proben schwankte bei den zur Verfügung gestellten Geräten zwischen 27,5 und 37,5%. Abnormalitäten wurden beim VCS und beim H1 deutlich sicherer als beim Stacker angezeigt, der je nach Art der Veränderung ca. 25 bis 70% der mikroskopisch als pathologisch eingeordneten Proben signalisierte. Vom VCS wurden Abnormalitäten bei ca. 50 bis 75%, vom H1 bei 55 bis 100% der betroffenen Proben angezeigt. Dabei wurden Proben mit Veränderungen des weißen Blutbildes im Rahmen hämatologischer Grunderkrankungen sicherer erkannt als Proben mit reaktiver Linksverschiebung und sog. „lymphatischen Reizformen“.

Soweit im Rahmen dieser Untersuchung beurteilbar, kann die Zahl der mikroskopischen Blutbild-Differenzierungen durch Analysengeräte ohne eine wesentliche Einschränkung der diagnostischen Aussagefähigkeit erheblich reduziert werden, wenn vom Gerät 5 Zellklassen unterschieden werden.

D 38

## Einfluß der Alterung von EDTA-Blutproben auf die Ergebnisse von hämatologischen Analysengeräten (einschließlich der Differenzierung der Leukozyten)

R. J. Klosson  
Hygiene-Institut des Ruhrgebiets, Gelsenkirchen  
(Direktor: Prof. Dr. N. Dickgießer)

Einsendelabors haben oft große Probleme, für hämatologische Untersuchungen geeignetes Material zu erhalten. Blutausschriebe werden bei den Einsendern in sehr unterschiedlicher Qualität angefertigt. Beim Versand von EDTA-Blutproben liegt zwischen der Blutentnahme und der Bearbeitung der Probe eine größere Zeitspanne, die bis zu 48 Std. betragen kann. Inzwischen werden

eine Reihe von Analysengeräten für das sog. „große Blutbild“ bzw. für die Leukozytendifferenzierung angeboten, die sich vor allem in der Differenzierungstechnik unterscheiden. Bei drei Geräten (Coulter Stacker, Coulter VCS, Technicon H1) bestand nun bei einer Geräteerprobung im Labor die Möglichkeit, die Veränderungen der Ergebnisse einer kleinen Anzahl von EDTA-Blutproben (n = 4) über einen Zeitraum von 24 (VCS) bzw. 48 Std. (Stacker, H1) bei Raumtemperatur zu verfolgen. Im Rahmen einer Gerätedemonstration konnten auch 24 Std. alte EDTA-Blutproben über ein demnächst in Deutschland erhältliches Gerät (Sysmex NE 8000) vermessen und die Ergebnisse mit denen des Coulter Stacker verglichen werden.

Bei allen Geräten, die ein großes Blutbild erstellen, zeigten sich keine wesentlichen Veränderungen der Analyseergebnisse für das rote Blutbild, die Thrombozytenzahl und die Gesamtleukozytenzahl nach 24 und 48 Std. Dagegen fanden sich bei den untersuchten Proben z. T. gravierende Veränderungen der Differenzierung des weißen Blutbildes. Geräte, die die einzelnen Leukozytenpopulationen cyzometrisch mit Hilfe der trimodalen Verteilungskurve sowie mit Hilfe von verbesserten Widerstandsmessungen und der Messung von Streulichtsignalen unterscheiden, zeigten einen z. T. bereits nach 8 Std. einsetzenden Abfall der Granulozytenzahlen bei entsprechender Zunahme der sog. „monozytären Zellen“ (besonders Monozyten und basophile Granulozyten). Bei mehrfachen Wiederholungsmessungen fanden sich auch erhebliche Unterschiede in den Ergebnissen einzelner Proben. Der Anteil der Lymphozyten blieb oft unverändert, bei einzelnen Proben kam es mit der Alterung aber auch zu erniedrigten oder erhöhten Werten. Parallel zu diesen Veränderungen kam es zum Auftreten von „Suspect“-Meldungen, die eine mikroskopische Kontrolle erfordern. Nur bei einem Gerät, das neben der cytomertischen Analyse auch eine cytochemische durchführt, waren die Ergebnisse für Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten über 48 Std. weitgehend unverändert. Lediglich bei den eosinophilen Granulozyten fand sich nach mehr als 24 Std. eine diskrete Verminderung, bei den basophilen Granulozyten ein entsprechender Anstieg. Nach 24 Std. gibt das Gerät auch eine „Suspect“-Meldung (i. d. R. „Linksverschiebung“) an. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse einer Probe war auch nach 48 Std. noch zufriedenstellend.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß beim Einsatz cytochemischer Methoden mit Analysengeräten bis zu 24 Std. nach der Blutentnahme verlässliche Resultate für das „große Blutbild“ erhalten werden können. Zur Sicherung dieses Befundes sind aber noch weitere, umfangreichere Untersuchungen erforderlich.

# Magic® Lite LIA

**Lichtblitze im Labor**

**T4**

**TSH**

**T Upt**

**FT3**

**FT4**

Außerdem:

- LH
- FSH
- HCG
- FER
- VIT B<sub>12</sub>
- CK-MB
- DIG
- CEA
- AFP
- PTH
- OIG

# Schilddrüse

- Magnetische Trennung
- Nicht-Isotopischer Marker
- Stabiles Luminogen (9 Mon./4°C)
- Meßzeit etwa 1 Sekunde
- Komplettes offenes System - keine Bindung an nur einen Hersteller

## CIBA-CORNING

Ciba Corning Diagnostics GmbH  
Industriestraße 11, 6301 Fernwald 2  
Telefon 0641/4003-0

## Korrelation der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit und der Plasma-Heparin-Konzentration bei konstanter i.v. Heparinapplikation

H. A. Weinand, M. Erdweg und M. Hoffmann  
Institut für Hygiene und Laboratoriumsmedizin  
der Städtischen Krankenanstalten Krefeld  
(Direktor: Prof. Dr. med. H. Finger)

Als laborchemische Kontrollmethoden für eine Heparintherapie stehen heute die Vollblutgerinnungszeit, die Thrombinzeit, die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) sowie die Heparinbestimmung mit Hilfe von chromogenen Substraten zur Verfügung. Von diesen Parametern hat sich die aPTT für die Überwachung der intravenösen Heparinapplikation mittels Perfusor durchgesetzt. Daneben bietet auch die Heparinbestimmung im Plasma die Möglichkeit einer sinnvollen Kontrolle. Da sich bei konstanter Heparinzufuhr eine Verlängerung der aPTT nicht in allen Fällen in dem erwarteten Maße einstellt, haben wir Untersuchungen zur Korrelation der aPTT und der Plasma-Heparin-Konzentration durchgeführt.

**Material-Methode:** Wir haben bei 39 Intensivpflegepatienten, die einer ständigen Heparinzufuhr bedurften, die Effektivität dieser Therapiemaßnahme mittels aPTT kontrolliert und parallel dazu die Heparin-Konzentration im Plasma bestimmt. Alle Patienten erhielten 1000 E Heparin/h über einen Perfusor. Berücksichtigt wurden nur Probanden mit einem normalen Antithrombin-III-Spiegel sowie einem normgerechten Säure-Basen-Haushalt. Die aPTT wurde mit dem Reagenz Pathromtin (Behring) bestimmt. Die Untersuchung der Heparin-Konzentration erfolgte mit dem chromogenen Substrat S 2222 (KABI).

**Ergebnisse:** Die Untersuchungsergebnisse zeigen, daß trotz konstanter Heparinzufuhr bei jedem Patienten ein individuelles Ansprechen der Gerinnung auf diese Therapie gegeben ist. Dies läßt sich auch an Hand der gemessenen Heparin-Plasma-Konzentrationen bestätigen. Die Korrelation zwischen aPTT und Heparin-Konzentration beträgt 0,57.

**Diskussion:** Da Heparin im menschlichen Organismus neben seiner gerinnungsphysiologischen Wirksamkeit unter bestimmten Bedingungen auch Affinitäten zu anderen Stoffwechselfvorgängen hat, sind unsere Untersuchungsergebnisse dahingehend zu interpretieren, daß eine standardisierte Therapie mit einer konstanten Heparindosis weder mit der aPTT noch mit der Plasma-Heparinbestimmung exakt zu überwachen ist. Die Ergebnisse zeigen, daß jeder Patient individuell im Rahmen seiner Stoffwechselbedingungen auf eine Heparinapplikation reagiert.

Schrifttum:

BÖTTCHER, D.: Heparin: Indikationen, Applikationsformen und Laborkontrollen. Nieren und Hochdruckkrankheiten 3, 106–110 (1981).  
WIT, J.: Amidolytische Antithrombin-III- und Heparinbestimmung. Klinikerzt 9, 779–780 (1980).

D 40

## Eine Plättchenfaktor 4 unabhängige Methode für die Bestimmung von Heparin

K. Fickenscher, U. Buckler und U. Konheiser  
Behringwerke AG, Postfach 1140, Marburg

Die Bestimmung von Heparin in vitro wird vor allem durch Plättchenfaktor 4 (PF4) in der Probe beeinflusst. Aus diesem Grund mußte Heparin bisher unter streng kontrollierten Bedingungen bestimmt werden. Die hier vorgestellte Methode erlaubt eine PF4 unabhängige Heparin-Bestimmung aus Citratplasma. Der Test beruht auf einer durch Heparin oder Heparinfragmente katalysierten Inaktivierung von Faktor Xa durch Antithrombin III (AT III). Sowohl hochmolekulares als auch niedermolekulares Heparin kann über den gesamten therapeutischen Konzentra-

tionsbereich bestimmt werden. Zuerst wird dem Plasma AT III zugesetzt, um einen eventuellen Mangel auszugleichen. An PF4 gebundenes Heparin wird durch sulfatierte Polysaccharide, die im Faktor Xa-Reagenz enthalten sind, freigesetzt. Faktor Xa wird durch das sekundär freigesetzte Heparin und durch freies Heparin gehemmt. Nach der Inkubation der Plasmaprobe mit AT III und Faktor Xa-Reagenz wird dem Test ein spezifisches chromogenes Substrat zugesetzt, das durch die restliche FXa-Aktivität umgesetzt wird. Die Umsetzung des Substrates wird kinetisch mit einem Photometer gemessen. Die Extinktions-Meßwerte werden an einer Bezugskurve ausgewertet.

D 41

## Probleme bei der Laborüberwachung der thrombolytischen Therapie mit rekombinantem tissue Plasminogen-Aktivator (rt-PA)

E. Seifried<sup>1</sup> und P. Tanswell<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Zentrale Einrichtung Klinische Chemie und Abt. Innere Medizin III des Klinikums der Universität Ulm

<sup>2</sup> Dr. Karl Thomae GmbH, Biberach

In einer Phase-I-Studie an gesunden freiwilligen männlichen Probanden (n = 36) wurden unterschiedliche Mengen rt-PA intravenös infundiert und während und nach der Infusion engmaschige Untersuchungen des Gerinnungs- und Fibrinolyse-Systems durchgeführt. Als Kontrolle wurde eine Placebo-Gruppe mitgeführt. Die Plasminogen- und a<sub>2</sub>-Antiplasmin-Aktivitäten fielen während der Infusion auf ca. 70%/35% (0,25 mg/kg/60 min) bzw. 40%/20% (0,50 mg/kg/60 min) des Ausgangswertes ab und stiegen nach Ende der Infusion wesentlich schneller wieder an, als die bekannten biologischen Halbwertszeiten dieser Proteine erwarten lassen. Dies deutet auf eine in vitro Fibrinolyse hin. In vitro-Untersuchungen an frisch gepooltem Zitratblut ergaben rt-PA-dosisabhängige Veränderungen von Quick-Wert, partieller Thromboplastinzeit, Thrombinzeit, Fibrinogen, a<sub>2</sub>-Antiplasmin und Plasminogen. Bei therapeutischen Spiegeln, wie sie bei der thrombolytischen Therapie des Myokardinfarktes erreicht werden, wurden in vitro Aktivitätsverluste der Gerinnungsparameter um bis zu 50–80% beobachtet. Diese Veränderungen konnten durch Zugabe eines anti-rt-PA-Antikörpers oder des synthetischen rt-PA-Inhibitors PPACK verhindert werden. In einer weiteren Probanden-Studie (n = 18) und bei Patienten mit akutem Herzinfarkt (n = 12) wurden Gerinnungsanalysen mit und ohne Verwendung der genannten Inhibitoren durchgeführt. Dabei konnten erhebliche Diskrepanzen der verbliebenen Restaktivitäten gemessen werden. Die Unterschiede entsprechen einer in vitro-Aktivierung des Fibrinolyse-Systems mit konsekutivem Abbau einzelner Gerinnungsparameter. Die Ergebnisse zeigen, daß zur korrekten Bestimmung von Gerinnungsparametern während der Thrombolysetherapie mit rt-PA Inhibitoren erforderlich sind.

D 43

## Fibrin monomer has a high predictive value for the prethrombotic state in postoperative deep vein thrombosis

E. Spanuth<sup>1</sup> and G. Vogel<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Boehringer Mannheim GmbH, Abt. Blutgerinnung, Sandhofer Str. 116, D-6800 Mannheim

<sup>2</sup> Medizinische Akademie Erfurt, Nordhäuser Str., DDR-5020 Erfurt

Intravascular activation of the coagulation system produces disseminated intravascular coagulation (DIC) or deep vein thrombosis (DVT) and is characterized by the occurrence of circulating soluble fibrin monomer complexes (FM) in plasma. In order to evaluate the prognostic and diagnostic value of this parameter in 156 patients with fractures of femur, neck of the femur, tibia,

fibula and with knee joint of elective hip surgery FM have been determined using the FM-Test Boehringer Mannheim (erythrocyte agglutination test acc. to Largo). Plasma samples were taken prior to and on the 1st, 2nd, 3rd, 5th, 7th and 9th day following the operation. Diagnosis of DVT was carried out by <sup>125</sup>J-labelled fibrinogen test in parallel. Positive results were checked by phlebography on the 7th or 9th postoperative day. In patients without DVT positive FM results were obtained only in 26% regarding the lowest detection limit of FM-Test. On the other hand in 34 of 36 (94%) patients with postoperative DVT confirmed by phlebography elevated FM levels could be detected 1–2 days before the fibrinogen test gave positive results. The predictive value calculated on the basis of elevated FM levels is to be 63–73%. These results show that the FM-Test allows an early detection of prethrombotic state in the development of postoperative DVT.

D 44

### Use of citrated plasma and capillary blood in the prothrombin time determination — A comparison in the course of Hepato Quick standardisation according to the who model

*E. Spanuth and E. Zimmer  
Boehringer Mannheim GmbH, Abteilung Blutgerinnung,  
Sandhofer Straße 116, 6800 Mannheim 31, FRG*

In the monitoring or oral anticoagulation the use of capillary blood instead of citrated plasma has several advantages. The patient does not have to undergo vein puncture and the preparation of citrated plasma, a possible source of errors, can be omitted. In seven centres the Hepato Quick citrated plasma method and the Hepato Quick capillary blood method for determination of prothrombin time (PT) were evaluated on plasma and capillary blood samples from healthy subjects and from patients on oral anticoagulant therapy. The standardization of Hepato Quick using capillary blood and citrated plasma for PT determination was performed by comparison with a lot of the International Reference Thromboplastin OBT/79 according to the WHO model. For all Hepato Quick lots evaluated, a mean International Sensitivity Index (ISI) of 0.95 was obtained for the citrated plasma method and of 1.0 for the capillary citrated blood method. Expressed in percent of normal the therapeutical range was confirmed for both the citrated plasma method and the capillary citrated blood method in comparison with the International Reference Thromboplastin OBT/79 to be 10–20%. The good congruence of the ISI values also shows that capillary blood may be used the same way as citrated plasma for PT determination with Hepato Quick.

D 45

### D-Dimer indicates the progression of malignant disease in patients with breast cancer

*M. Neises, M. Platz, H.-J. Strittmatter, F. Melchert  
and E. Spanuth\*  
Universitäts-Frauenklinik, Klinikum Mannheim,  
Theodor-Kutzer-Ufer, 6800 Mannheim 1  
\*Boehringer Mannheim GmbH, Abteilung Blutgerinnung,  
Sandhofer Straße 116, 6800 Mannheim 31*

Patients with benign breast tumor (group A), carcinoma of the breast (group B) and primary metastasized breast cancer or secondary malignancy (group C) were included in a prospective study. The aim of the study was to examine the diagnostic validity of several coagulation parameters connected to activation processes of the coagulation and fibrinolytic system.

Plasma samples were obtained prior to and 10 days after surgery for determination of fibrinmonomer, D-Dimer, Antithrombin III and Protein C. In order to compare these parameters with established tumor markers CEA and CA 15-3 were measured.

No differences were found between the various patient groups in AT III, Protein C, CEA and CA 15-3 concentrations. On the other hand a different behavior was seen in case of D-Dimer. Whereas no significant elevated D-Dimer values were found in group A and B before and after surgery group C shows postoperatively markedly raised levels.

This result shows that a discrimination between patients with metastasized breast cancer or secondary malignancy and others with benign breast tumors or primary carcinoma of the breast is possible by D-Dimer determination.

D 46

### Evaluation of ELISA PF 4 and ELISA $\beta$ -TG for determination of platelet specific proteins platelet factor 4 (PF 4) and $\beta$ -thromboglobulin ( $\beta$ -TG) by enzyme-linked immunosorbent assay

*K.-E. Stötzer and E. Spanuth  
Boehringer Mannheim GmbH, Abteilung Blutgerinnung,  
Sandhofer Straße 116, 6800 Mannheim 31, FRG*

We report about two new methods for determination of PF 4 and  $\beta$ -TG by enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA PF 4 and ELISA  $\beta$ -TG (Boehringer Mannheim).

Samples are obtained by clean venipuncture using CTAD-Tubes (Boehringer Mannheim) which contained citrat, theopylline, adenosine and dipyrindamole to avoid platelet activation during sample preparation.

With standard sample dilution of 1:5 for ELISA PF 4 and 1:10 for ELISA  $\beta$ -TG the assay range was 1–100 IU of PF 4 and 5–200 IU of  $\beta$ -TG.

In working solution the lowest detection limit was found to be 0.25 IU/ml for  $\beta$ -TG and 0.2 IU/ml for PF 4. The high reliability of ELISA PF 4 and ELISA  $\beta$ -TG can be concluded from the within-run and day-to-day coefficient of variation of 3.1–6.2 respectively 5.5–6.7 ELISA PF 4 and 2.2–3.6 respectively 5.1–7.1 for ELISA  $\beta$ -TG. Recovery studies with various levels of PF 4 and  $\beta$ -TG shows the good accuracy of the ELISA methods. With ELISA PF 4 we obtained a recovery of 96–104% (PF 4 values from 6.9–39 IU/ml) and with ELISA  $\beta$ -TG of 96–102% ( $\beta$ -TG values from 28–122.5 IU/ml).

Methodcomparison with PF 4 RIA-KIT (Abbott) respectively  $\beta$ -TG RIA (Amersham) shows good correlation ( $r = 0.89$  respectively  $r = 0.97$ ).

D 47

### Automatisierung eines neuen zweistufigen Tests zur photometrischen Bestimmung der partiellen Thromboplastinzeit mit einem chromogenen Substrat

*F. Keller, M. Kraus, F. Metz, J. Sieber, E. Solleder, G. Zang,  
P. Zürrlein, F. Dati\* und U. Konheiser\*  
Medizinische Universitätsklinik, Zentrallabor, Würzburg;  
\*Behringwerke AG, Postfach 1140, Marburg*

Die Einführung der Photometrie bei Gerinnungstests stellt nicht nur einen wichtigen Schritt zur Optimierung und Standardisierung, sondern auch zur Automatisierung der hämostaseologischen Diagnostik dar. Photometrische Gruppentests für die Thromboplastinzeit und die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (PTT) sind bereits beschrieben (1).

Um die Automatisierung der PTT-Bestimmung zu erreichen, wurde ein neuer chromogener Test (CTS-Neothromtin, Behringwerke AG) am Cobas Fara, einem Zentrifugalanalysator (Hoffmann-La Roche, Basel/Schweiz) adaptiert. Dieser Test basiert auf einer fixed-absorbance Messung und wird über einen an das Analysengerät angeschlossenen, externen Rechner ausgewertet.

Bestimmungen der PTT mit diesem System in Plasmen eines Referenzkollektivs (n = 50) ergaben einen Referenzbereich von 28–45 sec für diese chromogene Methode. Für Faktor VIII wurde eine Empfindlichkeit des Tests von 45% der Norm ermittelt.

Die Heparinempfindlichkeit dieses neuen Tests liegt bei 0,08 E/ml (HMW-Heparin). Vergleichsmessungen zwischen der photometrischen Zweistufen-PTT am Cobas Fara und einer traditionellen PTT (Neothromtin, Behringwerke AG) am KC10 (Amelung, Lemgo) in Plasmen von Patienten mit Hämophilie oder v. Willebrand Syndrom (n = 15) sowie von Patienten unter Antikoagulation- oder Lysetherapie (n = 63) ergaben gute Korrelationen.

Das System aus Cobas Fara und dem hier evaluierten Reagenz (CTS-Neothromtin, Behringwerke AG) bietet daher einen neuen Weg zur zuverlässigen, automatisierten Gerinnungsdiagnostik.

D 48

## Determination of immunosuppressive acid protein (IAP) in patients with thyroid medullary cancer: comparison with carcinoembryonic antigen (CEA)

I. Karbowiak, S. Dotto, G. L. Gessoni, P. Maturi, M. E. Girelli and F. Callegari

*Ospedale Civile Piove di Sacco and Istituto Semeiotica Medica, University of Padua, Italy*

IAP is a low molecular weight glycoprotein which has been isolated in its pure form in plasma. It is still not clear which is the function of this factor, but recent studies reported that IAP is elevated in several neoplastic diseases (1, 2, 3). These studies have also shown that IAP elevation is more evident in advanced stage of these diseases. The aim of the present study was to

measure plasma IAP in patients with medullary thyroid cancer, and to compare IAP values with CEA values.

### Patients

40 patients with medullary thyroid cancer were studied. IAP was also measured several times during the follow up of 10 of these patients with metastases, after thyroidectomy.

### Method

IAP was measured by nephelometric method adapted to Behring nephelometer, using a commercial kit (Bio-Line Diagnostics). For the standard curve the IAP standard (1 mg/ml) was diluted 'till 1:20, using accelerator and buffer of N-ASL-CRP (Behring). Normal values are considered less than 500 µg/ml.

### Results

IAP was elevated in 42% of the 40 cases studied, while CEA increased in 97%. No correlation was evident between the two parameters. Considering the follow up of patients with metastatic disease, IAP was elevated in 26% of the determinations (108 determinations in 10 patients). In most of these cases the increase of IAP started in the advanced stage of the disease and was a negative prognostic factor. It is interesting to note that in two cases with multiple metastasis, where CEA and TCT were negative, IAP was elevated.

### Conclusions

Determination of CEA is usually a better marker for evaluation of medullary thyroid cancer. Increase of IAP is however a marker of advanced stage of the disease. In selected cases, where CEA is not elevated it could be possible to consider IAP for the evaluation of the patients.

### References

1. YAMASHITA, et al.: *Cancer* 57, 69 (1986).
2. SAWADA, et al.: *Cancer* 52, 2081 (1983).
3. RUDMAN, et al.: *Cancer Res.* 32, 1951 (1972).

M 1

## Klinische Relevanz und laborchemische Eigenschaften von ANF und cGMP

K. P. Vorderwinkler, E. Artnar-Dworzak, G. Jakob und B. Puschendorf

Institut für Medizinische Chemie und Biochemie der Universität Innsbruck, Österreich

ANF (atrialer natriuretischer Faktor), ein Peptidhormon, das von myoendokrinen Zellen des rechten Vorhofes gebildet und bei Vorhofdehnung in das Blut sezerniert wird, wirkt an seinen Zielzellen über ein Rezeptorsystem, das die membrangebundenen Guanylatcyclase zur Bildung von cGMP anregt. Das von diesem Enzym gebildete cGMP kann im Blut proportional zu seiner intrazellulären Konzentration nachgewiesen werden. Erhöhte ANF-Werte wurden bei Tachyarrhythmien, Herzinsuffizienz, Hypervolämien und bei chronischen Nierenerkrankungen beschrieben. Wir untersuchten die laborchemischen Eigenschaften und die klinische Relevanz von ANF und cGMP.

Während cGMP bei Blutabnahme mit EDTA, das auch ein Hemmer der Phosphodiesterase ist, sowohl bei Raumtemperatur als auch gekühlt über mindestens sechs Tage stabil bleibt, erweist sich ANF in seinem präanalytischen Verhalten unbefriedigend. Aufgrund dieser laborchemischen Eigenschaften von ANF sowie der guten Übereinstimmung zwischen ANF und cGMP im Plasma scheint cGMP für die routinemäßige Labordiagnostik kardialer Erkrankungen besser geeignet zu sein.

Die an 74 herzkranken Patienten ermittelte Sensitivität des cGMP von 78% läßt sich nach ersten Ergebnissen durch ergometrische Belastung noch wesentlich erhöhen, so daß auch latente Herzkrankungen erkannt werden können. Die von uns an 128 nicht-herzkranken Patienten ermittelte Spezifität von 96% zeigt, daß erhöhte cGMP-Werte im Blut nahezu ausschließlich durch gesteigerte ANF-Freisetzung zustandekommen. Unsere eigenen Befunde deuten darauf hin, daß Erhöhungen von ANF und cGMP nicht nur bei Herzinsuffizienzen, sondern auch bei Nierenschädigungen (Kreatinin > 1,5 mg/dl) und bei Leberzirrhose (hepatorenales Syndrom) auftreten und somit übereinstimmende Einschränkungen der Spezifität für ANF und cGMP gegeben sind. Die erhöhten ANF- und cGMP-Plasmakonzentrationen bei Nierenerkrankungen zeigen, daß beide Substanzen über die Niere eliminiert werden, obwohl der Nachweis von immunreaktivem ANF im Urin wegen Maskierung bisher unbefriedigend ist und daher eine genaue Messung der ANF-Clearance nicht möglich war; deshalb findet sich auch keine Korrelation zwischen den ANF-Werten im Plasma und im Urin (1).

Hingegen zeigen vorläufige Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe eine gute Korrelation zwischen cGMP-Werten im Urin und im Plasma; die cGMP-Clearance beträgt 100–140 ml/min. Da die cGMP-Bestimmung im Urin ohne Extraktion durchgeführt werden kann, ergibt sich eine weitere Vereinfachung dieses Tests, so daß er für die routinemäßige Anwendung bei Herzkrankungen geeigneter ist als die ANF-Bestimmung im Serum, zumal beide Parameter nahezu die gleiche Spezifität aufweisen.

Schrifttum:

1. MISSBICHLER, A., HARTTER, E., WOLOSZCZUK, W., PITTNER, F.: *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 369, 878 (1988).

M 2

## Zur Bedeutung der mAst beim akuten Myokardinfarkt

S. W. Golf, H. Temme, N. Katz und L. Róka  
Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie des Klinikums Gießen

Die mitochondriale Aspartat-Aminotransferase (mAst) wird nach akutem Myokardinfarkt (AMI) zusammen mit anderen Enzymen,

z. B. der Creatinkinase (CK) und Laktat-Dehydrogenase (LDH) in das Plasma abgegeben. Die katalytische Konzentration (Aktivität) der mAst verläuft zeitlich ähnlich wie die der LDH. Während eines viertägigen Stationsaufenthaltes von 53 Personen mit AMI korrelierte die Aktivität der mAst signifikant mit der Aktivität der CK, Hxdroxybutyrat-Dehydrogenase (HBDH), LDH, Isoenzym MB der CK, und dem C-reaktiven Protein. Die Holoenzymfraktion der mAst-Aktivität verblieb im Gegensatz zur cytosomalen AST bei 0,6 während der Beobachtungsperiode. Das Komplikationsrisiko wurde anhand des Risikoindex (1) unter Verwendung des Lebensalters, seriellen Messungen der Plasma-Harnstoffkonzentration, sowie der LDH- oder mAst-Aktivität abgeschätzt. Die Patienten wurden unabhängig vom Risikoindex doppelblind in zwei Gruppen aufgeteilt, eine erhielt standardisierte Heparin-Behandlung, die andere eine hochdosierte Streptokinase-Behandlung (2). Die Berechnung des Risikoindex in der ursprünglichen Form mit der LDH-Aktivität ergab für beide Gruppen keinen Unterschied. Ein Austausch von LDH-Aktivität mit mAST-Aktivität ergab auf der Basis des berechneten Risikoindex für die Streptokinase-Gruppe eine günstigere Prognose. Wenn der ursprüngliche Risikoindex der Patienten den nachträglich eingetretenen Todesfällen, Reinfarkten und notwendigen Bypass-Operationen gegenübergestellt wurde, wiesen 54% Patienten mit nachträglichen Komplikationen bereits initial einen erhöhten Risikoindex auf. Wurde zur Berechnung von Risikoindex und Prognose die mAST-Aktivität anstelle der LDH-Aktivität verwendet, wiesen 70% der Patienten mit nachträglichen Komplikationen einen initial erhöhten Risikoindex und eine verschlechterte Prognose auf.

Schrifttum:

1. ALBERT, A., HARRIS, E. K., CHAPPELLE, J.-C., HEUSGHEM, C., KULBERTUS, H. E.: On the interpretation of serial laboratory measurements in acute myocardial infarction. *Clin. Chem.* 30, 69–76 (1984).
2. GOLF, S. W., TEMME, H., KÄMPF, K. P., BLEYL, H., BRÜSTLE, A., BÖDEKER, R., HEINRICH, D.: Systemic short term fibrinolysis with high dose streptokinase in acute myocardial infarction: time course of biochemical parameters. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 22, 723–729 (1984).

M 3

## Expression von fMet-Leu-Phe-Rezeptoren und Produktion von Sauerstoffradikalen in Granulozyten septischer Patienten

K. Tschaikowsky, U. Pfeiffer, M. Georgieff und T. Anhäuser  
Institut für Anästhesiologie, Universität Erlangen-Nürnberg

Die Aktivierung von Granulozyten (GR) als unspezifische Immunantwort auf Infektionen und mögliche Ursache irreversibler Zellschädigungen (ARDS und Multiorganversagen) in der Entwicklung einer Sepsis, ist von vitaler Bedeutung. Hierzu leisten, neben den lysosomalen Enzymen, freigesetzte Sauerstoffradikale, aufgrund ihrer deletären Wirkungen einen wesentlichen Beitrag. Die GR-Aktivierung erfolgt durch chemotaktische Faktoren bakteriellen (Endotoxin, N-Formylpeptide) oder endogenen Ursprungs (C5a, LTB<sub>4</sub>, etc.). Ziel unserer Untersuchung war es, den Einfluß der Sepsis auf die Expression von fMet-Leu-Phe (FMLP)-Rezeptoren für N-Formyl-Peptide sowie die Produktion von Sauerstoffsuperoxid (SO) zu bestimmen.

### Material und Methodik

GR wurden aus heparinisiertem Blut (Ficoll-Separation, hypotone Ery.-Lyse, Reinheit > 97%) gesunder Probanden und septischer Patienten gewonnen. Die Freisetzung von SO aus nichtstimulierten, sowie mit Phorbol-myristat-acetat (PMA) und FMLP stimulierten GR wurde durch eine Superoxiddismutase inhibierbare Reduktion von Cytochrom c gemessen. Die Berechnung der FMLP-Rezeptorendichte erfolgte durch die Bestimmung der spez. Bindung von <sup>3</sup>H-FMLP. Die eingesetzten Ligandkonzentrationen waren 1 nM (high affinity) und 120 nM. Die Bindung

in Gegenwart von 0,5 mM unmarkiertem FMLP wurde als unspezifische Bindung berücksichtigt.

## Ergebnisse

SO-Freisetzung (nmol/10<sup>6</sup> Zellen/30 min):

	FMLP	PMA	Unstimm.
Kontrolle (n = 12)	7,6 ± 1,3	59,2 ± 6,8	3,1 ± 1,4
Septiker (n = 10)	12,2 ± 2,8*	36,5 ± 10,3*	3,9 ± 2,7

## FMLP-Rezeptoren pro Granulozyt

	Gesamtanzahl	High affinity
Kontrolle (n = 5)	(2,4 ± 0,4) · 10 <sup>4</sup>	(3,8 ± 0,2) · 10 <sup>2</sup>
Septiker (n = 6)	(4,6 ± 1,3) · 10 <sup>4*</sup>	(9,3 ± 0,8) · 10 <sup>2*</sup>

(Mittelwerte ± SEM, \* = p < 0,01)

## Diskussion

In der Entwicklung einer Sepsis kommt es zu einer drastischen Zunahme der N-Formylpeptid-Rezeptoren (+91% Gesamtzahl, +145% high affinity) in der GR-Membran. Daraus resultiert eine verstärkte Ansprechbarkeit auf entsprechende Stimuli mit deutlich vermehrter (+60%) SO-Freisetzung und wahrscheinlich auch anderer, ko-stimulierter Reaktionen. Die Rezeptor-Response-Kopplung (SO-Bildung) ist jedoch ca. 32% niedriger als aufgrund der Rezeptorzunahme zu erwarten wäre. Ein Mangel intrazellulärer Kofaktoren in der GR septischer Patienten könnte, wegen der um ebenfalls ca. 38% reduzierten, rezeptorunabhängigen SO-Bildung unter PMA, ursächlich dafür sein.

M 4

## ANF und cGMP beim traumatischen Schock

A. Pomaroli, E. Artner-Dworzak, J. Koller, N. Mutz und B. Puschenдорf

Klinik für Anaesthesie & Allgemeine Intensivmedizin und Institut für Medizinische Chemie und Biochemie der Universität Innsbruck, Österreich

Die Ausbildung einer Hypovolämie beim traumatischen Schock bedingt die Entwicklung pathophysiologischer Regulationsmechanismen. Bei solchen Mechanismen ist möglicherweise auch das von den myo-endokrinen Zellen überwiegend des rechten Vorhofs bei volumenbedingter Dehnung in das Blut ausgeschüttete atriale natriuretische Peptid (ANF) von Bedeutung. Ausgehend von ersten tierexperimentellen Ergebnissen (1) haben wir das Verhalten von ANF und seinem second messenger, dem cyclischen Guanosin Monophosphat (cGMP) bei polytraumatisierten Patienten in der Frühphase des traumatischen Schocks untersucht.

## Fragestellung und Methodik

Die Untersuchung erfolgte an insgesamt 17 polytraumatisierten Patienten. Die Klassifizierung des Traumaschweregrades erfolgte nach dem Injury Severity Score (ISS). Die Patienten wurden nach dem Schweregrad und dem Verletzungsmuster zwei Gruppen zugeteilt. Gruppe A: 9 Pat. mit Thoraxbeteiligung; (X = 39,8a; ISS: 41,3 ± 17,7), Gruppe B (als Vergleichsgruppe): 8 Pat. ohne Thoraxbeteiligung; (X = 27,7a; ISS: 28,3 ± 16,1).

Sämtliche Patienten wurden beginnend von der Aufnahme künstlich beatmet und erhielten standardisierten Flüssigkeitsvolumenersatz. Zu festgelegten Meßzeitpunkten (unmittelbar nach der Aufnahme = 0, nach der 3., 7., 12., 24., 36. Std. und am 5. Tag nach der Aufnahme) wurde aus zentralvenösem Blut ANF und cGMP bestimmt. Die Blutabnahmen erfolgten in gekühlten EDTA-Monovetten; das Blut wurde gekühlt zentrifugiert und anschließend bei -20°C eingefroren. ANF und cGMP wurden radioimmunologisch bestimmt (ANF: Eiken-Kit, Jpn., cGMP: J125 - Amersham-Kit, GB).

## Ergebnisse

In beiden Gruppen zeigen ANF und cGMP während des gesamten Untersuchungszeitraumes einen annähernd parallelen Verlauf. In der akuten posttraumatischen Phase sind sowohl das ANF (Gruppe A: 149 ± 51 pg/ml; Gruppe B: 130 ± 28 pg/ml) als auch das cGMP (A: 9,4 ± 2,6; B: 8 ± 1,3 pg/ml) erhöht. Bereits nach 3 Std. liegen die ANF/cGMP-Werte wieder im Normbereich (ANF: bis 120 pg/ml; cGMP: bis 6,8 pmol/ml).

## Diskussion

In der akuten posttraumatischen Phase konnten wir bei unseren Patienten signifikant erhöhte ANF/cGMP-Werte nachweisen. Dies steht im Widerspruch zu bisher beschriebenen Releasemechanismen. Eine als Folge des Thoraxtraumas auftretende Herzkontusion könnte mögliche Ursache für die gefundenen erhöhten ANF-Werte sein (2). Andererseits führt auch die beim traumatischen Schock plötzlich auftretende Hypovolämie zu konsekutiver Kreislaufzentralisation (periphere Vasokonstriktion zur Sicherung der Durchblutung lebenswichtiger Organe). Der dadurch plötzlich gesteigerte Blutrückfluß führt zur Dehnung des rechten Atriums. Direkte Folge ist eine „relative Hypervolämie“. Sie löst die ANF-Liberation als direkten Regulationsmechanismus aus. Darüberhinaus wurde auch ein catecholamin-abhängiger ANF-Release bei Notfallsituationen beschrieben (3), welcher zur Steigerung der Durchblutung primär minderperfundierter Vitalorgane bei gleichzeitig bestehender peripherer Vasokonstriktion führt.

Schrifttum:

1. SHACKFORD, S. R.: Ann. Sur. 207, 195 (1987).
2. WENCKER, M., LECHLEITNER, P., DIENSTL, F., HAUPTLORENZ, S., PUSCHENDORF, B.: Lancet 11, 1369 (1987).
3. KUCHEL, O., DEBINSKY, W., RACZ, K., BUN, N. T., GARCIA, R., GESSON, J., LAROCHELLE, L., CANTIN, M., GENEST, J.: Life Sci. 40, 1545 (1987).

M 5

## Pankreas-Elastase 1-ELISA: Bedeutung für die Pankreastransplantation

A. Sziegoleit<sup>1</sup>, R. Linder<sup>2</sup>, B. Peters<sup>1</sup>, C. Brattström<sup>2</sup>, G. Tyden<sup>2</sup> und C. G. Groth<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institut für Med. Mikrobiologie der Universität Gießen  
<sup>2</sup> Dept. of Transplantation Surgery, Huddinge Hospital, Sweden

Die Pankreaselastase 1 (E1) hat sich als wertvoller Parameter für die Diagnose der akuten Pankreatitis erwiesen. Dieses pankreas-spezifische Enzym kann im Serum sowohl durch einen RIA (1) als auch mittels ELISA (2) bestimmt werden. Bei dem von uns entwickelten ELISA sind spezifische Antikörper vom Schaf an die feste Phase gebunden. Nach Inkubation mit dem Serum wird das gebundene Enzym mit einem zweiten spezifischen Antikörper vom Kaninchen markiert, anschließend durch enzymkonjugierte Antikörper gegen Kaninchen-Immunglobuline kenntlich gemacht.

E1 wurde mittels ELISA im Serum von 12 Patienten mit fortgeschrittenem Typ I Diabetes nach Pankreastransplantation über einen Zeitraum von 6 Wochen postoperativ regelmäßig bestimmt. In den ersten postoperativen Tagen stiegen die Werte ausnahmslos stark an (zwischen 50 und 150 ng/ml, normal unter 0,2 ng/ml) um sich in den folgenden Wochen auf einen niedrigeren Wert zwischen 10 und 50 ng/ml zu stabilisieren. Ob dies auf eine chronisch entzündliche Destruktion des Transplantats hinweist, muß durch Langzeitkontrollen noch geklärt werden. In dieser frühen Phase waren zytologisch nachgewiesene Abstoßungskrisen im ELISA nicht erkennbar. 4 Patienten wiesen aber später als 6 Wochen nach der Operation erneut einen E1-Anstieg auf, einmal im Rahmen einer akuten Abstoßungsreaktion, 3mal während einer CMV-Infektion.

Für die spätere Beobachtung von Patienten mit einer Pankreastransplantation könnte sich E1 somit als nützlicher Parameter zur Transplantatüberwachung erweisen.

Schrifttum:

1. MURATA, A., OGAWA, M., FUJIMOTO, K., KITAHARA, T., MATSUDA, Y., KASAKI, G.: Enzyme 30, 29 (1983).
2. SZIEGOLEIT, A., KNÄPLER, H., PETERS, B.: Clin. J. Biochemistry, im Druck.

## Elastase 1 (E1) und Chymotrypsin B (ChTB) Sekretion im Vergleich mit anderen Pankreasenzymen

A. Sziegoleit<sup>1</sup>, H. Weidenbach<sup>2</sup> und G. Adler<sup>2</sup>  
<sup>1</sup> Institut für Med. Mikrobiologie der Universität Gießen  
<sup>2</sup> Zentrum für Innere Medizin der Universität Marburg

E1 und ChTB sind außergewöhnlich stabile pankreaspezifische Enzyme, welche die Darmpassage als weitgehend intakte Proteine überstehen. Ihre Konzentration im Stuhl, die mit quantitativen immunologischen Methoden gemessen werden kann, spiegelt somit die Funktion des exocrinen Pankreas wider (1). In der vorliegenden Studie wurde die Sekretionsleistung der Bauchspeicheldrüse bestimmt. An der Untersuchung nahmen 3 Gesunde, 3 Patienten mit leichter und 7 Patienten mit schwerer Einschränkung der Pankreasfunktion teil. Nach Legen einer dreilumigen Duodenalsonde wurde Sekretin (1 U/kg KG) über 120 min infundiert. Nach 60 min wurde zusätzlich Caerulein (7,5 ng/kg KG) gegeben. Unter Anwendung einer Markerperfusion (PEG 4000) wurde das Duodenalsekret in 15 min-Portionen zur Bestimmung der Pankreasenzyme gesammelt. E1 und ChTB wurden durch radiale Immundiffusion quantifiziert. Amylase, Lipase und die enzymatische Chymotrypsinaktivität wurden mit den entsprechenden Kits der Fa. Boehringer, Mannheim, bestimmt, die enzymatische Aktivität von Trypsin nach Hummel (2) gemessen.

Bei Gesunden wurde für E1 eine Basissekretion von 6–8 mg/15 min gefunden, die unter Stimulation auf 20–25 mg/15 min anstieg. Für ChTB betragen die entsprechenden Werte etwa 2 mg und 7–8 mg. Bei den 7 Patienten mit schwerer Pankreasinsuffizienz konnten beide Enzyme weder in Ruhe noch nach Stimulation nachgewiesen werden (Nachweisgrenze 10 µg/ml), während bei den Patienten mit leichter Insuffizienz die Enzyme nach Stimulation in meßbaren Konzentrationen gefunden wurden. Dies entsprach weitgehend dem Verhalten der übrigen Enzyme. Die Bestimmung von E1 und ChTB kann als einfache Alternative zur Erfassung einer Pankreasinsuffizienz Verwendung finden, wobei signifikante Befunde bereits mit einer Stuhlprobe erhoben werden können.

Schrifttum:

1. SZIEGOLEIT, A., KRAUSE, E., KLÖR, H. U., KANACHER, L., LINDER, D.: Clin. J. Biochemistry, im Druck.
2. HUMMEL, B. C. W.: Can. J. Biochem. Physiol. 37, 1393 (1959).

## Porphyrinurie bei erythrohepatischer Protoporphyrinurie: Bedeutung für Diagnose und Prognose

Margareta Frank und M. Doss  
 Abteilung für Klinische Biochemie im Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg, Deutschhausstraße 17 1/2, D-3550 Marburg

Die Protoporphyrinurie beruht auf einer autosomal dominant vererbaren Störung des Porphyrinstoffwechsels (Defekt der Ferrochelatase). Klinisches Leitsymptom ist eine prognostisch günstige phototoxische Hautreaktion unmittelbar nach Sonnenexposition. Diese Photodermatose wurde primär als erythropoietisch, heute zunehmend als erythrohepatische Protoporphyrinurie bezeichnet, da in einigen Fällen eine Protoporphyrinurie-assoziierte, pathogenetisch ungeklärte schwere Leberschädigung dokumentiert wurde (1).

Bei 75 Patienten mit Lichtsensibilität wurde die Diagnose Protoporphyrinurie durch biochemischen Nachweis erhöhter Konzentrationen von freiem Protoporphyrin in Erythrozyten, Plasma und Stuhl gesichert. Die Porphyrine wurden durch HPTLC und HPLC analysiert und die Differenzierung des freien, nicht Zink-gebundenen Protoporphyrins spektrophotometrisch und spektrofluorimetrisch vorgenommen.

Zeichen einer gestörten Leberfunktion, Anstieg von Aminotransferasen und Bilirubin, wurden bei 21 (28%) Patienten beobachtet. 7 (10%) Patienten wiesen eine histologisch gesicherte mikronoduläre Leberzirrhose mit intrahepatischer Cholestase auf. Eine 20jährige Frau und ein 22jähriger Mann starben an den Folgen der irreversiblen Leberinsuffizienz. Ein weiterer Patient wurde im Stadium der dekompensierten Leberzirrhose Lebertransplantiert. Er erlag postoperativ pulmonalen und renalen Komplikationen. Bei 53 Patienten (70%) war die Porphyrinsekretion im Urin normal. Alle Patienten mit Leberfunktionsstörungen entwickelten eine sekundäre Porphyrinurie mit Dominanz von Koproporphyrin. Dabei korrelierte die Höhe der Koproporphyrinurie mit dem Ausmaß der hepatischen Funktionseinschränkung ( $p < 0,01$ ). In 4 Fällen trat die pathologische Koproporphyrinurie bei normwertigen biochemischen Leberfunktionsparametern, biopsisch jedoch nachweisbaren Organveränderungen, auf. Bei 12 Patienten mit symptomatischer Koproporphyrinurie war das Isomer I auf Werte zwischen 43 und 91% (normal  $< 31\%$ ;  $p < 0,01$ ) angestiegen. Die höchste Ausscheidung von Isomer I ( $> 80\%$ ) fand sich bei den 3 Patienten mit terminalem Leberschaden.

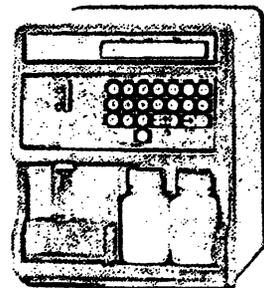
## Thrombozytenzählung ein Ärgernis für Sie ?

Schon unser Einkanalssystem Modell 871 bietet Ihnen :

- THR und RBC simultan aus Vollblut !
- WBC, RBC, THR, HGB, HCT, MCV sind Standard.
- Alle Kalibrierungen automatisch.
- Deutscher Klartext in Anzeige und Bedienungsführung.
- Elektronische Volumenüberwachung !

... aber vor allem:

**Präzision**  
**Verlässlichkeit**  
**Wirtschaftlichkeit !**



Weitere Informationen erhalten Sie: Entweder direkt vom Werk oder unserer Werksvertretung.



Unterer Dammweg 12  
 7500 Karlsruhe 31  
 Tel. 0721 / 70 50 46



Keltenstr. 1  
 4040 Neuss 1  
 Tel. 02101 / 54 00 55

Die vorliegenden Ergebnisse dokumentieren 1. reversible hepatische Funktionsstörungen bei 25% und irreversible Leberparenchymschäden bei 10% der Patienten mit Protoporphyrinurie; 2. die diagnostische Bedeutung der sekundären Koproporphyrinurie mit Dominanz des Isomer I als sensitiven Indikator der Leberbeteiligung und 3. die ernste Prognose klinische manifester Leberinsuffizienz.

Eine therapeutische Beeinflussung der Protoporphyrin-induzierten hepatobiliären Komplikationen ist nur in der initialen Phase der Leberbeteiligung möglich. Die frühzeitige Gabe von Cholestyramin oder Gallensäuren scheint hierbei erfolversprechend zu sein (2).

## Schrifttum:

- DOSS, M.: Erythrohepatische Protoporphyrinurie. *Internist* 26, 411–419 (1985).
- DOSS, M., FRANK, M.: Hepatobiliary implications and complications in protoporphyria. A 20 year study. *Clin. Biochem.*, in press (1989).

## Zn $\alpha_2$ -Glycoprotein in humanen Körperflüssigkeiten

W. Bürgi<sup>1</sup>, A. Llanto<sup>1</sup>, W. Stoll<sup>1</sup>, S. Baudner<sup>2</sup> und K. Schmid<sup>3</sup>  
<sup>1</sup> Kantonsspital Aarau, Schweiz  
<sup>2</sup> Behringwerke AG, Marburg/Lahn, BRD  
<sup>3</sup> Boston University School of Medicine, Boston, USA

Zn $\alpha_2$ -Glycoprotein (Zn $\alpha_2$ ) ist ein kleines, globuläres Protein mit einem Molekulargewicht von 41 kD und einem Kohlehydratgehalt von 18,2%. Seine Struktur ist erst kürzlich aufgeklärt worden. Sie weist Homologien zum Histokompatibilitäts-Antigenkomplex auf. Die Funktion von Zn $\alpha_2$  ist unbekannt. Als Grundlage für das Studium seiner biologischen Rolle wurde Zn $\alpha_2$  mittels radialer Immunodiffusion in verschiedenen Körperflüssigkeiten und bei verschiedenen Krankheiten bestimmt. Es wurden folgende Konzentrationen ermittelt ( $\bar{x} \pm 2s$ ; <sup>2</sup> = absoluter Bereich; w = weiblich; m = männlich; Angaben in mg/100 ml):

Blutserum, normale Kontrollen	w	3,8– 7,5 <sup>1</sup>
	m	4,4– 8,0 <sup>1</sup>
Blutserum, Leberzirrhose	w, m	< 1,0– 3,5 <sup>2</sup>
	w, m	1,0– 3,5 <sup>2</sup>
Nabelschnurserum	w, m	1,0– 3,5 <sup>2</sup>
Samenplasma, Fertilitätskontrolle Status nach Vasektomie		7,3– 56,5 <sup>1</sup>
		6,7– 55,1 <sup>1</sup>
Brustzysten-Flüssigkeit		80– 174 <sup>2</sup>
Colostrum		7,4– 10,5 <sup>2</sup>
Muttermilch		< 1,0– 1,7 <sup>2</sup>

Die Resultate zeigen, daß im Normalserum ein geringer, jedoch signifikanter Geschlechtsunterschied in der Konzentration von Zn $\alpha_2$  besteht. Die signifikant niedrigen Werte im Nabelschnurblut können möglicherweise auf eine Leberunreife zurückgeführt werden. Diese Vermutung stützt sich auf frühere Mitteilungen anderer Autoren, wonach Zn $\alpha_2$  in der Leber synthetisiert wird. Eine Störung der Leberfunktion, wie sie bei der Leberzirrhose typisch ist, könnte auch die signifikant niedrigeren Werte bei dieser Krankheit erklären. An anderer Stelle konnte gezeigt werden, daß Zn $\alpha_2$  auch in der Prostata synthetisiert wird und zu gegenüber Serum signifikant höheren Konzentrationen von Zn $\alpha_2$  im Samenplasma führt. Die sehr hohen Zn $\alpha_2$ -Konzentrationen in mehreren Brustdrüsenflüssigkeiten lassen die Vermutung aufkommen, daß das Epithel der Brustzyste ebenfalls Zn $\alpha_2$  synthetisiert. Die Werte, die im Colostrum gemessen wurden, und die sehr niedrige Konzentration von Zn $\alpha_2$  in der Muttermilch schließen eine solche Möglichkeit jedenfalls nicht aus.

## Endogene Kreatininclearance bei ikterischen Patienten: Quantifizierung und Eliminierung des Bilirubinfehlers

F. da Fonseca-Wollheim und W. Pommer  
 Zentrallaboratorium Krankenhaus Zehlendorf (Berlin)  
 und Nephrologische Abteilung Humboldt-Krankenhaus (Berlin)

Im Rahmen des nephrologischen Konsiliardienstes auf einer Intensivstation wurden wiederholt bei ikterischen Patienten unpausable Kreatinin-Clearancewerte beobachtet. Zur Klärung dieses Phänomens bestimmten wir die Kreatinin-Clearances bei einem ikterischen Patientenkollektiv und einer anikerischen Kontrollgruppe mit unterschiedlichen Analysemethoden.

## Methodik

Hitachi 704 Analyzer, Reagenzien der Fa. Boehringer Mannheim, Methoden: a) Jaffé kinetisch; b) Creatininase-PAP; c) Creatininase-MPA (1). Die Urin Kreatininbestimmungen erfolgten direkt im vorverdünnten Harn. Als Probenmaterial für die Bestimmung der Serum-Kreatininkonzentration wurde einerseits Serum direkt, andererseits Bilirubin-freies Serum-Ultrafiltrat (2) (UF) eingesetzt. Die Regressionskonstanten für die Umrechnung von UF-Kreatinin in S-Kreatinin lauten (bestimmt durch Parallelanalysen bei 48 anikerischen Proben und Auswertung nach Passing und Bablok (3):

Methoden	a (mg/ml)	b	r
Jaffé kinetisch	0,113	0,941	1,000
Creatininase-PAP	0,004	0,943	1,000
Creatininase-MPA	0,000	0,973	1,000

Bei dem ikterischen Kollektiv (Gesamtbilirubin:  $\bar{x} = 17,8$  mg/dl;  $s = 9,4$  mg/dl,  $n = 10$ ) ergab die Clearancebestimmung auf der Basis der im Harn und Serum bzw. Serum-UF gefundenen Kreatininwerte:

Methoden	Clearance (ml/min)				p
	U-/S-Analyse		U-/UF-Analyse		
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	
Jaffé kinetisch	141,7**	157,5	69,2	40,2	< 0,01
Creatininase-PAP	190,8**	155,7	84,4	59,4	< 0,01
Creatininase-MPA	80,1	50,1	80,3	48,4	> 0,05

Die statistisch hochsignifikanten und klinisch gravierenden Abweichungen der Clearancewerte bei der Jaffé- und der Creatininase-PAP-Methode erklären sich aus der für beide Methoden bekannten negativen Bilirubininterferenz bei der direkten S-Kreatininbestimmung (2). Dagegen erhielten wir bei dem anikerischen Kollektiv mit allen drei Methoden keine signifikanten Abweichungen, wenn Serum oder UF analysiert wurde. Die Creatininase-MPA-Modifikation ist frei von Bilirubininterferenz, aber kommerziell nicht mehr erhältlich. Bis zur Verfügung von Bilirubin-insensitiven Kreatinin-Methoden sollte gezielt bei ikterischen Patienten an Stelle von Serum das einfach zu erhaltende Serum-UF analysiert werden.

## Schrifttum:

- SIEDEL, J., STAEPPELS, J., ZIEGENHORN, J.: Enzymatic Color Reagent for the Assay of Serum and Urine Creatinine without Interference by even Grossly Elevated Sample Bilirubin Levels (Abstr.). *Clin. Chem.* 34, 1189–1190 (1988).
- DA FONSECA-WOLLHEIM, F., HEINZE, K., LOMSKY, K., SCHREINER, H.: Serum Ultrafiltration for the Elimination of Endogenous Interfering Substances in the Determination of Creatinine. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 26, 523–525 (1988).
- PASSING, H., BABLOK, W.: A New Biometrical Procedure for Testing the Equality of Measurements from Different Analytical Methods. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 21, 709–720 (1983).

## Messung der hepatischen Glukoseproduktion mit Hilfe der stabilen Isotopentechnik

F. Grellner, K. Tschakowsky, T. Anhäupel, J. Weindler und M. Georgieff  
 Institut für Anästhesiologie, Universität Erlangen-Nürnberg,  
 Maximiliansplatz, 8520 Erlangen

**Einleitung:** Die Messung des Blutglukosespiegels erlaubt nur eine limitierte Aussage über den Gesamtkörper-Glukosestoffwechsel. Eine wesentlich präzisere Einsicht ermöglicht hingegen die Messung des Glukosestoffwechsels mit Hilfe stabiler Isotope.

**Methodik:** Als Isotop wird 6,6-Dideutero-Glukose in Form einer Bolus-Dauerinfusion nach Bier et al. und Allsop et al. zugeführt. Dabei wird zunächst 6,6-Dideutero-Glukose in einer Dosierung von 4 mg/kg über eine Minute verabreicht, gefolgt von einer kontinuierlichen Infusion in einer Dosierung von 0,05 mg/kg · min. Die Entnahme der Blutproben erfolgt von der Bolus-Infusion zur Bestimmung der natürlichen Anreicherung von zweifach deuterierter Glukose sowie nach 60, 70 und 80 min zur Plateauverifizierung.

Nach Isolierung der Glukose aus dem entnommenen Blut und Derivatisierung erfolgt die analytische Bestimmung mit Hilfe des Gaschromatographen 5890A in Verbindung mit dem Massenspektrometer 5970 der Firma Hewlett Packard im SIM-Modus (Selected Ion Monitoring).

**Ergebnisse:** Nach 12stündiger Nahrungskarenz lag bei sechs Probanden der Blutglukosespiegel bei  $4,78 \pm 0,32$  mmol/l; die hepatische Glukoseproduktionsrate ergab  $2,38 \pm 0,07$  mg/kg · min. Unter Glukoseinfusion stieg der Blutzucker auf  $9,95 \pm 0,55$  mmol/l an. Die endogene Glukoseproduktionsrate fiel signifikant auf  $1,06 \pm 0,09$  mg/kg · min ab.

Sechs Intensivpatienten wiesen ohne Glukoseinfusion eine Glukoseproduktionsrate von  $10,21 \pm 1,85$  mg/kg · min und einen Blutglukosespiegel von 7,24 mmol/l auf.

**Zusammenfassung:** Obwohl die Analytik stabiler Isotope im Plasma mittels GCMS aufwendig ist, ermöglicht sie neue Einblicke in organbezogene Funktionsleistungen in Diagnostik und Therapie.

Schrifttum:

BIER, D. M. et al.: Measurement of "true" Glucose production rates in infancy and childhood with 6,6-dideuteroglucose. *Diabetes* 26, 1016–1023 (1977).  
 ALLSOP, J. R. et al.: The reliability of rates of Glucose appearance in vivo calculated from constant tracer infusions. *Biochem. J.* 172, 407–416 (1978).

## Logistische Regression der Serumkonzentrationen von Laminin und Hyaluronsäure zur Vorhersage der portalen Hypertension bei fibrotischen Lebererkrankungen

J. Kropf, A. M. Gressner und E. Grobe  
 Abteilung für Klinische Chemie und Zentrallaboratorium  
 Klinikum der Philipps-Universität Marburg, 3550 Marburg

Die Entwicklung der portalen Hypertension (PH) ist eine wichtige Folge des fibrotischen Umbruchs in der chronisch geschädigten Leber. Wie wir zuvor gezeigt haben, besteht eine positive, diagnostisch verwertbare Korrelation zwischen der Konzentration von Laminin im Serum und dem Portaldruck (PVP) (1). Wir haben nun untersucht, ob durch eine Kombination mit weiteren Parametern und bei Verwendung geeigneter statistischer Methoden eine verbesserte diagnostische Vorhersage der PH erreicht werden kann.

Die Serum-Konzentrationen von Laminin, N-terminalem Procollagen III Peptid (PIIINP), Hyaluronsäure (HA), Bilirubin und die

Aktivitäten von AST, ALT und gGT wurden in Seren von Patienten mit fibrotischen und cirrhotischen Lebererkrankungen ( $n = 102$ ) bestimmt. Von allen Patienten war weiterhin der Portaldruck bekannt, der indirekt über den Lebervenendruckgradienten ermittelt wurde (1). In Abhängigkeit vom Portaldruck wurden zwei Gruppen (Diagnosen) definiert mit PVP < 5 mm Hg („normal“,  $n = 53$ ) bzw. PVP > 5 mm Hg („erhöht“,  $n = 49$ ). Zur Diskrimination zwischen beiden Gruppen wurde die Methode der logistischen Regression auf die analytischen Ergebnisse für die oben genannten Parameter angewendet. Für einen gegebenen Satz von analytischen Resultaten liefert die logistische Regression die Likelihood Ratio (LR), die die „Chance“ beschreibt, daß ein Individuum bei gegebenen Resultaten zu der Gruppe „normal“ oder „erhöht“ gehört. Zusätzlich kann bei bekannter Prävalenz aus der LR ein individueller prädiktiver Wert berechnet werden.

Unter allen untersuchten Analyten ergaben nur Laminin und Hyaluronsäure, und zwar sowohl einzeln als auch in Kombination, einen signifikanten Beitrag zur Vorhersage der PH. Zur Abschätzung der diagnostischen Validität des Modells wurde eine LR von 1, d. h. gleiche Wahrscheinlichkeiten für „normal“ und „erhöht“, als Entscheidungsgrenze angenommen, und alle 102 Patienten wurden erneut klassifiziert. Aus dem Vergleich zwischen dem aus der Formel vorhergesagten und dem gemessenen PVP wurden eine diagnostische Sensitivität von 0,88 und eine diagnostische Spezifität von 0,88 ermittelt.

Durch die Kombination von Laminin und Hyaluronsäure, von der ebenfalls signifikante Erhöhungen in Seren von Patienten mit Lebercirrhose beschrieben sind (2), wurde somit eine weitere Verbesserung der diagnostischen Kriterien gegenüber den einzelnen Parametern erreicht. Die klinische Brauchbarkeit dieses Modells wird gegenwärtig an einem unabhängigen Patientengut überprüft.

Schrifttum:

- GRESSNER, A. M., TITTOR, W., KROPF, J.: *Hepato Gastroenterol.* 35, 95–100 (1988).
- ENGSTROM-LAURENT, A., LOOF, L., NYBERG, A., SCHRÖDER, T.: *Hepatology* 5, 638–642 (1985).

## Zur Entbehrlichkeit der konventionell bestimmten Totalen Eisenbindungs-kapazität (TEBK) im Rahmen der Eisenmangel-Diagnostik

B.-E. Braun, R. Goes, M. Krieg und H. J. Trampisch\*  
 Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin,  
 Berufsgenossenschaftliche Krankenanstalten Bergmanns-  
 heil – Universitätsklinik der Ruhr-Universität, Gilsingstr.  
 14, D-4630 Bochum 1

\* Abteilung für Medizinische Informatik und Biomathematik  
 der Ruhr-Universität, Overbergstr. 17, D-4630 Bochum 1

Bereits 1979 wurde darauf hingewiesen (1), daß mit Einführung der mechanisierbaren nephelometrischen Transferrinbestimmung die konventionell bestimmte TEBK entbehrlich sei. Trotzdem wird von klinischer Seite auch heute noch die TEBK vielfach angefordert, nicht selten sogar zusammen mit dem Transferrin. Wir haben deshalb versucht, statistisch zu belegen, inwieweit durch die Transferrinbestimmung auf die Meßgröße TEBK verzichtet werden kann.

Bei 195 Patienten mit der Verdachtsdiagnose Eisenmangel aufgrund eines erniedrigten Serumeisenspiegels und/oder eines erniedrigten MCH sowie bei 46 Patienten mit diesbezüglich unauffälligen Werten wurden gemessen: Erythrozytenzahl, Hämoglobin, Hämatokrit, MCH, MCHC und MCV mit dem Coulter Counter S-plus-III, das Serum Eisen ohne Enteiweißung mit der Ferro-Zine®-Methode (Technicon SMA II), die TEBK in Modifikation nach Ramsay (2) mittels Eppendorf-Photometer PCP 6121 und Ferritin radioimmunologisch (Gamma Dab®-<sup>125</sup>I, Fa. Baxter). Die Meßwerte wurden einer Regressions- sowie Clusteranalyse unterworfen, um den diagnostischen Zusammenhang zwischen Transferrin und TEBK zu beschreiben. Darüberhinaus wurden Präzision und Richtigkeit beider Methoden verglichen.

Die Ergebnisse im einzelnen: 1. Die Transferrinbestimmung ist hinsichtlich analytischer Qualität (Intra-, Interassayvarianz, Richtigkeit) und Praktikabilität (Zeitbedarf, Man power, Probenmenge, Reagenzienverbrauch) der TEBK-Bestimmung eindeutig überlegen. 2. Die Korrelation zwischen TEBK- und Transferrin-Werten ist gut (TEBK [ $\mu\text{g/dl}$ ] =  $0.74 \times \text{Transferrin [mg/dl]} + 95$ ;  $n = 241$ ;  $r = 0.74$ ;  $p < 0,0001$ ). 3. Die multivariate Regressionsanalyse mit Transferrin oder TEBK als abhängige Variable und den restlichen Meßgrößen als unabhängigen Variablen zeigt, daß TEBK bzw. Transferrin wechselseitig mit Abstand den größten Einfluß aufeinander haben. 4. Die Clusteranalyse mit auf die Referenzintervalle normierten Einzelergebnissen unter Einbeziehung aller Meßgrößen zeigt eine nur schlechte Strukturierung. Sie wird wesentlich besser, wenn man sich auf die Meßgröße MCH, Hämoglobin sowie Transferrin bzw. TEBK beschränkt, wobei die Zuordnung zu den einzelnen Clustern nahezu unabhängig davon ist, ob man TEBK oder Transferrin in die Analyse miteinbezieht.

Die Korrelationsstudien belegen, daß die TEBK keine diagnostischen Vorteile gegenüber dem Transferrin besitzt. Sie ist somit entbehrlich, da ihre Bestimmung der des Transferrins hinsichtlich analytischer Qualität und Praktikabilität unterlegen ist. Weiterhin zeigt die Clusteranalyse von Routinemeßgrößen des Eisenstoffwechsels, daß ein Patientenkollektiv mit der Verdachtsdiagnose Eisenmangel eine vielschichtige Strukturierung aufweist. Die Einordnung eines Patienten in einen bestimmten Cluster, der wiederum für eine bestimmte Form der Eisenstoffwechselstörung stehen könnte, ist nach den bisher von uns ermittelten Ergebnissen nicht möglich.

Schrifttum:

1. HAECKEL, R., OELLERICH, M.: *Lab. med.* 3, 163–166 (1979).
2. RAMSAY, W. N. M.: *Clin. Chim. Acta* 2, 221–226 (1957).

M 13

## Biochemische und EEG-Befunde beim Kleine-Levin-Syndrom

V. Maier und W. Fröscher

Zentrale Einrichtung Klinische Chemie des Klinikums der Universität Ulm und Neurologische Abteilung des PLK Weißenau, Abt. Psychiatrie I der Universität Ulm

Bei der periodischen Hypersomnie handelt es sich um eine Störung des Schlaf-Wach-Rhythmus mit Schlafphasen, die über Tage anhalten können. Neben schweren organischen Erkrankungen wie Enzephalitiden und Tumoren im Diencephalon müssen differential-diagnostisch Kleine-Levin-Syndrom, Petit mal-Status, vermehrte Tagesmüdigkeit bei Schlaf-Apnoe-Syndrom und die Narkolepsie differential-diagnostisch abgegrenzt werden.

Wir berichten über einen 23jährigen Patienten mit einer periodischen Hypersomnie, die am ehesten als abortives Kleine-Levin-Syndrom anzusehen ist. Die erste Aufnahme erfolgte wegen einer seit Tagen bestehenden Schläfrigkeit. Vor dieser Schlafperiode waren bereits vier ähnliche Phasen, jeweils im Winterhalbjahr, von 1,5 bis 3 Wochen Dauer aufgetreten.

Wesentliche Befunde während der Schlafperiode:

Klinisch: Bradykardie, Hyporeflexie, schläfrig, stets erweckbar.

EEG: 8,5–9/s-Grundtätigkeit, occipital bds. einzelne abortive Slow-SW-Komplexe. Unter HV selten um 3/s Delta-Parerhythmie.

Biochemisch: 10fache Erhöhung des Leucin-Enkephalin im Serum, Cystein im Aminosäurespektrum i. S. fehlend.

Wesentliche Befunde ein halbes Jahr später:

Klinisch: Weiterhin Bradykardie und Hyporeflexie. Psychiatrisch o.B.

EEG: 10–10,5/s-Grundtätigkeit (sonst keine Änderung).

Biochemisch: Leucin-Enkephalin kaum erhöht, Cystein im Aminosäurespektrum wieder vorhanden.

Die Erhöhung des endogenen Opioid-Peptids Leucin-Enkephalin könnte beim Zustandekommen der Vigilanzstörung bedeutsam sein und damit erstmals einen biochemischen Schlüssel zur Aufklärung dieses seltenen Krankheitsbildes bieten. Die Bedeutung des Fehlens von Cystein ist noch völlig unklar.

M 14

## Apolipoprotein A-I und B Serumkonzentrationen in einer badenwürttembergischen Bevölkerungsstichprobe

A. Berg, M. Baumstark, I. Frey und J. Keul  
Medizinische Universitätsklinik Freiburg

Die Serumkonzentrationen der Apolipoproteine A-I und B werden vermehrt als Marker für ein mögliches koronares Risiko herangezogen (1). Im Gegensatz zur Serumcholesterinverteilung (2) liegen allerdings für Apolipoproteine nur begrenzt Ergebnisse über Verteilungen in der Normalbevölkerung vor. Zudem wird die Standardisierung ihrer Analytik durch die Unterschiedlichkeit der Methoden erschwert. — So wurden anlässlich einer öffentlichen Veranstaltung in einer badenwürttembergischen Bevölkerungsstichprobe ( $n = 1056$ ,  $53,7 \pm 14,5$  J.) mittels kinetischer Nephelometrie (Beckmann, Array Protein System, München) die Serumkonzentrationen für Apo A-I und B bestimmt und mit den Ergebnissen der Lipoproteinelektrophorese (Immuno Diagnostika, Heidelberg) verglichen. In Abhängigkeit von Alter und Geschlecht wurden die folgenden Perzentilen berechnet.

Alter	n	Männer			n	Frauen		
		10.	50.	90.		10.	50.	90.
Apo A-I (mg/dl)								
< 45	141	99	133	171	140	113	151	204
45–60	175	104	132	178	211	119	158	203
> 60	156	111	141	182	233	116	149	199
Gesamt	472	105	136	176	584	116	152	202
Apo B (mg/dl)								
< 45	141	50	71	97	140	45	60	88
45–60	175	56	81	112	211	52	74	105
> 60	156	59	84	113	233	64	86	120
Gesamt	472	56	79	110	584	53	77	110

Bei Übereinstimmung der Apo A-I-Werte mit den Daten der Literatur, liegen die Apo-B-Konzentrationen niedriger als anhand der korrespondierenden LDL-C-Konzentration und der Vergleichsliteratur erwartet (3). Eigene Untersuchungen zur LDL-Struktur zeigen jedoch, daß die benutzte Analytik gegenüber Referenzmethoden verlässliche Daten liefert; so messen sich die Apo-B-Konzentrationen nach Lowry erwartungsgemäß um 8% höher (4), die Abweichung zur Konzentrationsmessung durch Aminosäureanalyse beträgt weniger als 2% (5). — Die Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit einer einheitlichen und standardisierten Apolipoproteinanalytik.

Schrifttum:

1. KOTTKA, B. A. et al.: *Mayo Clin. Proc.* 61, 313–320 (1986).
2. LRCP Data: *JAMA* 250, 1873–1879 (1983).
3. ASSMANN, G.: S. 154–159, Schattauer-Verlag Stuttgart (1982).
4. CURRY, M. D. et al.: *Clin. Chem.* 24, 280–286 (1978).
5. BAUMSTARK, M. W. et al.: *Zur Veröffentl.* eingereicht (1989).

## Lipoproteinanalytik im Vollserum mittels Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

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

In der klinisch-chemischen Routine werden Lipoproteine mittels Präzipitation oder Lipoproteinelektrophorese aufgetrennt, während die Fraktionierung durch Ultrazentrifugation Speziallaboratorien vorbehalten ist.

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung einer einfachen chromatographischen Methode zur Beurteilung individueller Lipoproteinmuster.

**Methode.** Zur Auftrennung von Vollserum (50 µl) an Superose 6 (Pharmacia, 30 cm Trennstrecke) dient ein rechnergestütztes HPLC-System (Kontron Analytik). Die Elution erfolgt in Phosphatpuffer pH 7,4. Lipoproteine werden durch kontinuierliche Zumisung von Cholesteroleagenz (CHOD-PAP, Boehringer) zum Eluat photometrisch nachgewiesen. Eine Teflonkapillare mit spezieller Geometrie (Strickliesel nach Engelhardt) gewährleistet eine optimale Durchmischung während der Inkubation.

**Ergebnisse.** Bei guter Reproduzierbarkeit erlaubt die Methode, VLDL, LDL und HDL voneinander abzutrennen. Vorteile gegenüber bisherigen Methoden sind geringe Probenvolumina unter Einsatz von nicht vorbehandeltem Serum, geringer Reagenzverbrauch und rasche Durchführbarkeit.

## Immunblotting des Apolipoprotein E nach isoelektrischer Fokussierung im immobilisierten pH-Gradienten

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

ApoE ist ligand zellulärer Lipoproteinrezeptoren und daher wesentlich am Katabolismus triglyceridreicher Lipoproteine beteiligt. Mittels isoelektrischer Fokussierung werden sechs Phänotypen dargestellt. Sie kommen durch Expression dreier alleler Gene  $\epsilon 4$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 2$  des ApoE Locus zustande. Man kennt je drei homozygote (E4/4, E3/3, E2/2) und heterozygote Phänotypen (E4/3, E4/2, E3/2). Das Allel  $\epsilon 4$  ist mit hohem, das  $\epsilon 2$  Allel mit niedrigem LDL-Cholesterin assoziiert. Dementsprechend beschleunigt  $\epsilon 4$  die Atheroskleroseentstehung, während  $\epsilon 2$  eher protektiv wirkt. Allerdings entwickeln etwa 5% Träger des E2/2 Phänotyps eine familiäre Hyperlipoproteinämie vom Typ III nach Fredrickson.

Die Analyse des ApoE Polymorphismus erfolgt derzeit mittels isoelektrischer Fokussierung der VLDL-Apolipoproteine. Dieses Vorgehen macht die Isolierung der VLDL mit präparativer Ultrazentrifugation notwendig und ist nur wenigen Laboratorien zugänglich. Die hier vorgeschlagene Methode erlaubt die Analyse des ApoE Polymorphismus aus Vollserum.

100 µl Serum werden zweimal mit je 10 ml Aceton: Ethanol (1:1 v/v) und einmal mit 10 ml Diethylether bei  $-20^{\circ}\text{C}$  delipidiert. Die Plasmaproteine werden in 400 µl 100 mM TRIS-HCl, pH 10,0, 10 mM Dithiothreitol, 1% Natriumdecylsulfat und 6 M Harnstoff gelöst. Immobilisierte Dry Plates pH 4–7 (LKB) werden in 8 M Harnstoff, 2 mM TRIS, 50 mM Dithiothreitol und 0,5% Servalyt 4–7 rehydratisiert. 30 µl delipidierte Probe werden mit 10 µl einer Ultradexsuspension (40 mg in 1 ml Servalyt 4–7) versetzt und direkt auf die Geloberfläche aufgetragen. Fokussierungsbedingungen: zunächst 400 V für 4 Std., dann 2500 V für 16 Std.,  $15^{\circ}\text{C}$ . Der Transfer auf eine Nylonmembran wird als Kapillarblot durchgeführt. Nach dem Blockieren (30 g/l Gelatine) werden die Membranen mit monospezifischem anti-ApoE als Erstantikörper und mit biotinyliertem Zweitantikörper inkubiert. Biotin wird schließlich mit einem Komplex aus Avidin und biotinylierter Peroxidase nachgewiesen.

Das Verfahren erlaubt die reproduzierbare Phänotypisierung des ApoE ohne Ultrazentrifugation. Sialoformen von ApoE können durch Vorinkubation der Proben mit Neuraminidase differenziert werden. Auf die Delipidierung kann nicht verzichtet werden. Elektroblothing hat gegenüber dem Kapillarblot keine wesentlichen Vorteile. Nylonmembranen binden ApoE besser als Nitrozellulose.

## Zur Bestimmung der HDL-Subfraktionen HDL<sub>2</sub> und HDL<sub>3</sub>: Ein Vergleich zwischen Polyanionenpräzipitation und Ultrazentrifugation

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

Zwischen der Konzentration der HDL und dem kardiovaskulären Risiko besteht eine negative Beziehung. Der kardioprotektive Effekt der HDL ist mit der Konzentration der HDL<sub>2</sub>, weniger dagegen mit den HDL<sub>3</sub> assoziiert. Die Bestimmung von HDL-Subfraktionen nach präparativer Ultrazentrifugation gilt als kostspielig und technisch anspruchsvoll. Daher wurden Präzipitationsmethoden zur Bestimmung von HDL-Subfraktionen ausgearbeitet. Einer dieser Ansätze wird hier einer eingehenden Bewertung unterzogen. Das Verfahren bedient sich zweier Polyethylenglykol (PEG) enthaltender Fällungsreagenzien A und B: Reagenz A fällt die ApoB enthaltenden Lipoproteine und beläßt die HDL im Überstand, Reagenz B fällt zusätzlich die HDL<sub>2</sub>. Als Referenzmethode dient die Ultrazentrifugation bei  $d_{20}^{\circ}\text{C} = 1,125 \text{ kg/l}$  nach Fällung der ApoB enthaltenden Lipoproteine mit Phosphowolframat/MgCl<sub>2</sub> (PhT/MgCl<sub>2</sub>).

HDL-C nach Fällung mit Reagenz A stimmt gut mit den im Überstand nach PhT/MgCl<sub>2</sub> Präzipitation gemessenen Werten überein ( $n = 375$ ;  $r = 0,89$ ). Im Vergleich mit der präparativen Ultrazentrifuge wird mit Reagenz B die Konzentration der HDL<sub>2</sub> um 33% zu niedrig ( $r = 0,65$ ) bestimmt. Damit fällt HDL<sub>3</sub> zu hoch aus ( $r = 0,66$ ). Variationskoeffizienten von Tag zu Tag ( $n = 21$ ) für den Präzipitationstest belaufen sich auf 5,8% (HDL-C), 10,1% (HDL<sub>2</sub>-C) 6,2% (HDL<sub>3</sub>-C).

Die Richtigkeit der Fällungsmethode wurde überdies an definierten Mischungen aus isolierten Lipoproteinfraktionen und lipoproteinfreiem Serum untersucht. Es zeigte sich, daß weder Reagenz A noch Reagenz B LDL quantitativ ausfällen. Reagenz A kopräzipitiert HDL<sub>2</sub>, wobei der kopräzipitierte Anteil von der Konzentration an HDL<sub>2</sub> abhängt. Reagenz B erfaßt HDL<sub>2</sub> nicht quantitativ und präzipitiert HDL<sub>3</sub>.

Der PEG-Präzipitationstest zur Bestimmung von HDL-Subfraktionen weist eine noch akzeptable Präzision von Tag zu Tag auf. Leider korrelieren die Ergebnisse nicht gut mit der präparativen Ultrazentrifugation und angesichts der Untersuchungen an gereinigten Lipoproteinen ist davon auszugehen, daß der Assay HDL-Subfraktionen liefert, die sich in ihren physikochemischen Eigenschaften von den HDL<sub>2</sub> und HDL<sub>3</sub>, wie sie in der Ultrazentrifuge gewonnen werden, deutlich unterscheiden.

## Radioimmunologische Bestimmung von Lipoprotein Lp(a) bei Patienten mit thromboembolischen Erkrankungen

M. Trommlitz<sup>1</sup>, W. März<sup>1</sup>, Sabine Cezanne<sup>1</sup>,  
Christine von Hayn<sup>1</sup>, Inge Scharrer<sup>2</sup> und W. Groß<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> Gustav-Embden-Zentrum für biologische Chemie und  
<sup>2</sup> Zentrum der Inneren Medizin, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main

Das Lipoprotein Lp(a) ähnelt in einer Reihe physikochemischer Eigenschaften den LDL. Sein Proteinanteil setzt sich aus ApoB-

100 und dem Apolipoprotein(a) zusammen, die durch eine oder mehrere Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Kürzlich wurde eine ausgeprägte Homologie der Gene für Apo(a) und Plasminogen nachgewiesen. In vitro hemmt Lp(a) die Aktivierung des Plasminogens durch Streptokinase, während die durch ADP und Adrenalin induzierte Thrombozytenaggregation verstärkt wird. Diese Befunde werfen die Frage auf, ob hohe Lp(a)-Konzentrationen ein gehäuftes Auftreten thromboembolischer Erkrankungen bedingen.

Hier wurde daher Lipoprotein Lp(a) bei 180 Patienten mit thromboembolischen Komplikationen bestimmt. Die Messungen wurden mit einem für Apo(a) spezifischen Sandwich-Radioimmunoassay vorgenommen.

Die im Patientenkollektiv beobachtete Häufigkeitsverteilung des Lp(a) unterscheidet sich praktisch nicht von der Verteilung bei Gesunden. Zwischen Lp(a) einerseits und funktionell sowie immunologisch bestimmten Plasminogenen andererseits besteht keine Korrelation.

Eine offensichtliche Beziehung zwischen der Plasmakonzentration des Lp(a) und der Inzidenz thrombotischer Erkrankungen ist demnach zur Zeit nicht erkennbar.

M 19

## Immunelektrophoretische Charakterisierung der Lipoproteinfamilien LpA, LpA-I und LpA-II im Humanplasma

W. März, Sabine Cezanne und W. Groß  
Gustav-Emden-Zentrum für biologische Chemie,  
Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main

Die High Density Lipoproteine (HDL) sind ein polydisperses System von Lipoproteinpartikeln. Sie dienen dem reversen Transport von Cholesterin aus peripheren Geweben zur Leber. HDL unterscheiden sich in physikochemischen Charakteristika wie Dichte, Partikelgröße und Molekulargewicht. Beim Stoffwechselgesunden besteht der Proteinanteil der HDL zu etwa 90% aus ApoA-I und ApoA-II. Bisher werden zwei Klassen Apolipoprotein A enthaltender Partikel beschrieben: Lipoproteine mit ApoA-I und ApoA-II (LpA) und Lipoproteine mit ApoA-I, jedoch ohne ApoA-II (LpA-I).

Hier werden ApoA enthaltende Lipoproteine in der zweidimensionalen Immunelektrophorese mit Zwischengelen untersucht. Dabei enthält die zweite Dimension monospezifische Antikörper gegen ApoA-I und ApoA-II in verschiedener Anordnung.

Neben den Lipoproteinen LpA und LpA-I werden in diesem System erstmals Lipoproteinpartikel mit ApoA-II, jedoch ohne ApoA-I nachgewiesen (LpA-II). LpA-II wird im normolipidämischen Plasma nur in Spuren angetroffen. Deutlich höhere Konzentrationen findet man dagegen bei Hypertriglyceridämie.

Etwa 80% des mit ApoA-I nicht assoziierten ApoA-II werden mit den HDL isoliert. Der Rest findet sich in der Fraktion  $d_{20}^{20} > 1,126$  kg/l. VLDL und LDL enthalten kein LpA-II. Durch geeignete Interposition weiterer monospezifischer Antikörper und im Immunblott kann gezeigt werden, daß LpA-II weder ApoB, ApoE, ApoC-II noch ApoC-III enthalten.

Es unterscheidet sich damit von einem Assoziat aus ApoA-II und ApoB wie wir es mit analoger Technik bei einem Patienten *Tangier Disease* nachweisen.

M 20

## Die Wirkung von niedermolekularem Heparin auf den Fettstoffwechsel chronischer Hämodialysepatienten

Y. Schmidt<sup>1</sup> und H. Schneider<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin  
<sup>2</sup> Nephrologische Abteilung im Zentrum für Innere Medizin,  
Kriegsbergstraße 60, Katharinenhospital, 7000 Stuttgart, FRG

Bei einer Gruppe von 22 chronischen Hämodialysepatienten, deren Dialysepflichtigkeit länger als 12 Monate betrug, wurde

das während der Dialyседauer benutzte Heparin durch das niedermolekulare Analogon für einen Zeitraum von 6 Monaten ersetzt. Vor Beginn der Umstellung wurden die Ausgangswerte ermittelt, mit denen die Resultate innerhalb und am Ende der Umstellungsperiode verglichen wurden. Nach Wiederumstellen auf konventionelles Heparin erfolgte eine nochmalige Kontrolle.

Dabei wurde festgestellt, daß sich hinsichtlich verschiedener Fettstoffwechselfparameter Verbesserungen ergaben. So fiel das Gesamtcholesterin signifikant ab, wobei dies hauptsächlich auf einen Abfall des LDL-Cholesterins zurückgeführt werden konnte. Gesamt-HDL-Cholesterin und die verschiedenen Subfraktionen blieben im wesentlichen unverändert. Begleitet wurde diese Veränderung von einem ebenfalls signifikanten Abfall der Apolipoproteine A1 und B. Apolipoprotein B sank während der 6monatigen Versuchsdauer konstant ab, wobei Apolipoprotein A1 innerhalb der ersten 2 Monate deutlich abfiel und sich dann auf einem gleichbleibenden Niveau stabilisierte. Die Triglyzeride stiegen innerhalb der ersten 2 Monate signifikant an und fielen dann bis zum Ende der Versuchsperiode auf den Ausgangswert zurück.

So ergibt sich der Schluß, daß der Einsatz von niedermolekularem Heparin während der Dialyse zu einer Besserung der Fettstoffwechselfparameter beiträgt und so den Risikoquotienten mindert.

M 21

## Trockenchemische Bestimmung von Liquorprotein (CSFP) mit dem Kodak Ektachem 700 XR

G. Steinbach, Sabine König\* und V. Maier  
Zentrale Einrichtung Klinische Chemie des Klinikums  
der Universität Ulm und  
\* KODAK AG, Stuttgart

In den Notfalllaboratorien des hiesigen Klinikums arbeiten zwei Kodak Ektachem 700 XR-Analysatoren rund um die Uhr.

Die Korrelationen zu Serumproben, die mit dem Hitachi 717 (Boehringer Mannheim) gemessen wurden, sind hervorragend.

Inzwischen wurde von Kodak ein Test für die Bestimmung von Liquorprotein (CSFP) eingeführt.

Das Testprinzip basiert auf einer modifizierten Biuret-Reaktion. Diese beruht auf der bevorzugten Bindung von Cu-Ionen an Proteine im Vergleich zur komplexen Bindung an einen Azofarbstoff.

Die Bildung des Biuret-Komplexes wird verfolgt durch die Abnahme der Absorption des Kupfer-Azo-Farbkomplexes bei 670 nm.

Die Charakteristika für diese Bestimmung sind folgende:

- Probenvolumen: 10 µl unverdünnter Liquor.
- Meßbereich: 5 bis 300 mg/dl.
- Präzision innerhalb eines Laufes: Bei 49 mg/dl 3,3%, bei 150 mg/dl 1,7% und bei 362 mg/dl 1,0% VK.
- Der Korrelationskoeffizient zwischen ACA (DuPont) und dem Ektachem (Kodak) beträgt  $r = 0,986$  ( $n = 48$ ).

Bei dem Vergleich mit der Coomassie-Phosphorsäure-Methode von Biomed ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von  $r = 0,989$  ( $n = 48$ ).

Bis heute konnten keine Interferenzen gefunden werden.

In der Praxis hat sich diese Methode aufgrund ihrer Einfachheit, ihres besonders kleinen Probenvolumens und ihrer sehr schnellen Durchführung außerordentlich bewährt.

Der Einsatz der Trockenchemie erscheint ideal für Notfalllaboratorien und wird auch in die Routineanalytik Einzug halten.

## Albumin/Präalbumin-Quotient zur Diagnostik der Liquorrhoe

J. Bohner und W. Hesse  
 Institut für Laboratoriumsmedizin der Städtischen Kliniken  
 Fulda

Liquorfisteln können sich als Oto- oder Rhinoliquorrhoe manifestieren. Die diagnostischen Empfehlungen zum Nachweis einer Liquorrhoe reichen von grob-informativen Verfahren (Taschentuchtest) über eine quantitative Glukose- und Eiweißbestimmung im Sekret bis zu den invasiven Methoden der Liquormarkierung mit Hilfe von radioaktiven Isotopen oder Farbstoffen wie Fluorescein. Neuerdings wird der Immunelektrophoretische Nachweis des liquorotypischen  $\beta_2$ -Transferrins zur Identifizierung von Liquor vorgeschlagen (1). Alternativ zu diesem arbeits- und zeitaufwendigen Verfahren haben wir den Albumin/Präalbumin-Quotienten auf seine Eignung in der Liquorrhoe-Diagnostik geprüft.

Die quantitative Bestimmung der Albumin- und Präalbumin-Konzentrationen in Liquor (L) und Serum (S) erfolgte nephelometrisch (Behring Nephelometer-Analyser) mit Antiseren der Firma Behring. Bei einem Probenbedarf von insgesamt 150  $\mu$ l (L) bzw. 100  $\mu$ l (S) für eine simultane Bestimmung von Präalbumin und Albumin sind beide Proteine exakt und mit hoher Präzision (Variationskoeffizienten von 2 bis 5%) innerhalb von 20 min bestimmbar.

Der im Liquor ermittelte Albumin/Präalbumin-Quotient liegt im Bereich von 5 bis 29. Serum oder seröse Flüssigkeiten sind demgegenüber durch einen Albumin/Präalbumin-Quotienten von  $\geq 85$  charakterisiert.

Nach den uns bisher vorliegenden Erfahrungen ist die diagnostische Wertigkeit des Albumin-Präalbumin-Quotienten im Vergleich zum  $\beta_2$ -Transferrinnachweis wie folgt zu bewerten:

1. Liquor ist durch den Albumin/Präalbumin-Quotienten eindeutig identifizierbar (keine falsch-positiven Resultate!); falsch-negative Ergebnisse sind durch Beimengungen von Blut oder Nasensekret möglich.
2. Der Albumin/Präalbumin-Quotient basiert auf quantitativen Proteinbestimmungen. Im Gegensatz zum qualitativen  $\beta_2$ -Transferrinnachweis erfordert seine Interpretation keine spezielle Erfahrung.
3. Gegenüber dem  $\beta_2$ -Transferrin ist der Albumin/Präalbumin-Quotient einfach und schnell zu bestimmen. Im Bedarfsfall ist er deshalb auch im Bereitschaftsdienst durchführbar.

### Schrifttum:

1. OBERASCHER, G., ARRER, E.: Immunologische Liquordiagnostik mittels  $\beta_2$ -Transferrin - Grundlagen und Methodik. *Laryng. Otol.* 65, 158-161 (1986).

## Vergleich der colorimetrischen naß- und „trockenchemischen“ Magnesiumbestimmung mit den Ergebnissen der Atomabsorptionsspektrometrie

A. M. Marx, R. Eckle und A. M. Gressner  
 Abteilung für Klinische Chemie und Zentrallabor Klinikum der Universität Marburg, Baldingerstraße, 3550 Marburg

Zur Bestimmung der Serum-Mg-Konzentration werden neben der als Referenzmethode angesehenen Atomabsorptionsspektrometrie verschiedene photometrische Verfahren eingesetzt (1-4). In der vorliegenden Untersuchung wurden die Xylidyl-Blau-Methode ohne Enteiweißung (3) der Firma Wako unter Verwendung eines Cobas-Bio Zentrifugal-Analysators (Hoffmann/La Roche) und die von der Firma Kodak entwickelte, auf einen Formazan-Derivat basierende trockenchemische Be-

stimmung mit dem Kodak Ektachem 700 XR-Analysator mit der Atomabsorptionsspektrometrie verglichen. Beide photometrischen Verfahren basieren auf der Bestimmung eines sich ausbildenden Mg-Farbstoff-Komplexes und wurden nach unserem Wissen bisher nicht miteinander verglichen. Durch Aufstockung bzw. Verdünnung eines Serumpools wurden Proben mit Mg-Konzentrationen zwischen 0,26 mmol/l und 3,04 mmol/l hergestellt. Die konventionelle Xylidyl-Blau-Methode (konv. Meth.) war linear bis 1,8 mmol/l, die Kodak-Methode (Kodak Meth.) bis 3,02 mmol/l und die Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) bis 20 mmol/l. Innerhalb einer Serie von 22 Proben ergab sich für die konv. Meth. bei 3 verschiedenen Konzentrationen ein durchschnittlicher Variationskoeffizient (VK) von 3,4% (1,44 mmol/l: 1,6%, 0,8 mmol/l: 3,3% und 0,29 mmol/l: 5,3%). Bei den gleichen Proben erreichte die Kodak Meth. einen mittleren VK von 1,5% (1,44 mmol/l: 0,5%, 0,78 mmol/l: 1,4% und 0,32 mmol/l: 2,6%). Für die AAS wurde ein VK von 1,4% (1,36 mmol/l: 1,3%, 0,80 mmol/l: 1,02% und 0,28 mmol/l: 1,8%) ermittelt. Innerhalb eines Untersuchungszeitraumes von 2 Wochen lag für diese Proben der VK von Tag zu Tag für die konv. Meth. bei 1,6%, 4,4% und 3,9% (Mittel: 3,3%) und für die Kodak Meth. bei 0,8%, 1,7% und 1,5% (Mittel: 1,3%). Die in unserem Labor routinemäßig eingesetzte AAS hat bei einer Konzentration von 1,45 mmol/l einen VK von 1,6% von Tag zu Tag und bei einer Konzentration von 0,93 mmol/l einen VK von 2,7%. Für eine direkte Korrelation wurden 150 Patientenproben (Mg-Konzentrationen zwischen 0,46 mmol/l und 1,28 mmol/l, normalverteilt) mit allen 3 Methoden bestimmt. Die lineare Regressionsanalyse ergab folgende Werte:

y: AAS; x: Konv. Meth.:  $y = 0,912x + 0,046$ ;  $r = 0,942$ .

y: AAS; x: Kodak Meth.:  $y = 0,959x + 0,029$ ;  $r = 0,952$ .

y: Kodak Meth.; x: Konv. Meth.:  $y = 0,872x + 0,086$ ;  $r = 0,907$ .

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß sich beide photometrische Verfahren als sehr praktikabel erwiesen haben. Die Kodak-Methode war der Xylidyl-Blau-Methode wegen des niedrigeren VK und der höheren Linearitätsgrenze allerdings überlegen. Beide Methoden zeigen eine gute Korrelation mit der AAS während ein Vergleich der beiden photometrischen Verfahren nur eine mäßige Korrelation ergab.

### Schrifttum:

1. KÜLPMANN, W. R., RUSCHKE, D., BÜTTNER, J., PASCHEN, K.: *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 27, 33-39 (1989).
2. TSANG, W. M., HOWELL, M. J., MILLER, A. L.: *Ann. Clin. Biochem.* 25, 162-168 (1988).
3. MANN, C. K., YOE, J. H.: *Anal. Chem.* 28, 202-205 (1956).
4. FALCK, M., CEPELNIK, E.-M., RICK, W.: *Internist* 30, 51-56 (1989).

## Erfahrungen mit der mechanisierten Auswertung von Urineststreifen im Hinblick auf Praktikabilität und Vergleichbarkeit der Ergebnisse

A. M. Marx, J. Kropf und A. M. Gressner  
 Abteilung für Klinische Chemie und Zentrallabor, Klinikum der Universität Marburg, Baldingerstraße, 3550 Marburg

Geräte zur mechanisierten Auswertung von Urin-Teststreifen sollen aufgrund standardisierter Inkubations- und Meßbedingungen zuverlässigere und besser reproduzierbare Ergebnisse liefern. Die analytische Zuverlässigkeit dieser Geräte wurde bereits in vielen Evaluationen überprüft. Wir haben untersucht, ob durch den Einsatz mechanisierter Teststreifenauswertung an sich tatsächlich eine Verbesserung der Urinanalytik möglich ist. Es sollte dabei der Objektivität und Vergleichbarkeit der Ergebnisse und einer möglichen Beschleunigung der Analysen besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden. Hierzu haben wir drei auf dem Markt befindliche Geräte (Rapimat® II/T der Behringwerke AG, Urotron® RL9 der Firma Boehringer Mannheim GmbH und Clinitek® 200 von Ames/Bayer Diagnostic) mit der in unserem Labor routinemäßig durchgeführten visuellen Auswertung des Combur®-Teststreifens (Boehringer Mannheim GmbH) verglichen. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde durch wie-

derholte Analyse (n = 10) von drei Kontrollurinen (Kova®Trol I-III, Madaus) bestimmt. Die Unpräzision der mechanisierten Teststreifen-Auswertung lag zwischen 3% und 11,9% und lag damit im gleichen Bereich wie bei der visuellen Auswertung (4,5%). Die Vergleichbarkeit der erhaltenen Ergebnisse wurde durch parallele Analyse von Urinproben des Routine-Labors untersucht. Bei allen Parametern zeigte sich für ein- und dasselbe Probenkollektiv eine stark voneinander abweichende Häufigkeitsverteilung der „semiquantitativen“ Ergebnisse. Selbst die Beschränkung auf die Häufigkeiten aller positiven Teststreifenergebnisse ergab signifikante Unterschiede (Chi<sup>2</sup>-Test, p < 0,001 – 0,05). Erstaunlicherweise zeigten visuelle Teststreifenanalysen durch zwei Mitarbeiter keinen signifikanten Unterschied. Unter Bezug auf die mikroskopische Sedimentuntersuchung wurden pathologische Urine mit einer Sensitivität/Spezifität von: 0,85/0,84 (Urotron) 0,91/0,67 (Rapimat), 0,82/0,81 (Clinitest), 0,88/0,67 (1. Visuelle Analyse) und 0,91/0,93 (2. Visuelle Analyse) nachgewiesen. Auch im Hinblick auf die Analysengeschwindigkeit zeigt sich kein deutlicher Vorteil der mechanisierten gegenüber der visuellen Teststreifenanalyse.

Zusammenfassend konnten wir die von der mechanisierten Urin-teststreifen-Auswertung erwarteten Verbesserungen in der Urin-analytik nicht feststellen. Die geringe Vergleichbarkeit der Ergebnisse dürfte unserer Meinung nach in der „semiquantitativen“ Ergebnisausgabe und der schlechten Kalibrierbarkeit der Geräte begründet sein. Es sind kaum Aussagen zu Rationalisierungsmöglichkeiten des Urinlabors durch die getesteten Geräte möglich. Die reine Meßzeit für einen Teststreifen wird gegenüber dem Zeitbedarf einer MTA nicht verkürzt. Eine Entlastung bei paraanalytischen Tätigkeiten wie Ergebnisdokumentation oder Probenidentifizierung läßt sich kaum beurteilen, da sie von der jeweiligen Organisation des Urinlabors vor dem Einsatz eines solchen Gerätes abhängen. Bei Einbindung der getesteten Analysatoren in ein Labor-EDV-System ist eine Absenkung des Arbeitsaufwandes z. B. durch die On-Line-Übertragung der Ergebnisse jedoch denkbar.

M 25

## Einfache photometrische Bestimmung von Carboxyhämoglobin und Methämoglobin durch Mehrwellenlängenmessung

B. Carl<sup>1</sup>, H. Kaehler<sup>2</sup> und R. Schlegel<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dr. Bruno Lange GmbH, Berlin, Chemie-Entwicklung

<sup>2</sup> Zentrallabor, Krankenhaus Neukölln, Berlin

Für das Dr. Lange Spektralphotometer LS 500 wurde ein einfaches und schnelles direktphotometrisches Verfahren zur Bestimmung des Carboxyhämoglobins (COHb), des Methämoglobins (MetHb) und des Gesamthämoglobins (THb) im Vollblut entwickelt, das auf einer Messung bei 9 Wellenlängen basiert. Auswertung und Ergebnisberechnung erfolgen über ein Programm mit gerätespezifischen Faktoren, die aus den Extinktionskoeffizienten der einzelnen Hämoglobine mit Hilfe eines Matrizenprogramms für die Multikomponentenanalyse (MCA) ermittelt wurden. Das Photometer wird mit einem neu entwickelten COHb/MetHb-Standard kalibriert.

Zur Messung wird die mit einer Hämolyselelösung verdünnte Blutprobe (10 µl) eingesetzt. Das Ergebnis (% COHb + THb in g/dl bzw. % MetHb + THb in g/dl) wird sofort ausgedruckt.

Die Methode ist im Bereich von 0 bis 100% COHb bzw. MetHb linear. Es wurden die VK-Werte in der Serie und von Tag zu Tag in verschiedenen Konzentrationsbereichen bestimmt.

COHb

i. d. Serie: VK = 2,3% (X = 2,24% COHb); VK = 0,5% (X = 58,3% COHb)

Tag zu Tag: VK = 1,3% (X = 60,8% COHb)

MetHb

i. d. Serie: VK = 5,8% (X = 1,69 MetHb); VK = 0,83% (X = 26,8% MetHb)

Tag zu Tag: VK = 2,4% (X = 26,8% MetHb)

Der Methodenvergleich mit dem CORNING CO-Oximeter 2500 ergab eine gute Korrelation sowohl für COHb ( $y = 0,950x + 0,494$ ) als auch für MetHb ( $y = 1,035x - 0,259$ ). Die MetHb-Bestimmung am LS 500 wurde zusätzlich mit der Evelyn-Malloy-Methode verglichen ( $y = 1,020x - 0,828$ ).

Schrifttum:

ZWART, A., VAN KAMPEN, E. J., ZIJLSTRA, W. G.: Results of Routine Determination of Clinically Significant Hemoglobin Derivatives by Multicomponent Analysis. Clin. Chem. 32, 972 (1986)

M 26

## Eine einfache und schnelle enzymatische Bestimmung von L-Phenylalanin im Serum mit einer L-Phenylalanin-Dehydrogenase

U. Wendel<sup>1</sup>, W. Hummel<sup>2</sup> und U. Langenbeck<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Kinderklinik

<sup>2</sup> Institut für Enzymtechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

<sup>3</sup> Institut für Humangenetik, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main

Bestimmungen von L-Phenylalanin im Serum sind zur Diagnose der Phenylketonurie sowie zur Überwachung der Diättherapie erforderlich. Sie erfolgen überwiegend durch fluorimetrische Methoden, durch Austauschchromatographie (Aminosäureanalyser) oder HPLC. Enzymatische Bestimmungsmethoden (unter Einsatz von L-Aminosäure-Oxidase, Phenylalanin-Ammonialyase oder L-Phenylalanin-Oxidase) finden bisher in der Praxis keine Anwendung. Ausgehend von einer enzymatischen Bestimmungsmethode für Phenylalanin unter Verwendung einer L-Phenylalanin-Dehydrogenase [Hummel, W., Schütte, H., Kula, M. R., Anal. Biochem. 170, 397–401 (1988)] wurde ein einfacher, schneller und präziser colorimetrischer Test zur Phenylalaninbestimmung im Serum für den routinemäßigen Einsatz entwickelt. Dabei wurde die Reaktion einer L-Phenylalanin-Dehydrogenase [L-Phenylalanin:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase (deaminierend)] aus *Rhodococcus* sp. M 4 mit einem INT/Formazan-System gekoppelt und die Formazanbildung über die Adsorptionsänderung bei 492 nm verfolgt. In einem kinetischen Test war der Reaktionsablauf bei 21 °C über mehr als 30 min linear. Die Analyse der entweißten Überstände von Standardlösungen von Phenylalanin in Precinorm S ergab eine lineare Beziehung zwischen der  $dA_{\text{Formazan}}/30 \text{ min}$  und der Substratkonzentration über einen Bereich von 30–1200 µmol/l. Die Präzision betrug 2,3–5,5%, die Wiederfindung lag zwischen 98 und 103%. Interferenzen durch Tyrosin, Phenylpyruvat, Pyruvat und Ascorbat in klinisch relevanten Konzentrationen waren nicht nachzuweisen. Die enzymatisch-colorimetrisch bestimmten Phenylalaninkonzentrationen in Serumproben von Phenylketonurikern stimmten sehr gut mit den säulenchromatographisch bestimmten Werten überein. Diese einfache colorimetrische Methode eignet sich auch zur Messung von Phenylalanin in Kapillarblut und Blut auf Filterpapierträgern und kann automatisiert werden.

M 27

## Standardisierung einer chromatographischen Methode zur spezifischen und empfindlichen Histaminbestimmung

F. Asskali und H. Förster

Experimentelle Anaesthesiologie, Universität Frankfurt

Histamin ist ein biogenes Amin, welches in Gewebsmastzellen und in basophilen Leukozyten gebildet und dort in großen Mengen gespeichert wird. Biologisch aktiv ist jedoch nur das im Plasma in sehr niedrigen Konzentrationen um 0,5 ng/ml frei vorhandene Histamin. Die quantitative Erfassung von solchen niedrigen Konzentrationen bereitete bislang analytische Schwierigkeiten. Wir haben eine chromatographische Methode zur spezifi-

schen und hochempfindlichen Bestimmung von Histamin in Körperflüssigkeiten standardisiert.

Die unmittelbar nach Entnahme eisgekühlten Li-Heparin-Plasma-Proben werden spätestens 30 min nach Entnahme enteiweißt und mit einem internen Standard (Aza-heptamethylen-diamin) versetzt. Die Vorreinigung der enteiweißten Proben (zur Abtrennung der Aminosäuren) erfolgt durch Säulenchromatographie auf Ionenaustauscherharz (Dowex 50 x 8). Nach Aufkonzentrieren wird die Probe über eine analytische Ionenaustauscher-Säule erneut chromatographisch aufgetrennt. Die Detektion erfolgte fluorometrisch nach mit 0-Phthalaldehyd ohne Zusatz von Mercaptoethanol. Eine Potentierung der Fluoreszenz wird durch Ansäuern mit Phosphorsäure erreicht. Die Linearität wurde über einen Bereich von 1–100 pmol/ml geprüft. Die Abweichung von Tag zu Tag lag unter 5%. Zur Aufstellung eines Normalbereiches für Plasma und für Bluthistamin bei Gesunden und bei Patienten wurden zwei Kollektive gebildet. Das eine Kollektiv bestand aus gesunden jungen Männern und Frauen von 20 und 35 Jahren. Das zweite Kollektiv bildeten Patienten der Intensivpflege-Station. Die Werte von Plasmahistamin liegen bei  $0,38 \pm 0,12$  ng/ml mit einem Medianwert von 0,365 ng/ml. Bei den Intensivpflege-Patienten liegt das Plasmahistamin in einem Bereich von 0,48 ng/ml. Für das Bluthistamin wurden bei Gesunden Konzentrationen von 50–200 ng/ml gemessen, während bei den untersuchten Patienten sehr niedrige Werte gefunden wurden, die z. T. mit denen des Plasmas identisch waren.

M 28

## Thiamin- und Pyridoxinkonzentrationen im Serum bei Patienten: HPLC-Analytik und Untersuchung bei 200 Patienten mit verschiedenen Krankheitsbildern

A. Schnier, F. Susanto, S. Humfeld und H. Reinauer  
Abt. für klinische Biochemie des Diabetes-Forschungsinstitutes an der Universität Düsseldorf,  
Auf'm Hennekamp 45, 4000 Düsseldorf 1

In einer gemeinsamen Studie mit der klinischen Abteilung des Diabetesforschungsinstitutes sowie der neurologischen und der gastroenterologischen Abteilung der Universität Düsseldorf werden Vitaminanalysen bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen sowie bei gesunden Personen und Vegetariern durchgeführt.

Diese Arbeit beschreibt die Analytik von Thiamin und Pyridoxin im Serum mit Hilfe von Hochdruckflüssigkeitschromatographie und Fluoreszenzdetektion. Untersucht wurden Typ I- und Typ II-Diabetiker, M. Crohn-Patienten, chronische Alkoholiker, Epileptiker sowie gesunde Probanden und Vegetarier. Die Isolation von Pyridoxin aus dem Serum erfolgt über eine flüssig-flüssig-Extraktion im sauren Medium, nach Denaturierung und Fällung des Proteins.

Nach einem weiteren Reinigungsschritt mit Diethylether wird die Probe im Laufmittel aufgenommen und direkt in die HPLC injiziert.

Dagegen muß Thiamin vor der Extraktion zu Thiochrom oxidiert werden, um eine empfindliche Fluoreszenzdetektion zu ermöglichen. Als Extraktionsmittel dieser hydrophilen Vitamine ist Isobutanol sehr gut geeignet. Für die Bestimmung von Pyridoxin werden Phosphatpuffer und Acetonitril, für Thiamin Diisopropylether und Methanol als Laufmittelgemisch verwendet. Als stationäre Phasen dienen Nucleosil C<sub>18</sub> für Pyridoxin und eine NH<sub>2</sub>-Säule für Thiamin. Die Richtigkeit und Präzision beider Verfahren wurde überprüft und die gewonnenen Analysenwerte werden diskutiert.

Schrifttum:

HOLLINS, B., HENDERSON, J. M.: J. Chromatogr. 380, 67–75 (1986).  
WEBER, W., KEWITZ, H.: Eur. J. Clin. Pharmacol. 28, 213–219 (1985).

M 29

## Hochdruckflüssigkeitschromatographische Bestimmung von Mezlocillin im Plasma

S. Humfeld, F. Susanto, B. Schmidt und H. Reinauer  
Abteilung für klinische Biochemie des Diabetes-Forschungsinstitutes an der Universität Düsseldorf  
Auf'm Hennekamp 65, 4000 Düsseldorf 1

Mezlocillin (BAYPEN) ist ein ringförmiges Acylureido-Penicillin mit einem breiten Wirkungsspektrum sowohl im grampositiven als auch im gramnegativen Bereich. Eine besonders hohe Wirksamkeit ist gegenüber Pseudomonas aeruginosa nachgewiesen.

Diese Arbeit beschreibt eine einfache hochdruckflüssigkeitschromatographische Methode, mittels UV-Detektion, zur Bestimmung von Mezlocillin im Serum unter Verwendung von Azlocillin als interner Standard.

Die Probenvorbereitung für eine Analyse mit der Hochdruckflüssigkeitschromatographie benötigt keine Derivatisierungsschritte. Die Extraktion erfolgt mit dem Baker SPE-System bei pH 7,2 über einen Anionen-Austauscher (Baker SPE-Trennsäule: quaternäres Amin). Der Vorteil dieser Säulenextraktion liegt darin, daß sich das erhaltene Eluat, ohne weitere Reinigungsschritte, zur Direktaufgabe in das HPLC-System eignet.

Die Serumkonzentrationen, nach i.v.-Injektion von 2 g Mezlocillin, wurden durch Untersuchungen an einem Patientenkollektiv bestimmt.

Die mittleren Serumspiegel lagen eine halbe Stunde nach Bolus-Injektion zwischen 141 mg/l und 116 mg/l und nach 4 Std. noch zwischen 13 mg/l und 18 mg/l. Die Serumhalbwertszeit von Mezlocillin beträgt nach i.v.-Gabe etwa 57 min.

Für die Untersuchung der Präzision dienten aufgestockte, medikamentenfreie Plasma- und Urinproben (n = 90) im Konzentrationsbereich von 10–1000 mg/l. Es ergab sich ein durchschnittlicher Variationskoeffizient von 3,8% für die Plasmaanalysen bzw. 3,9% für die Urinbestimmungen.

Bei der Überprüfung der Präzision von Tag zu Tag lagen die V<sub>k</sub>-Werte bei 5,8%.

Die Nachweisgrenze betrug 50 µg/l Serum, die Wiederfindungsrate lag im Durchschnitt bei 96,8%.

Schrifttum:

KNOTHE, H.: Arzneim.-Forsch. 29 (II), 1916–1920 (1979).

M 30

## Ein HPLC-Analysensystem zur vollautomatischen Bestimmung glykierter Hämoglobine

B. Wilmers<sup>1</sup>, K.-S. Boos<sup>1</sup> und R. Sauerbrey<sup>2</sup>  
<sup>1</sup> Laboratorium für Biologische Chemie, Universität Paderborn, D-4790 Paderborn, Postfach 1621  
<sup>2</sup> E. Merck, D-6100 Darmstadt, Postfach 4119

Glykierte Hämoglobine entstehen in den Erythrozyten durch eine nicht-enzymatische Reaktion zwischen freien Aminogruppen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globulinketten des Hämoglobins und Glucose. Ihre Bildungsreaktion verläuft über zwei Stufen: in einem ersten Reaktionsschritt entsteht eine labile Schiff'sche Base (Aldimin), die durch eine langsam ablaufende Konversion (Amadori-Umlagerung) das stabile Ketoamin bildet. Die glykierten Hämoglobine sind eine wichtige Kenngröße zur Überprüfung der Diabetes-Mellitus-Therapie.

Die chromatographische Bestimmung der glykierten Hämoglobine kann prinzipiell über zwei unterschiedliche Verfahren erfolgen:

1. durch ladungsabhängige Methoden, bei denen die  $\beta$ -N-terminal glykierten Hämoglobinfraktionen (HbA<sub>1c</sub>) von dem nicht glykierten Hämoglobin auf Kationenaustauschern abgetrennt werden,

2. durch glykierungsspezifische Affinitätschromatographie mit Aminophenylboronsäure als Affinitätsliganden.

In Abhängigkeit von der chemischen Struktur des Trägermaterials als auch der Austauscherguppen können mit Kationenaustauschern unterschiedliche Fraktionen glykierter Hämoglobine (HbA<sub>1a</sub>, HbA<sub>1b</sub>, HbA<sub>1c</sub>) und andere Hämoglobinvarianten (z. B. HbF) aufgetrennt werden. Nachteile solcher Bestimmungsmethoden sind die starke pH-Abhängigkeit der Trennung und analytische Interferenzen. So können am β-N-Terminus carbamylierte bzw. acetylierte Hämoglobine oder labiles HbA<sub>1</sub> (Aldimin) mit der stabilen HbA<sub>1</sub>-Fraktion coeluiieren (1).

Durch die Verfahren der Affinitätschromatographie wird der Gesamtgehalt an glykiertem Hämoglobin (Glycohäemoglobin) bestimmt, d. h. nicht nur die Glykierung am N-Terminus der β-Globulinketten, sondern auch die entsprechende Glykierung der α-Globulinketten und einiger ε-Aminogruppen. Interferenzen sind bei dieser Bestimmungsmethode durch andere Hämoglobinvarianten (z. B. HbF), Hämoglobinmodifizierungen (Carbamylierung, Acetylierung) und durch Aldimine nicht nachweisbar.

Das in dieser Arbeit vorgestellte Hochleistungs-Affinitätschromatographische Analysenverfahren zur Bestimmung glykierter Hämoglobine beruht auf der Immobilisierung von 3-Aminophenylboronsäure (Belegungsgard 300–400 μmol/g Gel) an ein mechanisch und chemisch stabiles Polyacrylamid-Copolymer. Unter leicht alkalischen Bedingungen werden die Glycohäemoglobine durch Ausbildung zyklischer Ester zwischen den coplanaren cis-Diolgruppen der Glucosereste und den Boronatationen chemoselektiv retiniert, um nach saurer Hydrolyse der Ester von der Affinitätsphase zu eluieren.

Das Analysenverfahren ist automatisiert und erlaubt die routinemäßige Bestimmung von mehr als 1000 Hämolytaten mit einer Affinitäts säule, bei einer Analysenzeit von 15 min, inklusive der Rekonditionierung der Affinitätsphase. Das Analysensystem verfügt über eine ausgezeichnete Spezifität und Präzision. Die Intra- und Interassay-Varianzen sind weitgehend unabhängig vom Gehalt an glykiertem Hämoglobin und liegen zwischen 2,3% und 3,2%. Die Bestimmung des Glycohäemoglobins wird durch hohe Konzentrationen an Glucose und Aldimine nicht beeinflusst. Ein Methodenvergleich mit einem Bestimmungsverfahren auf der Basis der Hochleistungs-Ionenaustauschchromatographie (2) (Bestimmung von HbA<sub>1c</sub>) ergab eine zufriedenstellende Korrelation ( $y = 1,185x + 1,299$ ;  $r = 0,956$ ) zwischen den bestimmten HbA<sub>1c</sub>-Werten und dem Anteil an Glycohäemoglobin. Die Werte, die mittels Hochleistungs-Affinitätschromatographie (HPAC) gemessen werden, liegen durchschnittlich um 2,8%-Punkte höher als die HbA<sub>1c</sub>-Werte, wobei die Differenzen mit steigendem Anteil an glykiertem Hämoglobin zunehmen. Aufgrund der Erfassung des Gesamtanteils glykierter Hämoglobine erstreckt sich der Normalbereich bei der beschriebenen HPAC-Methode von 7% bis 10%. Das Analysenverfahren verfügt im Vergleich zur Ionenaustauschchromatographie über eine höhere Sensitivität, d. h. es gestattet eine bessere Differenzierung zwischen Normalwerten und pathologischen Werten.

Schrifttum:

1. FLÜCKIGER, R., MORTENSEN, H. B.: *J. Chromatogr.* 429, 279–292 (1988).
2. SIVORINOVSKY, G., BARTLING, D., KEENAN, D., TANAKA, S.: *BIO-RAD Laboratories*, Wright Ave. Richmond (USA).

M 31

## Absorptionsspektrometrische Ketoisocapronat-Bestimmung mit D-2-Hydroxyisocapronat-Dehydrogenase aus *Lactobacillus casei*

P. Schadewald<sup>1,2</sup>, W. Hummel<sup>3</sup> und U. Wendel<sup>4</sup>  
<sup>1</sup> Diabetes Forschungsinstitut, <sup>2</sup> Institut für Physiologische Chemie II, <sup>3</sup> Institut für Enzymtechnologie und <sup>4</sup> Kinderklinik, Universität Düsseldorf

Bei der Ahornsirupkrankheit akkumulieren die drei verzweigt ketigen Amino- und ihre 2-Oxosäuren. Ketoisocapronat ist wahrscheinlich die einzige 2-Oxosäure mit (neuro)toxischer Wirkung (1, 2). Die Bestimmung dieses Metaboliten war bisher nur mit aufwendigen analytischen Methoden (GC, HPLC) möglich (3).

Wir haben unter Verwendung einer aus *Lactobacillus casei* ssp. pseudoplatarum isolierten, weitgehend Ketoisocapronat-spezi-

fischen, NAD<sup>+</sup>-abhängigen Dehydrogenase, einen einfachen, schnellen UV-Test entwickelt. Das Prinzip beruht auf der kinetischen Messung der Abnahme der NADH-Absorption bei 334 nm nach Enzymzusatz. Die Proben wurden durch Säurefällung, Zentrifugation und Neutralisation des Überstandes vorbereitet. Die Auswertung erfolgte anhand von mitgeführten Standards. Im Bestimmungsansatz ( $d = 1 \text{ cm}$ , 25°C) war die initiale  $\Delta A/\text{min}$  bei Einsatz von 15 mU Enzym/ml im Bereich von 6–36 nmol/ml linear mit der Ketoisocapronat-Konzentration korreliert. Der Variationskoeffizient betrug 5% in der Serie und 10% von Tag zu Tag ( $n = 30$ ; 0,2–0,8 mM Ketoisocapronat im Plasma, 6 Konzentrationen). Die Wiederfindung war  $98 \pm 5\%$  ( $n = 10$ ). Bei Erhöhung der Enzymaktivität liegt die Nachweisgrenze für Ketoisocapronat im Plasma  $< 0,01 \text{ mM}$ . In physiologischen Proben traten Störungen durch andere 2-Oxosäuren nur in Ausnahmefällen auf (Ketoisocapronat  $<$  Ketoisovalerianat).

Zur Überprüfung der enzymatischen wurde eine HPLC-Methode (3) als Referenzmethode verwandt. Bestimmung in 24 Plasmen ahornsirupkranker Patienten ergab eine gute Übereinstimmung beider Methoden ( $y = 0,92x + 0,01$ ,  $r = 0,998$ ).

Schrifttum:

1. TANAKA, K., ROSENBERG, L. E.: Disorders of branched-chain amino acid and organic acid metabolism. In: STANBURY, J. B., WYNGAARDEN, J. B., FREDRICKSON, D. S., GOLDSTEIN, J., BROWN, M. S. (eds.) *The metabolic basis of inherited disease*. MacGraw-Hill, New York, pp. 440–473 (1983).
2. LANGENBECK, U.: Pathobiochemical and pathophysiological analysis of the MSUD phenotype. In: ADIBI, S. A., FEKL, W., LANGENBECK, U., SCHAUDER, P. (eds.) *Branched chain amino and keto acids in health and disease*. Karger Verlag, Basel, New York, pp. 315–344 (1984).
3. RADECK, W., BECK, K., STAIB, W.: Simple method for rapid quantification of branched-chain 2-oxo acids in physiological fluids as quinoxalinol derivatives by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 432, 297–301 (1988).

M 32

## Analyse einer Medikamentenintoxikation

M. Erdweg, H. A. Weinand und M. Hoffmann  
Institut für Hygiene und Laboratoriumsmedizin der  
Städtischen Krankenanstalten Krefeld  
(Direktor: Prof. Dr. med. H. Finger)

Bei schweren Intoxikationen durch Medikamente sind Barbiturate auch heute noch überproportional häufig vertreten. Neben der langsamen Elimination, das gilt besonders für die lipophilen Barbituratsubstanzen, ist für den Verlauf und die Prognose einer Intoxikation die synergistische Wirkung z. B. mit Alkohol oder mit anderen Medikamenten entscheidend. Für die gezielte Durchführung einer optimalen klinischen Therapie ist eine möglichst rasche und exakte toxikologische Analytik Voraussetzung.

### Kasuistik

Durch den Notarzt wurde eine tief komatöse Patientin unter der Verdachtsdiagnose einer Intoxikation in die Intensivpflege gebracht. Aufgrund der im Umfeld der Patientin gefundenen Arzneimittelpackungen und Tablettenreste war in Verbindung mit der klinischen Symptomatik eine schwere Barbituratintoxikation wahrscheinlich.

Die sofort eingeleitete laborchemische Analytik von Plasma- und Harnproben mittels Enzymimmunoassay ergaben einen positiven Nachweis für Barbiturate. In der parallel dazu durchgeführten Dünnschichtchromatographie ließ sich dieser Befund bestätigen. Außerdem kam noch eine weitere Substanz in erheblicher Konzentration zur Darstellung, die als Diphenylhydantoin identifiziert wurde. Secobarbital und Diphenylhydantoin konnten anhand einer hochleistungsflüssigkeitschromatographischen Analyse quantitativ bestätigt werden.

Für die toxikologische Analytik sind Screeningmethoden sicherlich sinnvoll, bedürfen aber fast immer einer weiteren differenzierten Analytik durch Dünnschichtchromatographie oder Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, um das Problem einer Intoxikation durch mehrere Medikamente zu erfassen.

Schrifttum:

1. DYKEMAN, R. W., ECOBICHON, D. J.: *Journal of Chromatography* 162, 104–109 (1979).
2. MOESCHLIN, S.: *Klinik und Therapie der Vergiftungen*. 7. Aufl., Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York (1986).

**M 33**

## Eine Kandidat-Referenzmethode zur Bestimmung von Theophyllin im Serum mittels Isotopenverdünnung-Massenspektrometrie (IDMS)

F. Susanto, S. Humfeld, B. Schmidt und H. Reinauer  
Abteilung für Klinische Biochemie des Diabetes-Forschungsinstitutes und der Universität Düsseldorf,  
Auf'm Hennekamp 65, 4000 Düsseldorf 1

Eine große Anzahl von analytischen (GC, HPLC, GC-MS) sowie enzymatischen Methoden zur Bestimmung von Theophyllin (3,7-Dihydro-1,3-dimethylpurin-2,6(1H)-dion) wurden beschrieben (1, 2).

Die hier vorgestellte Methode basiert auf Isotopenverdünnung-Massenspektrometrie unter Verwendung von einem stabil isotop markierten internen Standard.

Nach Zugabe von (1,3-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>,2-<sup>13</sup>C) Theophyllin als interner Standard und Ausfällung des Eiweißes mit HClO<sub>4</sub> wird die Probe mit Diethylether extrahiert. Die sekundären Aminogruppen werden mit Essigsäureanhydrid und Pyridin zu einem unpolaren Acetylderivat umgesetzt.

Die Fragmentationen m/e 199 und m/e 193 (M<sup>+</sup>-Acetylgruppe) von Theophyllin bzw. von internem Standard werden für die Quantifizierung verwendet.

Die Präzision wurde durch Mehrfachmessungen von aufgestocktem, medikamentfreiem Serum ermittelt.

Der durchschnittliche Variationskoeffizient (VK) war kleiner als 1,3%. Die Wiederfindungsrate lag im Durchschnitt bei 98,6%.

Das hier beschriebene Verfahren ist als Referenzmethode zur Bestimmung von Theophyllin in Kontrollseren geeignet.

Schrifttum:

1. FLOBERG, S., LINDSTRÖM, B., LÖNNERHOLM, G.: J. Chromatogr. 221, 166–169 (1980).
2. LEIS, D., BRAUN, S., SCHNEIDER, B., KELLER, A.: Therapiewoche 32, 71–73 (1982).

**M 34**

## Bestimmung und Interpretation von AzidoDeoxythymidinspiegeln (AZT) im Serum von AIDS-Patienten mit HPLC

R. Averdunk, H. J. Stellbrink und E. Vercio  
Auguste Viktoria-Krankenhaus, Zentrallabor, Berlin 41,  
Univ.-Krankenhaus Eppendorf, Hamburg 20

Die Bestimmung der AZT-Konzentration erfolgt mit Hilfe der HPLC-Technik. Ausgangsmaterial 1–2 ml Serum, Erhitzung 45 min auf 57°C, Vorsäulenextraktion: (C18-Säule), nach Auswaschen mit Phosphatpuffer, Extraktion mit Methanol/Heptansulfonsäure. Auf die HPLC-Säule (C18) werden 200 µl aufgetragen. Mobile Phase: A) Ammoniumphosphat/Acetonitril, B) 85%ige wäßrige Acetonitrillösung. Gemessen wird bei 278 nm, die Elutionszeit für AZT beträgt 11 min, für den internen Standard (AZTU) 14 min.

Meßdaten: Linearität zwischen 0,25 und 12 µmol, Wiederfindung bei 0,5 µmol = 95%, bei 5 µmol = 98%. VK in Serie (1 µmol) 3,8%, VK von Tag zu Tag (1 µmol) 4,5%.

Die Patienten erreichen 30–180 min nach der Tabletteneinnahme einen maximalen Serumspiegel. Der therapeutische Bereich wird von der Firma mit 3 µmol/l 1 Std. nach Tabletteneinnahme und der toxische Bereich > 10 µmol angegeben. Für die Beurteilung des Medikamentenspiegels gilt: Die minimale Hemmkonzentration der reversen Transkriptase in den Zellen liegt bei 0,05 µmol. Diese intrazelluläre Konzentration wird bei einer extrazellulären Konzentration von 0,1 µmol erreicht. Das würde

bedeuten, daß die Serumkonzentration vor der Tabletteneinnahme nicht unter 0,1 µmol abfallen darf.

Offensichtlich schwanken Resorptions- und Halbwertszeiten des Medikamentes, z. B. bei Lebererkrankungen, beträchtlich. So fanden wir bei 4 von 68 Patienten Werte im toxischen Bereich 1 Std. nach der Tabletteneinnahme. Andererseits wurden bei 14 Patienten sehr niedrige (< 0,7 µmol) Spiegel gemessen; bei 4 Patienten bestanden starke Diarrhoen, die später zur Absetzung des Medikamentes führten.

Zur optimalen Einstellung der Patienten empfiehlt es sich, die Halbwertszeit des Medikamentes zu bestimmen. Wir fanden bei unseren Patienten Halbwertszeiten zwischen 45 und 150 min. Wegen der unterschiedlichen Resorptionszeit des Medikamentes empfiehlt es sich, zur Definition der Halbwertszeit die Serumspiegel der 3. und 6. Stunde nach der Tabletteneinnahme heranzuziehen. Im Gegensatz zu anderen Autoren fanden wir keine veränderten Halbwertszeiten von AZT bei Niereninsuffizienten einschl. Dialysepatienten.

### Schlußfolgerung

Die Bestimmung des Plasmaspiegels von AZT zur Therapieüberwachung gibt wichtige Informationen über optimale Zeitfolge und Dosis.

**M 35**

## Die Wirkung von Cocain auf die renale Magnesium-Calciumausscheidung beim Schaf

S. Balabanova, R. Nowak und H. Westermayer  
Institut für Rechtsmedizin der Universität Ulm

In dieser Studie wurde die Wirkung von Cocain auf die renale Ausscheidung von Magnesium (Mg) und Calcium (Ca) sowie auf die Blutkonzentration von Mg und Ca untersucht.

Die Untersuchungen wurden an 6 Merinoschafen durchgeführt. Über einen Dauerkatheter eingelegt in die Arterie cervicalis superficialis erhielten die Schafe täglich (30 Tage) 2,5 mg Cocain-HCl/kg KG. Der Urin wurde über 24 Std. gesammelt. Aus dem Sammelurin wurde eine Probe entnommen und bei –20°C eingefroren. Blut wurde durch den Dauerkatheter in stündlichen Abständen entnommen. Nach Zentrifugieren wurde das Plasma bei –20°C eingefroren.

Die Bestimmungen des totalen Ca und Mg erfolgten durch komplexometrische Titration mit Calzein und EDTA im Ca/Mg-Meter.

Bei allen Schafen zeigte sich nach Cocaingabe ein deutlicher Anstieg der renalen Magnesiumausscheidung sowie eine Abnahme der Magnesiumkonzentration im Blut. Die renale Calciumausscheidung nahm bei 3 Schafen nach Cocaingabe ebenfalls deutlich zu, bei 4 Schafen kam es auch zu einer Abnahme des Blutcalciumspiegels.

Die Zunahme der renalen Magnesium- und Calciumausscheidung könnte zum einen die Folge einer direkten Wirkung von Cocain auf die tubuläre Magnesium- und Calciumreabsorption sein, zum anderen könnte Cocain eine Wirkung auf die glomeruläre Filtrationsrate haben. Es könnte auch durch Cocain zu einem Anstieg der Calcitoninsekretion kommen, die dann einen Anstieg der Magnesium- und Calciumausscheidung verursacht. Eine mögliche Wirkung von Cocain auf den Aldosteron- und Adrenalinblutspiegel sowie auf die Schilddrüsenhormone wäre auch denkbar.

## Enzym-Immunoassays zur quantitativen Bestimmung von Plasma-Proteinen auf Mikrotitrationsplatte

P. Pfeleiderer, B. Auerbach und H.-P. Harthus  
Forschungslaboratorien der Behringwerke AG, Marburg

Eine Serie neuer heterogener Enzym-Immunoassays zur quantitativen Bestimmung von humanem IgE, carcinoembryonalem Antigen (CEA),  $\alpha$ -Fetoprotein (AFP), Ferritin sowie  $\beta_2$ -Microglobulin ( $\beta_2M$ ) ist entwickelt worden. Durch die Verwendung der Mikrotitrationsplatte als Festphase ergeben sich zahlreiche Vorteile im Vergleich zur konventionellen Röhren-Technologie, so z.B. die Verwendung kleiner Probenvolumina (10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l), ökonomischer Reagenzienverbrauch und die Möglichkeit leichter Automatisierbarkeit mit kommerziell verfügbaren Geräten für Pipettier-, Wasch- und Photometrieschritte (Semi-Automatisierung mit dem Behring ELISA-Processor II).

Als Festphase werden teilbare Mikrotitrationsplatten (6 x 16er Riegel, Rundboden) verwendet. Jede analytische Beschichtungsprozedur wurde nach Auswahl des geeigneten Plattentyps sorgfältig hinsichtlich Antikörperkonzentration, pH-Milieus und Pufferzusammensetzung optimiert. Die Konjugation der Antikörper, Antikörper-Fragmente bzw. des  $\beta_2$ -Microglobulins mit Meerrettich-Peroxidase erfolgte nach Methoden, wie sie bei Ishikawa et al. (1) beschrieben sind.

Die Assays basieren auf dem Sandwich- bzw. dem Wettbewerbsprinzip; mit Ausnahme des AFP-Test erfolgt Proben und Konjugatinkubation simultan (Einschritt-Assay). Sie zeichnen sich vor allem durch hohe Sensitivität, sehr gute Intraassay-Präzisionen ( $\leq 6\%$  VK) und einer guten Reproduzierbarkeit der Testergebnisse aus. Um ein möglichst unkompliziertes Procedere bei der Verlaufskontrolle von Tumorkranken zu gewährleisten, wurden für die einzelnen Tests großzügige Meßbereiche zur Vermeidung von Verdünnungsschritten gewählt. Andere Assay-Charakteristika wie Wiederfindung von Serum-/Plasma-Proben, Verdünnungsechtheit sowie potentielle Störeinflüsse von Antikoagulantien, Bilirubin, Ascorbinsäure oder Azid erwiesen sich als unproblematisch.

Beim Vergleich der Mikrotitrationsplatten-Assays mit anderen kommerziellen Tests wie den Enzygnost-Röhren-Assays® (Behringwerke), aber auch mit vollmonoklonalen Versionen anderer Diagnostika-Hersteller wurde eine sehr gute Übereinstimmung in der Serenfindung (Korrelationskoeffizient  $\geq 0,96$ ) festgestellt.

Schrifttum:

1. ISHIKAWA, et al.: J. Immunoassay 4, 209–327 (1983).

## Evaluation eines neuen homogenen Enzymimmunoassays zur Bestimmung der PMN-Elastase an verschiedenen Analysenautomaten

B. Utz, M. Dreher, U. Schönefeld, A. Heubner und H. Lang  
E. Merck, Frankfurter Straße 250, 6100 Darmstadt, FRG

PMN-Elastase, ein proteinspaltendes Enzym, ist in den Granula polymorphkerniger Granulozyten lokalisiert. Bei entzündlichen Prozessen werden die PMN-Granulozyten stimuliert und setzen PMN-Elastase frei. Freigesetzte PMN-Elastase wird durch Proteinaseinhibitoren inaktiviert und tritt im Blut überwiegend als inaktiver PMN-Elastase/ $\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor-Komplex auf. Die Bestimmung der PMN-Elastase-Konzentration im Plasma ermöglicht eine frühzeitige Diagnose von lebensbedrohlichen Komplikationen bei schwer operierten und schwerverletzten Patienten. Bei einer akuten Pankreatitis kann anhand des Elastase-Wertes zwischen ödematöser und nekrotisierender Pankreatitis unterschieden werden. Mit Hilfe des PMN-Elastase-Testes können neonatale Sepsis und bakterielle Infektionen bei Kindern

ebenso sicher diagnostiziert werden wie aufsteigende Infektionen bei vorzeitigem Blasensprung.

Wir haben einen schnellen homogenen Enzymimmunoassay zur Bestimmung der komplexierten PMN-Elastase im Plasma entwickelt. Der neue Test basiert auf der Immunoaktivierungsmethode (IMAC). In einem ersten Reaktionsschritt reagieren Konjugate, bestehend aus Antikörpern gegen humane PMN-Elastase und Meerrettich-Peroxidase (Ab-HRP), mit der PMN-Elastase der Probe unter Ausbildung von Immunaggregaten. In einem zweiten Reaktionsschritt wird dem Reaktionsansatz  $H_2O_2$  im Überschuß, Phenol und 4-Aminophenazon zugesetzt. Das Prinzip der IMAC-Methode beruht darauf, daß die durch  $H_2O_2$ -Überschuß bedingte Hemmung der enzymatischen Aktivität der Peroxidase durch die Immunaggregat-Bildung der Peroxidase-Konjugate (Ab-HRP) weitgehend aufgehoben wird.

Eine kinetische Version dieses neuen Enzymimmunoassays wurde an verschiedene Analysenautomaten adaptiert. Die Ergebnisse zu Präzision, Richtigkeit und Meßbereichsgrenzen am RA 1000, Hitachi® 717 und Cobas® Mira werden in dem vorgestellten Poster präsentiert.

## Neuer Immunoassay zur Bestimmung des Transferrins in der Routine

E. Fuchslocher, H. Drosdat und M. Dreher  
E. Merck, Diagnostica

Transferrin, das metallbindende Transportprotein des Blutes, ist ein wichtiger Parameter in der Eisenstoffwechselfeldiagnostik.

Zur Bestimmung des Transferrins wurde ein einfacher und schneller homogener Enzymimmunoassay entwickelt. Der Test basiert auf der Immunoaktivierungsmethode (IMAC). Antikörperkonjugate – bestehend aus Antikörpern gegen Human-Transferrin und Meerrettichperoxidase – bilden mit in der Probe enthaltenem Transferrin Immunaggregate. Peroxidase in Immunaggregaten besitzt im Vergleich zu Peroxidase in nicht aggregierter Form bei hohen  $H_2O_2$ -Konzentrationen eine deutlich bessere enzymatische Aktivität.

In den Aggregaten katalysiert die Peroxidase in Gegenwart von  $H_2O_2$ , Phenol und 4-Aminophenazon die Farbreaktion. Die Menge an gebildetem Farbstoff ist der Peroxidase-Aktivität und damit der Konzentration an Transferrin direkt proportional.

Der Test korreliert sehr gut mit turbidimetrischen und nephelometrischen Methoden sowie mit der Radialimmundiffusion.

IMAC-Transferrin ist leicht automatisierbar und kann mit jedem Photometer gemessen werden.

## Lumineszenzimmunoassay zur Bestimmung der Immunglobulinfractionen nach intravesikaler BCG-Therapie

St. Kuster, A. Böhle\* und W. G. Wood  
Klinik für Innere Medizin und \*Klinik für Urologie der Medizinischen Universität zu Lübeck

Die intravesikale Rezidivprophylaxe des oberflächlichen Urothelkarzinoms der Blase mit Bacillus Calmette-Guérin (BCG) ist eine seit 1976 etablierte und effektive Therapieform (1). Neben einer lokalen Aktivierung des zellulären Immunsystems wurde auch eine Beteiligung des peripheren humoralen Systems beschrieben (2). Um einen detaillierteren Einblick in die lokale und systemische humorale Immunantwort auf die BCG-Therapie zu erhalten, wurde ein Testsystem etabliert, welches die spezifische Antikörperproduktion im Urin und Serum des Patienten mißt.

**Methode:** Nach transurethraler Resektion und Laserkoagulation der Tumoren wurde eine Behandlung mit 6maliger intravesikaler Instillation von 120 mg BCG in wöchentlichen Abständen ange-

geschlossen. Zu definierten Zeitpunkten vor, während und nach der BCG-Therapie wurden Urin- und Serumproben von bisher 30 Patienten untersucht. Zur Bestimmung der Antikörper (Ak) im Urin und Serum verwendeten wir einen sequentiellen SPALT Assay (3). Als Antigen (Ag) fungiert der zur Therapie eingesetzte Impfstoff, der eine Suspension von BCG in Humanalbumin und Caseinautolysat darstellt. Das Ag wird in einem ersten Schritt an Poly-Phenylalanin-Lysin-beschichtete Polystyrolkugeln immobilisiert. Dann werden diese Ag-beschichteten Kugeln mit der zu untersuchenden Probe und einem Puffer (PBS-Tween 20) inkubiert. Es kommt dabei zu einer Bindung der spezifisch gegen BCG gebildeten Ak an die Kugeloberfläche. Nach zwischengeschaltetem Waschschrift werden diese Kugeln mit einem lumino-gen markierten Antimmunglobulin inkubiert, wodurch jeder an die Festphasenoberfläche gebundene antigenspezifische Ak mit einem zweiten Ak beladen wird. Es folgt wieder ein Waschschrift, durch den ungebundene markierte Ak entfernt werden. Nach Zugabe von Katalase und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> werden in einem LB 952 Lumino-meter Photonenaufschläge gezählt und als Integral der Lichtintensität über 2 sec ausgedruckt. Mittels eines eigenen Standards werden diese Signale in Laboreinheiten (LE) umgerechnet. Den höchsten Standard definierten wir als 100 LE. Die unverdünnt eingesetzten Urinproben lagen alle zwischen 0 und 100 LE. Die Messung der Serumproben erfolgte aufgrund des höheren Ak-Gehalts nach 10–100facher Verdünnung.

**Resultate.** Ein deutlicher Anstieg der spezifischen Ak-Titer im Urin konnte bei nahezu allen Patienten unter der Instillationstherapie nachgewiesen werden. Das zeitliche Maximum der Immunglobulinproduktion lag zwischen der 4. und 8. Stunde nach BCG-Instillation. Serumwerte zeigten vergleichsweise höhere Titer für IgG und IgA. Es konnten mehrere Charakteristika des zeitlichen Verlaufs der Ak-Produktion herausgearbeitet werden.

**Schlußfolgerung:** Das beschriebene Testsystem erlaubt in einfacher, kostengünstiger und zeitsparender Weise die Bestimmung spezifischer Ak nach BCG-Immuntherapie. Hiermit ist eventuell eine Möglichkeit zur Aufdeckung des Wirkungsmechanismus und zur Orientierung der BCG-Therapie geschaffen.

#### Schrifttum:

- MORALES, A., EIDINGER, D., BRUCE, A. W.: Intracavitary Bacillus Calmette-Guérin in the treatment of superficial bladder tumors. *J. Urol.* 116, 180 (1976).
- WINTERS, W. D., LAMM, D. L.: Antibody Responses to BCG during immunotherapy in bladder cancer patients. *Cancer Res.* 41, 2672 (1981).
- WOOD, W. G.: Luminescence immunoassays in theory and practice – the state of the art. In: *Reviews of immunoassay technology* (Ed. PAL, S. B.), de Gruyter, Berlin, New York, Vol. 1, pp. 105–150 (1985).

#### M 40

### Einzug der Chemielumineszenz ins immunologische Routinelabor

R. Schmidt, R. Lipecky<sup>1</sup>, U. Klaus, J. Teuber<sup>2</sup> und R. Kattermann  
 Institut für Klinische Chemie, Klinikum Mannheim

<sup>1</sup> Fa. Henning, Berlin GmbH, Berlin

<sup>2</sup> II. Medizinische Klinik, Klinikum Mannheim der Universität Heidelberg

Als immunologisches Analysenverfahren ist der Lumineszenzimunoassay (LIA) eine nicht-radioisotopische Alternativ-Methode zum Radioimmunoassay (RIA). Der LIA und andere nicht-RIA-Methoden finden derzeit zumeist Anwendung in Forschungslaboratorien. Der direkte LIA ist das einzige „offene System“ neben dem RIA. Die anderen nicht-RIA-Verfahren werden zumeist als „geschlossene Systeme“, bei denen Reagenzien und Meßgerät eine Einheit bilden, vertrieben (Gadow, 1988).

Die bei allen Anbietern bisher zu geringe Zahl an zum Teil ungenügend ausgestatteten LIA-Assays begrenzte die Aufstellung von Luminometern auf den Anwendungskreis, der zusätzliche Parameter entwickeln konnte.

Obwohl derzeit mehrere LIA-Anbieter eine wachsende Assay-Palette auf den Markt bringen, scheiterte der Einzug der LIA-Methode ins Routinelabor vor allem an einer geeigneten Instrumentierung (Missler u. Wood, 1988), die eine Personal- und damit kostengünstigere Durchführung von LIA-Analysen nicht zuließ.

Eine Alternative zu Halb- oder Vollautomaten für Fluoreszenz- und Enzymimmunoassays kann das von uns evaluierte STRATEC-LUMINOMETER SL 300 in Verbindung mit einem TECAN RSP 5051 Pipettierautomaten darstellen.

Das SL 300 ist ein Gerät mit Kassetten- und integriertem Wascher, das nach Vorlegen von Serum und Reagenz in die Antikörper (AK) beschichteten Test-Röhrchen den Analysenablauf vollautomatisch durchführt. Die Meßwerte werden mit Hilfe eines Computers zu Endergebnissen verarbeitet und ausgedruckt. Der umgerüstete TECAN-Sampler läßt direktes Arbeiten in die in STRATEC-Kassetten befindlichen AK-beschichteten Röhrchen zu.

Die Daten der letzten 30 Assays werden gespeichert. Standardkurvendaten und Qualitätskontrollwerte (Langzeit) können auf Diskette abgelegt werden. Eine Wiederverwendung alter Standardkurven ist ebenso wie eine Ein- oder Mehrpunktkalibration möglich.

Zu Vergleichsuntersuchungen mit der SL 300-TECAN-Geräteausstattung wurde ein HCG LIA-mat der Firma Byk-Sangtec, Dietzenbach, durchgeführt, der mit einem Enzymun-Test® HCG der Fa. Boehringer, Mannheim, gemessen mit ES 600, korreliert wurde. Die HCG-Spiegel wurden mit Stratus® HCG der Fa. Baxter, München, und mit Amerlite® HCG-60 der Fa. Amersham, Braunschweig, korreliert.

Die guten Korrelationskoeffizienten ( $r = 0,92 - 0,98$ ) sowie das Zeit- und Personalkosten effiziente Arbeiten mit der neuen Lumino-meter-, Wasch- und Pipettier-Einheit deuten auf den Einzug der Chemilumineszenzmeßtechnik ins immunologische Routinelabor.

#### Schrifttum:

- GADOW, A.: LUMI-Test® – ein universelles Chemilumineszenz-Immunoassay-System. *GIT Labor-Medizin* 5, 259–264 (1988).  
 MISSLER, U., WOOD, W. G.: Aufbau und Einsatz von stabilen Lumineszenzimunoassays in der täglichen Routine. *GIT Labor-Medizin* 5, 245–250 (1988).

#### M 41

### Sensitive Quantitation of Small Peptide Immunoreactivity by Competitive Antigen-Biotin-Adsorbed Immunoassay for (CABIA)

A. Kage, D. Weitzel, C. Felsch, R. Kage\* and E. Köttgen  
 Universitätsklinikum Rudolf Virchow, Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie, Berlin, Germany  
 \* University of Massachusetts Medical Center, Department of Physiology (Dir.: Prof. S. Leeman), Worcester, USA

Radioimmunoassay is the only analytical method for sensitive quantification of small peptides. Broader applications of non-radioactive analyses are limited by the facts that a) for each individual peptide the number of analyses is small; b) common techniques based on solid phase bound specific antibodies require comparably high amounts of antibody; c) to increase sensitivity of these methods high affinity antigen/enzyme conjugates must be isolated, but separation technique of these conjugates is limited.

Here, we present a new immunoassay procedure for small peptides which enables highly sensitive quantification of small peptides using a "label" with long half life time.

**Methods:** A biotinylated peptide is adsorbed to an avidin coated solid phase. To remove biotin-reagent and to separate different molecules forms obtained by the biotinylation reaction mixture was fractionated by HPLC and the best fraction was selected. After washing off unbound peptide the sample or standard is incubated together with the specific  $\alpha$ -Substance P-antibody. In the last step bound specific antibody is stained by a second antibody coupled to peroxidase.

**Results and discussion:** Data indicate that the presented assay has a sensitivity in the range of radioimmunoassay. The actual data show that the label is stable for at least 8 weeks if stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  and that the method is suited for detection of substance P after high performance liquid chromatography.

The presented assay is discussed as a new tool for a broader application of sensitive, enzymatic quantification of small peptides with sensitivity in the range or better than radioimmunoassay. Using amine specific biotinylation reagents the principle could be a practicable alternative for all radioimmunoassays using iodinated haptens in the future.

M 42

## Ein Sandwich-ELISA zum Nachweis des humanen prostatasekretorischen Proteins PSP94 in männlichen Samen und Samenplasma

H. v. d. Kammer<sup>1</sup>, Erika Kraus<sup>1</sup>, K.-F. Klippel<sup>2</sup>, C. Jurincic<sup>2</sup> und K. H. Scheit<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, 3400 Göttingen, FRG

<sup>2</sup> Allgemeines Krankenhaus Celle, Abt. Urologie, 3100 Celle

Die humane Prostata produziert im Wesentlichen 3 sekretorische Proteine: saure Phosphatase (PAP), prostataspezifisches Antigen (PSA) und prostatasekretorisches Protein mit 94 Aminosäuren (PSP94) (Abrahamson und Lilja, 1988). Gegen gereinigtes PSP94 aus humanem Samenplasma wurde sowohl ein polyklonales Antiserum in Kaninchen sowie durch Fusionierung von Mausplenocyten mit einer Myelomzell-Linie PSP94-spezifische Hybridomas erzeugt. Ein PSP94-spezifischer monoklonaler Antikörper (mAK) 6B6 gehört der Klasse IgG<sub>1</sub> an; die Spezifität des PSP94-spezifischen mAK 6B6 konnte durch proteinchemische und immun-histochemische Experimente gesichert werden. Der Aufbau eines Sandwich-ELISA erfolgte durch Adsorption der polyklonalen Kaninchen-anti-PSP94-IgG an die feste Phase von Mikrotiterplatten. An die polyklonalen IgGs gebundenes PSP94 reagiert mit mAK 6B6. Der gebildete Komplex läßt sich durch anti-Maus IgG (F<sub>c</sub>)-Peroxidasekonjugat nachweisen. Eine sequentielle Durchführung des Tests ist nicht erforderlich. Eine Reaktionsmischung aus mAK 6B6 und anti-Maus IgG (F<sub>c</sub>)-Peroxidasekonjugat kann direkt mit einer Standard- oder unbekannt Probe in der Kavität der Mikrotiterplatte in 1,5 Std. bei 37°C reagieren. Der Meßbereich des Sandwich-ELISA beträgt 2–30 ng/ml. Die wichtigsten Testcharakteristika: Wiederfindung im Serum 98,2 ± 5,4%; intra-Testvarianz 3,3%; inter-Testvarianz 3,5%. Mit diesem Sandwich-ELISA wurde in Kollektiven normaler Männer, Männer mit Prostatacarcinom sowie Prostataadenom die Konzentration an PSP94 im Serum gemessen. Dieser Test eignete sich auch zur Bestimmung der Konzentration von PSP94 in humanem Samenplasma.

Schrifttum:

LILJA, H., ABRAHAMSON, P.-A.: Three predominant proteins secreted by the human prostate gland. *Prostate* 12, 29–38 (1988).

M 43

## Zwei neue Forschungsassays für die In-vitro-Diagnostik nach In-vivo-Applikation monoklonaler Antikörper

B. Auerbach, P. Pfeleiderer und N. Madry  
Forschungslaboratorien der Behringwerke AG, Marburg

Die In-vivo-Applikation muriner, monoklonaler Antikörper (MAK) zur Immuntherapie von Tumoren, der Immunsuppression bei Organtransplantationen und zur Immunszintigraphie stehen im Mittelpunkt vieler klinischer Prüfungen. Unter anderem wird neben der MAK-Pharmakokinetik auch eine mögliche Immunantwort der Patienten gegen das applizierte Fremdeiweiß untersucht. Hierzu wurden zwei Enzymimmunoassays, der Enzygnost HAMA micro (indirekter Immunoassay) zur Detektion der humanen Anti-Maus-Antikörper (HAMA) und der Enzygnost mlgG micro (Sandwich-Immunoassay) zur quantitativen Bestimmung der MAK-Serumspiegel entwickelt.

Mit Hilfe des für die verschiedensten Konzentrationsbereiche ausgelegten mlgG-Immunoassays gelang es den MAK-Serumspiegel von Tumorpatienten optimal einzustellen, so daß eine möglichst effektive Therapie gewährleistet werden konnte.

Bei der Tumorthherapie mit hohen MAK-Dosen folgen der HAMA IgM-Primärantwort die IgG-HAMA; hingegen bilden Patienten, die wegen der Transplantation zusätzlich medikamentös immun-supprimiert wurden, vermehrt IgM-HAMA gegen die Anti-T-Zell-MAK. Da die HAMA-Antwort so unterschiedlich ausfallen kann, wurde der HAMA-Test möglichst flexibel gestaltet: Der MAK, der auch dem Patienten appliziert wurde, wird den HAMA im Patientenserum als Festphasenantigen präsentiert. Hiermit ist gewährleistet, daß auch anti-idiotypische HAMA mit diesem Test erfaßt werden. Gerade diesen anti-idiotypischen HAMA wird eine MAK-neutralisierende Wirkung und damit ein Verlust an Therapieeffektivität zugeschrieben. Im nachfolgenden Inkubationsschritt werden die gebundenen HAMA mit enzymkonjugierten Anti-human-IgM- bzw. IgG-Antikörpern weiter entsprechend ihrer Immunglobulinklassen differenziert.

Da bisher kein klinischer „HAMA-cut-off“ existiert, dient eine Positivkontrolle als Anhaltspunkt, wie eine unbekannt Serumprobe bzgl. der HAMA-Konzentration einzuschätzen ist. Mehr als 95% (IgG-Antwort) bzw. 90% (IgM-Antwort) der Seren normaler Blutspender weisen einen kleineren HAMA-Faktor auf wie der einfache IgG- bzw. der doppelte IgM-HAMA-Faktor dieses Kontrollserums. Erst Patienten mit einem sehr hohem HAMA-Serumspiegel (HAMA-Faktor  $\geq$  4mal Hf. d. Poskontra.) zeigen eine verstärkte Anreicherung der MAK in Leber und Milz, die die Interpretation immunszintigraphischer Befunde erschwert.

M 44

## Die Kombination eines verallgemeinerten Likelihood-Ratio-Ansatzes und der logistischen Regressionsanalyse zur Diskriminierung zwischen multiplen diagnostischen Kategorien

G. Reibnegger, D. Fuchs, A. Hausen, E. R. Werner,  
G. Werner-Felmayer und H. Wachter  
Institut für Medizinische Chemie und Biochemie, Universität,  
A-6020 Innsbruck

Das Konzept der diagnostischen Sensitivität und Spezifität weist zwei Beschränkungen auf: Es ist nur für binäre Fragestellungen hinsichtlich der diagnostischen Kategorien geeignet (etwa „krank“ versus „gesund“), andererseits wird der (quasi)kontinuierliche Wertebereich quantitativer analytischer Meßergebnisse auf die dichotome Entscheidung „normal“ versus „abnormal“ reduziert. Albert hat gezeigt (1), wie aus logistischen Regressionskoeffizienten Likelihood-Ratios berechnet werden können. In einer neueren Arbeit hat Birkett (2) eine Erweiterung des Likelihood-Ratio-Konzepts zur Berechnung der posterioren Wahrscheinlichkeiten für multiple einander ausschließende diagnostische Kategorien vorgeschlagen. Wir zeigen anhand zweier Datensätze aus publizierten klinischen Studien (3, 4), daß eine Kombination dieser beiden Methoden die Diskriminierung zwischen multiplen diagnostischen Kategorien unter optimaler Ausnutzung des vollen Wertespektrums auch von Kombinationen aus diagnostischen Variablen erlaubt. Eine Anpassung an geänderte Prä-Test-Wahrscheinlichkeiten ist zwanglos möglich. Gewisse Abweichungen der mit dem Modell errechneten posterioren Wahrscheinlichkeiten, die auf die statistische Schätzung der logistischen Regressionskoeffizienten zurückzuführen sind, lassen sich mit einer von uns angegebenen Formel (5) analytisch ausdrücken.

Schrifttum:

1. ALBERT, A.: *Clin. Chem.* 28, 1113 (1982).
2. BIRKETT, N. J.: *J. Clin. Epidemiol.* 41, 491 (1988).
3. REIBNEGGER, G., EGG, D., FUCHS, D., GÜNTHER, R., HAUSEN, A., WERNER, E. R., WACHTER, H.: *Arthritis Rheum.* 29, 1063 (1986).
4. PRIOR, C., FUCHS, D., HAUSEN, A., JUDMAIER, G., REIBNEGGER, G., WERNER, E. R., VOGEL, W., WACHTER, H.: *Lancet* 11, 1235 (1987).
5. REIBNEGGER, G., FUCHS, D., HAUSEN, A., WERNER, E. R., WERNER-FELMAYER, G., WACHTER, H.: *J. Clin. Epidemiol.*, in press (1989).

## Anwendung eines informationstheoretische Modells in der medizinischen Diagnostik

P. Kotanko, H. Heiss, W. Wild und R. Margreiter  
Univ.-Klinik für Innere Medizin und I. Chir. Univ.-Klinik,  
Universität Innsbruck, A-6020 Innsbruck, Anichstraße 35

Die Informationstheorie beschreibt ein Maß für den Informationsinhalt einer Nachricht (1). Die Interpretation des Kanalmodells wurde den diagnostischen Problemstellungen in der Medizin angepaßt. Dabei wurde ein im Organismus ablaufender pathologischer Prozeß als eine „Nachricht“ interpretiert, die, durch patientenspezifische Störgrößen verändert, in Form von Symptomen, Laborbefunden, etc. an den Untersucher gelangt. Ähnliche Verfahren wurden in der Vergangenheit für einfache diagnostische Probleme verwendet (2).

Wir untersuchten die Anwendung des informationstheoretischen Kanalmodells an 111 Patienten nach Nierentransplantation. Ziel war die frühzeitige Diagnose von Abstoßungen. In der doppelblinden Studie wurden drei Parameter herangezogen, nämlich die Harnausscheidung von Neopterin, N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase und Änderungen des Serumkreatinins. Von 21 histologisch verifizierten Abstoßungen wurden 16 erkannt, weitere 6 von 10 klinisch diagnostizierten. Im Mittel ging die Diagnose auf der Basis des Modells der klinischen Diagnose um 2,2 Tage voraus. Falsch-positive Resultate traten vor allem im Zusammenhang mit Hämodialysen und nephrotoxischen Medikamenten auf.

Über die in der vorliegenden Arbeit dargestellte Anwendung hinaus erscheint die Applikation des Modells in zahlreichen anderen klinischen Situationen (z. B. Endokrinologie) sinnvoll.

### Schrifttum:

1. SHANNON, et al.: The mathematical theory of communication (1949).
2. BÜTTNER, J.: Die Beurteilung des diagnostischen Wertes klinisch-chemischer Untersuchungen. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 15, 1–12 (1977).

## EDV-unterstützte Verzweigungsanalyse in der klinisch-chemischen Diagnostik

H. Bleyl, B. Klabuhn und U. Bering  
Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Zur Beurteilung des Gesundheits- oder Krankheitszustandes eines Patienten gehört ein Spektrum klinisch-chemischer Analysen, über dessen Umfang der behandelnde Arzt entscheidet; stets trägt er das Risiko und die Verantwortung für „unterlassene“ und „überflüssige“ Laborparameter. Der nicht erwartete, überraschende Befund der zur differentialdiagnostischen Abgrenzung Zusatzuntersuchungen wünschenswert oder erforderlich macht, stellt dabei zweifelsfrei das Hauptproblem dar. Im stationären Bereich des Krankenhauses kommt hinzu, daß die Umsetzung ärztlichen Willens auf das Laboranforderungsformular in zunehmendem Maße nachgeordneten Hilfskräften übertragen wird, die über keine ausreichende Qualifikation zur Entscheidungsfindung für oder gegen bestimmte Laborparameter verfügen.

Ausgehend von „basalen Befundmustern“ als primären Leitparametern läßt sich eine weiterführende Labordiagnostik mit sekundären Folgeparametern zwischen behandelndem Arzt als Auftraggeber und Laborarzt vereinbaren, die zu einer wesentlich schnelleren Befundkomplettierung führt, als wenn diese erst im sog. „second look“ durch Nachforderung aus vorhandenem Spezimen bzw. erneuter Blutentnahme erfolgt.

Dazu bedarf es der Erstellung von Entscheidungskriterien, unter welchen Bedingungen welche Zusatzparameter zu analysieren sind:

1. Welche sekundären Folgeparameter sollen gegebenenfalls untersucht werden?

2. Welche primären Leitparameter dienen zur Entscheidungsfindung für die zu untersuchenden sekundären Folgeparameter?
3. Welche Veränderungen primärer Leitparameter bedingen eine Wiederholung eines sekundären Parameters?
4. Welche Vorwertkonstellation eines sekundären Folgeparameters soll zu dessen Wiederholung führen?

5. Welches Zeitintervall ist für die Wiederholung eines sekundären Parameters sinnvoll?

Beispielhaft werden Entscheidungskriterien vorgestellt für GLDH als Funktion für ALT und/oder AST,  $\alpha$ -HBDH als Funktion von LDH, Phosphat als Funktion von Calcium und Creatinin sowie Chlorid als Funktion von Natrium. Die Zielvorgabe, weit über 90% aller als notwendig erachteten Zusatzuntersuchungen von sekundären Folgeparametern durchzuführen, kann erreicht werden.

## Zur Quantifizierung von Serum-Benzodiazepin-Spiegeln mittels der Enzyme-Multiplied-Immunoassay-Technique (EMIT) in einem Du Pont ACA-SX Discrete Clinical Analyzer

T. O. Kleine  
Funktionsbereich Neurochemie im Medizinischen Zentrum  
für Nervenheilkunde der Universität Marburg a. d. Lahn

Der Benzodiazepin-Screen wird in Serumproben auf dem ACA-SX® Discrete Clinical Analyzer (Du Pont Company, Wilmington, Del. USA und Du Pont de Nemours BRD) semiquantitativ mit der EMIT-Technologie gefahren, d.h. ab 300  $\mu$ g/l Diazepam als Standard wird ein positives Ergebnis reproduzierbar und mit ausreichender Präzision (VK < 10%) angezeigt (1). Die Eichkurve war über Monate stabil (1). Unter dieser Voraussetzung werden z.B. Clonazepam-Spiegel mit einem therapeutischen Bereich von 5–50  $\mu$ g/l erst im toxischen Bereich angezeigt. Deshalb wurde hier versucht, den semiquantitativen Benzodiazepin-Screen auf dem ACA-SX® wie folgt zu qualifizieren:

Durch Verdopplung des Probenvolumens auf 0,08 ml wird die Sensitivität des Tests um den Faktor 2 erhöht bei einer Nachweisgrenze (3 Standardabweichungen des Negativ-Kalibrators) von  $\sim$  30  $\mu$ g/l Diazepam. Durch Mischen des Medium-Kalibrators von 2 mg/l Diazepam mit dem Negativ-Kalibrator (beide von Syva, Palo Alto, CA USA) wurde die Eichkurve zwischen 0 und 250 (500 oder 1000)  $\mu$ g/l Diazepam hergestellt unter Verwendung der Chargen-spezifischen Logit-Funktionsdaten (2).

Mit dieser gespeicherten Diazepam-Eichkurve wurde gemessen und die erhaltenen Werte (y) linear korreliert mit

1. Verdünnungen des Low-Kalibrators Syva (x) mit dem Negativ-Kalibrator (Syva):  $y = +3,4 + 1,02 \cdot x$  (n = 15), r = 1,00; Bereich: 37 bis 600  $\mu$ g/l;
2. Verdünnungen einer Serumkontrolle, enthaltend Diazepam und N-Desmethyl-Diazepam (1:1) (x), mit einem Serum-Blank:  $y = +0,8 + 1,23 \cdot x$  (n = 20), r = 0,99; Bereich: 15 bis 250  $\mu$ g/l;
3. Verdünnungen einer Serumkontrolle, enthaltend Chlordiazepoxid (1 mg/l), N-Desmethylchlordiazepoxid (1 mg/l), Demoxepam (0,5 mg/l), Diazepam (1 mg/l), N-Desmethyldiazepam (0,5 mg/l) und Oxazepam (1 mg/l) (x), mit einem Serum-Blank:  $y = +65,7 + 0,42 \cdot x$  (n = 18), r = 0,97; Bereich: 20 bis 1250  $\mu$ g/l;
4. Verdünnungen einer Serumkontrolle, enthaltend Flurazepam (100 mg/l) und Desalkylflurazepam (200 mg/l) (x), mit einem Serum-Blank:  $y = +7,2 + 1,04 \cdot x$  (n = 10), r = 1,00; Bereich: 75 bis 300  $\mu$ g/l;
5. Verdünnungen einer Serumkontrolle enthaltend Clonazepam (x) mit einer Blank-Kontrolle (alle TDM/TDX-Kontrollseren von UTAK LABS INC Canyon Country, CA USA):  $y = -5,9 + 1,04 \cdot x$  (n = 10), r = 0,98; Bereich: 31 bis 125  $\mu$ g/l;

6. Serumproben von Patienten unter Clonazepam-Therapie ( $x = \text{Clonazepam-Spiegel gemessen mittels Gaschromatographie}$ ):  $y = -10,4 + 0,91 x$  ( $n = 8$ ),  $r = 0,95$ ; Bereich: 10 bis 50  $\mu\text{g/l}$ .

Diese vorläufigen Untersuchungen zeigen an, daß der hier modifizierte Benzodiazepin-Screen auf dem ACA-SX® quantifizierbarer für Benzodiazepin-Serumspiegel unterhalb von 300  $\mu\text{g/l}$  wird.

Schrifttum:

1. HEMPHILL, D. G., HAHN, N., BREUTZMANN, D., CLEMENT, G. E., HAVASSY, J.: Du Pont Company Diagnostics Systems 9108A (1984).
2. Manual of the ace discrete clinical analyzer (1987) Du Pont Company, Wilmington Del., USA.

M 48

## Direktnachweis von Bakterienantigenen: ein Methodenvergleich

T. O. Kleine

Funktionsbereich Neurochemie im Medizinischen Zentrum für Nervenheilkunde der Universität Marburg a. d. Lahn

Der Nachweis von bakteriellen Erregern in der Kultur ist bereits nach kurzer Anbehandlung mit Antibiotika nicht mehr möglich. Damit haben Schnelltests zum immunologischen Nachweis von Bakterienantigenen eine diagnostische Bedeutung z. B. bei einer anbehandelten Meningitis, wenn diese Tests spezifisch und ausreichend empfindlich sind (vgl. 1).

Hier werden immunologische Latex-Tests der Firmen bioMérieux (Frankreich), Wellcome (England) und Becton Dickinson (USA) zum schnellen Nachweis von neun freigesetzten Bakterienantigenen mit Co-Agglutinationstests und Enzymimmunoassays auf Bakterienantigene verglichen (beide von Pharmacia Schweden). Modifikationen der Latex-Tests von bioMérieux bzw. Wellcome durch Reduktion von Proben- (0,01 bzw. 0,02 ml) und Reagenz-Volumen (0,01 ml) und Verlängerung der Inkubationszeit auf 4 bis 6 min (2) konnten ihre Sensitivität nicht wesentlich steigern: Die Nachweisgrenze von Antigenen der fortlaufend 1+1 mit steriler 0,15 mol/l NaCl-Lösung verdünnten Kontrolle lag für H. influenzae Typ B bei ca. 1:32, für S. pneumoniae bei ca. 1:32 (1:4; abweichender Wert des Wellcogen-Tests), für N. meningitis Gruppe A, C, Y, W 135 bei ca. 1:2 (ca. 1:16; für Typ B/E. coli K<sub>1</sub> bei ca. 1:2 für Wellcogen-Tests) und für Streptococcus der Gruppe B bei ca. 1:16.

Für die Co-Agglutinationstests mit an abgetöteten Staphylococci gebundenen spezifischen Antikörpern (Phadebact®) mit 0,02 ml Probe und Reagenz wurden nach 1 min Inkubationszeit vergleichbare Nachweisgrenzen erhalten.

Latex-Tests von Becton-Dickinson mit 0,05 ml Probenvolumen waren nach 10 min Inkubationszeit empfindlicher gegenüber verdünnten Kontrollantigenen (s.o.) von H. influenzae Typ B  $\geq 1:128$ , S. pneumoniae  $\geq 1:128$ , N. meningitis Gruppe A, C, Y, W 135 und B/E. coli K<sub>1</sub>  $\geq 1:64$ , Streptococcus Gruppe B  $\geq 1:64$ .

Die Enzymimmunoassays Meningitis EIA 10 mit 0,1 ml Probe waren noch empfindlicher mit Nachweisgrenzen von ca. 1:4096 für H. influenzae Typ B, ca. 1:1024 für S. pneumoniae und ca. 1:256 für N. meningitis Gruppe A, B, C, Y, W 135 bei einer Testdauer von 1 bis 2 Std.

Vergleichbar hohe Sensitivitäten zeigten modifizierte Latex-Tests von bioMérieux (Wellcome) mit 0,01 ml Probe und visueller mikroskopischer Beurteilung der Präzipitation (vgl. 2) mit Nachweisgrenzen von ca. 1:2048 (ca. 1:256) für H. influenzae Typ b, ca. 1:4096 (ca. 1:32) für S. pneumoniae, ca. 1:64 für N. meningitis Gruppe A oder C (ca. 1:128 für Gruppe A, C, Y, W 135; ca. 1:8 für B/E. coli K<sub>1</sub>) sowie ca. 1:1024 (ca. 1:1024) für Streptococcus Gruppe B; Testdauer 30 bis 60 min.

Damit ist die einfache und billige Modifikation der Latex-Tests mit den Enzymimmunoassays in Bezug auf Empfindlichkeit vergleichbar.

Schrifttum:

1. KLEINE, T. O., JANIK, P., HACKLER, R.: Lab.med. 11, 177 (1987).
2. KLEINE, T. O.: Lab.med. 11, 176 (1987).

202 Lab.med. 13: 202 (1989)

M 49

## Computer-unterstützte Routine-Untersuchungen und -Probenverteilung im medizinischen Laboratorium

T. O. Kleine, W. Pietzuch und R. Hackler

Funktionsbereich Neurochemie im Medizinischen Zentrum für Nervenheilkunde der Universität Marburg a. d. Lahn

Die Anpassung von käuflichen EDV-Systemen an die Besonderheiten kleinerer medizinischer Laboratorien bereitet technische und finanzielle Schwierigkeiten. Deshalb wurde hier versucht, ein flexibles Datenerfassungs- und Probenverteilungs-System aus folgenden Einzelteilen aufzubauen:

**Probenverteilungs-System:** Eine Einheit besteht aus 10 Reagenzglasgestellen mit je 10 durchnummerierten Bohrungen in zwei Reihen: erstes Gestell für Blutproben (z. B. des Sarstedt-Blutentnahme-Systems), zweites Gestell für die Primärserumprobe, drittes bis zehntes Gestell für Sekundärproben (z. B. in Eppendorf-Reaktionsgefäßen).

**Datenerfassungs-System-Hardware:** IMB PS/2 Modell 60 mit schnellem Festplattenlaufwerk (70 MB) zur Speicherung großer Datenmengen, VGA-Monitor und unterbrechungsfreier Stromversorgung (500 W) sowie zwei Druckern (z. B. EPSON LQ-1050 für Arbeitslisten und OKI MICROLINE 192 für Etiketten).

**Datenerfassungs-System-Software:** DBase III+ (Ashton-Tate): Das Arbeitsprinzip basiert auf Mengenoperationen: Aus der vorgegebenen Gesamtmenge G an zu untersuchenden Analyten wird über Ja/Nein-Entscheidungen [Selektoren S<sub>i</sub> (F) entsprechen Ankreuzfeldern in Ankreuzformularen F] eine Teilmenge T (Auftrag) ausgewählt, die dem jeweiligen Untersuchungsauftrag entspricht. Selektor S<sub>i</sub> kann ein oder mehrere Analyten G<sub>i</sub> selektieren. Die Menge T wird nun auf Arbeitslisten verteilt. In jeder Arbeitsliste A wird nur eine Teilmenge L(A) erfaßt. Die Schnittmenge von L(A) und T ergibt die Art und Anzahl der Analytmessungen in einer Patientenprobe aus der Arbeitsliste. Ist die Schnittmenge leer, erscheint der Patient nicht auf der Arbeitsliste. Eine freie Konfiguration der Mengen G, S(F) und L(A) ist möglich.

Folgende Leistungen sind zu jeder Zeit und in freier Reihenfolge abrufbar:

- Untersuchungsanforderung über ein Standardformular (Patient, Station) mit anwählbaren Masken für die gewünschten Analyte mit Vergabe einer Untersuchungs- und Patienten-Nummer.
- Abfragen laufender Untersuchungen, Druck unvollständiger Untersuchungen sowie deren Abbruch,
- Druck von Arbeitslisten,
- Druck von Probenetiketten mit automatischer oder manueller Selektion,
- manuelle Eingabe von zu druckenden Probenetiketten.

Die Kennzeichnung der Proben erfolgt eindeutig auf der Probenetikette mit Angabe des Probentyps und der Arbeitsliste. Die Primär-Serumprobe wird manuell in die vor ihr in einer Reihe stehenden Reaktionsgefäße (nur) mit Etikette verteilt. Die einzelnen Patientenproben werden durch eine Leer-Reihe getrennt. Die Sekundär-Proben einer Arbeitsliste befinden sich in einem Gestell und werden durch eine besondere Farbmarkierung zusätzlich gekennzeichnet.

Arbeitslisten werden automatisch verwaltet und können durch Nachzügler ergänzt werden (Rückführung in die EDV). In der Arbeitsliste in Tabellenform werden die Meßergebnisse patientenbezogen eingetragen. Nur die Eintragung von angeforderten Meßwerten ist möglich. Nicht benötigte Messungen werden gekennzeichnet. Das Zurücksetzen einer Arbeitsliste ist möglich, ebenso das Abfragen auf deren (Un-)Vollständigkeit.

Weiterhin ist vorgesehen, Meßergebnisse einzugeben in dynamisch verwaltete Masken mit Plausibilitätskontrolle bei der Eingabe und ihre Ausgabe auf Befundformularen in Etikettenform. Untersuchungsbezogenes Abfragen der gespeicherten Daten ist möglich.

Dieses einfache System ist auf allen IBM-kompatiblen Rechnern mit geeigneter Konfiguration lauffähig.

## Zur Eichung einer trockenchemischen Glucosebestimmung mittels der Hexokinase-Referenzmethode

T. O. Kleine und D. Rytlewski

Funktionsbereich Neurochemie im Medizinischen Zentrum für Nervenheilkunde der Universität Marburg a. d. Lahn

Das Glucosefeld des Rapignost Total-Screen I. wurde mit Hilfe des Rapimat II/T (beide von Behringwerke Marburg) und einer im IBM PC-AT (mit Drucker und Monitor) gespeicherten 10-Punkt-Eichkurve wie folgt geeicht:

In Aqua bidest. gelöste D(+)-Glucose (E. Merck 8337, wasserfrei) wurde nach 10 min Inkubation bei 70°C mit einem Urinpool I von 20 Personen (Ascorbinsäure- und alle Rapignost-Screen-Felder waren negativ) (Eichkurve I) oder mit steriler 0,15 mol/l NaCl-Lösung (Eichkurve II) verdünnt und die Glucosekonzentrationen mit der Hexokinase-Methode (vgl. 1, 2) gemessen: Nachweisgrenze (3 Standardabweichungen von Rapimat Urine Control level I (normal) Behringwerte bzw. von 0,15 mol/l NaCl): 13 bzw. 3 mg/dl (n = 20), Meßbereich: 0–200 mg/dl (Eichkurve I verlief flacher als Eichkurve II). Die serielle Impräzision lag mit hohen Glucose-Standards (170–200 mg/dl) bei 23–25% VK, mit mittleren (40–75 mg/dl) bei 10–11% VK und mit niedrigen (8–14 mg/dl) bei 15–29% VK.

Die Korrelation von Verdünnungen eines menschlichen Urinpools II mit ausgedehnter Glucose mit Urinpool I (Bedingungen s. o.), gemessen mittels Rapimat-Eichkurve I (y) und der Hexokinase-Methode (x), war mit  $y = +2,5 + 0,87x$  (n = 64), r = 0,98, in einem Bereich von 13–108 mg/dl ausreichend.

Zur Eichung des Glucosefeldes des Rapignost Total-Screen L auf Liquor cerebrospinalis-Proben ist ein Liquorpool ungeeignet, da Liquor Glucose und Ascorbinsäure enthält. Deshalb wurden folgende Verdünnungen von eingewogener D(+)-Glucose (E. Merck 8337, 15639) hergestellt und mit der Rapimat-Eichkurve II (y) und der Hexokinase-Methode (x) nach 5–6 min (a) und nach ca. 60 min (b) nach Lösung gemessen und korreliert:

Lösungsmittel I: 0,15 mol/l NaCl + Kontrollogen L (1+99; Behringwerke):

$$a) y = -1,0 + 0,22x \quad (n = 18), r = 0,99;$$

$$b) y = -7,4 + 1,24x \quad (n = 18), r = 0,93;$$

Lösungsmittel I plus 5 g/l Na-Dodecylsulfat (p.A. Serva):

$$a) y = +2,4 + 0,24x \quad (n = 34), r = 0,98;$$

$$b) y = +2,6 + 1,10x \quad (n = 28), r = 0,98;$$

Lösungsmittel I plus 10 g/l Triton X-100 Serva):

$$a) y = -0,4 + 0,13x \quad (n = 36), r = 0,98;$$

$$b) y = +6,9 + 0,28x \quad (n = 34), r = 0,93.$$

Hieraus ist zu folgern, daß native unbehandelte Glucoselösungen mit Proteinzusatz (z.B. 0,4 g/l)  $\pm$  Detergentien zur besseren Benetzung des Glucosefeldes sich nicht zur Eichung des Rapignost Total-Screen eignen, da nach zu kurzer Vorinkubation zu niedrige Werte mit der Rapimat-Eichkurve II erhalten wurden. Dies läßt sich u. a. auf eine ca. 100mal langsamere Reaktionsgeschwindigkeit der Glucose-Oxydase (3) (EC 1.1.3.4) des Glucosefeldes (4) für die in frischer Lösung vorliegende  $\alpha$ -D(+)-Glucose im Vergleich zur  $\beta$ -D(+)-Glucose zurückführen, erstere wird in wäßriger Lösung in letztere umgewandelt (vgl. 5). Triton X-100 zeigte dabei einen Hemmeffekt. Des weiteren sind Matrixefflüsse zu berücksichtigen, da mit der Rapimat-Eichkurve I 2- bis 4mal höhere Werte errechnet wurden.

Schrifttum:

- SCHMIDT, F. H.: In: 3. Internationales Donau-Symposium über Diabetes mellitus. 1973. Verlag W. Maudrich Wien.
- Manual of the aca discreet clinical analyzer (1987) Du Pont Wilmington, Del., USA PN 710707902 Rev. F.
- BERGMAYER, H. U., BERNT, E.: Methoden der enzymatischen Analyse, Band II (3. Auflage) Verlag Chemie Weinheim/Bergstr. 1974, S. 1250.
- Packungsbeilage zu Rapignost Total-Screen L. Behringwerke 1988.
- ELIEL, E. L.: Stereochemie der Kohlenstoffverbindungen. Verlag Chemie Weinheim/Bergstr. S. 76 (1966).

Mit finanzieller Unterstützung durch den Bundesminister für Forschung und Technologie: Förderungskennzeichen 01 ZR 8513.

## Eingegangene Abstracts von Symposien, Diagnostikforen und Plenarvorträgen

### Gerinnungsanalytik in der Notfallmedizin

M. Fischer, Wien – Österreich

Zentrallaboratorium Krankenhaus der Stadt Wien-Lainz

Als Basisuntersuchungen der Gerinnungsanalytik in der Notfallmedizin sind Thromboplastinzeit, aktivierte Thromboplastinzeit, Thrombinzeit, quantitative Fibrinogenbestimmung und Thrombozytenzählung allgemein anerkannt. Dies hat auch eine von uns jüngst erhobene Umfrage an Klinischen Abteilungen und Instituten für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin bestätigt. Interessant war aber ein weiterer Aspekt dieser Umfrage, und zwar gerade in der Notfall- und Intensivmedizin der Wunsch nach diagnostischen Möglichkeiten zur raschen Erkennung hyperkoagulabiler bzw. präthrombotischer Zustände im Sinne einer Verbrauchskoagulabilität bzw. einer Thrombophilie. Einige Methoden, wie Antithrombin III, D-Dimer, Thrombin-Antithrombin III-Komplex, Plasminogen Aktivator Inhibitor, Faktor X<sub>a</sub>, welche für den Kliniker in einer sinnvollen Zeitspanne ein brauchbares Ergebnis liefern, werden besprochen.

Zusammenfassend läßt sich aber feststellen: Nicht die Zahl der Untersuchungen, sondern die Erfahrung – kombiniert die klinische Erfahrung wie die labormedizinische Erfahrung – sind für die Diagnostik in der Blutgerinnung von enormer Wichtigkeit.

### Referenzmethoden zur Bestimmung von Harnsäure, Kreatinin, Cholesterin und Triglyceriden

D. Stöckl<sup>1</sup> und H. Reinauer<sup>2</sup>

<sup>1</sup> INSTAND e. V., Johannes-Weyer-Straße 1, 4000 Düsseldorf 1

<sup>2</sup> Abteilung für klinische Biochemie des Diabetes-Forschungsinstitutes an der Universität Düsseldorf, Auf'm Hennekamp 65, 4000 Düsseldorf 1

Für die Bestimmung von Harnsäure, Kreatinin, Cholesterin und Triglyceriden in menschlichem Serum werden Referenzmethoden (1) beschrieben, die auf dem Prinzip der massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsanalyse (ID-MS) beruhen.

Für Kreatinin und Harnsäure werden zusätzlich Methoden beschrieben, deren Grundlage die Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) bildet. Die Ergebnisse der ID-MS- und HPLC-Methoden für Harnsäure und Kreatinin weichen im Mittel nicht mehr als 1–2% voneinander ab.

Als Kalibriermaterialien werden primäre Standardmaterialien des National Bureau of Standards (NBS) verwandt. Richtigkeitskontrollen werden mit Hilfe des NBS-Referenzserums durchgeführt.

Alle Volumina werden durch Wägung ermittelt.

Unter diesen Voraussetzungen zeigen alle Methoden eine Unrichtigkeit und eine Unpräzision von weniger als 3%.

Schrifttum:

1 Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien. Dt. Arztebl. 85, A 699 - A 712 (1988).

V 3

## Referenzmethoden zur Bestimmung von Glucose

F. Susanto und H. Reinauer

Abteilung für Klinische Biochemie des Diabetes-Forschungsinstitutes an der Universität Düsseldorf, Auf'm Hennekamp 65, 4000 Düsseldorf 1

Eine Referenzmethode zur Bestimmung von Glucose mit Hilfe der Isotopverdünnung-Massenspektrometrie wird beschrieben.

Die polare Glucose wird zunächst zu einem Glucosenitripentacetat-Derivat umgesetzt. Als interner Standard werden zwei verschiedene stabil isotop markierte Glucose, ( $U-^{13}C$ ) Glucose und D-Glucose-6,6- $d_2$ , verwendet.

Die Fragmentionen m/e 187 von Glucose, m/e 189 deuterierten und m/e 191 des  $^{13}C$ -markierten Standards werden für die Quantifizierung mittels Multiple Ion Detector des Massenspektrometers verwendet.

Aus dem Verhältnis der Peakflächen des nicht markierten und des isotopmarkierten Glucosederivates und aus der bekannten Menge an markierter Standardsubstanz, die zu Beginn der Analyse zugegeben wurde, wird die Menge an endogener Glucose in der Serumprobe berechnet. Die Präzision der Methode, ermittelt aus Mehrfachanalysen ( $n = 7$ ), zeigte einen VK  $< 1\%$ .

Unter Anwendung der hier beschriebenen Referenzmethode wurde in 10 Seren zurückliegender Ringversuche Glucose bestimmt, und die Ergebnisse der Referenzlaboratorien mit den massenspektrometrischen Resultaten verglichen.

Diese Methode ist zur Bestimmung der Zielwerte in Ringversuchsproben sehr gut geeignet.

Als weiteres Beispiel, diesmal in vivo, wird die Untersuchung der Glucoseumsatzrate, Glucoseoxidation sowie Glucoseclearance und Recycling bei Menschen dargestellt.

Schrifttum:

TSERNIG, K., KALHAN, S. C.: Am. J. Physiol. 245, 476-482 (1983).  
SUSANTO, F., HUMFELD, S., REINAUER, H.: Lab.med. 11, 171 (1987).

V 4

## Aktuelle Diagnostik und Therapiemöglichkeiten bei Thromboseneigung

Monika Barthels

Abteilung Hämatologie und Onkologie, Medizinische Hochschule Hannover

Die Bereitschaft zu venösen Thromboembolien beruht in einem Teil der Fälle auf äußeren Einflüssen (z. B. bestimmte Operationen). Z. T. ist sie konstitutionell bedingt (z. B. Alter, Körpergewicht) oder durch zugrundeliegende Erkrankungen begünstigt (z. B. Neoplasien, Autoimmunerkrankungen). Neuerdings weiß man, daß auch genetisch bedingte Hämostasedefekte des Blutes venöse Thromboembolien verursachen können. Es handelt sich hierbei vorzugsweise um Funktionseinschränkungen der physiologischen Inhibitoren Antithrombin, Protein C und den Cofaktor des letzteren, Protein S. Diese Funktionseinschränkungen können zum einem auf einem echten Mangel beruhen (Aktivität und Konzentration gleichermaßen vermindert), zum anderen handelt

es sich um fehlstrukturierte Moleküle mit verminderter Aktivität aber normaler Plasmakonzentration. Die Aktivität liegt zumeist in subnormalen Bereichen. Weitere angeborene Ursachen einer erhöhten Thrombosebereitschaft sind eine Dysplasminogenämie oder Plasminogenmangel und eine Dysfibrinogenämie. Ca. 80% der Patienten mit einer der genannten angeborenen Störungen haben noch vor dem 40. Lebensjahr zumindestens ein thromboembolisches Ereignis. Ca. 4% stationärer Patienten mit venösen Thromboembolien dürften einen dieser Defekte haben. Am häufigsten scheint der Protein S-Mangel zu sein, dann Protein C-Mangel und Antithrombin III-Mangel. Von besonderem Interesse ist z. T. ferner der seltene sog. „Lupusinhibitor“, der gegen die gerinnungsaktiven Phospholipide gerichtet ist. Bei Vorliegen eines Lupusinhibitors werden häufiger thromboembolische Ereignisse sowie Aborte beobachtet. Die Auswirkungen thromboembolischer Ereignisse können heutzutage im Blut nachgewiesen werden anhand des vermehrten Anfall thrombinbedingter Reaktionsprodukte. Zu nennen sind hier der Thrombin-Antithrombin-Komplex, Fibrinopeptid A, Fibrinmonomere, fibrinspezifische Spaltprodukte des Plasmin (D-Dimere) aber auch Fibrinogenspaltprodukte als Ausdruck einer reaktiven systemischen Lyse sowie Plättchenfaktor 4 als Zeichen des vermehrten Plättchenzerfalls.

V 5

## Trends in der Gerinnungsdiagnostik: Neue Möglichkeiten zur Überwachung der Thromboseprophylaxe

H. Pelzer, F. Dati und W. Stüber

Forschungslaboratorien der Behringwerke AG

Die frühzeitige Diagnose einer latenten thrombotischen Erkrankung ist mit konventionellen Gerinnungsanalysen (z. B. Thromboplastinzeit, aPTT) in vielen Fällen nicht möglich. Es bedarf spezieller Methoden, um Aktivierungsprodukte bzw. Marker der in vivo ablaufenden Thrombinbildung zu erfassen. Prothrombinfragment F1+2 (PTF) und Thrombin-Antithrombin III-Komplex (TAT) stellen Aktivierungsprodukte dar, die unter Einwirkung von Faktor  $X_a$  auf Prothrombin bzw. Thrombin auf Antithrombin III gebildet werden. Es wurden zwei hochempfindliche Enzymimmunoassays entwickelt die eine exakte Quantifizierung von PTF bzw. TAT im Plasma ermöglichen. Die Tests sind nach dem „Sandwich-Prinzip“ aufgebaut und verwenden spezifische Testphasen-Antikörper gegen PTF bzw. Thrombin. In Citratplasma gesunder Erwachsener wurden folgende Referenzwerte bestimmt (Median, Bereich): 0,6 nM/l, 0,45-0,75 nM/l für PTF; 1,8 µg/l, 0,8-4,0 µg/l für TAT. Bei verschiedenen Patientengruppen mit gesteigerter Aktivierung des Haemostasesystems wurden signifikant erhöhte Konzentrationen beider Parameter gemessen. Ein Anstieg der TAT-Werte zeigte sich bei Patienten mit DIC (Bereich: 2-103 µg/l), Venenthrombose (2-26 µg/l), Lungenembolie (3,5-26 µg/l), Lebererkrankung (2-60 µg/l), Leukämie (2-60 µg/l). Erhöhte PTF-Konzentrationen wurden bei Patienten mit DIC bzw. Venenthrombose bestimmt (Bereich: 1-5 nM/l). Bei Patienten mit Myocardinfarkt war nach Beginn der Lyse-Therapie ein Anstieg von TAT festzustellen; bei erfolgreicher Behandlung kam es zur Normalisierung der TAT-Spiegel, während bei Reocclusion konstant hohe TAT-Konzentrationen gemessen wurden. Bei Patienten unter oraler Antikoagulation in der stabilen Phase wurden keine erhöhten TAT-Spiegel bestimmt. Hingegen wurden signifikant erniedrigte PTF-Konzentrationen gemessen (Bereich: 0,05-0,3 nM/l).

Die Resultate belegen, daß die vorgestellten Methoden neue Möglichkeiten im Gebiet der Gerinnungsdiagnostik eröffnen. PTF und TAT sind geeignete Parameter zur Erkennung sowohl hyper- als auch hypocoagulatorischer Zustände. Es ist anzunehmen, daß beide Parameter geeignete Indikatoren darstellen, sowohl Lyse- als auch Antikoagulationstherapie zu überwachen.

## Kinetische Untersuchungen des plasmatischen Gerinnungssystems

P. Baumann<sup>1</sup> und C. C. Heuck<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universitätskinderklinik, Heidelberg

<sup>2</sup> WHO, Genf

Die konventionellen Untersuchungstechniken zum Nachweis der Gesamtaktivität des plasmatischen Gerinnungssystems oder der Gerinnungsaktivität eines einzelnen Gerinnungsfaktors beschränken sich auf die Bestimmung des Zeitraums zwischen der Aktivierung der Gerinnungskaskade und dem Auftreten eines Meßsignals in Folge der Bildung von Fibrinaggregaten oder der Hydrolyse eines chromogenen Substrates. Diese eindimensionalen Meßverfahren lassen zwar globale Rückschlüsse auf die ablaufenden Reaktionen zu, weiterführende Aussagen können hingegen erst aus Vergleichsmessungen oder Meßreihen gewonnen werden.

Demgegenüber erhält man ohne einen weiteren experimentellen Aufwand zusätzliche Aussagen aus einer Analyse der Kinetik des Reaktionsablaufs der Gerinnungskaskade. In diesen Untersuchungen wird nicht nur die bis zum Auftreten eines Meßsignals verstreichende Zeit, sondern der Gesamtverlauf der Umsetzung eines Substrats (d. h. Fibrinogen oder chromogenes Substrats) gemessen und mit Hilfe von nicht-linearen Angleichungsverfahren der Verlauf einer Extinktionskurve durch eine empirische Gleichung beschrieben. Die in einer Vielzahl von Meßpunkten enthaltene Information wird hierbei auf wenige Konstanten kondensiert, deren Größe den Verlauf einer Extinktionskurve hinreichend charakterisieren. Aus diesen Kenngrößen können folgende Meßgrößen unmittelbar bestimmt werden:

- Thromboplastinzeit bzw. partielle Thromboplastinzeit
- Fibrinogenkonzentration
- Art und Ausmaß eines Einzelfaktormangels.

Weiterhin kann die Aktivität von heparinartigen Antikoagulantien ermittelt werden.

Neben diesen praktischen Aspekten bietet diese Methodik Möglichkeiten zur Prüfung der Regelmechanismen im Gesamtgeschehen der Aktivierung des Gerinnungssystems an, ohne daß ein gezielter Eingriff auf einem bestimmten Niveau der Reaktionskaskade erforderlich wäre.

Die bisherigen aus Untersuchungen von Plasmen mit einem Einzelfaktormangel gewonnenen Erfahrungen lassen vermuten, daß mit einer Weiterentwicklung des Auswerteverfahrens auch gezielte Aussagen bei Messungen von Plasmen mit kombinierten Faktormangelzuständen möglich sind.

## Zellzählung mit zusätzlicher Dreipopulations- und Fünfpopulationsdifferenzierung des peripheren Blutes: Ein Vergleich von Sysmex E-4000 und NE-8000

J. W. J. van Wersch und C. Bank

Hämatologisches Laboratorium, De Wever Krankenhaus, 6401 CX Heerlen (NL)

Die Zellzähl- und Zelldifferenzierungsgeräte mit Dreipopulationsdifferenzierung wie der Sysmex E-4000 haben sich durch eine Verfeinerung der Diskriminierung der einzelnen Zellsorten erweitern lassen zu einem Fünfpopulationsdifferenzierer (Sysmex NE-8000). Die beiden genannten Maschinen haben die üblichen Zellparameter gemeinsam: die Parameter des kleinen Blutbildes mit Thrombozyten und neuere Parameter wie RDW, PDW, MPV und Plättchencrit (PCT). In dem Sysmex E-4000 wird die leukozytendifferenzierung in der Volumenverteilung als Dreierpopulation wiedergegeben: 1. kleine Zellen („small cell ratio“), repräsentativ für die Lymphozyten. 2. große Zellen („large cell ratio“) neutrophile Granulozyten und 3. mittelgroße Zellen

(„middle cell ratio“) (die Summe aus Monozyten, Eosinophilen und Basophilen). In dem Sysmex NE-8000 werden die Leukozyten in die fünf üblichen Fraktionen des normalen weißen Differentialblutbildes aufgeteilt: neutrophile, eosinophile, basophile Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten. In diesem neuen Konzept wird die Kombination der direkten Strommessung (Impedanzmethode) und der Radiofrequenzmessung genutzt gemacht, um respektive Zellvolumen, Kerngröße und Kerncharakter zu bestimmen. Wir haben in dieser Studie sowohl die Zellzählung als die Zelldifferenzierung der beiden Geräte miteinander verglichen. Die Reproduzierbarkeit ist für beide Geräte gut: der Variationskoeffizient für die Präzision in der Serie variiert im kleinen Blutbild für das neue NE-8000-Gerät im Referenzbereich zwischen 0,2 und 1,3%, im erniedrigten Meßwertbereich zwischen 0,3 und 3,0%. Für die 5-Partikeldifferenzierung wurden nur unwesentlich höhere VK's ermittelt. Die Variationskoeffizienten für die Präzision von Tag zu Tag lagen im Referenzbereich zwischen 0,6 und 1,7%, und im niedrigen Bereich zwischen 0,6 und 4,3%. Auch hier lagen die VK's für die Differenzierung nur wenig höher. Die Vergleichbarkeit der Parameter des kleinen Blutbildes auf beiden Geräten war hervorragend mit Werten der Korrelationskoeffizienten von über 0,98. Die Vergleichbarkeit der Neutrophilen und der Lymphozyten war mit dem Korrelationskoeffizienten von über 0,98 ebenfalls zufriedenstellend. Ein Vergleich mit der „middle cell ratio“ gab einen niedrigeren Korrelationskoeffizienten von 0,80. Auch die Signalisierungsfähigkeit für hämatologisch abnormale Befunde wurde getestet und für beide Geräte vergleichbar gut gefunden.

## Labordiagnostik bei Organtransplantationen

M. M. Müller

2. Chirurgische Universitätsklinik Wien, Klinische Biochemie

Mit der heute allgemein angewandten immunsuppressiven Kombinationstherapie mit Azathioprin (Aza), Cortison, Cyclosporin A (CyA) und Antithymocyten Globulin hat sich die Prognose von Patienten nach Organtransplantationen deutlich verbessert. An Komplikationen im postoperativen Verlauf stehen toxische Nebenwirkungen und Infektionen als Folge der immunsuppressiven Therapie sowie das Versagen des transplantierten Organes im Rahmen einer akuten Abstoßungskrise im Vordergrund.

1. *Therapeutisches Drugmonitoring:* Die Dosierung des Aza läßt sich einfach mittels Zählung der Leukozyten optimieren. CyA ist stark hepato- und nephrotoxisch. Daher ist in der postoperativen Phase neben der täglichen Kontrolle der Leber- und Nierenfunktion auch die Bestimmung von CyA unbedingt notwendig. Für die Bestimmung im Vollblut stehen neben HPLC-Methoden auch immunologische Tests (RIA, FIA) zur Verfügung, wobei bei letzteren meist in Abhängigkeit vom verwendeten Antikörper neben dem CyA auch seine Metabolite mit erfaßt werden. Nach den vorliegenden klinischen Erfahrungen sollen in der postoperativen Phase CyA-Vollblutspiegel von 150–350 µg/l und als Erhaltungsdosis 70–150 µg/l (HPLC-Werte) erreicht werden.

2. *Diagnostik der Infektionen:* Als Folge der immunsuppressiven Therapie besteht bei den Patienten eine besondere Anfälligkeit gegenüber viralen, bakteriellen und fungiziden Infektionen. Außer den spezifischen Erregernachweisen im Blut, Sputum und Harn werden bei viralen Infektionen in der Regel neben den Komplementbindungsreaktionen noch die spezifischen Immunglobuline IgM und IgG bestimmt. Als grobe und rasche Orientierungshilfe kann auch die Bestimmung der akuten Phasenproteine herangezogen werden.

3. *Diagnostik der Transplantatabstoßung:* Da jede akute Abstoßungskrise mit einer Einschränkung der Funktion des transplantierten Organs einhergeht, wird bei Empfängern von Nieren-, Leber- und Pankreastransplantaten die Bestimmung von Kreatinin, Bilirubin bzw. der Amylaseaktivität im Serum zur Monitoring verwendet. Bei Nierentransplantationen hat sich neben dem Anstieg der Konzentration des Serumkreatinins auch die Bestimmung von Harnenzymen (ALAT, AP, g-GT, Lysozym) als wertvoll erwiesen. Außerdem scheint auch die Bestimmung von Mediatoren (Interferon-g, Neopterin), akuter Phasenproteine und von

Lymphozytensubpopulationen zur Diagnostik der Abstoßung beitragen zu können, falls keine Infektion gleichzeitig vorliegt. Bei Nieren- und Herztransplantierten konnten gute Korrelationen zwischen den histologischen Abstoßungsgraden und den Serumkonzentrationen einiger akuter Phasenproteine, der Komple-

mentfraktionen C3 und C4, des Interferon-g sowie den Konzentrationen des Neopterin im Serum und Harn nachgewiesen werden. Die multivariate Betrachtung einiger Parameter ergibt diagnostische Validitäten von bis zu 92%.

# 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 Abonnementpreis von 11,- DM pro Ausgabe = 121,- 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

Lab. med. 5/89

Wir laden Sie ein, diese Fachzeitschrift für 2 Ausgaben kostenlos kennenzulernen.

Ein Jahresabonnement kostet 121,- 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.