

## Kongresskurzberichte

### Methodische Fortschritte im Laboratorium

Kongress der Deutschen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin e. V., Berlin 3. 5. – 7. 5. 1981

### Substrate, Enzyme, Hormone und Pharmaka

#### Teil 1 Enzyme

#### MM – Makrokreatinkinase als Ursache für einen falsch positiven CK-B Nachweis im Immuninhibitionstest

W. Fiehn<sup>1</sup> und D. Seiler<sup>2</sup>  
 Med. Universitäts-Poliklinik Heidelberg<sup>1</sup> und  
 Städt. Krankenanstalten Ludwigshafen<sup>2</sup>

Die Bestimmung der CK-MB im Immuninhibitionstest hat sich als wertvolle, in der Routine einfach durchzuführende Untersuchung in der Herzinfarkt Diagnostik erwiesen. Falsch positive Ergebnisse werden erhalten beim Vorliegen von CK-BB im Serum, z. B. bei ZNS-Erkrankungen, bei Neoplasien und beim Vorliegen einer sog. Makro-CK-BB. Es wird nun von einem Patienten berichtet, bei dem ein positiver Immuninhibitionstest gefunden wurde, ohne daß B-Untereinheiten vorlagen.

Chromatographische, elektrophoretische und immunologische Untersuchungen wurden durchgeführt. Es handelt sich um eine Makro-CK-MM, deren elektrophoretische Mobilität zwischen CK-MM und CK-MB liegt und die durch inhibierende AK nicht gehemmt wird. Behandlung mit Polyäthylenglykol 6000 führte zu einer Dissoziation von Proteinkomponente und CK, die nun die elektrophoretische Mobilität einer CK-MM zeigte und in ihrer Aktivität durch inhibierende AK gehemmt wurde.

#### Neuer Screening-Test für die Erkennung der chronischen Pankreatitis: IsoAmylase

K. Birath und H. Fitterer  
 Forschungslaboratorien der Pharmacia, Uppsala und  
 Deutsche Pharmacia, Freiburg

Die Bestimmung der  $\alpha$ -Amylase ist wegen der unterschiedlichen Herkunft des Enzyms von beschränkter diagnostischer Aussagekraft. Bestimmt man zusätzlich noch ein weiteres Pankreasenzym, die Lipase, so sind diese beiden Parameter nur beim entzündlichen Schub einer chronischen oder akuten Pankreatitis mit einer Treffsicherheit von < 95% aussagefähig. Die Bestimmung der  $\alpha$ -Amylase und der Lipase gibt aber keine Auskunft über den Verlust an Pankreasgewebe (chron. Pankreatitis).

Früher schon war der diagnostische Wert von Isoenzymen der Amylase bekannt, doch die Bestimmung war mit großem technischen Aufwand verbunden.

Erst seit Entdeckung eines Inhibitor-Proteins aus Weizen ist es möglich, die Speicheldrüsen-Amylaseaktivität zu inhibieren und so die wahre Pankreas-Amylaseaktivität spezifisch und einfach

zu bestimmen. Die Ergebnisse zeigen, daß der Verlust an Pankreasgewebe wahrscheinlich mit einem Abfall der Pankreas-Amylaseaktivität verbunden ist.

Mit dieser Methode ist somit ein Screening zur Erkennung der chronischen Pankreatitis möglich. Ein Testkit auf der Basis der Inhibitortechnik ist bereits verfügbar (Phadebas® IsoAmylase Test, Pharmacia).

#### Ergebnisse der $\alpha$ -Amylase-Bestimmung mit der enzymatischen und der Jod-Stärke-Methode

K. Abraham und W.-W. Weigold  
 Zentrallabor, Rudolf-Virchow-Krankenhaus, Berlin  
 J. Schneider und J. Schmitz  
 I. Innere Abt., Rudolf-Virchow-Krankenhaus, Berlin

Aus insgesamt 2325 Serum- und Urinproben wurde in einem Großkrankenhaus mit fast allen Fachdisziplinen die  $\alpha$ -Amylase mit zwei Methoden parallel untersucht. Zur Anwendung kamen eine jodometrische und eine enzymatische Methode. Das Substrat der jodometrischen Methode war Amylose, das der enzymatischen Methode Maltotetraose.

Bei Zugrundelegung der Normbereichsgrenzen ergaben sich für die beiden Methoden folgende Konstellationen:

n	jodometrische Methode	enzymatische Methode
1790	normal	normal
379	normal	erhöht
11	erhöht	normal
145	erhöht	erhöht

Von den Patienten der gastroenterologischen Abteilung wurden folgende Untersuchungsergebnisse in die Auswertung mit einbezogen: GOT, GPT, alk. Phosphatase, gamma-GT, Lipase, teilweise der Pankreoläuryltest, die Leukozytenzahl, die BSG, die Temperatur, die Sonographie und teilweise die Computertomographie.

Mit der enzymatischen  $\alpha$ -Amylase-Bestimmungsmethode wurden eindeutig mehr pathologische Ergebnisse erhalten als mit der jodometrischen Methode. Über die Korrelation der Laborergebnisse zum klinischen Befund wird berichtet.

## Rationelle Funktionsdiagnostik des exokrinen Pankreas

F. Tympner

Abteilung für Gastroenterologie der LVA-Klinik Herzoghöhe, Bayreuth

Die zunehmende Inzidenz der chronischen Pankreatitis durch möglicherweise steigenden Alkoholkonsum macht eine rationelle exokrine Pankreasfunktionsdiagnostik unumgänglich.

1.) Die Chymotrypsinbestimmung im Stuhl ergab bei 57 Gesunden und 51 Patienten mit chronischer Pankreatitis keine falsch positiven und in 9,9% der Fälle falsch negative Resultate.

2.) Eine selektive Pankreassekretaspiration wurde bei 127 Probanden durchgeführt. Sofort nach Aspiration wurde mit einem modifizierten Kapillarviskosimeter die Viskosität bestimmt. Der obere Grenzwert ( $\bar{x} + 2s$ ) 1,22 mPa·s 39 Gesunder wurde nur von einem Kontrollprobanden überschritten. Es fand sich eine Sensitivität von 97,4% und bei 46 Patienten mit chronischer Pankreatitis eine Spezifität von 91,3% der Fälle. Mittels eines neuen Standards kann auch der Lactoferringehalt in mg% angegeben werden. Bei 20 Gesunden ergab sich in 7,1% der Fälle ein falsch positives und bei 40 Patienten mit chronischer Pankreatitis in 15% der Fälle ein falsch negatives Ergebnis.

3.) Ein volumenverlustkorrigierter Sekretin-Pankreozymin-Test wurde etwa 1000 mal durchgeführt und 487 mal statistisch ausgewertet. Es fand sich eine gute Korrelation zur Sonographie und zur endoskopisch retrograden Pankreatikographie.

Zusammenfassung: Ein rationelles Vorgehen in der exokrinen Pankreasfunktionsdiagnostik ist zunächst die Bestimmung der fäkalen Chymotrypsinaktivität. Darüber hinaus sind Viskosität und Lactoferringehalt des reinen Pankreassekretes wichtige Parameter. Zuletzt sollte dann der labortechnisch aufwendige, aber zuverlässige Sekretin-Pankreozymin-Test durchgeführt werden.

## Die Konzentrationsbestimmung der sauren Prostataphosphatase im Serum und Knochenmark mit einem Enzymimmunoassay und deren diagnostische Bedeutung

W. Ehrenthal<sup>1</sup>, W. Prellwitz<sup>1</sup>, U. Engelmann<sup>2</sup>

Abteilung für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin<sup>1</sup> und Urologische Klinik und Poliklinik<sup>2</sup> der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz

Der von Grenner und Schmidtberger entwickelte Enzymimmunoassay (EIA) nach dem Sandwich-Verfahren (J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17, 156 [1979]) wurde mit dem Prostatic Acid Phosphatase <sup>125</sup>I RIA KIT (New England Nuclear) verglichen. Zwischen beiden Testen wurde eine sehr gute Korrelation ermittelt:

$$y = 0,056 + 1,501 x \text{ mit } R = 0,9667 \text{ bei } n = 401 \text{ (} y = \text{RIA, } x = \text{EIA).}$$

Ähnlich gute Korrelationen findet man sowohl für den RIA als auch für den EIA innerhalb eines Testverfahrens beim Vergleich zwischen Serum und Plasma. Hingegen ist die Korrelation zwischen den immunologischen Verfahren und der Aktivitätsbestimmung der tartrathemmbar sauren Phosphatase sehr viel schlechter. Eine Lyse von Thrombozyten, Leukozyten und Erythrozyten ist ohne Einfluß auf die Konzentrationsbestimmung mit dem EIA. Eine Lagerung der Serumproben über längere Zeit bei  $-20^{\circ}\text{C}$  oder über einige Tage im Kühlschrank ist möglich. Störungen des Testes bei Alkalisierung des Serums durch Abgabe von  $\text{CO}_2$  treten nicht auf. Wegen der guten Korrelation zwischen Serum und Knochenmarkspunktat liefert die Bestimmung der sauren Prostataphosphatase im Knochenmarksaspirat keine zusätzliche diagnostische Information. Die Bedeutung der immunologischen Bestimmung der sauren Prostataphosphatase wird nicht in der Screening-Untersuchung für die Stadieneinteilung des Prostatakarzinoms gesehen. Die Bestimmung dient in erster Linie der Überwachung der Therapie sowie der frühzeitigen Diagnose eines Wechsels des Stadiums des Prostatakarzinoms von Mo nach Mi.

## Neuere Entwicklungen auf dem Gebiet des Immunoassay

### Chemiluminescence Immunoassay

A. Thore and T. Olsson

Department of Clinical Chemistry Huddinge University Hospital, Sweden

Chemiluminescent red-ox reactions are used for many analytical purposes in biochemistry and medicine. In chemiluminescence analysis the light emitted during the chemical reaction is measured and can be related to concentrations of reactants in the reaction mixture.

The main feature of chemiluminescence analysis is the extremely high sensitivity (detection limit  $10^{-15}$  mol or less) which is attained using relatively simple instrumentation.

Recently chemiluminescence analysis has received considerable interest as a possible basis for sensitive non-isotopic immuno-analytical methods. The principle has been to label antigen or antibody with substances active in chemiluminescent reactions, using chemiluminescence as the final detection step.

The luminescent labels have been reactants or catalysts from several chemiluminescent systems; for example luciferase enzymes, pyridine and adenine nucleotides, luminol and its derivatives, haemin, peroxidase.

In several studies analytical sensitivity equal to or better than that obtained with radioimmunoassay or enzyme immunoassay has been reached.

The presentation summarizes present experience with chemiluminescent immunoassay.

### Der PACIA (Particle Counting Immunoassay) – ein neues Analysenkonzept für den Immunoassay

H. T. Seeger und H. W. Holy

Technicon GmbH, Bad Vilbel

Latexpartikel, die mit reaktiven Substanzen beladen sind, finden seit Jahren weite Anwendung für Agglutinations- oder Inhibitionsreaktionen. Einem direkten Vergleich mit den Standardmethoden für einen Immunoassay, z. B. dem RIA oder der (automatisierten) Immunpräzipitation konnten diese Verfahren allerdings nicht immer standhalten, weil die Präzision durch den Meß- bzw. Auswertevorgang begrenzt wurde. Im PACIA-System – einem neuentwickelten Analysensystem auf der Basis des AutoAnalyzer – finden 0,8  $\mu$  große Latexpartikel Verwendung, deren Zahl vor und nach der Reaktion bestimmt wird, wodurch von der meßtechnischen Seite eine Präzision  $\leq 1\%$  gegeben ist. Der elektrophoretische arbeitende Zählzähler des Systems arbeitet nach dem Dunkelfeldprinzip. Das Analysensystem umfaßt ferner Analogschreiber, Rechner und Drucker, sowie einen automatisch arbeitenden Reaktionsteil mit Probennehmer. Sämtliche Analysenschritte (Ansaugen der Probe, Dosieren der Latex-Suspension und mehrerer Reagenzien) laufen vollmechanisiert ab; ein Umprogrammieren einzelner Analysenschritte ist leicht möglich. Eine Phasentrennung erfolgt an keiner Stelle. Pro Stunde werden im PACIA-System 60 Seren analysiert, die Ergebnisse liegen etwa 30 Minuten nach dem Ansaugen vor.

Als Bindeglied zwischen den Latexpartikeln und den aufgezogenen Proteinen dient ein kettenförmiges Molekül mit zwei endständigen reaktiven Gruppen. Der bisherige Anwendungsbereich umfaßt die quantitative Bestimmung von Immunglobulinen und Antigenen (z. B. IgG, IgA, IgM, IgE, Masern, Herpes), Haptenen (z. B. T 4), Hormonen (Insulin, Wachstumshormon, HCG, HPL) und Immunkomplexen. Bei dieser Reaktion handelt es sich um einen kompetitiven Bindungsassay mit 2 Agglutinatoren, die ne-

ben den Immunkomplexen um IgG-beladene Partikel konkurrieren.

Die Korrelation zum RIA oder zu der AIP (Automatisierte Immunpräzipitation) ist gut ( $r = 0,98$  für Ferritin,  $r = 0,96$  für IgE), die theoretische Nachweisgrenze liegt bei  $10^{-16}$  mol/l; Konzentrationen von  $10^{-13}$  mol/l Insulin konnten erfaßt werden. Die vorliegenden Ergebnisse der Immunkomplex-Bestimmung belegen den Wert des Systems für die Diagnose und vor allem für die Verlaufskontrolle.

## Fluoreszenz-Messungen: Grundlagen und moderne Instrumentierung

I. Ringhardt  
Bodenseewerk Perkin-Elmer & Co GmbH, Überlingen

Nach einer kurzen Einführung in die physikalischen Grundlagen der Lumineszenzphotometrie werden deren für die Laboratoriumsmedizin relevanten photometrischen Techniken beschrieben:

- Fluoreszenz in der Serumanalyse zur direkten Bestimmung von Serumbestandteilen und Metaboliten, sowie zu Nachweisverfahren über Fluoreszenz-Immuno-Assay (FIA).
- Phosphoreszenz-Messungen bei Raumtemperatur als neues Verfahren zur Bestimmung biologisch wichtiger Substanzklassen.
- Chemilumineszenz als hochempfindliche Meßmethode zur Bestimmung  $H_2O_2$ -produzierender Enzymsysteme.
- Biolumineszenz als bisher empfindlichstes Nachweisverfahren für ATP und NADH über das Luciferin/Luciferase-System.

Die instrumentellen Voraussetzungen für die einzelnen Verfahren werden erläutert und deren Vor- und Nachteile gegeneinander abgewogen. Besonders hervorgehoben werden für die klassische Fluorimetrie die Quantenkorrektur als Mittel zur geräteunabhängigen Vergleichbarkeit von Fluoreszenzspektren, Laseranregung und Xenonblitzanregung bei „time-resolved“ Fluoreszenz für homogene FIA und der Einsatz von Photonen-zählern in der Chemi- und Biolumineszenz.

Am Beispiel des Perkin-Elmer Lumineszenz-Spektrometers LS-5 wird gezeigt, daß es möglich ist, die Kombination einer gesputten Xenon-Lichtquelle mit einer mikrocomputer-gesteuerten Torschaltung für alle zuvor besprochenen Einsatzmöglichkeiten einschließlich der Chemilumineszenzmessungen vorteilhaft einzusetzen.

## Polarisation and quenching fluoroimmunoassay Heterogeneous fluoroimmunoassay using magnetisable particles

M. H. H. Al-Hakim, M. Massoud, A. Sidki and D. S. Smith  
Department of Chemical Pathology, St. Bartholomew's Hospital,  
London EC1, U.K.

One attraction of non-isotopic immunoassays has been the possibility of avoiding the need for physical separation of antibody-bound and free fractions of the labelled-antigen (tracer) reagent, which is an essential step in radioimmunoassay. Homogeneous (non-separation) immunoassays may be performed if antibody-binding of the tracer results in a change in signal from the label.

When fluorescent-labelled antigen is employed, a variety of homogeneous fluoroimmunoassays (FIA) can be developed. In some cases, antibody-binding of tracer may lead to a significant reduction in emission intensity and hence a simple measurement of fluorescence can serve as the assay end-point ("quenching FIA"). Another technique involves measurement of fluorescence polarisation which responds to the increase in effective molecular size when a relatively small tracer is bound by the large antibody molecule; thus free tracer undergoes relatively fast Brownian rotation and has low polarisation of fluorescence, while bound tracer experiences the slower rotation of the antibody and gives a higher signal ("polarisation FIA").

Homogeneous FIA has chiefly been applied to the determination of haptens, although assay of large antigens such as proteins is also possible, for example using fluorescent excitation transfer or substrate-labelling techniques. The major practical disadvantage of such methods is the inevitable interference due to endogenous fluorophores, chromophores, and proteins of serum or plasma specimens; this has restricted their application to analytes that circulate in the  $\mu$ mol/l concentration range or above.

When a separation step is included (heterogeneous FIA), it may enable the removal of interfering factors prior to end-point measurement, and hence permit exploitation of the full potential sensitivity of FIA. Separation may be simplified and speeded by the use of antibodies that are coupled to magnetically attractable particles. For example, magnetisable iron oxide micro-particles may be incorporated into a cellulose matrix to which antibodies may be covalently linked by the cyanogen bromide method. Such a solid-phase (typical size range 1–10  $\mu$ m) can be rapidly sedimented from immunoassay incubation mixtures using a simple permanent block magnet, thereby obviating the need for centrifugation.

Using antibodies to digoxin coupled to magnetisable cellulose/iron oxide particles and a fluorescein-labelled digoxin derivative in a sequential-addition protocol, we have been able to determine serum digoxin in the clinically important concentration range (between about 0.5 and 4  $\mu$ g/l). The detection limit of the assay is 0.2  $\mu$ g/l (0.26 nmol/l). This level of sensitivity probably represents the limit that is accessible by FIA using current types of tracer prepared with simple organic fluorophores, and conventional fluorimetric detection.

## Sol particle immunoassay (SPIA)

J. H. W. Leuvering, P. J. H. M. Thal, M. van der Waart, and A. H. W. M. Schuur  
Organon Scientific Development Group, Oss, The Netherlands

Gold sol particles (diameter 50 nm) were used as labels in various types of immunoassay. Antibodies were labelled with gold particles by adsorption of the antibodies on to the particle surface resulting in a (coloured) antibody gold particle conjugate.

Using the various properties of these conjugates several detection methods can be used:

conjugate property	detection method
colour	colorimetry, eye
particle	lightscattering
gold particle	atomic absorption spectrophotometry

Just like antibody-coated latex particles, antibody-coated gold particles were used for (homogeneous) agglutination SPIAs. Since the absorption spectrum of the conjugate changes considerably as a result of agglutination, it was possible to use colorimetry and even the naked eye for detection. Like for latex particles lightscattering can be used too.

For haptens it was possible to develop an agglutination inhibition SPIA. Gold particles coated with antibody against a hapten were agglutinated by an artificial polyvalent hapten complex obtained by coupling several hapten molecules to e.g. a bovine serum albumin (BSA) molecule. The agglutination of suitably chosen amounts of the conjugate and the hapten-BSA complex was inhibited by free hapten. Again colorimetry, the naked eye and lightscattering were used for detection.

The gold particle conjugates were also used for (heterogeneous) sandwich SPIA. Antigen was bound by antibodies adsorbed onto the wall of a reaction vessel. After incubation with an excess antibody gold particle conjugate, the free antibody gold particle conjugate was removed. The antibody gold particles bound to the wall were redispersed in an acid or a base causing dissociation of the immune complex. The absorbance (colorimeter) or the colour intensity (eye) is related to the concentration of the antigen in the sample. Very sensitive immunoassays were obtained using atomic absorption spectrophotometry for detection.

For haptens we developed an inhibition-type sandwich SPIA. A polyvalent hapten-BSA complex was used in the sandwich instead of the antigen. The formation of the sandwich was inhibited by free hapten. For detection the same methods can be used as for antigen.