

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 16, 1978, pp. 335–342

Bestimmung von Digoxin im Serum Vergleich von Radioimmunassay und heterogenem Enzymimmunassay

Von K. Borner

Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Freien Universität Berlin, Klinikum Steglitz und

N. Rietbrock

Institut für Klinische Pharmakologie der Freien Universität Berlin, Klinikum Steglitz

(Eingegangen am 7. November 1977/16. Februar 1978)

Herrn Professor Dr. Dr. Ernst Schütte zum 70. Geburtstag gewidmet

Zusammenfassung: Es werden erste praktische Erfahrungen mit einem heterogenen Enzymimmunassay (EIA, Typ ELISA)¹⁾ zur Bestimmung von Digoxin im Serum berichtet und mit den Ergebnissen eines Radioimmunassays (New England Nuclear, ¹²⁵I-Digoxin) verglichen. Die Nachweisgrenze beträgt etwa 0,3 µg/l (0,4 nmol/l). Der Meßbereich erstreckt sich von 0,3 bis 5,0 µg/l (0,4 bis 6,4 nmol/l). Die Präzision in Serie liegt bei 7–11 % und die Präzision von Tag zu Tag bei 8–14%. Zu Albumin-Lösungen und Pool-Serum zugesetztes Digoxin wurde zu 87 bis 106% wiedergefunden. 116 Serumproben von Patienten, die ausschließlich Digoxin einnahmen, ergeben im Vergleich zum Radioimmunassay (RIA) keinen systematischen Unterschied. Gleichung der mittleren Regressionsgeraden:

$C_{ELISA} = 0,954 \cdot C_{RIA} + 0,14$ (µg/l bzw. 0,18 nmol/l). Jedoch bestehen im Einzelfall merkliche Differenzen. Digoxin ergibt *in vivo* und *in vitro* je nach Konzentration eine Kreuzreaktion von 7 bis 14%. Bei 68 Patienten, die zusätzlich Spironolacton einnahmen, ergab der Enzymimmunassay durchschnittlich 0,48 µg/l (0,64 nmol/l) höhere Ergebnisse als der Radioimmunassay (Bereich 0,14 bis 1,14 µg/l bzw. 0,18 bis 1,46 nmol/l; $p < 0,01$ %). In Bezug auf Praktikabilität entspricht der ELISA weitgehend dem analogen Radioimmunassay mit solid phase technique.

Determination of digoxin in serum. Comparison of radioimmunoassay and a heterogeneous enzyme immunoassay

Summary: This paper describes the evaluation of a heterogeneous enzyme immunoassay (EIA, subtype ELISA) for the determination of digoxin in serum. Results are compared with those obtained from a radioimmunoassay (New England Nuclear, ¹²⁵I-Digoxin). The limit of detection is 0.3 µg/l (0.4 nmol/l). The range of the test is from 0.3 unto 5.0 µg/l (0.4–6.4 nmol/l). Within-batch precision ranged from 7 to 11 %, between-batch precision from 8–14%. Pure digoxin, added to solutions of albumin and pooled sera, gave recoveries between 87 and 106%. 116 sera from patients taking digoxin exclusively yielded no systematic difference compared to the results of a radioimmunoassay (RIA) (equation of the bivariate regression: $C_{ELISA} = 0.954 \cdot C_{RIA} + 0.14$ (µg/l) (0.18 nmol/l). Nevertheless marked differences between both tests were observed in individual cases. Digoxin yielded *in vitro* and *in vivo* a cross-reactivity of 7 to 14% depending upon the concentration. In 68 sera from patients, taking digoxin plus spironolactone, we found results that were on average 0.48 µg/l (0.64 nmol/l) higher with the ELISA than with the RIA ($p < 0.01$ %). With respect to practicability the ELISA test for digoxin is very similar to the analogous RIA both using the solid phase technique.

Einführung

Die regelmäßige Kontrolle der Serum-Konzentration von Digoxin hat die Therapie mit Digoxin sicherer und zuverlässiger gemacht (1, 2). An eine dafür geeignete Analyse-methode werden hohe Anforderungen in Bezug auf Nachweis-Empfindlichkeit und Spezifität gestellt. Bis

Ende 1975 war der Radioimmunassay (RIA) die einzige Methode, die praktikabel genug war, für klinische Routine-Zwecke eingesetzt werden zu können (3). Der den Einsatz des Radioimmunassay stark limitierende Faktor war die Notwendigkeit des Umgangs mit radioaktivem Material. Mit dem Aufkommen von enzym-markierten Liganden wurden Immunassays vorgeschlagen (Übersicht

bei i.c. (4)), die diesen Nachteil nicht aufweisen. Beim Enzymimmunoassay ersetzt ein Enzym den radioaktiven Indikator (engl. marker). So entwickelten Chang et al. (5) einen homogenen Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Digoxin, über dessen Anwendung inzwischen mehrfach berichtet wurde (6–10). Alternativ dazu wird seit kurzem ein heterogener Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Digoxin angeboten (11), der die sog. solid phase technique des Radioimmunoassay verwendet, die von ihren Beschreibern das Akronym ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)¹⁾ erhielt (12).

Der Test besteht aus 3 Schritten:

1. Konkurrierende Bindung von freiem Digoxin und enzymmarkiertem Digoxin an den wandständigen Antikörper.
2. Trennen von gebundenem und freiem Hapten-Enzym durch Dekantieren und
3. Bestimmen der Antikörper-gebundenen, wandständigen Enzymaktivität.

Der hier geprüfte Test verwendet Peroxidase (EC 1.11.1.7) als Indikator. Die vorliegende Arbeit berichtet über praktische Erfahrungen mit der Bestimmung von Digoxin im Serum durch einen heterogenen Enzymimmunoassay im Vergleich zu einem in der Praxis bewährten Radioimmunoassay. Dabei sollte geklärt werden, ob der heterogene Enzymimmunoassay den Radioimmunoassay in Bezug auf Zuverlässigkeit und Praktikabilität erreicht.

Material und Methoden

Klinische Proben

Verwendet wurden Seren von Patienten des Klinikums Steglitz und von externen Einsendern. Die Blutabnahme erfolgte frühestens 12 Stunden nach der letzten Medikamenteneinnahme. Die Proben wurden in der Regel am Tage der Entnahme verarbeitet.

Reagenzien und Bestimmungsmethoden

Alle RIA-Bestimmungen wurden doppelt, die ELISA-Bestimmungen dreifach durchgeführt.

Radioimmunoassay von Digoxin

Test RIA-NEN Digoxin der Fa. New England Nuclear (North Billerica, Mass.) Prinzip: ¹²⁵J-Markierung von Digoxin, Solid phase assay system.

Radioimmunoassay von Digitoxin

¹²⁵J Gamma coat digitoxin der Fa. Clinical Assays (Cambridge, Mass.). Prinzip: ¹²⁵J-Markierung von Digitoxin, Solid phase assay system.

Heterogener Enzymimmunoassay zur Digoxin-Bestimmung
Enzymun-Test Digoxin, Best. Nr. 199656, Fa. Boehringer (Mannheim). Chargen Nummern 1046504, 1186307, 1256108.

Analytisches Verfahren des heterogenen Enzymimmunoassays

1. Kompetitive Bindung
0,1 ml Standard/Serum/Kontrollserum
1,0 ml Reaktionsgemisch (Phosphatpuffer Peroxidase-markiertes Digoxin)
Inkubation in Antikörper-beschichteten Röhrchen über 60 Minuten bei Raumtemperatur.
2. Trennung von gebundenem und freiem Indikator:
Absaugen des Inkubationsgemisches und Waschen der Röhrchen.
3. Indikatorreaktion der Antikörper-gebundenen Peroxidase:
Füllen der Röhrchen mit 1 ml Puffer-Substratgemisch (Perborat und 2,2'-Azino-di[3-ethyl-benzthiazolinsulfonsäure(6)], ABTS)
Inkubation 60 min bei 25°C.
4. Messen der Extinktion des Inkubationsgemisches bei 405 nm.
5. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels gezeichneter Bezugskurven.

Glykoside

Digoxin, Fa. Merck (Darmstadt), Nr. 3047, Digitoxin, Fa. Merck (Darmstadt), Nr. 3044.

Kontrollseren

Firmen Boehringer, Dade und New England Nuclear.

Meßgeräte

Elektronischer Dilutor (Firma Brand, Wertheim).
Digitalphotometer Eppendorf 6115S (Eppendorf Gerätebau, Hamburg) mit Absaugküvette und Drucker 6522.
Szintillationsspektrometer Autogamma 5130 (Packard Instruments, Darmstadt).

Statistik

Standard-Methoden (13).
Bivariate Regressionsanalyse (14).

Ergebnisse

Bezugskurven, Meßbereich und Nachweisgrenze
Abbildung 1 zeigt eine typische Bezugskurve ohne Skalentransformation. In der Anfangszeit der Erprobung wurden gelegentlich auch angedeutet sigmoide Bezugskurven ermittelt. Bei Inhibierung des Enzyms mit Natriumazid erreicht die Kurve fast die Absorption 0, gemessen gegen einen stabilen Reagenzienleerwert von $A = 0,600$ bis $0,800$. Die Nachweisgrenze beträgt näherungsweise $0,3 \mu\text{g/l}$ ($0,4 \text{ nmol/l}$). Der von Meßpunkten eingeschlossene Bereich reicht von $0,75$ bis $5,0 \mu\text{g/l}$, in neueren Packungen von $0,3$ bis $5,0 \mu\text{g/l}$ ($0,38$ bis $6,40 \text{ nmol/l}$). Eine reziproke Darstellung ($1/A = f(c)$) der Abbildung 1 ergibt eine aufwärts gekrümmte Kurve.

¹⁾ Im Text verwendete Abkürzungen:
ELISA enzyme linked immuno sorbent assay
RIA radioimmunoassay

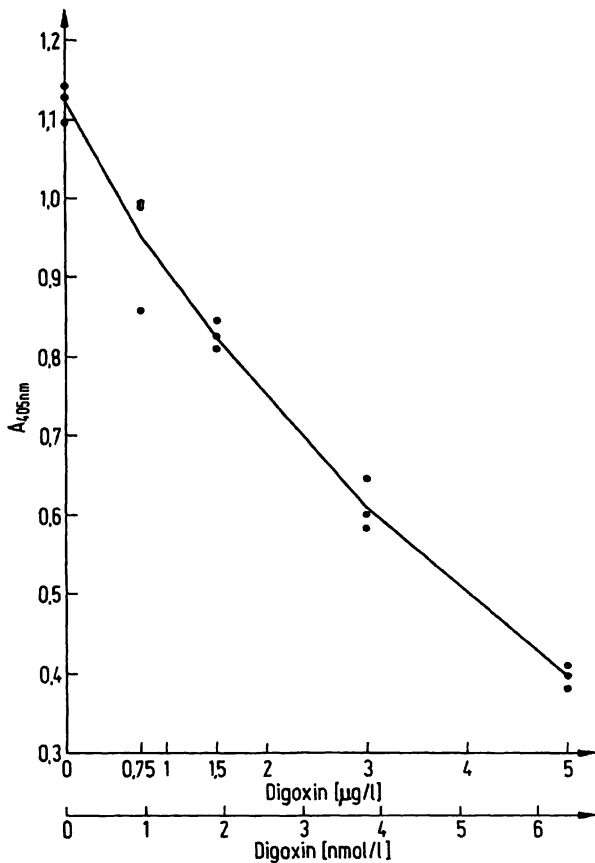


Abb. 1. Bezugskurve für Digoxin-ELISA.

Präzision

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Präzision in Serie des ELISA. Gleichzeitig wurde die Präzision in Serie mit dem RIA zu Vergleichszwecken bestimmt. Die Variationskoeffizienten liegen zwischen 3 und 11%.

Die Präzision von Tag zu Tag lag für den ELISA zwischen 8 und 14% und mit den gleichen Kontrollproben für den RIA bei 9 bis 15% (Tab. 2).

Dabei ist jedoch zu beachten, daß beim ELISA jeweils Dreifachbestimmungen, beim RIA jedoch nur Doppelbestimmungen ausgeführt wurden.

Richtigkeit

Die Überprüfung der Methode mit Kontrollseren ergab die in Tabelle 2 angegebenen Werte. Zum Vergleich enthält Tabelle 2 ebenfalls die mit dem RIA gefundenen Ergebnisse.

Die für den ELISA vom Hersteller gelieferten Kalibrierlösungen ergaben mit dem RIA innerhalb der Fehlerbreite übereinstimmende Ergebnisse (Tab. 3).

Ein Zusatz von Digoxin zu einem Serumgemisch mit niedriger Digoxin-Konzentration ergab bei Zusatz von 1 bis 3 µg/l (1,28 bis 3,84 nmol/l) Wiederfindungsanteile von 99 bis 106% (Tab. 4).

Tab. 1. Präzision in Serie.

Material	Methode	Sollwert (µg/l)	(nmol/l)	Istwert, \bar{x} (µg/l)	(nmol/l)	n	VK _{Serie} (%)
Lederle (Charge 2945-406)	RIA	3,25	(4,16)	3,61	(4,63)	12	3,2
	ELISA	3,25	(4,16)	3,01	(3,85)	9	7,5
Kontrollserum (RIA-NEN)	RIA	3,00	(3,84)	3,19	(4,08)	20	2,9
Boehringer 3	ELISA	2,50	(3,20)	2,42	(3,10)	7	11

Tab. 2. Richtigkeit und Präzision von Tag zu Tag.

Material	Methode	Sollwert (µg/l)	(nmol/l)	Istwert, \bar{x} (µg/l)	(nmol/l)	n	VK (%)
Lederle I (Charge 2945-405)	ELISA	1,09*	(1,40)	0,85	(1,09)	7	13
Lederle I (Charge 2945-405)	RIA	1,09	(1,40)	1,04	(1,33)	4	15
Lederle II (Charge 2945-406)	ELISA	3,25*	(4,16)	3,40	(4,36)	13	13,7
Lederle II (Charge 2945-406)	RIA	3,25	(4,16)	3,39	(4,34)	8	9,2
Boehringer 3	ELISA	2,50	(3,20)	2,53	(3,24)	5	8,1
Boehringer 4	ELISA	4,00	(5,12)	3,90	(4,99)	4	11,8
Boehringer 6	ELISA	2,50	(3,20)	2,54	(3,25)	14	11,4

* Der angegebene Sollwert wurde mit einem RIA ermittelt.

Tab. 3. Vergleich mit Kalibrier-Lösungen.

Kalibrierlösung angegebener Wert Boehringer ($\mu\text{g/l}$)	(nmol/l)	mit RIA-NEN gefundener Wert ($\mu\text{g/l}$)	(nmol/l)
0	(0)	0,18	(0,23)
0,75	(0,96)	0,60	(0,77)
1,50	(1,92)	1,38	(1,77)
3,00	(3,84)	3,08	(3,94)
5,00	(6,40)	5,01	(6,41)

Bei Zusatz von 3 $\mu\text{g/l}$ (3,84 nmol/l) Digoxin zu wässrigen Albumin-Lösungen wurden 87 bis 97% der Einwaage wiedergefunden. Eine Abhängigkeit von der Albuminkonzentration (10, 20, 30, 40, 50 g/l) besteht nicht.

Methodenvergleich

In 116 Serumproben von Patienten, die *ausschließlich* Digoxin einnahmen, wurde Digoxin mit dem ELISA und dem RIA bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 dargestellt. Ein statistischer Vergleich beider Kollektive ergibt keinen signifikanten Unterschied (Tab. 5). Auch die mittlere Regressionsgerade weicht nur geringfügig von der Winkelhalbierenden ab.

Spezifität

Digitoxin

Wässrige Lösungen von Digitoxin und in vitro mit Digitoxin versetztes Pool-Serum von 5 gesunden Personen unter 30 Jahren ergibt eine Kreuzreaktion in Digoxin-ELISA von 7 bis 14% (Tab. 6). Die Kreuzreaktion ist konzentrationsabhängig.

Bei Seren von Patienten, die Digitoxin einnahmen, ist die Kreuzreaktion merklich höher. Sie beträgt für den Digoxin-ELISA zwischen 12 und 40% bei Digitoxinkonzentrationen zwischen 10 und 38 $\mu\text{g/l}$ (13,1 und 49,7 nmol/l) (Tab. 7). Die zum Vergleich gleichzeitig bestimmte Kreuzreaktion des Digoxin-RIA liegt zwischen 3 und 15%.

Tab. 4. Wiederfindung von Digoxin mit dem ELISA.

Zu je 2 ml eines Pool-Serums wurden je 1 ml Digoxin-Lösung (0,07 mol/l Phosphatpuffer pH 7,4) hinzugefügt. Jede Konzentration wurde 6-fach bestimmt.

Material	Digoxin zugesetzt ($\mu\text{g/l}$)	(nmol/l)	Digoxin gefunden ($\mu\text{g/l}$)	(nmol/l)	Digoxin gefunden - Leerwert ($\mu\text{g/l}$)	(nmol/l)	Wieder- findung (%)	VK Serie (%)
Pool-Serum	0	(0)	0,20	(0,26)	0	0	-	-
Pool-Serum	1,0	(1,28)	1,24	(1,59)	1,04	(1,33)	104	17
Pool-Serum	2,0	(2,56)	2,32	(2,97)	2,12	(2,71)	106	12
Pool-Serum	3,0	(3,84)	3,16	(4,05)	2,96	(3,79)	99	12

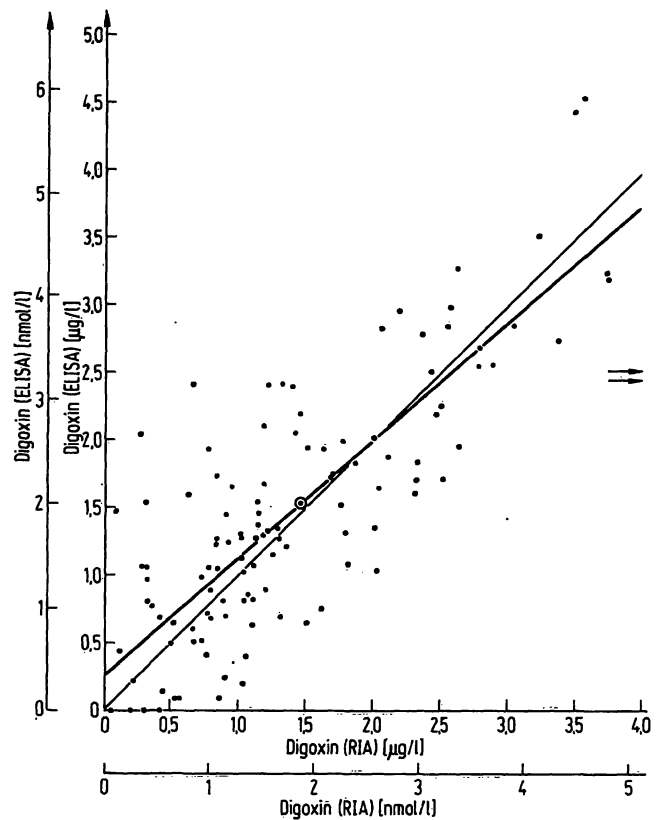


Abb. 2. Vergleich der Ergebnisse von Digoxin-Bestimmungen bei Patienten, die keine zusätzlichen Medikamente erhielten.

Dünne Linie: Winkelhalbierende.

Starke Linie: mittlere Regressionsgerade N = 116

Steigung der mittleren Regressionsgeraden = 0,954

Achsenabschnitt = 0,139 $\mu\text{g/l}$

[= 0,178

nmol/l)

Korrelationskoeffizient

= 0,810

Spiroolacton

Die Bestimmung von Digoxin in 68 Seren von Patienten, die zusätzlich Spiroolacton einnahmen, ergab mit dem ELISA um durchschnittlich 0,48 $\mu\text{g/l}$ (0,62 nmol/l) höhere Ergebnisse als mit dem RIA (vgl. Abb. 3). Statistische Vergleiche zeigen einen signifikanten Unterschied (Tab. 8).

Tab. 5. Statistischer Vergleich der Ergebnisse von Digoxin-Bestimmungen mit RIA und ELISA (13). Patienten ohne Zusatz-Medikation.

1. Vorzeichen-Test nach *Dixon & Mood* für Paardifferenzen:
 $N = 116$ $N_+ = 58$ $N_- = 56$ $N_0 = 2$ $f = 113$
 Kein signifikanter Unterschied.

2. Prüfung der Paardifferenzen (d) mit dem t-Test nach *Student*:
 $\bar{d} = \bar{c}_{ELISA} - \bar{c}_{RIA} = 0,08526 \text{ } (\mu\text{g/l}) = 0,1092 \text{ } (\text{nmol/l})$
 $s_{\bar{d}} = 0,05810 \text{ } (\mu\text{g/l}) = 0,0744 \text{ } (\text{nmol/l})$
 $\hat{t} = 1,467$
 $t_{115; 0,10} = 1,66 \quad \hat{t} < t.$
 Kein signifikanter Unterschied.

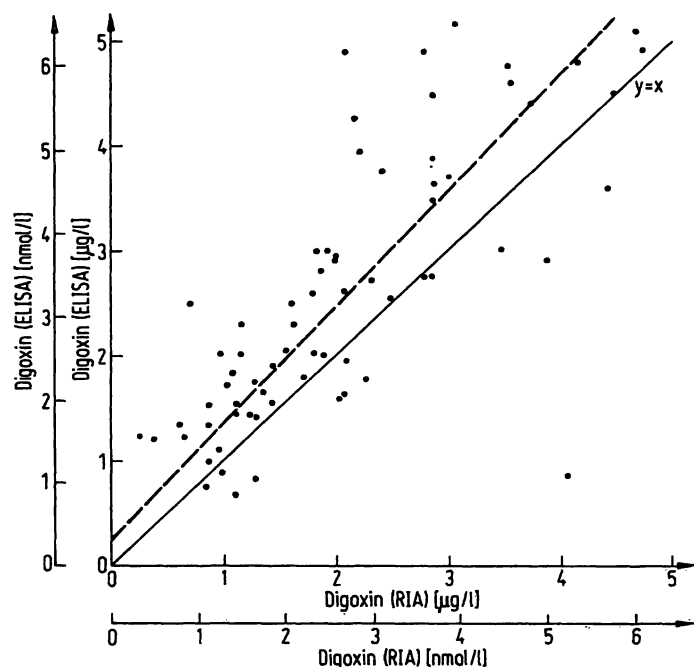


Abb. 3. Vergleich der Ergebnisse von Digoxin-Bestimmungen bei Patienten, die zusätzlich Spironolacton einnehmen.

Ausgezogene Linie: Winkelhalbierende.
 Gestrichelte Linie: mittlere Regressionsgerade
 $n = 68$
 Steigung der Regressionsgeraden $= 1,123$
 Achsenabschnitt der Regressionsgeraden $= 0,12 \mu\text{g/l}$
 $[= 0,154 \text{ } (\text{nmol/l})$
 Korrelationskoeffizient $= 0,714$

Störungen

Eine Serie von Kontrollseren (TRI-RAC, Dade) ergab eine totale Hemmung der Enzymaktivität. Die Struktur des Konservierungsmittels ist aus den Unterlagen nicht ersichtlich.

Diskussion

An eine Bestimmungsmethode von Digoxin im Serum zur Therapiekontrolle sind relativ hohe Anforderungen in Bezug auf Nachweisempfindlichkeit und Spezifität zu stellen.

Die ausführliche Erstbeschreibung des von uns geprüften heterogenen Enzymimmunoassays durch seine Autoren steht noch aus (vgl. l.c. (11)). Infolgedessen sind Angaben über die biochemischen Spezifikationen, z. B. die Art der Antikörper-Erzeugung oder die Parameter der Antigen-Antikörperreaktion, unvollständig. Der Test wird als Fertigpackung seit dem August 1977 offiziell im Handel angeboten (15). Unsere Erfahrungen beziehen sich auf Reagenzien, die uns freundlicherweise vor der Freigabe zur Verfügung gestellt wurden und sich möglicherweise vom endgültigen Produkt noch etwas unterscheiden können. Es interessierte uns vor allem die Frage, inwieweit der heterogene Enzym-Immunoassay (ELISA) in Bezug auf Zuverlässigkeit und Praktikabilität dem derzeit bei uns routinemäßig verwendeten Radioimmunoassay (RIA) gleichwertig ist. Beide Tests benutzen die sog. solid phase Technik, unterscheiden sich jedoch in der Hapten-Indikatorbindung und in der Indikator-Reaktion.

Zuverlässigkeit

Nachweisgrenze und Meßbereich

Die Nachweisempfindlichkeit und der Meßbereich genügen den klinischen Ansprüchen. Eine Vorverdünnung der Serumprobe ist nur selten erforderlich. Die Indikatorreaktion des ELISA liefert gut meßbare Signale bei stabilem Untergrund.

Tab. 6. In vitro Kreuzreaktion von Digoxin.

Material	Digitoxin, zugesetzt ($\mu\text{g/l}$)	Digitoxin, zugesetzt (nmol/l)	„Digoxin-ELISA“ gefunden ($\mu\text{g/l}$)	„Digoxin-ELISA“ gefunden (nmol/l)	Kreuzreaktion (%)
Wäßrige Lösung	9,75	(12,7)	1,40	(1,79)	14,4
Wäßrige Lösung	14,63	(19,1)	1,79	(2,29)	12,3
Wäßrige Lösung	19,51	(25,5)	2,22	(2,84)	11,4
Wäßrige Lösung	24,39	(31,8)	2,65	(3,39)	10,9
Wäßrige Lösung	34,15	(44,6)	2,49	(3,19)	7,3
Serum* (2000 μl + 50 μl Zusatz)	9,75	(12,7)	1,24	(1,59)	12,7
Serum* (2000 μl + 50 μl Zusatz)	14,63	(19,1)	1,62	(2,07)	11,1
Serum* (2000 μl + 50 μl Zusatz)	19,51	(25,5)	1,83	(2,34)	9,4
Serum* (2000 μl + 50 μl Zusatz)	24,39	(31,9)	1,85	(2,37)	7,8
Serum* (2000 μl + 50 μl Zusatz)	34,15	(44,6)	2,35	(3,01)	6,9

* Das Serum war ein Gemisch von 5 Seren gesunder Personen von unter 30 Jahren ohne nachweisbaren Digoxin-Gehalt.

Tab. 7. In vivo Kreuzreaktion von Digitoxin.

In Seren von Patienten, die Digitoxin eingenommen hatten, wurde neben Digitoxin auch Digoxin mit RIA und ELISA bestimmt.

Proben-Nr.	Digitoxin RIA		Digoxin RIA		„Kreuz-Reaktion“ des RIA (%)	Digoxin-ELISA		„Kreuz-Reaktion“ des ELISA (%)
	($\mu\text{g/l}$)	(nmol/l)	($\mu\text{g/l}$)	(nmol/l)		($\mu\text{g/l}$)	(nmol/l)	
543	37,6	(49,1)	1,49	(1,91)	4,0	4,32	(5,53)	11,5
534	25,4	(33,2)	1,07	(1,37)	4,2	3,82	(4,89)	15,0
531	18,0	(23,5)	0,84	(1,08)	4,7	2,81	(3,60)	15,6
509	15,7	(20,5)	0,95	(1,22)	6,0	3,37	(4,32)	21,5
523	10,1	(13,2)	1,56	(2,00)	15,4	2,88	(3,69)	28,5
497	10,2	(13,3)	0,61	(0,78)	6,0	2,48	(3,18)	24,3
516	12,3	(16,1)	0,57	(0,73)	4,6	3,38	(4,33)	27,6
569	17,3	(22,6)	0,81	(1,04)	4,7	3,58	(4,58)	20,7
570	12,4	(16,2)	1,96	(2,51)	15,8	5,00	(6,40)	40,3
571	18,7	(24,4)	0,71	(0,91)	3,8	4,00	(5,12)	21,9
651	15,7	(20,5)	0,62	(0,79)	4,0	2,29	(2,93)	14,6
661	17,1	(22,4)	0,45	(0,58)	2,6	2,56	(3,28)	15,0
680	18,9	(24,7)	0,63	(0,81)	3,3	2,50	(3,20)	13,2
683	19,5	(25,5)	1,44	(1,84)	7,4	2,90	(3,71)	14,9
684	12,2	(15,9)	0,84	(1,08)	6,9	2,56	(3,28)	21,0
685	10,7	(14,0)	0,53	(0,68)	5,0	2,37	(3,03)	22,1
686	12,8	(16,7)	0,48	(0,61)	3,8	2,10	(2,69)	16,4
689	19,1	(25,0)	0,67	(0,86)	3,5	2,49	(3,19)	13,0
049	14,2	(18,6)	0,57	(0,73)	4,0	3,17	(4,06)	22,3
047	17,7	(23,1)	0,57	(0,73)	3,2	2,96	(3,79)	16,7
048	13,8	(18,0)	0,53	(0,68)	3,8	2,76	(3,53)	20,0

Tab. 8. Statistischer Vergleich der Ergebnisse von Digoxin-Bestimmungen mit RIA und ELISA (13). Patienten mit zusätzlicher Medikation von Spironolacton.

1. Vorzeichen-Test nach Dixon & Mood für Paardifferenzen:

$N = 68$ $N_+ = 53$ $N_- = 15$
 Schranke (0.5%) = 26⁻
 $p < 0,005$ Unterschied signifikant

2. Prüfung der Paardifferenzen (d) mit dem t-Test nach Student:

$n = 68$
 $\bar{d} = \bar{c}_{\text{ELISA}} - \bar{c}_{\text{RIA}} = 0,48029$ ($\mu\text{g/l}$) = 0,62 (nmol/l)
 $s_{\bar{d}} = 0,10060$ ($\mu\text{g/l}$) = 0,13 (nmol/l)

Mittelwerte:

$\bar{c}_{\text{RIA}} = 2,06$ ($\mu\text{g/l}$); $\bar{c}_{\text{ELISA}} = 2,54$ ($\mu\text{g/l}$)
 (= 2,64 nmol/l) (= 3,25 nmol/l)

$\hat{t} = \frac{\bar{d}}{s_{\bar{d}}} = 4,774$ $t_{67; 0,01} = 2,65$

$p < 0,01$ Unterschied signifikant

Richtigkeit

Eine anerkannte Referenzmethode existiert nicht. Die Angaben über die Digoxin-Konzentration in Kontrollseren schwanken je nach der verwendeten Methode beträchtlich. Aus dieser Sicht muß die in Tabelle 2 und 3 angegebene Reproduktion von Sollwerten als befriedigend angesehen werden. Die Wiederfindung von Digoxin in proteinhaltigen Lösungen war ebenfalls befriedigend. Unter dieser og. Restriktion kommt einem Methoden-Vergleich mit klinischem Untersuchungsmaterial erhöhte Bedeutung zu (vgl. Abb. 2). Die kollektive Übereinstimmung von ELISA- und RIA-Ergebnissen muß als befriedigend bezeichnet werden. Es gibt keinen statistisch gesicherten Unterschied zwischen beiden Ergebnisgruppen. Nicht zu übersehen sind jedoch einige deutliche Ausreißer, für die wir keine befriedigende Erklärung haben. Soweit noch Untersuchungsmaterial vorhanden war, ließen sich diese Abweichungen bei wiederholter Bestimmung mit beiden Methoden bestätigen.

Präzision

Für ein gleiches Kontrollmaterial ist die Präzision in Serie des ELISA etwas ungünstiger als die Präzision in Serie des RIA (Tab. 1). Dagegen ist die Präzision von Tag zu Tag bei beiden Methoden gleich (Tab. 2) und deckt sich mit Angaben einer Übersicht über 24 Fertigreagenzien zur Bestimmung von Digoxin durch Radioimmunoassays (16). Bei zunehmender Qualitätssteigerung des ELISA dürften Doppelbestimmungen ausreichen. Für klinische Bedürfnisse wäre eine Verbesserung der Präzision wegen der geringen therapeutischen Breite des Digoxins sicher wünschenswert.

Spezifität

Der anzustrebende therapeutische Bereich von Plasma-Digoxin liegt bei 0,6 bis 1,5 $\mu\text{g/l}$ (0,8–1,0 nmol/l) (1). Einige ebenfalls klinisch wichtige, in der Struktur ähnliche Substanzen kommen im Serum in wesentlich höheren Konzentrationen vor, so daß schon eine geringe Kreuzreaktivität des Antikörpers eine relevante Störung verursachen könnte. Hinzu kommen u. U. biologisch inaktive Stoffwechselprodukte des Digoxins, die z. T. ebenfalls noch um die Bindungsstellen konkurrieren (17).

1. Digitoxin

Therapeutische Serumkonzentrationen von Digitoxin sollten im Bereich von 9 bis 25 $\mu\text{g/l}$ (12–34 nmol/l) liegen. Die meisten Hersteller von Digoxin-RIA geben eine Kreuzreaktion von Digitoxin an (16). Auch der Digoxin-ELISA zeigt eine Kreuzreaktion für Digitoxin sowohl *in vitro* wie *in vivo*. Nach Rietbrock et al. (18) ist bei Digitoxin-Sättigung mit 2% (= 0,5 $\mu\text{g/l}$ = 0,64 nmol/l) Digoxin im Serum als Metabolit zu rechnen. Die von uns *in vivo* gemessene Kreuzreaktion geht über diesen Wert hinaus (Tab. 7). Praktische Bedeutung hat die Kreuzreaktion nur bei Wechsel des Digitalisglykosids oder bei falscher Deklaration des Untersuchungsmaterials.

2. Spironolacton

Von größerer Bedeutung ist dagegen die Störung des Digoxin-ELISA durch Spironolacton. 37% der an uns eingesendeten Proben enthielten gleichzeitig Spironolacton. Nach Sadée et al. (19) können dabei Serumkonzentrationen von Canrenon und Stoffwechselprodukten desselben bis zu 10 mg/l (etwa 24 $\mu\text{mol/l}$) erreicht werden. Selbst unter weniger extremen Konzentrationsverhältnissen wird man mit einem 100fachen Überschuß der Störsubstanzen rechnen müssen, der bereits bei einer Kreuzreaktion von 1% zu einer Verdopplung des Ergebnisses der Digoxin-Bestimmung führen würde. Der von uns *in vivo* festgestellte Effekt ist zwar geringer. Immerhin liegen aber die Digoxin-ELISA Ergebnisse um durchschnittlich 0,48 $\mu\text{g/l}$ (0,14 bis 1,14 $\mu\text{g/l}$ = 0,18 bis 1,46 nmol/l) höher als die gleichzeitig bestimmten Digoxin-RIA Konzentrationen (Abb. 3, Tab. 8). Diese Störung dürfte im oberen therapeutischen Bereich eine Rolle spielen, wo die Abgrenzung zwischen therapeutischen und toxischen Konzentrationen kritisch ist.

Störungen der Indikatorreaktion

Während eine Störung durch radioaktives Material in der Probe nicht zu erwarten ist, muß mit Störungen durch Enzyminhibitoren gerechnet werden. In dieser Beziehung sind uns Kontroll-Seren mit deklariertem Digoxin-Wert aufgefallen, die das Indikator-Enzym Peroxidase total inhibierten. Es besteht der Verdacht, daß es sich hierbei um das viel benutzte Natriumazid handelt. Störungen durch Hämolyse, Ikterus oder Hyperlipämie sind bisher nicht aufgefallen. Der heterogene Enzymimmunoassay dürfte in dieser Beziehung weniger anfällig sein als der homogene Enzymimmunoassay.

Praktikabilität

Der größte Vorteil des ELISA liegt im Vermeiden des Umgangs mit radioaktiven Substanzen. Für kürzere Serienlängen bis zu 10 Proben genügt für die Messung ein Photometer üblicher Qualität. Der eigentliche Meß-

vorgang kann teilweise mechanisiert werden. Der Geräteaufwand erreicht dann allerdings den Preis eines Gamma-Meßplatzes, so daß hier kein wesentlicher Preisvorteil zu erwarten ist. Die Bezugskurve muß in jeder Serie neu erstellt werden. Im Falle einer Sofort-Analyse bei fraglicher Digitalisüberdosierung erscheint es vertretbar, die Zahl der Bezugspunkte auf 2 (3,0 und 1,5 $\mu\text{g/l}$ = 3,84 und 1,92 nmol/l) zu reduzieren. Wird für jede Probe eine Dreifachbestimmung angesetzt, so reicht eine Packung mit 96 Röhrchen für 25 Proben einschließlich Bezugslösungen und Qualitätskontrollen aus. Der Zeitaufwand ohne Teilmechanisierung der Messung beträgt für 25 Proben etwa 3 Stunden, der bei Einsatz eines Dilutors und Protokolldruckers durch Kürzung des Arbeitstaktes noch etwas reduziert werden kann. Bei zunehmender Perfektionierung der Reagenzien und genügender Erfahrung des Anwenders dürften Doppelbestimmungen ausreichen. Im Gegensatz zum homogenen Enzymimmunoassay, der weitgehend mechanisiert werden kann (10) und aus meßtechnischen Gründen auch sollte, ist der heterogene Enzymimmunoassay mit den zur Zeit bekannten Analysengeräten nicht vollmechanisierbar. Die Forderung nach Vollmechanisierung steht u. E. jedoch angesichts relativ kurzer Serienlängen nicht im Vordergrund. Eine rechnerunterstützte Auswertung analog der Auswertung des RIA (10, 21) dürfte einen zusätzlichen Rationalisierungseffekt bieten. Die Kosten pro Test für die Reagenzien des ELISA und des von uns verwendeten RIA liegen in der gleichen Größenordnung.

Schlußfolgerung

Die Bestimmung von Digoxin im Serum mit einem heterogenen Enzymimmunoassay (ELISA) ist für klinische Zwecke brauchbar und bietet damit eine gleichwertige Alternative zur Bestimmung durch einen Radioimmunoassay.

Danksagung

Wir danken Frau H. Hartwig für die gewissenhafte Durchführung der Versuche.

Anmerkung bei Korrektur des Manuskriptes

1. Nach Abschluß der Versuche stellte uns der Hersteller eine neue Antikörper-Charge mit verminderter Kreuzempfindlichkeit gegen Canrenon vor. Bei 21 Patienten, die gleichzeitig Digoxin und Spironolacton einnahmen, konnten wir keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ergebnissen des RIA und ELISA mehr feststellen. Dies war auch nicht der Fall in einer weiteren Serie von Patienten, die Aldactone intravenös verabreicht bekamen.
2. Die Firma Dade stellte uns freundlicherweise Kontrollseren ohne Stabilisator-Zusatz zur Verfügung, die nach orientierenden Versuchen im ELISA ohne Störung verwendet werden können.

Literatur

1. Rietbrock, N. & Kuhlmann, J. (1977), *Med. Klin.* 72, 435–449.
2. Schüren, K. P. & Rietbrock, N. (1977), *Internist. Praxis* 17, 581–601.
3. Smith, T. W. & Haber, E. (1970), *J. Clin. Invest.* 49, 2377–2386.
4. Wisdom, B. (1976), *Clin. Chem.* 22, 1243–1255.
5. Chang, J. J., Crowl, C. P. & Schneider, R. S. (1975), *Clin. Chem.* 21, 967.
6. Rosenthal, A. F., Vargas, M. G. & Klass, C. S. (1976), *Clin. Chem.* 22, 1899–1902.
7. Sun, L. & Spiehler, V. (1976), *Clin. Chem.* 22, 2029–2031.
8. Müller, H., Bräuer, H., Reinhardt, M. & Förster, G. (1976), *Ärztl. Lab.* 22, 399–402.
9. Drost, R. H., Plomp, Th. A., Teunissen, A. J., Maass, A. H. J. & Maes, R. A. A. (1977), *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 15, 151.
10. Vogt, W., Tausch, A., Jacob, K. & Knedel, M. (1977), *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 15, 194–195.
11. Kleinhammer, G., Lenz, H., Linke, R. & Gruber, W. (1976), *Europäischer Kongreß für Klinische Chemie, Prag* 4. 10. 76, Abstract.
12. Engvall, E., Jonsson, K. & Perlmann, P. (1971), *Biochim. Biophys. Acta* 251, 427–434.
13. Sachs, L. (1972), *Statistische Methoden*. Springer-Verlag, Berlin. 3. Aufl.
14. Averdunk, R. & Borner, K. (1970), *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 8, 263–268.
15. Fa. Boehringer-Mannheim: *Diagnostica Dialog*. Heft 3/77. Mannheim.
16. Hopkins, J. A. C., Edwards, L., Herber, A. E. & Van Dreal, P. (1977), *Clin. Chem.* 23, 403–446.
17. Fläsch, H., Heinz, N. & Petersen, R. (1977), *Arzneimittelforsch./Drug Res.* 27, 649–653.
18. Rietbrock, N., Vöhringer, H. F. & Kuhlmann, J. (1977), *Herz und Kreislauf*, im Druck.
19. Sadée, W., Schröder, R., v. Leitner, E. & Dagcioglu, M. (1974), *Europ. J. Clin. Pharmacol.* 7, 195–200.
20. Vogt, W., Popp, B. & Knedel, M. (1973), *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 11, 438–445.
21. Schöneshöfer, M. (1977), *Clinica Chimica Acta* 77, 101–115.

Prof. Dr. med. K. Borner
Institut für Klinische Chemie
und Klinische Biochemie
der Freien Universität Berlin,
Klinikum Steglitz
Hindenburgdamm 30
D-1000 Berlin 45

und

Prof. Dr. N. Rietbrock
Institut für Klinische Pharmakologie
der Freien Universität Berlin
Hindenburgdamm 30
D-1000 Berlin 45