

Immunoassays deel IV

Rob Kaletzky

Klinisch farmaceutisch laboratorium
Ziekenhuis Apotheek Midden-Brabant
TweeStedenziekenhuis
Tilburg

Naast de eerder besproken en meer gebruikte technieken van Emit en FPIA binnen de farmaceutische laboratoria zijn er nog twee technieken, die ook in Nederland op het ogenblik in gebruik zijn. Dit is de Kinetic Interaction of Microparticles in Solution kortweg KIMS- techniek van Roche en Cloned Enzym Donor Immunoassay (CEDIA) techniek van Microgenics

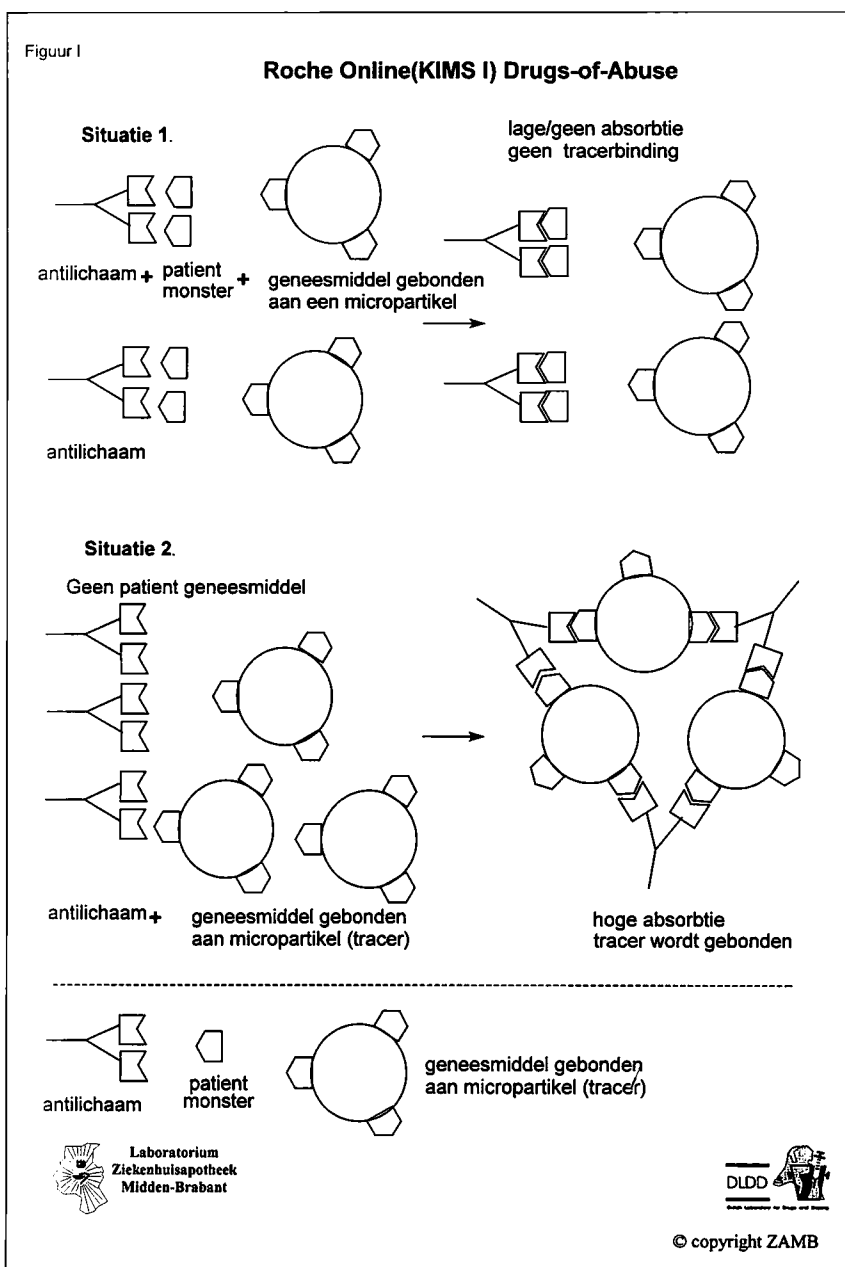
De firma Roche is voor velen een bekende naam in de farmacie sector, maar de firma Microgenics als zelfstandige firma is toch nog vrij onbekend. Omdat Roche in 1997 Boehringer had opgekocht en er sprake was van kartel vorming is Microgenics uit de Boehringer/Roche poot gegaan om weer als zelfstandige firma verder te kunnen gaan. De KIMS-techniek van Roche is ook hier in Nederland minder bekend, maar wordt al vele jaren (sinds 1992) toegepast in o.a. Dupont en Roche analysers. Microgenics (opgericht in 1987) is o.a. gevormd uit oud werknemers van Syva. Zo was er ook in Amerika de firma DRI, die door oud werknemers van Syva opgericht was en die al enige jaren Emit kits in vloeibare vorm op de markt brachten. De fa. DRI is nu samengegaan met de firma Microgenics en Microgenics is nu een zelfstandige kleinere firma met vestigingen in Amerika en verschillende Europese landen. Microgenics richt zich speciaal op de ontwikkeling van immunoassays voor DOA en TDM bepalingen. Dit heeft zich al doen gelden in het uitbrengen van nieuwe immunoassay bepalingen, die wij al jaren vragen aan de grotere broeders om die te ontwikkelen. De meest in het oog springende producten zijn

de benzodiazepine High Sensitivity kit*, de EDDP kit** en de 6-MAM kit***. Alle DOA bepalingen met uitzondering van de amfetamine kit zouden ook geschikt zijn voor bepalingen in bloed. De amfetamine kit bevat twee antilichamen waardoor ook de xtc-achtigen beter detecteerbaar zijn. Deze laatste ontwikkeling zien we ook bij EMIT (Dade Behring) en KIMS II. Op het ogenblik is Roche bezig met het uitbrengen van de

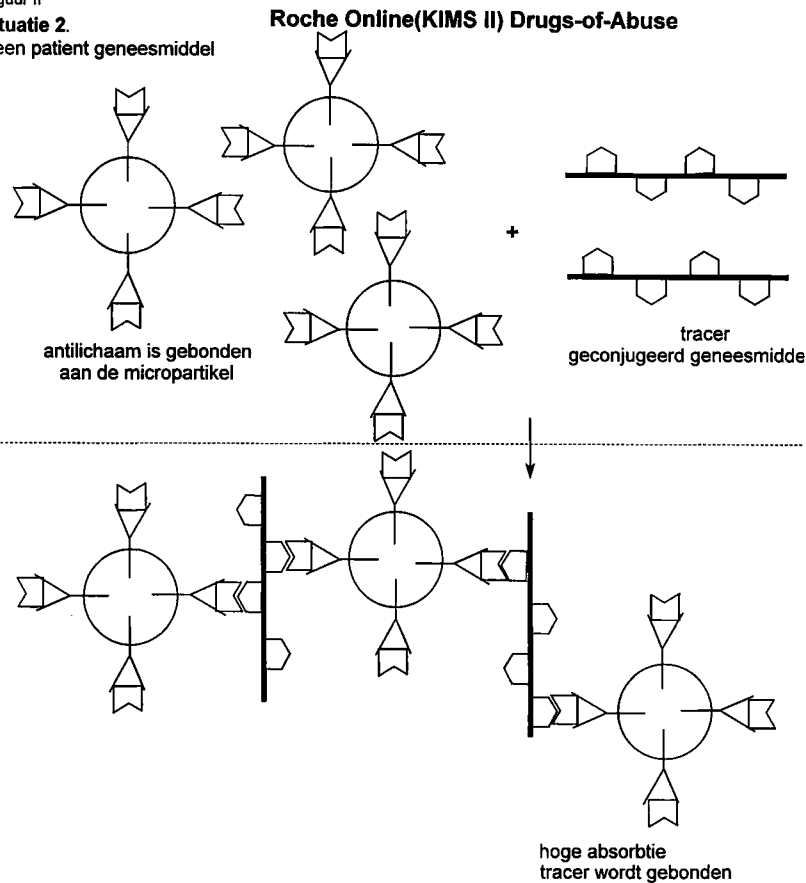
tweede generatie KIMS n.l. KIMS II. In ieder geval is het voor ons gebruikers een goede zaak dat er meer mogelijkheden komen in een toch voor ons wat starre immunoassay markt. Over de mogelijkheden en onmogelijkheden van de nieuwe immunoassays van Microgenics zal ons laboratorium nog berichten.

KIMS (zie Figuren I en II)

De volgende onderdelen zijn bij deze



Figuur II
Situatie 2.
Geen patiënt geneesmiddel



© copyright ZAMB

ofwel lichtverstrooiing door de resonantie van het molecuul. Deze lichtverstrooiing treedt dus op bij moleculen die met elkaar aggregeren. Het werkingsmechanisme in de KIMS immunoassay is gebaseerd op het voorkomen van aggregatie van de latexpartikels. De meettechniek van versterking van de licht intensiteit door lichtverstrooiing, die veroorzaakt wordt door lichtinstraling op moleculen heet turbidimetrie. De intensiteit veranderingen worden net zoals bij absorbtie spectrometrie gemeten in absorbtie eenheden. Bij de KIMS techniek gaat het geneesmiddel in het patiënten monster een competitie aan samen met het gebonden geneesmiddel aan de micropartikel (tracer) met het beperkt aantal bindingsplaatsen van het antilichaam. Er zijn ook nu weer twee situaties die kunnen optreden. Situatie I veel geneesmiddel in een patiënten monster koppelt met het antilichaam zodat de tracer niet met het antilichaam kan binden. De absorbtie blijft praktisch nul (figuur I situatie 1). Omdat deze immunoassay gebaseerd is op het voorkomen van de samenballing van de tracer met het antilichaam, dat uiteindelijk verantwoordelijk is voor de verandering in absorbtie zal er een omgekeerd evenredige logaritmische functie van de ijklijn tot gevolg zijn. Dit fenomeen kennen we ook van de FPIA methode (Extract2, 2000, immunoassays deel 3: FPIA). Met andere woorden: indien er weinig geneesmiddel van de patiënt in de te meten oplossing is, zal er een hoge absorbtie ontstaan (figuur I, situatie 2). Dit impliceert dat de hoogste gevoeligheid bij de laagste concentratie van geneesmiddel aanwezig in een patiënten monster wordt bereikt. KIMS gebruikt polyclonale antilichamen hetgeen een oorzaak kan zijn dat er eerder niet bedoelde endogene componenten mee koppelen aan het antilichaam. De grootte van het latexpartikel (zakt makkelijk uit in de vloeistof, altijd goed schudden voor gebruik), matrix effecten afkomstig van lipemisch (melkachtig) serum (voor spe-

techniek betrokken

- latexmicropartikel
- lichtverstrooiing
- aggregatie
- electromagnetische straling
- turbidimetrie

De KIMS immunoassay techniek dateert uit 1992. Als tracer heeft men een latex micropartikel (bolletje) ontwikkeld waaraan het te bepalen geneesmiddel gekoppeld is. In die tijd heeft men het latexpartikel kunnen verkleinen tot een grootte van slechts 300Å, waardoor het micropartikelconjugaat in oplossing voor de reactie de lichttransmissie veel minder blokkeert. Dit was nodig om de toegepaste meetmethode van "light scattering" te kunnen toepassen. Bij een aggregatie (samenbal-

len) van deze micropartikels zal de oplossing vertroebelen en wordt er een verandering van de lichtverstrooiing gemeten. De elektronen rondom een molecuul zullen bij absorbtie van licht (lees: electromagnetische energie) een oscillerende beweging maken. Het gevolg is dat er een oscillerende dipool ontstaat, die een bron van electromagnetische straling wordt met een zelfde golflengte als die van het ingestraalde licht. De aggregatie van moleculen geven een versterkte lichtverstrooiing bij karakteristieke golflengtes. Doordat de beide electromagnetische stralingen in fase zijn, zal er een versterking van licht intensiteit optreden. Daarom wordt bij deze latexpartikel reactie gebruik gemaakt van deze "light scattering"

cifieke serum bepalingen gebruikt Roche de FPIA techniek) of donkergekleurde urines spelen een storende rol bij deze immunoassay. Het verdere gevolg van de grootte van het latexpartikel is dat het bereik van de ijklijnen niet groot is. Bij de KIMS II techniek (figuur II) heeft Roche het antilichaam aan de micropartikel gebonden en bestaat de tracer uit geconjugeerd geneesmiddel. Het resultaat is dat er nu een beter dynamisch bereik geboden wordt (een verschil dat je ook zag tussen Emit 1, Emit 2 en Emit 2 plus) en waarbij nu de ijklijn een groter bereik heeft gekregen.

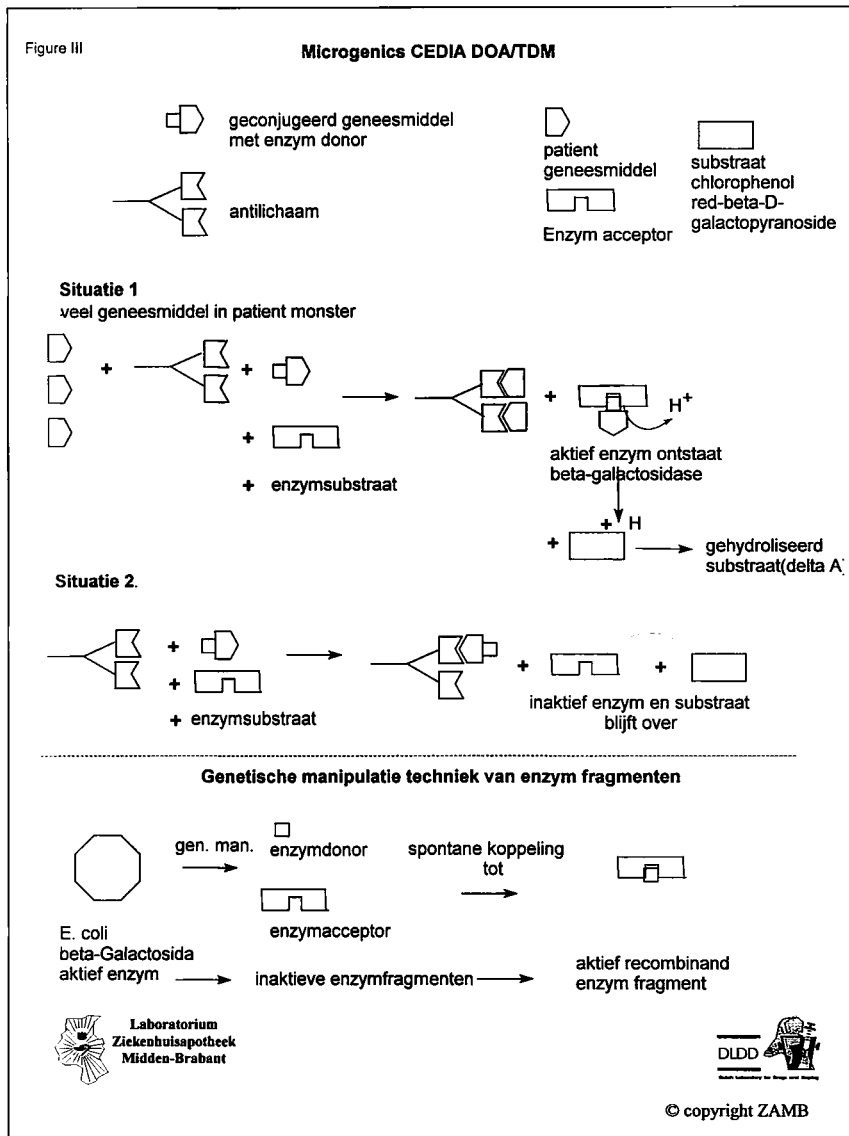
CEDIA (zie Figuur III)

De Cedia techniek bestaat al sinds de midden jaren tachtig en is dus al geruime tijd op de markt. Het is de eerste immunoassay die gebruik maakt van recombinant DNA techniek. De Cedia is evenals de EMIT een homogene enzym immunoassay techniek.

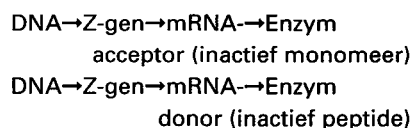
De volgende onderdelen zijn bij deze techniek betrokken

- Recombinant DNA
- Escherichia-coli
- enzym β-galactosidase
- mRNA
- Enzymdonor (ED)
- Enzymacceptor (EA)
- Co-enzym (substraat): chlorophenol red-β-D-galactopyranoside

Alvorens het werkingsmechanisme te beschrijven van de Cedia techniek volgt hier eerst een verkorte en vereenvoudigde uitleg van het principe van de recombinant DNA-techniek, die hier toegepast wordt. DNA, deoxyribonucleïne zuur is een polymeer dat bestaat uit een ruggegraat van onveranderlijke samenstelling van verschillende groepen genen, die gerangschikt zijn in een gevarieerde reeks. In dit geval bestaat het DNA-snoer uit een drietal genen, een promoter en een operator gedeelte. mRNA = messenger (boodschapper) RNA wordt direct gesynthetiseerd uit een gedeelte van het DNA. Elke keer dat een celdeling optreedt, wordt de gehele DNA



inhoud gedupliceerd. Hierbij wordt gebruik gemaakt van het DNA van de Escherichia-coli (escherichia is een bacterie/colibacil die o.a. in de darm van de mens voorkomt). Het Z-gen in het DNA zorgt voor de omzetting tot mRNA dat verder gederivatiseerd wordt tot een groot aminozuur. Dit gevormde polypeptide is inactief. Op deze manier worden er enzym donoren (ED) en enzym acceptors (EA) geproduceerd. Schematisch ziet dit er als volgt uit:



Bij het samenvoegen van EA en ED

zal er een recombinatie plaatsvinden waarbij het actieve β-galactosidase ontstaat dat net zo actief is als het natuurlijke β-galactosidase. Na deze korte introductie uit het leerboek van de moleculair biologie de werking van de Cedia techniek op zich.

Het actieve enzym β-galactosidase wordt dus genetisch gemanipuleerd in twee inactieve fragmenten een enzym acceptor (EA) en een enzym donor (ED) respectievelijk reagens 1 en reagens 2. Wanneer deze twee inactieve enzymen bij elkaar gebracht worden zal er dus een spontane hergroepering plaats vinden en ontstaat er weer een actief enzym dat het co-enzym chlorophe-

nol red- β -D-galactopyranoside splijt. In situatie 1 figuur III is geïllustreerd dat met aanwezigheid van veel patiënt geneesmiddel voornamelijk het geneesmiddel van de patiënt gebonden zal worden (competitie) met het antilichaam. Er zal veel actief β -galactosidase ontstaan waardoor veel gehydrolyseerd co-enzym ontstaat met als resultaat een hoge absorbtie. In situatie 2 wanneer er geen of weinig geneesmiddel van de patiënt in de oplossing

aanwezig is, zal het geconjugeerde geneesmiddel zich met het antilichaam binden waardoor er een inactief enzym over blijft en er geen hydrolyse plaats kan vinden van het co-enzym, geen of lage absorbtie dus. Als we de vier tot nu toe besproken immunoassays op een rijtje zetten, dan zien de reactie vergelijkingen bij een postief patiënten monster er uit als weergegeven in schema 1.

Wordt vervolgd.

- * Benzodiazepine HS is een benzodiazepine kit met on line deglucuronidering, zodat geglucuronideerde benzo's beter aantoonbaar zijn.
- ** EDDP = 2 ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine; de metaboliet van methadon.
- *** 6-MAM = 6 mono-acetyl-morfine

Schema 1

EMIT:	Enzym-Ag + AL+ gen.mid.	→	AL:gen.mid. + Ag-enzym (actief enzym, hoge absorbtie)
FPIA:	F-AG+AG + gen.mid.	→	AL:gen.mid. + Ag-F (lage polarisatie)
KIMS:	MPR + AL + gen.mid.	→	AL:drug + MPR (lage/geen absorbtie)
CEDIA:	ED-AG+ EA+AL+gen.mid	→	AL:gen.mid+EA::ED-Ag (actief enzym, hoge absorbtie)
waarbij:	AL	=	antilichaam
	Enz-AG/F-AG/ED-Ag	=	tracer
	Gen.mid.	=	geneesmiddel of drug van de patient
	MPR	=	micropartikel