

Immunoassays

Rob Kaletsky
Laboratorium ZAMB
Tweesteden ziekenhuis Tilburg

In dit tweede artikel wordt de competitieve homogene immunoassay besproken. Op het ogenblik staat binnen ons farmaceutisch werkgebied de Enzym Multiplied Immunoassay Technology kortweg de Emit methode in het middelpunt van de belangstelling. De firma Abbott heeft namelijk een licentie afspraak gemaakt met de firma Dade Behring (Syva) om vanaf volgend voorjaar de Emit kits in eigen Abbott verpakking op de markt te brengen. Dade Behring brengt in 2000 voor alle bepalingen met Emit kits uit die in opgeloste vorm verkrijgbaar zijn. Ook verdere ontwikkelingen en optimalisaties binnen de DOA kits zien het licht in het nieuwe millennium. De Abbott ontwikkeling van de in 1998 eerder aangekondigde Optimized Multiplied Enzym Immunoassay (OMEI) gaf dusdanig veel problemen om dit binnen bepaalde research tijd te ontwikkelen dat men een samenwerking met Dade is aangegaan. Op deze manier is Abbott in staat om op z'n nieuwe generatie analysers TDM en DOA bepalingen te laten uitvoeren. Daarom zal in dit deel uitgebreid stil gestaan worden bij de enzymatische immunoassay en met name de Emit. Ook andere technieken als FPIA, CEDIA, ELISA, PETINIA, KIMS, Chemiluminescentie e.a. komen nog aan bod.

De eerste kennis van enzymen gaat terug naar het begin van 1900. In 1908 was de amylase in urine bekend. In de tijdsperiode van 1920 tot 1930 werd de enzymactiviteit van alkalische fosfatase gemeten. Hierna volgden de ontdekkingen in 1943 van verhoogde enzymactiviteiten bij tumoren, in 1955 de aminotransferase bij een hartinfarct. Al deze ontdekkingen staan aan de basis van de moderne diagnostische enzymologie. Hierdoor weten we steeds meer over biochemische reacties die in ons lichaam plaatsvinden en dat deze reacties onder katalytische

invloed staan van enzymen. Met deze kennis zijn bepalingen ontwikkeld om enzymen te meten, maar een verdere ontwikkeling is de enzymen te gebruiken voor kwantitatieve bepalingen van geneesmiddelen en hun metabolieten. Enzymen zijn te beschrijven als eiwitten, die katalytische eigenschappen hebben en die tevens hun substraten kunnen activeren. Veel enzymen werken op het zelfde substraat terwijl ze verschillende reacties kunnen katalyseren. Om een goed onderscheid te maken is in 1955 een Enzym Nomenclatuur (EN) opgezet. Hierbij wordt een systematische naam gebruikt, die hoort bij de reactie, een triviale naam die voor dagelijks gebruik is en een EN nummer die de classificatie aangeeft. De enzymen worden in 6 klassen verdeeld. Een ervan is de oxidoreductase waarbij nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) een rol speelt. Dit enzym wordt als co-enzym gebruikt bij de Emit methode. Het enzym dat bij de Emit gebruikt wordt is Glucose-6-phosphate-dehydrogenase (G6P-DH). Omdat enzymen de eigenschappen van eiwitten bezitten, zijn ze alleen stabiel onder bepaalde omstandigheden.

- Ze zijn in kleine hoeveelheden werkzaam
- Ze doen niet mee aan de reactie, maar werken als katalysator
- Ze hebben een bepaalde temperatuur nodig
- Er is een bepaalde pH nodig
- Ze zijn afhankelijk van bepaalde zout concentraties

In eerste instantie werd 25°C aangehouden, maar omdat deze temperatuur in de tropen niet stabiel was in te stellen bij de meetapparatuur is er afgesproken om enzymreacties bij 30°C te laten verlopen. De ontwikkeling van de immunoassays leidde ertoe dat in 1970 de firma Syva de EMIT methode op de markt bracht.

Het principe van de immunoassay

De reacties in een immunoassay worden immunochemische reacties

Deel II

genoemd. Een immunochemische reactie bestaat uit een antilichaam dat gebruikt wordt om een chemische substantie (antigeen) te detecteren. Het antigeen dat gebruikt wordt is gelabeld. Het label binnen de Emit is een enzym. Een vastgestelde hoeveelheid antilichaam wordt in een buis gebracht met een vastgestelde hoeveelheid van het gelabelde geneesmiddel (antigeen) en het te bepalen geneesmiddel. Het geneesmiddel in het monster gaat een competitie aan met het gelabelde geneesmiddel om binding te maken met het antilichaam. Het antilichaam heeft echter een beperkt aantal bindingsplaatsen zodat niet al het geneesmiddel en gelabelde geneesmiddel kunnen koppelen met het antilichaam. Er zal dus competitie zijn met als uitgangspunt dat van de component waarvan de meeste moleculen zijn er ook het meeste zich zal kunnen binden aan het antilichaam. Deze reactie noemt men de antigeen-antilichaam reactie. Bij deze reactie ontstaan veranderingen in concentraties, in molecuulair gewicht en molecuulgrootte van de aanwezige componenten. Het gevormde immunocomplex kan hierna gemeten worden. In 1936 werd door Otto Warburg een optische methode ingevoerd om de gereduceerde NAD tot NADH tijdens de dehydrogenase reactie te kunnen meten. Binnen de immunochemie reactie zijn de volgende zaken te onderscheiden:

• Het antilichaam

Antilichamen zijn proteïnen die in staat zijn om aan een grote verscheidenheid van natuurlijke of gesynthetiseerde antigenen en moleculen te koppelen. Het antilichaam wordt zodoende gebruikt als een reagens om chemische substanties (antigeen), die we willen bepalen, te detecteren. Een grote verscheidenheid aan antigenen kunnen vanwege de affiniteit en specificiteit van het antilichaam gekoppeld worden. Antilichamen met lage specificiteit (meestal polyclonaal) kunnen een groep (benzodiazepines) met bijna

een zelfde chemische structuur detecteren.

Antilichamen met een hoge specificiteit (monoclonaal) zijn ontworpen om slechts één specifiek geneesmiddel te kunnen detecteren.

De keuze om polyclonale of monoclonale antilichamen te nemen, hangt van het doel van de test af.

• De antigeen-antilichaam reactie

Er zijn drie hoofdkrachten die tezamen verantwoordelijk zijn voor de antigeen-antilichaam binding:

Van der Waals-London dipool-dipool interactie

Dit zijn elektrostatische interacties. Niet geladen moleculen hebben invloed op de elektronen wolk om het antilichaam molecuul hetgeen resulteert in een voorbijgaande dipool. De vorming van het dipool moment zal een dipool moment induceren in de nabijgelegen moleculen.

Hydrofobische interactie

Als er een water aantrekkende groep in de buurt komt van het antigeen-antilichaam complex zal er een watermolecuul van het complex verwijderd worden. Op deze manier ontstaat er een stabiel complex want het vrije energie niveau wordt lager. Immers een systeem zal altijd zijn laagste energie niveau willen bereiken.

Coulombische binding

De aantrekkingskracht tussen geladen groepen op het antigeen en het antilichaam noemt men coulombische binding. Deze aantreking heeft zijn maximum in een oplossing met een lage diëlectrische constante. Wanneer er zout aan een oplossing toegevoegd wordt zal de diëlectrische constante stijgen. Hierbij ontstaat een dubbele laag van geladen deeltjes die als een schild kunnen werken zodat er een afname ontstaat in binding van het antigeen met het antilichaam.

• Label

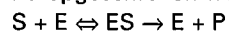
Elk gebruikt label heeft zijn voor- en nadelen. Op het ogenblik zijn vooral de niet radioactieve labels in gebruik.

Het enzym zal alleen zijn katalytische vermogen kunnen toepassen bij een bepaalde pH omdat het substraat dan

in ongedissocieerde vorm of gedissocieerde vorm aanwezig is. Bij extreme pH kan het enzym zelfs gedenatureerd worden. Hierbij spelen verder de ionen van gebruikte buffer een rol. Bij de optimale pH zal de hoogste enzymactiviteit ontstaan waarbij dan de gevoeligheid van de bepaling optimaal zal zijn. Het pH optimum is afhankelijk van de soort buffer substraatconcentratie en het substraat. Zo zorgt de buffer dat bij het ontstaan van te zure of basische oplossing tijdens de reactie de pH toch binnen de vastgestelde grenzen blijft waarbij de reactie volledig verloopt. Om enzym reacties goed te laten verlopen zijn er nogal wat randvoorwaarden aanwezig en hebben de volgende factoren een invloed op de uitkomst van de enzymreactie:

- Bij stijgende temperatuur neemt de enzymactiviteit toe, maar bij te hoge temperatuur en per tijdseenheid ontstaat denaturatie van het enzym.
- Een pH optimum dat bereikt wordt bij bepaalde concentratie van buffer en substraat.
- Voldoende substraat om een snelle reactie te verkrijgen, maar ook zoveel substraat dat er geen substraat uitputting kan ontstaan. Een enzym kan alleen werken als het zich met een substraat kan binden. De substraat activiteit wordt weergegeven in de bekende fundamentele regel van Michaelis en Menten. De Michaelis constante K_m is voor elk enzym-substraatpaar een karakteristieke grootte.
- Een enzymreactie verloopt alleen bij aanwezigheid van een substraat

De volgende vergelijkingen kunnen nu opgeschreven worden.



S = substraat

E = enzym

P = reactieproduct

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

waarbij K_m = Michaelis constante
 v = reactiesnelheid

Immunochemische reacties zijn evenwichtsreacties, daarom is het van belang dat de reactie toch één kant op loopt.

Hoge zout concentraties leiden tot

minder complexvorming waardoor het antigeen met een kleinere hoeveelheid van het antilichaam kan binden.

Sterk verdunde oplossingen verminderen de invloed van toegevoegde ionen die voor een stabielere pH zorgen.

Kationen veroorzaken inhibitie van de binding.

Een verkleining van de ionradius ($NH_4^+ > K^+ > Na^+ > Li^+$) geeft een verhoging van de hydratatie.

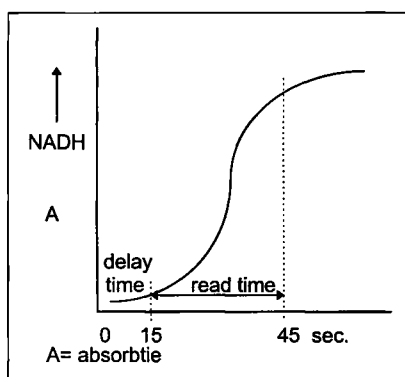
Een lagere graad van hydratatie geeft echter een grotere interactie van het anion van het antilichaam.

Bij een pH tussen 6-8 en een temperatuur van 25°C-35°C is er een gering verschil in de antigeen-antilichaam verbinding. Uitscheiding van een onveranderd geneesmiddel of drug is pH afhankelijk en daardoor ook fraude gevoelig hetgeen bij drugs bepalingen nogal speelt. Het kan ook echter een positief effect hebben, benzodiazepines bijvoorbeeld worden voornamelijk in urine in de geglycuronideerde vorm uitgescheiden en zijn daardoor moeilijk te detecteren. Maar door de urine met zuur te behandelen komt het geneesmiddel en metaboliet vrij en is detectie toch mogelijk.

EMIT

Het basis principe van de Emit (Enzym multiplified immunoassay technology) is gebaseerd op de antigeen-antilichaam binding, enzym katalyse van de reactie en het enzymlabel. Ieder enzymgelabeld geneesmiddel dat ongebonden in oplossing blijft zorgt voor een verhoogde "rate" (multiplified signaal) van de reactie. Deze chemische reactie staat bekend als de katalyse van het enzym. Het enzym katalyseert de chemische reactie. Het enzymgelabelde geneesmiddel gaat een competitie aan met het geneesmiddel in het monster en met de beperkte bindingsplaatsen van het antilichaam. De hoeveelheid van het gelabelde geneesmiddel aan het antilichaam wordt indirect m.b.v. absorptie gemeten, doordat het substraat aan niet gebonden gelabeld geneesmiddel gaat zitten waardoor er H^+ vrijgemaakt kan worden om het NAD te reduceren tot NADH. Verder is de reactie van geneesmiddel en NAD één op één en hierdoor

is de hoeveelheid van geabsorbeerd licht recht evenredig met de concentratie van het te meten geneesmiddel in het monster. We zien dan ook hoe hoger de geneesmiddelconcentratie des te hoger is de absorptie. Deze absorptie wordt dus veroorzaakt door de reductie van het co-enzym NAD, dat tot NADH gereduceerd wordt. NADH absorbeert licht bij 340 nm en NAD absorbeert niet bij deze golflengte. De Emit berust dan ook op een tweede enzymkatalyse reactie, het co-enzym zorgt voor een indicator reactie die evenredig verloopt met de hoofdreactie. Zoals de hierboven geschetste reactie is de hoeveelheid substraat van levensbelang om de enzym reactie in stand te houden. Er is er nog wel eens geëxperimenteerd met verdunde oplossingen van de Emit omdat het dan goedkoop bepalen was. De uitslagen waren dan in een aantal gevallen geheel onbetrouwbaar. Dit kwam omdat er te weinig substraat aanwezig was (substraat uitputting) om de reactie te laten verlopen. Extra substraat toevoeging is dan eigenlijk een must. Dit heeft echter weinig meer te maken met GLP en daarom gebruik een assay gewoon zoals de fabrikant hem aanlevert. Gaat er iets fout dan is er de garantie van de fabrikant, de kit moet niet voor niets FDA accoord zijn. Omdat de Emit een kinetisch reactieverloop heeft, hoeven we niet te wachten tot de gehele reactie verlopen is (in tegenstelling tot eindpunt reacties, KIMS). Daarom wordt bij Emit nadat de reactie gestart is een eerste meting genomen na 15 seconden (zg delay time) en een tweede meting na 45 seconden (figuur 2). Dit zogenaamde "rate window" blijkt bij verschillende analysers anders ingesteld te zijn. Hierbij is sprake van een optimalisatie (fine-tuning) per apparaat die afhankelijk is van verschillende concentraties en hoeveelheden monster en reagentia. De opgenomen ijklijn is S vormig. Waarbij het begin en het eind van de curve een te kleine delta absorptie geven om in dit gebied nauwkeurig te kunnen meten. Bij een open analyser is echter een optimale instelling te verkrijgen. Zo kan er een specifiek dal- en top protocol voor tobramycine toegepast worden. Er



Figuur 2: De Emit curve.
Kinetische meting: er wordt gedurende een bepaalde tijd het verschil in absorptie gemeten.

zijn dus twee situaties in absorptie uitslag te verkrijgen (zie ook figuur 1):
I Het monster bevat veel geneesmiddel, hierbij zal het gelabelde

geneesmiddel ongebonden blijven, maar het co-enzym zal een hoge absorptie geven.

II Het monster bevat weinig geneesmiddel, hierbij zal veel gelabeld geneesmiddel met antilichaam gebonden worden. Het substraat wordt sterisch gehinderd omdat het antilichaam gekoppeld zit aan het gelabelde geneesmiddel.

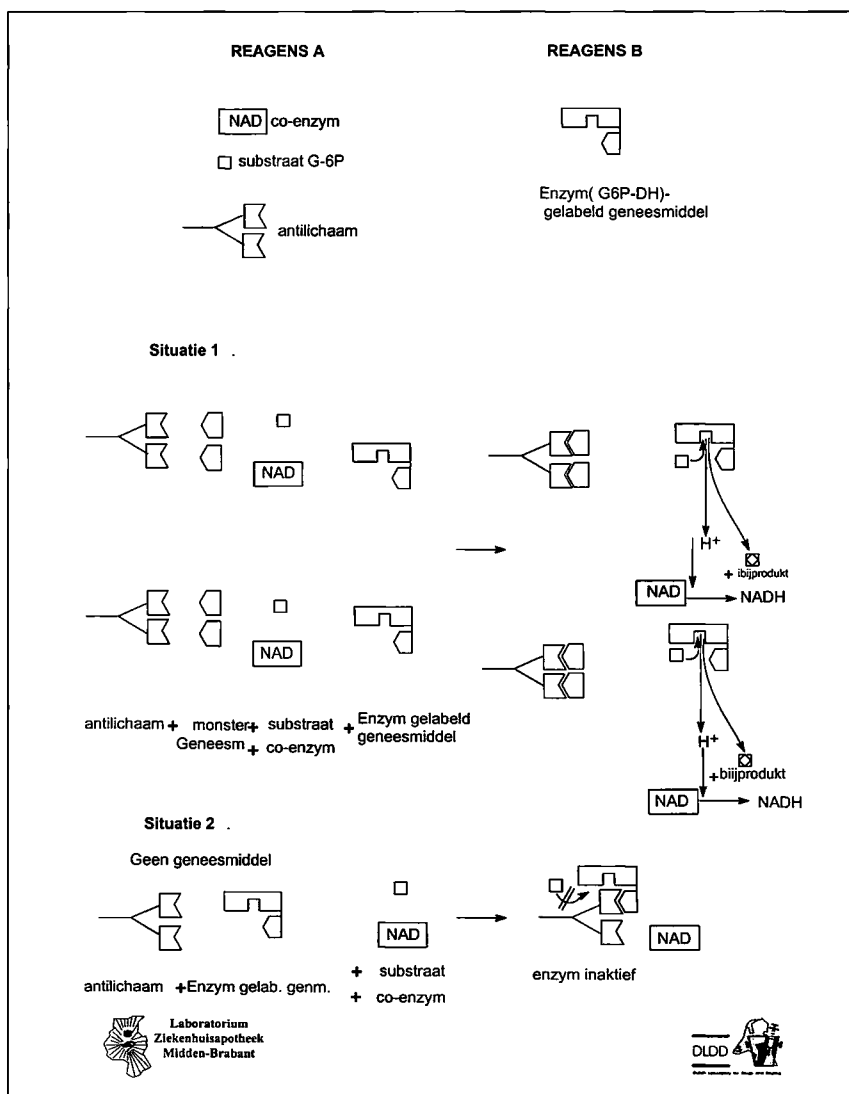
Een Emit kit bestaat derhalve uit de volgende componenten:

Reagens A: antilichaam/substraat (G6P)/Co-enzym(NAD)

Reagens B: Enzym(G6P-DH) gelabeld geneesmiddel

Bij de reactie wordt reagens A, B, buffer en het te onderzoeken monster bij elkaar gevoegd.

Wordt vervolgd.



Figuur 1: Dade Behring (Syva) Emit.