Klinische Prüfung eines neuen photometrischen Tests zur Bestimmung der Faktor XIII-Aktivität im Plasma

Clinical Evaluation of a New Photometric Test for Factor XIII Activity in Plasma

Eva Solleder, Dagmar Demuth, C. Pfeiffer, M. Bomhard, J. Mayer, Th. Eller, P. Brauer, F. Keller, J. Grün*, K. Fickenscher*, Carola Wagner*

Zentrallabor der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg

* Behringwerke AG, Marburg

Zusammenfassung:

Ein neu entwickelter photometrischer Test (Berichrom F XIII) zur Bestimmung der Faktor-XIII-Aktivität im Plasma wurde sowohl am Cobas Fara als auch in der manuellen Version am Spektralphotometer geprüft. Bei diesem Test wird die durch NADH-Verbrauch verursachte Absorptionsabnahme bei 340 nm gemessen. Das NADH wird während der durch Glutamatdehydrogenase katalysierten Inkorporation des mittels einer F XIIIa-Reaktion freigesetzten NH_3 in α -Ketoglutarat verbraucht. Die Absorptionsabnahme ist proportional zur F XIII-Aktivität in der Probe.

Der Test zeichnet sich durch eine hohe Präzision, eine gute Korrelation mit dem Clot-Lyse-Test, durch seine Unempfindlichkeit gegen Störeinflüsse, seine Schnelligkeit und einfache Durchführbarkeit aus. Er wird zu einer enormen Erleichterung der F XIII-Bestimmungen in den klinischen Labors führen.

Schlüsselwörter:

Faktor XIII-Transamidase – Clot-Lyse-Test – NADH-abhängige Bestimmung – Zentrifugalanalyzer

Summary:

A new developed photometric assay (Berichrom F XIII) for the detection of factor XIII activity in plasma was tested. In this assay the decrease in absorbance caused by NADH consumption due to incorporation of NH_3 is detected at 340 nm. This NH_3 is released in a F XIIIa catalyzed reaction into α -ketoglutarate with the aid of glutamate dehydrogenase. The maximal rate of this decrease in absorbance at 340 nm is proportional to the activity of F XIIIa in the sample.

This new assay can easily be performed on clinical analyzers or usual photometers. The test reveals a high precision, a good correlation to the clot lysis test and is insensitive to interferences. Due to its rapid and easy performance this assay will contribute to simplify determinations of F XIII in clinical laboratories.

Keywords:

Factor XIII-transamidase – clot lysis test – NADH-dependent detection – centrifugal analyzer

1. Einleitung

Der Faktor XIII gewinnt neben seiner wichtigen Rolle in der Hämostase (Stabilisierung des Fibringerinnsels durch Quervernetzung des löslichen Fibrins zu nichtlöslichen Polymeren, Verminderung der fibrinolytischen Aktivität durch Einlagerung von α_2 -Antiplasmin in das gebildete Fibrin) zunehmend an Bedeutung bei der Behandlung von Wundheilungsstörungen (1, 2, 3, 4, 5), Bindegewebserkrankungen wie z. B. Sklerodermien (6, 7, 8), Vaskulitiden wie Schönlein-Henoch-Purpura (9, 10, 11, 12), entzündlichen Darmerkrankungen, wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa (13, 14, 15, 16), Leukämien (17, 18), Subarachnoidalblutungen (19, 20) sowie bei der Förderung der Knochenheilung (2, 21, 22, 23, 24, 25).

Dies führt zu einer ständig steigenden Zahl der Anforderungen von Faktor XIII-Bestimmungen. Da die bisher zur Verfügung stehenden Tests zur Bestimmung der Faktor XIII-Aktivität jedoch oft ungenau, zeitintensiv, sehr umständlich in der Durchführung und nicht automatisierbar sind, wurden in letzter Zeit verstärkt Anstrengungen unternommen, neue Testverfahren wie Mikrotiter-Assays

(26, 27, 28) oder photometrische Tests (29, 30) zu entwickeln.

Ein neuer photometrischer Test (Berichrom F XIII), bei welchem durch Zusatz eines speziell entwickelten Clotinhibitors die Defibrinierung entfällt, wurde von uns geprüft und mit dem im Routinelabor üblicherweise durchgeführten Clot-Lyse-Test verglichen. Zusätzlich wurde im Rahmen des Methodenvergleichs bei 47 Plasmen die Faktor XIII-Aktivität außer mit Berichrom F XIII mit einem zweiten, photometrischen Test (Clinisotest Factor XIII) bestimmt.

2. Material und Methoden

2.1 Plasmaproben

Alle untersuchten Blutproben stammten von Patienten der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg. Das Blut wurde in Gerinnungsmonovetten (Sarstedt, Nümbrecht) gewonnen und mit 3,13%igem Natriumcitrat pH 7,3 antikoaguliert (Mischungsverhältnis Antikoagulans:Blut = 1:10). Nach der Zentrifugation 10 min bei 2 680 g wurden

Diagnostik in Deutschland hat einen guten Namen: Behring

Behring bietet Ihnen ein umfassendes Diagnostika-Programm. Von qualitativen Screening-Testen für die ärztliche Praxis, die leicht zu handhaben und schnell abzulesen sind, bis zu hochspezifischen automatisierten Systemen für die

quantitative Laboratoriumsdiagnostik.

Behring arbeitet intensiv an neuen Entwicklungen, die Ihre Probleme immer intelligenter und exakter lösen.

Sprechen Sie mit uns über

Proteindiagnostik
Gerinnungsdiagnostik
Mikrobiologie
Tumordiagnostik

Analytica 92

Halle 7
Stand 7B21

Behringwerke AG
Postfach 1140, 3550 Marburg/Lahn

Behringwerke AG
Med. Information und Verkauf
Postfach 800280
6230 Frankfurt/M. 80

BEHRING
S. Behring

IBL

IMMUNO BIOLOGICAL LABORATORIES

NEU

Faktor XIII-ELISA

Solid Phase Activity Test*

* Zum Patent angemeldet

Mikrotiterassay zur quantitativen Bestimmung
der Faktor XIII-Aktivität

Bei Faktor XIII-Mangel, Wundheilungsstörungen,
disseminierter intravasaler Gerinnung, Sepsis,
Colitis ulcerosa, M. Crohn u.a.

- Objektive Verlaufskontrolle
der Substitutionstherapie
- Neue, verlässliche, einfache Methode
- Geringes Probenvolumen
- Keine Störung durch Heparin, Bilirubin
oder Lipide

GESELLSCHAFT FÜR IMMUNCHEMIE UND -BIOLOGIE MBH
OSTERSTRASSE 86 • 2000 HAMBURG 20
TEL.: 040-491 00 61-64 • FAX: 040-40 11 98

Standardisierte Reagenzien für mikrobiologische Laboratoriums-Arbeiten

dehydrierte sowie Fertigmedien, Gewebebezücht-
materialien, Seren und Reagenzien

Resistenz-Blättchen, Carbohydrate, Farbstoffe, Antigene und Seren
Dispenser, FA-Reagenzien, Peptone, Hydrolysate, Indikatoren,
Extrakte, Biochemikalien, Aminosäuren, Enzyme, Serierung Tests
sowie klinische Reagenzien und Anreicherungsmedien

DIFCO

DIFCO-Produkte werden routinemäßig in
der ganzen Welt verwendet, wo mikro-
biologische Arbeiten stattfinden.

Sie wurden speziell geschaffen für die klin. chem. Labora-
torien in Krankenhäusern, Hygiene-Institute, Gewebezücht-
Laboratorien, Gesundheitsämter - für Wasser- und Abwas-
serkontrollen, Milch- und Lebensmitteluntersuchungen, Qualitäts-
überwachung in der chem.-pharm. Industrie, Erziehungs- und
Ausbildungsinstitute.

ISMUNIT

Virus-Antigene und Sera,
Agglutino-Teste

Auf Wunsch Listen
und Spezial-Literatur.

OTTO NORD WALD

Heinrichstraße 5 • 2000 Hamburg 50
Tel. 040/432827 • Fax 040/432830

Spezial-Importeur für
Labor-Präparate

13. Internationale Fachmesse für Biochemische und
Instrumentelle Analytik mit internationaler Tagung
München, 5.-8. Mai 1992

Innovative Analysetechnik für:
Biologie, Biotechnologie, Biochemie
Genetik, Gentechnologie
Medizinische Diagnostik
Pharmakologie, Umweltanalytik
Lebensmittelanalytik
Industrielle Analytik

Analytica 92

Veranstalter:

Münchener Messe- und Ausstellungsgesellschaft mbH, Postfach 121009, D-8000 München 12,
Tel. (0 89) 5107-143, Telex 5212086 ameg d, Fax (0 89) 5107-177, Btx ★ 35075 #

MESSE MÜNCHEN INTERNATIONAL

für die Faktor-XIII-Bestimmung Aliquots der gewonnenen Plasmen bei -18°C tiefgefroren. Nur für die Bestimmung des Referenzbereiches wurde der Faktor XIII aus frisch gewonnenen Plasmen bestimmt.

2.2 Analysengeräte

Die photometrische F XIII-Bestimmung wurde sowohl am Zentrifugalanalysator Cobas Fara (Hoffmann La Roche, Basel) als auch am Spektralphotometer LS 500 (Dr. Bruno Lange GmbH, Berlin) durchgeführt.

2.3 Faktor XIII-Testmethoden

2.3.1 Allgemeines Testprinzip der photometrischen F XIII-Bestimmung

Bei den Methoden handelt es sich – von der Fibrinogenausfällung mit Bentonit beim Clinisotest abgesehen – um eine Einstufenmethode, wobei dem unverdünnten Plasma ein Reagenz zugegeben wird, welches alle für die Reaktion notwendigen Komponenten enthält.

Zunächst wird in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen der in der Probe vorhandene Faktor XIII durch Thrombin aktiviert. Nach seiner Aktivierung, welche sich in der Reaktionskinetik in einer lag-Phase von ca. 5 min äußert, führt der gebildete Faktor XIIIa in einer Transamidase-Reaktion, bei der die beiden im Reagenz enthaltenen Substrate miteinander verknüpft werden, zur Freisetzung von Ammonium-Ionen. Nach Zugabe des Reagenz wird die Extinktionszunahme bei 340 nm verfolgt. Die während dieser Transamidierung gebildeten Ammonium-Ionen werden mittels einer Glutamatdehydrogenase-katalysierten, NAD(P)H-abhängigen Reaktion gemessen. Im linearen Bereich der Kinetik ist die Extinktionsabnahme direkt proportional zur F XIII-Aktivität (27). In diesem Bereich wird deshalb über einen Zeitraum von 5 min die Extinktionsabnahme pro Minute gemessen und daraus die F XIII-Aktivität im Plasma bestimmt. Bei beiden photometrischen Tests wurde Standard-Humanplasma der Behringwerke AG (Marburg) als Standard eingesetzt.

2.3.2 Berichrom F XIII-Test

(Behringwerke AG, Marburg/BRD)

Für den manuellen Test am Spektralphotometer LS 500 wurden gleiche Volumina des Aktivatorreagenz (Rinderthrombin, Gly-Pro-Arg-Pro-Ala-amid, CaCl_2 , Polybren, BICINE-Puffer pH 8,3, Albumin, Natriumazid, NADH) und das Nachweisreagenz (Glutamat-Dehydrogenase, Glycinethylester, L-Leucyl-L-Glycyl-L-Prolyl-L-Glycyl-L-Glutaminyl-L-Seryl-L-Lysyl-L-Valyl-L-Isoleucyl-L-Glycyl-amid), ADP, α -Ketoglutarat, Hepes-Puffer pH 6,5, Albumin, Natriumazid) zu einem Monoreagenz vermischt und bei 37°C inkubiert.

Testansatz in einer auf 37°C temperierten Kunststoffküvette:

Probe:	100 μl
Monoreagenz:	1000 μl

Nach dem Mischen und Starten der Messung wurde nach 5 min und 10 min die Extinktion abgelesen und $\Delta E/\text{min}$ berechnet.

Am Cobas Fara II wurden Aktivator- und Nachweisreagenz getrennt eingesetzt, wodurch sich die Stabilität des Reagenzes deutlich verlängert.

Testansatz am Cobas Fara II:

Probe:	25 μl
Aktivatorreagenz:	90 μl
Nachweisreagenz:	90 μl

Durch einen „Temp. delay“ von 120 sec wurde gewährleistet, daß die Testtemperatur von 37°C vor Beginn der Analyse erreicht wird. 5 min nach Beginn der Messung bei 340 nm wurde in Zeitintervallen von 30 sec 10 x die Extinktion abgelesen (d. h. die gesamte Meßdauer beträgt 10 min).

2.3.3 Clinisotest F XIII

(Isotopenlabor Budapest/Ungarn)

Dieser Test entspricht – geringfügig modifiziert – der kinetischen UV-Methode von Muszbek et al. (29). Der eigentlichen Bestimmung geht eine Fibrinogenfällung voraus. Dafür wurden 1,5 ml Citratplasma in Reaktionsgefäße pipettiert, welche 60 mg Bentonit enthalten. Nach einer 10minütigen Inkubation wurde das Plasma erneut zentrifugiert und der fibrinogenfreie Überstand für die F XIII-Bestimmung verwendet.

Da bei dieser Methode von jeder Probe ein Probenleerwert mitgeführt werden muß, wurde für die Leerwertbestimmung das im Reagenz enthaltene CaCl_2 durch EDTA ersetzt, um die Aktivierung des im Plasma vorhandenen F XIII zu unterbinden.

Um das gebrauchsfertige Reagenz zu erhalten, müssen zu dem NADPH-Lyophilisat 1 ml des Substratpuffers (α -Oxoglutarat, ADP, Dithiothreitol, Et-NH₂ (ethylamin) HCl, AD- β -casein, Hepes-Puffer pH 7,5), 200 μl Thrombin, 50 μl Glutamatdehydrogenase und 100 μl CaCl_2 (bzw. für den Probenleerwert EDTA) pipettiert werden. Beim Testansatz am Cobas Fara II wurden zu 90 μl Probenvolumen im 1. Lauf 135 μl Reagenz pipettiert und nach 5minütiger Inkubation in Zeitintervallen von 60 sec 4 x die Extinktion gemessen. Für die Leerwertbestimmung wurde im Reagenz das CaCl_2 durch EDTA ersetzt und ein 2. Lauf durchgeführt.

2.3.4 Clot-Lyse-Test

Als Vergleichsmethode diente der Clot-Lyse-Test mit dem Gerinnungsfaktor XIII-Schnellreagenz der Behringwerke AG, Marburg (31). Es wurden 4 Verdünnungsstufen angesetzt (1:5, 1:10, 1:15, 1:20), die einem F XIII-Gehalt von 25%, 50%, 75% und 100% d. N. entsprechen und der Test gemäß der Testanleitung durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Präzision

Intra- und Interassay wurden mit einer standardisierten Kontrolle im Normalbereich, einer standardisierten Kontrolle im pathologischen Bereich, sowie einem selbstgestellten Normalpool und einem durch Verdünnung mit 0,9% NaCl gewonnenen Plasmapool im pathologischen Bereich durchgeführt.

Bei der Präzision in der Serie ($n = 20$) lagen die Variationskoeffizienten der Normalplasmen am Cobas Fara zwischen 1,8 und 2,0%, bei der manuellen Methode um 3,1%. Für die Plasmen im pathologischen Bereich ergaben sich am Cobas Fara Variationskoeffizienten zwischen 1,9 und 2,4%, am Spektralphotometer zwischen 3,0 und 6,0% (Tab. 1).

Von Tag zu Tag ($n = 10$) betrugen die Schwankungen am Cobas Fara ca. 2,8% bzw. 2,4–4,8%, bei der manuellen Methode ca. 3,5% bzw. 3,7–5,3% (Tab. 2).

3.2 Referenzbereich

Für die Bestimmung des Referenzbereiches wurde der Faktor XIII-Gehalt in 100 Plasmen mit Quick-, PTT- und Fibrinogenwerten im Normalbereich gemessen. Der Mittel-

Tab. 1: Präzision in der Serie (n = 20) am Cobas Fara (C) und am Spektralphotometer (M). 1 = CTS-Kontrollplasma N, 2 = CTS-Kontrollplasma P 1, 3 = Plasmapool im Normalbereich, 4 = Plasmapool im pathologischen Bereich.

	1		2		3		4	
	C	M	C	M	C	M	C	M
Mittelwert (%)	92,5	93,9	52,8	54,6	107,0	116,8	58,7	59,1
Std.abweichung	1,8	2,9	1,0	1,7	1,9	3,7	1,4	3,6
Var.koeff. (%)	2,0	3,1	1,9	3,0	1,8	3,1	2,4	6,0

Tab. 2: Variation von Tag zu Tag (n = 10; Doppelbestimmung) am Cobas Fara (C) und am Spektralphotometer (M). 1 = CTS-Kontrollplasma N, 2 = CTS-Kontrollplasma P1, 3 = Plasmapool im Normalbereich, 4 = Plasmapool im patholog. Bereich.

	1		2		3		4	
	C	M	C	M	C	M	C	M
Mittelwert (%)	94,9	94,8	54,9	54,5	111,2	114,8	57,8	59,1
Std.abweichung	2,8	3,0	1,3	2,0	3,1	4,4	2,8	3,1
Var.koeff. (%)	2,9	3,2	2,4	3,7	2,8	3,8	4,8	5,3

wert dieser Proben lag bei 99,8%, der Referenzbereich wurde zwischen 60% und 133% (2,5 bis 97,5 Perzentile) festgelegt.

3.3 Linearität

Zur Überprüfung der Linearität wurden Proben mit hohem F XIII-Gehalt schrittweise mit 0,9% NaCl verdünnt (10 + 0...1 + 9), um so den gesamten Meßbereich abzudecken. Wie in Abbildung 1 dargestellt, zeigte sich über den gesamten Meßbereich eine gute Korrelation (r = 1,0) zwischen dem theoretischen Wert und dem tatsächlich gemessenen Ergebnis.

3.4 Methodenvergleich

Der Vergleich der Berichrom F XIII-Bestimmung mit dem Clot-Lyse-Test wurde mit 81 Plasmen durchgeführt, die sich aus folgenden Patientenkollektiven zusammensetzten:

- 15 Patienten postoperativ
- 24 Patienten mit Frakturen
- 34 Patienten mit malignen Erkrankungen
- 6 Patienten mit Leberdysfunktionen
- 2 Patienten mit DIC/hämorrhag. Schock

Abb. 1: Graphische Auswertung (Passing & Bablok) der Linearität zwischen gemessenem (Cobas Fara) und theoretischem F XIII-Wert der Probenverdünnungen.

Abb. 2: Auswertung des Methodenvergleichs (n = 81) der Faktor XIII-Bestimmung zwischen Berichrom F XIII-Test und Clot-Lyse-Test mit einer Neunfeldertafel. Die Grenzen 70% und 120% d. N. entsprechen dem Referenzbereich.

Von den 81 Wertepaaren waren bei der Auswertung mit der Neunfeldertafel (Abb. 2) 69 Paare konkordant und 12 diskordant. Wertet man aufgrund der semiquantitativen Bestimmung die Korrelation für den Clot-Lyse-Test mit einem Graubereich bis 50% aus, so fallen in diesen Graubereich weitere 7 Wertepaare. Somit reduziert sich die Zahl der tatsächlich diskordanten Ergebnisse auf 5 (6,2%), 7 Wertepaare (8,6%) können als grenzwertig diskordant bezeichnet werden, die verbleibenden 69 Paare (85,2%) sind konkordant.

Zur Klärung methodenspezifischer Unterschiede wurde die F XIII-Aktivität von 56 Proben am Cobas Fara und am Spektralphotometer bestimmt. Bei der Auswertung nach Passing & Bablok zeigte sich eine gute Korrelation (r = 0,988), wobei die mit der manuellen Methode bestimmten Werte etwas höher lagen als die am Cobas Fara erzielten Werte (Abb. 3). Der Methodenvergleich des Berichrom F XIII-Test mit dem Clinisotest ergab eine starke Streuung der Werte (Abb. 4) und mit r = 0,650 eine schlechte Korrelation.

Von 49 Plasmen wurden jeweils 1,5 ml entnommen, um das Fibrinogen mit Bentonit auszufällen und sowohl in

dieser fibrinogenfreien Probe als auch im unbehandelten Plasma die Faktor XIII-Aktivität mit Berichrom F XIII bestimmt. Es zeigte sich, daß in der fibrinogenfreien Probe nur ca. $\frac{1}{4}$ der im unbehandelten Plasma nachgewiesenen F XIII-Aktivität gemessen werden konnte (Abb. 5). Dies läßt vermuten, daß neben dem Fibrinogen auch ein Teil des Faktor XIII mit Bentonit ausgefällt wird.

3.5 Störfaktoren

Im Plasma erfolgt die Aktivierung von Faktor XIII durch Thrombin in Gegenwart von Ca^{2+} (32, 33, 34). Da im Plasma vorhandenes Heparin zusammen mit AT III zu einer Inaktivierung von Thrombin führt, wird somit in heparinhaltigen Plasmen der Faktor XIII nur unvollständig

Abb. 3: Graphische Auswertung (Passing & Bablok) des Methodenvergleichs ($n = 56$) des Berichrom F XIII-Tests zwischen der automatisierten (Cobas Fara) und der manuellen (Spektralphotometer) Version.

Abb. 4: Graphische Auswertung (Passing & Bablok) des Methodenvergleichs der Faktor XIII-Bestimmung am Cobas Fara zwischen der Berichrom F XIII-Methode und dem Clinisotest F XIII.

Abb. 5: Graphische Auswertung (Passing & Bablok) des Methodenvergleichs der Berichrom F XIII-Bestimmung zwischen unbehandelten und mit Bentonit defibrierten Plasmen.

Abb. 6: Auswertung der mit Berichrom F XIII und dem Clot-Lyse-Test bestimmten F XIII-Werte von 13 Patienten unter Heparintherapie (15000 IE/d) mit einer Neufeldertafel. Die Grenzen 70% und 120% d. N. entsprechen dem Referenzbereich.

Abb. 7: Auswertung der mit Berichrom F XIII und mit dem Clot-Lyse-Test bestimmten F XIII-Werte von 11 Plasmen mit erhöhtem NH_3 -Gehalt ($> 90 \mu\text{g/dl}$) mit einer Neufeldertafel. Die Grenzen 70% und 120% d. N. entsprechen dem Referenzbereich.

in F XIIIa umgewandelt. Deshalb wurde dem Aktivatorreagenz des Berichromtest Polybren (ein Polykation) zugesetzt, um die Heparinaktivität bis 1,5 U/ml zu neutralisieren (30). In den Plasmen von 13 Patienten unter Heparintherapie (15000 IE/d) wurde der Faktor XIII sowohl mit Berichrom F XIII als auch mit dem Clot-Lyse-Test bestimmt. Die Auswertung mit der Neufeldertafel ergab, daß 12 der 13 Wertepaare konkordant waren, ein Wertepaar war diskordant (Abb. 6). Erweitert man die Neufeldertafel um einen Graubereich bis 50%, so fällt das diskordante Wertepaar in diesen Bereich und ist somit grenzwertig. Da beim Berichromtest die Faktor XIII-Aktivität über die Messung des Verbrauchs des in der Transglutaminasereaktion gebildeten Ammoniaks erfolgt, kommen erhöhte Ammoniakkonzentrationen im Plasma als weitere Störfaktoren in Frage. Deshalb wurde in 11 Plasmen mit erhöhten Ammoniakwerten (93–226 $\mu\text{g/dl}$) die Faktor XIII-Bestimmung mit Berichrom F XIII und dem Clot-Lyse-Test durchgeführt. 8 der 11 Wertepaare sind nach der Auswertung mit der Neufeldertafel konkordant, 3 sind diskordant, jedoch bei der Auswertung in einer erweiterten Neufeldertafel mit einem Graubereich bis 50% als grenzwertig zu bezeichnen (Abb. 7).

4. Diskussion

Durch die ständig steigende Zahl der F XIII-Bestimmungen wird die Forderung nach einfacheren Routinetests immer dringlicher. Um zu einer einfachen und schnellen Bestimmungsmethode zu gelangen, wie dies z. B. im Berichrom F XIII-Test verwirklicht ist, mußten jedoch eine ganze Reihe von Problemen gelöst werden (30). So wird z. B. der im Plasma in einer inaktiven Vorstufe vorliegende F XIII durch Thrombin in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen aktiviert (32, 33, 34). Thrombin induziert jedoch überdies die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin, welches einerseits mit dem synthetischen Substrat konkurrieren könnte, andererseits können die Fibrinpolymere zu einer Zunahme der Trübung führen, welche die Detektion des NADH-Verbrauchs bei 340 nm stört.

Dieser Störfaktor könnte durch Ausfällen des in der Probe vorhandenen Fibrinogens eliminiert werden. Der Ausfällungsschritt ist jedoch in zweifacher Hinsicht pro-

blematisch. Zum einen wird durch Fibrin die Aktivierungszeit von Faktor XIII durch Thrombin verkürzt (35, 36), zum anderen wird dadurch häufig ein Teil des F XIII aufgrund seiner Affinität zu Fibrinogen mit ausgefällt. Letzteres wird auch durch Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigt. So findet man in den für den Clinisotest mit Bentonit defibrinierten Plasmen gegenüber unbehandelten Proben mit dem Berichrom-Test nur etwa $\frac{1}{4}$ der Faktor XIII-Aktivität. Die durch Fibrinogen verursachten Interferenzen wurden in dem von Fickenscher et al. (30) entwickelten Berichrom F XIII-Test durch einen neuen Inhibitor unterbunden, welcher die Quervernetzung des Fibrins und somit eine Zunahme der Trübung verhindert, jedoch nicht die Bildung von löslichem Fibrin. Fickenscher et al. (30) berichten, daß bis zu einem Fibrinogengehalt von 11 g/l kein unlösliches Fibrin nachweisbar war. Auch bei den von uns untersuchten Plasmen konnten keine durch den Fibrinogengehalt in der Probe verursachten Störungen gefunden werden.

Verfälschung der Meßergebnisse durch weitere mögliche Störfaktoren wie eine erhöhte Ammoniakkonzentration oder begleitende NADH-abhängige Reaktionen konnten bei unseren Bestimmungen nicht beobachtet werden.

Die Präzision sowohl in der Serie als auch von Tag zu Tag sowie die gute Linearität der Ergebnisse über den gesamten Meßbereich sprechen für die hohe Meßgenauigkeit der photometrischen F XIII-Bestimmung, so daß der Test als Einzelbestimmung durchgeführt werden kann.

Um einen schnellen Testablauf zu gewährleisten, wurde für den Berichrom F XIII-Test ein neues synthetisches Substrat (K 9) entwickelt, welches eine hohe Umsatzrate und eine niedrige K_M aufweist (30). Dies ermöglicht bei der manuellen Testdurchführung eine Faktor XIII-Bestimmung innerhalb von 15 min, bei der automatisierten Version am Cobas Fara kann innerhalb von ca. 25 min die F XIII-Aktivität von 26 Proben bestimmt werden. Während die Testdurchführung beim Clot-Lyse-Test doch recht umständlich, langsam und personalintensiv ist, kann sie mit der Berichrommethode äußerst unkompliziert bei nur geringer Personalbindung durchgeführt werden.

Durch seine vielen Vorteile, die diese Arbeit zeigt, führt der Berichrom F XIII-Test zur einer enormen Erleichterung bei der Bewältigung der ständig steigenden Faktor XIII-Anforderungen.

Schrifttum:

1. Baer, U., Baukecht, J., Stangl, T., Häring, R. (1980) Verminderung von Wundheilungsstörungen durch prä- und postoperative quantitative Faktor XIII-Substitution. *Zentralbl. Chir.* 105, 642-651.
2. Benfer, J., Struck, H. (1979) Substitution von Faktor XIII bei Störungen der Wund- und Knochenbruchheilung. Die gelben Hefte 19, 106.
3. Silberzahn, J. (1991) Faktor XIII and Wound-Healing Impairments in ENT. 2nd Internat. Conference on Factor XIII in Marburg.
4. Mishima, Y., Nagao, F., Ishibiki, K., Matsuda, M., Nakamura, N. (1984) Faktor XIII in der Behandlung postoperativer therapiefaktärer Wundheilungsstörungen. *Chirurg* 55, 803-808.
5. Gierhake, F. W., Papastavrou, M., Zimmermann, K., Bohn, H., Schwick, H. G. (1974) Prophylaxe postoperativer Wundheilungsstörungen durch Faktor XIII-Substitution. *Dtsch. med. Wschr.* 99, 1004-1009.
6. Pilger, E., Bertuch, H., Ulrich, A. & Rainer, F. (1987) Capillary permeability in connective tissue disease: Influence of Fibrogammin P-therapy. *Thromb. Haemostas.* 58, 279.
7. Guillevin, L., Chouvet, B., Mery, C., Godeau, P., Delbarre, F. (1982) Traitement de la sclérodermie généralisée par le facteur XIII. *La Revue de Médecine interne*, Tome III No 3, 273-277.
8. Guillevin, L. (1991) Prevention of Systemic Manifestations of Progressive Systemic Sclerosis by Faktor XIII (Fibrogammine): Design of a Prospective Randomized Trial. 2nd Internat. Conference on Faktor XIII in Marburg.
9. Henriksson, P., Hederr, U., Nilsson, I. M. (1977) Faktor XIII (Fibrin stabilizing factor) in Henoch-Schönlein's Purpura. *Acta Paediatr. Scand.* 66, 273-277.
10. Kamitsuij, H., Tani, K., Yasui, M., Taniguchi, A., Taira, K., Tsukada, S., et al. (1987) Activity of blood coagulation factor XIII as prognostic indicator in patients with Schönlein-Henoch Purpura. *Eur. J. Pediatr.* 146, 519.
11. Kröniger, A., Seitz, R., Schwörk, W. B., Fickenscher, K., Arnold, R. & Egbring, R. (1991) Fibrin-Stabilizing Factor Deficiency in Henoch-Schönlein Purpura. Efficacy of F XIII Substitution in Bleeding Complications. 2nd Internat. Conference on Faktor XIII in Marburg.
12. Fukui, H., Kamitsuij, H., Nagao, T., Yamada, K., Akatsuda, J., Inagaki, M., et al. (1989) Clinical Evaluation of a Pasteurized Faktor XIII concentrate administration in Henoch-Schönlein Purpura. *Thromb. Res.* 56, 667-675.
13. Suzuki, R., Toda, H. & Takamura, Y. (1989) Dynamics of blood coagulation factor in ulcerative colitis and preliminary study of the factor XIII concentrate. *Blut* 59, 162-164.
14. Galloway, M. J., Mackie, M. J. & McVerry, B. A. (1983) Reduced levels of factor XIII in patients with chronic inflammatory bowel disease. *Clin. lab. Haemat.* 5, 427-428.
15. Lorenz, R., Clemens, R., Karl, M., Classen, M. (1989) Substitution von F XIII-Konzentrat bei Colitis ulcerosa. *Z. Gastroenterol.* 2 (27), 89-90.
16. Wisen, O. & Garlund, B. (1988) Hemostasis in Crohn's disease: Low Factor XIII levels in active disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 23, 961-966.
17. Havemann, K., Egbring, R., Gropp, C., Schmidt, M., Sodomann, C. P. (1977) Faktor XIII-Mangel bei akuter Leukämie des Erwachsenen: Ergebnisse einer Substitution mit Faktor XIII. *Klin. Wschr.* 55 801-809.
18. Wóitinas, F. (1991) Bleeding Disorder in Hypercellular Leukemia and Faktor XIII-Substitution. 2nd Internat. Conference on Faktor XIII in Marburg.
19. Janzen, R. W. C., Bauer, W. & Tilsner, V. (1982) The spontaneous course of factor XIII following intracranial hemorrhage: relevant for rebleeding? *J. Neurosurg. Sci.* 26, 135-136.
20. Thie, A., Henze, Th., Degner, D., Oberling, M., Clemens, R., Klein, H. J., Lombard, G. F. & Huchni, K. (1987) Faktor XIII concentrate for prophylaxis of rebleeding in subarachnoidal hemorrhage (SAH). Results of a prospective multicenter pilot study. *Thromb. Haemostas.* 58 (1), 513.
21. Benfer, J. & Struck, H. (1977) Faktor XIII and fracture healing. *Europ. Surg. Res.* 9, 217-223.
22. Kugelmeier, K. (1985) Experimentelle proliferationskinetische Untersuchungen über die Wirkung des Plasmafaktor XIII auf das Knochenwachstum in vitro und in vivo. *Diss. Ulm.*
23. Claes, L., Burri, C., Gerngross, H., Mutschler, W. (1984) Die Beschreibung der Frakturheilung durch F XIII. *Helv. Acta* 51, 201-212.

24. Gerngross, H., Steinmann, R., Graf, N. (1987) Faktor XIII und Knochenheilung. *Med. Welt* 38, 1533-1538.
25. Gerngross, H. & Claes, L. (1991) Experimental Results in Factor XIII and Bone-Graft Healing. 2nd Internat. Conference on Faktor XIII in Marburg.
26. Dempfle, C. E., Hochreuther, K., Helmchen, G. & Heene, D. L. (1991) Microtiter Assay for Faktor XIII Activity. 2nd Internat. Conference on Faktor XIII in Marburg.
27. Selmayr, E., Klöss, H. R. & Müller-Berhaus, G. (1991) A New Method for the Determination of Faktor XIII Activity Using Bionylated Fibrinogen. 2nd Internat. Conference on Faktor XIII in Marburg.
28. Lee, K. N., Birkbichler, P. S. & Patterson jr., M. K. (1988) Colorimetric assay of blood coagulation factor XIII in plasma. *Clin. Chem.* 34, 906-910.
29. Muszbek, L., Polgár, J. & Fésüs, L. (1985) Kinetic Determination of Blood Coagulation Faktor XIII in Plasma. *Clin. Chem.* 31, 35-40.
30. Fickenscher, K., Aab, A. & Stüber, W. (1991) A Photometric Assay for Blood Coagulation Faktor XIII. *Thromb. Haemostas.* 65 (5), 535-540.
31. Karges, H. E., Heimbürger, N. (1978) Gerinnungsfaktor XIII: Schnelltest bei Defizitverdacht. *Laboratoriumsblätter* 28, 71-78.
32. Takagi, T. & Doolittle, R. F. (1974) Amino acid sequence studies on factor XIII and the peptide released during its activation by thrombin. *Biochemistry* 13, 750.
33. Henriksson, P. & McDonagh, J. (1983) Faktor XIII activation and interactions. In: *Faktor XIII and Fibronectin*. (R. Egbring, H. G. Klingemann eds.) Medizinische Verlagsgesellschaft (Marburg) pp 1-14.
34. Curtis, C. G., Brown, K. L., Credo, R. B., et al. (1974) Calcium dependent unmasking of active center cysteine during activation of fibrin stabilizing factor. *Biochemistry* 13, 3774.
35. Credo, R. B., Curtis, C. G. & Lorand, L. (1978) Ca²⁺ related regulatory function of fibrinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 4234.
36. Janus, T. J., Lewis, S. D., Lorand, L. & Shafer, J. A. (1983) Promotion of thrombin catalyzed activation of factor XIII by fibrinogen. *Biochemistry* 22, 6269-6272.

Anschrift der Verfasser:

Dr. Eva Solleder
 Dagmar Demuth
 Christian Pfeiffer
 Dr. Michael Bomhard
 Dr. Johannes Mayer
 Dipl.-Chem. Thomas Eller
 Dr. Peter Brauer
 Prof. Dr. Franz Keller
 Zentrallabor der Medizinischen Universitätsklinik
 Josef-Schneider-Straße 2
 8700 Würzburg

Dr. Joachim Grün
 Dr. Karl Fickenscher
 Dr. Carola Wagner
 Behringwerke AG
 Postfach 1140
 3550 Marburg