

Ist die nephelometrische „Derived Fibrinogen“-Methode routinetauglich?

Is the nephelometric „Derived Fibrinogen“-method suitable for the routine laboratory?

N. Weinstock, H. Patscheke

Medizinisch-diagnostisches Institut, Städtisches Klinikum Karlsruhe

Zusammenfassung

Die Wertigkeit der nephelometrischen „Derived Fibrinogen“-Bestimmung wurde im Hinblick auf ihre Routinetauglichkeit in einem Gerinnungslabor untersucht. Die Variationskoeffizienten in der Serie und von Tag zu Tag lagen zwischen 3 % und 6 %. Die Methode war linear in einem Bereich von 40 mg/dl bis 1000 mg/dl. Die Korrelation mit der Clauss-Methode ist für Patienten mit stabiler Hämostase gut ($Y = 0,993 X - 24,5$ mg/dl, $r = 0,98$). Die Korrelation beider Methoden bei Patienten mit einer gestörten Hämostase ist erwartungsgemäß deutlich schlechter ($Y = 0,82 X + 49,6$ mg/dl, $r = 0,88$). Diese Diskrepanz beruht hauptsächlich auf unterschiedlichen, zum Teil entgegengesetzten (Fibrinogen-Fragment) Einflüssen von Fibrin-/Fibrinogen-Degradationsprodukten auf beide Methoden. Triglyceride ≤ 1500 mg/dl (17 mmol/l); Bilirubin ≤ 24 mg/dl (400 μ mol/l) und Hämoglobin ≤ 6 g/dl (60 g/l) sowie monoklonale Immunglobuline von vier Patienten mit einem Plasmocytom – inklusive eines Patienten mit M. Waldenström und einer monoklonalen IgM-Kappa-Konzentration von 49 g/l – zeigten keinen wesentlichen Einfluß auf die „Derived Fibrinogen“-Bestimmung.

Die „Derived Fibrinogen“-Methode ist eine gute und kostensparende Alternative für die Bestimmung des Fibrinogens in einem klinischen Routinelabor. In den wenigen unklaren Fällen wie sie u. a. bei Dysfibrinogenämien, Hyperfibrinolyse oder Verbrauch auftreten können, ist eine zusätzliche Bestimmungsmethode hilfreich, um diese klinischen Zustände besser interpretieren zu können.

Schlüsselwörter

Derived Fibrinogen – Fibrinogen – Hämoglobin – Triglyceride – Lipämie

Summary

Usefulness of the nephelometric „derived fibrinogen“ determination was considered with respect to the routine needs of a hemostaseological laboratory. Within-run and day-to-day coefficients of variation were 3 % to 6 %. The method was linear from 40 to 1000 mg/dl. For patients with balanced hemostasis, correlation with the Clauss method was good ($Y = 0,993 X - 24,5$ mg/dl, $r = 0,98$), but was much lower ($Y = 0,82 X + 49,6$ mg/dl, $r = 0,88$) for patients with an unbalanced hemostasis, as was expected. This is mainly due to divergent influences of fibrin(ogen) degradation products on the „derived fibrinogen“ and the Clauss methods. Triglycerides ≤ 1500 mg/dl (17 mmol/l), bilirubin ≤ 24 mg/dl (400 μ mol/l), hemoglobin ≤ 6 g/dl (60 g/l), and monoclonal immunoglobulins of four patients with plasmocytoma – including a M. Waldenström with a monoclonal concentration of IgM-Kappa = 49 g/l – had no substantial influence on „derived fibrinogen“.

„Derived fibrinogen“ is a good money-saving alternative for the workload of a routine hemostaseological laboratory. In a few cases like dysfibrinogenemia, hyperfibrinolysis and DIC, an additional method for fibrinogen determination could help to better understanding of such clinical situations.

Keywords

Derived fibrinogen – fibrinogen – hemoglobin – triglycerides – lipemia

Einleitung

Fibrinogen, ein Akutphasenprotein, erhöht die Plasma- und Blutviskosität, fördert die Aggregation der Plättchen [1] und Erythrozyten [2, 3] und stimuliert die Migration [4] und Proliferation der glatten Muskelzellen [5, 6]. Ablagerungen von Fibrinogen, Fibrin und deren Abkömmlingen

werden sowohl in den atheromatösen Plaques als auch in den venösen und arteriellen Verschlüssen nachgewiesen [7–9]. Ergebnisse neuerer epidemiologischer Studien zeigen, daß erhöhte Fibrinogenkonzentrationen mit einem erhöhten thromboembolischen Risiko korrelieren [10–14]. Die beobachteten Erhöhungen können sowohl erworben [15–17] als auch durch genetischen Polymorphismus [18] bedingt sein. Die Fibrinogenkonzentration gewinnt zunehmend an Bedeutung als ein zusätzlicher prädiktiver Marker für arterielle und venöse Thrombosen.

Eine einheitliche Methode für die Fibrinogenbestimmung konnte sich bisher nicht durchsetzen. In verschiedenen Studien [10–14] wurden zur Bestimmung der Fibrinogenkonzentration unterschiedliche Meßmethoden eingesetzt wie:

1. Fällung von Fibrin mit anschließendem Auswaschen des Präzipitats und Bestimmung des gefällten Eiweiß [10] nach Ratnoff und Menzie [19] in der Variante nach Blombäck [20],
2. Streulichtmessungen von Hitzeaggregaten in verdünntem Plasma bei strenger Einhaltung von pH und Temperatur [11],
3. Auswiegen des gefällten und gewaschenen Thrombus [12],
4. Fällung und Gesamteiweißbestimmung [20] in der Variante nach Swain [21] sowie
5. die Clauss-Methode [14, 16].

In den Routinelaboratorien ist bislang die Clauss-Methode [22] etabliert, dies weist aber zahlreiche Nachteile auf:

1. Gemessen wird nicht Fibrinogen, sondern die Zeit bis zur Bildung eines „meßbaren“ Gerinnsels. Sämtliche Polymerisationsstörungen gehen in das Meßergebnis als falsch niedrige Fibrinogenkonzentrationen ein. Besonders ausgeprägt ist dieser Einfluß unter der Streptokinase-Lyse. Unter dieser Therapie ist in einigen Fällen mit der Clauss-Methode, trotz normaler bis mäßig erniedrigter Fibrinogenkonzentrationen, kein meßbares Fibrinogen zu erfassen.
2. Die Methode ist schlecht automatisierbar und als Endpunktmethode schlecht standardisierbar.
3. Das Plasma muß manuell verdünnt werden und
4. wegen des eingeschränkten Linearitätsbereiches sind häufig Nachverdünnungen erforderlich.
5. Das Ergebnis muß über eine Wertetabelle oder Eichkurve abgelesen werden.

Abkürzungen:

APTT	=	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit
AT III	=	Antithrombin III
DF	=	Derived Fibrinogen
FSP	=	Fibrinspaltprodukte
PT	=	Prothrombinzeit
TZ	=	Thrombinzeit

6. Von den gerinnungsphysiologischen Bestimmungsmethoden (PT, APTT, Thrombinzeit und Fibrinogen) ist die Methode nach Clauss sowohl vom Reagenzienaufwand wie von der Personalbindung bei weitem die teuerste Methode.

In den letzten Jahren sind aus diesen Gründen vermehrt neue Methoden für das Routinelabor entwickelt und zur Marktreife gebracht worden [23–29]. Von diesen Methoden ist die „Derived Fibrinogen“ (DF)-Methode die kostengünstigste, da sie bei jeder Bestimmung der Prothrombinzeit automatisch mitgeführt werden kann, ohne zusätzliche Material- oder Personalkosten zu verursachen.

Die Grenzen und Vorteile dieser Methode werden noch kontrovers diskutiert.

Material und Methoden

Patienten und Probengewinnung

Alle Patienten stammten aus dem stationären oder ambulanten Bereich unseres Klinikums. Das Blut wurde in Monovetten® abgenommen. Citratplasma wurde aus 9 Teilen Vollblut und 1 Teil 0,11 mol/l Trinatriumcitrat-Lösung durch Zentrifugation bei 3900 g gewonnen. Alle Proben von Plasmocytompatienten, von Patienten mit einem Verschlussikterus oder einer Hypertriglyceridämie wurden mit Einwilligung der Patienten abgenommen, innerhalb von vier Stunden weiterverarbeitet oder sofort schockgefroren. Die Plasmocytompatienten kamen aus der hämatologisch-onkologischen Ambulanz unserer Klinik.

Klinisch-chemische Bestimmungen

Bilirubin, Triglyceride und Gesamteiweiß wurden an einem Olympus AU-5000, Fa. Olympus (Hamburg), mit Reagenzien der Fa. Merck (Darmstadt) bestimmt. Die Eiweißelektrophoresen wurden an einem Olympus Hite System der Fa. Olympus (Hamburg) durchgeführt. Für die nephelometrischen Immunglobulinbestimmungen und die Immunfixationselektrophoresen wurden Geräte und Reagenzien der Fa. Beckman (München) eingesetzt. Die Quantifizierung der monoklonalen Anteile wurde über eine Kurvenanalyse der Eiweißelektrophorese durchgeführt nach einem multizentrisch evaluierten Verfahren (multizentrische Therapiestudie; Multiples Myelom MM02 24 (BMFT) (1990)).

Fibrinogenbestimmungen

Fibrinogen wurde nach Clauss an einem Schnitger-Gross-Koagulometer der Fa. Amelung (Lemgo) mit dem Fibrinogen-Reagenz der Fa. Boehringer Mannheim (Mannheim) bestimmt. Die „Derived Fibrinogen“-Metho-

de (DF-Methode) wurde an einem ACL 300R der Fa. IL (München) mit dem Reagenz PT-Fibrinogen der gleichen Firma durchgeführt. Zur Bestimmung von Präzision und Richtigkeit wurden Standard-Human-Plasma der Fa. Behring (Marburg), Verify-U und -LF der Fa. OrganonTektika (Eppelheim), CoagCal N und Coag Trol P der Fa. Baxter (Unterschleißheim) als Untersuchungsmaterial eingesetzt.

Um die Linearität der Methode zu überprüfen, wurden Patientenplasmen mit hohen (> 1000 mg/dl) und niedrigen (< 100 mg/dl) Fibrinogenkonzentrationen in unterschiedlichen Portionen gemischt. Sie wurden sowohl unverdünnt als auch mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt gemessen. Vom Meßgerät der Firma IL (ACL) werden Konzentrationen über 800 mg/dl invers angezeigt, Konzentrationen über 1000 mg/dl gesperrt. Um mögliche Störeinflüsse auf die Fibrinbildung zu erkennen, überprüft das Gerät zusätzlich, ob am Ende der Gerinnselformung das Streulichtsignal stabil bleibt. Damit wird gewährleistet, daß Störfaktoren wie eine Lyse oder ein Nachgerinnen der Probe erkannt werden und die ermittelte Fibrinogenkonzentration nicht falsch angegeben wird. Ist das Signal nicht stabil, wird die Angabe der Konzentration verweigert.

Bestimmung von DF in Gegenwart hoher Triglyceridkonzentrationen

Bei einer 73jährigen Patientin mit eingeschränkter Nierenfunktion und entgleistem Diabetes mellitus (Blutglukose 550 mg/dl; 30,53 mmol/l) wurde Citratplasma mit einer Triglyceridkonzentration von 1572 mg/dl (17,92 mmol/l) und einer Fibrinogenkonzentration von 355 mg/dl unverdünnt sowie 1 + 1 und 1 + 4 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und mit steigenden Mengen eines Patientenplasmapools mit normaler Triglyceridkonzentration (120 mg/dl; 1,37 mmol/l) und einer Fibrinogenkonzentration von 559 mg/dl gemischt. Dabei ergeben sich in den Mischplasmen berechnete Fibrinogenkonzentrationen zwischen 539 und 339 mg/dl. Die aus Vierfachbestimmungen gemittelten Konzentrationen von „Derived Fibrinogen“ wurden mit den berechneten Werten verglichen. Die Wiederfindung wurde als der Prozentsatz der gefundenen, bezogen auf die berechneten Fibrinogenkonzentrationen ermittelt (Abb. 5).

Bestimmung von DF in Gegenwart hoher Bilirubinkonzentrationen

Von einem Patientenserum mit einer Bilirubinkonzentration von 24,1 mg/dl (412,1 μ mol/l) wurden 8 Teile mit 2 Teilen Citratlösung versetzt. Das Citratserum und daraus mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellte Verdünnungen wurden mit steigenden (von 10 bis 90 %) Volumenanteilen von Poolplasma mit einer Bilirubinkonzentration von 0,4 mg/dl (6,84 μ mol/l) und einer Fibrinogenkonzentration von 533 mg/dl versetzt. Die Wiederfindung wurde als der Prozentsatz der gefundenen, bezogen auf die berechneten Fibrinogenkonzentrationen ermittelt (Abb. 6).

ogenkonzentration von 533 mg/dl versetzt. Die Wiederfindung wurde als der Prozentsatz der gefundenen, bezogen auf die berechneten Fibrinogenkonzentrationen ermittelt (Abb. 6).

Bestimmung von DF in Gegenwart hoher Hämoglobinkonzentrationen

Aus Citratblut wurden durch Zentrifugation die zellulären Bestandteile isoliert und viermal mit 4–5 Volumenanteilen physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden mit 1 Teil destilliertem Wasser und 0,5 Anteilen Chloroform 3 Minuten kräftig geschüttelt und anschließend 20 min bei 3000 g zentrifugiert. 20 μ l des Überstandes wurden mit 5 ml Transformationslösung (Reaktionslösung Nr. 9405, Diagnostica Merck, Darmstadt) versetzt und die Hämoglobin (Hb)-Konzentration photometrisch bestimmt. Das Hämolyat mit einer Hb-Konzentration von 12,1 g/dl (7,51 mmol/l) und daraus mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellte Verdünnungen wurden jeweils im Verhältnis 1 + 1 mit einem Citratplasmapool mit einer Fibrinogenkonzentration von 376 mg/dl versetzt und die Fibrinogenkonzentration bestimmt. Die Wiederfindung wurde als der Prozentsatz der gefundenen, bezogen auf die berechneten Fibrinogenkonzentrationen ermittelt (Abb. 7).

Bestimmung von DF in Gegenwart hoher monoklonaler Immunglobulin-Konzentrationen

Plasmaproben von 4 Patienten mit einem Plasmocytom (Tabelle 1) wurden mit 4 Poolplasmen aus der allgemeinen Routine des Hämostaselabors verdünnt. In den gepoolten Plasmen waren APTT, PT (Quick), TZ und AT III im Referenzbereich. Die Fibrinogenkonzentrationen in den 4 Poolplasmen waren: 330 mg/dl für Patientenplasma 1, 572 mg/dl für Patientenplasma 2, 421 mg/dl für Patientenplasma 3 und 360 mg/dl für Patientenplasma 4. Diese Fibrinogenkonzentrationen wurden gewählt, um die Bestimmungen in den Patient/Pool-Mischplasmen in einem möglichst optimalen Meßbereich (200–550 mg/dl

Tabelle 1. Immunglobulin (Ig-) und Fibrinogen (Fg)-Konzentrationen bei 4 Patienten mit Plasmacytom. Referenzbereich des Kappa/Lambda-Quotienten 1,2–2,7

Patient	Ig-Typ	Ig-Konz. mg/dl	Kappa/Lambda Quotient	Fg-Konz. mg/dl
1	IgM-Kappa	4900	47,8	130
2	IgA-Lambda	4500	0,08	147
3	IgG-Lambda	2900	0,05	510
4	IgG-Lambda	2600	0,32	250

Fibrinogen) durchführen zu können. Um einen Einfluß der monoklonalen Immunglobuline auch im unteren Konzentrationsbereich erfassen zu können und um nicht-lineare Matrixeffekte zu untersuchen, wurden die Plasmen der Plasmocytompatienten zusätzlich mit physiologischer Kochsalzlösung 1 + 1 und 1 + 3 verdünnt eingesetzt. Die Konzentrationen der Immunglobuline variierten damit in den Mischplasmen zwischen 234 mg/dl und 4410 mg/dl. Die Wiederfindung von DF wurde als der Prozentsatz der gefundenen, bezogen auf die berechneten Fibrinogenkonzentrationen ermittelt (Tabelle 3).

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte nach der Methode von Passing und Bablok.

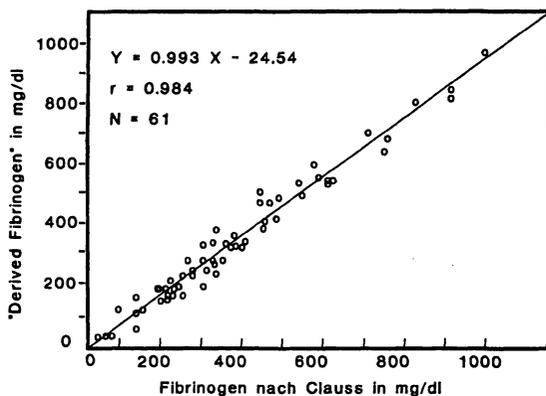


Abb. 1. Vergleich von Fibrinogenbestimmungen nach der DF- und der Clauss-Methode für ein „gerinnungsnormales“ Patientenkollektiv.

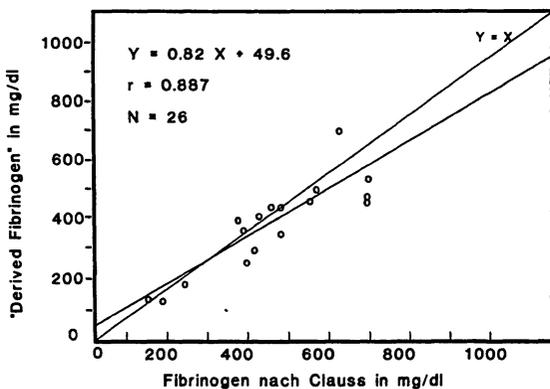


Abb. 2. Vergleich von Fibrinogenbestimmungen nach der DF- und der Clauss-Methode für ein Patientenkollektiv mit aktivierter Hämostase.

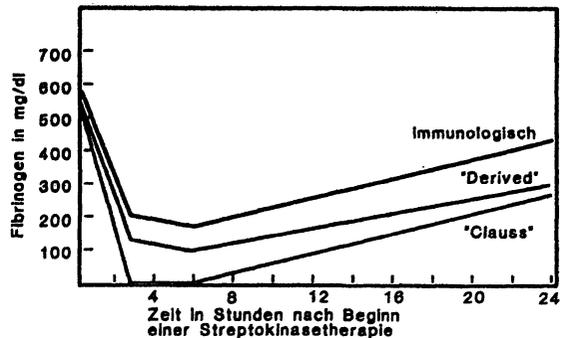


Abb. 3. Verlauf der Fibrinogenkonzentrationen, die während einer Streptokinase-Therapie mit 3 verschiedenen Methoden gemessen wurden.

Ergebnisse

Korrelation der Fibrinogenergebnisse mit der DF-Methode und der Clauss-Methode

Die vergleichende Bestimmung von Fibrinogen mit der DF- und der Clauss-Methode in Patientenplasmen, in denen die Prothrombinzeit (Quick-Test), die APTT, die Thrombinzeit, die FSP, und AT III Ergebnisse im Referenzbereich aufwiesen, zeigt Abbildung 1. Bei diesen Patienten war eine gute Korrelation bis zu Fibrinogenkonzentrationen von 1000 mg/dl gegeben. Vergleichbare Resultate wurden mit unterschiedlichen Reagenzienchargen für das Prothrombin-Reagenz über mehrere Jahre erhalten. Bei Patienten mit gestörter Gerinnung, darunter postoperative Patienten einer Intensivstation, Patienten von onkologischen Stationen und Patienten unter fibrinolytischer Therapie mit pathologischen Gerinnungsparametern, korrelieren dagegen beide Methoden erwartungsgemäß weniger gut (Abb. 2). Insbesondere bei Patienten unter einer Lysetherapie treten deutliche Diskrepanzen [27, 28, 30, 31] auf (Abb. 3).

Impräzision und Linearität der DF-Methode

Die Impräzision in der Serie wurde für eine hohe und eine niedrige Fibrinogenkonzentration in zwei Patientenplasmen bestimmt (Tabelle 2). Die Serienlänge von

Tabelle 2. Präzision der Fibrinogenbestimmung nach der DF-Methode in der Serie mit 2 Patientenplasmen und von Tag zu Tag mit Kontrollplasma Verify-U-N

	x mg/dl	s mg/dl	VK	N
Patient 1	569,4	12,3	2,2	18
Patient 2	78,2	3,3	4,3	18
Verify-U-N	251,4	14,0	5,6	4623

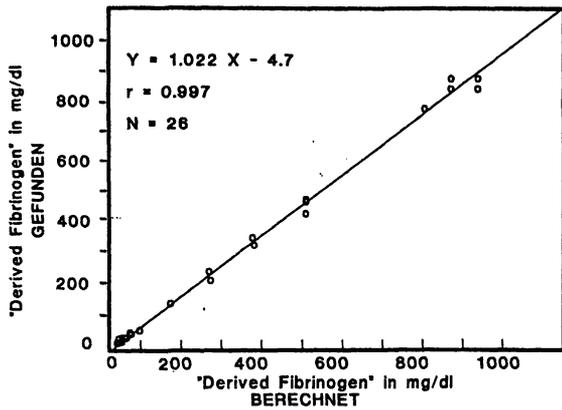


Abb. 4. Linearitätsprüfung der DF-Methode mit Mischplasmen und verdünnten Plasmen.

N = 18 entspricht der Höchstzahl der auf einem Reaktionsrotor maximal durchführbaren Patientenanalysen. Für die Impräzision von Tag zu Tag wurden die im geräteeigenen Qualitätskontrollprogramm gespeicherten Daten der Richtigkeitskontrolle herangezogen. Zur Auswertung kamen 4623 Messungen über einen Zeitraum von 5 Monaten, in denen keine Zwischenkalibration erforderlich war (Tabelle 2). Mit Variationskoeffizienten auch bei niedrigen Fibrinogenkonzentrationen von unter 5 % in der Serie und von 5,6 % von Tag zu Tag wurde eine gute Präzision erreicht. Sowohl in unverdünntem als auch in dem mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnten Mischplasma fanden wir im Meßbereich von 40–990 mg/dl eine gute Linearität (Abb. 4).

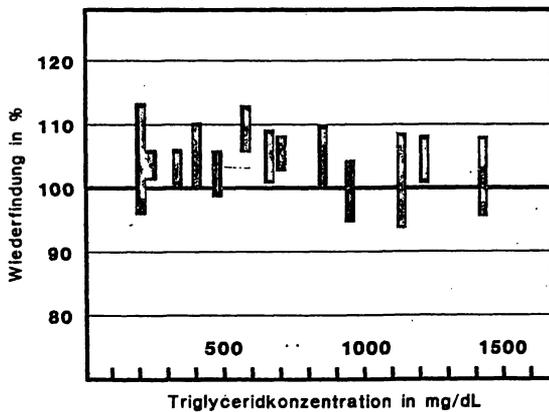


Abb. 5. Einfluß der Triglyceridkonzentration auf die Wiederfindung des „Derived Fibrinogens“. Die gemessenen Fibrinogenkonzentrationen variierten in einem Bereich von 579 bis 341 mg/dl. Die Balken geben die Ergebnisbereiche von Mehrfachbestimmungen wieder.

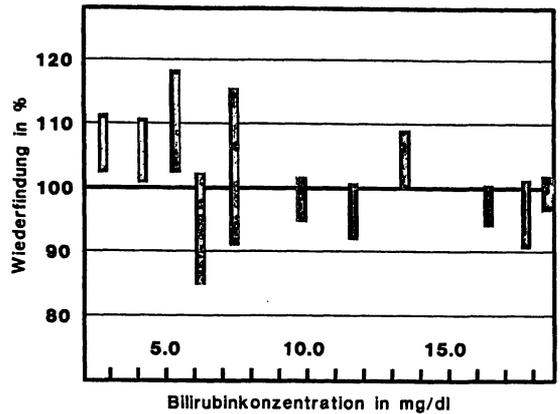


Abb. 6. Einfluß der Bilirubinkonzentration auf die Wiederfindung des „Derived Fibrinogens“. Die gemessenen Fibrinogenkonzentrationen variierten in einem Bereich von 52 bis 501 mg/dl. Die Balken geben die Ergebnisbereiche von Mehrfachbestimmungen wieder.

Einfluß erhöhter Konzentrationen von Triglyceriden, Bilirubin, Hämoglobin und Immunglobulinen

Abbildung 5 zeigt, daß die prozentualen Abweichungen der gefundenen von den berechneten Fibrinogenkonzentrationen im geprüften Konzentrationsbereich der Triglyceride zwischen -4 % und +15 % liegen. Die parallel dazu gemessenen Fibrinogenkonzentrationen nach Clausz zeigten ebenfalls über den gesamten Konzentrationsbereich der Triglyceride eine gute Übereinstimmung.

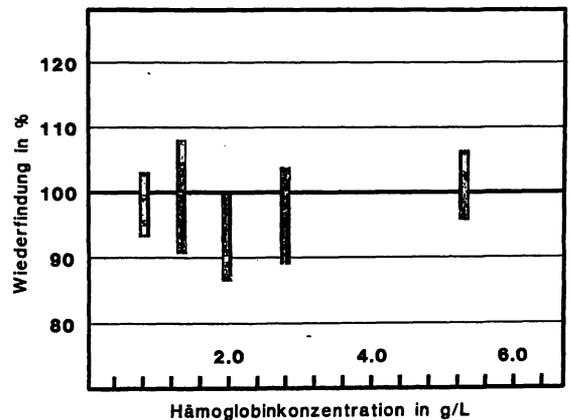


Abb. 7. Einfluß der Hämoglobinkonzentration auf die Wiederfindung des „Derived Fibrinogens“. Die gemessenen Fibrinogenkonzentrationen variierten in einem Bereich von 148 bis 168 mg/dl. Die Balken geben die Ergebnisbereiche von Mehrfachbestimmungen wieder.

Tabelle 3. Wiederfindung bei der Fibrinogenbestimmung nach der DF-Methode in Gegenwart verschiedener IgM-Konzentrationen. Angegeben sind kleinster (min) und größter (max) sowie der Median-Wert von 6 aufeinanderfolgenden Bestimmungen

Monoklonale Konzentration IgM-Kappa mg/dl	Wiederfindung		
	min	% Median	max
4410	94	102	107
3430	103	105	106
2940	110	113	114
2450	101	103	105
1960	97	100	104
1470	98	103	107
1225	99	106	109
980	104	106	110
613	97	103	107
490	94	95	97
Mittelwerte	99,7	103,6	106,6

Für die DF-Methode konnte eine Beeinflussung der Fibrinogenkonzentration durch steigende Bilirubin-konzentrationen von 2,9–20,9 mg/dl (49,6–352,4 µmol/l) nicht abgeleitet werden (Abb. 6). Bei der Clauss-Methode wurden dagegen unter den gegebenen Versuchsbedingungen oberhalb einer Bilirubinkonzentration von 15 mg/dl (256 µmol/l) nur noch etwa 80 % der berechneten Konzentrationen ermittelt (Ergebnisse nicht gezeigt).

Der Einfluß zunehmender Hämolyse auf die DF-Methode geht aus Abbildung 7 hervor. Durch steigende Hämoglobinkonzentrationen im Bereich von < 0,1 bis 6,0 g/dl (< 0,06 bis 3,73 mmol/l) konnten wir für die DF-Methode keine nennenswerte Beeinflussung der Fibrinogenbestimmung nachweisen. Dieses traf auch, im Gegensatz zu den Ergebnissen von Brezniak et al. [32], für die Fibrinogenbestimmung nach Clauss zu.

Eine Beeinflussung der Fibrinogenbestimmung durch hohe Konzentrationen monoklonaler Immunglobuline vom IgG- und IgA-Typ ließ sich ebenfalls nicht nachweisen. Einen geringen Einfluß auf die Wiederfindung zeigte die Aufstockung des Plasmapools mit dem Plasma des Patienten mit Morbus Waldenström (Tabelle 3).

Diskussion

Die Fibrinogenbestimmungen nach der „Derived Fibrinogen“- und nach der Clauss-Methode sind gerinnungsphysiologische Tests, die sich meßtechnisch grundsätzlich unterscheiden. Bei der DF-Methode wird das gefällte Fibrinogen, das am Ende der Prothrombinzeit-Bestimmung (Quick) entsteht, optisch quantifiziert. Unter geeigneten Versuchsbedingungen ist die Differenz der optischen Dichte bzw. der Lichtstreuung vor und nach vollständigem Ablauf der Gerinnungsreaktion proportional der Fibrinogenkonzentration. Bei der Methode nach Clauss wird die Zeit bis zur Bildung eines erfassbaren

Gerinnsels ermittelt. Diese Zeit ist in einem engen Bereich proportional der Fibrinogenkonzentration. Es ist daher zu erwarten, daß beide Methoden nicht immer deckungsgleiche Ergebnisse liefern. Die Unterschiede werden zunehmend deutlich seitdem beide Methoden routinemäßig eingesetzt und verglichen werden. Unklar ist, unter welchen Bedingungen welche der beiden Methoden die richtigen Werte liefert. Sicher ist, daß bei einer Lysetherapie die Clauss-Methode falsch niedrige bis nicht mehr meßbare Fibrinogenkonzentrationen ermittelt (Abb. 3). Dies beruht auf ihrer Empfindlichkeit gegenüber Spaltprodukten. Je nach Thrombinaktivität, Heparin-inhibitor-Konzentration im Reagenz übt darüber hinaus Heparin einen variablen Einfluß aus. Unter der Lysetherapie liefert die DF-Methode daher die klinisch eher plausiblen Werte [27, 28, 30].

Von Labor zu Labor wurden sehr unterschiedliche Korrelationen zwischen DF-Fibrinogen und Fibrinogen nach Clauss berichtet [25–28]. Eine gute Korrelation wird überwiegend nur in einem mittleren, engen Konzentrationsbereich gefunden. Die DF-Methode soll im oberen Referenzbereich „falsch“ hohe Werte liefern. Als Ursachen dieser Abweichungen von unseren Ergebnissen können Ursprung und Zusammensetzung des Prothrombinreagenzes, die Art der Kalibration und die Matrix des Kalibrationsmaterials diskutiert werden. So eignen sich nach unseren Erfahrungen käufliche Fibrinogenstandards nicht für eine Kalibration von DF [33, 34]. Eine matrixkonforme, d. h. mit Patientenplasmen durchgeführte Kalibration ergibt die besten Ergebnisse. Eine gute Korrelation kann auch nur dann erwartet werden, wenn in den zu untersuchenden Patientenplasmen vorwiegend normales, intaktes Fibrinogen vorliegt. Das ist am ehesten zu erwarten bei Patientenplasmen, die zwar unterschiedlich hohe Fibrinogenkonzentrationen, aber normale Gerinnungs-globaltests aufweisen. Untersucht man dagegen Patienten aus chirurgischen oder internistischen Stationen mit pathologischen Gerinnungszeiten in den Globaltests, so ist die Korrelation deutlich schlechter. Das ist zu erwarten, da Fibrin-/Fibrinogen-Spaltprodukte (FSPs) die Clauss- und die DF-Methode unterschiedlich beeinflussen. So erhöhen die mittleren Spaltprodukte wie Spaltprodukt Y die Lichtstreuung durch Kopräzipitation und führen so in der DF-Methode zu höheren Werten [35]. Diese Spaltprodukte hemmen jedoch die Fibrinbildungsgeschwindigkeit und verursachen daher bei der Clauss-Methode falsch niedrige Resultate. Noch ausgeprägter ist der Hemmeffekt in der Clauss-Methode bei den „späten“ Spaltprodukten D und E, die im Gegensatz dazu die DF-Methode am ACL nicht beeinflussen [35]. Der Einfluß des „frühen“ Spaltproduktes X wird noch kontrovers diskutiert [35, 36].

Der unterschiedliche Einfluß, den polymerisationshemmende und kopräzipitierende Spaltprodukte auf beide Methoden haben, kann genutzt werden, um aus Parallelbestimmungen mit beiden Methoden Hinweise auf das Vorliegen unterschiedlicher FSPs zu gewinnen. Gezielte Untersuchungen mit spezifischen Antikörpern ge-

gen einzelne Epitope der verschiedenen Degradationsprodukte [36] können dann folgen, um solche Hinweise zu verifizieren. Anhaltspunkte für das Vorliegen von Dysfibrinogenämien dürften gleichfalls leichter zu gewinnen sein und wären dann beispielsweise auf DNA-Ebene abzuklären. Auch eine unterschiedliche Beeinflussung beider Methoden durch eine veränderte Plasmamatrix in Anwesenheit von Medikamenten wie Plasmaexpander kann durch Parallelbestimmungen leichter erkannt werden.

Verglichen mit der Bestimmung nach Clauss weist die DF-Methode eine deutlich höhere Präzision von Tag zu Tag auf und ist unter diesem Aspekt den anderen Fibrinogen-Bestimmungsmethoden überlegen [37]. Insgesamt ist die Impräzision für die Routineanalytik als befriedigend zu bezeichnen. Für die Bewertung des Fibrinogens als möglichen prädiktiven Marker thromboembolischer Komplikationen wäre allerdings eine noch bessere Präzision wünschenswert.

Die Methode nach Clauss ist linear in einem Bereich von etwa 150–500 mg/dl. Nach Angaben des Herstellers vom Meßgerät (IL) und dem von uns eingesetzten Reagenz (PT-Fibrinogen) wurde DF im Konzentrationsbereich von 40–800 mg/dl linear gefunden. Das entspricht dem Linearitätsbereich anderer automatisierter Fibrinogen-Bestimmungsmethoden [38, 39]. Werte oberhalb und unterhalb dieser Grenzen werden vom Gerät gekennzeichnet. Werte oberhalb von 999 mg/dl werden nicht mehr als Ergebnis, sondern als („X X X“) am Bildschirm angegeben und auch so ausgedruckt. Mit den in einem Zeitraum von 6 Jahren untersuchten Reagenzienchargen konnten wir die diesbezüglichen Angaben des Herstellers bestätigen. Im Bereich hoher Fibrinogenkonzentrationen reichte die Linearität sogar bis 1000 mg/dl, so daß Werte bis 999 mg/dl ohne Korrektur übernommen werden können. Noch höhere Fibrinogenkonzentrationen werden als > 1000 mg/dl mitgeteilt. Verdünnungen zur genaueren Konzentrationsbestimmung werden von uns in der Regel nicht durchgeführt.

Lipämische Proben stellen an alle photometrischen Meßmethoden hohe Anforderungen sowohl durch die Eigentrübung als auch durch eine mögliche Veränderung dieser Trübung im Verlauf der zu beobachtenden Reaktion bzw. Gerinnung. Dieser Störfaktor ist sowohl bei den optisch messenden Clauss-Methoden [40] als auch bei der DF-Methode zu beachten. In der nephelometrischen DF-Methode war bis zu einem Triglyceridwert von über 1500 mg/dl (> 17 mmol/l) mit den ACL-Geräten der neuen Generation (seit etwa 1989) mit Leuchtdioden-Detektion kein Einfluß der Lipämie nachweisbar. Im Routinebetrieb wurden gelegentlich auch Plasmen mit Triglyceridwerten > 4000 mg/dl (> 45 mmol/l) noch gemessen. Beim Einsatz der älteren Geräte mit He-Ne-Laser wurden Interferenzen hingegen bereits ab einer Triglyceridkonzentration von 450 mg/dl (5 mmol/l) nach Zugabe einer Milchemulsion zur Probe beschrieben [35]. Es ist naheliegend, daß neben den spezifischen Eigen-

schaften des Gerätes vorwiegend die Trübungseigenschaften der eingesetzten oder vorhandenen Lipidpartikel und nicht die reine Triglyceridkonzentration für diesen Einfluß ausschlaggebend sind.

Die bei einem posthepatischen Ikterus im Blut auftretenden hohen Bilirubin- und Gallensalzkonzentrationen führen bei zahlreichen Labor-Parametern zu einer deutlichen Beeinflussung der Ergebnisse. Vergleichbare Untersuchungen für das DF sind uns nicht bekannt. Am ACL 300 wurden bei extrem ikterischen Plasmen und Bilirubin-konzentrationen > 30 mg/dl gelegentlich keine Fibrinogenkonzentrationen ausgedruckt. Bis zu einer Bilirubin-konzentration von 20 mg/dl (350 µmol/l) konnten wir keinen Einfluß feststellen.

Nach neueren Untersuchungen [32] beeinflussen Hämoglobin und Hämoglobinderivate die Fibrinpolymerisation und die quantitative Fibrinogenbestimmung. Eine starke Hämolyse könnte darüber hinaus durch eine zu hohe Ausgangsextinktion die Messung in solchen Proben grundsätzlich verhindern. Außerdem könnte sie sowohl die nephelometrischen Streueigenschaften der Probenmatrix vor und nach Bildung des Fibrinkoagels als auch die Lichtstreuung durch das Gerinnsel selbst beeinflussen. Hämolytische Plasmen mit einem Hämoglobingehalt von bis zu 6 g/dl (3,7 mmol/l) können nach unseren Erfahrungen dennoch für die quantitative Fibrinogenbestimmung eingesetzt werden. Wegen zu hoher Hämoglobinkonzentration und dadurch bedingter zu hoher Ausgangs- oder Endextinktion oder wegen instabiler Streueigenschaften des gebildeten Gerinnsels wurde bisher keine hämolytische Patientenprobe am ACL verweigert. Einen Einfluß von Hämoglobin oder Hämoglobinderivaten auf die Fibrinogenbestimmung [32] konnten wir weder für die DF- noch für die Clauss-Methode beobachten.

Bei Myelompatienten und insbesondere bei Patienten mit einer Makroglobulinämie Waldenström werden vermehrt hämorrhagische Diathesen beobachtet. Dafür werden sowohl Hemmungen der zellulären Hämostase durch „coating“ der Plättchen, eine Bindung und Inaktivierung von Gerinnungs- und Lysefaktoren durch die Immunglobuline als auch eine Hemmung der Fibrinbildungsreaktion verantwortlich gemacht. Nach Deutsch und Lechner [41] finden sich bei etwa 1/3 der Myelompatienten eine verlängerte Thrombin- und Reptilasezeit. Diese Effekte beruhen auf einer Hemmung der Fibrinpolymerisation durch „Paraproteine“. Bei allen Fibrinogenbestimmungen, die einen Fällungsschritt beinhalten [11, 12, 19, 20, 21, 23–28] ist neben der Wirkung der monoklonalen Immunglobuline als Antithrombine vom Antipolymerasetyp [41] auch mit ihrer Kopräzipitation zu rechnen. Somit sind bei diesen Fibrinogenbestimmungsmethoden falsch hohe oder falsch niedrige Ergebnisse nicht auszuschließen. Bei den vier untersuchten Plasmen von Patienten mit IgA-, IgG- und IgM-Plasmacytom wurden die größten Abweichungen für das Plasma des Patienten mit M. Waldenström beobachtet. Ein deutlicher

Effekt hoher monoklonaler Immunglobulinkonzentrationen war jedoch in keinem Fall festzustellen. Auch wenn eine klassenspezifische Wechselwirkung der Antikörper nicht nachzuweisen war, ist eine idiotypische Wechselwirkung, wie auch bei der Clauss-Methode beobachtet [42], nicht auszuschließen.

Die nephelometrische DF-Methode an den ACL-Geräten hat sich in unserem Labor über viele Jahre als eine kostengünstige, routinetaugliche und sichere Methode bewährt. Gute Ergebnisse wurden auch für gleichartige [28, 40, 43] nephelometrische und turbidimetrische Meßverfahren an Geräten anderer Hersteller berichtet. Wegen ihrer einfacheren, rationellen Durchführung könnte daher die DF-Methode die Clauss-Methode in der Routineanalytik ersetzen. Vor allem im Hinblick auf die Bedeutung des Fibrinogens als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen besteht allerdings ein dringender Bedarf für die Etablierung von Kalibrationsstandards für alle Fibrinogenbestimmungen. Darauf zielen Bestrebungen auf nationaler (GTH Komitee zur Standardisierung in der hämostaseologischen Analytik, Arbeitsgruppe „Fibrinogen“) und internationaler Ebene [44].

Danksagung

Wir danken Frau Vinz und Herrn Litfin für die ausgezeichnete technische Assistenz.

Korrespondenz-Adresse:

Dr. Nicodemo Weinstock
Zentrallaboratorium der
St. Vincentius-Krankenhäuser
Südenstraße 32, D-76137 Karlsruhe

Literatur

1. Meade TW, Vichers MV, Thompson SG, Segkatchian MJ (1985) The effects of physiological levels of fibrinogen on platelet aggregation. *Thromb Res* 38, 527–534
2. Barras JP (1969) Blood rheology – a general review. *Bibl Haematologica* 33, 277
3. Leschke M, Höffler H, Motz W, Strauer BE (1988) Chronisch-intermittierende Urokinasetherapie bei therapierefraktäre Angina Pectoris. *Dtsch Med Wschr* 117, 81
4. Naito M, Hayashi T, Kuzuya M, Funali Ch, Asci K, Kuzuya F (1990) Effects of fibrinogen and fibrin on the migration of vascular smooth muscle cells in vitro. *Atherosclerosis* 83, 9
5. Hunt BJ (1990) The relation between abnormal hemostatic function and the progress of coronary disease. *Curr Op Cardiol* 5, 758
6. Thompson WD, Smith EB, Stirck CM, Kochkar A (1990) Atherosclerotic plaque growth; presence of stimulatory fibrin degradation products. *Blood Coag Fibrinol* 1, 489–493
7. Smith EB, Keen GA, Grout A (1990) Fate of fibrinogen in human arterial intima. *Atherosclerosis* 10, 263–275
8. Gurewich V, Lipinski B, Hyde F (1976) The effect of fibrinogen concentration and the leucocyte count on intravascular fibrin deposition from soluble fibrin monomer complexes. *Thromb Haemostas* 36, 605–614
9. Sadoshima S, Tanaka K (1979) Fibrinogen and low density lipoprotein in the development of cerebral atherosclerosis. *Atherosclerosis* 34, 93–103
10. Wilhelmsen L, Svardsudd K, Korsan-Bengsten K, Larsson B, Welin L, Tibblin G (1984) Fibrinogen as a risk factor for stroke and myocardial infarction. *N Engl J Med* 311, 501–505
11. Stone MC, Thorp JM (1985) Plasma fibrinogen a major coronary risk factor. *J R Coll Gen Pract* 35, 565–537
12. Meade TW, Brozovic M, Chakrabarti RR, Haines AP, Imeson JD, Mellows S, Miller GJ, North WRS, Stirling Y, Thompson SG (1986) Haemostatic function and ischaemic heart disease: Principal results of the Northwick Park Heart Study. *Lancet* ii, 533–537
13. Kannel TW, Wolf PA, Castelli WP, D'Agostino RB (1987) Fibrinogen and the risk of cardiovascular disease, the Framingham Study. *JAMA* 258 (9), 1183–1186
14. Lee AJ, Smith WCS, Lowe GDO, Tunstall-Pedoe H (1990) Plasma fibrinogen and coronary risk factors: the Scottish Heart Health Study. *J Clin Epidemiol* 43 (9), 913–919
15. Holme I, Helgeland A, Hjermann I, Lund-Larson PG (1976) Coronary risk factors and socio-economic status. *Lancet* ii, 1396–1398
16. Balleisen L, Bailey J, Epping PH, Schulte H, van de Loo J (1985) Epidemiological study on factor VII, factor VIII and fibrinogen in an industrial population: I. baseline data on the relation to age, gender, bodyweight, smoking, alcohol, pill-using and menopause. *Thromb Haemost* 54, 325–356
17. Ernst E (1992) Oral contraceptives, fibrinogen and cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 93, 1–5
18. Humphries SE, Cook M, Bubowitz M, Stirling Y, Meade TW (1987) Role of genetic variation at the fibrinogen locus in determination of plasma fibrinogen concentrations. *Lancet* i, 1987–1455.
19. Ratnoff OD, Menzie AB (1951) A new method for the determination of plasma fibrinogen in small samples of plasma. *J Lab Clin Med* 37, 316–320
20. Blombäck B (1958) On the properties of fibrinogen and fibrin. *Ark Kemi* 12, 99–113
21. Swain WR, Feders MB (1967) Fibrinogen assay. *Clin Chem* 13, 1026–1028
22. Clauss A (1957) Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. *Acta Haematol Basel* 17, 237–246
23. Morse EE, Viswanathan U (1978) Determination of fibrinogen in plasma. *Ann Clin Lab Sci* 8, 438–441
24. Spannagl M, Schramm W (1987) Klinische Erprobung eines kinetischen Trübungstestes zur Fibrinogenbestimmung. *Lab Med* 11; 123–127
25. Rossi E, Mondonico P, Lombardi A (1988) Method for the determination of functional (clottable) fibrinogen by the new family of ACL coagulometers. *Thromb Res* 52, 453–468
26. Weinstock N (1992) Einsatz moderner Gerinnungsautomaten in der klinischen Hämostaseologie. *Lab Med* 16, 404
27. Weinstock N (1993) Vorteile und Grenzen der „Derived Fibrinogen“-Methode. 32. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin, Stuttgart

28. Schmitt Y, Ramirez I, Denzler B, Kolde H-J (1993) Die simultane funktionelle Bestimmung des Fibrinogens und der Thromboplastinzeit mit einem turbidimetrischen Verfahren auf Electra 1000 C. *Lab Med* 17, 12–19
29. Ziemer S, Keller E, Solleder E, Engelhardt W (1993) Erste Erfahrungen mit dem Behring Fibrintimer A. In *Perspektiven der Hämostaseologie. Die Medizinische Verlagsgesellschaft Marburg, Germany*, 31–35
30. Thomas L, Trobisch H (1992) Blutstillung und Diagnose. *Labor und Diagnose (Thomas ed.) 4. Auflage. Die Medizinische Verlagsgesellschaft Marburg, Germany*, pp 706–710
31. Barthels M, Poliwođa H (1993) *Gerinnungsanalytik 4. Auflage. George Thieme Verlag Stuttgart/New York, Germany/USA*, pp 172–174
32. Brezniak DV, Moon DG, Beaver JS, Fenton JW (1993) Hemoglobin interferes with fibrin polymerisation. *Thromb Haemost* 69, 1261
33. Furlan N, Felix R, Escher N, Lämmle B (1989) How high is the true fibrinogen content of fibrinogen standards? *Thromb Res* 56, 583–592
34. Weinstock N, Hegner N, Kolde H-J, Spanuth E, Witt P (1994) unveröffentlicht
35. Hoffmann JJML, Verhappen MAL (1988) Automated nephelometry of fibrinogen: analytical performance and observations during thrombolytic therapy. *Clin Chem* 34, 2135–2140
36. Nieuwenhuizen W (1988) New strategies in the determination of fibrin and fibrin(ogen) derivatives by monoclonal antibodies. *Blut* 57, 285–291
37. Palareti G, Maccaferri M, Manotti C, Tripodi A, Chantarakul V, Rodeghiero F, Ruggeri M, Mannucci PM (1991) Fibrinogen assays: a collaborative study of six different methods. *Clin Chem* 37, 714–719
38. Siegfriing GE, Riabov DK, Wehrly JA (1983) Development and analytical performance of a functional assay for fibrinogen on the Du Pont aca analyzer. *Clin Chem* 29, 614–617
39. Dessauer A, Spanuth E, Bart K (1986) Photometrische Fibrinogenbestimmung mit einem kinetischen Trübungstest. *Lab Med* 10, 287–290
40. Gurr E (1992) Bestimmung von Gerinnungsparametern mit dem CA 5000, einem selektiv arbeitenden Vollautomaten mit nephelometrischer Detektion. *Lab Med* 16, 161–169
41. Deutsch E, Lechner K (1972) Gerinnungsstörungen bei paraproteinämischen Hämoblastosen. *Wien Klin Wochenschr* 84, 253
42. Weinstock N, unveröffentlicht
43. Weinstock N, Patscheke H (1995) „Derived Fibrinogen“ and Evaluation of the Random Access Multiparametric Coagulation System „AMAX“ (abstr). *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 33, A54–A55
44. Gaffney PJ, Wong MY (1992) Collaborative study of a proposed international standard for fibrinogen measurement. *Thromb Haemost* 68, 428–432