J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 20, 1982, pp. 587–591

α_1 -Antitrypsin: Referenzwerte in Serum und Plasma mit Benzoyl-D, L-arginin-p-nitroanilid, einem chromogenen Substrat

Von I. Witt

Biochemisches Labor der Universitäts-Kinderklinik, Freiburg i.Br. und

W. Tritschler

Boehringer Mannheim GmbH, Diagnostica Forschung, Mannheim

(Eingegangen am 8. Februar/5. Mai 1982)

Zusammenfassung: Mit einer konfektioniert erhältlichen Testpackung für die Bestimmung von α_1 -Antitrypsin in einem kontinuierlichen Verfahren bei 25 °C wurden Referenzwerte bestimmt. Für ein Kollektiv von 100 Probanden im Alter von 20 bis 60 Jahren ergab sich für Serum ein Referenzbereich von 1,4 bis 2,4 kIU/l (1,9–3,4 g/l), für Plasma von 1,4 bis 2,1 kIU/l (1,9–3,0 g/l), (jeweils 5. bis 95. Perzentil).

Eine Alters- oder Geschlechtsabhängigkeit konnte nicht nachgewiesen werden; präprandiale und postprandiale Aktivitäten unterschieden sich nicht, zwischen Rauchern und Nichtrauchern wurde kein Unterschied der α_1 -Antitrypsin-Aktivitäten gefunden. Bei den Frauen ließ sich zwischen den Kollektiven mit und ohne hormonale Kontrazeption ein signifikanter Unterschied der Aktivitäten nachweisen.

Berücksichtigt man bei der Berechnung der Aktivitäten im Citratplasma die Verdünnung des Blutes mit Citratlösung, dann zeigt sich, daß in Plasma höhere Werte als in Serum gefunden werden (Median 13%): Die Messung in Plasma dürfte die in vivo-Aktivität von α_1 -Antitrypsin besser wiedergeben.

α_1 -Antitrypsin: Reference values in serum and plasma determined using benzoyl-D,L-arginine-p-nitroanilide, a chromogenic substrate

Summary: Reference values for α_1 -antitrypsin were determined using a commercially available kit for continuous assay at 25 °C. With a population of 100 probands aged between 20 and 60 years, a reference range of 1.4–2.4 kIU/l (1.9–3.4 g/l) was obtained for serum, and 1.4–2.1 kIU/l (1.9–3.0 g/l) for plasma. In each case, these ranges correspond to the 5th to 95th percentile. No variations according to age or sex were observed, nor was any difference noted between preprandial and postprandial activities, or between values in smokers and nonsmokers. Significantly different values were found in the group of women taking oral steroid contraceptives and the group not taking such contraceptives.

If the dilution of the blood sample with citrate solution is taken into account in calculating the activity in citrated plasma, it is apparent that higher values are found in plasma than in serum (median 13%): Hence, the in vivo- α_1 -antitrypsin activity can most probably be better determined using a plasma sample.

Einleitung

α_1 -Antitrypsin ist ein Akutphasenprotein: Bei entzündlichen Erkrankungen, Tumoren und Gewebszerfall reagiert es mit einer vermehrten Synthese (1). Klinisch wichtiger ist die Assoziation von genetisch bedingtem α_1 -Antitrypsin-Mangel mit dem im Erwachsenenalter auftretenden obstruktiven Lungenemphysem (1, 2). Ein

weiteres klinisches Korrelat des angeborenen α_1 -Antitrypsin-Mangels ist das Krankheitsbild der juvenilen Lebercirrhose (3, 4, 5). Die Beurteilung des α_1 -Antitrypsin-Wertes ist dadurch erschwert, daß Abhängigkeiten beschrieben sind: In der Schwangerschaft und bei Einnahme oraler Kontrazeptiva wurden erhöhte Werte gefunden (1, 6, 7). Weniger gesichert scheinen Geschlechts- und Altersabhängigkeiten zu sein (7, 8, 9).

Im Zusammenhang mit der Einführung einer Testkombination zur Bestimmung der α_1 -Antitrypsin-Aktivität haben wir für Serum und Plasma Referenzwerte ermittelt und sind der Frage nach Abhängigkeiten der α_1 -Antitrypsin-Aktivität nachgegangen.

Material und Methoden

Testprinzip

Serum oder Citratplasma werden mit einem Überschuss von Trypsin versetzt. Das nicht gebundene Trypsin setzt aus dem Substrat Benzoyl-D, L-arginin-p-nitroanilid (BAPA) p-Nitroanilin frei, dessen Absorption bei 405 nm ($\epsilon = 970 \text{ m}^2/\text{mol}$) kontinuierlich gemessen wird (10). Aus der Absorptionsdifferenz gegenüber dem „Leerwert von Trypsin“ (Reagenziengemisch ohne Probe) läßt sich die Aktivität von α_1 -Antitrypsin in Inhibitoreinheiten pro Liter Serum oder Plasma (IU/l) berechnen:

Eine Inhibitoreinheit α_1 -Antitrypsin ist die Aktivität, welche eine Trypsineinheit hemmt. Eine Trypsineinheit ist die Enzymaktivität, welche bei 25 °C 1 μmol Substrat in 1 min umsetzt.

Reagenzien, Methoden, Geräte

α_1 -Antitrypsin, Farbstoff (Best.Nr. 416509) sowie Testpackungen zur Bestimmung von L- γ -Glutamyl-transferase (EC 2.3.2.2), Harnstoff, Triglyceriden und Gesamtprotein entstammten dem Lieferprogramm von Boehringer Mannheim GmbH, D-6800 Mannheim 31. Zur Bestimmung von Aspartat-aminotransferase (EC 2.6.1.1) und Alanin-aminotransferase (EC 2.6.1.2) wurden Packungen von E. Merck, D-6100 Darmstadt 2, eingesetzt. Kreatinin wurde mit der Jaffé-Reaktion kinetisch mit dem Creatinin-Analyser von Beckman Instruments, D-8000 München 40, gemessen. Nach der Arbeitsanleitung wurde α_1 -Antitrypsin kontinuierlich bei 25 °C an einem Photometer Eppendorf 1101 M (Netheler und Hinz, D-2000 Hamburg) mit Thermostat, Wechselautomatik und Schreiber bestimmt. Die Proteinelektrophorese wurde als Mikrozonenelektrophorese auf Celluloseacetatfolie, Färbung mit Ponceau S und automatischer Auswertung mit Elscript III (Hirschmann D-8000 München), durchgeführt.

Mit Natriumcitratlösung beschickte Probenröhrchen (0,5 ml, 0,11 mol/l, Gesamtvolumen 5 ml) wurden von der Fa. Sarstedt, D-5223 Rommelsdorf, bezogen (Best.Nr. 05268).

Probanden

Das Ausgangskollektiv der Erwachsenen (N = 100) bestand aus Blutspendern der Blutbank der Universitätsklinik Freiburg/Brsg. Per Anamnese wurden erfaßt: Alter, Geschlecht, Einnahme von Kontrazeptiva, prä- bzw. postprandialer Zustand, Rauchen. Schwangere sowie Probanden mit aktuellen Erkrankungen oder Medikamenten-Therapie sind im Ausgangskollektiv nicht enthalten. Zur Auswahl eines Referenzkollektivs wurden klinisch-chemische Kenngrößen eingesetzt, welche bei Leber-, Nieren- sowie entzündlichen Erkrankungen verändert sind.

Referenzwerte: Aspartat-aminotransferase: Männer bis 18 U/l, Frauen bis 15 U/l; Alanin-aminotransferase: Männer bis 22 U/l, Frauen bis 17 U/l; L- γ -Glutamyltransferase: Männer 6–28 U/l, Frauen 4–18 U/l; Harnstoff: 1,7–8,3 mmol/l; Kreatinin: Männer 44–97 $\mu\text{mol/l}$, Frauen 44–80 $\mu\text{mol/l}$; Albumin 38–54 g/l, α_1 -Globulin 1–3 g/l, α_2 -Globulin 4–9 g/l, β -Globulin 5–11 g/l, γ -Globulin 6–16 g/l.

Probennahme und Qualitätssicherung

Die Blutabnahme erfolgte vormittags. Nach Lösen der Stauung wurden etwa 500 ml Blut (Blutkonserve) und danach Blut für Serum- und Plasmagewinnung entnommen. Citratplasma und Serum wurden durch 20 min Zentrifugation bei 2000 g erhalten. Die Proben wurden bei –20 °C eingefroren und innerhalb von 4 Wochen untersucht.

Die Präzision der Meßergebnisse von α_1 -Antitrypsin wurde mit den Humancitratplasmen PreciChrom® I und II (Charge 09001) sowie einem portioniert eingefrorenen laboreigenen Plasma- und Serum-Pool überprüft. Die Wiederfindung wurde mit PreciChrom® I und II (Charge 1002) überprüft, indem an 10 Tagen jeweils Doppelbestimmungen in beiden Kontrollplasmen durchgeführt wurden.

Statistische Methoden und Berechnungen

Die Präzision in der Serie und von Serie zu Serie wurde mit Hilfe einer einfachen Varianzanalyse berechnet. Die Verteilung der Meßwerte wurde durch Angabe der Perzentile beschrieben. Zur Überprüfung eines geschlechtsspezifischen Unterschiedes sowie anderer Einflußgrößen auf die α_1 -Antitrypsin-Aktivität (siehe Tab. 4) wurde der U-Test von Mann-Whitney eingesetzt (11). Als Irrtumswahrscheinlichkeit wurde $\alpha = 0,05$ festgelegt.

Berechnungen für Referenzwerte

α_1 -Antitrypsin in Serum und Citratplasma aus 9 + 1 verd. Blut:

$$\text{kIU/l (25 °C)} = 26,03 \cdot \Delta A/\text{min.}$$

$$\text{g/l (25 °C)} = 36,50 \cdot \Delta A/\text{min.}$$

Nach Angabe des Herstellers wurde der Faktor für die Angabe in g/l durch Vergleich der photometrischen Aktivitätsbestimmung mit der radialen Immunodiffusion erhalten.

Berechnungen für Vergleichsuntersuchungen Plasma/Serum

Die jeweilige Verdünnung des Blutes bei Verwendung von Citratlösung als Antikoagulans hängt vom individuellen Hämatokrit (PCV) ab.

Damit gilt:

α_1 -Antitrypsin in Plasma:

$$\text{kIU/l (25 °C)} = 26,03 \cdot \left[1 + \frac{1}{9(1 - \text{PCV})} \right] \cdot \Delta A/\text{min}$$

Ergebnisse und Diskussion

Qualitätssicherung

Tabelle 1 enthält die Ergebnisse der Qualitätssicherung von α_1 -Antitrypsin in Kontrollplasmen sowie eingefrorenen und einmal wiederaufgetauten Plasma- und Serumproben. Die Präzision in der Serie und von Serie zu Serie war gut bis befriedigend (VK: 1,4 bis 6,5%); die Wiederfindung des Sollwertes war während des Untersuchungszeitraumes gegeben.

Referenzwerte

In Tabelle 2 ist die Verteilung der α_1 -Antitrypsin-Aktivitäten sowie -Konzentrationen im Ausgangskollektiv (N = 100) für Serum und Plasma wiedergegeben. Für Serum bzw. Citratplasma (aus 9 + 1 verd. Blut) ergeben sich nur geringe Unterschiede: Wählt man zur Charakterisierung der Variabilität der Meßwerte den 90%-Bereich zwischen dem 5. und 95. Perzentil, dann unterscheidet sich – bedingt durch die unterschiedliche Rechtsschiefe der Verteilungen – lediglich die Obergrenze. Die klinisch-wichtigere Untergrenze des Referenzbereiches liegt bei 1,4 kIU/l entsprechend 1,9 g/l.

Die Abbildung 1 zeigt die Verteilungen für Serum und Plasma. Wie die Verteilungen der in Tabelle 3 dargestellten klinisch-chemischen Kenngrößen zeigen, enthält das Ausgangskollektiv Probanden, bei denen Erkrankungen nicht auszuschließen sind. Setzt man die jeweiligen Referenzwerte als Auswahlkriterien an, dann ergibt sich eine Reduzierung des Kollektivs um 15 auf 85. Zwischen dem Endkollektiv (N = 85) und dem aussortierten Kollektiv (N = 15) besteht jedoch bezüglich der α_1 -Antitrypsin-Werte kein Unterschied (Tab. 4), so daß das Ausgangskollektiv zugleich als Referenzkollektiv angesehen werden kann.

Alter, Geschlecht, Rauchen oder prandialer Zustand beeinflussen offensichtlich die α_1 -Antitrypsin-Aktivität nicht (Abb. 2, Tab. 4). Dagegen zeigen Frauen, die hormonale Kontrazeptiva einnehmen, signifikant höhere Werte als Frauen ohne hormonale Kontrazeption. Da der Stichprobenumfang der beiden Kollektive sehr klein ist, kann aus diesem Befund keine Schlußfolgerung über eine Differenzierung der Referenzwerte gezogen werden. Von den in der Literatur beschriebenen Abhängigkeiten (1,6–9) können wir damit Angaben über erhöhte α_1 -Antitrypsin-Werte bei hormonaler Kontrazeption bestätigen. Eine Geschlechts- oder Altersabhängigkeit geht aus unseren Daten nicht hervor.

Abb. 1. Verteilung der α_1 -Antitrypsin-Aktivitäten (25 °C) in Serum und Plasma im Ausgangskollektiv (N = 100 Erwachsene)
 α_1 -Antitrypsin (Serum) [kIU/l] N₁ = 100 ▨
 α_1 -Antitrypsin (Plasma) [kIU/l] N₂ = 100 ▩
 Die Plasmawerte beziehen sich auf 9 + 1 verd. Blut

Tab. 1. α_1 -Antitrypsin: Präzision in Kontrollplasmen, Nativplasma und Serum sowie Wiederfindung in Kontrollplasmen.

Untersuchungs-material	Perzentile ¹⁾ [kIU/l]			VK [%]		Kontroll-plasmen	Sollwert [kIU/l] (Streu-bereich ²⁾)	Perzentile ³⁾ [kIU/l]				
	Min.	Median	Max.	Serie	Serie/Serie			Min.	10%	50%	90%	Max.
PreciChrom® I	1,19	1,41	1,55	3,4	6,5	PreciChrom® I	1,17 (0,94–1,40)	1,10	1,15	1,19	1,33	1,36
PreciChrom® II	0,70	0,77	0,84	5,2	2,7	PreciChrom® II	0,61 (0,49–0,73)	0,54	0,54	0,61	0,70	0,70
Nativplasma	1,38	1,49	1,64	2,2	4,1							
Serum	2,16	2,40	2,58	1,4	5,4							

¹⁾ Niedrigste und höchste Werte sowie Mediane an 5 Tagen mit jeweils 6 Bestimmungen (N = 30).

²⁾ Der Streubereich entspricht $\pm 20\%$ des vom Hersteller angegebenen Sollwertes.

³⁾ Die Werte geben das 10., 50. (Median), 90. Perzentil sowie niedrigste und höchste Meßwerte für Doppelbestimmungen an 10 Tagen (N = 20) an.

Tab. 2. Verteilung der α_1 -Antitrypsin-Werte (25 °C) im Ausgangskollektiv.

Die Werte geben das 2,5., 5., 50. (Median), 95. und 97,5. Perzentil sowie niedrigste und höchste Meßwerte in verschiedenen Probenmaterialien für 100 Probanden an.

α_1 -Antitrypsin	Probenmaterial	Minimum	2,5%	5%	50%	95%	97,5%	Maximum
kIU/l	Serum	1,2	1,3	1,4	1,8	2,4	2,6	2,9
g/l	Serum	1,6	1,9	1,9	2,5	3,4	3,6	4,1
kIU/l	Plasma verd. ¹⁾	1,2	1,3	1,4	1,7	2,1	2,2	3,0
g/l	Plasma verd. ¹⁾	1,7	1,8	1,9	2,3	3,0	3,1	4,2
kIU/l	Plasma ²⁾	1,4	1,5	1,6	2,0	2,6	2,6	3,6

¹⁾ Die Werte beziehen sich auf Citratplasma aus 9 + 1 verd. Blut.

²⁾ Der experimentell ermittelte Wert für Citratplasma aus 9 + 1 verd. Blut wurde über den individuellen Hämatokrit korrigiert, d. h. auf unverdünntes Plasma bezogen.

Unterschiede Plasma/Serum

Berücksichtigt man bei der Berechnung der Aktivitäten im Plasma die jeweilige Verdünnung mit Citratlösung, d.h. den individuellen Hämatokrit, dann ergeben sich für Plasma höhere Aktivitäten als für Serum (Tab. 2). Die Differenzen zwischen Plasma und Serum liegen zwischen - 0,02 und 0,32 Anteilen (5. bzw. 95. Perzentil), der Median liegt bei 0,13 Anteilen (13%; Abb. 3).

Diese Unterschiede lassen sich möglicherweise damit erklären, daß es bei der Gerinnung zu einer Freisetzung von Proteinasen kommt und zwischen α_1 -Antitrypsin und den aktiven Proteinasen Komplexe entstehen. Denkbar wäre auch eine Fixierung an das Fibrin-Gerinnse. Ein Teil des α_1 -Antitrypsin steht damit zur Komplexbildung mit Trypsin nicht mehr zu Verfügung, und man findet im Serum niedrigere Werte als im Plasma.

Abb. 2. Häufigkeitsverteilung der α_1 -Antitrypsin-Aktivitäten (Plasma) im Ausgangskollektiv (N = 100) in Abhängigkeit vom Alter.

Abb. 3. α_1 -Antitrypsin: Relative Differenzen zwischen den Aktivitätsmessungen in Plasma und Serum (N = 100), bezogen auf Serum.

Danksagung

Für die sorgfältige Durchführung der Untersuchungen danken wir Frau H. Flad und Frau B. Wohlhüter.

Tab. 3. Verteilung klinisch-chemischer Kenngrößen im Ausgangskollektiv. Die Werte geben das 5., 50. (Median) und 95. Perzentil sowie niedrigste und höchste Meßwerte von 100 Probanden an.

Kenngröße [Einheit]	Minimum	5%	50%	95%	Maximum
Aspartat-aminotransferase [U/l]	6	7	10	16	19
Alanin-aminotransferase [U/l]	5	5	9	20	42
L- γ -Glutamyltransferase [U/l]	6	7	11	29	93
Harnstoff [mmol/l]	2,8	3,2	5,0	7,8	9,3
Kreatinin [μ mol/l]	44	53	80	97	168
Albumin [g/l]	38	43	48	53	59
α_1 -Globulin [g/l]	1	1	2	3	3
α_2 -Globulin [g/l]	4	4	5	8	9
β -Globulin [g/l]	5	6	8	10	11
γ -Globulin [g/l]	5	6	9	13	15
Triglyceride [mmol/l]	0,5	0,5	1,1	2,4	3,5
Hämatokrit (PCV)	0,37	0,40	0,45	0,49	0,50

Tab. 4. Verteilung der α_1 -Antitrypsin-Aktivitäten (25 °C) in verschiedenen Kollektiven. Dargestellt sind von N Probanden die niedrigsten, höchsten und mittleren Aktivitäten (Mediane) in Citratplasma aus 9 + 1 verd. Blut sowie die Ergebnisse der Signifikanzprüfung mit dem U-Test.

Gruppe	N	α_1 -Antitrypsin [kIU/l]	Signifikanz ($\alpha \approx 0,05$)
		Minimum Median Maximum	
Endkollektiv	85	1,2 1,7 3,0	b
ausortiertes Kollektiv	15	1,4 1,6 2,3	
Männer	76	1,2 1,7 2,3	
Frauen	24	1,3 1,7 3,0	keine
Raucher	61	1,3 1,7 3,0	
Nichtraucher	39	1,2 1,6 2,2	keine
Keine hormon. Kontrazeptiva	17	1,3 1,5 1,9	
Hormonale Kontrazeptiva	7	1,8 2,1 3,0	Signifikanz
Nüchtern	32	1,3 1,7 2,3	
Post-prandial	68	1,2 1,7 3,0	keine
Triglyceride normal	88	1,2 1,7 3,0	
Triglyceride erhöht ^a	12	1,3 1,6 2,2	b
Alter: < 35 Jahre	66	1,3 1,7 3,0	
Alter: $\geq$ 35 Jahre	34	1,2 1,7 2,3	keine

^a mehr als 2,0 mmol/l.

^b Wegen der unterschiedlichen Fallzahlen der Kollektive wurde keine Signifikanzprüfung durchgeführt. Da der Bereich des Zweitkollektivs innerhalb des Wertebereiches des Erstkollektivs liegt, dürfte jedoch kein Unterschied zwischen beiden Gruppen vorliegen.

Literatur

1. Editorial (1973) Brit. Med. Journ. *1*, 758.
2. Laurell, C. B. & Eriksson, S. (1963) Scand. J. Clin. Lab. Invest. *15*, 132–140.
3. Sharp, H. L., Bridges, R. A., Krivit, W. & Freier, E. F. (1969) J. Lab. Clin. Med. *73*, 934–939.
4. Karitzky, D., Lesch, R., Goedde, H. W., Witt, I., Boehm, N., Beckmann, R., Jobke, A. & Künzer, W. (1978) Dtsch. Med. Wochenschr. *103*, 161–166.
5. Karitzky, D. & Witt, I. (1979) Therapiewoche *29*, 8622–8624.
6. Herbeth, B., Bagrel, A., Dalo, B., Siest, G., Leclerc, J. & Rauber, G. (1980) Clin. Chim. Acta *112*, 293–299.
7. Liappis, N., Beeser, H., Fritsche, Ch. & Hildenbrand, G. (1981) Lab. Med. *5*, 73–78.
8. Denko, Ch. W. & Gabriel, P. (1981) Ann. Clin. Lab. Sci. *11*, 63–68.
9. Liappis, N., Schlebusch, H. & Hildenbrand, G. (1981) Klin. Pädiat. *193*, 88–90.
10. Hoffmann, M. L., van den Broek, W. G. M. & Jansen, A. P. (1976) Clin. Chim. Acta *71*, 251–259.
11. Conover, W. J. (1971) Practical nonparametric statistics J. Wiley & Sons, New York, pp. 224–236.

Dr. rer. nat. W. Tritschler
Boehringer Mannheim GmbH
Diagnostica Forschung
Sandhofer Straße 116
D-6800 Mannheim 31

Prof. Dr. Irene Witt
Klinisch-Chemisches und Biochemisches Labor
Universitäts-Kinderklinik
Mathildenstraße 1
D-7800 Freiburg