Zuverlässigkeit von chromogenen Bestimmungen der Antithrombin III-Aktivität mit dem Behring Coagulation System

Reliability of Chromogenic Determinations of Antithrombin III-Activity with the Behring Coagulation System

Ruth A. Fischer-Bieniek^{1,2}, Th. Eller¹, L. Volbracht¹, D. Paar¹

Zusammenfassung: Die Zuverlässigkeit von chromogenen Bestimmungen der Antithrombin III-Aktivität mit dem vollmechanisierten Gerinnungsanalyzer Behring Coagulation System (BCS) wird im vorliegenden Beitrag beschrieben. Das von uns für das BCS adaptierte funktionelle Verfahren basiert auf der Reaktion von AT III mit dem Faktor Xa. Die ermittelte Impräzision mit Variationskoeffizienten von 2,2% und 3,7% in der Serie im normalen und klinisch bedeutsamen erniedrigten Bereich und von 4,3% und 5,2% von Tag zu Tag belegt die gute Präzision. Die ermittelten relativen Unrichtigkeiten betrugen bei Zielwerten von 95,5% bzw. 56,8% für die Antithrombin III-Aktivität 3% bzw. 4%, was die gute Richtigkeit der Methode anzeigt. Im Vergleich zu zwei weiteren Analyzern, dem RA-XTTM und dem ACP 5040, wurde eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse gefunden. Die Korrelationskoeffizienten lagen bei 0,96 (n=56) und 0,98 (n=49). Mit dem neuen vollmechanisierten BCS steht ein offenes System zur Verfügung, das die Integration von zuverlässigen chromogenen Antithrombin III-Bestimmungen in das Gerinnungslabor ermöglicht.

Schlüsselwörter: Antithrombin III; Blutgerinnungstests/Geräte; Chromogene Verbindungen; Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Summary: The report describes the reliability of chromogenic determinations of antithrombin III (AT III) activity with the fully mechanized Behring Coagulation System (BCS). The procedure adapted on the BCS is based on the reaction of AT III with factor Xa. The good precision of the method is shown by an intra assay CV of 2.2% in the normal range and of 3.7% in the clinically important low range; interassay CVs were 4.3% and 5.2%, respectively. The relative inaccuracy was 3% or 4% using control samples with assigned AT III activities of 95.5 and 56.8%, showing

the good accuracy of the method. In comparison studies with two other analyzers, the RA-XTTM and the ACP 5040, we found a good agreement of results; the coefficients of correlation were about 0.96 (n=56) and 0.98 (n=49). The Behring Coagulation System represents a new fully mechanized open system, which allows reliable chromogenic antithrombin III-determinations in the coagulation laboratory.

Keywords: Antithrombin III; Blood Coagulation Tests/instrumentation; Chromogenic Compounds; Reproducibility of Results.

Da Antithrombin III (AT III) einer der wichtigsten plasmatischen Proteaseinhibitoren ist, hat die kontinuierliche Überwachung der AT III-Aktivitäten vor allem in der Intensivmedizin große Bedeutung gewonnen [1,2]. Die primär entwickelten Bestimmungsverfahren basieren auf der Anti-Faktor IIa-Aktivität des AT III. Da aber die gemessenen AT III-Aktivitäten auch von der Konzentration des Heparin-Cofaktors II abhängig sind, wurden in den letzten Jahren Testsysteme entwickelt, die die Anti-Faktor Xa-Aktivität des AT III nutzen [3,4,5]. Diese Untersuchungsmethoden sind unabhängig von der Heparin-Cofaktor II-Konzentration und spiegeln nur die AT III-Aktivität einer Plasmaprobe wider [6,7]. Wir berichten über Untersuchungen zur Zuverlässigkeit von chromogenen Bestimmungen [8] der AT III-Aktivität mit dem Behring Coagulation System (BCS, Behring Diagnostics GmbH, Marburg). Das von uns für das BCS adaptierte funktionelle Verfahren basiert auf der Reaktion von AT III mit dem Faktor Xa (FXa). Im einzelnen prüften wir die Impräzision, die Richtigkeit sowie die Vergleichbarkeit der erhaltenen Ergebnisse des BCS mit denen zweier anderer von uns routinemäßig eingesetzten mechanisierten Analysensystemen.

Material und Methoden

Reagenzien

Testkit: Coamatic® AT 400 (Fa. Chromogenix AB, Mölndal, Schweden); Das Substrat S-2772 wurde in

¹Abt. für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, Zentrum für Innere Medizin, Universitätsklinikum Essen

²Korrespondenzadresse: Dr. Ruth A. Fischer-Bieniek, Abteilung für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, Zentrum für Innere Medizin, Universitätsklinikum Essen, Hufelandstraße 55, D-45122 Essen. Fax: +49-201-723-5975

Eingegangen: 21. Oktober 1996 / Angenommen: 15. Januar 1997

Tabelle 1 Pipettierschema für die Bestimmung der AT III-Aktivität mit dem Coamatic® AT 400-Test auf dem BCS

1	Probentransferarm Dest. Wasser aufnehmen Probe aufnehmen Abgabe Küvette außen	Waschen Typ 4 <kein Reagenz> <kein Reagenz> <kein Reagenz>	Mischaktion 2 Pipettierprofil 3 Pipettierprofil 3 Pipettierprofil 3	0 Sek. 20 µl 5 µl 25 µl	0 Sek.
2	Reagenztransferarm Luft aufnehmen Reagenz aufnehmen Abgabe Küvette innen	Waschen Typ 2 <kein Reagenz> F-Xa-Reagenz <kein Reagenz>	Mischen nach Inkubation Pipettierprofil 3 Pipettierprofil 3 Pipettierprofil 3	180 Sek. 20 µl 225 µl 225 µl	240 Sek.
3	Reagenztransferarm Luft aufnehmen Reagenz aufnehmen Abgabe Küvette Mitte	Waschen Typ 5 <kein Reagenz> AT-400 Substrat <kein Reagenz>	keine Mischrotation Pipettierprofil 3 Pipettierprofil 3 Pipettierprofil 3	0 Sek. 20 µl 50 µl 50 µl	0 Sek.

Tabelle 2 Methoden-Parameter für die Bestimmung der AT III-Aktivität mit dem Coamatic® AT 400-Test auf dem BCS

Name der Methode	AT III
Wellenlänge	405 nm
Photometeraussteuerung	0 - 100 mE
Enzymleerwert	keiner
1-fach-Bestimmung bei Probenmessungen	
2-fach-Bestimmung für Kalibrationen	
zulässige relative Abweichung bei Mehrfachbestimmung	10%
Verdünnungsfaktor	1 : 5
Verdünnungsmedium	NaCl

17ml sterilem, destilliertem Wasser und der F Xa in 25 ml Puffer, pH-Wert 8,2, gelöst.

Kalibrator: Standard Human Plasma (Behring Diagnostics GmbH, Marburg)

Kontrollmaterial: PreciChrom® I/II (Boehringer Mannheim): Zielwerte 95,5%/56,8%, Bereiche 75,4-116%/44,9-68,7%

Patientenproben

Als Untersuchungsmaterial dienen Citratplasma-proben (1 Teil Trinatriumcitrat 0,106 mol/l und 9 Teile Venenblut, S-Monovette® Sarstedt, Nümbrecht; Zentrifugation 10 Minuten bei 2000 x g) von Patienten des Universitätsklinikum Essen, bei denen im Rahmen der routinemäßigen Gerinnungsanalytik die Bestimmung der AT III-Aktivität gewünscht wurde.

Zur Bestimmung der Impräzision in der Serie wurden 2 Plasmapools sowohl im hochnormalen (135%), als auch im klinisch bedeutsamen pathologisch niedrigen (58%) AT III-Aktivitätsbereich von jeweils 20 Plasmaproben verwendet. Für die Vergleichsmessungen wurden 105 Plasmaproben eingesetzt. Sämtliche Untersuchungen erfolgten als Einfachbestimmungen.

Nicht standardisierte Abkürzungen: AT III, Antithrombin III; FXa, aktivierter Gerinnungsfaktor X.

Analysenprinzip

Die Plasmaprobe wird mit einem Überschuß an FXa und in Gegenwart von Heparin inkubiert. Anschließend wird die verbleibende FXa-Aktivität über die Hydrolyserate des chromogenen Substrates S-2772 bestimmt. Die bei 405 nm gemessene Freisetzung von p-Nitroanilin ist umgekehrt proportional der AT III-Aktivität der Probe.

Testdurchführung

Für die Messungen wurden neben dem BCS das RA-XT™-System (Bayer Diagnostics, München) und das ACP 5040-System (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg) eingesetzt. Bei den beiden letztgenannten Analysengeräten erfolgten die AT III-Bestimmungen ebenfalls mit dem Coamatic® AT 400-Testkit.

Das BCS ist ein Zentrifugalanalyzer, der gleichzeitig chromogene, koagulometrische und immunologische Testverfahren mit positiver Probenidentifikation durchführen kann [9]. Die Küvettenrotoren des BCS werden mit Hilfe eines Rotorarms in die unterschiedlichen Positionen, wie Inkubations-, Meß-, Vorrats- und Abfallposition gebracht. Durch diese unterschiedlichen Positionen können gleichzeitig mehrere Arbeitsschritte (Bestückung und Entladung der Rotoren, Pipettierungen u.a.) durchgeführt werden. Während der Zentrifugation können bis zu 20

Tabelle 3 Impräzision von Bestimmungen der AT III-Aktivität in der Serie mit dem BCS unter Verwendung von zwei Plasmapools (jeweils n=10)

Mittelwert (Norm-%)	Anzahl	Standardabweichung (Norm-%)	Variationskoeffizient (%)
135	10	2,99	2,2
58	10	2,13	3,7

Tabelle 4 Impräzision von Bestimmungen der AT III-Aktivität von Tag zu Tag unter Verwendung der Kontrollplasmen PreciChrom® I und II

Mittelwert (Norm-%)	Anzahl	Standardabweichung (Norm-%)	Variationskoeffizient (%)
98	20	4,20	4,3%
59%	20	3,08	5,2%

Tabelle 5 Daten der Regressionsanalyse [$y=a+bx$] nach *Passing* und *Bablok* [10] und Korrelationskoeffizienten für die mit den verschiedenen Analysensystemen erhaltenen AT III-Aktivitäten

X / Y	Anzahl n	Achsenabschnitt a (Norm-%)	Steigung b	Korrelationskoeffizient r
RAXT / BCS	49	1,2	0,93	0,983
ACP / BCS	56	0,0	1,0	0,961

Abbildung 1 Vergleich von AT III-Aktivitätsbestimmungen mit dem RA-XTM und BCS **Abbildung 2** Vergleich von AT III-Aktivitätsbestimmungen mit dem ACP 5040 und BCS

verschiedene Tests gleichzeitig verfolgt werden. Das System verfügt über 2 Pipettierarme für Proben und Reagenzien.

Bei der AT III-Aktivitätsbestimmung wird nach einer maximalen Zeit von 60 Sekunden bei einer Wellenlänge von 405 nm die Extinktion gemessen und aus dieser Kinetik die Steigung ermittelt (Delta E/min). Das Ergebnis wird anhand einer Eichkurve in % der

Norm angegeben. Zur Erstellung der Eichkurve wird der Kalibrator Standard Human Plasma verwendet: unverdünnt (100%), Verdünnungen mit 0,154 mol/l Natriumchloridlösung: 75%, 50% und 25%.

Die Ermittlung der AT III-Aktivität erfolgte am BCS nach dem Pipettierschema in Tab. 1. Weitere methodenspezifische Parameter der adaptierten AT III-Bestimmung sind in Tab. 2 aufgeführt.

Statistik

Die Regressionsanalyse der Daten der Methodenvergleiche wurde nach *Passing* und *Bablok* vorgenommen [10].

Ergebnisse

Es fanden sich bei der Messung in der Serie Impräzisionen zwischen 2,2 und 3,7% (Tab. 3), bei der Messung von Tag zu Tag zwischen 4,3% und 5,2% (Tab. 4). Bei Zielwerten von 95,5% bzw. 56,8% für die AT III-Aktivität in den Kontrollproben PreciChrom® I bzw. II lagen die relativen Unrichtigkeiten im Mittel bei 3% bzw. 4%.

Bei den Vergleichsuntersuchungen fand sich, wie aus den Abbildungen 1 und 2 und aus den Korrelationsdaten der Tabelle 5 hervorgeht, eine lineare Korrelation zwischen den Ergebnissen der AT III-Aktivitätsbestimmungen auf dem BCS, sowohl im Vergleich zum RA-XT™ als auch zum ACP 5040-System.

Diskussion

Für die hämostaseologische Notfalldiagnostik ist es von großem Vorteil, vollmechanisierte Meßgeräte zur Verfügung zu haben [11,12,13]. Deshalb wurde die auf der Anti-Faktor Xa-Aktivität beruhende, nicht durch Heparin beeinflusste [6] chromogene AT III-Aktivitätsmessung, die unabhängig von der Heparin-Cofaktor II-Konzentration ist, auf das BCS-System adaptiert. Bei den vorliegenden Untersuchungen wies diese Methode mit Variationskoeffizienten von 2,2 und 3,7% in der Serie bzw. 4,3 und 5,2% von Tag zu Tag eine zufriedenstellende Präzision im hochnormalen, im normalen und im klinisch bedeutsamen niedrigen Bereich auf. Die geringen relativen Abweichungen vom Zielwert mit 3% im normalen und 4% im Aktivitätsbereich von 55 bis 60%, also in einem Bereich, der klinisch für den betroffenen Patienten ein potentielles Risiko zur Gerinnungsaktivierung und oder Thrombose bedeuten kann, belegen die gute Richtigkeit der Bestimmungen, soweit dies in der Hämostaseologie möglich ist. Die Korrelationskoeffizienten von 0,98 bzw. 0,96 bei den Vergleichsuntersuchungen von 105 Patientenproben

zeigen die gute bis zufriedenstellende Vergleichbarkeit zwischen den mit dem BCS und dem RA-XT™- bzw. ACP 5040-System bestimmten AT III-Aktivitäten.

Es steht somit mit dem neuen vollmechanisierten BCS ein offenes System zur Verfügung, das die Integration von zuverlässigen chromogenen AT III-Bestimmungen in das Gerinnungslabor ermöglicht.

Literatur

1. Schrader J, Züchner C, Köstering H, Scheler F. Chromogene Substratmethoden zur Antithrombin III-Bestimmung. *Ärztl Lab* 1986;32:111-4.
2. Scherer R, Paar D, Stöcker L, Kox WJ. Diagnose und Therapie pathologischer Gerinnungsaktivierungen. *Anästhesist* 1994;43:347-54.
3. Tran TH, Duckert F. Influence of Heparin cofactor II (HCII) on the determination of Antithrombin III (AT). *Thromb Res* 1985;40:571-6.
4. Gram J, Jespersen J. Increased Concentrations of Heparin Cofactor II in Diabetic Patients, and Possible Effects on Thrombin Inhibition Assay of Antithrombin III. *Clin Chem* 1989;35:52-5.
5. Andersson NE, Menschik M, Van Voorthuizen H. New chromogenic AT III activity kit which is sensitive to heparin cofactor II and designed for use on automated instruments. *Thromb Haemostas* 1991;65:921.
6. Böhner J, von Pape KW, Blaurock M. Thrombin-based Antithrombin Assays show overestimation of Antithrombin III Activity in Patients on Heparin Therapy due to Heparin Cofactor II Influence. *Thromb and Haemostas* 1994;71:280-3.
7. Böhner J, von Pape KW, Blaurock M. Chromogener Substrat-test zur Bestimmung von Antithrombin III unter Verwendung des Faktors Xa. *Lab med* 1991;15:296-8.
8. Witt I. Test systems with Synthetic Peptide Substrates in Haemostaseology. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991;29:355-74.
9. Stolz H, Keller F. Die Gerinnungssystem-Analyser Behring-Coagulation-Timer (BCT) und Behring-Coagulation-System (BCS). Neue Aspekte der Hämostaseologie. Diagnostik aktuell. Marburg: Med. Verlagsgesellschaft, 1996:14-23.
10. Passing H, Bablok W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry. Part I. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983;21:709-20.
11. Ziemer S, Hanke T, Teipel I, Engelhardt W, Fickenscher K. Evaluation of Fibrintimer A, a New, Fully Automated Coagulation Analyzer. Part II: Evaluation of Single Coagulation Factors and of Antithrombin III (AT III), Protein C and Protein S. *Klin Lab* 1995;41:21-29.
12. Paar D. Fully Mechanized Systems for Coagulation Testing. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995;33:A164.
13. Houbouyan L, Boutiere B, Contant G, Dautzenberg MD, Fievet P, Potron G, Vassault A, Gourmelin Y. Validation protocol of analytical hemostasis systems: measurement of anti-Xa activity of low-molecular-weight heparins. *Clin Chem* 1996;42:1223-30.

Neue Software zur Kostenkontrolle in medizinischen Laboratorien von Klinik und Praxis

York Schmitt und Thorsten Schulz

Die Notwendigkeit der Kostenkontrolle und nach Möglichkeit der Kostenreduktion ist vor allem in den medizinischen Laboratorien unbestritten. Der Kostendruck führt zu einem ökonomischen Handlungsdruck mit eigenständiger Budgetverwaltung, für die verstärkt betriebswirtschaftliche Kenntnisse erforderlich sind. Dazu gehört auch die Einführung von EDV-Systemen zum umfassenden Kosten-Controlling. Erstmals zur Medica 1996 wurde eine neuartige Software präsentiert, die sämtliche medizinischen und betriebswirtschaftlichen Voraussetzungen und Bedürfnisse berücksichtigt. Das Programm wurde mit Unterstützung von Becton Dickinson in enger Zusammenarbeit zwischen einem Informatiker, einem Betriebswissenschaftler und einem Arzt für Laboratoriumsmedizin erarbeitet.

Der politische Wille zur Kostenreduktion im Gesundheitswesen kommt u. a. in den verschiedenen Gesundheitsstruktur-Reformgesetzen der Jahre 1993 bis 1996 und als Folge der anstehenden Ergänzungen der Gesetzgebung zum Ausdruck. Die Einführung neuer Gebührenordnungen für den kassen- sowie den privatärztlichen Bereich verstärkt diese Tendenz. Hinzu kommt die weitverbreitete Diskussion der Ausgliederung von Krankenhausinstituten oder der Fremdvergabe dieser Leistungen an externe, niedergelassene Laboratorien.

Die Programmziele der neuartigen Software zur Kostenkontrolle in medizinischen Laboratorien, die am Klinikum Darmstadt von den Autoren entwickelt und erstmalig auf der diesjährigen Medica vorgestellt wurde, sind die Kostenermittlung und Kostenbewertung.

Nach Erfassung aller direkten und indirekten Personalkosten einschließlich der gesamten Sachkosten liefert das Programm die detaillierten Kosten pro Ko-

stenträger, d. h., es werden für jeden erstellten Parameter die Kosten pro befundetem Parameter ermittelt. Auch eine Unterteilung nach Erbringung der Leistungen innerhalb bzw. außerhalb des Routinebetriebes ist möglich. Somit kann auch eine Deckungsbeitragsrechnung unter Berücksichtigung der möglichen Einnahmen aus den stationären und ambulanten Bereichen mit der Möglichkeit der Erstellung einer klaren Kostenstruktur durchgeführt werden. Dadurch wird z. B. die Erstellung von Angeboten für externe Auftraggeber erleichtert.

Ein besonderer Vorteil des Programms ist es, daß die direkten Personalkosten innerhalb und außerhalb des Routinebetriebes nicht nur durch die sogenannte Arbeitsplatzmethode ermittelt werden können, die immer dann ungenau ist, wenn Geräte von verschiedenen Arbeitsplätzen gemeinsam genutzt werden. Die neue Software bietet zusätzlich die Möglichkeit, auf ein neuartiges Konzept der Arbeitsgruppe „Analysenzeitermittlung“ der Deutschen und Österreichischen Gesellschaften für Klinische Chemie zurückzugreifen („Ermittlung des Personalbedarfs“, Instant-Schriftenreihe Band 8, Hg.: R. Haeckel, Springer-Verlag, Berlin 1992).

Weitere Anwendungsmöglichkeiten sind z. B. der Vergleich unterschiedlicher Rechnungsperioden sowie verschiedene statistische und grafische Darstellungen. Das Programm ermöglicht damit sowohl niedergelassenen als auch klinischen Laboratorien ein transparentes, auf einen Blick verständliches Kosten-Controlling. Dank des modularen Aufbaus und der Ausgabe der Ergebnisse in Listen ist es möglich, die erhaltenen Daten an die spezifischen Bedürfnisse der Anwender anzupassen und weiterzuverarbeiten.

Die Software läuft unter dem Programm Excel 5.0 auf jedem modernen PC. Sämtliche Programmabläufe werden in der besonders anwenderfreundlichen Programmiersprache 'Visual Basic' erstellt. Neben der manuellen Eingabe aller notwendigen Daten ist auch die automatische Übernahme der notwendigen Datenlisten möglich, z. B. über eine Schnittstelle wahlweise mit Online-Datenübertragung oder über Diskette.

Peter Krietsch/Manfred Dietel

Pathologisch- Anatomisches Cabinet

Vom Virchow-Museum zum Berliner Medizinhistorischen Museum in der Charité

1996. 192 Seiten mit 124 Farabbildungen. 17 x 24 cm.
Broschiert. DM 48,-/öS 350,-/sFr 44,50 ISBN 3-89412-254-4

Medizinhistorisch hat Berlin Unvergleichliches zu bieten, brennpunktartig versammelt in der Charité: Hier arbeiteten die bedeutendsten Ärzte Deutschlands, hier war das Zentrum der Forschung, hier entstanden schon im 18. Jahrhundert anatomische Sammlungen, und hier eröffnete Rudolf Virchow 1899 sein Pathologisches Museum.

Dieses Buch präsentiert das »Pathologisch-Anatomische Cabinet« in dreierlei Sinn: Es folgt dem wechselvollen Schicksal der früher »Cabinet« genannten Sammlungen, erzählt die dramatischen Geschichten einiger erhalten gebliebener Exponate und plädiert engagiert dafür, daß Berlin auch medizingeschichtlich wieder Hauptstadt wird durch ein Berliner Medizinhistorisches Museum.

»Die Geschichte dieser größten und wertvollsten Präparatesammlung, die jemals von einem Menschen zusammengetragen wurde, ist im vorliegenden, reich illustrierten Buch aufs lebendigste und mit vielen Quellenzitaten nachgezeichnet.«
Frankfurter Allgemeine Zeitung

Manfred Dietel/Peter Krietsch

Berliner Medizinhistorisches Museum an der Charité, Version 1.0

Systemmindestvoraussetzungen: 486 DX2/66, 4 MB Hauptspeicher, SVGA-Grafikkarte, 16-Bit-Soundkarte, Doublespeed CD-ROM-Laufwerk, DOS ab 5.0, Windows 3.X oder 95, Video für Windows, ca. 2 MB freien Festplattenspeicher. DM 98,-/öS 774,-/sFr 90,50 ISBN 3-89412-253-6

Sie finden auf dieser CD-ROM Exponate aus 300 Jahren Medizingeschichte. Sie sind ein Spiegelbild der Irrungen und Wirrungen der Natur mit Darstellungen von *Fehlbildungen*, *Infektionskrankheiten* und *Tumorerleiden*. *Kurzbiographien* bedeutender Wissenschaftler der Charité beschreiben deren Anstrengungen zur Erforschung der Krankheiten und zur Entwicklung angemessener Behandlungen. Ergänzend finden Sie eine Ausstellung des dafür notwendigen *technischen Handwerkszeugs* – von der ersten chirurgischen Säge über verschiedene Mikroskopgenerationen bis zu modernen Herzprothesen.

Die Museumsimagination, die Sie hier »betreten« können, wurde in realitas 1899 von Rudolf Virchow eingeweiht und seiner Bestimmung als Heimstätte der weltweit einmaligen pathologisch-anatomischen Sammlung übergeben. Nach Beschädigung im Zweiten Weltkrieg und Fremdnutzung begann nach der Wiedervereinigung der steinige Weg der Rekonstruktion. Um auf diesem Weg vorangehen zu können, benötigt das Museum IHRE ideelle und materielle Hilfe. Diese CD-ROM soll dazu beitragen.

Preisstand: 1. November 1996

Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin · Wien