



Immunoassays deel I

Rob Kaletzky
Laboratorium Ziekenhuisapotheek
Midden-Brabant
TweeSteden ziekenhuis, Tilburg

Binnen de farmaceutische laboratoria wordt er voor de bepaling van geneesmiddelen en drugs naast de technieken van o.a. GC, GC-MS, HPLC, AAS, UV-VIS-spectrometrie veelal Immunoassays gebruikt. Op de KKGt dag van 27 mei j.l. kwam ook al de mogelijkheden en onmogelijkheden van de immunoassay techniek aan de orde. Er ontstond een discussie over o.a. monsters in een niet humane matrix (kalfsserum) en de eventuele interpretatie t.a.v. gevonden waarden ervan. Waarom klopt de uitslag het ene jaar wel en het andere jaar niet? Is de uitslag lot afhankelijk binnen één en dezelfde immunoassay techniek of is de uitslag immunoassay techniek afhankelijk of heeft de analyser invloed op de uitslag? Vele onbeantwoorde vragen bleven liggen. Dit artikel gaat over immunoassays in de breedste zin.

De volgende zaken zullen voorlopig aan bod komen binnen 3 of meer artikelen:

- de geschiedenis
- immunoassay reactie
- hoofdtypen
- soorten immunoassay
- reactie principe
- reactie onderdelen
- nadelen immunoassays
- valkuilen
- voordelen immunoassays
- overzicht immunoassays
- nieuw ontwikkelde immunoassays
- apparatuur
- samenvatting

1 De geschiedenis

In de zestiger jaren kwam naast de toen bestaande technieken de radio-immunoassay (RIA) op. Deze techniek stelde het laboratorium in staat om hele kleine hoeveelheden

geneesmiddelconcentraties in bloed te detecteren. Een van die geneesmiddelen was digoxine. De concentratie van dit geneesmiddel moest in ng/ml gemeten kunnen worden. Met behulp van radioactieve labeling konden deze lage concentraties bereikt worden. Het gebruik van deze techniek was echter strikt voorbehouden aan zogenaamde C-laboratoria en ook de apotheker diende zijn C-bevoegdheid te hebben om met radioactieve stoffen te mogen werken. Daarom kon deze techniek niet wijd en zijd gebruikt worden en moest men de monsters opsturen naar speciale laboratoria.

De RIA methode was een arbeidsintensieve methode en bracht de nodige risico's met zich mee. Men moest zeer geconcentreerd en bedacht zijn op de minste of geringste besmetting van een persoon, maar ook juist besmetting van de omgeving moest vermeden worden. De halfwaardetijden van isotopen kunnen nogal lang zijn en als eenmaal een omgeving besmet was dan kon men die niet meer voor een bepaalde tijd gebruiken. Immers de besmetting zou doorwerken op de resultaten van de nieuwe monsters die weer ingezet werden. Ook bij de apparatuur was extra aandacht nodig om die niet per ongeluk te besmetten, doordat bijvoorbeeld er een buisje stuk gestoten werd. Een uitslag kwam pas na 24 uur en omdat de therapeutische breedte van o.a. digoxine gering is en toxische concentraties de dood tot gevolg kunnen hebben, was er behoefte aan een snellere methode, die op ieder laboratorium gebruikt kon worden zonder dat men gebruik moest maken van radioactiviteit. Ook die nieuwe immunoassay moest dezelfde gevoeligheid kunnen halen. Deze gegevens en het uitbreken van de Vietnam-oorlog hadden tot resultaat dat in de zeventiger jaren een grote variëteit aan immuno-

assay's ontstond, die geen gebruik maakten van radioactiviteit. De Vietnam oorlog was aanleiding voor de Amerikaanse regering om de soldaten te testen op het gebruik van drugs. De eerste niet radioactieve immunoassay's hadden echter een tekort aan gevoeligheid t.o.v. de RIA methodiek. Ook de niet optimale productie van antilichamen was debet aan een slechte reproduceerbaarheid. Pas na verbetering van zuiveringstechnieken voor antilichaam en antigen werd de inzetbaarheid van deze immunochemische technieken vergroot. Ook de ontwikkeling van apparatuur werd voortgezet. De enorme toename van het druggebruik eerst in de VS en later over de gehele wereld gaf een extra impuls om de grote aantallen monsters zo snel mogelijk te kunnen analyseren.

De behoefte aan het snel meten van grote hoeveelheden monsters vroeg om snelle, gevoelige, nauwkeurige en goedkope bepalingen. Na de manuele methoden voor Enzyme Multiple Immuno Technique (EMIT I) en Fluorescentie Immuno Assay (FIA), die op een spectrofotometer gemeten konden worden, kwamen voor deze methodieken eerst kleine analysers waarna ook grotere auto-analysers volgden, die op hun beurt in een volledig geautomatiseerde omgeving konden werken. Nadat de Emit een grote mate van bekendheid en toepasbaarheid had werd de FIA methode verder ontwikkeld door Abbott tot de FPIA methodiek. Voor Nederland met zijn overwegend kleine farmaceutische laboratoria zorgde de FPIA methodiek en het TDx apparaat voor een doorbraak in de TDM, Toxscreening en DOA controle m.b.v. van immunoassay techniek. In het buitenland werd veel meer de Emit toegepast op grote open analyser systemen. De FPIA kon alleen gebruikt worden op de kleinere Abbott analysers.

Naarmate er naast de batch afhandeling van de monsters er meer "ad random" bepalingen uitgevoerd moesten worden, kwamen er analyzers die alle bepalingen door elkaar en vanuit een en dezelfde monsterbuis konden bepalen. Naast deze twee meest gebruikte technieken in Nederland zijn er nog andere technieken geweest die tot op heden in gebruik zijn. Deze technieken worden in het overzicht besproken.

2 Immunoassay reactie

Binnen de Immunoassay reactie spelen de volgende componenten een hoofdrol:

- geneesmiddel
- gelabeld geneesmiddel*
- antilichaam (specifiek)

Bij de heterogene assay hebben het gebonden label en het vrije label hetzelfde signaal (RIA), deze twee moeten daarom gescheiden worden voordat het signaal gemeten wordt. De scheidingsstap is complex en leidt tot verlies van gebonden label. Bij een homogene assay blijven de reactanten en bijproducten in dezelfde oplossing. Omdat de activiteit van het label verandert nadat het gebonden wordt aan het antilichaam is er verschil in signaal van het gebonden label en ongebonden label en kan er direct in de oplossing gemeten worden. Er is hierbij dus geen wasstap nodig. Het voordeel van een homogene assay is dat het makkelijk uitvoerbaar is, snel, minder kans op fouten (geen separatie en wasstappen), te gebruiken bij

screening een zo groot mogelijk aantal geneesmiddelen binnen één groep gemeten moet worden. De reactieve kanten van een antilichaam en de gevoeligheid c.q. specificiteit t.a.v. geneesmiddelen wordt o.a. verkregen door het maken van lange ketens op bepaalde bindingsplaatsen zodat sterische hindering een koppeling in de weg kan staan. Deze antilichamen worden gemaakt met behulp van dieren o.a. ratten, konijnen, muizen en schapen. Deze dieren worden ingespoten met een antigeen. Het immunologie systeem van het dier zorgt ervoor dat door het langzame vrijkomen van het antigeen in het lichaam de productie van het antilichaam op gang komt. Verschillende antigenen leveren antilichamen met specifieke of non-specifieke bindingsplaatsen.

Figuur 1:

geneesmiddel + geneesmiddel* + antilichaam \rightleftharpoons
 1 [geneesmiddel*-antilichaam] + [geneesmiddel-antilichaam]
 2 en/of vrij geneesmiddel + vrij geneesmiddel*

3 Hoofdtypes

Competatief

competitie van gelabeld en niet gelabeld geneesmiddel

Niet competitief

verschillende wasstappen scheiden gelabeld geneesmiddel

Heterogeen

gebonden- en vrij geneesmiddel geeft hetzelfde signaal -scheiden

Homogeen

gebonden- en vrij gelabeld geneesmiddel geeft verschillend signaal -direkt te meten

verschillende test volumina, weinig monster nodig en er is een grote keuze in instrumenten.

Het antilichaam bestaat uit een groot eiwitproduct (albumine) dat óf heel specifiek monoclonaal óf een lage specificiteit heeft (polyclonaal). Beide soorten hebben hun voordelen en nadelen maar kunnen ook afhankelijk van de gewenste toepassing gebruikt worden omdat vaak bij

Voor bijvoorbeeld barbituraten kan het volgende onderscheid gemaakt worden. Wanneer antigeen no.1 wordt gebruikt, zal het geproduceerde antilichaam ongevoelig zijn voor veranderingen op plaats 5 en zal daarom zowel met pentobarbital maar ook met andere 5,5 disubstituten van barbituraten reageren zoals barbital, fenobarbital en 5-hydroxy metabolieten. Wil men een specifiek antilichaam verkrijgen dan moet er een langere keten toegevoegd worden tussen positie 5 en het eiwit of het eiwit moet aan een andere plaats in de keten gekoppeld worden zie figuur 2.

De niet competitieve assay ten opzichte van de competitieve assay heeft als nadeel dat de vaste fase bindingscapaciteit niet optimaal is, immers de vaste fase aan het glasoppervlak kan maar van één kant benaderd worden door het antilichaam. Ook de diverse wasstappen om alleen het gelabelde geneesmiddel te verkrijgen zorgen voor een minder goede opbrengst en een methode, die nogal bewerkelijk is.

Figuur 2

