

Alpha-1-Fetoprotein-Bestimmung mit einem Enzymimmunoassay. Workshop-Bericht über die klinische Erprobung an 13 Zentren

Erprobungsteam:

R. Allner, Städt. Kliniken Fulda; A. Fateh-Moghadam, Klinikum Großhadern, München; G. Fiorelli und M. Tommasini, Ospedale Maggiore de Milano; H. Joller-Jemelka, Med. Universitätsklinik Zürich; R. Kattermann und P. Haux, Städt. Krankenanstalten Mannheim; R. Kerckhaert und I. Jankowski, Ziekenhuis Lichtenberg Amersfoort; F. H. Kreutz und H. Boeck, Stadt Krankenhaus Kassel; J. D. Kruse-Jares und Ch. Trendelenburg, Chirurg. Universitätsklinik Freiburg; J. Marrink, Academ. Ziekenhuis Groningen; R. Masseyeff, U. E. R. de Médecine Nizza; B. Nørgaard-Pedersen und E. Kjaersgaard, Sonderburg Sygehus; A. Roesler-Englhardt, Rudolf-Virchow-Krankenhaus Berlin; F. Wewalka (†), Universitätsklinik Wien.

Zusammenstellung der Ergebnisse:

W. H. W. Albert, J. Oehler, R. Scherer und G. Staber, Boehringer Mannheim GmbH.

Zusammenfassung:

Ein Enzymimmunoassay zum Nachweis von Alpha-1-Fetoprotein wurde in 13 klinischen Laboratorien auf seine methodische Eignung geprüft. Die gesammelten Erfahrungen bezüglich Praktikabilität, Präzision, Linearität, Störungen und Richtigkeit der Methode wurden im Rahmen eines Workshops vorgestellt. Die Mediane der Variationskoeffizienten in der Serie mit 5–8% und von Tag zu Tag mit 7–13% sind mit Ergebnissen insbesondere von Radioimmunoassays vergleichbar. Störungen durch hämolytische, lipämische und ikterische Seren sowie durch Rheumafaktoren traten nicht auf. Auch üblicherweise in der Tumorbehandlung verwendete Zytostatika beeinflussen das Testergebnis nicht. Die Wiederfindung im Standardserum der WHO lag zwischen 100 und 109%.

Schlüsselwörter:

α_1 -Fetoprotein AFP – Enzymun-Test® AFP – Workshop – Enzymimmunoassay

Summary:

An enzyme immunoassay for the determination of α_1 -fetoprotein was evaluated in 13 clinical laboratories for methodical applicability. During the workshop results were presented on practicability, precision, linearity, interferences and accuracy. The precision (within run median CV 5–8%, between run median CV 7–13%) shows good agreement with the results from radioimmunoassays. No interference was caused by hemolytic, lipemic and icteric sera, neither did cytostatic drugs normally used for tumor treatment influence the results. The recovery of AFP in the WHO standard serum was between 100 and 109%.

Keywords:

α_1 -Fetoprotein AFP – Enzymun-test® AFP – workshop – enzyme immunoassay

Die Bestimmung von Alpha-1-Fetoprotein (AFP) ist im Rahmen der Diagnostik und Therapiekontrolle bestimmter Tumorerkrankungen und in der Schwangerschaftsvorsorge als Indikator von Neutralrohdefekten ein unverzichtbarer Bestandteil des labormedizinischen Leistungsangebotes geworden (1). Um die Bestimmung dieses klinisch bedeutsamen Parameters über Speziallabors hinaus allgemein zugänglich zu machen, wurde ein Enzymimmunoassay entwickelt, der insbesondere Praktikabilität und ausreichende Nachweisempfindlichkeit in sich vereinigen sollte (2). Im Rahmen eines

Workshops wurden im Juni 1980 in München die Ergebnisse der Erprobung dieses neuen Enzymimmunoassays unter klinischen Bedingungen bei 13 Untersuchern unter Verwendung unterschiedlicher Analysengeräte vorgestellt. Der vorliegende Bericht faßt die Ergebnisse dieser multizentrischen Studie mit dem Schwerpunkt Methodenvergleich zu radioimmunologischen Tests, Empfindlichkeit, Präzision und Praktikabilität zusammen. In einem folgenden Bericht werden die Befunde und Diskussion zur diagnostischen Relevanz vorgestellt.

Testdurchführung

Eine detaillierte Testbeschreibung wurde bereits früher in dieser Zeitschrift vorgestellt (2). Abbildung 1 zeigt das Schema des Reaktionsablaufes. Es handelt sich um einen „Sandwich“-assay mit GOD-markierten Antikörpern. Als Indikatorsystem findet die schon in anderen Tests bewährte Kombination von POD/ABTS[®] Verwendung.

Die Auswertung erfolgt über eine Eichkurve mit 5 Standards im Konzentrationsbereich von 3–240 ng/ml AFP, die Qualitätskontrolle über ein beigegebenes Kontrollserum.

Die bei der klinischen Erprobung zur Messung eingesetzten Geräte sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tab. 1.: Zusammenstellung der zur Erprobung eingesetzten Geräte

Labor	Gerät
1	LKB 7400
2	Vitatron Universal Photometer
3	Eppendorf PCP 6121 mit Probentisch
4	Eppendorf 6115
5	Beckman Mod. 25
6	Pye Unicam SP 1750
7	Saitron
8	Gilford
9	Zeiss PMQ II
10	Eppendorf 6115
11	Eppendorf PCP 6121
12	Eppendorf PCP 6121
13	Photometer 4010

Tab. 2.: Daten zur Präzision von Enzymun-Test[®] AFP. Die Messungen wurden in Humanserumpools in 3 Konzentrationsbereichen durchgeführt.

Konzentration (ng/ml)		Mediane der Variationskoeffizienten (%)
Median	Mittelwert	
VK in der Serie (n = 30)		
10,9	10,0	8,1
98,0	96,9	4,7
198,0	211,3	5,2
VK von Tag zu Tag (n = 3 Analysen an 10 Tagen)		
10,5	10,4	12,7
85,5	89,4	8,5
180,0	189,2	6,6
VK von Tag zu Tag (n = 2 Analysen an 10 Tagen)		
10,0	10,2	19,8
98,0	88,9	9,5
184,0	192,5	8,6

A: VK in der Serie (n = 30) Mittelwerte, Mediane und Range berechnet aus den Konzentrationen aller Teilnehmerlaboratorien

B: VK von Tag zu Tag (n = 10) Mittelwerte, Mediane und Range berechnet aus den Konzentrationen aller Teilnehmerlaboratorien in 3fach-Bestimmungen

C: VK von Tag zu Tag (n = 10) Mittelwerte, Mediane und Range berechnet aus den Konzentrationen von 4 Laboratorien in 2fach-Bestimmungen

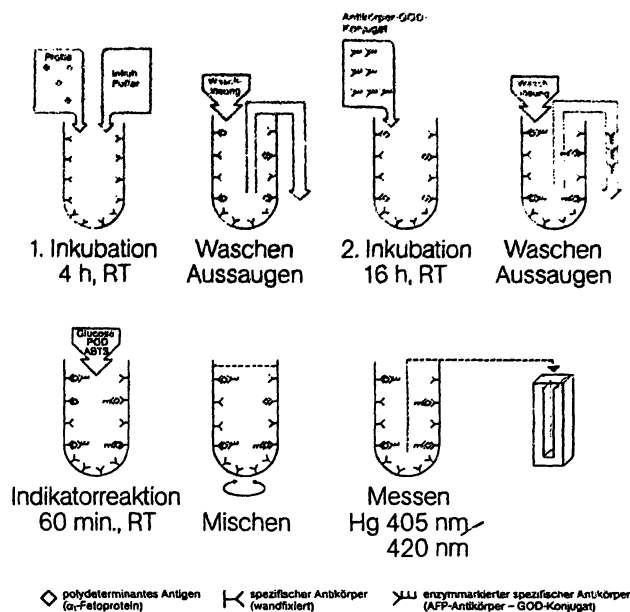


Abb. 1.: Arbeitsschema Enzymun-Test[®] AFP

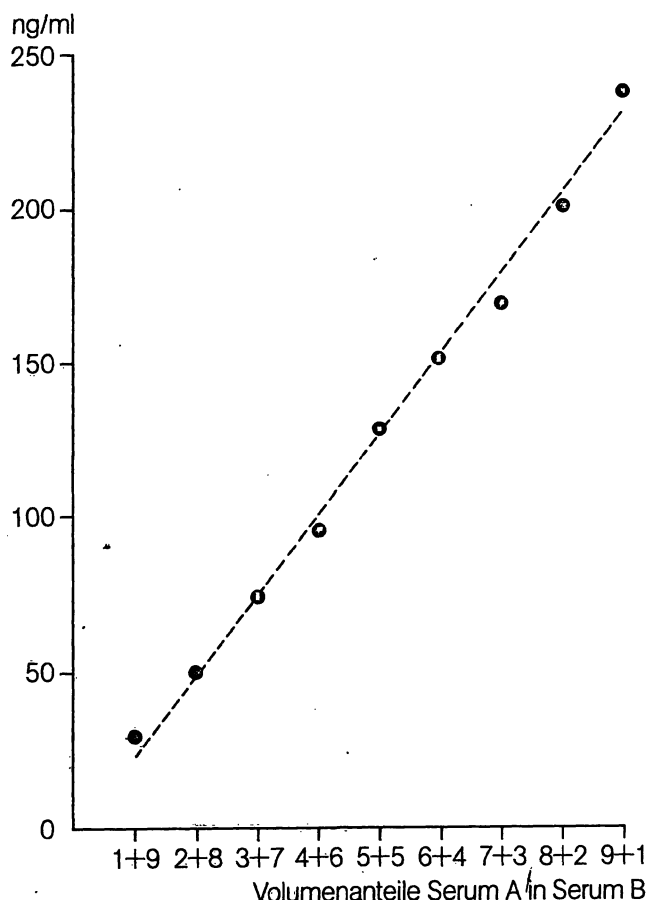


Abb. 2.: Lineares Verhalten der Extinktionswerte bei Verdünnung. A: Serum hoher AFP-Konzentration (< 240 ng/ml). B: Serum niedriger AFP-Konzentration (< 20 ng/ml); Ergebnisse Labor 10

Ergebnisse und Diskussion

Präzision, Linearität und Verdünnungsgrenze

Die Testpräzision wurde in 3 Konzentrationsbereichen durch Bestimmung der Variationskoeffizienten in Serie und von Tag zu Tag charakterisiert (Tab. 2). Die in der Tabelle 2 aufgeführten Daten für die Präzision von Tag zu Tag, berechnet aus Zweifachanalysen, verdeutlichen, daß Doppelbestimmungen empfohlen werden können.

Zur Überprüfung der Linearität bei Verdünnung wurden Seren mit hohen AFP-Konzentrationen mittels AFP-armen Humanseren, Tierseren verschiedenen Ursprungs und einer 5%igen RSA-Pufferlösung verdünnt, da die Verwendung von reinen Puffersubstanzen aufgrund eines von anderen Enzymimmunoassays her bekannten Matrixeffektes problematisch ist.

Abbildung 2 zeigt das lineare Verdünnungsverhalten im untersuchten Konzentrationsbereich. Es wurde empfohlen, AFP-

armes Humanserum als Verdünnungsmedium einzusetzen. Bei Sandwich-Tests ist aus der Literatur bekannt, daß Seren mit sehr hohen Antigenkonzentrationen falsch zu niedrige Werte ergeben können, wenn sie unverdünnt in den Test eingesetzt werden. Innerhalb dieses Workshops wurde nur über ein einziges Hepatom-Serum mit $>160\,000$ ng/ml (Labor 7) berichtet, das unverdünnt nicht als erhöht erkannt wurde. Unverdünnte Seren mit Konzentrationen unter $70\,000$ ng/ml wurden ausnahmslos richtig als erhöht erkannt.

Methodenvergleich, Ringversuch und Wiederfindung

Da eine unabhängige chemische Referenzmethode zur AFP-Bestimmung fehlt, wurden handelsübliche Radioimmunoassays (Abbott und Behring), jeweils ein im Teilnehmerlabor selbst entwickelter Radioimmunoassay (Labor 9) sowie ein Enzymimmunoassay (Labor 7) mit Enzymun-Test® AFP in Humanseren über den gesamten Meßbereich verglichen. Die

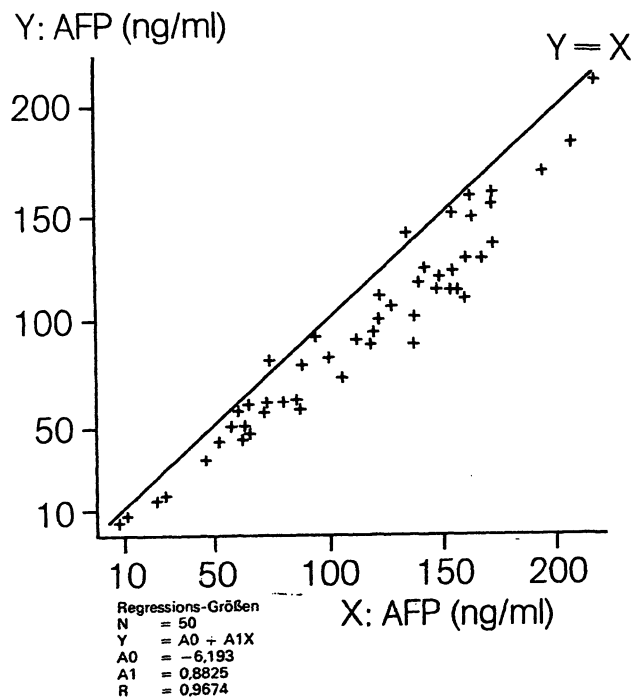


Abb. 3: Methodenvergleich AFP: RIA (Y) gegen Enzymun-Test® AFP (X)

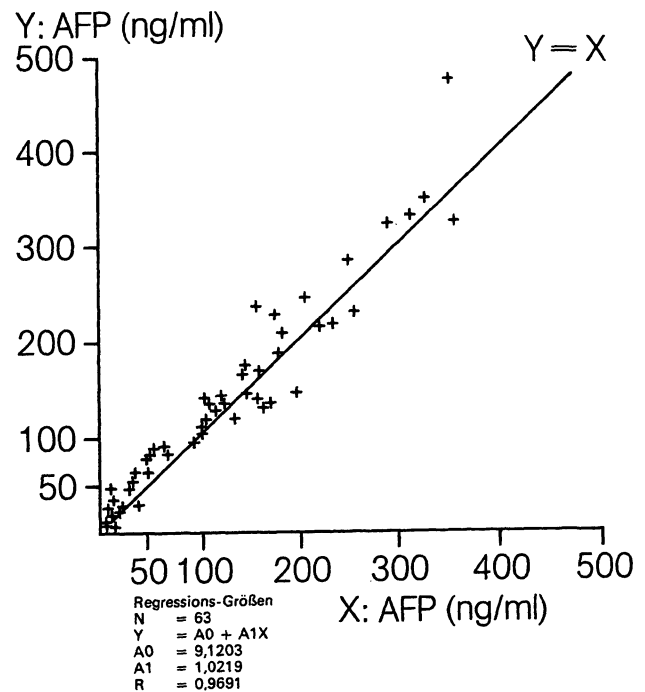


Abb. 4: Methodenvergleich AFP: RIA B (Y) gegen Enzymun-Test® AFP (X)

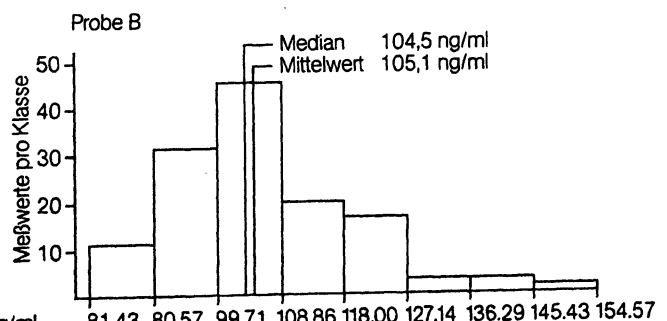
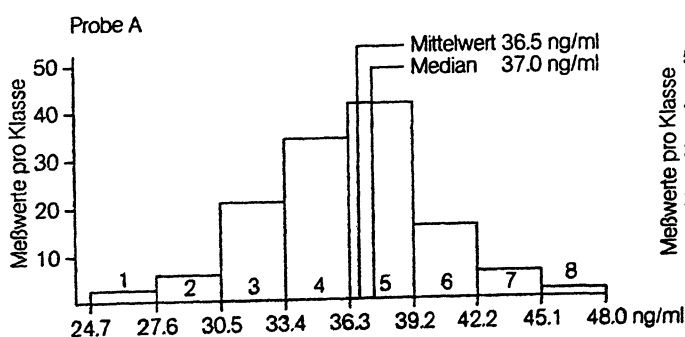


Abb. 5: Ringversuch mit Einteilung der Meßwerte in Klassen; n = 2 Analysen an 5 Tagen für 2 Proben A und B in 13 Laboratorien $\bar{x}$ = Mittelwert aus den 130 Einzelwerten aller Teilnehmerlaboratorien, Med. = Median aus den 130 Einzelwerten aller Teilnehmerlaboratorien

Tab. 3: Regressionsgrößen der Methodenvergleiche für $y = a_0 + a_1 \cdot x$

Methode	N	a_0	a_1	r
RIA A	71	7,43	0,78	0,87
	70	0,59	0,79	0,94
	43	2,46	0,71	0,92
	41	2,28	0,83	0,96
	71	7,36	0,59	0,88
RIA B	50	6,19	0,88	0,97
	63	9,12	1,02	0,97
RIA C	93	5,68	1,13	0,88
	49	2,10	0,97	0,99
EIA	81	0,99	0,92	0,95

N = Anzahl der Wertepaare; x = Enzymun-Test® AFP; y = Vergleichsmethode

Regressionsgrößen der Methodenvergleiche mit Humanserum sind in Tabelle 3 wiedergegeben. Zwei repräsentative Ergebnisse des Methodenvergleichs sind in Abbildung 3 und 4 dargestellt.

In einigen Labors wurde mit einer kleinen Probenzahl ein Methodenvergleich mit *Amnionflüssigkeit* gegenüber der Laurell-Rocket-Immunelektrophorese durchgeführt. Ergebnisse aus Labor 2 zeigt Tabelle 4.

Versuche zur Richtigkeit des Enzymun-Test® AFP wurden u. a. im WHO-Standardserum, Präparations-Nr. 72/225, in mehreren Verdünnungsstufen durchgeführt. Es ergab sich eine Wiederfindung zwischen 100 und 109%, außerdem wurde der Umrechnungsfaktor 1 U = 1,5 ng/ml von Labor 9 bestätigt.

Alle beteiligten Laboratorien nahmen an einem Ringversuch teil, für den 2 Proben unterschiedlichen AFP-Gehalts an 5 Tagen mit Doppelbestimmungen untersucht wurden. Das Ergebnis ist in Abbildung 5 dargestellt.

Es resultierte eine gute Übereinstimmung von Median- und Mittelwert in beiden Proben bei annähernd normal verteilten Seren. Der VK der gesamten Ergebnisse aller 13 Laboratorien betrug bei Probe A (ca. 40 ng/ml) 11,1%, bei Probe B (ca. 100 ng/ml) 11%.

Störungen durch Metabolite und Pharmaka

In Labor 10 wurden lipämische (Triglyceride bis 6 g/l), ikterische (Bilirubin bis 1 g/l) und hämolytische Seren (Hämoglobin bis 1 g/l) untersucht. Es wurden keine Störungen beobachtet.

37 Pharmaka (3) wurden Humanserum in doppelt toxischer Konzentration zugesetzt und beeinflussten den Test nicht. Zusätzlich wurde der Einfluß von 8 Zytostatika in vitro überprüft.

Störungen des Tests, hervorgerufen durch einen dieser Wirkstoffe, konnten nicht festgestellt werden.

Tab. 4: Vergleich Laurell-Rocket-Immunelektrophorese mit Enzymun-Test® AFP in Amnionflüssigkeit (Doppelbestimmung).

Verdünnung bei A mit Humanserum niedrigen AFP-Gehalts und bei B mit Inkubationspuffer (Labor 2).

Amnionflüssigkeit	Konzentration Laurell-Technik	Konzentrationen Enzymun-Test® AFP	
		A	B
Probe 1	33 µg/ml	33 µg/ml	37 µg/ml
Probe 2	10 µg/ml	13 µg/ml	14 µg/ml
Probe 3	28 µg/ml	33 µg/ml	35 µg/ml

Schrifttum:

1. Report of the U.K. Collaborative Study on alpha-fetoprotein in relation to neural tube defects. Maternal serum alpha-fetoprotein measurement in antenatal screening for anencephaly and Spina bifida in early pregnancy. Lancet I, 1323–1332 (1977). WEITZEL, H. K., SCHUMANN, K.: Praenatale Diagnostik von Neuralrohrdefekten mit Hilfe der AFP-Bestimmung. Ärtzl. Lab. 26, 195–199 (1980).
2. ALBERT, W. H. W., STÄHLER, F., GRUBER, W.: Enzymimmunologische Quantifizierung von AFP (AFP-ELISA). Lab. med. 2, 31–35 (1978).
3. Liste enthalten in Testreport Creatinin enzymatisch, Boehringer Mannheim; Auf Anforderung vom Hersteller erhältlich.

Korrespondenzanschrift:

Gertrud Staber
Boehringer Mannheim GmbH
Erprobung Diagnostika
Biochemica Werk Tutzing
Bahnhofstraße 9–15
8132 Tutzing

