

Erfahrungen mit einem Enzymimmunoassay für Digoxin

E. Munz, A. Kessler, P. U. Koller, E. W. Busch

Chemische Forschung, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim

Zusammenfassung:

Ein neuer Enzymimmunoassay für Digoxin nach dem Prinzip der solid phase-Technik wurde eingehend auf Präzision, Richtigkeit und Spezifität geprüft.*

Die Variationskoeffizienten der Präzision in der Serie und von Tag zu Tag entsprachen den Werten von Radioimmunoassays und lagen zwischen 4 und 15%; die Wiederfindung in Kontrollseren lag zwischen 87% im niedrigsten und 101% im höchsten Konzentrationsbereich.

β -Methyl-, α - und β -Acetyl-Digoxin sowie Digoxigeninmono- bzw. -bis-Digitoxosid werden im gleichen Maße wie Digoxin erfaßt. Digitoxin zeigte eine Kreuzreaktion von 33%. Spironolacton sowie die beiden Metabolite Canrenon und Canrenoin-Säure ergaben Kreuzreaktionen von $\ll 0,01\%$ und zeigten auch bei in vitro-Konzentrationen vom Zehnfachen der therapeutischen Sättigungsdosis keinen Einfluß auf den Test.

Schlüsselwörter:

Enzymimmunoassay Digoxin-ELISA – Methodenvergleich – Präzision – Spezifität.

Summary:

A new solid phase enzyme immunoassay was checked for precision, accuracy and specificity.

Coefficients of variation within series and from day to day were found to be between 4 and 15% thus corresponding to values obtained with radioimmunoassays, recovery in control material between 87% and 101% from the lowest to the highest concentration range.

β -Methyl-, α - and β -Acetyl-Digoxin and Digoxigenine-mono- respectively -bis-Digitoxoside react as Digoxin. Digitoxine gives a cross over-reaction of 33%. Spironolactone and its metabolites Canrenone and Canrenoate gave cross overreactions $\ll 0,01$ and there was no influence observed even at a ten-fold therapeutic saturation concentration.

Key words:

Enzymeimmunoassay Digoxin-ELISA – Method comparison – Precision – Specificity.

Nachdem sich in den letzten Jahren der Radioimmunoassay (RIA) in der klinischen Chemie durchgesetzt hat, konnte in jüngster Zeit der Enzymimmunoassay (EIA) für die Anwendung im Routinelabor entwickelt werden. Seit kurzem steht ein praktikabler Enzymimmunoassay mit antikörperbeschichteten Röhren zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit soll über Ergebnisse aus der umfangreichen Erprobung zu Präzision, Richtigkeit und Spezifität dieses Tests berichtet werden.

Material und Methoden

Die Digoxin-Bestimmungen wurden mit einem Enzymimmunoassay (Enzymun-Test® Digoxin), sowie drei im

Handel erhältlichen Radioimmunoassays (RIA I und RIA II und RIA Digoxin BM**) jeweils nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Dem Enzymimmunoassay liegt das in Abbildung 1 dargestellte Prinzip zugrunde. Wie beim Radioimmunoassay konkurrieren in der Immunreaktion das Digoxin der Probe und das enzymmarkierte Digoxin um die an der Wand fixierten Antikörper. Nach Inkubation bei Raumtemperatur wird der Gläscheninhalt ausgeleert bzw. ausgesaugt. Im Anschluß an einen Waschvorgang wird der an der Wand verbliebene Antikörper-Antigen-Enzymkomplex in einer nachgeschalteten, im sichtbaren Bereich meßbaren Indikatorreaktion bestimmt.

Meßgeräte waren für den EIA ein Eppendorf-Substratmeßplatz mit einem Eppendorf-Digitalphotometer

* Enzymun-Test® Digoxin, Boehringer Mannheim.
** Boehringer Mannheim GmbH

6115 A und für den RIA ein Gamma-Counter Nuclear Chicago 1185.

Die Präzision in der Serie und von Tag zu Tag wurde nach einem varianzanalytischen Verfahren ermittelt. Hierzu wurden drei Proben in verschiedenen Konzentrationsbereichen an fünf Tagen je 5mal in randomisierter Reihenfolge gemessen, die Einzelwerte ergaben sich aus Dreifach- bzw. Doppelbestimmungen. Für jede Meßserie wurde eine Eichkurve erstellt, die Auswertung erfolgte mit diesen Eichkurven, auf eine Transformation zur Linearisierung der Kurven wurde generell verzichtet.

Ergebnisse und Diskussion

Präzision

Tabelle 1 zeigt die Präzisionen in der Serie und von Tag zu Tag aus 3fach-Bestimmungen, Tabelle 2 zeigt dieselben Ergebnisse aus 2fach-Bestimmungen. Im niedrigen Konzentrationsbereich liegen die Variationskoeffizienten (VK) für die Präzision in der Serie zwischen 7 und 19%, während im therapeutischen und toxischen Konzentrationsbereich die Variationskoeffizienten mit Werten zwischen 4 und 8% als recht gut zu bezeichnen sind. Ähnliches gilt für die Präzisionen von Tag zu Tag, die in derselben Größenordnung liegen. Wegen der geringen Unterschiede der Präzisionen von 2fach- und 3fach-Bestimmungen sind nach den vorliegenden Daten für den Routinebetrieb nach entsprechender Einarbeitung

Doppelbestimmungen ausreichend. Für den Radioimmunoassay ergaben ähnliche frühere Untersuchungen in entsprechenden Konzentrationsbereichen vergleichbare Resultate (Tab. 3).

Beim 10fachen Ansetzen einer Bezugskurve mit 11 Konzentrationspunkten zeigte sich, daß die Varianzen der Extinktionsmessungen absolut gesehen über den gesamten Konzentrationsbereich relativ konstant sind, d.h. die Extinktionen werden mit der annähernd gleichen Präzision gemessen (Tab. 4). Gerade dies erklärt aber auch, warum die Varianzen der über die Eichkurve ermittelten Konzentrationswerte insbesondere bei niedrigen Konzentrationen größer sind. Das Zahlenverhältnis Extinktion [mE] zu Konzentration [ng/ml] ist ungefähr 100:1, so daß eine Streuung von etwa 5% bei der Extinktionsmessung sich beim Zahlenwert der Konzentrationsangabe wesentlich stärker auswirkt. Zur Charakterisierung der Präzision von Enzym- wie Radioimmunoassays wäre es daher falsch, die Präzision der Extink-

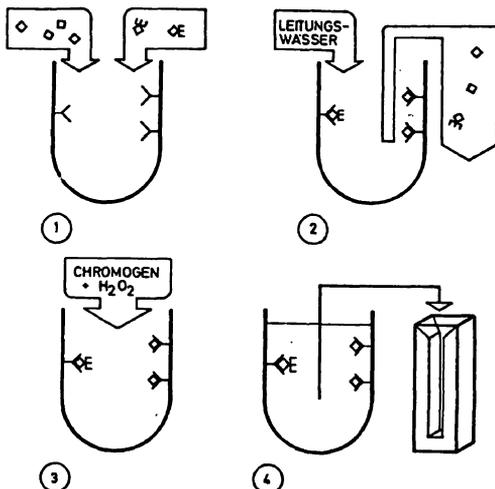
Abb. 1:

Reaktionsablauf im Enzymimmunoassay

↳ wandgebundener Antikörper

◇ Antigen (Digoxin) aus der Probe

◊ Enzymmarkiertes Antigen (POD-Digoxin)



Tab. 1:

Varianzanalytisch ermittelte Präzision in der Serie und von Tag zu Tag mit dem Enzymimmunoassay (Enzymun-Test® Digoxin). Einzelwerte aus Dreifachbestimmungen. (var = Varianz) Kontrollseren RIA 1, RIA 2 und RIA 3 BM.

Probe	Präzision in der Serie		
	\bar{x} [ng/ml]	var	VK [%]
Serum 1	1,68	0,017	7,69
Serum 2	2,49	0,033	7,27
Serum 3	3,78	0,049	5,91
Kontrollserum RIA 1	0,84	0,017	15,83
Kontrollserum RIA 2	2,45	0,028	6,92
Kontrollserum RIA 3	3,67	0,045	5,81
Probe	Präzision von Tag zu Tag		
	\bar{x} [ng/ml]	var	VK [%]
Serum 1	1,68	0,016	7,45
Serum 2	2,49	0,034	7,45
Serum 3	3,78	0,047	5,77
Kontrollserum RIA 1	0,84	0,015	14,32
Kontrollserum RIA 2	2,45	0,039	8,04
Kontrollserum RIA 3	3,67	0,042	5,59

Tab. 2:

Varianzanalytisch ermittelte Präzision in der Serie und von Tag zu Tag mit dem Enzymimmunoassay (Enzymun-Test® Digoxin). Einzelwerte aus Doppelbestimmungen.

Probe	Präzision in der Serie		
	\bar{x} [ng/ml]	var	VK [%]
Serum 1	1,67	0,024	9,33
Serum 2	2,51	0,041	8,13
Serum 3	3,78	0,071	7,07
Kontrollserum RIA 1	0,84	0,027	19,77
Kontrollserum RIA 2	2,49	0,032	7,29
Kontrollserum RIA 3	3,69	0,063	6,80

Probe	Präzision von Tag zu Tag		
	\bar{x} [ng/ml]	var	VK [%]
Serum 1	1,67	0,022	9,02
Serum 2	2,51	0,042	8,20
Serum 3	3,78	0,068	6,93
Kontrollserum RIA 1	0,84	0,022	17,83
Kontrollserum RIA 2	2,49	0,032	7,18
Kontrollserum RIA 3	3,69	0,054	6,30

Tab. 3:

Präzision in der Serie ($n = 5$) und von Tag zu Tag ($n = 15$) mit einem RIA (BM-RIA Digoxin). Einzelwerte aus Dreifachbestimmungen

Probe	Präzision in der Serie	
	\bar{x} [ng/ml]	VK [%]
Serum A	1,88	6,36
Serum B	3,64	5,86

Probe	Präzision von Tag zu Tag	
	\bar{x} [ng/ml]	VK [%]
Serum A	1,97	4,77
Serum B	3,69	5,86

tions-respektive Impulsratenmessung heranzuziehen. Im Rahmen der Erprobung, die in insgesamt 13 Labors durchgeführt wurde, waren die Daten zur Präzision in der Serie mit dem Enzymimmunoassay vergleichbar. Im unteren Bereich (0,3–1,0 ng Digoxin) lagen die Variationskoeffizienten zwischen 7 und 22%, im mittleren (1,2–2,4 ng Digoxin) zwischen 3 und 8% und im hohen Bereich (3,0–5,0 ng Digoxin) zwischen 2 und 9%, wobei diese Untersuchungen auf sieben verschiedenen Photometertypen durchgeführt wurden.

Richtigkeit

Zur Überprüfung der Richtigkeit wurden als Kriterien die Wiederfindung in Kontrollseren und der Methodenvergleich mit Radioimmunoassays gewählt. In azidfreien Kontrollseren (Tab. 5) war die Wiederfindung gut. Dieselben Kontrollseren wurden in einem externen Rundversuch in 11 Laboratorien verwendet, auch hier war eine gute Wiederfindung zu beobachten. Im Mittel wurden die Einwaagen zu nahezu 100% gefunden (Abbildung 2).

Bei dem Vergleich mit den Radioimmunoassays wurden im Rahmen der bekannten Präzisionen Differenzen der Einzelwerte gefunden, die in Abbildung 3 bzw. Abbildung 4 dargestellt sind. Die Verteilungsschwerpunkte der Differenzen lagen einmal auf der positiven und einmal auf der negativen Seite, die Mittelwerte stimmten durchweg gut überein. Dies zeigt die Schwierigkeiten des Methodenvergleichs bei immunologischen Methoden, wo absolute Referenzmethoden für Routine-

Tab. 4:

Zehnfaches Ansetzen einer Eichkurve; Extinktion, Varianz (var) und Standardabweichung (s) in Abhängigkeit von der Digoxin-Konzentration (Enzymimmunoassay)

Digoxin-Konzentration [ng/ml]	Extinktion (E)	var	s
0,0	1,4703	0,0083	0,09123
0,5	1,261	0,0013	0,03633
0,75	1,135	0,0008	0,02806
1,0	1,056	0,0005	0,02174
1,5	0,741	0,0028	0,05288
2,0	0,656	0,0028	0,0525
2,5	0,559	0,0014	0,03677
3,0	0,519	0,0009	0,030
3,5	0,454	0,0008	0,02875
4,0	0,442	0,0014	0,03805
5,0	0,405	0,0004	0,02022

labors meist fehlen und die Richtigkeit von Methoden nur relativ beurteilt werden kann.

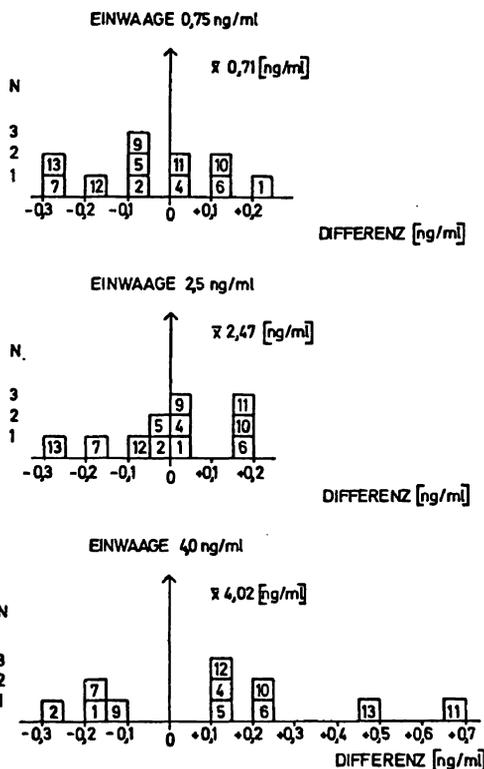
Spezifität

Die Spezifität immunologischer Methoden wird weitgehend durch die Qualität des Antikörpers bestimmt. Deshalb sind Kreuzreaktionen mit strukturverwandten Substanzen außerordentlich wichtig. Wie Tabelle 6 zeigt, reagieren die Digitalis-Präparate Digoxin, β -Methyl- sowie α - und β -Acetyl-Digoxin praktisch gleichwertig. Auch die Metabolite Digoxigenin mono- und bis-Digitoxosid werden zu 100% erfaßt. Digitoxin zeigt mit 33% noch eine deutliche Kreuzreaktion. Da in der Regel jedoch nur monotherapiert wird, spielt diese Kreuzreaktion praktisch keine Rolle.

Wegen der Strukturähnlichkeit der Spironolactone spielen diese Kreuzreaktionen ebenfalls eine wichtige Rolle, zumal die Metabolite Canrenon und Canrenoin-säure besonders bei Sättigungstherapie in Konzentra-

Abb. 2:

Wiederfindung von Digoxin in Kontrollseren. Rundversuch in 11 Laboratorien (von 1-13 numeriert, die Nummern 3 und 8 fehlen).



Tab. 5:

Wiederfindung in Kontrollserum mit einem EIA (Enzymun-Test® Digoxin) und zwei RIA [BM-RIA Digoxin (a) und RIA II (b)]

Kon-troll-serum	Soll-wert [ng/ml]	EIA [ng/ml]	RIA (a) [ng/ml]	RIA (b) [ng/ml]
Kon-troll-serum (BM)	2,5	2,5	2,45	2,4
Kon-troll-serum [RIA 1 (BM)]	0,75	0,65	1,0	0,78
Kon-troll-serum [RIA 2 (BM)]	4,0	4,05	4,0	3,8

Tab. 6:

Prozentuale Kreuzreaktionen des Enzym-immunoassay (Enzymun-Test® Digoxin) mit verschiedenen Digitaloiden und Steroiden

Substanz	Kreuz-reaktion (50% Tracerverdrängung)
Digoxin	100%
β -Methyldigoxin	100%
α -Acetyldigoxin	98%
β -Acetyldigoxin	100%
Lanatosid C	75%
Digoxigenin	45%
Digoxigenin-mono-digitoxosid	100%
Digoxigenin-bis-digitoxosid	100%
Digitoxin	33%
k-Strophantin	3%
Canrenon	$\leq 0,01\%$
Canrenoinsäure	$\leq 0,01\%$
Prednison	$\leq 0,01\%$
Cortisol	$\leq 0,01\%$
Progesteron	$\leq 0,01\%$
Spironolacton	$\leq 0,01\%$

tionen auftreten, die um den Faktor 1000 höher liegen als die von Digoxin. So kann auch bei einer Kreuzreaktion von <0,01% durchaus noch eine deutliche Digoxin-Konzentration vorgetäuscht werden. Unsere Ergebnisse zeigten für Canrenon und Canrenoin-Säure eine Kreuzreaktion von <0,01%, wobei die Kreuzreaktivität von Canrenoin-Säure noch um den Faktor 10 geringer war. Die therapeutisch zu erwartende Sättigungskonzentration von ca. 1 µg Canrenon/ml zeigte keinen Einfluß auf die Digoxin-Bestimmung, ebenso wurde die Bestimmung von in vitro mit Digoxin (ca. 1,5 ng/ml) aufgestockten Seren durch 5 µg Canrenon/ml nicht

verfälscht. In Digoxin-freiem Serum täuschten erst 10 µg Canrenon/ml etwa 0,5 ng Digoxin/ml vor. Da dies bereits das Zehnfache der therapeutisch zu erwartenden Canrenon-Konzentration darstellt und sich die Kreuzreaktivität von Canrenon:Canrenoin-Säure wie 10:1 verhält und außerdem vor allem bei oraler Therapie der Anteil an Canrenon im Serum überwiegt, kann praktisch ein Einfluß von Canrenon und Canrenoin-Säure ausgeschlossen werden.

Dies konnte zusätzlich noch durch einen in vivo-Versuch bestätigt werden. Bei der intravenösen Verabrei-

Abb. 3:

Labor 1. Vergleich Enzymimmunoassay mit Radioimmunoassays, es wurden jeweils die EIA-Werte von der zugehörigen RIA-Werten abgezogen

A Vergleich BM-RIA mit Enzymun-Test® Digoxin
 B Vergleich RIA II mit Enzymun-Test® Digoxin

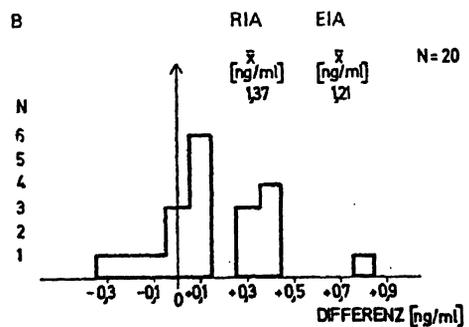
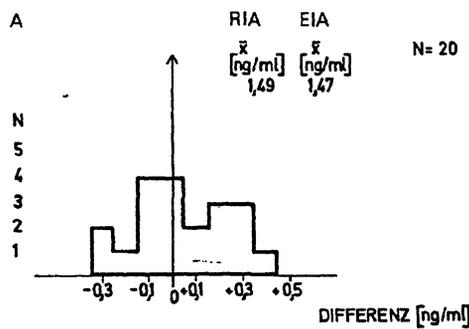
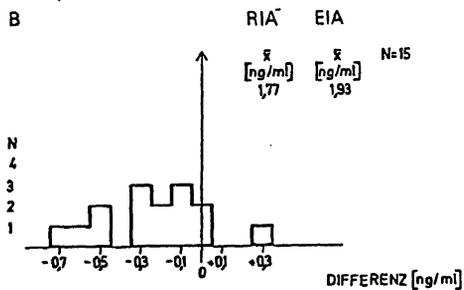
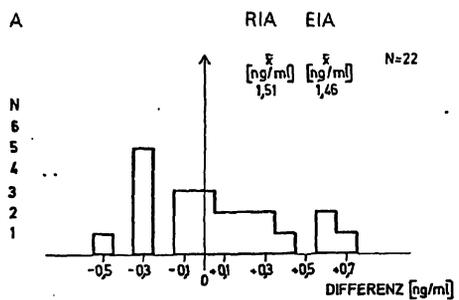


Abb. 4:

Labor 2. Vergleich Enzymimmunoassay mit Radioimmunoassays [RIA Digoxin BM (Boehringer Mannheim) und RIA I]. Es wurden jeweils die EIA-Werte von den zugehörigen RIA-Werten abgezogen.

A und B wie Abb. 3



Tab. 7:

Einfluß von Spironolactonmetaboliten auf die Richtigkeit des Enzymimmunoassay im Serum von digitalisierten Patienten 30 und 60 Minuten nach Verabreichung von 400 mg Canrenoat i.v.

Digitalis-Patient	Canrenon [µg/ml]	Canrenoin-säure [µg/ml]	Digoxin-Konzentration [ng/ml]
S. 0'	0	0	1,6
S. 30'	1,8	28,9	2,0
S. 60'	1,9	15,6	1,6
A. 0'	0	0	1,2
A. 30'	1,4	30,8	1,2
A. 60'	1,1	17,5	1,3
L. 0'	0	0	0,2
L. 30'	0,8	22,2	0,3
L. 60'	0,9	15,2	0,3
E. 0'	0	0	0,4
E. 30'	0,5	45,3	0,6
E. 60'	0,5	23,6	0,4
K. 0'	0	0	2,9
K. 30'	2,2	24,5	3,3
K. 60'	1,7	10,8	3,1
H. 0'	0	0	1,2
H. 45'	0,96	9,3	1,5
H. 60'	1,0	7,9	1,4

chung von 400 mg Canrenoin-Säure konnte bei 6 digitalisierten Patienten kein Einfluß sowohl von Canrenon als auch von Canrenoin-Säure festgestellt werden, was aus den Werten in Tabelle 7 zu ersehen ist.

Eine in vitro-Prüfung von 36 Pharmaka aus den wichtigsten Indikationsgebieten zeigte auch beim Einsatz von doppelt toxischen Wirkstoffkonzentrationen keinen Einfluß auf die immunologische Digoxin-Bestimmung. Nachuntersuchungen bei späteren Chargen ergaben vereinzelt einen Einfluß von Probenecid bzw. Chlor-diazepoxid bzw. Bromhexin beim Einsatz doppelt toxischer Wirkstoffkonzentrationen. Keine Störung zeigte sich beim Einsatz von hämolytischen, lipämischen, ikterischen und urämischen Seren.

Anschriften der Verfasser:

Dr. E. Munz, A. Kessler
Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica Werk Tutzing,
Tutzing

Dr. P. U. Koller, Prof. Dr. E. W. Busch
Chemische Forschung,
Boehringer Mannheim GmbH
Mannheim

Buchbesprechungen

Enzyme Labelled Immunoassay of Hormones and Drugs

Pal, S. B.
475 Seiten, 1978, 130,- DM
Verlag: Walter de Gruyter & Co.

Grundlage dieses Buches ist ein internationales Symposium, welches im Juli 1978 in Ulm stattfand. Mit diesem Symposium wurde der enormen Entwicklung auf dem Gebiet der Enzym-Immunoassays Rechnung getragen.

Das Werk gliedert sich in drei Abschnitte: Teil 1 befaßt sich mit der Reagentien- und Antisereherstellung sowie der Methodenentwicklung, Teil 2 mit der Bestimmung von Hormonen und Teil 3 mit der Bestimmung von Medikamenten. Sehr ausführlich sind die Beschreibungen der jeweiligen Methoden, und wie die Substanzen, die in den Enzym-Immunoassays eingesetzt werden, hergestellt werden können.

In einem klinischen Routinelabor sind diese Methoden nicht nachzuvollziehen, da die gerätemäßige Ausstattung für die Präparation der einzusetzenden Substanzen in der Regel nicht vorhanden sein wird. Dieses Buch gibt aber einen Überblick, wo die Entwicklung auf dem Gebiet der Enzym-Immunoassays steht und wird für jeden in der Forschung tätigen Mediziner, Chemiker und Biologen eine wertvolle Hilfe und Anregung sein.

K. A.

Intermediär-Stoffwechsel

Leuthardt
950 Seiten, 1977
Walter de Gruyter & Co.

Das bekannte „Lehrbuch der physiologischen Chemie“ wird unter dem Titel „Intermediär-Stoffwechsel“ weitergeführt. Dabei stehen besonders die Stoffwechselreaktionen im Vordergrund. Die allgemeinen biochemischen Fragen werden nicht getrennt, sondern sehr ausführlich in den jeweiligen Stoffwechselkapiteln abgehandelt.

Wie schon früher, stellt der Autor die bestehenden Auffassungen zum Teil wertfrei gegenüber und vermittelt mit reichlichen Literaturhinweisen Zugang zur Originalliteratur. Es handelt sich um ein Grundlagenbuch für alle Mediziner, Chemiker und Biologen, das besonders auch als Nachschlagewerk für spezielle Fragestellungen verwendet werden kann.

K. A.

Hämatologie (Physiologie, Pathologie, Klinik)

Kleihauer, E.
608 Seiten, 1978
Springer-Verlag

Die Entwicklung auf dem Gebiet der Zellkinetik hat zum Verständnis der Physiologie und Pathologie der Zellsysteme beigetragen. Den Lymphozyten und Granulozyten konnten neue Funktionen zugeordnet werden. Daraus ergibt sich auch die Erkennung von Funktionsdefekten. Diesen Funktionen und ihren Defekten ist in dem Werk ein breiter Raum gewidmet. Aber auch neue Erkenntnisse über Membran- und Stoffwechseleigenschaften der Erythrozyten, sowie Störungen der Struktur und Funktion des Hämoglobins werden ausführlich behandelt. Klassische Krankheitsbilder wie die perniziöse Anämie, Eisenmangelanämie, chronische Leukämieformen etc. werden dagegen nur kurz dargestellt. Der pädiatrische Aspekt wird entsprechend der Herkunft der Autoren besonders berücksichtigt. Daher ist das Buch für den Pädiater, aber auch für den Internisten eine wertvolle Hilfe, nicht zuletzt wegen der sehr detaillierten Darstellung der Krankheitsbilder und ihrer Therapie.

K. A. □