

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
11. Jg. 1973, S. 435—437

Eine methodische Vereinfachung der mechanisierten Bilirubin-, Serumweiß- und Liquoreiweißbestimmung

Von H. KAEHLER und J. WEILAND

Aus dem Chemischen Institut des Städtischen Krankenhauses Berlin-Neukölln

(Eingegangen am 4. Juni/30. Juli 1973)

Es wird das Vorgehen beschrieben, Bilirubin und Eiweiß im Serum bzw. Plasma sowie Eiweiß im Liquor cerebrospinalis mit dem Autoanalyzer zu bestimmen, ohne das Schlauchsystem zu ändern oder einen Filterwechsel vornehmen zu müssen. Das Umstellen von einer Methode auf eine andere dauert weniger als 15 min. Vergleichende manuelle Bestimmungen beweisen die Zuverlässigkeit der mechanisierten Methoden. Für manuelle und mechanisierte Bestimmungsverfahren wird ein Bewertungskriterium angegeben.

A simplified determination of bilirubin and protein in serum, plasma and liquor cerebrospinalis

The procedure for the determination of bilirubin and protein in serum, or blood plasma, and of protein in liquor cerebrospinalis by the Autoanalyzer without changing the tube system or exchanging the filters is described. Changing from one method to the other takes less than 15 min. A comparison with manual determinations showed the reliability of the mechanized methods. Criteria of suitability for the manual and mechanical analytical methods are given.

Der Einsatz mechanisierter Bestimmungsmethoden im klinischen Laboratorium scheitert häufig am Kosten- und Platzbedarf, mit dem die Aufstellung von Analysen-„automaten“ verbunden ist. Der Aufwand kann jedoch gering gehalten werden, wenn ein solcher Analysator für mehrere Bestimmungen einsetzbar ist.

Im folgenden wird die Technologie angegeben, auf einem ursprünglich für die Serumbilirubinbestimmung eingerichteten Autoanalyzer¹⁾, den Gesamteiweißgehalt in Serum, Plasma und Liquor cerebrospinalis zu bestimmen, ohne dabei das Schlauchsystem zu ändern oder die Interferenzfilter und die Blende für den Vergleichsstrahl austauschen zu müssen. Die erforderliche „Umrüst“zeit beträgt weniger als 15 min für das Durchspülen des Schlauchsystems mit den neuen Reagenzien; es ist allein die Basislinie nachzustellen.

Die Meßergebnisse werden mit den Befunden manueller Untersuchungstechniken verglichen.

Material und Methoden

Die mechanisierten Bestimmungen wurden auf einem 1-Kanal-Autoanalyzer (Untersuchungsfrequenz: 50 Proben/h, Waschzeit: Probenansaugzeit = 2:1, Papiervorschub: 7,8 mm/min) durchgeführt. Die Förderleistungen des Schlauchsystems, die verwendeten Reagenzlösungen sowie die Reihenfolge der Reagenzien-einspeisung sind im Fließschema (Abb. 1) dargestellt.

Die Bilirubinbestimmungen erfolgten nach der Methode von JENDRASSIK und GRÖF (1); mechanisiert in Anlehnung an die Technicon-Vorschrift (2), manuell unter Verwendung des Reagenziensatzes „Merckotest 3333 Bilirubin“²⁾.

Die Plasma- und Serumweißbestimmungen wurden mechanisiert nach der Biuretmethode (3) und manuell refraktometrisch durchgeführt.

¹⁾ Hersteller: Technicon GmbH, Bad Vilbel.

²⁾ Hersteller: E. Merck, Darmstadt.

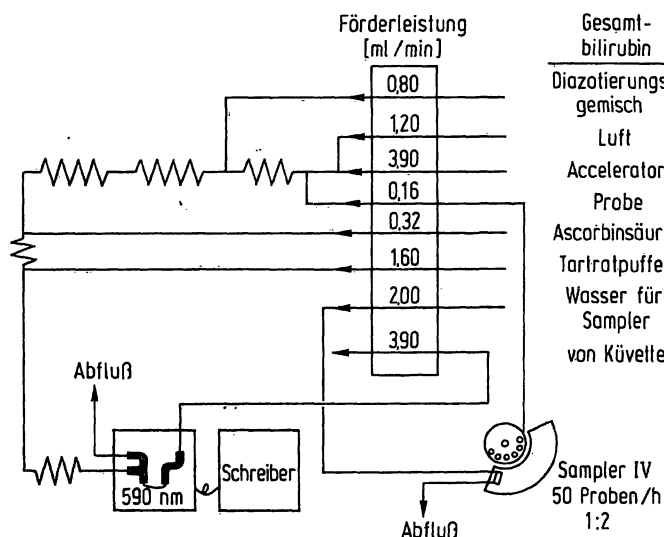


Abb. 1

Fließschema für die mechanisierte Bilirubin-, Liquoreiweiß- und Serum-/Plasmaeiweißbestimmung

Gesamt-bilirubin	Gesamteiweiß im Serum	Gesamteiweiß im Liquor	direktes Bilirubin
Diazotierungs-gemisch	Arbeitslösung	Wasser	Diazotierungs-gemisch
Luft	Luft	Luft	Luft
Accelerator	Arbeitslösung	Biuretlösung	Solzsäure
Probe	Probe	Probe	Probe
Ascorbinsäure	Arbeitslösung	Folin	Ascorbinsäure
Tartratpuffer	Arbeitslösung	Natronlauge	Tartratpuffer
Wasser für Sampler von Küvette	Wasser für Sampler von Küvette	Wasser für Sampler von Küvette	Wasser für Sampler von Küvette

Die Liquoreiweißbestimmungen erfolgten mit FOLIN'schem Phenolreagenz (4, 5, 6) entsprechend unserer manuellen Standardmethode:

0,5 ml Liquor mit 3,5 ml 100 g/l Na_2CO_3 -Lösung und 0,5 ml 1 g/l CuSO_4 -Lösung mischen. Nach 30 min (Raumtemperatur) 0,5 ml FOLIN-CIOCALTEU-Reagenz (Merck Nr. 9001, 1 + 1 mit dest. Wasser vorverdünnt) zugeben, 5 min auf 37°C erwärmen und bei 578 nm die Extinktion gegen Reagenzienleerwert messen.

Bei der mechanisierten Liquoreiweißbestimmung wird in stärker basischem Milieu (0,5 mol/l NaOH) eine wesentliche Vergrößerung der Peakhöhen erreicht; als Detergenz ist Tween 40 geeignet, da Brij 35 starke Trübungen mit dem Phenolreagenz hervorruft. Zur Registrierung³⁾ der Absorptionsspektren der Chromophore (Abb. 2) wurden entspr. dem Fließschema (Abb. 1) für jede Methode die einzusetzenden Chemikalien und Proben manuell gemischt.

Reagenzien

1 Gesamtbilirubin

1.1 Accelerator: In 400 ml dest. Wasser von 50 bis 60°C werden 17 g Coffein, 25 g Natriumbenzoat und 42 g Natriumacetat gelöst und nach dem Abkühlen mit dest. Wasser zu 1000 ml aufgefüllt.

1.2 Sulfanilsäure: 10 g Sulfanilsäure werden in 500 ml dest. Wasser und 15 ml konz. Salzsäure ($d = 1,15$) gelöst und mit dest. Wasser zu 1000 ml aufgefüllt.

1.3 Natriumnitrit: 0,5 g NaNO_2 mit dest. Wasser zu 100 ml lösen.

1.4 Diazotierungsgemisch: 200 ml Lösung 1.2 mit 20 ml Lösung 1.3 mischen.

1.5 Tartratpuffer: 50 g NaOH und 175 g Kaliumnatriumtartrat $\cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ werden mit dest. Wasser zu 1000 ml gelöst.

1.6 Ascorbinsäure: 40 g Ascorbinsäure werden mit dest. Wasser zu 1000 ml gelöst.

2 Direkt reagierendes Bilirubin

Es werden die Reagenzien der Gesamtbilirubinbestimmung verwendet, jedoch wird die Acceleratorlösung 1.1 ersetzt durch

2.1 0,05 mol/l Salzsäure.

3 Plasma- und Serumeiweiß

3.1 Alkalische Jodidlösung: 8 g NaOH und 5 g KJ werden mit dest. Wasser zu 1000 ml gelöst.

3.2 Biuret-Lösung: In 500 ml dest. Wasser werden nacheinander 45 g Kaliumnatriumtartrat $\cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 15 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ und 5 g KJ gelöst. Nach Zugabe von 100 ml 2 mol/l NaOH wird die Lösung mit dest. Wasser zu 1000 ml aufgefüllt.

3.3 Arbeitslösung: 800 ml Lösung 3.1 mit 200 ml Lösung 3.2 mischen.

3.4 Leerlösung: 9 g Kaliumnatriumtartrat $\cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ werden mit Lösung 3.1 zu 1000 ml gelöst. (3.4 ist zur Ermittlung der Probenleerwerte anstelle der Lösung 3.3 zu verwenden.)

4 Liquoreiweiß

4.1 Biuret-Lösung: 0,8 g Kaliumnatriumtartrat $\cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ und 0,4 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ werden in 500 ml dest. Wasser gelöst. Nach Zugabe von 100 ml 0,5 mol/l NaOH wird die Lösung mit dest. Wasser zu 1000 ml aufgefüllt.

4.2 FOLIN-Phenol-Reagenz: Die Stammlösung (z. B. Merck Nr. 9001) wird 1 + 1 mit dest. Wasser verdünnt.

4.3 0,5 mol/l NaOH.

Justierlösungen

Die Justierlösungen wurden für die Bilirubinbestimmungen in den Konzentrationen 7,0 bis 150,0 mg/l \cong 12 bis 256 $\mu\text{mol/l}$ aus einem Kontrollserum⁴⁾ und für die Serum-/Plasmaeiweißbestimmungen in den Konzentrationen 20 bis 100 g/l bzw. für die Liquoreiweißbestimmungen (über eine Stammlösung mit 2,0 g/l Albumin) im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 1,2 g/l aus einem Albumin-Stock⁵⁾ täglich frisch hergestellt.

Ergebnisse und Diskussion

Probenfrequenz und die gegenüber den meisten Standardverfahren (2) verlängerte Waschphase des Fließsystems (Abb. 1) führen zu einer Trennung der aufeinanderfolgenden Peaks, die keine Berücksichtigung von Verschleppungseffekten bei der Auswertung erfordert.

Die halblogarithmisch dargestellten Bezugfunktionen verlaufen bis zu den höchsten eingesetzten Konzentrationen linear und dienen zur Auswertung aller Meßergebnisse.

Die Bestimmungen der Präzision in der Serie und von Tag zu Tag sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Als Vergleichsmethoden dienen eine manuelle Vorschrift (8) bei der Bilirubinbestimmung, beim Serumeiweiß die refraktometrische Bestimmung und bei der Liquoreiweißbestimmung eine manuelle Technik (vgl. oben).

Innerhalb einer Serie und von Tag zu Tag liegen die Präzisionen der mechanisierten Verfahren beim Liquoreiweiß und beim Gesamtbilirubin über den Präzisionen der manuellen Methoden; bei der Serum-

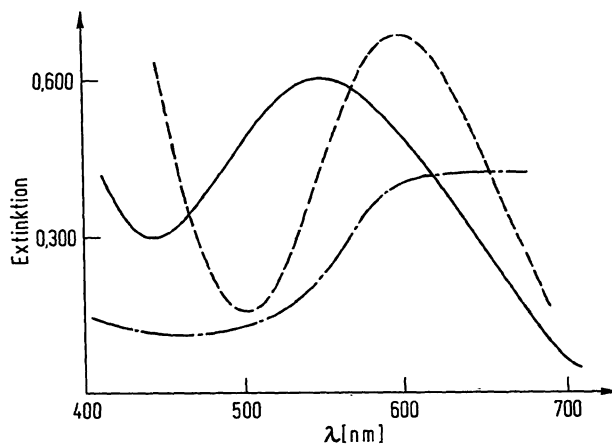


Abb. 2

Absorptionsspektren der Chromophore der Bilirubin- (-----), Liquoreiweiß- (—) und Serumeiweiß- (-----)bestimmungen.

³⁾ Unicam SP 1800 der Philips GmbH, Hamburg.

Tab. 1

Präzision innerhalb einer Serie und von Tag zu Tag bei mechanisierter und manueller Bestimmung von Gesamtbilirubin, Serumeiweiß und Liquoreiweiß bei 590 nm

	Gesamtbilirubin	Eiweiß im Serum	Eiweiß im Liquor
Präzision innerhalb einer Serie			
Autoanalyzer VK	1,0% (n = 15)	1,5% (n = 15)	1,2% (n = 17)
Handmethode VK	2,1% (n = 15)	0,8% (n = 15)	2,2% (n = 17)
Präzision von Tag zu Tag			
Autoanalyzer VK	2,0% (n = 15)	2,9% (n = 15)	2,5% (n = 15)
Handmethode VK	3,9% (n = 15)	1,5% (n = 15)	4,3% (n = 15)

⁴⁾ Bilirubin Control der Firma Dade, München.

⁵⁾ Formula T 23-0204 der Firma Technicon, Bad Vilbel.

eiweißbestimmung ist dagegen — in Übereinstimmung mit den Angaben von DOERR und STAMM (7) — die Handmethode dem mechanisierten Verfahren überlegen, auch die ermittelten Variationskoeffizienten entsprechen den Literaturangaben (9).

Der Vergleich statistischer Größen (10) erlaubt Aussagen über die Qualität von Analysensystemen. Wir verwenden als geeigneten Indikator den Analysatorquotienten AQ, der für Konzentrationen im sog. klinischen Normalbereich definiert ist zu:

$$AQ = \frac{VK \text{ der Messung in Serie}}{VK \text{ der Messung von Tag zu Tag}} \cdot 100.$$

AQ sollte für gute — auch manuelle — Arbeitsplätze nur wenig unter 50 absinken. Der Quotient wird sich dem Grenzwert 100 nähern, je besser die mechanisierten Systeme individuelle Fehler des Bedienungspersonals und apparative Inkonstanzen eliminieren.

Aus den Angaben der Tabelle 1 errechnen sich Analysatorquotienten zwischen 48 und 54. Am AQ-Kriterium geprüft, verringert die Fließsystemtechnik — trotz im allgemeinen verbesserter Präzisionen — den Störeinfluß äußerer Bedingungen nicht in dem gewünschten Maße. Wir führen dies auf das unterschiedliche Nachlassen der Schlauchelastizität, auf einen unterschiedlichen Füllungsgrad der Probenbecher sowie auf Temperatureinflüsse und Störungen im Strömungsprofil während der langen Verweilzeit im System zurück.

Der Vergleich zwischen den mechanisierten und manuellen Untersuchungsverfahren wird durch Korrelationsbetrachtungen (Berechnung der Regressionsfunktion $y = a + b \cdot x$) möglich. Ihre Äquivalenz wird durch den Korrelationskoeffizienten r ausgedrückt, der bei sich völlig entsprechenden Verfahren zu 1 wird. Die Konstanten der Regressionsfunktionen und die Korrelationskoeffizienten in Tabelle 2 zeigen eine gute Äquivalenz der angewandten Methoden.

VK und Korrelationskoeffizient der Serumeiweißbestimmung bei Messungen außerhalb des Absorptionsmaximums des Chromophors (Abb. 2) fallen deutlich ab:

bei 550 nm: $n = 15$, $\bar{x} = 77,7$ g/l, $s = 0,79$ g/l,

VK = 1,0%

bei 590 nm: $n = 15$, $\bar{x} = 78,3$ g/l, $s = 1,17$ g/l,

VK = 1,5%.

Tab. 2

Konstanten der Regressionsgeraden und Korrelationskoeffizienten bei mechanisierter und manueller Bestimmung von Gesamtbilirubin, Serumeiweiß und Liquoreiweiß bei 590 nm bzw. 550 nm

	Anzahl	a	b	r
Bilirubin im Serum (590 nm)				
Autoanalyser (x)	100	-1,43	1,027	0,990
Handmethode (y)				
Eiweiß im Liquor (590 nm)				
Autoanalyser (x)	99	0,01	0,934	0,987
Handmethode (y)				
Eiweiß im Serum (590 nm)				
Autoanalyser (y)	92	0,40	0,976	0,967
Handmethode (x)				
Eiweiß im Serum (550 nm)				
Autoanalyser (y)	100	0,38	0,986	0,990
Handmethode (x)				

Der Mittelwertunterschied ist nach dem t-Test (12) zufällig ($p = 0,05$): die Zuverlässigkeit (Vertrauensbereiche) von Absorptionsmessungen wird durch die Verwendung sog. Routine-Einfach-Photometer (11) und durch Messungen an den Flanken eines Absorptionspeaks herabgesetzt.

Die Richtigkeit (10) der untersuchten Methoden wurde in der Serie und von Tag zu Tag unter Verwendung von Kontrollseren⁶⁾ überprüft. Der Vergleich mit den tabellierten Werten des t-Tests ($p = 0,05$) zeigte für die gemessenen Abweichungen ($< 1,5\%$ vom Sollwert) keine systematischen Fehler. Ein Kontrollliquor⁷⁾ war zur Überprüfung ungeeignet, da sein Sollwert (Trübungsmessung) bis zu 17% niedriger lag als die ermittelten Werte. Bei guter Präzision ergab die refraktometrische Eiweißbestimmung — nicht jedoch die Biuretmethod — ähnlich hohe systematische Fehler, wenn Kontrollseren⁶⁾ oder Albuminlösungen⁸⁾ verwendet wurden.

Die vorgestellte methodische Vereinfachung der mechanisierten Bestimmung von Bilirubin, Liquor-, Plasma- und Serumeiweiß liefert präzise und — mit der zu fordernden Sicherheit — von systematischen Fehlern freie Meßwerte.

⁶⁾ Monitrol I und II der Firma Dade, München.

⁷⁾ Spinal Fluid Control der Firma Hyland, München.

⁸⁾ Formula T 23—0204 der Firma Technicon, Bad Vilbel.

Literatur

1. JENDRASSIK, L. & GRÓF, P. (1938), *Biochem. Z.* 297, 81—89. — 2. Technicon Autoanalyzer Methodology N-51. — 3. WEICHELBAUM, T. E. (1946), *Amer. J. Clin. Pathol., Techn. Section* 10, 40—49. — 4. LOWRY, O. H. & ROSEBROUGH, N. J. (1951), *J. Biol. Chem.* 193, 265—275. — 5. WALDMAN, R. K. & KRAUSE, L. A. (1953), *J. Lab. Clin. Med.* 42, 489—492. — 6. DAUGHADAY, W. H. & LOWRY, O. H. (1952), *J. Lab. Clin. Med.* 39, 663—665. — 7. DOERR, P. &

STAMM, D. (1968), *diese Z.* 6, 304—309. — 8. *Klinisches Labor* (1970), E. Merck, Darmstadt S. 103—108. — 9. NAZAR, S. M. & SCHMIDT, H. (1972), *diese Z.* 10, 548—551. — 10. RICHTERICH, R., GREINER, R. & KÜFFER, H. (1973), *diese Z.* 11, 65—75. — 11. VON KLEIN-WISENBERG, A. (1973), *Ärztl. Lab.* 18, 243—252. — 12. SACHS, L. (1968), *Statistische Auswertungsmethoden*, Springer Verlag Berlin, S. 140, 256.

Dr. H. Kachler
Städt. Krankenhaus Neukölln
Chemisches Institut
1 Berlin 47
Rudower Straße 56