

Die klinische Chemie – Herausforderung der Medizin für die analytische Chemie und die Nanowissenschaften

Jürgen Durner*

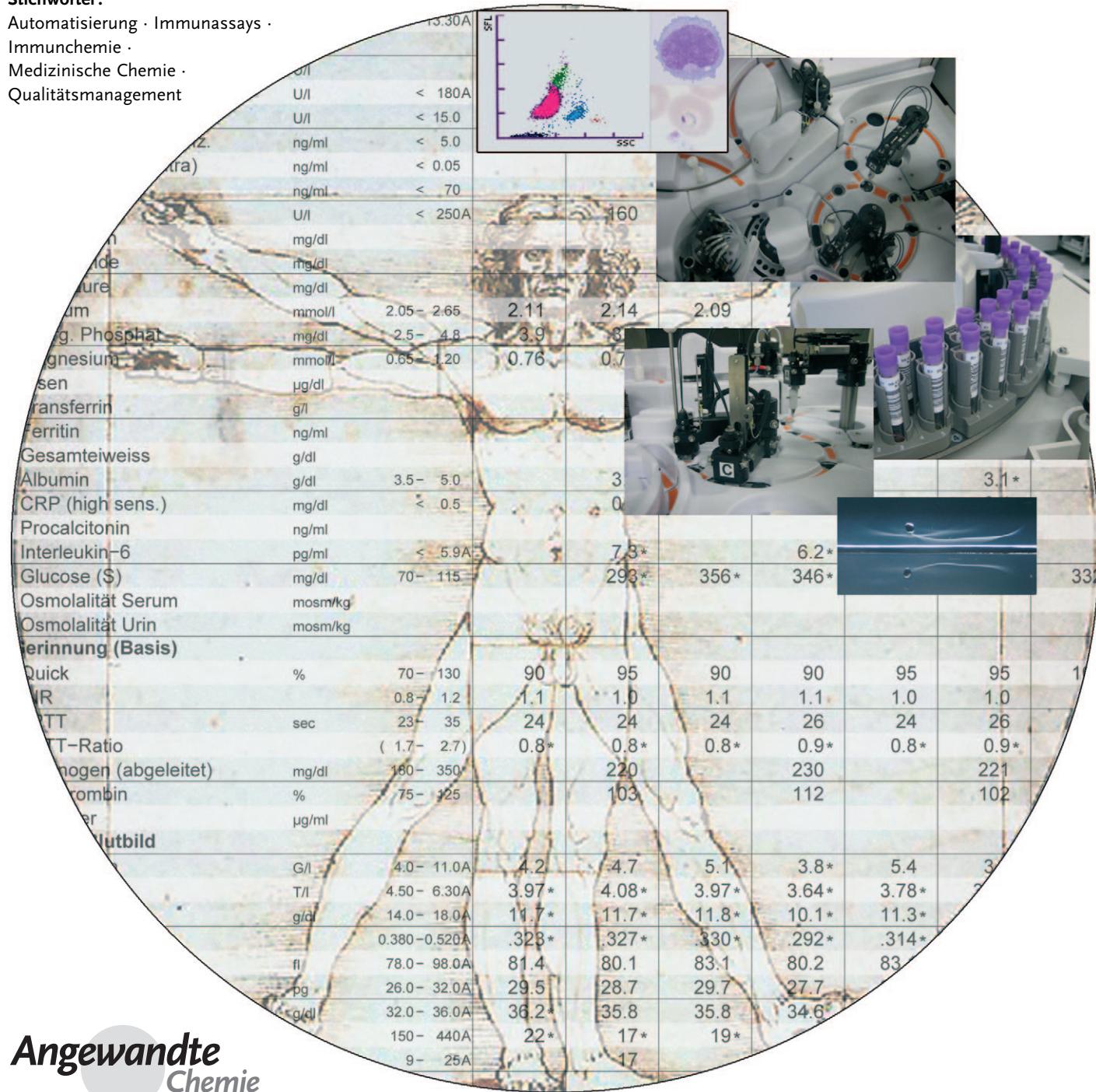
Stichwörter:

Automatisierung · Immunassays ·

Immunochemie:

Medizinische Chemie:

Medienwissen Chemie
Qualitätsmanagement



Angewandte Chemie

Die klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin blickt auf eine über 150jährige, ereignisreiche Geschichte zurück. Das Fach repräsentiert einen Querschnitt zu allen medizinischen Disziplinen und den übrigen Naturwissenschaften. Die klinische Chemie zeigt, wie neue Erkenntnisse aus der biochemischen, biologischen, chemisch-analytischen, technischen und informationstechnologischen Grundlagenforschung zum Nutzen einer verbesserten Diagnostik, Therapiekontrolle und Prävention in den medizinischen Alltag transferiert werden können. Im vorliegenden Aufsatz wird zunächst die Entwicklung der klinischen Chemie dargelegt. Anschließend werden die einzelnen Schritte von der Blutabnahme bis zum interpretierten Laborwert vorgestellt; hierbei werden sowohl Fallstricke als auch das Qualitätsmanagementsystem beschrieben. Der Einzug neuer Methoden und Trends in die medizinische Analytik wird ebenso erörtert wie Chancen und Probleme der personalisierten Medizin.

„I feel it strongly and I am convinced that the efforts of chemistry will change the face of medicine. [1]“

Antoine François de Fourcroy

1. Einführung

1.1. Gegenwärtige Stellung der klinischen Chemie in der Medizin

Im Verlauf der letzten 20 Jahre hat in der Medizin ein grundlegender Wandel stattgefunden: Ursprünglich wurden Laborparameter nur punktuell und meist erst im Verlauf einer Therapie erhoben; die Laboruntersuchung sollte die klinische und radiologische Verdachtsdiagnostik bestätigen. Heute hingegen werden diese Bestimmungen dank der Erweiterung des Analysenspektrums, der gesteigerten Empfindlichkeit der Nachweismethoden und der deutlich höheren Aussagekraft einzelner Parameter bereits früher durchgeführt; die Laboruntersuchungen dienen heute in vielen Fällen zur Erstellung der Diagnose oder zur Feststellung erhöhter Krankheitsrisiken. Daneben ist die Bestimmung von Laborparametern für die Überwachung des Therapieerfolges (Rückgang der Entzündungszeichen, Abfall von Tumormarkern) und die Früherkennung von Nebenwirkungen und Komplikationen (Überwachung von Leber- und Nierenwerten unter Chemotherapie) einer Behandlung für die klinisch tätigen Ärzte unverzichtbar. Die klinische Chemie beeinflusst auf diese Weise maßgeblich den zielgerichteten Behandlungsverlauf wie auch die Qualität der medizinischen Leistung – und dies in zunehmendem Maße individuell, d. h. auf den einzelnen Patienten zugeschnitten.

Für die in der heutigen Gesellschaft vorherrschenden Herzkreislauf-, Krebs- und Stoffwechselerkrankungen (vor allem Diabetes mellitus) spielen nicht nur die Behandlung, sondern auch die Früherkennung sowie die Feststellung eines erhöhten Risikos eine bedeutende Rolle (präventive Medizin). Hier ist die Labormedizin eine Stütze, die weiter an Bedeutung gewinnt, da bereits präklinisch, d. h. vor dem

Aus dem Inhalt

1. Einführung	1043
2. Medizinische Laboratoriumsdiagnostik und Qualitätsmanagement	1046
3. Phasen der Analytik	1046
4. Zusammenfassung und Ausblick	1064

ersten Auftreten von Symptomen, der Krankheit entgegengewirkt werden kann. Die Früherkennung ist für die Betroffenen und ihr weiteres Leben sowie – mit Blick auf die anfallenden Gesundheitskosten – auch für das Gemeinwesen entscheidend. Nicht nur die Erkrankung selbst, sondern auch die daraus resultierenden Folgeerkrankungen schlagen kostenmäßig massiv zu Buche.

Die modernen diagnostischen Methoden vermögen auch stationäre Aufenthalte zeitlich zu verkürzen oder zu vermeiden, z. B. werden bei Patienten mit erhöhter Temperatur und/oder Atembeschwerden Laborparameter angefordert, die helfen, eine Herzinsuffizienz von einer Lungenembolie oder einer Pneumonie als Ursachen zu unterscheiden und auszuschließen. Auf Grundlage der Messergebnisse kann entschieden werden, ob weitergehende, möglicherweise teure Bildgebungsverfahren oder invasive Untersuchungen eingesetzt werden müssen und eine stationäre Aufnahme oder intensivmedizinische Maßnahmen nötig sind. Weiterhin wird entschieden, in welchem Ausmaß die Medikation (z. B. Antibiotika) verabreicht werden soll. Einige Laborparameter haben die Charakterisierung und das Management von Krankheiten mit geprägt, wie das Troponin im Falle des Myokardinfarktes.

1.2. Aufgaben der klinischen Chemie

Der Definition von Sanz und Lous für die International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) folgend ist die klinische Chemie zuständig für klinisch-chemische Analysen zur qualitativen und quantitativen Beschreibung eines (patho)physiologischen Zustandes. Sie ist integraler Bestandteil der Diagnostik, Therapie und Verlaufskontrolle, aber auch der Prävention von Erkrankungen. Hinzu kommt

[*] Dr. Dr. J. Durner
Universitätsklinikum München,
Institut für Klinische Chemie
Ludwig-Maximilians-Universität München
Marchioninistraße 15, 81377 München
Fax: (+49) 89-7095-3240
E-Mail: juergen.durner@med.uni-muenchen.de

der Einsatz neuer Labormethoden.^[2] Diese Definition wurde 1995 von der IFCC überarbeitet und erweitert. Die klinische Chemie ist demnach zuständig für die Anwendung chemischer, molekularer und zellulärer Strategien (Konzepte) und Techniken für das bessere Verständnis und die Prüfung von menschlicher Gesundheit und Krankheit. Sie umschließt die Bereiche Hämatologie und Hämostaseologie, grenzt sich aber von Mikrobiologie, Virologie, Serologie, Histologie und Zytologie ab.

1.3. Anfänge der klinischen Chemie

Die Geschichte der wissenschaftlichen Medizin wurde geprägt von Fortschritten in der physiologischen und organischen Chemie. Hippokrates von Kos (um 460–370 v. Chr.) untersuchte das Aussehen und den Geruch des Stuhls. Erste systematische medizinische Laboratoriumsdiagnostik wird den heiligen Zwillingbrüdern Kosmas und Damian zugeschrieben, denen auch, der Legende nach, der Ersatz eines gangränösen Beines durch das eines Toten gelang.^[3] Die beiden Ärzte wurden unter anderem für ihr Handeln und ihre Bekehrung zum Christentum 289 n. Chr. zum Tode verurteilt.

„Laborchemisch“ versuchten Ärzte aus dem Blut (Aderlässe, Haemoscopie) und vor allem dem Urin (Uroscopie) Erkenntnisse über das Vorliegen von Krankheiten abzuleiten. Die Hämoskopie wurde bereits von Hippokrates betrieben. Aderlassblut wurde in Gefäßen aufgefangen, um zu beobachten, ob eine Crusta phlogistica (Speckhaut) entsteht, was als ungünstiges prognostisches Zeichen gewertet wurde. Die Uroskopie hatte im Mittelalter ihren Höhepunkt. Man versuchte, aus der Lage der Urinrübung im Harnkolben auf die krankhafte Lokalisation im Organismus zu schließen. Bis in die Mitte des 19. Jahrhunderts war die Medizin von der Naturphilosophie geprägt. Bis dahin gab es eine Vielzahl unterschiedlicher, zum Teil konträrer Lehrmeinungen, wie die Irritabilitätslehre von Glisson (1597–1677) und Haller (1708–1777). Diesen Lehren stand die Lebenskrafttheorie (Vitalismus) von Hufeland (1762–1836) diametral entgegen. Parallelen hierzu, jedoch in der Medikation verschieden, weist das von Hahnemann (1755–1843) vorgestellte homöopathische Ähnlichkeitsgesetz auf.^[4]

Die Vorstellung, dass der Sitz der Krankheiten im Organ sei und deshalb die Anatomie des Organs studiert werden müsse, geht auf Arbeiten von Morgagni (1682–1771)



Jürgen Durner studierte Chemie an der Technischen Universität München und Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU). 2000 promovierte er, nach einem Aufenthalt am TNO Prins Maurits Laboratorium Rijswijk (Niederlande), in Chemie bei Professor Wolfgang A. Herrmann und 2005 in Humanmedizin bei Professor Ekkehard D. Albert. Seit 2005 arbeitet er am Institut für klinische Chemie der LMU in Großhadern. Er befasst sich neben der Routinediagnostik mit Analysengeräteevaluationen, Lipidstoffwechselstörungen und leitet eine Lipid-Apherese-Ambulanz.

zurück.^[5] Der Chemiker und Mediziner de Fourcroy (1755–1809) bemühte sich, die Chemie in die Medizin zu integrieren.^[6] Am Ende des 18. Jahrhunderts kam eine neue Vorstellung des Begriffs „Krankheit“ auf. Nicht mehr die individuelle Symptomatik stand im Vordergrund, sondern Charakteristika der Erkrankung (klinische Symptomatik, objektivierbare Zeichen (z.B. Hautveränderungen)). Um diese Charakteristika besser studieren zu können, wurde ein neues Konzept eingeführt: Große Kliniken wurden errichtet, in denen eine Vielzahl von Patienten mit derselben Krankheit beobachtet und untersucht wurde, auch laborchemisch.^[7] Grundlage hierfür waren Fortschritte in der Laboranalytik, die auf grundlegende Arbeiten wie die Elementaranalyse von Gay-Lussac (1778–1850), Thenard (1777–1857), von Berzelius (1779–1848) und von Liebig (1803–1873) zurückgehen.^[8,9] So waren um 1840 ca. 1400 organische Verbindungen bekannt. Die Zeit um das Jahr 1840 wird als die Entstehung des Faches klinische Chemie angesehen, da um diese Zeit vor allem in deutschsprachigen Ländern die ersten Lehr- und Handbücher und Zeitschriften erschienen, wissenschaftliche Vereinigungen gegründet sowie eigene Lehrgebäude errichtet wurden (z.B. in Berlin, Würzburg und Wien). Etwas früher wurde die klinische Chemie in England und Frankreich betrieben, zu einer Institutionalisierung dieses Faches kam es zu dieser Zeit allerdings noch nicht. Auch sah man im deutschsprachigen Raum eher, dass das Fach der Chemie entstammt, weshalb es zeitweise als „pathologische Chemie“ bezeichnet wurde. In England und Frankreich hingegen sah man die Wurzeln dieses Fachs in der Medizin und sprach deshalb von „chemischer Pathologie“. Die Euphorie am neuen Fach währte nur etwa ein Jahrzehnt, denn zum einen wurden die verfügbaren chemischen Hilfsmittel (Tabelle 1) zur Analyse und Diagnosefindung überschätzt, zum anderen erkannte man, wie wenig über die physio-biochemischen Zusammenhänge bekannt war („eine pathologische Chemie, der keine physiologische zu Grunde“ liegt).^[10] Außerdem widmeten sich die Chemiker zunehmend der organischen Synthese. Viele klinische Laboratorien dienten nun primär Forschungszwecken, wobei die Chemiker diese Arbeit den Medizinern überließen. Gegen Ende des 19. Jahrhunderts entwickelte sich die Bakteriologie und Parasitologie, von denen man sich schneller Ergebnisse für die Diagnose und Therapie von Krankheiten erhoffte.^[4]

In den USA etablierte sich das Fach gegen Ende des 19. Jahrhunderts. Die Erlernung biochemischer Analysentechniken wurde in die Ausbildung der Ärzte aufgenommen.^[11] Die Möglichkeit der Quantifizierung von Analyten, dargestellt an der Entwicklung des Glucosennachweises im Urin (Tabelle 2), sowie weitere Fortschritte der Biochemie und der Aufbau neuer Laboratorien während des Ersten Weltkrieges gaben dem Fach neue Impulse.^[5] Nach dem Zweiten Weltkrieg wurde die international einheitliche Bezeichnung „klinische Chemie“ von der American Association of Clinical Chemists (AACC) und der IFCC eingeführt.^[12]

Tabelle 1: Messinstrumente in frühen klinischen Laboratorien. Modifiziert nach Lit. [13].

Messinstrument	Beispiele
Waagen	Apotheker-Waagen, Feinwaagen (< 1 mg)
volumetrische Instrumente	Messzylinder, Messkolben, Pipetten, Büretten (nach Gay-Lussac und Mohr)
Instrumente für Dichtemessung	Araeometer, „Urinprober“
Instrumente für Gasanalyse	Gaspipetten, Eudiometer
Mikroskopie mit Messeinrichtungen	Okularmikrometer, Okulargoniometer
Polarimeter	Biot/Soleil und Mitscherlitz
Spektroskope	Kirchhoff und Bunsen
Kolorimeter	Duboscq
Photometer	Vierordt, Hüfner und Pulfrich

Tabelle 2: Zuckerbestimmung im Urin: Entwicklung der Untersuchungstechnik.^[a] Modifiziert nach Lit. [13].

Entdecker	Jahr	Art der Untersuchung	Charakteristikum	Ergebnis
Willis	1674	Geschmacksprüfung	sensorische Wahrnehmung	süßer Geschmack
Bobson	1776	Extraktion	chemischer Nachweis	quantitativ: nachweisbar oder nicht nachweisbar
Home	1780	Vergärung		
Trommer	1841	chemischer Test		
Vogel	1858	chemischer Test	halbquantitativer chemischer Test	Reaktionsstärke: nicht nachweisbar, +, ++, +++
Bouchardat	1841	Polarimetrie	quantitative Analyse	Konzentrationsangabe
Heintz	1843	Polarimetrie		
Fehling	1848	Titration		
Einhorn	1885	Vergärung		

[a] „Diabetes“ bedeutet „hindurchgehen lassen“, und „Mellitus“ bedeutet „honigsüß“, Diabetes mellitus also svw. „honigsüßer Durchfluss“.

1.4. Analysenautomatisierung durch enzymatische Kolorimetrie

In der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts machten enorme Fortschritte auf den Gebieten der Biochemie, der Technik (Mechanik, Optik, Hydraulik, Elektronik, Datenverarbeitung), der Methodik und die empfindlichere und spezifischere Analytik die klinische Chemie zu einem wichtigen und unverzichtbaren Bestandteil der medizinischen Diagnostik.^[14,15]

Die Notwendigkeit zur Automatisierung im Bereich der klinischen Chemie soll anhand eines Beispiels verdeutlicht werden: Das Klinikum der Universität München (LMU) verfügt über zwei Standorte, an denen jährlich rund 83 000 Patienten stationär und 371 000 Patienten ambulant behandelt werden. Die 44 Fachkliniken, Institute und Abteilungen verfügen über 2400 Betten. Alleine am Standort Großhadern sind an Werktagen zwischen 15 000 und 18 000 Einzelwerte zu bestimmen. Neben einer standardisierten Probenlogistik ist dies auch eine Herausforderung für die apparative Analysenleistung. Die rasche Bewältigung dieses Arbeitsaufkommens gelang vor allem durch Fortschritte bei der enzymatischen Kolorimetrie, der Grundlage vieler Routinenachweismethoden.

Reine kolorimetrische Messverfahren zur Analytquantifizierung sind häufig nicht spezifisch, da andere Substanzen die Farbreaktion beeinflussen und das Resultat damit verfälschen. Ab 1928 entwickelte Warburg (1883–1970) für seine

Enzymforschung photometrische Methoden. Die ersten Geräte für die Routineanalytik, welche die enzymatische Kolorimetrie auf der Basis von Warburgs Arbeiten nutzten, kamen ab 1955 auf den Markt. Die erhaltenen Messwerte der enzymatischen Reaktion wurden in ein Millimeterpapier-Raster übertragen, und die Steigung der Ausgleichsgeraden wurde mit dem Winkelmesser bestimmt. Aus dem Winkel der Ausgleichsgeraden wurde anhand von Umrechnungstabellen die Enzymaktivität bestimmt. Dies war ein personalintensives und zeitraubendes Messverfahren, Serienanalysen waren beschwerlich. Eine weitere Automatisierung setzt eine automatische Pipetteneinrichtung, einen vollmechanischen Vortrieb der Küvetteinheit und einen Analog-Digital-Wandler für das Messsignal voraus. Der Amerikaner Skeggs war wesentlich an der Entwicklung automatischer Analysengeräte beteiligt.^[14] 1956 wurde auf dem International Congress on Clinical Chemistry die erste vollautomatische Bestimmung von Harnstoff, Glucose und Calcium vorgestellt.^[15]

Die größte Herausforderung bei der Entwicklung vollautomatischer Analysensysteme war das Photometer: Für das Spektrum der klinisch-chemischen Parameter musste es bei ca. zehn verschiedenen Wellenlängen messen können. Deshalb wurden zunächst „Batch-Analyser“ eingesetzt, d.h., es wurde aus bis zu 100 Proben immer nur ein Parameter bestimmt und im Anschluss das Gerät auf den nächsten umgerüstet. Ein Durchbruch gelang erst Anfang der 1980er Jahre unter der Verwendung eines neuen Photometer-Prinzips mit dem Diiodenarray-Spektralphotometer: Licht aus einer Xenon-Hochdrucklampe wird zuerst durch eine Messküvette geleitet und anschließend mithilfe eines Polychromators (Gittermonochromator, Prisma) horizontal in seine Wellenlängen gespalten und aufgefächert. Entlang dem Sektor des aufgefächerten Lichtes werden Photodioden für die entsprechende Wellenlänge platziert. Nun konnten gleichzeitig mehrere Wellenlängen aus einer Probe gemessen werden. Damit ist es möglich, in Arbeitstakten von weniger als zehn Sekunden beliebige Wellenlängen aus einem fixen Spektrum zu messen.

Ein weiterer Meilenstein in der Routineanalytik war die Einführung des Immunassays. Grundlegende Arbeiten von Yalow und Berson über die Bestimmung von Peptidhormonen mithilfe der Radioimmunassay-Technik reichen in die 1950er Jahre zurück, für die Yalow 1977 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde.^[16] Durch weitere Verbesserungen und Einführung verschiedener Immunassayvarianten hat diese

Technik in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen. Durch die Verwendung von monoklonalen Antikörpern sind Bestimmungen im pmol L⁻¹-Bereich möglich. Immunassays ermöglichen auf diese Weise die Bestimmung von z. B. Hormonen, Tumormarkern und Medikamentenspiegeln.

2. Medizinische Laboratoriumsdiagnostik und Qualitätsmanagement

Die medizinische Laboratoriumsdiagnostik umschließt die Bereiche:

- klinische Chemie (inkl. Hämatologie, Hämostaseologie)
- Immunologie (inkl. Allergologie, Immungenetik, Immunhämatologie)
- Mikrobiologie (inkl. Bakteriologie, Mykologie, Parasitologie, Infektionsserologie, Molekularbiologie)
- Virologie (inkl. Infektionsserologie, Molekularbiologie)
- Humangenetik (molekulare Humangenetik, Zytogenetik, Tumorzytogenetik)
- Pathologie (inkl. Neuropathologie, Histologie, Zytologie)
- Transfusionsmedizin (inkl. Blutgruppenserologie, Transfusionsserologie)
- Krankenhaushygiene
- Funktionsuntersuchungen am Patienten (z. B. Bestimmung der Blutungszeit, ¹³C-Atemtest, H₂-Lactose-Atemtest, oraler Glucosetoleranztest, Pankreolaurylttest, Xylosetest)

Im Folgenden wird nur auf die klinische Chemie (allgemeine klinische Chemie, Serologie, Immunchemie, Proteinchemie, Endokrinologie, Stoffwechselchemie und Arzneimittelspiegelkontrollen (Drug Monitoring)) mit den Bereichen Hämatologie und Hämostaseologie eingegangen.

Für die analytischen Aufgaben stehen, mit Subspezifizierungen, über 6000 Untersuchungsverfahren zur Verfügung. Eine Auswahl wichtiger Methoden ist in Tabelle 3 zusammengestellt.^[17–23] Das zu untersuchende Material in klinisch-chemischen Laboratorien ist je nach Herkunft und Beschaffenheit sehr verschieden. Quantifizierungen sollen durchgeführt werden aus z. B.:

- Körperflüssigkeiten wie Blut, Speichel, Liquor, Magensaft, Galle, Duodenalsaft
- Ausscheidungen wie Schweiß, Stuhl, Sputum, Urin, Eiter
- Gewebeproben wie Knochenmark

Die Analysenergebnisse der oben genannten Proben liefern einen wichtigen Beitrag zur Diagnosestellung und Therapieentscheidung. Eine hohe Qualität und die Zuverlässigkeit der Befunde sind deshalb unabdingbar. Um diesen Prozess zu standardisieren und transparent zu machen, potentielle Fehlerquellen auszuschalten und die Laborbefunde richtig und zuverlässig zu erstellen, wird ein Qualitätsmanagementsystem vorausgesetzt.

Die Geschichte der Qualitätssicherung in der Medizin begann 1835 mit der Abschätzung von Messfehlern bei Mehrfachbestimmung derselben Probe (Präzision) und ist eng mit dem Namen Quételet (1796–1874) verbunden.^[17,18] Medizinische Laboratorien und Hersteller von Medizinpro-

dukten können heute akkreditiert werden, wenn sie die definierten gesetzlichen und normativen Grundlagen erfüllen. Das Fundament bildet ein gut funktionierendes Qualitätsmanagementsystem. Dies kann generell und auf alle Fachbereiche bezogen erreicht werden, wenn die Anforderungen der Norm DIN EN ISO/IEC 17025 erfüllt werden. Für humanmedizinische Laboratorien besteht zusätzlich die Möglichkeit, die Anforderungen der Norm DIN EN ISO 15189 „Medizinische Laboratorien – Spezielle Anforderungen an Qualität und Kompetenz“ zu erfüllen, eine Fortführung der DIN EN ISO/IEC 17025 für medizinische Bedürfnisse. Daneben gibt es noch weitere, zum Teil nationale Normen.^[19] Ziele sind ein weltweit einheitliches und harmonisiertes Akkreditierungsverfahren, eine Steigerung des Qualitätsniveaus und eine internationale Vergleichbarkeit der Laboratorien.^[27–29] Durch die genannten Normen werden insbesondere geregelt:^[30,31]

- fachliche Kompetenz des Laboratoriums (Laborleitung, Mitarbeiter)
- strukturierte und geplante Aus-, Fort- und Weiterbildung der Mitarbeiter
- Regelung der Anforderungen an das Dokumentarwesen
- interne und externe Qualitätskontrollsysteme
- Vorgaben und Maßnahmen zur betriebsinternen kontinuierlichen Qualitätsoptimierung (vorbeugende und Korrektur-Maßnahmen, Kausalanalysen)
- internes und externes Auditwesen
- Anforderungen an die Laborausrüstung (Geräte, Reagenzien, Materialien)
- eindeutige und verständliche Vorgaben zur Präanalytik, Analytik und Postanalytik
- Vorgaben an das verwendete EDV-System
- verbesserte Einsender- und Patientenorientierung

Eine erteilte Akkreditierung ist fünf Jahre gültig. In dieser Fünfjahresperiode werden in der Regel jährliche Überwachungen durchgeführt. Anlässlich dieser Überwachungen wird überprüft, ob das Managementsystem in die Praxis umgesetzt worden ist und ob die Akkreditierungsvoraussetzungen, vornehmlich die fachliche Kompetenz, noch gegeben sind. Etwa sechs Monate vor Ablauf der Akkreditierungsperiode wird, falls vom Laboratorium gewünscht, die Begutachtung zur Erneuerung der Akkreditierung durchgeführt.

3. Phasen der Analytik

Gewinnung und Transport des Untersuchungsmaterials, Analytik und ärztliche Interpretation, sowie die Übermittlung des Befundes an die Einsender stellen einen komplexen Prozess dar (Abbildung 1). Bis zur Erstellung des fertigen Befundes werden drei Phasen unterschieden:^[20]

1. Präanalytik
2. Analytik
3. Postanalytik

Die Auswertung einer internen Qualitätsuntersuchung des medizinischen Labors der Universität Padua hat ergeben, dass durch die Einführung eines Qualitätsmanagements die

Tabelle 3: Auswahl an Untersuchungsverfahren für die Routinebestimmung von Analyten.

Spektrometrie:		Blutzellzählung:
● Absorptionsspektroskopie/ Photometrie	● Nephelometrie/ Immunnephelometrie	● Impedanzmessung
● UV/Vis/NIR/IR-Spektroskopie	● Turbidimetrie/ Immunturbidimetrie	● durchflusszytometrische Zell- zahlbestimmung mit zytometri- scher oder zytochemisch-zyto- metrischer Zellklassifizierung
● Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)	● Atomemissionsspektroskopie (AES)	Partikeleigenschaftsbestimmungen
● Atomfluoreszenzspektroskopie (AFS)	● Flammenemissionsspektroskopie	mit automatisierten Verfahren
● NMR-Spektroskopie	● ICP-Massenspektrometrie (ICP- MS), MALDI-TOF-MS	(Partikelzählung und Partikelgrö- ßenbestimmung von Blutzellen)
● Lumineszenzspektroskopie: Biolumineszenzmessung, Chimi- lumineszenz-, Fluoreszenz-, zeit- aufgelöste Fluoreszenz-, Fluores- zenzpolarisations- und Phospho- reszenzspektroskopie		
Ligandenassays:		elektrochemische Untersuchungen:
● Enzymimmunassay	● Fluoreszenzpolarisations-Enzym- immunassay	● Amperometrie: O ₂ -Partialdruck (Clark-Elektrode)
● Fluoreszenzimmunassay	● Radioimmunassay	● Potentiometrie: pH-Wert, CO ₂ - Partialdruck, ionenselektive Elek- troden
● Immunblot (Westernblot)	● Rezeptorassay	● Coulometrie
● Lumineszenz- und Elektroche- milumineszenz-Immunassay (CLIA/ECLIA)		
Chromatographie:		molekularbiologische Methoden:
● Dünnenschichtchromatographie (DC)	● Gaschromatographie (GC) und GC-MS	● (Echtzeit-)Polymeraseketten- reaktion
● Flüssigkeitschromatographie (LC)	● Hochleistungs-Flüssigkeitschro- matographie (HPLC) und HPLC-MS	● Southern Blot
		● Fluoreszenz-in-situ-Hybridisie- rung (FISH)
Elektrophorese:		weitere Verfahren:
● Zonenelektrophorese: Cellulo- seacetat-Elektrophorese	● Gegenstromelektrophorese (Überwanderungselektrophorese)	● Aggregometrie (Thrombozyten- funktionstests: Impedanzaggro- metrie: PFA 100, ROTEM)
● Immunelektrophorese/ Immunfixation	● Isotachophorese	● Filtration (Adsorptionsfiltration, Membranfiltration, Ultrafiltration)
● isoelektrische Fokussierung	● Kapillarelektrophorese	● Immunhistochemie
● Pulsfeldgelektrophorese	● Rocket-Elektrophorese	● Mikroskopie (Hell- und Dunkel- feld-, Fluoreszenz- und Phasen- kontrastmikroskopie)
		● qualitative Untersuchungen mit visueller Auswertung (z. B. osmoti- sche Erythrozytenresistenz)
		● Reflektometrie/trägergebunde- ne Untersuchungsverfahren
		● Rheologie, Viskosimetrie
		● Aräometrie
		● Röntgendiffraktion (Konkre- mentanalyse)
		● Koagulometrie
		● Osmometrie: Kryoskopie, Dampfdruckosmometrie
		● Sedimentationsuntersuchungen (Blutkörperchen-Senkungsge- schwindigkeit)
		● Radioaktivitätsmessung
		● Zentrifugation: analytische Ul- trazentrifugation, Dichtegradien- ten-Zentrifugation

Fehleranzahl, innerhalb eines Zeitraums von zehn Jahren und bei einer jährlichen Analysenleistung von 8 000 000 Einzelwerten, von 4667 auf 3093 pro eine Million Einzelwertbestimmungen reduziert werden konnte.^[21] Hierbei entstanden 61.9 % der Fehler im Bereich der Präanalytik, 15.0 % in der Analytik und 23.1 % in der Postanalytik.

Die eindeutige Zuordnung einer Probe und deren Messwerte zu einem bestimmten Patienten muss während der analytischen Phasen sichergestellt sein. Ein häufiger Fehler in der Präanalytik ist die so genannte Patientenverwechslung,

d. h., die Patientendaten (Patientenname, Geburtsdatum, Patientidentitätsnummer) auf dem Probengefäß und die Probe selbst stammen nicht vom selben Patienten.

3.1. Präanalytische Phase

Der Begriff Präanalytik oder präanalytische Phase beschreibt die Gesamtheit aller administrativen und praktischen Faktoren und Prozesse, die vor der Laboranalytik ablaufen,

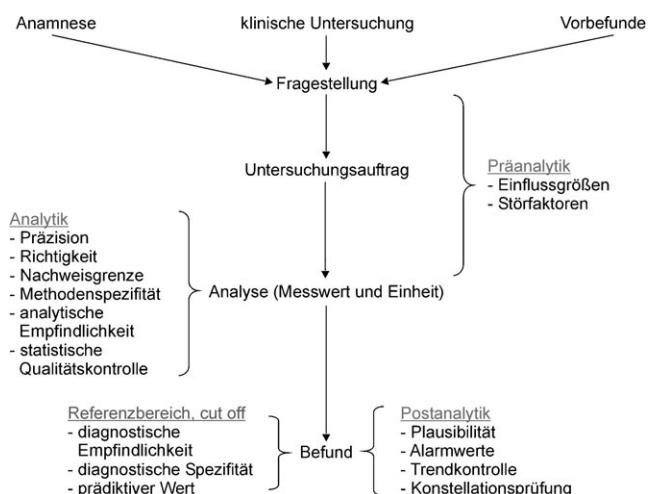


Abbildung 1. Pfad von der Fragestellung zum klinisch-chemischen Befund.

d. h. Vorbereitung, Gewinnung, Aufarbeitung (z. B. Abtrennung korpuskulärer Bestandteile durch Zentrifugation), Lagerung und Transport von labormedizinischen Untersuchungsmaterialien.^[22] Zusätzlich ist es hilfreich, dass Informationen über den Patienten an das Labor weitergegeben werden, damit Analysenergebnisse, besonders im medizinischen Grenzbereich, sicher interpretiert werden können (Schwangerschaft, Niereninsuffizienz, Zustand nach Organtransplantation).

Variabilitäten und Fehlerquellen in der präanalytischen Phase sind Einflussgrößen und Störfaktoren. Unter Einflussgrößen werden alle In-vivo-Veränderungen des zu bestimmenden Analyten subsumiert. Man unterscheidet endogene und exogene Einflussgrößen. Endogene Einflussgrößen sind unabänderliche Eigenschaften eines Individuums oder unabänderliche biologische Gegebenheiten. Unter exogenen Einflussgrößen werden alle beeinflussbaren Größen zusammengefasst, die auf ein Individuum wirken. In beiden Fällen werden permanente von langzeitig und kurzzeitig wirkenden Faktoren unterschieden (Tabelle 4). Störfaktoren beschreiben In-vitro-Veränderungen wie die Beeinflussung des Analy-

lysenvorgangs durch z. B. Störungen des Messvorgangs durch Arzneimittel, ikterische Verfärbung der Proben (Übertritt von Gallenfarbstoffen wie Bilirubin ins Blut), hämolytische Proben (Zerstörung von Erythrozyten und damit Freisetzung von Hämoglobin) oder lipämische Proben (mikroskopisch kleine Lipoproteinpartikel im Serum; Abbildung 2).

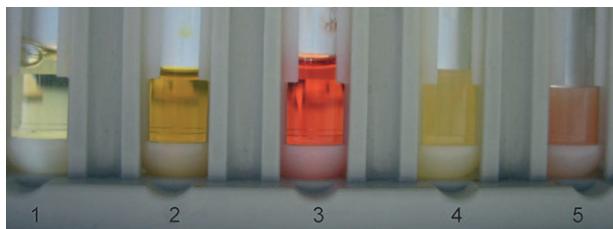


Abbildung 2. Verschiedene Seren: 1) normale Färbung, 2) Verfärbung bei ikterischer Stoffwechsellsage (Ansammlung von Gallenfarbstoffen), 3) Serum bei Hämolyse, 4) Serum bei Lipämie, 5) Serum bei Hämolyse und Lipämie.

Die meisten Fehler entstehen im Bereich der Präanalytik.^[23] Deshalb ist eine genaue Instruktion des Patienten, was vor der anstehenden Blutabnahme zu beachten ist (z. B. keine körperliche Anstrengung vor Kreatinkinasebestimmung, kein Radsport, Reiten oder Motorradfahren vor Bestimmung des prostataspezifischen Antigens), ebenso wichtig wie die Unterrichtung der Einsender (Arztpraxen, Stationen) zur Patientenvorbereitung, der korrekten Abnahme, zum richtigen Abnahmematerial, zu Lagerung und Transport (gekühlter Transport, Lichteinfluss).^[21]

3.2. Analytische Phase

3.2.1. Grundlagen und allgemeine Bemerkungen

Die analytische Phase umfasst die Aliquotierung und Aufbereitung der Analysenprobe, die eigentliche analytische Bestimmung und die Gewinnung des Messwertes. Die Qualitätssicherung im Bereich der Analytik wird ebenfalls durch

Tabelle 4: Unterteilung der Einflussgrößen mit Beispielen. Modifiziert nach Lit. [24, 25].

Entnahmeverbedingungen	permanente Faktoren	Individualfaktoren langzeitig wirkende Faktoren	kurzzeitig wirkende Faktoren
Körperlage			
Dauer der Stauung	Geschlecht	<i>endogene Faktoren:</i>	
Lokalisation der Entnahme	ethnische Besonderheiten	Alter	Biorhythmus
Tageszeit	interindividuelle Variationen	Gewicht	Schwangerschaft
	genetische Faktoren	Krankheiten	Lactation
	geographische Besonderheiten	<i>exogene Faktoren:</i>	
		Arzneimittel	Ernährung
		Lebensgewohnheiten	körperliche Belastung
		Muskelmasse	Genussmittel
		soziökonomischer Status	Pharmaka
		Klima	diagnostische Maßnahmen
		besondere Expositionen	Operationen

DIN EN ISO 15189 geregelt. Weitere Regelungen finden sich in der ISO 15196 und 15198. Die Umsetzung erfolgt nach länderspezifischen Vorgaben. In Deutschland wird dies durch das Medizinproduktegesetz, die Medizinproduktebetreiberverordnung und die Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen (RiLi-BÄK) rechtsverbindlich geregelt. Diese schreiben die in Laboratorien durchzuführende Qualitäts sicherung (interne und externe Qualitätskontrollen) für quantitative Analysen von 67 Messparametern im Serum/Plasma/Vollblut, sieben Messparametern im Liquor cerebrospinalis und zehn Messparametern im Urin verbindlich vor. Die Einhaltung der Richtlinien wird regelmäßig durch die zuständigen Eichbehörden kontrolliert.

Standardarbeitsanweisungen (Standard Operation Procedures, SOPs) sind integraler Bestandteil eines Qualitäts managements. Dabei handelt es sich um Verfahrensanweisungen zur Durchführung der Probenverarbeitung und Bedienung von Geräten. SOPs müssen im Labor schriftlich hinterlegt werden, potenzielle Einflussfaktoren auf die Analytik, Fehlererkennung und Fehlerbehandlung müssen darin enthalten sein. Entsprechend ihrer Bestimmung werden allgemeine SOPs, Gerät-SOPs und Prüf-SOPs unterschieden. Allgemeine SOPs regeln z.B. Zuständigkeiten im Labor. Gerät-SOPs umfassen gerätespezifische Arbeitsschritte, wie Handhabung, Kalibrierung, Wartung. Prüf-SOPs regeln detailliert die Durchführung analytischer Prüfungen von der Probenahme bis zur Ergebnisangabe. Diese können auf selbst entwickelten Methoden oder auf genormten oder veröffentlichten Standardmethoden beruhen.

Ein grundsätzliches Problem beim Messen humaner Proben ist die äußerst komplexe und variantenreiche Zusammensetzung der Probe. Sie enthält Proteine (Eiweiß, rheumatoide Faktoren, Enzyme, Lysozyme, Komplementsysteme, Autoantikörper, endogene Hormone und deren bindende Proteine sowie abnorme Formen davon), Kohlenhydrate, Lipide, zelluläre Bestandteile, Elektrolyte, Pharma ka und deren Metabolite. Den Effekt, der hierbei von den unterschiedlichen Komponenten auf das analytische System ausgeübt wird, bezeichnet man als Matrixeffekt. Er ist definiert als die Summe aller Effekte der Komponenten eines Systems mit Ausnahme des Analyten.^[26] Dies schließt auch alle in der Probenvorbereitung und im Messvorgang verwendeten Reagenzien mit ein. Hierdurch kann das Ergebnis einer Messung schwerwiegend verändert werden.^[27]

Der Analyt kann qualitativ oder quantitativ bestimmt werden. Die Ergebnisse werden in Nominal-, Ordinal- und Differenzen-/Verhältnisskalen ausgedrückt. Die qualitative Analyse beschränkt sich auf den alleinigen Nachweis einer Substanz z.B. zur Frage nach einer Schwangerschaft vor radiologischen Untersuchungen oder Drogenintoxikation bei somnolenten Patienten, die in die Nothilfe eingeliefert werden. Für qualitative Bestimmungen stehen homogene Teststreifen (z.B. Urinteststreifen mit Testfeldern für den pH-Wert, Glucose, Proteine, Ketone, Nitrit, Erythrozyten, Leukozyten usw. auf einer Trägerfolie) und immunanalytische Lateralfluss-Schnelltests („Lateral Flow Assay“, LFA) zur Verfügung (Abbildung 3), deren Entwicklung im Rahmen des EU-geförderten Projektes „AllergenTest“ forcierter wurde.^[28]

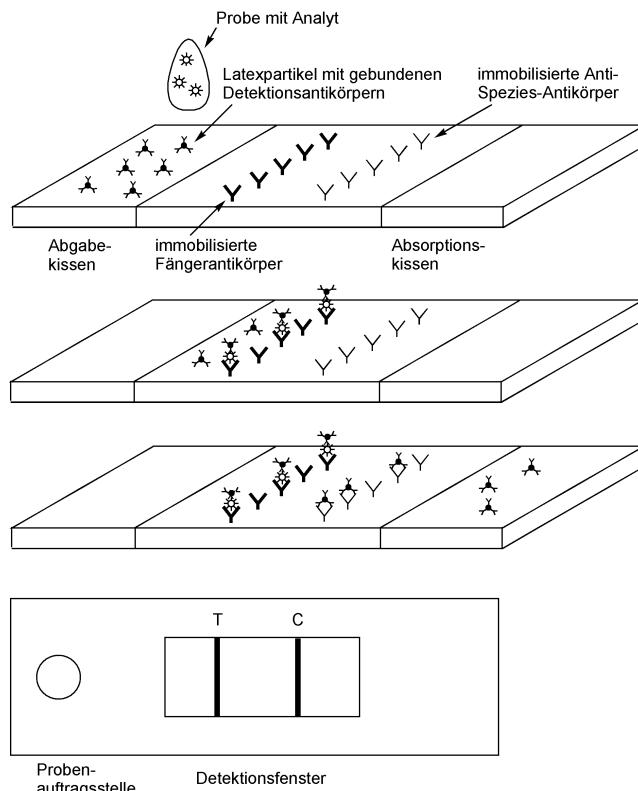


Abbildung 3. Funktionsweise des Lateralfluss-Schnelltests. C: Kontroll linie, Signalentwicklung bei korrektem Testverlauf; T: Testline, Signal entwicklung bei positivem Ergebnis.

LFAAs sind Weiterentwicklungen von 1956 eingeführten homogenen Latexagglutinationstests.^[40–42] Sie basieren auf dem gleichen Prinzip wie immunologische Assays, d.h. einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Zusätzlich haben sie chromatographische Eigenschaften. Der Analyt wird durch eine Öffnung auf ein Kissen (sample pad) aufgetragen, auf dem sich markierte primäre Antikörper (Konjugat) gegen den Analyten befinden. Die Antikörper sind auf einem beschichteten Latexpartikel oder kolloidalem Gold fixiert (GLORIA-Technik: Gold Labelled Optical-read Rapid Immuno Assay), seltener an Selen, Kohlenstoff oder Liposomen.^[29] Der Antigen-Antikörper-Komplex sowie überschüssiges Konjugat strömen aufgrund von Kapillarkräften durch das Membransystem. Sobald der Antigen-Antikörper-Komplex die Testzone erreicht, reagiert er mit einem sekundären Antikörper und wird dort fixiert. Nicht gebundene Konjugate wandern bis zur Kontrollzone und werden dort am sog. Anti-Spezies-Antikörper gebunden. Durch das kolloidale Gold erscheinen die beiden Zonen in einer rötlichen Farbe. Ist kein Analyt vorhanden, sollte nur die Kontrolllinie rötlich werden. Die überschüssige Flüssigkeit mit den an der Test- oder Kontrolllinie nicht gebundenen Partikeln strömt weiter durch das Membransystem, bis sie von einem Filterpapier aufgesaugt wird, um den Rückfluss zu verhindern. Die Auswertung eines LFA kann visuell (qualitativ) oder über ein Messgerät (halbquantitativ) erfolgen. Als Membranmaterial wird häufig Nitrocellulose verwendet. LFAs sind auch im militärischen Bereich von Interesse, da sie außerhalb eines Labors schnell

einsetzbar sind und einen ersten Überblick über mögliche Kontaminationen mit bakteriellen Toxinen oder anderen biologischen Agentien geben können.^[30]

Zur quantitativen Analyse werden Routinemethoden (für die Anwendung hinreichende Zuverlässigkeit und Praktikabilität), Referenzmethoden (Eignung zur Überprüfung anderer Methoden) und definitive Methoden (spezifisch und richtig) herangezogen. Diese so genannte Methodenhierarchie lässt Unrichtigkeiten für definitive Methoden von 0.1–1 %, für Referenzmethoden von 3–5 % und für Routinemethoden von 5–10 % zu.^[31]

Die analytische Empfindlichkeit beschreibt die Fähigkeit einer Methode, zwischen konzentrationsabhängigen Signalen zu differenzieren, die analytische Spezifität hingegen beschreibt die Fähigkeit, nur die gesuchte Substanz zu erfassen, wobei andere Bestandteile der Matrix das Prüfergebnis nicht beeinflussen. Die statistische Qualitätskontrolle ist der Oberbegriff für statistische Verfahren der Stichproben- und Versuchsplanung, die dazu verwendet werden, aufgrund der Untersuchung geeigneter Stichproben die Qualität eines Produktes zu überwachen und auf diese Weise den Produktionsprozess unter Kontrolle zu halten. Die Umsetzung für quantitative laboratoriumsmedizinische Parameter erfolgt durch laborinterne (Präzisions- und Richtigkeitskontrollen) und externe Qualitätskontrollen (Ringversuche).

Die Teilnahme an der externen Qualitätssicherung (Ringversuche) dient der objektiven Überwachung der Richtigkeit von Ergebnissen quantitativer Laboratoriumsuntersuchungen.

3.2.2. Ausgewählte analytische Methoden

3.2.2.1. Immunassay

Unter Immunassays versteht man eine Reihe von Methoden, die sich der Antigen-Antikörper-Reaktion zum Analytnachweis (z.B. Hormone, Proteine, Arzneimittel) bedienen.^[32,33] An die Stelle von Vollantigenen können auch Haptene treten. Das Prinzip der Immunassays beruht auf einer kompetitiven und kooperativen Wechselwirkung eines markierten und damit messbaren Liganden (L^*) mit einem nichtmarkierten Liganden (L), dem zu bestimmenden Analyten, mit derselben Bindungsstelle eines Proteins (P). Bei der Markierung kann es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, ein Luminogen, ein Fluorophor, ein Enzym oder eine radioaktive Substanz handeln (daneben ist es auch möglich, die Trübung aufgrund der Immunkomplexbildung zu messen (siehe Abschnitt 3.2.2.2)). Für den Fall einer multivalenten Wechselwirkung zwischen Antigen und Antikörper ergeben sich die Gleichungen (1) und (2):^[34]

$$xL - yP \quad L_xP_y \quad 1$$

$$xL^* - yP \quad L^*xP_y \quad 2$$

Die Konzentration des Komplexes L_xP_y , [L_xP_y], ergibt sich in Abhängigkeit der Konzentration des Liganden, [L], nach dem Massenwirkungsgesetz zu Gleichung (3):

$$\frac{L_xP_y}{K} = \frac{L_xP_{y\max}}{L^b}$$

Dieser Zusammenhang entspricht einer kooperativen Enzymkinetik und wird durch die Hill-Gleichung beschrieben. In Analogie zur enzymologischen Anwendung entspricht in diesem Falle der Ligand dem Substrat, das Protein dem Enzym, wobei b der Hill-Exponent ist.

Immunassays zeichnen sich durch eine hohe Spezifität und Affinität der Antikörper aus. Der Vielzahl kommerziell erhältlicher Antikörper entsprechend können auch viele Analyten bestimmt werden. Durch die Automatisierung ist ein hoher Probendurchsatz möglich. Die Handhabung ist einfach, eine aufwändige Probenvorbereitung entfällt in den meisten Fällen. Als problematisch erweisen sich Kreuzreaktivitäten mit weiteren Matrixbestandteilen wie Metaboliten oder strukturverwandten Stoffen. Immunassays werden außer in der klinischen Diagnostik auch in der Umwelt- und Lebensmittelanalytik verwendet.

Entsprechend der Umsetzung werden verschiedene Immunassayvarianten unterschieden.^[35] Verbunden mit der Vielzahl an Varianten ist auch die Einteilung der Immunassays verschieden. Nachfolgend ist eine in der klinischen Chemie gebräuchliche Einteilung und die Darstellung wichtiger Immunassayvarianten wiedergegeben. In Abhängigkeit von der Durchführung werden homogene und heterogene Immunassayvarianten unterschieden. Im Unterschied zum homogenen Immunassay werden beim heterogenen Immunassay die ungebundenen Reaktanten vor der Messung abgetrennt.

Beim heterogenen Immunassay werden zwei weitere Formen unterschieden: der kompetitive Immunassay und der immunometrische Assay, auch als „Two-site-Assay“ oder Sandwich-Immunassay bezeichnet.

Beim kompetitiven Immunassay konkurrieren zugegebene markierte Analyte (Tracer) mit dem zu bestimmenden Analyten aus der Probe um eine im Unterschuss vorliegende Anzahl an Antikörpern (Catcher), die an der Wand des Messgefäßes fixiert sind. Während der Inkubation konkurrieren die markierten Antigene mit den zu quantifizierenden Antigenen um die Bindungsstellen der am Reaktionsgefäß angelagerten Antikörper. Nach Aufarbeitung dient das Verhältnis, in dem Probenantigen und Tracer die Bindungsstellen besetzen, zur Berechnung der Analytkonzentration der Probe anhand von Kalibrationskurven.

Beim Sandwich-Immunassay können zwei weitere wichtige Formen unterschieden werden: Der Antigen-capture-Assay und der Antibody-capture-Assay.

Beim Antigen-capture-Assay liegt der Antikörper fixiert an der Wand des Reaktionsgefäßes oder fixiert an einem Latex- oder Magnetpartikel im Überschuss im Vergleich zum Analyten vor. Anschließend werden die Probe und der markierte Antikörper gleichzeitig zugegeben (Ein-Schritt-Assay); alternativ wird zunächst die Probe vorgelegt und nach Inkubation und Reinigung der markierte Antikörper zugegeben (Zwei-Schritt-Assay). Das Antigen muss für diesen Test mindestens zwei verschiedene Epitope haben.

Beim Antibody-capture-Assay werden spezifische Antikörper in der Probe bestimmt. Hierfür kann entweder das

Antigen im Überschuss an einer festen Phase immobilisiert werden oder ein klassenspezifischer Anti-Human-Antikörper (meist gegen IgM) verwendet werden. Nach einem Waschschritt wird der markierte Sekundärantikörper zugegeben. Dieser bindet gegen den konstanten Fc-Teil des gebundenen Primärantikörpers. Nach weiteren Waschgängen erfolgt die Quantifizierung.

Eine weit verbreitete Markierung ist die Kupplung eines Enzyms (Meerrettichperoxidase, alkalische Phosphatase, β -Galactosidase) an den Antikörper. Das Enzym setzt in einer anschließenden Reaktion ein Substrat in ein chromogenes Reaktionsprodukt um, dessen Konzentration absorptionspektroskopisch nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ermittelt wird. Dies ist das Prinzip des ELISA-Tests (ELISA: enzyme linked immunosorbent assay, enzymgekoppelter Immunadsorptionstest), mit dem eine schnelle Untersuchung und Quantifizierung eines Antigens (z.B. Protein, Virus, Hormon, Toxin, Pestizid) in einer Probe (Blutserum, Milch, Urin) möglich ist.

Der homogene Immunassay ist unempfindlicher als der heterogene, aber einfacher in der Aufarbeitung. Eine verbreitete Methode ist der „enzyme multiplied immunoassay“ (EMIT). Das Testprinzip entspricht einem kompetitiven Immunassay, jedoch ohne Immobilisierung des Antikörpers. Das zugegebene, enzymmarkierte Antigen, das mit dem zu bestimmenden Antigen inkubiert wird, konkurriert um eine Bindungsstelle am zugegebenen Antikörper, durch die es entweder zur Enzymaktivierung oder zur Enzymaktivierung kommt. Die Messung erfordert keine zusätzliche Trennung des gebundenen vom freien Analyten.

Häufig verwendete Enzyme zur Markierung sind die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und die Malat-Dehydrogenase. Durch Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes verringert sich die Enzymaktivität bei Markierung mit Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase oder verstärkt sich bei Markierung mit Malat-Dehydrogenase, d.h., eine hohe Analytkonzentration in der Probe führt im ersten Fall zu hohen, im zweiten Fall zu niedrigen Enzymaktivitäten. Nachteilig ist, dass durch den Antikörper die Enzymaktivität nicht exakt ein- oder ausgeschaltet wird, sondern nur verstärkt bzw. gehemmt wird, was sich in einer deutlichen Leerwertaktivität zeigt.

3.2.2.2. Immunnephelometrie

Die Immunnephelometrie gehört zu den optischen Analysenverfahren, die zur Quantifizierung des Analyten den Tyndall-Effekt nutzen. Bei der Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen entstehen feindisperse Teilchen in Flüssigkeiten, Suspensionen oder Aerosolen, die das Licht streuen.^[36,37] Die Intensität des Streulichtes hängt unter anderem von der Größe und Zahl der Teilchen ab. Die Immunnephelometrie kann unterteilt werden in die Immunturbidimetrie (Trübungsmessung) und in die Immuntandemmetrie (Streuungsmessung). Immunturbidimetrie und Immuntandemmetrie entsprechen ihrer Methode nach der Absorptions- bzw. Fluoreszenzphotometrie, mit dem Unterschied, dass statt Absorption und Emission von Licht bei verschiedenen Wellenlängen das gestreute Licht bei derselben Wellenlänge ge-

messen wird.^[46,47] Die Immuntandemmetrie, in der allgemeinen Literatur und im Laborsprachgebrauch als Immunnephelometrie (obwohl ein Überbegriff) bezeichnet, misst den Anteil des seitlich gestreuten Lichtes. Im Falle der Immunturbidimetrie wird die Intensitätsabnahme des eingeschalteten Lichts gemessen. Diese Extinktion beruht jedoch nicht auf einem Absorptionsvorgang, sondern auf der Lichtstreuung.

Da bei der Absorptionsphotometrie wie bei der Immunturbidimetrie die Differenz zweier starker Messsignale bestimmt wird, sind diese Verfahren bei geringer Analytkonzentration weniger empfindlich als Fluoreszenzmessungen oder die Immuntandemmetrie, bei denen kleine Analytkonzentrationen mit der Differenz schwächer Signale einhergehen.^[38] Zur Quantifizierung des Analyten bei der Reaktion anhand der Streulichtdynamik gibt es mehrere Methoden: Bei der Endpunktmetode wird das Maximum des Streulichtwertes für die Auswertung herangezogen. Bei der Zwei-Punkt-Methode (Fixed-Time-Methode) wird die Streulichtintensität zu definierten Zeiten an zwei Punkten gemessen und die Antigenkonzentration anhand der Differenz der Streulichtwerte ermittelt. Bei der kinetischen Immunnephelometrie (Rate-Methode) wird die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der Immunkomplexbildung zur Quantifizierung des Analyten herangezogen. Hierfür werden die aufgezeichnete Streulichtintensitätskurve differenziert und der Wendepunkt ermittelt.^[39,40]

Eine Variante der Immunnephelometrie mit gesteigerter Nachweisempfindlichkeit ist die partikelverstärkte Immunnephelometrie (partikelamplifizierter nephelometrischer Test). In diesem Fall werden Latexpartikel mit Immunglobulinen (Ig) beschichtet, um bei der immunologischen Reaktion größere Partikel zu erzeugen, wodurch sich die Streulichtintensität erhöht und die Nachweigrenze auf das 1000-Fache abgesenkt werden kann.^[41] Auf diese Weise ist es möglich, niedrige Analytkonzentrationen zu ermitteln, z.B. IgA und IgM im Liquor.

Die Präzipitationsreaktion dauert in Lösung 90–240 min. Die Reaktionszeit lässt sich durch Zusatz von 4% Polyethylenglycol 6000 auf wenige Minuten (Immuntandemmetrie) oder auf 10–15 s (Immunturbidimetrie) verkürzen. In der klinischen Chemie werden die gewonnenen Messergebnisse anhand von Kalibrierungskurven in SI-Einheiten umgerechnet und ausgegeben. Hierin unterscheidet sich die klinische Chemie von anderen Bereichen, z.B. der Wasseraufbereitungstechnologie, wo die Messergebnisse nach Kalibrierung mit einer Standardsuspension nach ländler- oder bereichsspezifischem Standard in nephelometrischen Trübungseinheiten (nephelometric turbidity unit, NTU) oder in Trübungseinheit/Formazin (TE/F) angegeben werden.

Besondere Aufmerksamkeit muss niedrigen Messwerten geschenkt werden. Heidelberger und Kendall untersuchten die Abhängigkeit der Immunpräzipitation vom Konzentrationsverhältnis Antigen zu Antikörper.^[42,43] In der nach ihnen benannten graphischen Auftragung (Heidelberger-Kendall-Kurve; Abbildung 4) werden drei Bereiche unterschieden, die darauf zurückzuführen sind, dass sowohl das Antigen als auch der Antikörper mehrere Bindungsstellen enthalten. Deshalb entstehen in Abhängigkeit von ihren Konzentrationen

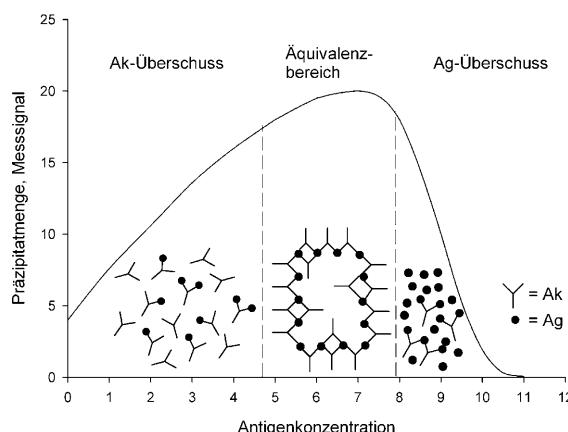


Abbildung 4. Kurve nach Heidelberger und Kendall zur Darstellung der Abhängigkeit der Agglutination vom Konzentrationsverhältnis Antigen/Antikörper und des Antigenüberschusses (High-Dose-Hook-Effekt). Die Streulichtintensität des Antigen(Ag)-Antikörper(Ak)-Komplexes wird in Abhängigkeit von der Ag-Konzentration bei konstanter Ak-Vorlage aufgetragen. Bei maximaler Präzipitation enthält der Überstand nach der Sedimentation weder Antigen noch Antikörper, d.h., Antikörper und Antigen sind in toto vernetzt sedimentiert. Der Bereich mit der maximalen Präzipitation wird als Zone der Äquivalenz bezeichnet, d.h. der Äquivalenz von Epi- und Paratop. Rechts und links von der Zone der Äquivalenz enthält die Lösung nach Sedimentation entweder Antikörper (Zone des Antikörperüberschusses; lineare Beziehung zwischen Präzipitatmenge und Antigenkonzentration) oder lösliches Antigen (Zone des Antigenüberschusses, Auflösung des Raumgitters und dadurch Abnahme der Präzipitatmenge; falsch-niedrige Messergebnisse).

onsverhältnissen unterschiedlich große Antigen-Antikörper-Komplexe und damit Immunpräzipitate. Im ersten Bereich (aufsteigender Ast, Zone des Antikörperüberschusses; linearer Bereich) liegt der Antikörper im Überschuss vor, und es resultiert eine nahezu lineare Beziehung zwischen Präzipitatmenge und Antigen-Konzentration. Im zweiten Bereich (Äquivalenzzone, maximale Präzipitatabbildung) nimmt die Antikörperfokussierung solange weiter ab, bis alle Antikörper durch das Antigen gebunden sind und es zur Bildung eines Raumgitters kommt. Im dritten Bereich (absteigender Ast, Zone des Antigenüberschusses) liegt eine hohe Antigenkonzentration vor. Dies führt zur Auflösung des Raumgitters und entsprechend zur Abnahme der Präzipitatmenge. Aus diesem Grund müssen quantitative Bestimmungen im ersten Bereich der Heidelberger-Kurve stattfinden. Die Auswertesoftware versucht diesen Fehler, der als Hook-Effekt bezeichnet wird, zu erkennen. Durch eine automatische Verdünnung wird eine Wiederholungsmessung gestartet, damit wieder im Bereich des Antikörperüberschusses gemessen wird.

Der Hook-Effekt (oder auch High-Dose-Hook-Effekt) bezeichnet die falsch-niedrige Bestimmung von Analyten, die in sehr hoher Konzentration in Proben vorkommen. Sobald die Analytkonzentration zu hoch ist, können alle Antikörperbindungsstellen mit Analyt belegt sein, und zusätzliche Analytmoleküle werden nicht mehr im Rahmen der Bindungskurve ermittelt. Es kommt zu falsch-niedrigen Messwerten. Durch parallele Messungen von verschiedenen Ver-

dünningen einer Probe kann das Vorliegen eines Hook-Effektes bemerkt und die Bestimmung entsprechend korrigiert werden. Bekannte klinische Parameter, die einem Hook-Effekt unterliegen können, sind beispielsweise Calcitonin, hCG, CRP, AFP, CA 125, PSA, Ferritin, Prolactin und TSH.

3.2.2.3. Blutzellzählung

3.2.2.3.1. Impedanzmessung

Die Kammerzählung und Differenzierung des Blutes ist personal- und zeitintensiv, weshalb versucht wurde, die Differenzierung zu automatisieren. In den 1940er Jahren erfand Coulter die elektronische Zählung und Größenbestimmung mikroskopischer Partikel durch Impedanzmessung.^[44] Das Prinzip ist weit verbreitet: Blutzellen werden in einer Elektrolytlösung suspendiert und diese Suspension durch die Öffnung einer Kapillare gesaugt. Um die Öffnung sind zwei Elektroden platziert (eine innerhalb der Kapillare, eine außerhalb). Bei Passage einer Blutzelle ändern sich der elektrische Widerstand und die Leitfähigkeit proportional zum Volumen der verdrängten Elektrolytlösung und damit der Zellgröße. Für jeden Zelltyp sind Schwellenwerte zur Unterscheidung festgelegt.

3.2.2.3.2. Durchfluszytometrie

Die Durchfluszytometrie eignet sich zur physikalischen und molekularen Identifizierung, Zählung und Sortierung von Zellen oder Partikeln in Suspensionen. Sie wird auch häufig als Flusszytometrie, Flussphotometrie oder FACS (fluorescence activated cell sorting) bezeichnet. Bei der letztgenannten Bezeichnung handelt es sich um eine Handelsmarke der Firma Becton Dickinson.

Die automatische Bestimmung von Zellen in einem Flusssystem wurde erstmals 1934 von Moldavan vorgestellt.^[45] Als Problem erwies sich die Zellaggregation in den dünnen Messkapillaren. Dieses Problem konnte Anfang der 1950er Jahre durch Umhüllung des Zellstroms mit einem laminar strömenden Flüssigkeitsmantel gelöst werden (Abbildung 5).^[46]

Die Quantifizierung und die Analyse von Zellen beruhen auf der Emission von Streulicht bei Passage eines Laserstrahls in Abhängigkeit von der relativen Größe, Granularität oder Komplexität der Zellen. Hierbei werden die in einer Lösung befindlichen Zellen durch eine Kapillare gesaugt und passieren im Sensormodul einzeln einen Laserstrahl. Die Zellen streuen einen Teil des Lichts, das von Photovervielfächern detektiert wird. Das Ausmaß der Lichtstreuung korreliert mit der Größe der Zelle sowie ihrer Granularität oder Komplexität. Demzufolge streuen beispielsweise segmentkernige Granulozyten, die über viele zytoplasmatische Granula verfügen, deutlich mehr Licht als die sehr glatten Lymphozyten. Das Vorwärtsstreuulicht (FSC = forward scatter) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt vom Zellvolumen ab. Das Seitwärtsstreuulicht (SSC = sideways scatter) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, die von der Granularität der Zelle, der Größe und der Struktur des Zellkerns sowie der Menge intrazellulärer Bestandteile abhängt (Abbildung 6). Mit diesen beiden Pa-

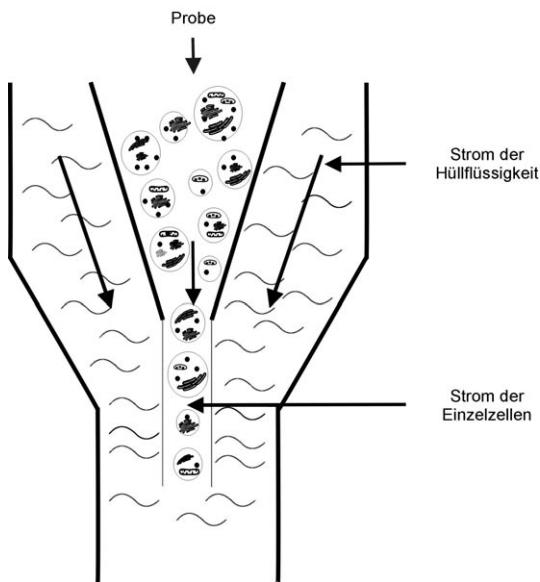


Abbildung 5. Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung: Bei der Durchflusszytometrie werden Zellsuspensionen auf Einzelzellniveau untersucht. Die Zellen werden hierfür durch hydrodynamische Fokussierung in eine Einzellssuspension gebracht. Hierbei wird die Zellsuspension der Probe aus dem Probenreservoir angesaugt. Ein Hüllstrom, der eine höhere Fließgeschwindigkeit aufweist als der Probenstrom, umschließt den Probenstrom und engt diesen dadurch bis auf wenige Mikrometer Durchmesser ein.

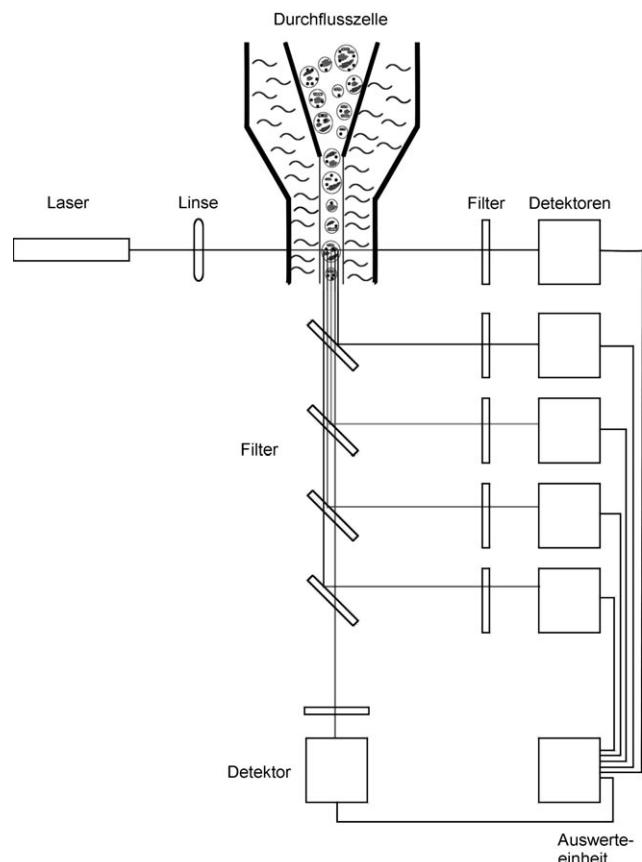


Abbildung 6. Prinzip der Durchflusszytometrie: Ein Partikel (evtl. fluoreszenzmarkiert) oder eine Zelle (evtl. fluoreszenzmarkiert) wandert in einem Flüssigkeitsstrom durch einen Laserstrahl. Dabei wird für jede Zelle oder jedes Partikel gemessen, wie viel Licht absorbiert wird (forward scatter; ergibt die relative Größe), wie viel Licht reflektiert wird (sideways scatter; ergibt die relative optische Dichte), sowie, falls eine Fluoreszenzmarkierung durchgeführt wurde, welche Fluoreszenzen emittiert werden (Detektion abhängig von den Detektoren, den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen und der Wellenlänge des Anregungslichtes). Filter und Spiegel regulieren das Licht so, dass es auf die richtigen Detektoren trifft.

rametern lassen sich z.B. die Zelltypen des Blutes bereits recht gut unterscheiden. An diesem von Hulett, Bonner et al. Anfang der 1970er Jahre eingeführten Prinzip hat sich bis heute nichts geändert, lediglich die Zahl der Detektionskanäle für die simultane Detektion von mehreren Fluoreszenzfarbstoffen und die Zahl der Laseranregungslichtquellen wurden erhöht.^[47–49]

Parallel hierzu ist es, je nach Ausstattung der Geräte, möglich, fluoreszenzmarkierte Zellen zu messen. So werden für die Diagnostik und Differenzierung der verschiedenen Leukämien die Leukozyten mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen leukämiespezifische Oberflächenproteine inkubiert. Durch die anschließende Messung lässt sich zeigen, ob der markierte Antikörper gebunden hat und somit dieses Oberflächenprotein auf den Leukozyten exprimiert ist. Außerdem ist es möglich, Zellen nach Markierung zu sortieren. Durch den Einsatz von Lasern, die bei verschiedener Wellenlänge arbeiten, in Kombination mit unterschiedlichen Filtern können die Zahl der verwendbaren Farbstoffe und damit die Informationsdichte erhöht werden (Abbildung 6).

Die Durchflusszytometrie ist ein Routineverfahren in der Immunologie und Hämatologie. Sie dient in der täglichen Routineanalytik zur Erstellung des maschinellen Differentialblutbildes. Abbildung 7 zeigt das Verteilungsmuster (Streudiagramm, Punktauftragung) eines unauffälligen Differentialblutbildes. Die Zellpopulationen des weißen Blutbildes stellen sich als Punktewolken dar. Sind die Punktewolken nicht mehr begrenzt, kann dies ein Hinweis auf eine Veränderung im weißen Blutbild sein. In Abbildung 8 ist eine so genannte „Linksverschiebung“, d.h. das Auftreten jugendli-

cher, unreifer Granulozyten, dargestellt. Sie kann z.B. im Rahmen von Infekten, Entzündungen und Neoplasien auftreten. In Fällen mit unklarer Abgrenzung der Zellpopulationen im Streudiagramm sind die Anfertigung eines Ausstrichpräparates und die ärztliche Differenzierung der weißen Blutzellen obligat.

Daneben wird die Durchflusszytometrie in der biologischen Forschung und Umweltanalytik verwendet. Von Interesse sind häufig die Untersuchung der Expression von Oberflächenmolekülen oder intrazellulären Molekülen auf Einzelzellebene. Die Zellen werden mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern oder mithilfe von fluoreszierenden Fusionsproteinen markiert. Andere Anwendungen sind Experimente zur Zellzyklusanalyse, Apoptose-Assays unter Verwendung von RNA/DNA-Farbstoffen oder die Analyse des intrazellulären pH-Werts oder von Ionenflüssen an Membranen mithilfe geeigneter Fluoreszenzfarbstoffe.

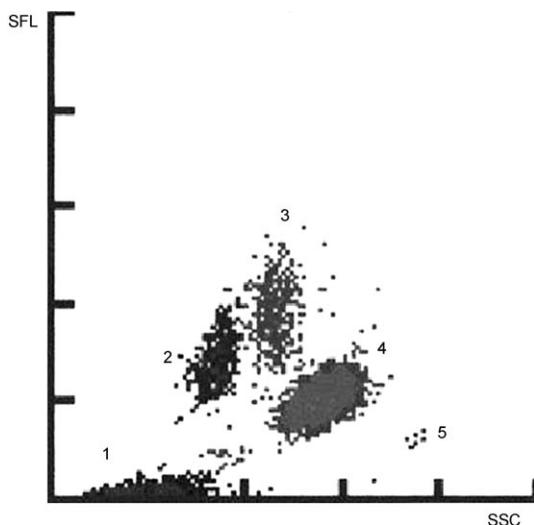


Abbildung 7. Verteilungsmuster (Streudiagramm) der Blutzellen in der Durchflusszytometrie (Differentialblutbild). Die einzelnen Zellpopulationen des weißen Blutbildes stellen sich als Punktfolken dar. Bewertung als unauffälliges Differentialblutbild. 1 = Debris, entstanden z. B. durch Lyse der Erythrozyten; 2 = Lymphozyten; 3 = Monozyten; 4 = neutrophile und basophile Granulozyten; 5 = eosinophile Granulozyten. SSC = Seitwärtsstreuulicht; SFL = Fluoreszenzintensität = side fluorescence.

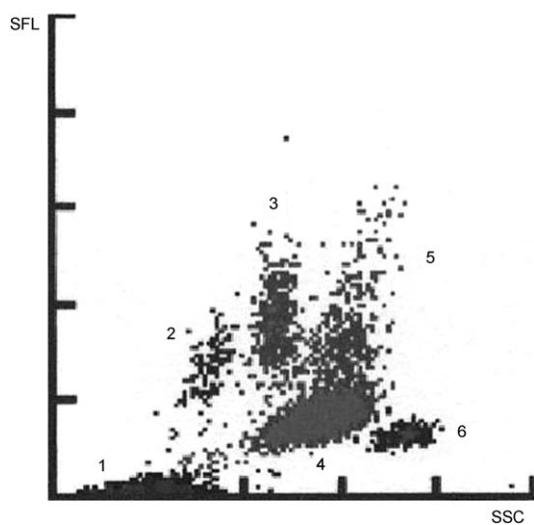


Abbildung 8. Verteilungsmuster (Streudiagramm) der Blutzellen in der Durchflusszytometrie (Differentialblutbild). Die Zellpopulation 4 zeigt sich nicht als Punktfolke, sondern es zeigt sich eine zweite, nicht homogene Zellpopulation (5). Dabei handelt es sich um Vorläuferzellen der Granulozytopoese (unreifer Formen) im Rahmen einer „Linksverschiebung“. Diese tritt z. B. im Rahmen von Infektionen, Entzündungen und Neoplasien auf. 1 = Debris, entstanden z. B. durch Lyse der Erythrozyten; 2 = Lymphozyten; 3 = Monozyten; 4 = neutrophile und basophile Granulozyten; 5 = Vorläuferzellen der Granulozytopoese; 6 = eosinophile Granulozyten.

3.2.2.4. Funktionelle Gerinnungsdiagnostik

Außer der Quantifizierung von Analyten spielt auch die Ermittlung ihrer physiologischen Funktionstüchtigkeit eine

wichtige Rolle. So ist im peri- und postoperativen Management nicht nur die Zahl der Thrombozyten von Bedeutung, sondern auch ihre Funktionstüchtigkeit im Hinblick auf die zelluläre Gerinnung.^[50,51]

Der erste Versuch einer einheitlichen Gerinnungserfassung der zellulären und plasmatischen Gerinnung, erfolgte 1878 durch von Vierordt (1818–1884).^[52] Er zog ein weißes Pferdehaar durch eine 5 cm lange, mit Blut gefüllte Glas-Kapillare und maß die Zeit bis zum ersten Erscheinen eines Fibrinstrangs. Die Einführung der Thrombelastographie (TEG), eines Verfahrens zur Erfassung der funktionellen Gerinnung (Globaltest des Gerinnungssystems), durch Harpert 1948 ermöglichte nicht nur die Bestimmung einzelner oder weniger Gerinnungsparameter, sondern auch die Beobachtung der Dynamik der Gerinnung sowie der Fibrinolyse.^[53–55] Die TEG ergibt ein viskoelastisches Maß der Bildung und Auflösung des Gerinnsels, mit dem sich gleichzeitig Gerinnungsstatus, Thrombozyten-Fibrinogen-Wechselwirkung, Thrombozytenfunktion und Fibrinolyse ermitteln lassen. Die Weiterentwicklung in Form der Rotationsthrombelastographie (ROTEM) durch Calatzis et al. 1996 verbesserte die Methode vor allem im Hinblick auf Routinetauglichkeit bezüglich der Messzeit und Messemfindlichkeit.^[56] Das Prinzip dieser Technik basiert auf der Änderung der Oszillation eines Stempels, der in eine mit Blut gefüllte Küvette eintaucht. Der Stempel, stabil geführt durch das Kugellager, oszilliert um einen Winkel von $\pm 4.75^\circ$, angetrieben durch eine Feder (Abbildung 9). Bei Einsetzen der Gerinnung und Bildung von Fibrinfäden zwischen Stempel- und Messküvettenwand kommt es zur Dämpfung der Oszillation, was durch das op-

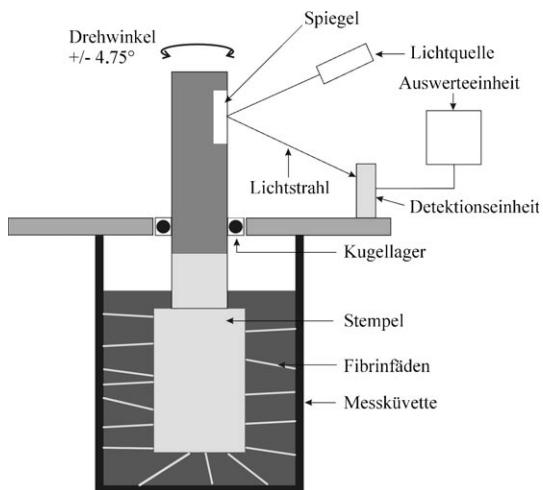


Abbildung 9. ROTEM-Prinzip.^[57] Vor Beginn der Messung wird der Rührstempel in seiner Halterung am Messgerät fixiert und die Küvette in einen Metallblock hineingedrückt. Nach Zugabe der Blutprobe und des Startreagens werden spezifische Reagenzien für den jeweiligen Test hinzugesetzt, und die Messung wird gestartet. Die Bewegung des Stempels wird mechatronisch an das Computersystem weitergeleitet. Die durch Gerinnselfbildung eingeschränkte Bewegung des Stempels wird in die TEG-Amplitude umgerechnet, die somit ein stetiges Maß für die Gerinnselfestigkeit darstellt. Die für das ROTEM entwickelten Aktivatoren beschleunigen das Einsetzen der Gerinnung und führen daher in bedeutend kürzerer Zeit (10 min statt 45–60 min mit klassischen Geräten) zu Ergebnissen.

tische System (Lichtquelle – Spiegel – CCD-Zeilsensor) registriert und an einen Computer weitergeleitet wird. Im weiteren Verlauf der Messung setzt die Fibrinolyse ein, weshalb die Oszillation des Stempels wieder zunimmt. Die Oszillationsveränderungen des Stempels werden aufgezeichnet, und man erhält die typische TEG-Kurve (Abbildung 10). Anhand des zeitlichen Verlaufs und der Anstiegssteilheit der Kurve sowie durch Wahl verschiedener standardisierter Testansätze lassen sich Gerinnungsstörungen diagnostizieren und differenzieren.

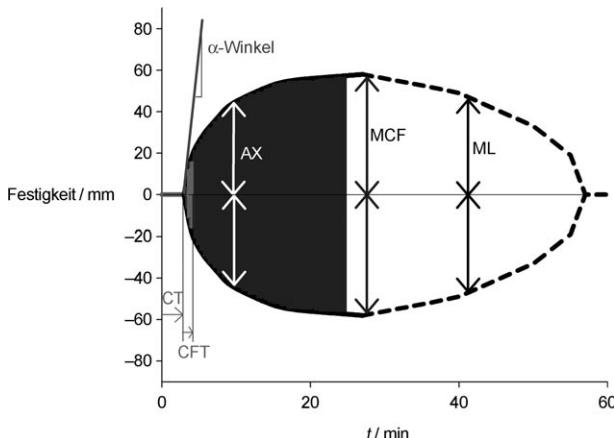


Abbildung 10. Verlauf und Parameter des Thrombelastogramms (ROTEM-Analyse) einer gesunden Person, modifiziert nach Lit. [56] (aus historischen Gründen wird die Kurve zweischichtig aufgetragen und die Ordinate in mm bemaßt). Die Gerinnungszeit (coagulation time/clotting time, CT [s]) ist die Zeit von Beginn der Messung bis zum Einsetzen der Gerinnung (Aktivierung der Gerinnungskaskade, Thrombinbildung, Beginn der Gerinnselbildung). Die Gerinnselbildungszeit (clot formation time, CFT [s]) ist definiert als die Zeit ab dem Beginn der Gerinnung bis zum Erreichen einer Gerinnselfestigkeit von 20 mm (Verfestigung des Gerinnsels durch das Zusammenwirken der Fibrinpolymerisation, der Thrombozytenaggregation und der Aktivität des fibrinstabilisierenden Faktors XIII; CFT und α -Winkel sind ein Maß für die Elastizitätszunahme des Gerinnsels). Die maximale Gerinnselfestigkeit (maximum clot firmness, MCF [mm]) ist die maximale mechanische Ausprägung des Gerinnsels (zunehmende Verfestigung des Gerinnsels durch das Zusammenwirken der Fibrinpolymerisation und -vernetzung, der Thrombozytenaggregation und der Aktivität des fibrinstabilisierenden Faktors XIII). Die maximale Lyse (maximum lysis, ML [%]) ist die Stabilität des Gerinnsels gegenüber der fibrinolytischen Aktivität (Gerinnsellyse). Bei einem Mangel an prokoagulatorischen Faktoren, einer Thrombozytopenie oder der Wirkung von Antikoagulantien wie Heparin wird eine Verlängerung der CT beobachtet. AX [mm] ist die Amplitude zu einem Zeitpunkt X; sie fließt in die Bewertung der MCF mit ein. Die Gerinnselfestigkeit ist ein Maß für die Stärke und Belastungsfähigkeit eines Gerinnsels (Gerinnselqualität) und ist abhängig z.B. von der Thrombozytenzahl, der Fibrinogenkonzentration und der Faktor-XIII-Aktivität. Physiologisch setzt die Lyse innerhalb von 60 min ein.

Die Vollblut-Impedanz-Thrombozytenaggregometrie wurde zu Beginn der achtziger Jahre von Cardinal und Flower vorgestellt.^[58] Eine Weiterentwicklung dieser Methode stellt das Multiplate dar, das maßgeblich von Calatzis et al. entwickelt wurde.^[59,60] Bei dieser Methode tauchen in die Blutprobe zwei parallel positionierte Elektroden ein (Abbil-

dung 11). Während des initialen Kontaktes mit Vollblut werden die Elektroden zum Teil mit Thrombozyten bedeckt. Ohne aggregationsfördernde Reagenzien bleibt die Leitfähig-

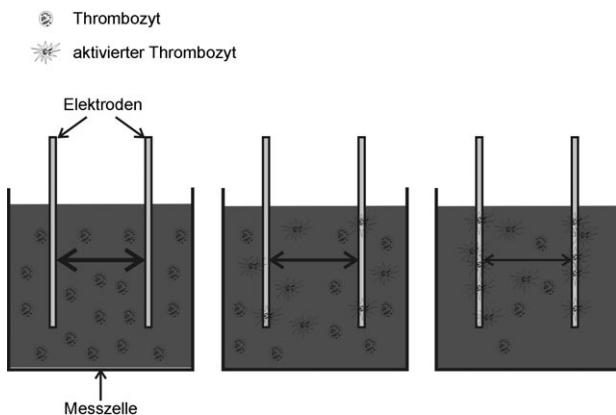


Abbildung 11. Prinzip des Impedanz-Thrombozytenaggregationstests von Multiplate. Zwei Elektroden, an denen eine Wechselspannung angelegt ist, tauchen in eine Küvette, die mit Vollblut gefüllt ist. Es wird der Anstieg der Impedanz (Wechselspannungswiderstand) nach einer Aktivierung der Thrombozyten mit verschiedenen Aktivatoren als Fläche unter der Aggregationskurve innerhalb von 6 min gemessen.

higkeit bei einem bestimmten Stromfluss konstant. Nach Zugabe von Aggregationsstimulanten (z.B. Adenosindiphosphat (ADP), Arachidonsäure, Prostaglandine, Ristocetin, Thrombin) steigt die Impedanz (Wechselspannungswiderstand) wegen der Aggregation der Thrombozyten an den Elektroden. Die Impedanzänderung ist proportional zur Thrombozytenaggregation und wird als Fläche unter der Aggregationskurve angezeigt.

Mithilfe des Platelet Function Analyzers (PFA 100) kann die Thrombozytenfunktion durch die Bestimmung der Kapillarverschlusszeit getestet werden.^[61–63] Vollblut wird in eine Kammer gefüllt, die ins Gerät eingesetzt wird. Anschließend zieht das Gerät die Blutprobe durch Anlegen von Vakuum durch ein dünnes Röhrchen, das innen mit Kollagen und Adrenalin oder ADP ausgekleidet ist. Diese Substanzen regen die vorbeiströmenden Thrombozyten zur Adhäsion und Aggregation an. So bildet sich im Inneren des Röhrchens ein Thrombus, der den weiteren Blutfluss stoppt. Die Zeit zwischen Testbeginn und Ende des Blutflusses wird gemessen und als Verschlusszeit angegeben.

3.2.3. Point-of-Care-Testung (POCT)

POCT bedeutet soviel wie „Vor-Ort-Diagnose“, denn auch unter bestmöglichster Organisation aller präanalytischen (im Besonderen der Materialtransport) und analytischen Abläufe wird gerade wegen der Vielzahl an Untersuchungsaufträgen Zeit bis zur Erstellung des Laborbefundes und damit zur weiteren Sicherung der Diagnose benötigt. Um diese Zeitspanne (turnaround time, TAT) möglichst gering zu halten, gehen neben Intensivstationen, Not hilfen, Operationsbereichen und Ambulanzen der Krankenhäuser auch niedergelassene Ärzte zunehmend dazu über, wichtige Ana-

lysen dezentral und patientennah (near patient testing) mit POCT-Geräten durchzuführen.^[64] Charakteristika der POCT sind eine patientennahe quantitative oder halbquantitative Einzelprobenmessung, keine Probenaufbereitung (meist Vollblut als Untersuchungsmaterial), keine Pipettierschritte, gebrauchsfertige Reagenzien und einfach zu bedienende Messgeräte.^[65] Ein weiteres Merkmal ist die Verwendung von Unit-Use-Reagenzien, d.h., alle für die Untersuchung benötigten Substanzen sind auf dem Teststreifen. Die zugrunde liegende Technik ist die Biosensorik. Die Messsysteme basieren auf trockenchemischen, immunochemischen und elektrochemischen Messmethoden. Die Messzeit liegt im Minutenbereich. Vor allem bei akuten Notfällen sowie in der intensivmedizinischen Überwachung hat die Blutgasanalyse (BGA), eine Anwendung der POCT, einen hohen Stellenwert, da sie den aktuellen Status quo des Patienten bezüglich der Verteilung von Sauerstoff und Kohlendioxid sowie des pH-Werts, des Blutglucosewerts, der Elektrolyte und des Säure-Basen-Haushalts widerspiegelt. Somit ist eine individuelle Therapie des Patienten z.B. im Rahmen einer künstlichen Beatmung oder einer Dialyse möglich.^[66]

Weit verbreitet ist auch die Bestimmung von Enzymen (alkalische Phosphatase (AP), Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT = Aspartat-Aminotransferase = ASAT = AST), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT = Alanin-Aminotransferase = ALAT = ALT), γ -Glutamyl-Transferase (γ -GT), α -Amylase, Kreatinkinase (CK)), Elektrolyten (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , Mg^{2+}) sowie einer Vielzahl von Stoffwechselgrößen (Bilirubin, Gesamt-, HDL(high density lipoprotein)- und LDL(low density lipoprotein)-Cholesterin, Triglyceride, Glucose, Harnsäure, Kreatinin, Harnstoff und Lactat). Daneben wird versucht, weitere Notfallparameter, beispielsweise Herzmarker (Troponin T oder I) oder das D-Dimer im Rahmen eines Lungenembolieausschlusses mithilfe von POCT zu bestimmen.^[67] Die analytische Qualität ist für klinische Zwecke in aller Regel ausreichend, akzeptable Korrelationen zwischen POCT-Messergebnissen und den Befunden etablierter Labormethoden wurden nachgewiesen.^[68,69] Allerdings muss beachtet werden, dass Richtigkeit und Präzision bei POCT-Messungen aus methodischen Gründen (Anfälligkeit gegen Interferenzen, Entfall der Probenmaterialvorbereitung, Messprinzip) häufig denen der Labordiagnostik unterlegen sind, weshalb die Validität der POCT-Resultate in klinischen Notfallsituationen besonders überprüft werden muss, z.B. Analytwerte bei Patienten mit erhöhtem Blutglucose- oder Hämatokritwert.^[70,71]

3.2.4. Laborstraßen

Bei Laborstraßen handelt es sich um prozessoptimierte Anlagen, die zeitaufwändiges Sortieren von Proben, das Zentrifugieren sowie das Entfernen des Deckels der Probengefäße übernehmen. Anhand des Strichcodes der Röhrchen wird erkannt, welche Parameter bestimmt werden sollen. Die Probengefäße werden anschließend vollautomatisch den jeweiligen Messstationen zugeführt. Nach der Bestimmung der Analyte werden sie am Ende der Laborstraße zur Ablage eingesortiert. Die Erstellung von Aliquots ist ebenfalls möglich und erfolgt vollautomatisch, wenn Para-

meter an mehreren Stationen bestimmt werden sollen. Falls ein Parameter wiederholt gemessen werden muss, wird automatisch das bereits eingesortierte Probengefäß gesucht und der Parameter analysiert. Im Falle von Parametern für Spezialuntersuchungen wie die Durchflusszytometrie werden die Proben aussortiert und im Ausgabebereich gesammelt (Abbildung 12).

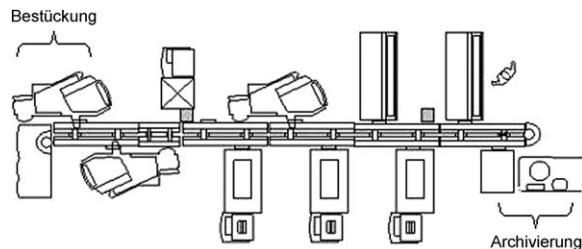


Abbildung 12. Eine Laborstraße: Die Probenröhrchen werden automatisch eingelesen und eventuell zentrifugiert, die Kappen der Probenröhrchen werden automatisch entfernt (links im Bild). Anhand der angeforderten Parameter (codiert im Strichcodeetikett) werden die Probenröhrchen den einzelnen Analysenautomaten zugeführt und anschließend an die Sammelstelle zur Archivierung transportiert (rechts im Bild).

3.2.5. Forschung und aktuelle Entwicklungen

3.2.5.1. Biosensorik

Die Biosensorik beschreibt einen Prozess, bei dem spezifische Informationen über die biochemische Zusammensetzung einer Analysenprobe in Echtzeit erhalten werden. Der Biosensor ist ein miniaturisiertes Analysensystem, das biospezifische Wechselwirkungen ohne zusätzliche Markierung im Durchflusssystem erfassen kann. Auf der Sensoroberfläche sind biologische Erkennungselemente immobilisiert, die eine biospezifische Wechselwirkung mit definierten Analyten eingehen können.^[72] Diese Wechselwirkung wird in ein physikalisch messbares optisches, elektrochemisches, thermisches, mechanisches, elektrisches oder magnetisches Signal übersetzt und quantitativ oder qualitativ dargestellt.^[73]

Das Prinzip von Enzymelektroden (Enzyme, die auf einem Messfühler aufgebracht sind) wurde Anfang der 1960er Jahre von Clark, Jr. patentiert. Clark und Lyons beschrieben eine Enzymelektrode zur Bestimmung von Blutzucker, bei der das Enzym Glucoseoxidase mit einer semipermeablen Membran vor einer Sauerstoffelektrode fixiert wurde.^[74] Seit dieser Zeit sind zahlreiche weitere Enzyme verwendet worden. Daneben werden auch andere Biokomponenten, wie Organellen, intakte Zellen, Antikörper und Rezeptoren, als Erkennungselemente eingesetzt. Diese traditionell verwendeten Erkennungssysteme wurden in neuerer Zeit durch Nucleinsäuren sowie synthetische und semisynthetische (biomimetische) Erkennungssubstanzen erweitert. Hier sind besonders DNA, RNA, Peptidnucleinsäuren (PNAs), Synzyme (synthetische Enzyme) und Molecular Imprinting (molekular geprägte Polymere, die bestimmte Zielstrukturen erkennen (vgl. antikörperähnliche Affinität und Selektivität)) zu nennen. Durch Nutzung des Proteinengineering werden gezielt veränderte Proteine, Antikörper

und Enzyme erhalten. Die Erzeugung von optimalen Bindungsmolekülen auf Aminosäure- und Nucleinsäurebasis wird durch Kombination der Synthese großer kombinatorischer Peptid- und RNA-Bibliotheken, Selektion nach Bindungsstärke zum Analyten und enzymatischer Verstärkung realisiert.

Beispiele sind Immun- und Nucleinsäuresensoren, enzymatische und mikrobielle Sensoren sowie rezeptorbasierte Sensoren. Zur Detektion dienen in der Biosensorik vor allem enzymatische Umsetzungen, die piezo-elektrische Quarz-Mikrowaage, aber auch verschiedene optische Verfahren, wie die zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie, sowie die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (Detektion von Massenänderungen in einem evaneszenten Feld). Daraus ergibt sich eine Reihe von biochemischen, molekularbiologischen und medizinischen Anwendungen.^[75–77] Ein gutes Beispiel auf dem labormedizinischen Sektor ist die Entwicklung eines Glucosesensors, der – im Gewebe platziert – eine kontinuierliche Echtzeit-Blutzuckerbestimmung sowie über einen Rückkopplungsmechanismus die direkte und automatische Verabreichung von Insulin ermöglicht (künstliche Bauchspeicheldrüse). Biosensoren finden daneben ihre Anwendung im Bereich der POCT-Messungen (Blutgase, Elektrolyte, Stoffwechselmetabolite). Weitere zukünftige Einsatzgebiete sind der Nachweis kleinstter Tumoren im Rahmen der Krebsvorsorge, die Allergiediagnostik, die Erforschung des menschlichen Erbgutes und die Mikrobiologie. Der Bakteriennachweis beruht beispielsweise auf einer elektrochemischen Messung mit Kohlenstoffnanoröhren, die mit Aptameren, d.h. künstlichen DNA- oder RNA-Fragmenten, als bakterienspezifischen Bindestellen beschichtet sind. Binden Bakterien an die Aptamere, lässt sich eine elektrische Spannungsänderung detektieren.^[78]

3.2.5.2. Personalisierte Medizin

Hierunter versteht man die gezielte Behandlung eines Patienten nach vorheriger Erhebung seines genetischen Profils, da dieses Ausmaß und Dauer sowohl der Medikamentenwirkung wie auch der Nebenwirkungen beeinflussen kann. Mit der personalisierten Medizin wird die Arzneimitteltherapie mehr und mehr auf einzelne Patientengruppen in Abhängigkeit von deren genetischem Profil abgestimmt.

Vereinzelt kommt die personalisierte Medizin bereits beim Patienten an. Die amerikanische Arzneimittelbehörde (Food and Drug Administration, FDA) hat 2005 erstmals vor der Anwendung Warfarin-haltiger Produkte beim Patienten einen genetischen Test empfohlen.^[79] Warfarin, ein Vitamin-K-Antagonist aus der Gruppe der Cumarine, wird zur Hemmung der Blutgerinnung eingesetzt, um beispielsweise bei Risikopatienten die Gefahr von Thrombosen und Schlaganfällen zu senken. Da ca. 30% der Patienten Warfarin wegen bestimmter Genvariationen langsamer abbauen und deshalb – bei Standarddosierung – einen zu hohen Warfarin-Spiegel im Körper aufweisen, kann es zu schweren Blutungen kommen. Im Umkehrschluss bleibt bei einer zu niedrigen Dosierung die angestrebte Senkung des Thrombosierisikos aus. Zurückzuführen ist dieser unterschiedliche Abbau des Warfarins auf Varianten des Cytochrome-P450(cyp)2c9- und

vkorcl-Gens.^[80] Weitere Beispiele sind die Gene *cyp2d6* und *cyp2c19*, die für Enzyme codieren, die Propharmaka in die aktiven Metaboliten umwandeln (*cyp2d6*: Tamoxifen, ein Therapeutikum bei Östrogen-Rezeptor-positiven Brustkrebskrankungen, in den Wirkstoff Endoxifen; *cyp2c19*: Clopidogrel, ein Medikament zum Schutz vor einem Wiederverschluss geöffneter Herzkrankengefäße, in das pharmakologisch aktive Thioholderivat).^[81,82] Das genetische Profil der Patienten hilft dabei, die Dosierung dieser Wirkstoffe gezielt auf den jeweiligen Patienten abzustimmen, um die gewünschte Wirksamkeit zu gewährleisten und vor allem auch unerwünschte Nebenwirkungen zu vermeiden.

Der humane epidermale Wachstumsfaktorrezeptor 2 (human epidermal growth factor receptor 2; HER2 = HER2/neu = c-erbB-2) spielt eine wichtige Rolle beim normalen Wachstum und bei der Ausreifung von Körperzellen. Im Vergleich zu normalen Körperzellen kann bei Krebszellen die Zahl der Rezeptoren auf das 10- bis 100-Fache der Norm gesteigert sein. Man spricht dann von einer HER2-Überexpression. Dies ist meist mit einer gesteigerten Genamplifikation verbunden, d.h. einer Erhöhung der Zahl von HER2-Genkopien im Zellkern. Der Nachweis des HER2-Proteins bei Brustkrebs mit spezifischen Tests ermöglicht es, Patientinnen zu identifizieren, die voraussichtlich auf eine Therapie mit dem rekombinanten humanisierten monoklonalen IgG₁-Antikörper Trastuzumab (Herceptin) ansprechen – einem Medikament, das gezielt auf diesen Wachstumsfaktor-Rezeptor wirkt.^[83]

Panitumumab (Vectibix) ist ein humaner rekombinanter Anti-EGFR-Antikörper (IgG₂) gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (epidermal growth factor receptor, EGFR) der in der Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms eingesetzt wird. Die Therapiekosten können sich hierbei auf über 100000 Euro pro Patient belaufen. Nach aktuellen Daten scheint die Therapie mit Anti-EGFR-Antikörpern aber nur bei Patienten sinnvoll zu sein, deren Tumor keine Mutation des K-ras-Gens aufweist (etwa 60% der Patienten).^[84] Die Bestimmung des K-ras-Mutationsstatus ist ein prädiktiver Biomarker für das Ansprechen der Therapie mit Panitumumab; dem Patienten werden damit schwere Nebenwirkungen und den Trägern des Gesundheitssystems Kosten erspart.

Des Weiteren ist ein Genchip verfügbar, um die individuelle Ausstattung eines Patienten mit Genen für bestimmte Medikamente abbauende Leberenzyme zu erfassen, da diese bei einigen Arzneimitteln wiederum für die Wahl der geeigneten und erforderlichen Dosierung von großer Bedeutung ist. Weitere Beispiele sind Azathioprin und Mercaptopurin, die gegen Autoimmunkrankheiten bzw. gegen Leukämie eingesetzt werden.^[85]

Generell müssen für die Etablierung von Parametern der personalisierten Medizin drei grundsätzliche Aspekte erforscht und abgesichert sein:

- Die Messgenauigkeiten und -empfindlichkeiten für den jeweiligen Marker müssen valide sein.
- Der Test muss eine Krankheit zuverlässig feststellen oder vorhersagen können.
- Der Test muss klinisch relevant sein, d.h., die Bedeutung des Befundes für den einzelnen Patienten muss klar sein,

inklusive möglicher präventiver oder therapeutischer Ansatzpunkte.

3.2.5.3. Kontroll-, Kalibrierungs- und Referenzmaterialien

Im Rahmen der internen Qualitätssicherung wird nach den gängigen Richtlinien für jeden Analyten die Führung eines Kontrolljournals gefordert. Für jeden Analyten müssen pro Analysenserie Kontrollen zu Beginn der Messreihe und im Verlauf in verschiedenen Konzentrationsbereichen gemessen werden. Konkret bedeutet dies, dass die Analysenwerte der Kontrollen nicht ausschließlich in der Mitte des Messbereichs liegen dürfen, sondern auch Kontrollen an der Ober- und Untergrenze des Messbereichs gemessen werden müssen und dass das Ergebnis im Kontrolljournal dokumentiert werden muss. Ebenso müssen Abweichungen vom Konzentrationsbereich dort dokumentiert werden. Sollten die vorgegebenen Konzentrationsbereiche nicht eingehalten werden können, ist eine Kalibrierung des Analysengerätes durchzuführen. Durch Auswerten der Kontrolljournale werden Präzision (Maß für die Übereinstimmung unabhängiger Messergebnisse unter verschiedenen Messbedingungen, z.B. Zeit, untersuchende Person) und Richtigkeit (Maß für die Übereinstimmung zwischen dem in einem Kontrollzyklus, z.B. in einem Monat, erhaltenen Mittelwert und dem Zielwert) ermittelt.

Es ist empfehlenswert, diese Mindestanforderung durch freiwillige zusätzliche Kontrollen zu ergänzen, damit Fehler bei der Analytbestimmung (z.B. durch Geräteverunreinigungen) frühzeitig erkannt werden können. Darüber hinaus werden in vielen Laboratorien so genannte Pools vermessen. Diese werden im Labor selbst durch Zusammenfügen humarer Seren hergestellt und weisen damit eine komplexere Matrix auf als Kontrollen, die häufig synthetisch hergestellt werden. Pools werden ebenfalls für verschiedene Konzentrationsbereiche hergestellt.

Kontroll- und Kalibrierungsmaterialien werden vom Hersteller der Geräte meist mit angeboten. Hierbei ergibt sich das Problem, dass der Reagentiensatz zur Analytbestimmung zwar gute Ergebnisse mit den synthetischen Kontroll- und Kalibrierungsmaterialien liefert (da von einem Hersteller), jedoch bei stark matrixbelasteten Patientenproben Kreuzreaktivitäten oder andere Störungen auftreten.^[86,87] Aus diesem Grund ist für einen Teil der Untersuchungen aus humanem Material ein Messen mit einem anderen Testsystem unerlässlich oder eine umfangreiche Probenvorbereitung nötig. Es besteht daher ein Interesse an der Verbesserung von Kalibrierungs- und Referenzmaterialien und deren Matrix, damit diese vergleichbar zu biologischen und humanen Proben sind.^[88–90] Grundlegende Richtlinien für Referenzmaterialien werden von der ISO und deren Komitee für Referenzmaterialien (ISO-REMCO) festgelegt. Gemäß ISO/IEC Guide 99:2007 International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM) sind Referenzmaterialien Materialien oder Substanzen von ausreichender Homogenität, von denen einer oder mehrere Merkmalswerte so genau festgelegt sind, dass sie zur Kalibrierung von Messgeräten, zur Beurteilung von Messverfahren oder zur Zuweisung von Stoffwerten verwendet werden

(z.B. der Gehalt eines bestimmten Ions oder die elektrische Leitfähigkeit eines Stoffes). Referenzmaterialien werden üblicherweise mit Zertifikat ausgegeben, d.h., die Merkmalswerte sind mit zugehöriger Messungenauigkeit (Vertrauensintervall) aufgeführt. Außerdem wurden die vom Hersteller angegebenen Merkmalswerte durch ein unabhängiges Bestimmungsverfahren bestätigt. Laboratorien, die solche Zertifikate ausstellen dürfen, werden wiederum einer ständigen Qualitätskontrolle unterzogen. Auf dem Zertifikat ist außerdem die Homogenität des Referenzmaterials verzeichnet. Sie gibt an, bis zu welcher Mindesteinwaage die zertifizierten Merkmalswerte gültig sind. Referenzmaterialien gibt es in verschiedenen Bereichen (z.B. Arznei- und Lebensmittelindustrie). Außer zur Kalibrierung von Messgeräten werden Referenzmaterialien auch für Vergleichsmessungen zwischen verschiedenen Laboratorien (Ringanalyse) und zur Ausbildung in analytischer Chemie genutzt. Sie werden sowohl von privaten Produzenten und Vertriebsfirmen als auch von Staatsinstituten angeboten.

3.2.5.4. Nanodiagnostik

Unter Nanodiagnostik versteht man den Einsatz von Nanomaterialien zur Erkennung von Krankheiten.^[91,92] Einen Überblick über den gegenwärtigen und möglichen zukünftigen Einsatz der Nanotechnologie in der medizinischen Analytik verschafft die Übersichtsarbeit von Jain aus dem Jahr 2005.^[93] Wichtige Einsatzgebiete der Nanodiagnostik sind die Immunhistochemie, die Genotypisierung sowie die Detektion von Biomarkern und infektiösen Mikroorganismen. Ein simultanes Messen verschiedener Analytmoleküle (Multiplexing) ist möglich.^[94] Das Nachweisprinzip ist in allen Fällen ähnlich: Durch die Bindung des Analyten an den Antikörper, der auf einer Trägeroberfläche fixiert ist, werden die Oberflächeneigenschaften verändert.^[95] Diese Veränderung wird messtechnisch erfasst.

Für die klinisch-chemische Analytik sind besonders biofunktionalisierte Nanopartikel, z.B. aus Gold und dessen Legierungen, Quantenpunkte (QDs), magnetische Nanopartikel und nanomechanische Federbalken-Sensoren (cantilever arrays) von Interesse.

3.2.5.4.1. Goldnanopartikel

Sphärische Goldnanopartikel, die zum Teil auch mit Silber oder Kupfer legiert sind, eignen sich zum gleichzeitigen Nachweis verschiedener Proteine oder DNA-Moleküle (Multiplexing, Multi-Analyst-Verfahren) in Lösung oder an einer festen Phase unter Verwendung einer modifizierten Schwingungs-Raman-Spektroskopie.^[96] Die Goldnanopartikel sind hierbei mit einer selbstorganisierten Monoschicht (self-assembled monolayer, SAM) eines Raman-aktiven Farbstoffes bedeckt. Diese Kombination führt zu einer Steigerung der in der Bioanalytik nötigen Empfindlichkeit (oberflächenverstärkte Raman-Streuung, surface-enhanced raman scattering, SERS).^[97,98] An den Raman-aktiven Farbstoff wird zusätzlich ein Antikörper konjugiert. Dadurch entsteht ein biofunktionalisiertes Nanopartikel (Goldnanopartikel + Raman-aktiver Farbstoff + Antikörper), in

diesem speziellen Fall (in Anlehnung an die Markierungsart) auch als SERS-markierter Antikörper bezeichnet (vgl. radioaktiv oder fluorochrom markierte Antikörper).^[99] Bei Vorliegen des entsprechenden Antigens z.B. auf einem histologischen Schnittpräparat kommt es zur Immunkomplexbildung und damit zur Fixierung des biofunktionalisierten Goldnanopartikels. Nach der Aufbereitung kann die Messung durchgeführt werden. Das Prinzip dieser Methode ist ähnlich zur Markierungstechnik in der Fluoreszenzspektroskopie. Die Signale der Markermoleküle sind jedoch weniger zahlreich und bis zu ca. 100-mal schmäler als die von Fluorophoren, sodass es bei Kombination geeigneter Raman-aktiver Farbstoffe zu keiner spektralen Überlagerung kommt und damit eine parallele Durchführung mehrerer Messungen möglich ist.^[93]

3.2.5.4.2. Quantenpunkte

Bei Quantenpunkten handelt es sich um wenige Nanometer große Halbleiterkristalle.^[100,101] Sie verhalten sich wegen ihrer Größe weder wie Einzelmoleküle noch wie Volumenmaterialien. Ihre Zusammensetzung, z.B. CdSe/ZnS, und Größe verleihen den QDs ihre Eigenschaften. Durch Variationen von Größe und Zusammensetzung lassen sich Absorptions- und Emissionswellenlängen verändern.^[102] Im Unterschied zu anderen anorganischen und organischen fluoreszierenden Verbindungen zeichnen sich QDs durch ihre Helligkeit, das symmetrische Emissionsspektrum, die Farbstabilität und die Vielzahl an auflösbaren Farben aus, die durch eine einzige Wellenlänge gleichzeitig angeregt werden können. Eine weitere einzigartige photophysikalische Eigenschaft dieser Halbleiternanopartikel besteht darin, dass durch Modifikation ihrer Größe die Absorptions- und auch die Emissionswellenlänge wegen des Größenquantisierungseffekts (quantum confinement effect) zu jedem gewünschten Wert verändert werden kann.^[103]

3.2.5.4.3. Magnetische Nanopartikel

Magnetische Nanopartikel sind mit Antikörpern beschichtet und werden mit der Probe inkubiert.^[104] Der Analyt nachweis kann in flüssiger homogener Phase oder in einer festen Phase erfolgen, z.B. einem histologischen Organschnitt, in dem Tumorzellen gesucht werden. Bei Vorhandensein des Zielanalyten kommt es zur Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes, wodurch sich das extern angelegte Magnetfeld verändert. Diese Veränderung kann gemessen werden. Alternativ werden auch magnetische Relaxationsmessungen durchgeführt. Außer bei der In-vitro-Diagnostik werden magnetische Nanopartikel auch bei In-vivo-Untersuchungen und -Therapieschemata eingesetzt.^[105,106]

3.2.5.4.4. Nanomechanische Federbalken-Sensoren

Die Oberfläche eines Federbalkens (Cantilever) ist beschichtet mit DNA oder Antikörpern, die den Zielanalyten binden können. Der elastisch biegsame Federbalken ist auf einem Chip befestigt, der jede Auslenkung aufzeichnet. Ist der gesuchte Analyt in der Probe, kommt es zur Auslenkung,

die proportional zur Konzentration ist. Durch parallele Anordnung mehrerer Analyt-spezifischer Federbalken ist es möglich, gleichzeitig verschiedene Analyte zu quantifizieren.^[107]

3.2.5.5. Systembiologie

Der Mensch hat 30000–40000 Gene, die jeweils für ein Protein kodieren. Diese Zahl ist sehr groß, unüberschaubar sind jedoch die biochemischen Reaktionen, die durch diese Proteine ausgelöst werden. Die Systembiologie untersucht das Verhalten und die Wechselwirkungen aller Elemente in einem bestimmten biologischen System.^[108] In diesem interdisziplinären Bereich, der die Naturwissenschaften, die Mathematik und die Informatik umfasst, stehen nicht Untersuchungen einzelner Gene oder Proteine im Vordergrund, sondern das Verhalten und die Wechselwirkungen aller Komponenten eines Systems. Aus Daten über biologische Systeme oder auch der Physiologie des Menschen (gewonnen z.B. aus der Genomik, Transkriptomik, Lipomik, Proteomik, Metabolomik oder Glycomik („Omics“-Techniken) und anderen Untersuchungen) werden mathematische Modelle erstellt. Mithilfe dieser Modelle werden Hypothesen zu Systemeigenschaften und -verhalten abgeleitet.^[109] Dies kann am Computer („*in silico*“) und *in vitro/in vivo* geschehen.

Ergänzend hierzu werden zunehmend Ergebnisse (Biomarker) aus den Omics-Techniken und den Genom-Assoziationsstudien zu Volkskrankheiten zum Nutzen der Prävention und Effizienzverbesserung in der Labordiagnostik diskutiert. Im Rahmen dieser Untersuchungen gefundene Biomarker finden in vier klinischen Bereichen Verwendung:

- Screening auf präklinische Erkrankungen bei asymptatischen Personen
- differentialdiagnostischer Stellenwert bei Patienten mit bestehender Symptomatik
- Risikostratifizierung von Patienten mit klinisch manifesten Erkrankungen
- Unterstützung bei der Auswahl und Steuerung der Therapie

Aus den aufgeführten Punkten kann entnommen werden, dass nur wenige Biomarker tatsächlich den klinischen Ansprüchen genügen und Einzug in Routinetests finden.^[110]

3.2.6. Forschungen zu etablierten Methoden und Implementierung von Messmethoden aus der Chemie

Gegenstand aktueller Untersuchungen ist es, störungsunempfindliche quantitative Bestimmungsmethoden zu entwickeln sowie Methoden der chemischen Analytik auf ihre Verwendung in der klinischen Chemie zu prüfen und sie eventuell zu implementieren.

Die Robustheit von Immunassays kann durch Verwendung neuer Antikörper und die Veränderung der Matrix des Testsystems verbessert werden.^[111–117] Bei der Probenvorbereitung können chromatographische Säulen zur Abtrennung von Störsubstanzen verwendet werden. Die Zellanalytik mithilfe der Durchflusszytometrie wird durch Einführung

neuer Marker im Rahmen der Leukämiediagnostik, der Untersuchung von Stamm- und Vorläuferzellen sowie der Detektion pathologischer Mikroorganismen im Blut erweitert.^[118–120]

3.2.6.1. LC-MS/MS

Etablierte, jedoch relativ teure Testsysteme, wie Immunoassays, werden auf neue Plattformen, z.B. LC-MS/MS, übertragen.^[121–123] Im Bereich der Arzneimittelanalytik werden allein am Universitätsklinikum München dadurch Labor-kosteneinsparungen von mehreren 100000 Euro pro Jahr möglich. Für die Etablierung einer neuen Plattform müssen allerdings zunächst die Messbedingungen erforscht und in einem zweiten Schritt die Probenvorbereitungsschritte definiert werden; zum Schluss muss die Methode routinetauglich für einen Dauereinsatz gemacht werden. Viele chromatographische Untersuchungsmethoden scheitern, weil die Messzeit 15 min übersteigt, da es dann nicht mehr möglich ist, hohe Anforderungszahlen in einem adäquaten Zeitrahmen abzuarbeiten. Des Weiteren ist die Eingliederung eines neuen Analysenprinzips in die Routinediagnostik bei Parametern, die über 24 h verfügbar sein müssen, nicht leicht, da das Personal eine zusätzliche Methode mit ihren Fehleranfälligkeit erlernen muss. Als problematisch erweist sich auch die manuelle Probenaufbereitung. Zum einen ist dies personal-intensiv, zum anderen steigt die Gefahr von Probenverwechslungen.^[124,125] Eine Automatisierung ist deshalb wünschenswert. Ein möglicher Ansatz ist die Verwendung von funktionalisierten ferromagnetischen Mikropartikeln sowie eine automatisierte Plasmaprotein-Präzipitation.^[126–128]

3.2.6.2. NMR-Spektroskopie

Der routinemäßige Einsatz der NMR-Spektroskopie ist noch nicht vollzogen.^[129] Im Rahmen der Lipidanalytik soll sowohl die Differenzierung der Cholesterinfaktionen HDL-, LDL- und VLDL-Cholesterin als auch eine Unterteilung des LDL-Cholesterins in weitere Subgruppen erfolgen, die eine besondere atherogene Potenz aufweisen.^[130] Ziel ist es, den Arbeitsaufwand der aktuell durchgeführten Ultrazentrifugation zu reduzieren. Ein weiteres mögliches Einsatzgebiet ist die frühzeitige Aufklärung von Stoffwechselerkrankungen und die Erforschung von Stoffwechselschritten.^[131–135]

3.2.7. Neue Analyseparameter und Grundlagen der Zellphysiologie

Forschungsschwerpunkte sind z.B. die Durchführung klinischer Studien oder die Aufklärung von physiologischen und pathologischen Mechanismen auf molekularer Ebene. Wegen der Vielfalt der Gebiete können hier nur einzelne Bereiche skizziert werden.

Die MALDI-TOF-MS findet ihren Einsatz im Rahmen der Protein- und Lipidanalytik (Proteomanalytik),^[136–138] der posttranslationalen Glycosylierung von Proteinen^[139] und der Suche nach neuen Biomarkern.^[140–146] Die MALDI-TOF-MS wird zunehmend in der Mikrobiologie zur Identifizierung von Bakterien, Viren und Pilzen eingesetzt. Das Verfahren

zeichnet sich durch einen minimalen Einsatz an Verbrauchsmaterial sowie eine schnelle und einfache Probenvorbereitung aus. Im Unterschied zur biochemischen Differenzierung entfällt die Voreingruppierung (z.B. Gram-positiv/Gram-negativ; Enterobacteriaceae/Non-Enterobacteriaceae). Eine Inkubation der Keime mit Substraten wie bei der biochemischen Differenzierung entfällt, sodass der Zeitaufwand für eine einzelne Differenzierung höchstens zwei Minuten beträgt. Die Speziesidentifizierung über das erhaltene Massenspektrum erfolgt anhand von Spektrendatenbanken.^[147,148]

Nucleosomen beispielsweise, bestehend aus einem Histon-Octamer und DNA, die in etwa zwei Windungen um das Histon-Octamer gewickelt ist, fungieren als Marker für Zelldestruktion.^[149] Die Zelldestruktion kann eine Vielzahl von Ursachen haben, z.B. traumatische Ereignisse, eine Sepsis, einen Apoplex und verschiedene Tumoren (wie das kleinzellige Lungenkarzinom) und deren Therapiemonitoring bei einer Chemotherapie.^[150] Auch das Ausmaß der DNA-Methylierung bei verschiedenen Tumorerkrankungen als prognostischer Biomarker ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.^[151–154] Methyltransferasen methylieren Cytosin an bestimmten Stellen im Genom unter Bildung von Methylcytosin. Die Methylierung hat Konsequenzen für die Regulierung der Genexpression. Methylierte Cytosinbasen in der Promotorregion eines Gens führen zu seiner Inaktivierung. Es konnte gezeigt werden, dass eine aberrante DNA-Methylierung verschiedener Promotorregionen eine Eigenschaft humaner Tumoren ist und dass diese Methylierung mit dem Krankheitsprozess assoziiert ist.^[155–157]

Zellphysiologisch werden Struktur, Funktion, molekulare Mechanismen und Marker der Signaltransduktion, der Zellproliferation und -differenzierung, der Zellmigration sowie der Zelladhäsion erforscht.^[158] Stichwörter in diesem Zusammenhang sind z.B. Zytokine wie die koloniestimulierenden Faktoren, Interferone, Interleukine, Tumornekrosefaktoren, Chemokine, Cadherine, Catenine, Integrine, Selektine, Proteoglycane, Mucine und die Immunglobulin-Supergen-Familie (wie die cellular adhesion molecules, CAMs).^[159–165]

Besondere klinische Relevanz hat die Aufklärung der molekularen Mechanismen und Marker der Sepsis, der spezifischen und unspezifischen Abwehrreaktion sowie der Entzündungskaskade und, in diesem Zusammenhang, der Rolle der Zytokine.^[166–170]

Im Rahmen der molekularen Untersuchung von Wohlstands-krankheiten werden die Entwicklung einer Diabetes mellitus und der Atherosklerose (Lipidmetabolismus; Rolle des Lipoprotein(a)) erforscht.^[171–173] Ebenfalls auf molekularer Ebene wird der Knochenstoffwechsel untersucht, besonders vor dem Hintergrund der Osteoporose.^[174–176]

Im Mittelpunkt der Forschung stehen der Einfluss genetischer Komponenten auf die Entwicklung und das Ausmaß einer Krankheit sowie das Ansprechen auf eine Therapie. Das simultane Messen^[177] einer Vielzahl verschiedenster Gene soll mithilfe von DNA-Chips/Mikroarrays erfolgen.^[178–183]

3.3. Weiterentwicklung der labormedizinischen Methodik

Die Zukunftsprognosen sind zum Teil einfach Schätzungen und Meinungen. So wurde der Molekulardiagnostik in den 1980er und Anfang der 1990er eine große Zukunft vorausgesagt.^[184] In der heutigen Routinediagnostik ist ihr Stellenwert und Umsatz allerdings noch von untergeordneter Bedeutung. Durch die Einführung von Laborstraßen gilt der Höhepunkt der Automation als erreicht. Dabei wird ein Maximum an Effizienzsteigerung bei gleichzeitig geringer Personalbindung erzielt. Indirekt wird dadurch eine Zentralisierung der Laborleistungen erwirkt, wodurch Transportzeiten verlängert werden und keine Vor-Ort-Präsenz mehr gegeben ist. Bei akuten Krankheitsbildern dauert es oftmals zu lange, bis das Laborergebnis vorliegt. Das modulare Konzept eines handlichen Auslesegerätes und einer austauschbaren Multisensorkassette ermöglicht die Anpassung an verschiedene Analytportfolios, wie kardiale Marker, Drogen, Allergene oder Hormone. Vor diesem Hintergrund ist mit einer zunehmenden Verbreitung von POCT-Geräten zu rechnen.

Die technischen Hoffnungsträger sind der Trend zur Miniaturisierung (Lab-on-a-Chip), Parallelisierung (Multiplextechnik: Biochip, MS, Pyrosequenzierung), zellulären Analytik (FISH, FACS) und Massendatenauswertung (Bioinformatik). Weiterentwicklungen in der medizinischen Analytik werden deshalb von der Mikrotechnik beeinflusst.

Dank Fortschritten in der Mikrofluidik, der Chip-Technologie und elektronischen Detektionsverfahren ist es nunmehr möglich, in einer Probe mit wenigen Mikrolitern DNA oder RNA zu messen. Strukturen dieser Systeme haben eine Größe von wenigen Mikrometern. Auch Immunassays und elektrophoretische Analysen für Proteine können mit Mikrototalanalysensystemen (micro total analysis systems, μ -TASs) durchgeführt werden. Der Ausdruck μ -TAS wurde 1990 von Wissenschaftlern der Ciba-Geigy AG geprägt.^[185] Hierunter versteht man Messgeräte, die alle zur chemischen Analyse einer Substanz nötigen Schritte automatisiert durchführen (z.B. Trennungen, Filtrationsschritte, Verdünnungen und Auswertungen).

Komplette μ -TASs sind auch heute, nach fast 20 Jahren Entwicklung, noch rar. Die Gründe hierfür liegen zum einen in der technischen Komplexität einer Integration von verschiedenen Funktionalitäten in ein einziges automatisiertes, schnelles, robustes und verlässliches System, das die nötige Empfindlichkeit aufweist, zum anderen aber auch in der noch fehlenden Akzeptanz der Anwender.^[185]

Ein wichtiger Aspekt der Miniatlurlaboratorien ist der geringe Flüssigkeitseinsatz im Nano- und Pikoliterbereich. Außer der Senkung des Reagenzienverbrauchs sind auch eine Zeitsparnis bei der Temperierung und ein schnelleres Mischen möglich; somit sinkt die Analyzendauer. Dauern beispielsweise DNA-Amplifikationen durch PCR im Mikrolitermaßstab Minuten, so sind es im Chip-Labor nur noch Sekunden.^[186] Ein weiterer Fortschritt bei der DNA-Sequenzierung ist die Pyrosequenzierung. Diese nutzt, ähnlich wie die Sanger-Sequenzierung, die DNA-Polymerase zur DNA-Synthese. Dabei kommt es zur enzymatischen Abspaltung von Pyrophosphat aus den Desoxynucleosidtriphosphaten

(dNTPs: dATP, dGTP, dCTP, dTTP). Das freigesetzte Pyrophosphat wird in einer Folgereaktion unter Beteiligung von Lumiferase so umgesetzt, dass ein Biolumineszenzsignal entsteht, das gemessen werden kann. Ausgehend von einem Primer erfolgt die DNA-Strangverlängerung Nucleotid um Nucleotid durch kontrollierte Zugabe der einzelnen dNTPs. Bei Zugabe des passenden, d.h. zur Matrize komplementären Nucleotids erhält man das Lumineszenzsignal, bei den nicht passenden dNTPs bleibt das Lichtsignal aus. Überschüssiges dNTP wird schnell aus der Lösung entfernt, damit es zu keiner Vermischung der Signale kommt. Bei gleichzeitigem Einbau mehrerer gleicher Nucleotide hintereinander erhält man ein zur Nucleotidzahl proportional stärkeres Lichtsignal. Die Möglichkeit der quantitativen Auswertung von Signalen ist eine der Stärken der Pyrosequenzierung. Sie wird zur Bestimmung der Häufigkeit von Einzelnucleotidpolymorphismen (single nucleotide polymorphisms, SNPs), beispielsweise bei der Untersuchung von Erbkrankheiten und verbunden damit auch in der personalisierten Medizin, eingesetzt. Die Pyrosequenzierung ist gut automatisierbar und eignet sich zur parallelen Analyse von DNA.^[187]

Außer den technischen Änderungen der Analysengeräte werden auch Änderungen im Analytpektrum, also im medizinischen Bereich, hinzukommen, die sich an die sozioökonomische Struktur des Landes und damit an Volkskrankheiten anpassen werden. So werden in der klassischen Analytik die prädiktive Diagnostik und Früherkennung (vor allem Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Diabetes mellitus, Osteoporose, Demenz, Krebs), die individualisierte Medizin (Theragnostik) sowie die personalisierte Medizin einen hohen Stellenwert einnehmen. Herausforderungen sind hierbei natürlich die Entdeckung relevanter Krebsfrühstadien, die Erkennung von diagnostisch und/oder therapeutisch nützlichen Mustern und die Entwicklung klinisch aussagekräftiger Indizes, die für die Erkennung und Präzisierung des Risikos wissenschaftlich gesichert sind. Daneben fließen wissenschaftlich validierte Kalkulatoren (Risikorechner aus biografischen Daten der Patienten) ein, um auf dieser Basis das jeweilige Erkrankungsrisiko zu berechnen (z.B. das relative Risiko, die jeweilige Enderkrankung innerhalb der nächsten zwei Jahre zu entwickeln).

Die parallele Analyse von mehreren Parametern wird vor allem bei unspezifischen Krankheitssymptomen (z.B. Müdigkeit, Erkältungsgefühl, Erbrechen, ...) einen wichtigen Stellenwert in der Differentialdiagnose (z.B. einfache Erkältung gegenüber maligner Erkrankung) einnehmen. So wurde von der US-amerikanischen Zulassungsbehörde FDA eine Paralleltest zugelassen, der gleichzeitig zwölf verschiedene virale Erreger von Atemwegsinfektionen nachweisen kann. Ein anderer Anbieter stellte einen immunologischen Schnelltest vor, mit dem sich simultan Anthrax, Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB), Ricin, Yersinia pestis und Botulinum-Toxin, die wichtigsten Vertreter des „dirty dozen“ nachweisen lassen, was sowohl beim Katastrophenschutz als auch militärisch von Interesse ist. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass dieser Test die NATO Standard Agreements 4571 erfüllt, was z.B. bedeutet, dass er in einem weiten Temperaturbereich (Umgebungstemperatur zwischen 4 und 49 °C) verlässlich arbeiten muss.^[188,189]

Eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit einzelner Analyte sowie eine Parallelmessung mehrerer Parameter werden auch durch die Nanodiagnostik möglich werden. Wie bereits erwähnt, konzentrieren sich Forschung und industrielle Entwicklung auf Goldnanopartikel. Dies hat mehrere Gründe: Gold eignet sich für klinisch-chemische Untersuchungen wegen seiner optischen Eigenschaften, seiner chemischen Robustheit sowie der Möglichkeit einer Funktionalisierung mit Liganden über Thiolbindungen (DNA, Proteine, Antikörper). Es hat sich gezeigt, dass auf diese Weise DNA und Proteine äußerst empfindlich nachgewiesen werden können. So lässt sich DNA in einer Konzentration von 23 pm detektieren.^[190] Durch verschiedene Antikörper-Oberflächenbeschichtungen ist ein gleichzeitiges Messen von mehreren Analyten möglich, wodurch Screenings auf Volkskrankheiten oder Untersuchungen auf chronische Erkrankungen möglich sind.^[191,192] Im Rahmen der Nanodiagnostik werden die Bereiche Nanochips/Lab-on-a-Chip/Mikroarrays, Mikrofluidik, Nanopartikel sowie mikroelektromechanische Systeme (MEMS; z.B. tabletengroße Kameras) subsumiert.

Speziell bei der unmittelbaren Patientenversorgung auf Intensivstationen spielen kurzfristig implantierbare In-vivo-Diagnosesysteme eine zunehmende Rolle. Dabei handelt es sich um Sensoren, die in ein Gefäß implantiert werden, um permanent z.B. den pH-Wert, den Blutglucosewert, die Temperatur und den Sauerstoffpartialdruck zu messen.^[193,194] Eine Weiterentwicklung sind implantierbare, langzeitstabile und in vivo rekalibrierbare Messsysteme z.B. für die permanente Glucosebestimmung bei Diabetikern.^[195] Eine weitere Anwendung von Biosensoren ist die In-vivo-Dosisbestimmung in der Strahlentherapie mit faseroptischen Sensorsystemen, die ohne elektrische Stromzufuhr auskommen. Derartige Systeme ermöglichen eine therapiebegleitende lokale Überwachung der Strahlendosis am Tumor, im umliegenden Gewebe oder an benachbarten Organen.^[196]

Nicht nur apparative und diagnostische Veränderungen sind zu erwarten, es wird auch zur Zusammenfassung von Fachkompetenzen aus Labormedizin, Mikrobiologie/Infektionsepidiologie, Transfusionsmedizin, Humangenetik, Hygiene und Pathologie kommen. Im Rahmen diagnostischer Expertensysteme, neuronaler Netzwerke, wissensbasierter Diagnostiksysteme und elektronischer Differenzierungswerzeuge können Einzelbefunde anders beurteilt werden und individualisiert interpretiert werden. Die präventive Laboratoriumsdiagnostik birgt für den Einzelnen große Vorteile, wenn durch biochemische Marker Risiken bereits erkannt werden, bevor klinische oder organische Befunde auftreten, und so die Therapie frühzeitig eingeleitet werden kann.^[197,198]

Wann kann man nun von einem Wechsel zu einer neuen Systemgeneration sprechen? Die 0. Generation enthielt keine Automation, d.h., es handelte sich um manuelle Methoden, so genannte „Reagenzglassysteme“. Der Wechsel zur 1. Generation begann in Deutschland ab 1950; diese Generation war technologiegetrieben und geprägt von einer Mechanisierung der Geräte und Konfektionierung der Reagenzien (Standardisierung) sowie einer parameterweisen Probenverarbeitung. Die 2. Generation kam ab 1975 und war applikationsgetrieben; d.h., es gab Analysensysteme mit

konfektionierten Reagenzien, sowie einer Softwaresteuerung. Eine selektive Probenverarbeitung war möglich. Die 3. Generation kam ab 2000 und war effizienzgetrieben (Integration des Laborsystems auf einer Plattform mit einer „intelligenten“ Probenverarbeitung auf einer Laborstraße, Integration von Prä- und Postanalytik). Die 4. Generation wird wieder technologiegetrieben sein; Miniaturisierung und Parallelisierung der Analysentechniken sowie zunehmende IT-Vernetzung sind die Charakteristika. Wann jedoch die 4. Generation an Laborsystemen kommen wird, ist unklar, Schätzungen datieren die beginnende Einführung auf das Jahr 2025.^[199]

Miniaturisierte Produkte, deren Realisierung ohne Mikrotechnik nicht möglich ist, befinden sich heute bereits auf dem Markt, im klinischen Test oder stehen kurz vor der Markteinführung. Der Einsatz der Mikrotechnik in der Medizin kann nur dann als erfolgreich gewertet werden, wenn die neuen Produkte zu einer nachhaltigen Effizienzsteigerung der Patientenversorgung beitragen, d.h., entscheidend wird dabei immer der klinische Nutzen sein.

3.4. Postanalytische Phase

3.4.1. Allgemeines

Die postanalytische Phase oder Postanalytik umfasst eine analytische und medizinische Bewertung des Analysenergebnisses und den definitiven Befund.^[200] Der Befund ist die rechtsgültige Ergebnisübermittlung analytisch und medizinisch freigegebener Messwerte nach technischer und medizinischer Validierung (Longitudinal- und Transversalvergleich, Plausibilitätskontrolle). Die technische Validierung erfolgt durch die am Gerät arbeitende Person oder durch ein Qualitätskontrollprogramm, die medizinische Validierung erfolgt unter Berücksichtigung aller klinisch relevanten Daten. Der Befund muss Datum und Uhrzeit der Probeneingabe, des Probeneingangs und der Befundausgabe enthalten. Weiterhin müssen die Identifikation (Patient, Einsender, Labor, Verantwortlicher der Freigabe), die Art des Untersuchungsmaterials, die Bezeichnung der Untersuchung, die Ergebnisse mit Einheiten und die Referenzbereiche zur Interpretation dokumentiert sein.

Die Interpretation, Einordnung und Beurteilung der klinischen Relevanz von Analysenergebnissen zu einem Krankheitsbild setzt außer fundierten Kenntnissen in der Pathobiochemie, der Analytik (analytische Empfindlichkeit und Spezifität, Präzision, Störfaktoren der Untersuchungsmethoden) sowie der diagnostischen Charakteristika (physiologische Streuung, Einflussgrößen, diagnostische Empfindlichkeit und Spezifität, prädiktiver Wert) der untersuchten Messgröße auch die Anamnese des Patienten und seiner Beschwerden voraus.^[201] Differentialdiagnostische Beurteilungen aus Sicht des Labors sollten ebenfalls aufgezeigt werden. Der behandelnde Arzt entscheidet dann im Kontext mit z.B. radiologischen Befunden und Ergebnissen der Funktionsdiagnostik.^[202,203]

Die Befundübermittlung erfolgt in Absprache mit dem Einsender als gedruckter Befund mit Zustellung per Fahrdienst, per Post, per Fax oder elektronisch per Datenfernübermittlung oder HTML. Kombinationen sind möglich. Bei

entsprechender Kennzeichnung auf der Untersuchungsanforderung kann vorab eine telefonische oder Fax-Mitteilung erfolgen. Bei länger dauernden Untersuchungen wird ein Teilbefund erstellt, auf den ein Endbefund mit allen angeforderten Untersuchungen folgt. So genannte Korrekturbefunde mit Hinweis auf den berichtigten Befund erfolgen, falls infolge interner Kontrollen oder einer Nachfrage eine Korrektur erforderlich wurde. Ergänzungen werden üblicherweise mit entsprechendem Zusatz am endgültigen Befund versehen.

Kritische Laborergebnisse werden gemäß Extremwertlisten (diesbezüglich sind individuelle Absprachen mit den Einsendern möglich) auch ohne spezielle Kennzeichnung dem behandelnden Arzt sofort telefonisch oder per Fax mitgeteilt, z.B. deutlich erhöhte oder erniedrigte Kaliumspiegel, Hormonkontrollen in der Schwangerschaft oder Überwachung einer Fertilitätstherapie.

Je nach Vereinbarung zwischen Einsender und Analysenlabor kann man verschiedene Befundarten unterscheiden. Nachfolgend werden die Wichtigsten erläutert:

Kumulativbefund: Dieser fasst mehrere Aufträge auf einem Blatt zusammen. Die Messgrößen sind dabei so angeordnet, dass die Werte einer Messgröße von verschiedenen Probenentnahm-Zeitpunkten in einer Zeile stehen. Grundlage für die Zuordnung und Zusammenfassung von Aufträgen auf einem Kumulativbefund ist die lebenslang gültige Identifikationsnummer des Patientenverwaltungssystems. Der Kumulativbefund ist der obligatorische Befund. Eine Variante hiervon ist der XML-Kumulativbefund. Er fasst elektronische Einzelbefunde zusammen und gibt sie in Tabellenform aus. Der Anwender kann den Zeitraum und den Inhalt individuell anpassen. Hier ist zusätzlich die Anzeige von Verlaufsgrafiken möglich.

Ausführlicher Befund/Einzelbefund: Die Ergebnisse nur eines Auftrages, häufig mit einer Voruntersuchung des Patienten, sind so dargestellt, dass die Messgrößenbezeichnungen vollständig ausgeschrieben sind, um Einsendern die Interpretation zu erleichtern. Eine weitere Individualisierung durch entsprechende Befundinterpretation ist möglich.

Etikettenbefund: Der Etikettenbefund bringt die Ergebnisse mit den zugehörigen Einheiten eines Auftrags auf einem oder mehreren Etiketten zum Ausdruck. Er dient dem Einkleben der Laborwerte in die Patientenübersichten der Stationen.

HTML-Onlinebefund: Er steht in der Regel nur Einsendern aus dem Klinikum zur Verfügung und stellt die zeitnahe Übermittlung von Ergebnissen für die Patientenversorgung sicher. Es handelt sich dabei um einen elektronischen Befund, der am PC des Einsenders abrufbar ist. Jeder Zugriffsberechtigte hat sich auf eine vom Datenschutzbeauftragten des Klinikums vorgegebene Datenschutzerklärung zu verpflichten.

Vom Laborbefund ist der Laborbericht zu differenzieren. Beim Laborbericht handelt es sich um ärztlich interpretierte Messwerte, wohingegen der Befund eine reine Messwertübermittlung darstellt, gegebenenfalls mit Hinweisen wie „Probe hämolytisch“.

Alle Untersuchungsergebnisse werden unter den Patientenstammdaten und den Laborauftragsnummern elektronisch

dokumentiert, für zehn Jahre gespeichert und können jederzeit abgerufen werden. Die angegebenen Referenzbereiche, die zur Ergebnisinterpretation notwendig sind, richten sich nach den Angaben des Herstellers und der jeweils aktuellen Studien- und Literaturlage.

Der letzte Vorgang der Probenbearbeitung ist deren Entsorgung nach den landesspezifischen Rechtsvorschriften.

3.4.2. Bestimmung des Referenzbereichs für den einzelnen Parameter

Referenzbereiche sind der Ausdruck der interindividuellen Variabilität.^[204,205] Sie werden von der Bestimmungsmethode und präanalytischen Faktoren, wie Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht, zirkadiane Rhythmus und Ernährungsgewohnheiten des Probanden, beeinflusst. Nach DIN EN ISO 15189 sollen Referenzbereiche dem aktuellen Kenntnisstand angepasst werden.^[206] Prinzipiell ist es wichtig, eine physiologische Streuung eines Parameters, wie bei Gesunden vorkommend, von pathologischen Werten, wie im Erkrankungsfalle vorkommend, abzugrenzen.^[207] Deshalb müssen Parameter/Biomarker auf ihre Spezifität zur Erkennung einer Erkrankung überprüft werden, z.B. bei Einführung und Interpretation von neuen Tumormarkern. Dabei handelt es sich um Proteine, Peptide oder andere Substanzen, die bei der Entstehung und dem Wachstum von malignen Tumoren entweder von den entarteten Zellen selbst gebildet werden oder vom gesunden Gewebe als Reaktion auf das Wachstum des Tumors sezerniert werden. Tumormarker können auch bei gesunden Personen auftreten. Ziel des Referenzbereiches ist es, ein gesundes von einem kranken Kollektiv zu trennen, d.h., die diagnostische Empfindlichkeit und Spezifität soll jeweils bei 100 % liegen (Abbildung 13).^[208] Unter diagnostischer Empfindlichkeit versteht man die Anzahl der Gesunden bei normalem Testergebnis. Je weniger falsch-negative Ergebnisse erhalten werden, desto empfindlicher ist die Untersuchungsmethode. Die diagnostische Spezifität bezeichnet die Anzahl der Kranken bei pathologischem Testergebnis. Je weniger falsch-positive Ergebnisse gefunden werden, desto spezifischer ist die Untersuchungsmethode.

Zur Ermittlung des Normalbereichs kann immer nur eine Stichprobe der Grundgesamtheit („normale Gesunde“) untersucht werden, der Normalbereich ist daher ein Bereich von Werten, die mit einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit bei Gesunden vorkommen können. Häufig ist das Normalkollektiv schlecht definiert. Es mangelt an Angaben

- zu den Auswahlkriterien
- zur Probennahme (Vorbereitung des Probanden)
- zur Analysenmethode (Zuverlässigkeitsskriterien)
- zur Zahl der untersuchten Personen
- zum Auswerteverfahren

Dies soll anhand von zwei Beispielen erläutert werden. Besonderer Sorgfalt bedarf die Interpretation des prostata-spezifischen Antigens (PSA), da das Messergebnis von vielen Faktoren beeinflusst wird.^[209,210] Einer dieser Faktoren ist die Messmethode.^[211] Über 80 verschiedene Testmethoden stehen weltweit zur Gesamt-PSA-Bestimmung zur Verfügung. Deshalb ist es bei Verlaufskontrollen wichtig, dass

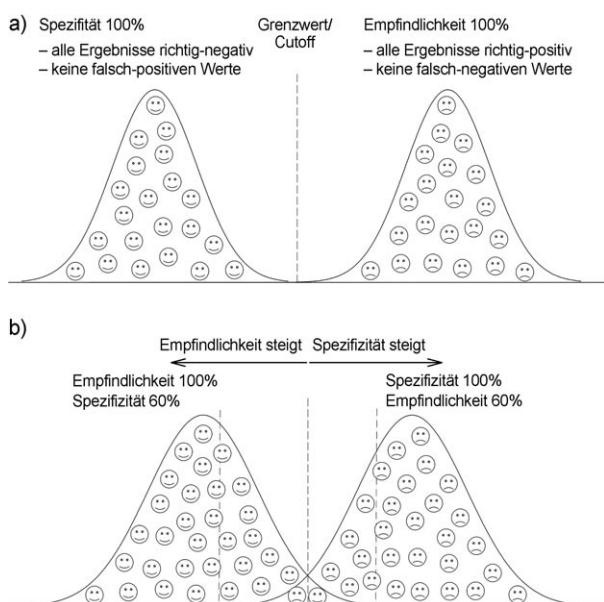


Abbildung 13. a) Idealvorstellung eines Markers: 100% diagnostische Empfindlichkeit, d. h. keine falsch-negativen Ergebnisse und 100% diagnostische Spezifität, d. h. keine falsch-positiven Ergebnisse. Hierdurch ist eine eindeutige Differenzierung zwischen Gesunden und Erkrankten möglich. b) Realer Test: Die Differenzierung zwischen Gesunden und Erkrankten ist nicht eindeutig möglich.

immer die gleiche Bestimmungsmethode verwendet wird.^[212] Einflussfaktoren auf die Höhe des Wertes sind außer dem Lebensalter und der Ethnie auch intensives Fahrradfahren und starke körperliche Aktivität (Gesamt-PSA-Erhöhung jeweils bis zu einer Woche nach Anstrengung nachweisbar), Samenerguss (Gesamt-PSA-Erhöhung bis 48 Stunden danach), akuter Harnverhalt oder Prostatabiopsie (Gesamt-PSA-Erhöhung jeweils bis einen Monat danach). Diese PSA-Erhöhungen müssen vor allem von Erkrankungen der Prostata (Karzinom, Entzündung, Vergrößerung) abgegrenzt werden. Da dies anhand des Gesamt-PSA-Wertes allein häufig sehr schwer ist, wird zusätzlich das freie PSA (fPSA) bestimmt und ein Quotient (fPSA/Gesamt-PSA) gebildet. Starre Grenzwerte werden in solchen Fällen durch ein stufendiagnostisches Vorgehen ersetzt. Bei einer erhöhten Gesamt-PSA-Konzentration kann die Bestimmung des fPSA folgen. Patienten mit einem Prostatakarzinom weisen häufig niedrigere prozentuale Anteile des fPSA auf als Patienten mit einer benignen Prostatahyperplasie.^[213] Wegen der Variabilität eines Biomarkers, z. B. des PSA bei der Diagnostik des Prostatakarzinoms, können additiv weitere Biomarker zur Erhöhung der diagnostischen Empfindlichkeit, wie das prostataspezifische Membranantigen sowie prostatakarzinom-spezifische Antikörper, herangezogen werden, wobei deren Bedeutung erst durch klinische Studien verifiziert werden muss.^[214]

Natriuretrische Peptide, wie das Brain-natriuretic-Peptid (BNP), werden als Prohormone, d. h. inaktive Vorstufen des Hormons, von Kardiomyozyten bei Erhöhung der Wandspannung des Herzens infolge einer Volumen- und/oder Druckbelastung freigesetzt und sollen die renale Natrium-ausscheidung, und damit eine Wasserausscheidung, fördern.

Jede Volumen- und/oder Druckbelastung führt zu einer Freisetzung von BNP, qualitative und quantitative Unterschiede geben Hinweise auf die Ursache.^[215,216] Durch weitere Parameter, z. B. die Bestimmung von Troponin, kann festgelegt werden, ob der Sekretion von BNP eine kardiale Ursache, oder, bei erhöhtem Kreatinin, eine renale Ursache zu grunde liegt.

Um einen Referenzbereich eines Parameters festzulegen, werden definitionsgemäß nur 95 % der Analysenergebnisse (dieses Parameters) von Probanden mit definierter Gesundheit (z. B. aus klinischen oder epidemiologischen Registern/Studien, nationalen oder internationalen Referenzdaten) in das Vertrauensintervall einbezogen. Dieses wird dabei so gewählt, dass jeweils am oberen und am unteren Ende der gemessenen Werte eine Standardabweichung von 2.5 % als Grenze genommen wird. Dieses Vorgehen impliziert, dass 2.5 % aller Gesunden einen erhöhten und 2.5 % einen erniedrigten, für sie jedoch physiologischen Messwert aufweisen. Somit sind 5 % der gesunden Probanden außerhalb des Messbereichs und würden fälschlicherweise als krankhaft eingestuft werden. Deshalb ist die Bestimmung weiterer Parameter sowie das Vorhandensein klinischer Hinweise unabdingbar, um zu einer richtigen Einschätzung und Interpretation der Ergebnisse zu kommen.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Ein zuverlässiger Laborbefund kann nur erhalten werden, wenn in allen drei Teilschritten korrekt gearbeitet wird. Fehler in der Präanalytik sind bis heute die häufigsten Ursachen eines „falschen“ Laborbefundes. Wegen des Kostendrucks im Gesundheitswesen wird seit langem versucht, das Spannungsdreieck „schnell – gut – billig“ in Einklang zu bringen. Bisher lassen sich jedoch nur zwei von diesen Punkten zur Erfüllung seiner Wünsche auswählen. Zahlen des Verbandes der Diagnostikaindustrie zufolge spielen Laboruntersuchungen bei etwa 70 % aller klinischen Diagnosen eine maßgebliche Rolle. Daten aus den USA belegen diese Zahlen: In dortigen Krankenhäusern werden zwischen 70 und 80 % der medizinischen Entscheidungen aufgrund der Laboranalysen getroffen, die mit nur 3–5 % der Kosten in den dortigen Gesundheitssystemen vergleichsweise preiswert sind.

Die alternde Bevölkerung, der veränderte Lebensstil und die hohe Erwartung an eine gute Lebensqualität stellen die Gesundheitssysteme vor eine Herausforderung. Ziel ist es daher, die vorbeugende Diagnostik zu stärken. Hierfür werden z. B. Tests entwickelt, die Zivilisationskrankheiten wie Herz-Kreislauf-, Krebs- und Stoffwechselerkrankungen (vor allem Diabetes mellitus) und Osteoporose vor deren klinischer Manifestation erkennen können. Neue diagnostische Ansätze wie die Nanotechnologie und DNA-Mikroarrays bieten vielversprechende Ansätze für die individualisierte Systembiologie in dieser personalisierten Medizin. Der Nobelpreisträger Richard Phillips Feynman (1918–1988) sagte im Jahr 1959 voraus, dass „*there is plenty of room at the bottom*“^[217] womit er darauf anspielte, dass es noch ungeahnte Möglichkeiten bezüglich der Veränderung von Materie

in allerkleinsten Dimension gebe. Hier wird die Theranostik, ein Neologismus aus Therapie und Diagnostik, weitere Bedeutung erlangen.^[92] Allerdings wird nicht alles, was analytisch und technisch möglich ist, in die Routine einfließen. So müssen z.B. die Raman-Spektroskopie im Rahmen der Diagnostik mit biofunktionalisierten Goldnanopartikeln, die NMR-Spektroskopie und die DNA-Mikroarrays zunächst ihre Überlegenheit gegenüber den Routineverfahren bezüglich analytischer Stabilität, Empfindlichkeit und Spezifität zeigen, und es muss eine Vielzahl an Parametern mit diesen Methoden bestimmbar sein, damit die Investition in das Gerät und die Ausbildung des Anwenderpersonals lohnenswert sind. Zusätzlich müssen neue Parameter und Biomarker ausführlich auf ihre diagnostische Empfindlichkeit und Spezifität geprüft werden. Viele der neuen analytischen Methoden, Ansätze und Biomarker zur Verbesserung der Patientenversorgung müssen sich noch in der Routine bewähren.

Außerdem muss nachgewiesen werden, dass die erhobenen Werte und die daraus gezogenen Konsequenzen die Lebensqualität und -jahre der Patienten erhöhen. Aktuelle Studien zur Früherkennung von Prostatakrebs unter anderem durch eine jährliche PSA-Bestimmung zeigen keinen eindeutigen Nutzen.^[218,219] Keine bessere Heilungschance für die Patienten bringt das Neugeborenen-Urin-Screening auf das Vorliegen eines Neuroblastoms (maligne Neubildung des sympathischen Nervengewebes),^[220,221] wohingegen ein Neugeborenen-Screening aus Fersenblut auf angeborene Stoffwechselerkrankungen (z.B. Phenylketonurie, Hypothyreose) ein Gewinn für die Patienten ist.^[222,223] Gegenstand aktueller Diskussion ist der Ausbau des Neugeborenen-Screenings auf 21 Stoffwechselerkrankungen mithilfe von Tandem-MS.^[224]

Ein weiterer Schritt, das „Lab-on-a-chip“, bietet die Möglichkeit der Echtzeitbeobachtung einer Vielzahl von Blutparametern oder zellulären Prozessen (optimistische Autoren sprechen von Tausenden).^[225–227] Aus der Vielzahl an Parametern, der schnellen Verfügbarkeit und der einfachen Gewinnung des Messergebnisses ergeben sich neue Probleme, die vor allem für den klinisch behandelnden Arzt wichtig sind. Ein Messwert ist wichtig, aber wie ist dieser zu deuten?^[228] Wie variabel ist ein einzelner Parameter? Wie spezifisch ist eine Veränderung des Parameters? Müssen dann, im Rahmen der personalisierten Medizin, regelmäßig, besonders in der Phase der Gesundheit, Messwerte erhoben werden, um Veränderungen im Krankheitsfall richtig zu deuten? Über all diesen Fragen steht nicht zuletzt auch die Frage der Finanzierbarkeit.

Eingegangen am 22. Juni 2009

Online veröffentlicht am 29. Dezember 2009

- [1] A. F. Fourcroy, *Système des connaissances Chimiques Part 9*, Baudoin, Paris, **1801**.
- [2] M. C. Sanz, P. Lous, *IFCC News Lett.* **1971**, 6, 1.
- [3] B. D. Kahan, *N. Engl. J. Med.* **1981**, 305, 280–281.
- [4] J. Buettner, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **1985**, 23, 797–804.
- [5] L. Rosenfeld, *Clin. Chem.* **2002**, 48, 186–197.
- [6] W. A. Smeaton, *Fourcroy, chemist and revolutionary*, W. Heffer & Sons Ltd, Cambridge, **1962**.

- [7] J. Buettner, *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **1992**, 30, 585–593.
- [8] J. J. Berzelius, *Ann. Philos.* **1814**, 4, 401–409.
- [9] J. L. Gay-Lussac, L. J. Thenard, Recherches physico-chimiques, faites sur la pile, sur la préparation chimique et les propriétés du potassium et du sodium, sur la décomposition de l’acide boracique, sur les acides fluorique, muriatique et muriatique oxygéné, sur l’action chimique de la Lumière, sur l’analyse végétale et animale, Vol. 1, 2, Deterville, Paris, **1811**.
- [10] C. G. Lehmann, *Lehrbuch der physiologischen Chemie*, Bd. 1, 2. Aufl., Engelmann, Leipzig, **1850**.
- [11] A. M. Chesney, *The Johns Hopkins Hospital and the Johns Hopkins University School of Medicine. A chronicle, 1893–1905*, Vol. 2, The John Hopkins Press, Baltimore, **1958**.
- [12] S. Natelson, *Clin. Chem.* **1970**, 16, 258–259.
- [13] J. Buettner, *Ber. Wissenschaftsgesch.* **1957**, 28, 311–322.
- [14] L. T. Skeggs, Jr., *Am. J. Clin. Pathol.* **1957**, 28, 311–322.
- [15] L. T. Skeggs, Jr., *Clin. Chem.* **1956**, 2, 241, Abstract 028.
- [16] R. S. Yalow, S. A. Berson, *J. Clin. Invest.* **1960**, 39, 1157–1175.
- [17] A. Quetelet, Sur l’homme et le développement de ses facultés, ou Essai de physique sociale., Paris, **1835**.
- [18] A. Quetelet, Lettres à S.A.R. le duc Régnant de Saxe-Cobourg et Gotha sur la théorie des probabilités, appliquée aux sciences morales et politiques, Hayez, Bruxelles, **1846**.
- [19] P. Pascal, F. Beyerle, *Pathol. Biol.* **2006**, 54, 317–324.
- [20] M. Elston Dirk, *Clin. Lab. Med.* **2008**, 28, 173–177.
- [21] P. Carraro, M. Plebani, *Clin. Chem.* **2007**, 53, 1338–1342.
- [22] M. J. Alsina, V. Alvarez, N. Barba, S. Bullrich, M. Cortes, I. Escoda, C. Martinez-Bru, *Clin. Chem. Lab. Med.* **2008**, 46, 849–854.
- [23] G. Lippi, N. Blanckaert, P. Bonini, S. Green, S. Kitchen, V. Palicka, A. J. Vassault, C. Mattiuzzi, M. Plebani, *Clin. Chem. Lab. Med.* **2008**, 0, 0.
- [24] G. Halwachs-Baumann, *Labormedizin: Klinik – Praxis – Fallbeispiele*, Springer, Wien, **2006**.
- [25] M. G. Scott, A. M. Gronowski, C. S. Eby, *Tietz’s Applied Laboratory Medicine*, 2. Aufl., Wiley, Hoboken, **2007**.
- [26] W. G. Wood, *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* **1991**, 205, 105–112.
- [27] C. Selby, *Ann. Clin. Biochem.* **1999**, 36(Pt 6), 704–721.
- [28] G. A. Postuma-Trumpie, J. Korf, A. van Amerongen, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 393, 569–582.
- [29] R. J. Davies, S. S. Eapen, S. J. Carlisle, *Handb. Biosens. Biochips* **2007**, 2, 1151–1165.
- [30] G. A. Postuma-Trumpie, J. Korf, A. van Amerongen, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 393, 569–582.
- [31] G. A. Uriano, J. P. Cali in *Validation of the measurement process* (Hrsg.: J. R. DeVoe), American Chemical Society, Washington, DC, **1977**, S. 140–161.
- [32] J. N. Miller, R. Niessner, D. Knopp, *Ullmann’s Biotechnol. Biochem. Eng.* **2007**, 2, 585–612.
- [33] M. Seydack, *Springer Ser. Fluoresc.* **2008**, 6, 401–428.
- [34] J. F. Brady, *Immunoassay Other Bioanal. Tech.* **2007**, S. 249–263.
- [35] R. F. Taylor, *Kirk-Othmer Encycl. Chem. Technol.*, Vol. 14, 5. Aufl., Wiley, Hoboken, **2005**, S. 135–159.
- [36] C. P. Price, D. J. Newman, *Methods Immunol. Anal.* **1993**, 1, 134–158.
- [37] D. J. Marmer, P. E. Hurtubise, *Immunoassay* **1996**, 363–387.
- [38] I. Deverill, *Res. Monogr. Immunol.* **1984**, 6, 27–49.
- [39] S. Blirup-Jensen, *Clin. Chem. Lab. Med.* **2001**, 39, 1098–1109.
- [40] J. C. Sternberg, *Clin. Chem.* **1977**, 23, 1456–1464.
- [41] J. A. Molina-Bolívar, F. Galisteo-Gonzalez, *J. Macromol. Sci. Part C* **2005**, 45, 59–98.
- [42] M. Heidelberger, F. E. Kendall, *J. Exp. Med.* **1932**, 55, 555–561.
- [43] M. Heidelberger, F. E. Kendall, *J. Exp. Med.* **1935**, 62, 697–720.

- [44] „Device for the determination of particles in liquid suspensions“: W. H. Coulter, DE 964810, **1957**.
- [45] A. Moldavan, *Science* **1934**, *80*, 188–189.
- [46] P. J. Crosland-Taylor, *Nature* **1953**, *171*, 37–38.
- [47] H. R. Hulett, W. A. Bonner, J. Barrett, L. A. Herzenberg, *Science* **1969**, *166*, 747–749.
- [48] H. R. Hulett, W. A. Bonner, R. G. Sweet, L. A. Herzenberg, *Clin. Chem.* **1973**, *19*, 813–816.
- [49] W. A. Bonner, H. R. Hulett, R. G. Sweet, L. A. Herzenberg, *Rev. Sci. Instrum.* **1972**, *43*, 404–409.
- [50] A. R. Hobson, R. A. Agarwala, R. A. Swallow, K. D. Dawkins, N. P. Curzen, *Platelets* **2006**, *17*, 509–518.
- [51] R. J. Luddington, *Clin. Lab. Haematol.* **2005**, *27*, 81–90.
- [52] K. Vierordt, *Arch. Heilkd.* **1878**, *19*, 193.
- [53] H. Hartert, *Klin. Wochenschr.* **1948**, *26*, 577–583.
- [54] H. Hartert, *Schweiz. Med. Wochenschr.* **1949**, *79*, 318–322.
- [55] H. Hartert, *Z. Gesamte Exp. Med.* **1951**, *117*, 189–203.
- [56] A. Calatzis, S. Haas, O. Gödje, A. Calatzis, R. Hipp, J. M. Walenga in *Management of bleeding in cardiovascular surgery* (Hrsg.: R. Pifaré), Hanley & Belfus, Inc., Philadelphia, **2000**, S. 215–226.
- [57] Nobis Labordiagnostica GmbH: Benutzerinformation für die roTEG Vollblutgerinnungsanalyse/Thrombelastographie.
- [58] D. C. Cardinal, R. J. Flower, *J. Pharmacol. Methods* **1980**, *3*, 135–158.
- [59] A. Calatzis, M. Wittwer, B. Krueger, *Platelets* **2004**, *15*, 485–486.
- [60] A. Calatzis, B. Krueger, M. Wittwer, (Dynabyte Informationsysteme G.m.b.H.), WO, Application, **2005**, S. 50.
- [61] M. A. Kratzer, S. Bellucci, J. P. Caen, *Haemostasis* **1985**, *15*, 363–370.
- [62] M. A. Kratzer, G. V. Born, *Haemostasis* **1985**, *15*, 357–362.
- [63] V. Von der Goltz, US Patent 5051239, **1991**.
- [64] R. L. Sautter, E. H. Lipford, *N. C. Med. J.* **2007**, *68*, 132–135.
- [65] S. S. Ehrmeyer, R. H. Laessig, *Clin. Chem. Lab. Med.* **2007**, *45*, 766–773.
- [66] S. M. Caples, R. D. Hubmayr, *Curr. Opin. Crit. Care* **2003**, *9*, 230–235.
- [67] G. J. Kost, N. K. Tran, *Cardiol. Clin.* **2005**, *23*, 467–490, vi.
- [68] G. J. Kost, H. T. Vu, J. H. Lee, P. Bourgeois, F. L. Kiechle, C. Martin, S. S. Miller, A. O. Okorodudu, J. J. Podczasy, R. Webster, K. J. Whittlow, *Crit. Care Med.* **1998**, *26*, 581–590.
- [69] Oral Anticoagulation Monitoring Study Group, *Am. J. Clin. Pathol.* **2001**, *115*, 288–296.
- [70] Z. Tang, J. H. Lee, R. F. Louie, G. J. Kost, *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2000**, *124*, 1135–1140.
- [71] R. Gosselin, J. T. Owings, R. H. White, R. Hutchinson, J. Branch, K. Mahackian, M. Johnston, E. C. Larkin, *Thromb. Haemostasis* **2000**, *83*, 698–703.
- [72] P. B. Luppa, L. J. Sokoll, D. W. Chan, *Clin. Chim. Acta* **2001**, *314*, 1–26.
- [73] D. Wild, *The Immunoassay Handbook*, Nature Publishing Group, New York, **2001**.
- [74] L. C. Clark, Jr., C. Lyons, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1962**, *102*, 29–45.
- [75] E. Katz, L. Sheeney-Haj-Ichia, I. Willner, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3354–3362; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3292–3300.
- [76] E. Katz, I. Willner, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6166–6235; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6042–6108.
- [77] E. Katz, I. Willner, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4869–4872; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4791–4794.
- [78] G. A. Zelada-Guillen, J. Riu, A. Düzung, F. X. Rius, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7470–7473; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7334–7337.
- [79] M. J. Kim, S. M. Huang, U. A. Meyer, A. Rahman, L. J. Lesko, *J. Clin. Pharmacol.* **2009**, *49*, 138–146.
- [80] M. H. Eckman, J. Rosand, S. M. Greenberg, B. F. Gage, *Ann. Intern. Med.* **2009**, *150*, 73–83.
- [81] S. Briest, V. Stearns, *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* **2009**, *7*, 185–192.
- [82] T. Simon, C. Verstuift, M. Mary-Krause, L. Quteineh, E. Drouet, N. Meneveau, P. G. Steg, J. Ferrieres, N. Danchin, L. Becquemont, *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 363–375.
- [83] R. Nanda, *Rev. Recent Clin. Trials* **2007**, *2*, 111–116.
- [84] E. S. Schernhammer, E. Giovannucci, C. S. Fuchs, S. Ogino, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2008**, *17*, 2895–2898.
- [85] C. Csillag, R. Borup, J. Olsen, F. C. Nielsen, O. H. Nielsen, *Scand. J. Gastroenterol.* **2007**, *42*, 834–840.
- [86] C. Franzini, F. Ceriotti, *Clin. Biochem.* **1998**, *31*, 449–457.
- [87] A. Uldall, *Accredit. Qual. Assur.* **1996**, *1*, 218–222.
- [88] WHO Expert Committee on Biological Standardization, *Tech. Rep. Ser.* **2005**, 932(i–vi), 1–137.
- [89] W. J. Philipp, P. Iwaarden, H. Schimmel, N. Meeus, N. Kollmorgen, *Accredit. Qual. Assur.* **2007**, *12*, 134–138.
- [90] K. W. Phinney, *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, *88*, 511S–512S.
- [91] H. M. Azzazy, M. M. Mansour, S. C. Kazmierczak, *Clin. Chem.* **2006**, *52*, 1238–1246.
- [92] K. Riehemann, S. W. Schneider, T. A. Luger, B. Godin, M. Ferrari, H. Fuchs, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 886–913; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 872–897.
- [93] K. K. Jain, *Clin. Chim. Acta* **2005**, *358*, 37–54.
- [94] L. Wang, M. B. O'Donoghue, W. Tan, *Nanomedicine* **2006**, *1*, 413–426.
- [95] G. Wu, R. H. Datar, K. M. Hansen, T. Thundat, R. J. Cote, A. Majumdar, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 856–860.
- [96] C. Schmuck, P. Wich, B. Kustner, W. Kiefer, S. Schlucker, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4870–4873; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4786–4789.
- [97] D. L. Jeanmaire, R. P. Van Duyne, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1977**, *84*, 1–20.
- [98] M. D. Porter, R. J. Lipert, L. M. Siperko, G. Wang, R. Narayanan, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1001–1011.
- [99] S. Schlücker, B. Kuestner, A. Punge, R. Bonfig, A. Marx, P. Stroebel, *J. Raman Spectrosc.* **2006**, *37*, 719–721.
- [100] X. Gao, M. Yezhelyev, Y. Xing, R. M. O'Regan, S. Nie, *Immunoassay Other Bioanal. Tech.* **2007**, *465*–476.
- [101] K. E. Sapsford, L. Berti, I. L. Medintz, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4676–4704; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4562–4588.
- [102] V. Biju, T. Itoh, A. Anas, A. Sujith, M. Ishikawa, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 2469–2495.
- [103] R. Gill, M. Zayats, I. Willner, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7714–7736; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7602–7625.
- [104] P. Tartaj, M. P. Morales, S. Veintemillas-Verdaguer, T. Gonzalez-Carreno, C. J. Serna, *Handb. Magn. Mater.* **2006**, *16*, 403–482.
- [105] C. Alexiou, R. Jurgons, C. Seliger, H. Iro, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2006**, *6*, 2762–2768.
- [106] E. Duguet, S. Vasseur, S. Mornet, J. M. Devoisselle, *Nanomedicine* **2006**, *1*, 157–168.
- [107] R. McKendry, J. Zhang, Y. Arntz, T. Strunz, M. Hegner, H. P. Lang, M. K. Baller, U. Certa, E. Meyer, H. J. Guntherodt, C. Gerber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 9783–9788.
- [108] T. Ideker, T. Galitski, L. Hood, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2001**, *2*, 343–372.
- [109] E. C. Butcher, E. L. Berg, E. J. Kunkel, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1253–1259.
- [110] J. W. Lee, W. C. Smith, G. D. Nordblom, R. R. Bowsher, *Drugs Pharm. Sci.* **2003**, *132*, 119–148.
- [111] A. Dorn-Beineke, C. E. Dempfle, T. Bertsch, H. Wisser, *Thromb. Res.* **2005**, *116*, 171–179.
- [112] C. P. Chan, Y. C. Cheung, R. Renneberg, M. Seydack, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2008**, *109*, 123–154.

- [113] Z. Fu, H. Liu, Z. Yang, H. Ju, *Curr. Trends Biotechnol. Pharm.* **2007**, *1*, 1–17.
- [114] R. E. Gerszten, M. Sabatine, T. J. Wang, *Clin. Chem.* **2009**, *55*, 404–406.
- [115] I. Hemmilä, *Springer Ser. Fluoresc.* **2008**, *6*, 429–447.
- [116] H. Kuramitz, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 61–69.
- [117] C. Mastichiadis, A. E. Niotis, P. S. Petrou, S. E. Kakabakos, K. Misiakos, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2008**, *27*, 771–784.
- [118] M. S. Rodeheffer, K. Birsoy, J. M. Friedman, *Cell* **2008**, *135*, 240–249.
- [119] W. A. Woodward, E. P. Sulman, *Cancer Metastasis Rev.* **2008**, *27*, 459–470.
- [120] R. M. O'Hara, Jr., S. E. Benoit, C. J. Groves, M. Collins, *Drug Discovery Today* **2006**, *11*, 342–347.
- [121] M. Vogeser, C. Seger, *Clin. Biochem.* **2008**, *41*, 649–662.
- [122] K. Gempel, K.-D. Gerbitz, B. Casetta, M. F. Bauer, *Clin. Chem.* **2000**, *46*, 122–123.
- [123] Z. Yang, S. Wang, *J. Immunol. Methods* **2008**, *336*, 98–103.
- [124] H. H. Maurer, *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *388*, 1315–1325.
- [125] U. Ceglarek, A. Leichtle, M. Brugel, L. Kortz, R. Brauer, K. Bresler, J. Thiery, G. M. Fiedler, *Mol. Cell. Endocrinol.* **2009**, *301*, 266–271.
- [126] M. Vogeser, A. Geiger, R. Herrmann, U. Kobold, *Clin. Biochem.* **2008**, *41*, 1417–1419.
- [127] U. Kobold, A. Geiger, R. Herrmann, M. Vogeser, (Roche Diagnostics GmbH; F.Hoffmann-La Roche AG), Application EP 200810569, **2008**, S. 35.
- [128] J. Ma, J. Shi, H. Le, R. Cho, J. C.-J. Huang, S. Miao, B. K. Wong, *J. Chromatogr. B* **2008**, *862*, 219–226.
- [129] D. Leibfritz, *Anticancer Res.* **1996**, *16*, 1317–1324.
- [130] S. Mora, J. D. Otvos, N. Rifai, R. S. Rosenson, J. E. Buring, P. M. Ridker, *Circulation* **2009**, *119*, 931–939.
- [131] J. Willmann, D. Leibfritz, H. Thiele, *J. Biomol. Tech.* **2008**, *19*, 211–216.
- [132] W. Dreher, D. Leibfritz, *Magn. Reson. Med.* **2005**, *54*, 190–195.
- [133] V.-P. Makinen, P. Soininen, C. Forsblom, M. Parkkonen, P. Ingman, K. Kaski, P.-H. Groop, M. Ala-Korpela, *Magn. Reson. Mater. Phys. Biol. Med.* **2006**, *19*, 281–296.
- [134] M. E. Bolland, E. G. Stanley, J. C. Lindon, J. K. Nicholson, E. Holmes, *NMR Biomed.* **2005**, *18*, 143–162.
- [135] M. Coen, E. Holmes, J. C. Lindon, J. K. Nicholson, *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 9–27.
- [136] B. Fuchs, J. Schiller, *Subcell. Biochem.* **2008**, *49*, 541–565.
- [137] K. Sparbier, T. Wenzel, H. Dihazi, S. Blaschke, G.-A. Mueller, A. Deelder, T. Flad, M. Kostrzewa, *Proteomics* **2009**, *9*, 1442–1450.
- [138] Z. Meng, T. D. Veenstra, *Proteomics Clin. Appl.* **2007**, *1*, 747–757.
- [139] W. Morelle, V. Faid, F. Chirat, J. C. Michalski, *Methods Mol. Biol.* **2009**, *534*, 1–19.
- [140] T. Alexandrov, J. Decker, B. Mertens, A. M. Deelder, R. A. Tollenaar, P. Maass, H. Thiele, *Bioinformatics* **2009**, *25*, 643–649.
- [141] C. Pan, S. Xu, H. Zhou, Y. Fu, M. Ye, H. Zou, *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387*, 193–204.
- [142] F. Vivanco, L. R. Padial, V. M. Darde, F. de La Cuesta, G. Alvarez-Llamas, N. Diaz-Prieto, M. G. Barderas, *Biomarker Insights* **2008**, *3*, 101–113.
- [143] J. V. Tricoli, *Transl. Med. Ser.* **2007**, *1*, 39–57.
- [144] A. Lonneborg, *Mol. Diagn. Ther.* **2008**, *12*, 307–320.
- [145] O. F. Laterza, V. R. Modur, J. H. Ladenson, *Biomarkers Med.* **2008**, *2*, 81–92.
- [146] D. C. Gaze, *Curr. Opin. Invest. Drugs (Thomson Sci.)* **2007**, *8*, 711–717.
- [147] P. Seng, M. Drancourt, F. Gouriet, B. La Scola, P. E. Fournier, J. M. Rolain, D. Raoult, *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *49*, 543–551.
- [148] G. Marklein, M. Josten, U. Klanke, E. Müller, R. Horré, T. Maier, T. Wenzel, M. Kostrzewa, G. Bierbaum, A. Hoerauf, H. G. Sahl, *J. Clin. Microbiol.* **2009**, *47*, 2912–2917.
- [149] S. Holdenrieder, P. Stieber, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2009**, *46*, 1–24.
- [150] S. Holdenrieder, J. von Pawel, E. Dankelmann, T. Duell, B. Faderl, A. Markus, M. Siakavara, H. Wagner, K. Feldmann, H. Hoffmann, H. Raith, D. Nagel, P. Stieber, *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 7813–7821.
- [151] A. Sulewska, W. Niklinska, M. Kozlowski, L. Minarowski, W. Naumann, J. Niklinski, K. Dabrowska, L. Chyczewski, *Folia Histochem. Cytobiol.* **2007**, *45*, 315–324.
- [152] M. Esteller, *DNA Methylation* **2005**, 1–9.
- [153] E. Prokhortchouk, P.-A. Defossez, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2008**, *1783*, 2167–2173.
- [154] S. Thiagalingam, P. Papageorgis, *Cancer Epigenet.* **2009**, 333–346.
- [155] R. Lesche, F. Eckhardt, *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2007**, *9*, 222–230.
- [156] A. Dobrovic, L. S. Kristensen, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2009**, *41*, 34–39.
- [157] S. Gopalakrishnan, B. O. Van Emburgh, K. D. Robertson, *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2008**, *647*, 30–38.
- [158] E. A. Klein, Y. Yung, P. Castagnino, D. Kothapalli, R. K. Assoian, *Methods Enzymol.* **2007**, *426*, 155–175.
- [159] J. P. Thiery, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2003**, *13*, 365–371.
- [160] M. K. Chelbi-Alix, J. Wietzerbin, *Biochimie* **2007**, *89*, 713–718.
- [161] E. A. Evans, D. A. Calderwood, *Science* **2007**, *316*, 1148–1153.
- [162] J. Monnier, M. Samson, *FEBS J.* **2008**, *275*, 4014–4021.
- [163] S. A. Mousa, *Mol. Biotechnol.* **2008**, *38*, 33–40.
- [164] K. R. Pang, J. J. Wu, D. B. Huang, S. K. Tyring, S. Baron, *Methods Mol. Med.* **2005**, *116*, 1–23.
- [165] F. W. Quelle, *Immunol. Res.* **2007**, *39*, 173–184.
- [166] K. Ley, J. Reutershan, *Handb. Exp. Pharmacol.* **2006**, *176*, 97–133.
- [167] I. Cinel, S. M. Opal, *Crit. Care Med.* **2009**, *37*, 291–304.
- [168] I. Herzum, H. Renz, *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 581–587.
- [169] M. Bajenoff, R. N. Germain, *Eur. J. Immunol.* **2007**, *37*, S18–S33.
- [170] N. Sachdeva, D. Asthana, *Front. Biosci.* **2007**, *12*, 4682–4695.
- [171] M. Mahmoudi, N. Curzen, P. J. Gallagher, *Histopathology* **2007**, *50*, 535–546.
- [172] D. Aronson, *Adv. Cardiol.* **2008**, *45*, 1–16.
- [173] M. Cnop, *Biochem. Soc. Trans.* **2008**, *36*, 348–352.
- [174] B. Akduman, E. D. Crawford, *Curr. Urol. Rep.* **2007**, *8*, 233–238.
- [175] H. K. Datta, W. F. Ng, J. A. Walker, S. P. Tuck, S. S. Varanasi, *J. Clin. Pathol.* **2008**, *61*, 577–587.
- [176] H. Jüppner, *Ther. Apheresis Dial.* **2007**, *11 Suppl 1*, S3–22.
- [177] M. Wiltgen, G. P. Tilz, *Hematology* **2007**, *12*, 271–287.
- [178] S. F. Grant, H. Hakonarson, *Clin. Chem.* **2008**, *54*, 1116–1124.
- [179] K. Ogawa, S. Murayama, M. Mori, *Oncol. Rep.* **2007**, *18*, 1243–1248.
- [180] G. P. Page, S. O. Zakharkin, K. Kim, T. Mehta, L. Chen, K. Zhang, *Methods Mol. Biol.* **2007**, *404*, 409–430.
- [181] A. T. Weeraratna, D. D. Taub, *Methods Mol. Biol.* **2007**, *377*, 1–16.
- [182] K. Sato, T. Kitamori, *Handb. Capillary Microchip Electrophor. Assoc. Microtech.*, 3. Aufl., CRC, Boca Raton, **2008**, S. 1013–1019.
- [183] M. Seidel, R. Niessner, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 1521–1544.
- [184] A. R. Newman, *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 1063A–1065A.
- [185] S. J. Lee, S. Y. Lee, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *64*, 289–299.
- [186] C. Zhang, D. Xing, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 4223–4237.

- [187] A. Ahmadian, M. Ehn, S. Hober, *Clin. Chim. Acta* **2006**, *363*, 83–94.
- [188] B. Huelseweh, R. Ehricht, H. J. Marschall, *Proteomics* **2006**, *6*, 2972–2981.
- [189] J. Weile, C. Knabbe, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 731–742.
- [190] P. Baptista, E. Pereira, P. Eaton, G. Doria, A. Miranda, I. Gomes, P. Quaresma, R. Franco, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 943–950.
- [191] C. C. You, O. R. Miranda, B. Gider, P. S. Ghosh, I. B. Kim, B. Erdogan, S. A. Krovi, U. H. Bunz, V. M. Rotello, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 318–323.
- [192] K. K. Jain, *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2003**, *3*, 153–161.
- [193] W. Wang, P. Vadgama, *J. R. Soc. Interface* **2004**, *1*, 109–117.
- [194] W. L. Wright, *J. Neurol. Sci.* **2007**, *261*, 10–15.
- [195] J. Metzger, P. B. Luppia, D. M. Good, H. Mischak, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2009**, *46*, 129–152.
- [196] R. Gaza, S. W. McKeever, *Radiat. Prot. Dosim.* **2006**, *120*, 14–19.
- [197] V. Van Hoof, A. Wormek, S. Schleutermann, T. Schumacher, O. Lothaire, C. Trendelenburg, *Stud. Health Technol. Inform.* **2004**, *107*, 89–93.
- [198] A. Kratz, M. Laposata, *Clin. Chim. Acta* **2002**, *319*, 117–125.
- [199] G. E. Hoffmann, *Clin. Chim. Acta* **1998**, *278*, 203–216.
- [200] D. M. Elston, *Clin. Lab. Med.* **2008**, *28*, 173–177.
- [201] M. J. Goldschmidt Henk, *Clin. Chem. Lab. Med.* **2004**, *42*, 868–873.
- [202] Y. A. Park, M. B. Marques, *Clin. Lab. Med.* **2007**, *27*, 411–424, abstract ix.
- [203] M. J. O’Kane, P. L. Lynch, N. McGowan, *Ann. Clin. Biochem.* **2008**, *45*, 129–134.
- [204] R. Gräsbeck, *Clin. Chem. Lab. Med.* **2004**, *42*, 692–697.
- [205] C. Ricós, V. Domenech Maria, C. Perich, *Clin. Chem. Lab. Med.* **2004**, *42*, 858–862.
- [206] F. Ceriotti, R. Hinzmamn, M. Panteghini, *Ann. Clin. Biochem.* **2009**, *46*, 8–17.
- [207] B. N. Swanson, *Dis. Markers* **2002**, *18*, 47–56.
- [208] J. Feldschuh, S. Katz, *Am. J. Med. Sci.* **2007**, *334*, 41–46.
- [209] S. F. Shariat, P. T. Scardino, H. Lilja, *Can. J. Urol.* **2008**, *15*, 4363–4374.
- [210] D. J. Parekh, D. P. Ankerst, D. Troyer, S. Srivastava, I. M. Thompson, *J. Urol.* **2007**, *178*, 2252–2259.
- [211] D. L. Meany, D. W. Chan, *Clin. Chem. Lab. Med.* **2008**, *46*, 575–576.
- [212] C. M. Sturgeon, A. R. Ellis, *Clin. Chim. Acta* **2007**, *381*, 85–92.
- [213] D. Ilic, D. O’Connor, S. Green, T. Wilt, *Cochrane Database Syst. Rev.* **2006**, *3*, CD004720.
- [214] K. Bensalah, Y. Lotan, J. A. Karam, S. F. Shariat, *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **2008**, *11*, 112–120.
- [215] M. A. Burke, W. G. Cotts, *Heart Failure Rev.* **2007**, *12*, 23–36.
- [216] V. K. Munagala, J. C. Burnett, Jr., M. M. Redfield, *Curr. Probl. Cardiol.* **2004**, *29*, 707–769.
- [217] R. Feynman, There is plenty of room at the bottom. Rede vom 29.12.1959 auf dem „Annual meeting of the American Physical Society“ am California Institute of Technology, Pasadena, CA, **1959**.
- [218] G. L. Andriole, E. D. Crawford, R. L. Grubb, 3rd, S. S. Buys, D. Chia, T. R. Church, M. N. Fouad, E. P. Gelmann, P. A. Kvale, D. J. Reding, J. L. Weissfeld, L. A. Yokochi, B. O’Brien, J. D. Clapp, J. M. Rathmell, T. L. Riley, R. B. Hayes, B. S. Kramer, G. Izmirlian, A. B. Miller, P. F. Pinsky, P. C. Prorok, J. K. Gohagan, C. D. Berg, *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 1310–1319.
- [219] F. H. Schroder, J. Hugosson, M. J. Roobol, T. L. Tammela, S. Ciatto, V. Nelen, M. Kwiatkowski, M. Lujan, H. Lilja, M. Zappa, L. J. Denis, F. Recker, A. Berenguer, L. Maattanen, C. H. Bangma, G. Aus, A. Villers, X. Rebillard, T. van der Kwast, B. G. Blijenberg, S. M. Moss, H. J. de Koning, A. Auvinen, *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 1320–1328.
- [220] W. G. Woods, R. N. Gao, J. J. Shuster, L. L. Robison, M. Bernstein, S. Weitzman, G. Bunin, I. Levy, J. Brossard, G. Dougherty, M. Tuchman, B. Lemieux, *N. Engl. J. Med.* **2002**, *346*, 1041–1046.
- [221] F. H. Schilling, C. Spix, F. Berthold, R. Erttmann, N. Fehse, B. Hero, G. Klein, J. Sander, K. Schwarz, J. Treuner, U. Zorn, J. Michaelis, *N. Engl. J. Med.* **2002**, *346*, 1047–1053.
- [222] C. I. Kaye, F. Accurso, S. La Franchi, P. A. Lane, H. Northrup, S. Pang, G. B. Schaefer, *Pediatrics* **2006**, *118*, 1304–1312.
- [223] B. Wilcken, V. Wiley, *Pathology* **2008**, *40*, 104–115.
- [224] L. E. Cipriano, C. A. Rupar, G. S. Zaric, *Value Health* **2007**, *10*, 83–97.
- [225] A. M. Dupuy, S. Lehmann, J. P. Cristol, *Clin. Chem. Lab. Med.* **2005**, *43*, 1291–1302.
- [226] T. A. Franke, A. Wixforth, *ChemPhysChem* **2008**, *9*, 2140–2156.
- [227] D. Kohlheyer, J. C. Eijkel, A. van den Berg, R. B. Schasfoort, *Electrophoresis* **2008**, *29*, 977–993.
- [228] A. A. Conti, A. Conti, G. F. Gensini, *Panminerva Med.* **2006**, *48*, 203–205.