



## Immunoassays deel III

Rob Kaletzky

Klinisch farmaceutisch laboratorium  
Ziekenhuis Apotheek Midden-Brabant  
TweeStedenziekenhuis Tilburg

### Fluorescentie Polarisatie Immunoassay

Na de EMIT methodiek is de fluorescentie toepassing een breed verbreide techniek binnen de laboratoria. Er zijn veel verschillende technieken die gebruik maken van het fluorescentievermogen van moleculen. Een zeer bekende techniek binnen de farmaceutische laboratoria is de Fluorescentie Polarisatie Immunoassay (FPIA) van Abbott. Naderhand zijn er ook door andere firma's FPIA kits op de markt gebracht.

Bij deze techniek komen een aantal zeer essentiële onderdelen aan de orde:

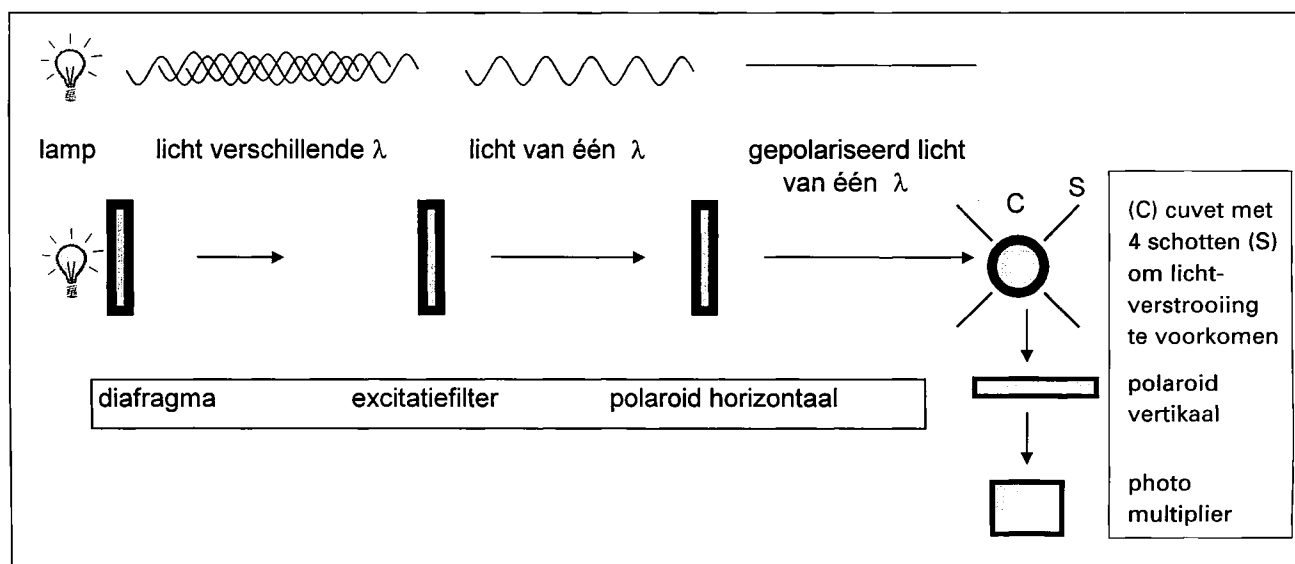
- Absorptie
- Emissie
- Energie niveau
- Excitatie
- Polarisator ("polaroid")
- Fluorofoor
- Brownse beweging
- Rotatie Relaxatie tijd (RRT)
- Electrische/magnetische golven
- Depolarisatie

Fluorescentie ontstaat als een molecuul licht absorbeert bij een bepaalde golflengte en daarna licht emitteert gedurende meestal een korte tijd totdat het molecuul zijn laagste energie niveau weer bereikt heeft. Dit uitgestraalde licht is van een lager energie (langere golflengte) niveau. De emissie van dit uitgestraalde licht heeft een vervaltijd van slechts  $10^{-8}$  seconden. Licht is samengesteld uit elektrische en magnetische golven die loodrecht op elkaar staan. Lichtgolven die door excitatie ontstaan stralen dan ook hun uiteindelijke elektrische vectoren in alle richtingen. De FPIA techniek gebruikt gepolariseerd licht. Dit wordt bereikt door het licht door een polarisator te sturen waardoor de uiteindelijke elektrische vector in één plat vlak straalt (figuur 1). Men noemt dit ook wel horizontaal gepolariseerd licht. De fluorescentie die gemeten wordt bij deze immunoassays zijn afkomstig van zogenaamde fluoroforen. Fluoroforen hebben de eigenschap om zeer efficiënt licht te absorberen in het vlak van hun elektronische energieniveau. De Brownse beweging van een molecuul om zijn denkbeeldige as wordt de rotatie

relaxatie genoemd. De tijd die een molecuul gebruikt om draaiend over zijn eigen as een hoek van ongeveer 68,5 graad af te leggen is gedefinieerd als de "Rotatie Relaxatie tijd" (RRT) van een molecuul. Wanneer nu de rotatie tijd langzamer (zoals bij grote eiwit moleculen) is dan de fluorescentie vervaltijd dan zal het geëmitteerde licht gepolariseerd zijn. Kleine moleculen hebben een rotatie relaxatie tijd van ~ 1 nanoseconde. Deze tijd is een stuk korter als de fluorescentie vervaltijd en hierdoor zal het fluorescerende licht gedepolariseerd zijn. Het grote antilichaam heeft een rotatie relaxatie tijd van 100 ns.

Voor de Immunoassayreactie zie deel I en II in Extract 1999 nr. 2 en 4.

Zowel het gelabelde geneesmiddel (tracer) als het geneesmiddel in het monster gaan een competitie aan met een beperkt aantal bindingsplaatsen op het antilichaam. De gebruikte tracer absorbeert blauw licht en emitteert groen licht. De intensiteit van het groene licht kan gemeten worden. Deze intensiteitsmeting is proportioneel evenredig met de hoeveelheid tracer die ge-



Figuur 1. Optische systeem FPIA (Abbott).

bonden wordt aan het antilichaam. Immers de hoeveelheid tracer die gebonden is aan het grote antilichaammolecuul zal door de langzame rotatie gepolariseerd licht uitzenden. De hoeveelheid niet gebonden tracer zal door het snel draaien om zijn as gedepolariseerd raken (polarisatiewaarde bijna gelijk aan nul). Bij de reactie zijn weer twee eindstadia te verwachten nl:

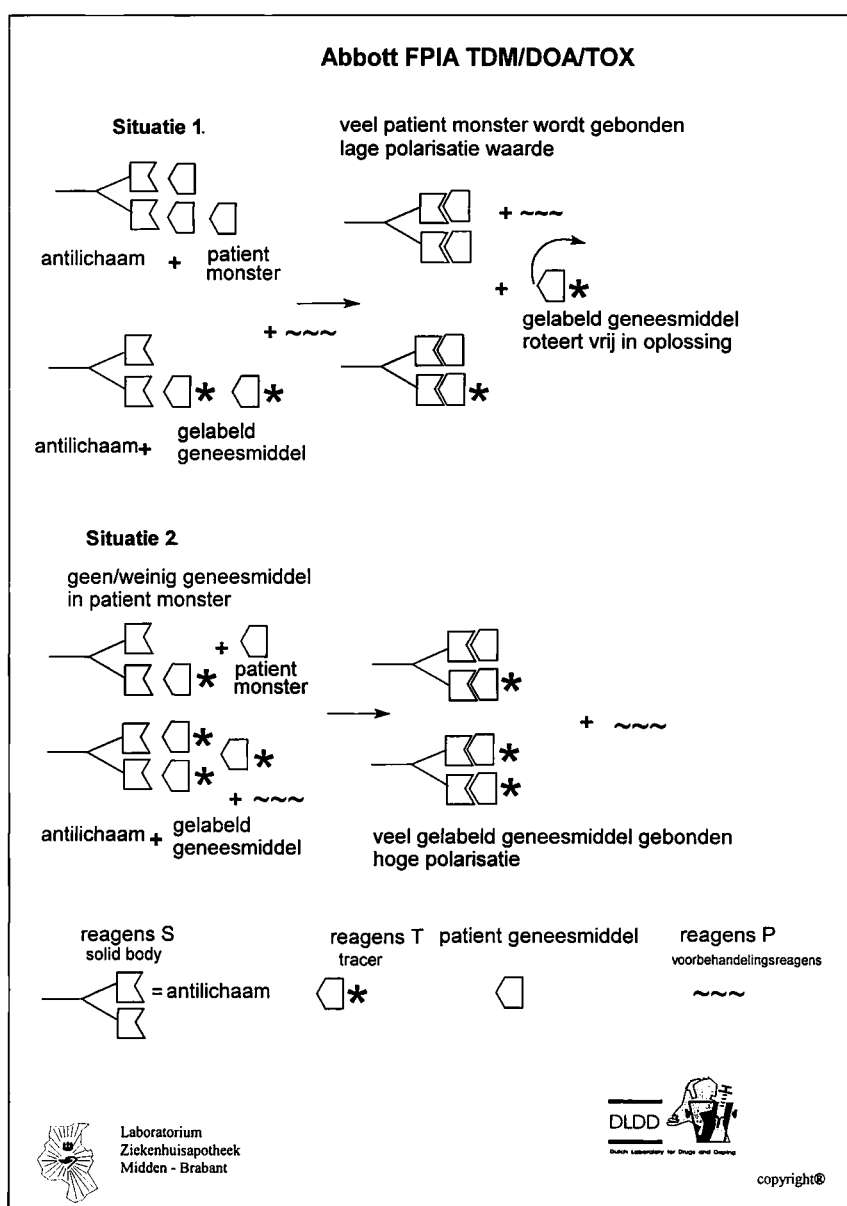
1. Wanneer er geen of weinig geneesmiddel in een patiënten monster aanwezig is, zal vanwege de competitie bijna alle tracer gebonden zijn aan het antilichaam. Het resultaat is dan dat er een hoge polarisatie waarde gemeten wordt.
2. Wanneer er veel geneesmiddel in een patiënten monster aanwezig is, zal vanwege de competitie veel geneesmiddel van het patiënten monster gebonden zijn aan het antilichaam. Het resultaat is dan dat er veel tracer ongebonden is en door de korte RRT zal er depolarisatie van de tracer ontstaan. Er wordt nu een lage polarisatie gemeten.

Wanneer dat vertaald wordt naar een uitslagwaarde van een patiëntenmonster dan zal een patiëntenmonster met veel geneesmiddel uiteindelijk resulteren in een lage polarisatie waarde (figuur 2, situatie 1). Dan zal een patiënten monster met weinig geneesmiddel een hoge polarisatie waarde geven (figuur 2, situatie 2). De calibratie curve die berekend wordt vanuit de intensiteitsmetingen, berekend naar de polarisatie waarde geven een niet lineaire logaritmische functie weer, waarbij bij een verschil van lage gemeten concentraties van geneesmiddel een groot polarisatie verschil wordt gemeten. Met andere woorden de concentratie van een patiëntenmonster is omgekeerd evenredig met de hoogte van de polarisatie waarde. De conclusie is dan dat de FPIA methode zijn hoogste gevoeligheid heeft in het lage concentratie gebied.

Er wordt dus in een totale oplossing

gemeten waarbij de intensiteitsmeting proportioneel evenredig is met de hoeveelheid tracer die gebonden wordt aan het antilichaam. Dit gegeven gaat echter alleen op in verdunde oplossingen. Fluorescentie intensiteit wordt niet lineair als de absorptie van de te meten oplossing boven de 2% van de excitatie straling komt. Er wordt dan ook altijd een blanco meting gedaan van het monster. Blijkt dit een bepaalde waarde te overstijgen dan mag men de gemeten polarisatie waarden niet vertrouwen. Het monster kan dan eventueel verdund worden om de extra storende fluorescentie van

het monster terug te dringen. Let er hierbij op dat de dan berekende uitslag niet beneden de detectie limiet van de assay komt. Echter te lage fluorescentie concentraties geven ook problemen. Een concentratie van een fluorofoor in de range van  $10^{-9}$  mol/l of lager kan adsorptie aan glas geven (cuvetten) waardoor een fotochemische ontleding ontstaat. De monstermatrix blijft ook altijd een bron van ongewenste achtergrondstoring. Zeer donkere urines kunnen nog wel eens zeer hoge blanco metingen geven. Let er hierbij echter op dat de urine bepalingen werken met assays die crossre-



Figuur 2. Situatie 1 en situatie 2.

activiteiten hebben met verschillende componenten. De hoogte van de crossreactiviteit verandert met de concentratie van de stof. Dit levert het probleem op dat bij verdunning van urine of bloed met assays die

crossreactiviteiten hebben met meerdere middelen er geen semi-kwantitatieve uitslag meer gegeven kan worden. Ook bij deze FPIA assays geldt evenzo als bij de Emit dat door gebruik te maken van monoklonale-,

polyklonale- of een mix van antidiodes een assay gemaakt wordt met eigenschappen voor verschillende doeleinden.

Wordt vervolgd.