

Immunoassays



Karen Robijns – KKG, Den Haag

Inhoudsopgave



- Aanleiding
- Historie
- Principe
- Immunoassay's
 - EIA
 - FPIA
 - Turbidimetrische immunoassays
 - ✦ KIMS
 - ✦ PETINIA
 - MEIA
 - CMIA
- Methodedefinitie

Aanleiding



- **Methodedefinitie in Qbase tot 2014**
 - EMIT, FPIA, GC, HPLC, KIMS, LC/MS(/MS), Turbidimetrie
 - Overigen
 - ✦ Online TDM Cobas
 - ✦ Immulite
 - ✦ Homogeneous enzyme immunoassay technique
 - ✦ Beckman Coulter: AU2700
 - ✦ DxC600
 - ✦ Architect C4000
- **Onwetendheid/onduidelijkheid methoden**
 - 2015: nieuwe definities methoden Qbase o.b.v. REF-nummers
 - Presentatie discussiedag 2015

Historie



- 1950's: introductie eerste immunochemische bepaling (RIA) voor hormonen
 - Berson en Yalow: insuline (RIA)
 - Elkins: thyroxine
- 1960's: introductie kleurgenererende enzymen
 - Snelle ontwikkeling van testen voor diagnose en monitoring in endocrinologie
- 1980's: automatisering leid tot snellere analyses, minder arbeidsintensief, grotere betrouwbaarheid
 - Uitbreiding nieuwe gebieden (TDM, tumor markers, vitamines)
- 1983: introductie acridinium ester (chemiluminiscentie)

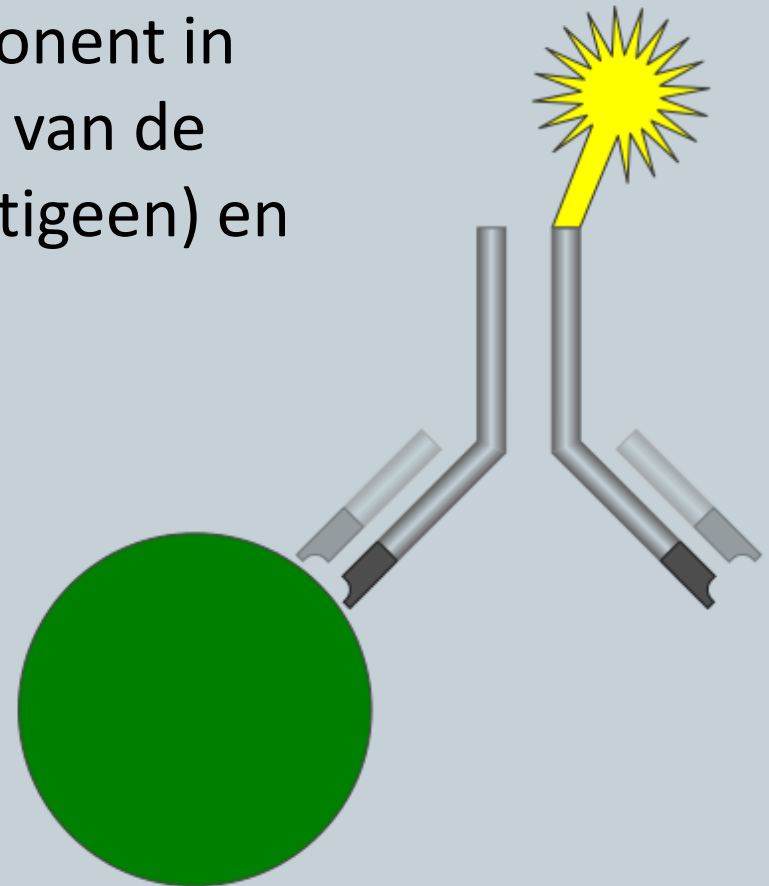
Black box



Principe immunoassay



- Biochemische methode die de aanwezigheid of de concentratie van een component in een oplossing meet, door middel van de reactie tussen de component (antigeen) en een antilichaam
 - Analyt (antigeen)
 - Antilichaam
 - Detecteerbaar label
- Type
 - Homogeen vs. heterogeen
 - Competitief vs. non-competitief



EIA



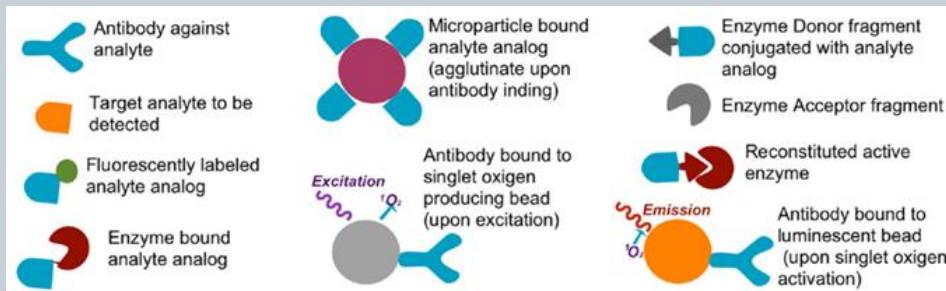
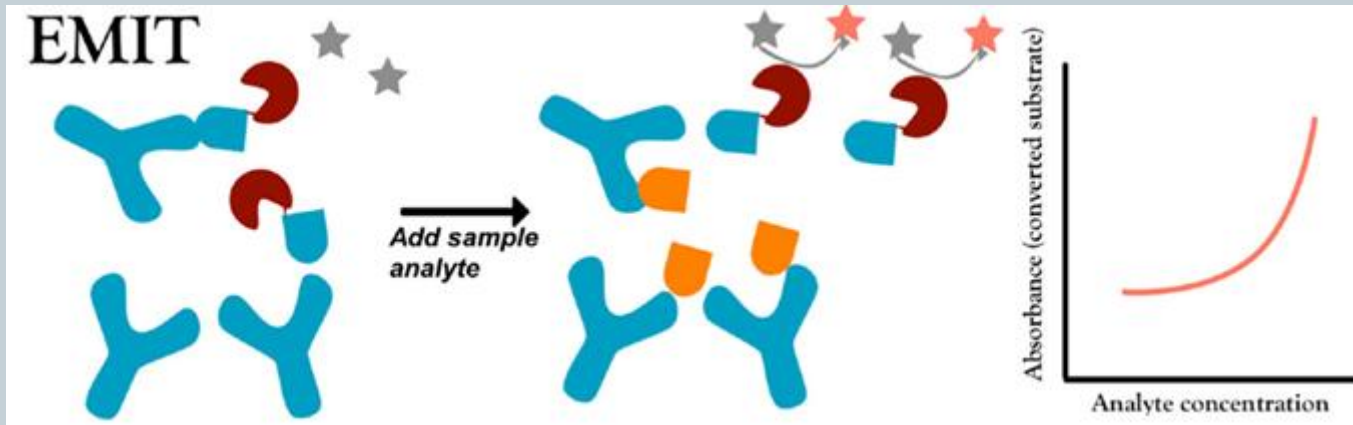
- **Enzymatische ImmunoAssay**
 - G6PDH
 - β -galactosidase
- **Competitieve, homogene immunoassay**
- **Principe**
 - Competitie analyt en analyt-enzym complex voor antilichaam
 - Binding aan antilichaam \rightarrow verandering enzymactiviteit
 - Spectrofotometrische bepaling

EIA – G6PDH



- Glucose-6-phosphate dehydrogenase
- ARK, Abbott, Beckman Coulter, Roche, Siemens (EMIT[®])
 - Anti-epileptica, Antimicrobiële middelen, Cardiacs, Pijnstillers
- Reagentia
 - G6P (glucose-6-fosfaat), NAD⁺, antilichaam
 - Analyt-G6PDH complex
- Principe
 - ↑ analyt + antilichaam en ↓ analyt-G6PDH complex + antilichaam (inactief)
 - ↑ actief G6PDH + G6P → H⁺ → omzetting NAD⁺ naar NADH
 - ↑ absorptie bij golflengte 340 nm door NADH

EIA – G6PDH (2)

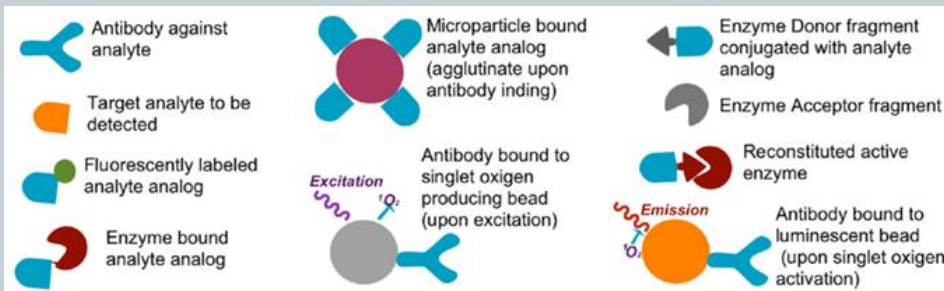
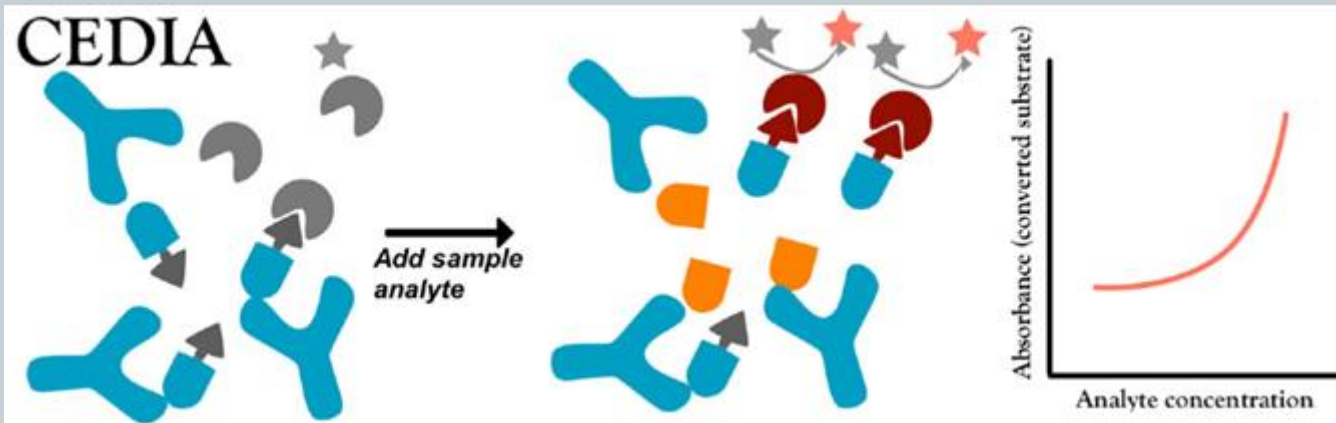


EIA – β -galactosidase



- Beckman Coulter, Roche, Thermo Scientific (CEDIA[®])
 - Anti-epileptica
- Reagentia
 - Enzymacceptor, analyt-enzymdonor complex
 - Antilichaam
- Principe
 - \uparrow analyt + antilichaam en \downarrow analyt-enzymdonor complex + antilichaam
 - \uparrow hercombinatie analyt-enzymdonor complex en enzymacceptor \rightarrow actief β -galactosidase \rightarrow knipt substraat \rightarrow kleurverandering
 - Spectrofotometrische bepaling

EIA – β -galactosidase (2)

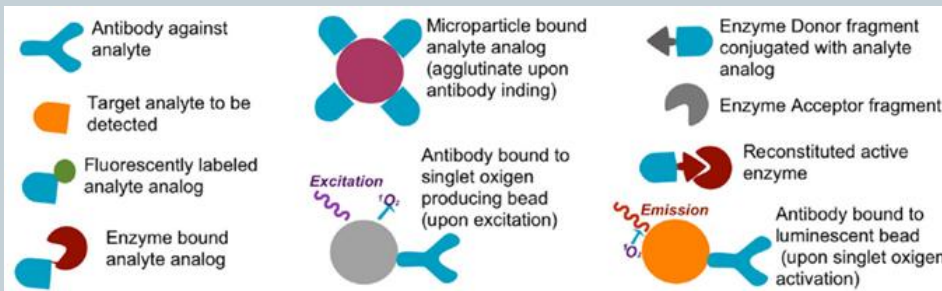
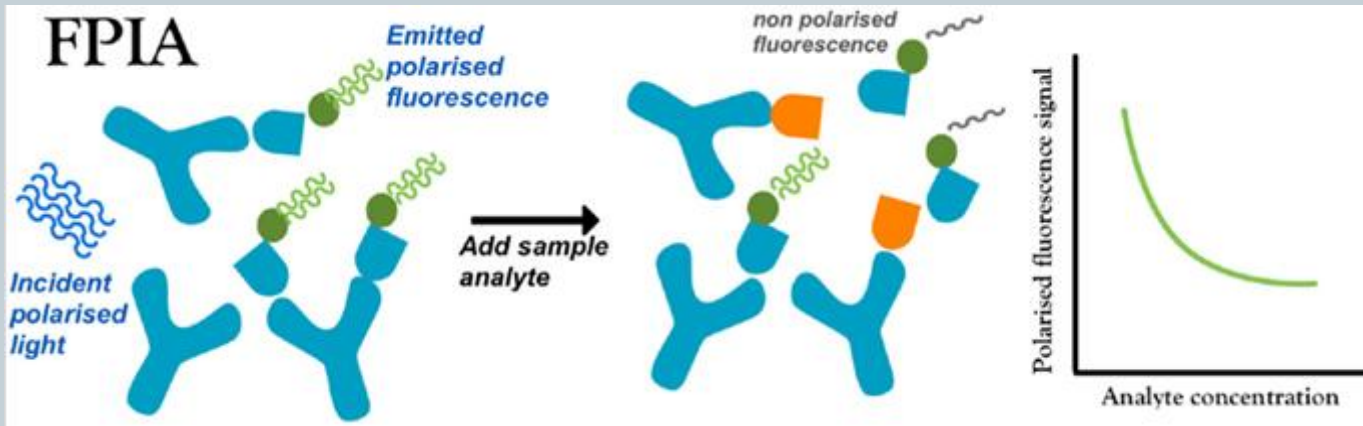


FPIA



- **Fluorescence Polarization ImmunoAssay**
 - Competitieve homogene immunoassay
- **Abbott, Roche**
 - Anti-epileptica, Antimicrobiële middelen
- **Reagentia**
 - Analyt-fluorescent label complex
 - Antilichaam
- **Principe**
 - ↓ analyt + antilichaam en ↑ analyt-fluorescent label complex + antilichaam
 - ↓ rotatiesnelheid van analyt-fluorescent label complex + antilichaam → ↑ gepolariseerd licht

FPIA (2)

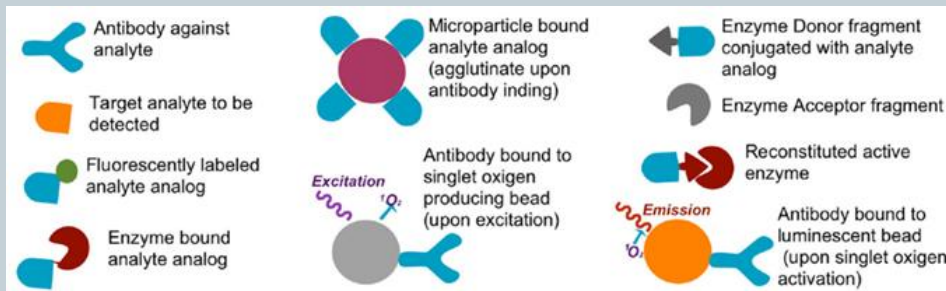
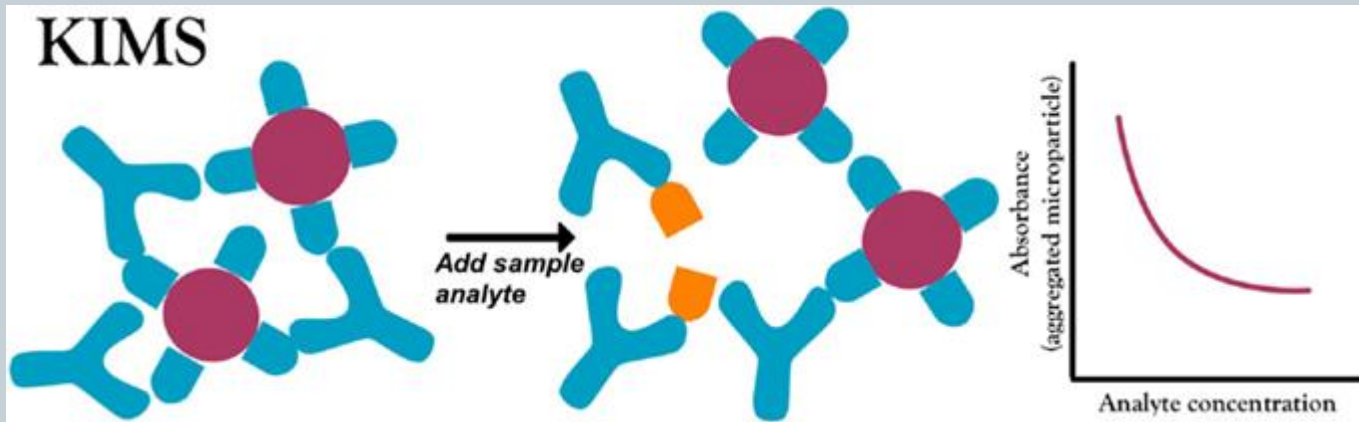


Turbidimetrische immunoassays



- **Turbidity = troebelheid van een oplossing**
 - KIMS - Kinetic Interaction of Microparticles in Solution
 - ✦ Roche
 - PETINIA - Particle-Enhanced Turbidimetric Inhibition ImmunoAssay
 - ✦ Abbott, Beckman Coulter, Siemens, Thermo Scientific
- **Reagentia**
 - Partikel gecoat met analyt
 - Antilichaam
- **Principe**
 - \uparrow analyt + antilichaam en \downarrow partikel gecoat met analyt + antilichaam \rightarrow
 \downarrow vorming onoplosbare aggregaten
 - \downarrow troebeling \rightarrow \downarrow absorptie van licht

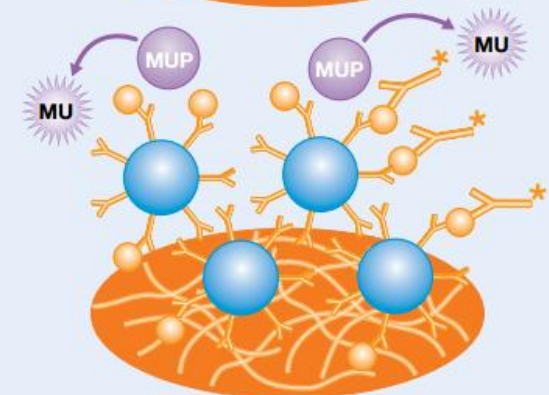
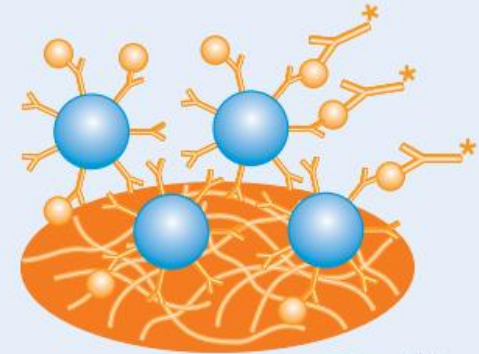
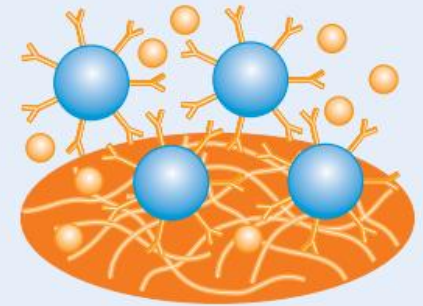
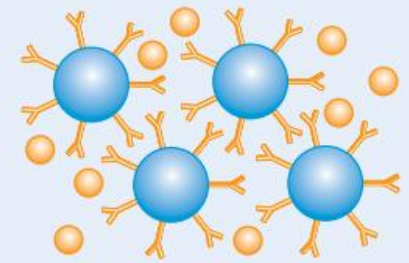
Turbidimetrische immunoassays (2)



MEIA



- **Microparticle Enzyme ImmunoAssay**
 - Heterogene immunoassay
- **Abbott (digoxine)**
- **Reagentia**
 - Micropartikel gecoat met antilichaam
 - Antilichaam-enzym complex
 - Enzym substraat
- **Principe**
 - Micropartikel binding aan analyt
 - Binding van microparticles aan **glass fiber matrix** → v
 - Binding van antilichaam-enzymcomplex aan analyt-n
 - Toevoeging enzym substraat → fluorescentie



CMIA



- **Chemiluminescent Microparticle ImmunoAssay**
 - Heterogene immunoassay
- **Abbott**
 - Anti-epileptica, Antimicrobiële middelen, Cardiac
- **Reagentia**
 - Magnetisch micropartikel gecoat met antilichaam
 - Antilichaam-enzym complex
 - Enzym substraat
- **Principe**
 - Micropartikel binding aan analyt
 - Wasstap/scheiding o.b.v. magnetische krachten
 - Binding van antilichaam-enzymcomplex aan analyt-micropartikel complex
 - Toevoeging enzym substraat → chemiluminescentie

Enzymatische assays



- Enzymatische assays

- Alcohol – alcohol dehydrogenase
- GHB – GHB dehydrogenase
- Salicylzuur – salicylaat hydroxylase



- Spectrofotometrie

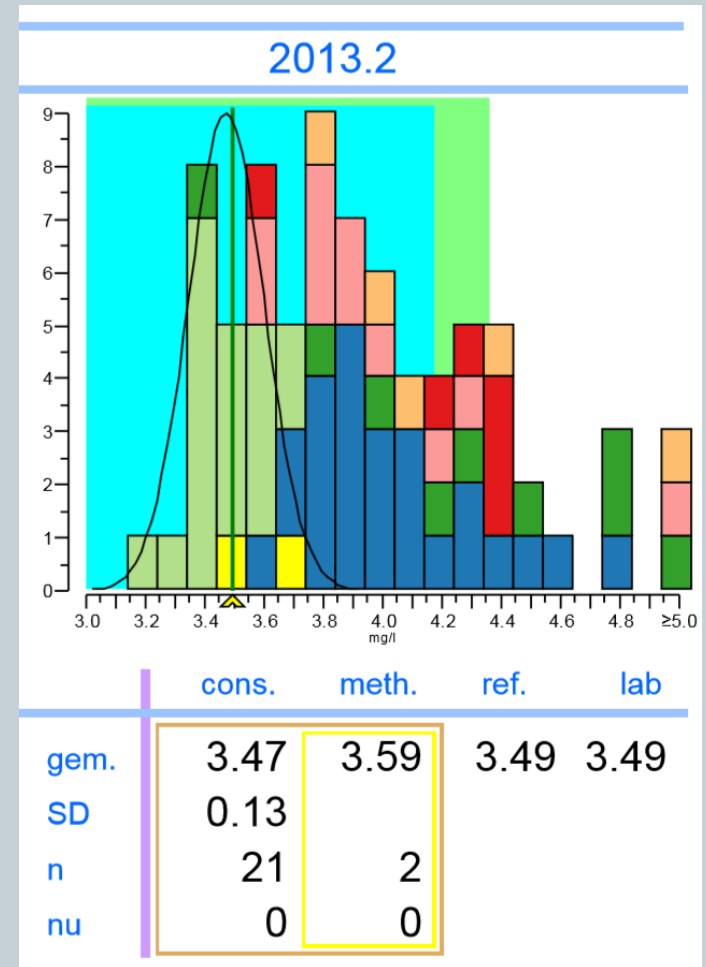
- Lithium
- Paracetamol
- Salicylzuur

Nieuwe methodedefinities QBase

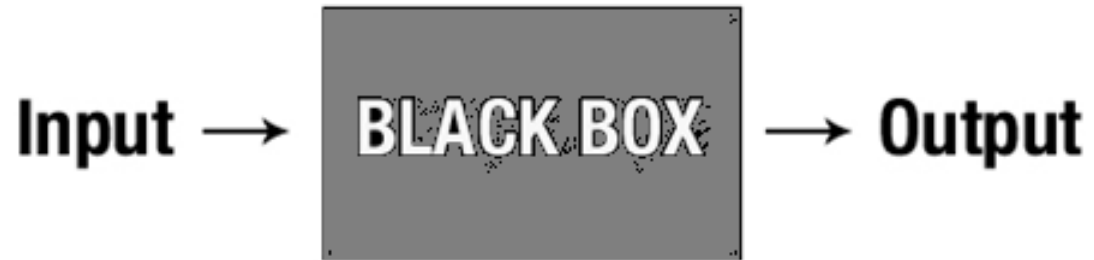


- O.b.v. methode en firma
 - EIA G6PDH Abbott
 - EIA β -galactosidase Beckman Coulter
 - FPIA Roche
 - PETINIA Siemens

- Vergelijking
 - Methode
 - Fabrikant



Black box



Vragen?

