

# Quantitative immunchemische Plasmaproteinbestimmung mittels Nephelometrie und Turbidimetrie\*

Quantitative Determination of Plasma Proteins by Antigen-Antibody Reactions Using Nephelometry and Turbidimetry

L. Thomas

Zentrallabor Krankenhaus Nordwest, Frankfurt

## Zusammenfassung:

*Zur quantitativen Plasmaproteinbestimmung sind die Immunnephelometrie und die Immunturbidimetrie häufig eingesetzte Bestimmungstechniken. Aufgrund der kürzeren Analysenzeit bei vergleichbarer oder besserer Präzision und Empfindlichkeit haben diese Techniken die radiale Immundiffusion in vielen Laboratorien ersetzt.*

*Die mechanisierte Plasmaproteinbestimmung erfolgt als Antigen-Antikörper-Reaktion entweder mit Proteinanalyzern oder mit klinisch-chemischen Analysensystemen, an denen normalerweise Enzyme und Substrate bestimmt werden.*

*Zwischen den verschiedenen Plasmaproteinen im Serum besteht ein bis zu 10 000facher Konzentrationsunterschied und die biologische Varianz des einzelnen Plasmaproteins ist breit. Damit die Plasmaproteine mit hoher analytischer Sensitivität über einen weiten Konzentrationsbereich, mit guter Präzision und der erforderlichen Richtigkeit mechanisiert bestimmt werden können, ist eine gute Adaption des Immunreagenzes auf das mechanisierte Analysensystem erforderlich. Diese Übersicht soll dazu Grundlagen vermitteln.*

## Schlüsselwörter:

*Plasmaproteine – Immunturbidimetrie – Immunnephelometrie – Plasmaproteinanalysensysteme*

## Summary:

*Nephelometry and turbidimetry are the most widely used methods for the plasma protein quantitation. These techniques have replaced radial immunodiffusion in many laboratories because of their shorter analysis time and the comparable or better precision and analytical sensitivity.*

*For mechanised immunochemical assays of plasma proteins the measurement of antigen-antibody reactions are adapted to special protein analyzers or to automated chemistry analyzer systems.*

*Plasmaproteins differ from each other with respect to their quantity more than 10 000 fold in their serum concentration, the interindividual variation is broad. To provide accurate and precise plasma protein measurements with high analytical sensitivity and acceptable measuring range a good adjustment of the immuno reagents to the analyzer is necessary.*

*The operating principles and features for plasma protein quantitating will now be described.*

## Keywords:

*Plasma proteins – Immunturbidimetry – Immunonephelometry – Plasmaprotein analyzer*

## Einleitung

Mechanisierte immunchemische Bestimmungsmethoden haben in mittleren und größeren Laboratorien die radiale Immundiffusion zur quantitativen Plasmaproteinbestimmung weitgehend abgelöst. In zahlreichen Publikationen sind Protokolle zur Durchführung von Plasmaproteinbestimmungen veröffentlicht (1–22), insbesondere für klinisch-chemische Analysensysteme. Obwohl diese Analysensysteme nicht primär für die Plasmaproteinbestimmung konstruiert sind, wird dem Anwender nicht selten der Eindruck vermittelt, daß die Plasmaproteinbestim-

mungen ähnlich problemlos und zuverlässig durchgeführt werden können wie die Bestimmung von Enzymen und Substraten. Nicht selten wird von den Diagnostikherstellern die preisgünstige Analyserbringung der Plasmaproteinbestimmung durch klinisch-chemische Analysensysteme in den Vordergrund gestellt. Aber auch die Ergebnisse von Analysensystemen, die primär meß- und auswertetechnisch und bezugnehmend auf die analytische Sensitivität und den Meßbereich für die quantitative Plasmaproteinbestimmung konzipiert sind, wie die nach dem nephelometrischen Prinzip arbeitenden Plasmaprotein-Analyzer erfordern die analytische Beurteilung und Plausibilitätsprüfung durch einen Laborfachmann. Ziel dieser Übersichtsarbeit ist es, Kenntnisse der immunchemischen Plasmaproteinbestimmung zu vermitteln, so daß eine den Laborgegebenheiten entsprechende optimale Methodenwahl erfolgen kann.

\* Vortrag auf der Fortbildungsveranstaltung Hessischer Laborärzte 1988

## Immunchemische Grundlagen der quantitativen Plasmaproteinbestimmung

Antigene reagieren mit ihren korrespondierenden Antikörpern in wässriger Lösung in einem nichtkovalenten Bindungsvorgang unter Bildung von Immunkomplexen. Die Immunkomplexbildung nimmt ab

- mit fallendem pH-Wert (unter pH 7),
- durch Anstieg der Ionenstärke (sehr schnelle Reaktion in ionenarmer wässriger Lösung),
- mit steigender Temperatur.

Unter optimalen Bedingungen bilden sich bei mäßigem Antikörperüberschuß Immunkomplexe mit der Größe von 0,3–0,5  $\mu\text{m}$ , was einem Molekulargewicht von 50–100 Mio. entspricht (23). Der kinetische Ablauf der Immunkomplexbildung in wässriger Lösung kann in vitro als Trübungszunahme des Reaktionsansatzes verfolgt werden.

Die Intensität der Trübungszunahme zeigt Abhängigkeiten:

1. Bei vorgegebenem Antigen-Antikörper-Konzentrationsverhältnis von der Reaktionszeit (Abb. 1). Je länger sie ist, desto stärker ist die Trübung, es kommt schließlich zu Ausflockungen der Immunkomplexe.

2. Bei konstanter Antikörpermenge im Ansatz von der Höhe der Antigen-Konzentration (Abb. 1).

Im Äquivalenzbereich (Kurve c) setzt die Trübung der Lösung langsam ein (lag phase ist lang), die Trübungsänderung pro Zeiteinheit ist gering. Bei mäßigem Antikörperüberschuß (Kurve b) trübt sich die Lösung schnell (lag phase ist kurz), die Trübungsänderung pro Zeiteinheit ist groß. Hoher Antikörperüberschuß (Kurve a) oder hoher Antigenüberschuß (Kurve e) führen zu kaum meßbaren Trübungsänderungen.

Wird bei vorgegebener Antikörpermenge das trübungsabhängige Meßsignal nach einer bestimmten Reaktionszeit in Beziehung zur Antigenkonzentration gesetzt, ergibt sich für ein Antigen-Antikörper-System eine Trübungskurve, die der für die Immunpräzipitation geltenden Kurve nach Heidelberger und Kendall (24) ähnelt (Abb. 2). Diese zeigt nur bei niedriger Antigenkonzentration, d. h. bei geringer Menge von Immunkomplexen, eine annähernd lineare Beziehung zwischen Antigenkonzentration und Meßsignal.

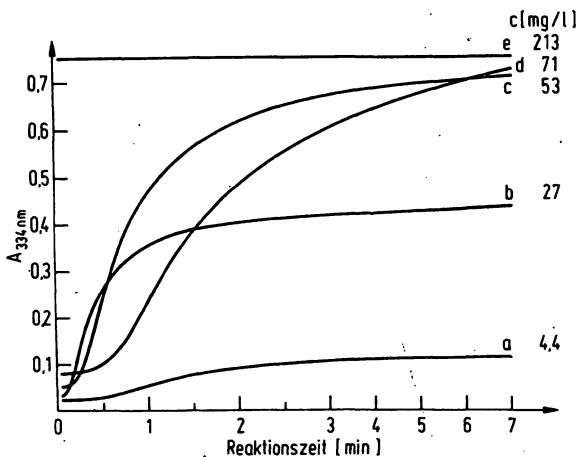


Abb. 1: Abhängigkeit der Immunkomplexbildung von der Reaktionszeit und der Antigenkonzentration, gemessen als Trübungszunahme bei konstanter Antikörpermenge im Reaktionsansatz (Abb. aus Lit. 14 entnommen).

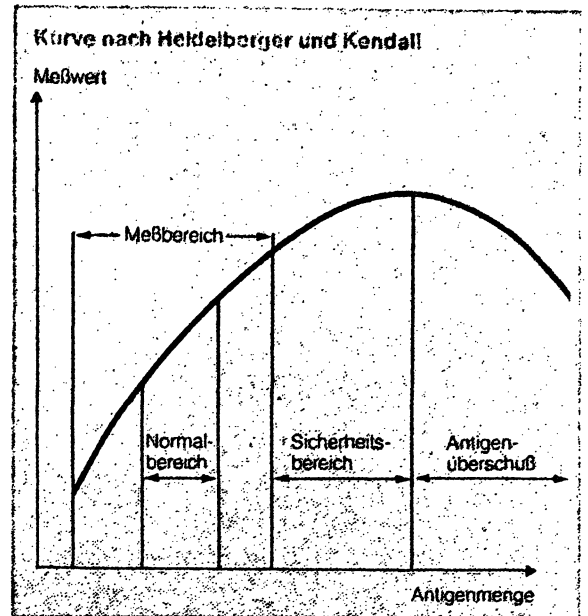


Abb. 2: Immunpräzipitationskurve nach Heidelberger und Kendall. Aus Behring Nephelometer Analyzer Broschüre.

Zur optimalen Registrierung einer Antigen-Antikörper-Reaktion müssen die Trübungsreaktion und die meßtechnische Einstellung des mechanisierten Analysensystems aufeinander abgestimmt sein. Das betrifft insbesondere die Abstimmung von:

1. Meßbeginn und Reaktionsstart, ersterer sollte kurz nach oder am Reaktionsstart liegen.
2. Meßzeitraum bzw. Meßintervall und Reaktionszeit der Trübungsreaktion. Die größte Änderung der Trübungsreaktion sollte in das Meßintervall des Analysensystems fallen.

Bei schnell ablaufender Immunkomplexbildung wird mit zunehmender Verzögerung des Meßbeginns nach Reaktionsstart (Abb. 3, Kurven a–c) der Beginn der Trübungskurve nach links und deren Maximum nach rechts verschoben, da es schon zu einer wesentlichen Bildung von Immunkomplexen gekommen ist (Kurve c).

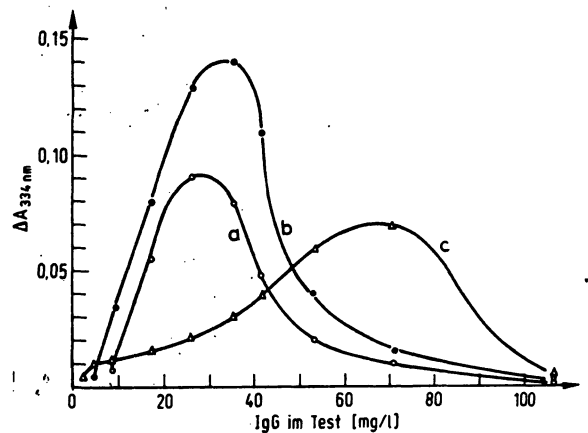


Abb. 3: Trübungskurven in Abhängigkeit vom Reaktionsstart bei einem Fixed-time-Meßintervall von 12 sec. Meßbeginn (a) = 6 sec, (b) = 12 sec, (c) = 60 sec nach Reaktionsstart (Abb. aus Lit. 14 entnommen).

Bei klinisch-chemischen Analysensystemen mit nicht modifizierbarem Meßintervall ergeben sich durch einen relativ stark verzögerten Meßbeginn (Abb. 3, Kurve c) folgende Nachteile:

1. Eine zunehmende Unlinearität, da das Meßintervall stärker in den gekrümmten Teil des linken Schenkels der Trübungskurve gerückt wird. Die Folgen sind eine Auswertungenauigkeit und mangelnde Richtigkeit.
2. Die im Meßintervall erzielbare Absorptionsänderung ist geringer als in dem Fall, wo Meßbeginn und Reaktionsstart gut aufeinander abgestimmt sind, z. B. Kurve b in Abb. 3.

Für die mechanisierte Plasmaproteinbestimmung ist die Steuerung der Immunkomplexbildung in Hinsicht auf die Abstimmung von Reaktionsstart und Meßbeginn sowie von Geschwindigkeit der Trübungsreaktion und Meßintervall eine wesentliche Voraussetzung. Sie erfolgt durch die Zugabe von Hemm- und Beschleunigungsmitteln zum Reaktionsmedium.

Beschleunigend auf die Immunkomplexbildung wirken

- die Zugabe von Polyethylenglykol (PEG) 6000 in Konzentrationen von 1–5% (25); die meisten Reaktionsmedien haben einen 4%igen Anteil,
- eine möglichst geringe Ionenstärke,
- gewisse Puffer wie Tris-HCl, Barbitursäure.

Verzögernd auf die Immunkomplexbildung wirken

- Elektrolyte und niedermolekulare organische Verbindungen. Häufig eingesetzt wird 0,9% NaCl, es dient entweder zur Verdünnung der Probe oder des Antiserums;
- eine Erhöhung der Ionenstärke. Eine gewisse Ionenstärke des Reaktionsansatzes ist immer erforderlich zur Vermeidung unspezifischer Aggregation und Fällung von Proteinen, die dadurch die Meßreaktion erheblich stören.

PEG 6000 ist ein Proteinfällungsreagenz ab Konzentrationen von 3% im Reaktionsansatz und als 6%ige Lösung fällt es Fibrinogen. Seine beschleunigende Wirkung als 4%ige Lösung zur Bildung von Immunkomplexen beruht darauf, daß es den Antigen- und Antikörpermolekülen im wässrigen Milieu Raum zur Ausbreitung ihrer molekularen Struktur entzieht. Antigene und Antikörper bilden deshalb schneller Komplexe. Durch die Gegenwart von 4% PEG 6000 wird z. B. bei der immunchemischen Albuminbestimmung die Reaktionszeit um den Faktor 10–15 verkürzt und der Äquivalenzpunkt der Immunreaktion zu höherer Konzentration verschoben, so daß es nicht so schnell zu einem Antigenüberschußphänomen kommt (25). Die Nachweisempfindlichkeit nimmt um den Faktor 2–3 zu bei nephelometrischer Bestimmung. Einen beschleunigenden und stabilisierenden Effekt auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Immunkomplexbildung haben ebenfalls 10 mmol/l Tris-HCl pH 7,4 (26) sowie 20 mmol/l 5,5-Diäthylbarbitursäure-Puffer pH 7,0 (18).

Gewöhnlich besteht das Reaktionsmedium aus einem Puffer, der PEG 6000/NaCl enthält. Die PEG 6000/NaCl-Lösung hat nicht nur steuernden Effekt auf den Ablauf der Immunkomplexbildung, sondern sie dient ebenfalls folgenden Zwecken:

- der Verdünnung des hochtitrigen Antiserums vor Antigenzugabe. PEG 6000/NaCl hat einen strukturierenden Einfluß auf die Antikörpermoleküle, dadurch werden Spontanaggregationen vermieden, das hat einen positiven Effekt auf die Stabilität der Kalibrationskurve;
- sie verhindert die Ausflockung von Antigen-Antikörperkomplexen im Reaktionsansatz (Spontanfällung) sofort nach Antigenzugabe, die in salzfreier Lösung durch PEG 6000 verursacht würde. Mehrfach eingefrorene Proben oder solche, die aufgrund unsachgemäßer Transport-

bedingungen eine Denaturierung der Proteine erfahren haben, können auch in PEG 6000/NaCl eine Spontanausfällung bewirken.

Durch Einflußnahme auf die Bildungsgeschwindigkeit des Immunkomplexes gelingt es, den Verlauf der Reaktion so zu steuern, daß in einem weiten Bereich des aufsteigenden Schenkels der Kurve nach Heidelberger und Kendall ein linearer Anstieg des Meßsignals sowohl bezugnehmend auf die Reaktionszeit als auch in Hinsicht auf die Antigenkonzentration erzielt wird. Es liegen somit den kinetischen Enzym- und Substratbestimmungen analoge Bedingungen vor und immunchemische Plasmaproteinbestimmungen werden an solchen klinisch-chemischen Analysensystemen wie dem Boehringer Hitachi 705 möglich, die nur auf der Basis linearer Standardkurven eine Konzentrationsberechnung durchführen (20, 22).

## Quantitative Bestimmung der Immunkomplexbildung

Die quantitative Bestimmung der bei der Antigen-Antikörper-Reaktion gebildeten Immunkomplexe kann durch Trübungsmessung (Turbidimetrie) oder Streulichtmessung (Nephelometrie) erfolgen.

Die Schwächung von Strahlung beim Durchgang von Licht durch eine Kuvette, die kolloidal gelöste Immunkomplexe enthält, erfolgt gemeinsam durch Absorption und diffuse Reflexion (27). Dieser Prozeß ist um so ausgeprägter, je höher die Konzentration der Immunkomplexe und damit die Trübung der zu messenden Lösung ist. Ursache von Absorption und diffuser Reflexion (Streuung) ist die Beugung der Strahlung an den inhomogen verteilten und ungleich großen Immunkomplexen sowie an Partikeln des Probenmaterials und Antiserums.

Das Ausmaß der Absorption und Streuung von Strahlung beim Eintritt in kolloidale Lösungen ist neben der Partikelkonzentration auch von der Wellenlänge abhängig (Tab. 1).

Tab. 1: Rayleigh-Gleichung

$$\frac{I}{I_0} = K \cdot \frac{dV^2}{\lambda^4} \sin^2\theta$$

Erklärung:  $I$  = Strahlungsintensität des gestreuten Lichtes am Winkel  $\theta$ ,  $I_0$  = Strahlungsintensität, die in die Lösung fällt,  $\lambda$  = Wellenlänge der Strahlung,  $d$  = Schichtdicke der Kuvette,  $V$  = Volumen der Lösung

Die Absorption einer Strahlung ist um so besser registrierbar, je kürzer deren Wellenlänge und je höher die Partikelkonzentration ist.

Die Lichtstreuung ist demgegenüber am optimalsten in verdünnten, nicht trüben Lösungen und bei längerwelliger Strahlung meßtechnisch nutzbar. Die Ursache liegt darin, daß bei niedriger Partikelkonzentration die in die Meßkuvette eintretende längerwellige Strahlung kaum absorbiert wird und auch das gebildete Streulicht nahezu keiner Absorption unterliegt. Mit der Nephelometrie können deshalb Plasmaproteine immunchemisch in einem Konzentrationsbereich gemessen werden, der um eine Zehnerpotenz niedriger liegt als der turbidimetrisch erfaßbare Konzentrationsbereich.

## Turbidimetrie

Unter Turbidimetrie versteht man die Trübungsmessung im durchfallenden Licht. Die photometrische Absorptionsmessung erfolgt im UV-Bereich bei 334–340 nm. Für die Turbidimetrie gilt nicht das Lambert-Beersche Gesetz. Die Beziehung zwischen Extinktion und Konzentration ist gewöhnlich nur bei niedrigen bis mittelhohen Plasmaproteinkonzentrationen linear, bei höheren Konzentrationen werden mehr oder minder gekrümmte Beziehungen erhalten. Die Turbidimetrie hat deshalb einen kleineren Meßbereich als die Nephelometrie, wobei letztere generell eine stärkere Probenverdünnung erfordert.

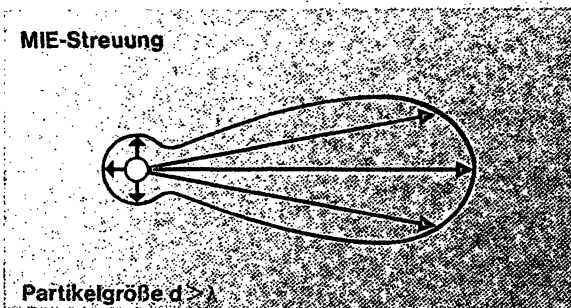
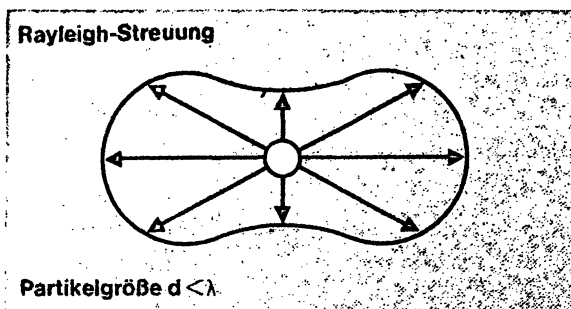


Abb. 4: Streuung von Strahlung in Abhängigkeit von Partikelgröße ( $d$ ) und Wellenlänge der Strahlung ( $\lambda$ ). Aus Behring Nephelometer Analyzer Broschüre.

Tab. 2: Verwendete Lichtquellen in Nephelometern

Nephelometer	Lichtquelle	Wellenlänge (nm)
Beckman Array	Halogenlampe	400–620
Behring – Nephelometer Analyzer – Nephelometer 100 – (Laser Nephelometer)	Infrarot-Hochleistungsleuchtdiode Helium-Neon-Laser	840 633
Kallestad QM 300	Licht-Emissions-Diode (LED)	660
Technicon DPA 1-System	Licht-Emissions-Diode (LED)	660

Turbidimetrische Plasmaproteinbestimmungen sind anfällig gegenüber Probengut mit hoher Eigenabsorption, z. B. hyperbilirubinämische, hämolytische oder hyperlipidämische Seren. Die Wahrscheinlichkeit, daß in solchen Proben ein Antigenkörperüberschuß übersehen und falsch niedrige Plasmaproteinkonzentrationen gemessen werden, ist deshalb hoch.

## Nephelometrie

Das Prinzip der Lichtstreuung durch Partikel liegt der Nephelometrie zugrunde. Gemessen wird mit monochromatischer Strahlung der Wellenlänge größer 600 nm. Sind die Partikeldurchmesser ( $d$ ) kleiner als die Wellenlänge des eintretenden Lichtes ( $d < \lambda$ ), bildet sich vorwiegend die symmetrische Rayleigh-Streuung aus. Ist der Partikeldurchmesser größer als die Wellenlänge des eintretenden Lichtes ( $d > \lambda$ ), kommt es zur Ausbildung des sogenannten MIE-Streulichtes in Vorwärtsrichtung (Abb. 4).

Da Immunkomplexe größer sind als  $0,1 \mu$ , wird zur Nephelometrie das MIE-Streulicht in Vorwärtsrichtung gemessen (28). Die verwendeten Lichtquellen sind in Tabelle 2 angegeben. Für kinetische Streulichtmessungen ist der Laser als Lichtquelle ungeeignet aufgrund seines

Tab. 3: Analysensysteme, speziell konzipiert zur Plasmaproteinbestimmung

Analysensystem	Technik	Anmerkung
Beckman – Array	kinetisch-nephelometrisch, Peak-rate-Messung ( $V_{max}$ )	Referenzkurve werkseitig erstellt, geräteseitige Ausrichtung über 1-Punkt-Kalibration. Automatische Antigenexzeßerkennung. Probe wird dann mit höherer Verdünnung nochmals gemessen.
Behring – Nephelometer Analyzer – BNA 100	kinetisch-nephelometrisch, Fixed-time-Messung	Referenzkurve wahlweise – eigene 6-Punkt-Kalibrierung – werkseitig erstellt und Ausrichtung über 1-Punkt-Kalibration. Frei programmierbare Reaktionsschemata zur Messung beliebiger Ag-AK-Systeme und Fällungsreaktionen. Endpunktmethode für Latex-verstärkte Reaktionen. Weiter Meßbereich, deshalb sehr selten Antigenexzeß.
– Turbi Time System	kinetisch-turbidimetrisch, Peak-rate-Messung ( $V_{max}$ ) und deren Reaktionszeit ( $t_{max}$ )	Referenzkurve werkseitig erstellt, keine Nachkalibrierung. Kein Antigenexzeß tritt auf.
Kallestad – QM 300	kinetisch-nephelometrisch, Peak-rate-Messung	Referenzkurve werkseitig erstellt, geräteseitige Ausrichtung über 1-Punkt-Kalibration. Automatischer Antigenüberschußtest bei jeder Probe.
Technicon DPA 1-System	kinetisch-nephelometrisch, Peak-rate-Messung	Referenzkurve werkseitig erstellt, geräteseitige Ausrichtung über 1-Punkt-Kalibration. Antigenexzeßerkennung über Algorithmus und Wiederholung der Messung mit höherer Probenverdünnung.

starken optischen Rauschens, gut geeignet ist er für Endpunktmethode.

Die analytische Sensitivität der kinetischen Nephelometrie zur Plasmaproteinbestimmung im Serum liegt bei 10 mg/l, sie beträgt bei Endpunktmethode 1 mg/l.

Wesentliche Störungen der nephelometrischen Plasmaproteinbestimmung sind bedingt durch lichtstreuende Verunreinigungen wie z. B. Mikrogerinnsel, Zellen aus unzureichend zentrifugierten Proben, Lipoproteinpartikel, mikrobielle Verunreinigungen. Grundsätzlich ist bei Proben nach Tiefgefrierung sowie bei Hyperlipoproteinämie mit Problemen zu rechnen. Hämolyse und Hyperbilirubinämie stören die Nephelometrie weniger als die Turbidimetrie.

## Techniken der immunchemischen Plasmaproteinbestimmung

Die immunchemische Plasmaproteinbestimmung kann kinetisch oder als Endpunktverfahren erfolgen, die quantitative Messung der Immunkomplexe turbidimetrisch oder nephelometrisch geschehen. Wegen der höheren Analysengeschwindigkeit, dem dadurch bedingten erhöhten Probendurchsatz und aufgrund geringerer störender Nebenreaktionen werden die kinetischen Methoden gegenüber den Endpunktmethode bevorzugt. Die analytische Sensitivität der kinetischen Methoden für das Probegut Serum liegt bei 10 mg/l, der Endpunktmethode bei 1 mg/l. In Tabelle 3 und 4 sind die Techniken der immunchemischen Plasmaproteinbestimmung bezugnehmend auf eine Auswahl von Analysensystemen dargestellt.

### Endpunktmessung

Bei Endpunktmessungen an nephelometrischen Analysensystemen wird zuerst das Eigenstreulichtsignal der Meßkuvette im leeren Zustand oder mit Puffer-Reagenz gemessen, dann die verdünnte Probe zugeben und nach einer definierten Inkubationszeit die Kuvette nochmals in den Strahlengang geschoben. Turbidimetrische Endpunktmessung an Photometern oder an mechanisierten klinisch-chemischen Analysensystemen laufen ähnlich

ab. In Abhängigkeit von den methodischen Voraussetzungen wird zuvor in der gleichen Kuvette ein Proben- und Reagenzienleerwert ermittelt, oder der Proben- und Reagenzienleerwert erfordert einen gesonderten Ansatz. Da bei Endpunktmethode die maximale Trübung oder Streuung gemessen werden kann, sind sie empfindlicher als kinetische Bestimmungen am gleichen Analysensystem. Endpunktmessungen in Serumproben sind im niedrigen Konzentrationsbereich (unter 200 mg Plasmaprotein/l) wenig sinnvoll und sollten nur in proteinarmen Lösungen wie Liquor durchgeführt werden. Serumproben können aufgrund von Eigentrübungen oder durch PEG 6000 induzierte Spontanfällungen von Proteinen zu erheblichen Störungen führen. Da Partikel unterschiedlicher Größe entstehen, ist die Lichtstreuung nicht einheitlich, und insbesondere bei nephelometrischer Meßtechnik wird dann die Subtraktion des Proben- und Reagenzienleerwertes vom Endpunktwert problematisch.

### Kinetische Messungen

Zur quantitativen Plasmaproteinbestimmung haben sich folgende kinetische Meßtechniken durchgesetzt:

- Peak-rate-Nephelometrie (Beckman ICS, Beckman Array, Kallestad QM 300, Technicon DPA 1-System),
- Fixed-time-Nephelometrie (Behring Nephelometer Analyser, Behring Nephelometer 100),
- Fixed-time-Turbidimetrie (manuelle Turbidimetrie am Photometer, turbidimetrische Messung an klinisch-chemischen Analysensystemen),
- Peak-rate-Turbidimetrie mit Reaktionszeitmessung (Behring Turbi Time System).

Sollen Plasmaproteine kinetisch mit hoher analytischer Sensitivität und weitem Meßbereich bestimmt werden, so müssen der Meßbeginn, die Geschwindigkeit der Immunreaktion und der Meßzeitraum gut aufeinander abgestimmt sein.

### Turbidimetrische Fixed-time-Verfahren

Der Meßbeginn sollte bei einem idealen fixed time-Verfahren so früh liegen, daß die Anfangsextinktion stets

Tab. 4: Auswahl von klinisch-chemischen Analysengeräten zur turbidimetrischen Plasmaproteinbestimmung

Analysensystem	Technik	Anmerkung
ACP (Eppendorf)	Endpunktmessung turbidimetrisch	Trübungskurve wird über Standardreihe erstellt (15).
Cobas (Roche)	kinetisch-turbidimetrisch	Referenzkurve durch eigene Mehrwertkalibrierung, Erstellung der nichtlinearen Eichkurve durch integrierten Rechner (13).
Gemsaec (Electro-Nucleonics)		
Hitachi (Boehringer Mannheim)	Endpunktmessung, turbidimetrisch	Auf der Basis unlinearer Standardkurven ist geräteseitig beim 705 keine Konzentrationsberechnung möglich. Es sind Verfahren beschrieben, bei denen die immunchemischen Bedingungen so verändert werden, daß in gewissen Konzentrationsbereichen eine lineare Beziehung zwischen Extinktion und Konzentration besteht. Eichung durch 1-Punkt-Kalibration (20, 22). Beim 717 ist eine Konzentrationsberechnung auf der Basis unlinearer Standardkurven möglich.
– RA-1000 RA-XT (Technicon)	Endpunktmessung, turbidimetrisch	Auswertung unlinearer Standardkurven möglich. Kalibration über Standardreihe (19).
Photometer manuell	Turbidimetrische Endpunktmessung, turbidimetrisches Fixed-time-Verfahren	Ablesung der Konzentration an einer graphisch oder rechnerisch ermittelten Standardkurve, erstellt mit mehreren Standards.

kurz nach dem Einsetzen der Immunkomplexbildung erfaßt wird. Das ist für die turbidimetrische Messung bei einem Teil der klinisch-chemischen Analysensysteme nicht möglich. Es kommt somit zu Abschneideeffekten der Zeit-Extinktionskurve. Diese bewirken im schlimmsten Fall, wie in Abb. 5 gezeigt, eine Verformung der Standardkurve mit den Folgen einer mangelnden Richtigkeit und/oder eines zu engen Meßbereiches. Wird der Versuch unternommen, die Immunreaktion zu verzögern und somit den Meßbeginn zu verlängern, z. B. durch Erhöhung der NaCl-Konzentration und Verminderung des PEG 6000-Anteils, lassen sich zwar die Abschneideeffekte verhindern, aber andere Nachteile treten auf. So kann sich z. B. die Standardkurve zu niedrigeren Proteinkonzentrationen verschieben, wodurch der Meßbereich eingeengt wird.

Ein genereller Nachteil der turbidimetrischen Fixed-time-Verfahren, aber auch der Endpunktverfahren an klinisch-chemischen Analysensystemen ist die Nichterkennung eines Antigenüberschusses, wenn die Probe nur in einer Probenverdünnung gemessen wird.

### Nephelometrische Fixed-time-Verfahren

Bei den nephelometrischen Fixed-time-Verfahren, z. B. am Behring Nephelometer Analyzer (11, 29), wird nach Zugabe des Antiserums zur mit Reaktionspuffer vorverdünnter Probe und Mischung der Reaktionspartner nach

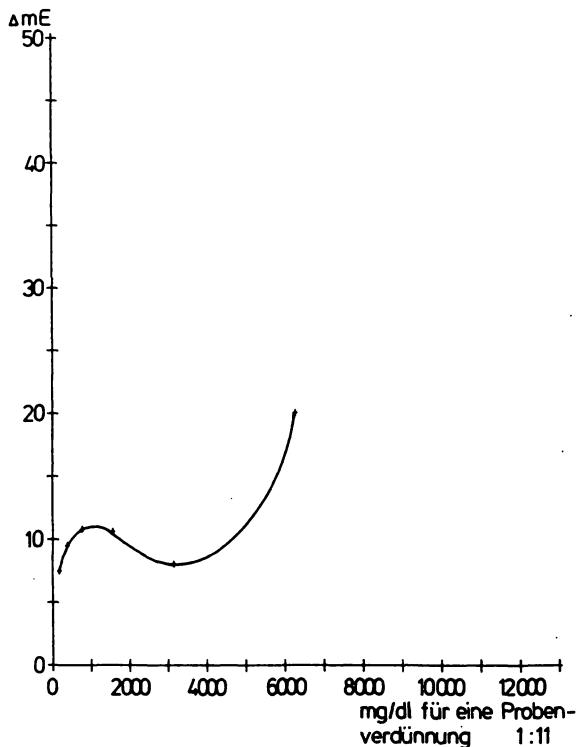


Abb. 5: Messung von IgG am RA-1000 im Fixed-time-Verfahren. Das Einsetzen der Immunkomplexbildung wird 15 sec zu spät erfaßt. Es resultiert eine zweigipflige Standardkurve, die im Bereich von 400–5000 mg/dl zweideutige Ergebnisse erbringt. Abbildung entnommen aus Lit. 19.

10 sec ein erster und nach einer Reaktionszeit von weiteren 6 min ein zweiter Meßwert registriert (Abb. 6). Durch Subtraktion des ersten vom zweiten Meßwert wird ein Differenzsignal erhalten, über das der Konzentrationswert mittels einer im System gespeicherten Referenzkurve ermittelt wird. Die Referenzkurve für ein Plasmaprotein kann wahlweise über 6-Punkt- oder 1-Punkt-Kalibrierung aufgenommen werden. Die Berechnung erfolgt über eine Logit-Log-Funktion. Referenzkurven bleiben 7 Tage gespeichert und können unter der Voraussetzung, daß die Antiserumcharge konstant bleibt, reaktiviert werden.

Da unspezifische Trübungen ein generelles Problem nephelometrischer Bestimmungstechniken sind, wird beim Behring Nephelometer Analyzer der erste Meßwert nach einer Vorinkubationszeit von 10 sec gemessen und der Streulichtwert an einem Schwellenwert verglichen (30). Bei Überschreitung des Schwellenwertes wird ein Signal gesetzt, das auf die zu hohe Eigentrübung der Probe hinweist. Unspezifische Trübung während der 6minütigen Inkubationszeit, die zu falsch hohen Plasmaproteinwerten führen können, werden nicht vom System erkannt.

Die Reaktionsbedingungen sind so gewählt, daß nach der 6minütigen Inkubationszeit, in Abhängigkeit vom Plasmaprotein, 60–90 % des Endpunktsignals erreicht werden. Die analytische Sensitivität des Systems für Untersuchungen im Serum beträgt, z. B. für Myoglobin, 5 mg/l.

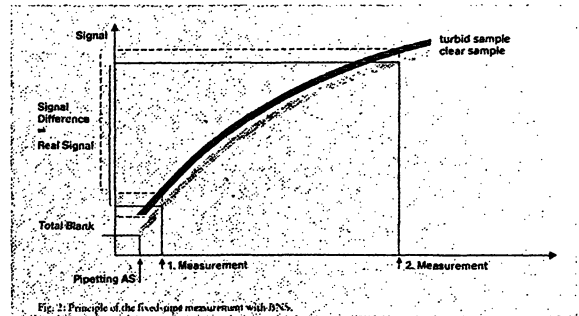


Abb. 6: Fixed-time-Messung einer optisch klaren und einer trüben Probe am Behring Nephelometer Analyzer (31).

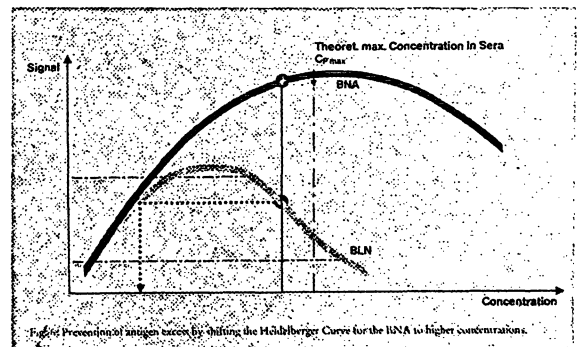


Abb. 7: Verschiebung der Heideberger-Kurve zu höheren Konzentrationswerten durch Auswahl eines speziellen Reaktionsmediums und Messung am Behring Nephelometer Analyzer (BNA). Die untere Kurve (BLN) zeigt das gleiche Antigen-Antikörper-System ohne das spezielle Reaktionsmedium bei Messung am Behring Laser Nephelometer (31).

Antigenexzeß ist gewöhnlich nur zu erwarten bei der quantitativen Immunglobulinbestimmung im Serum aufgrund extrem hoher Konzentrationen, die bei Vorliegen eines Plasmozytoms oder des M. Waldenstroem auftreten können. Beim Behring Nephelometer Analyzer wird ein Antigenexzeß selten gefunden und wenn, dann nur bei hohen IgM-Konzentrationen. Ursache des sehr selten auftretenden Antigenexzeß ist die Verschiebung der Heidelberger-Kurve zu höheren Konzentrationen (31) durch Wahl eines Phosphatpuffer-NaCl-PEG 6000-haltigen Reaktionsmediums (Abb. 7).

## Kinetische Nephelometrie, Peak-rate-Technik

Bei dieser Technik wird die Reaktionskinetik der Antigen-Antikörperreaktion bei im mäßigen Überschuß vorliegender Antikörperkonzentration nephelometrisch verfolgt. Unter optimalen Bedingungen (PEG 6000-Konzentration, Pufferzusammensetzung, NaCl-Konzentration) stehen die Antigenkonzentration und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der Immunkomplexbildung ( $V_{max}$ ) in einer Beziehung, die durch die Kurve nach Heidelberger und Kendall beschrieben ist. Als Meßsignal wird die maximale Zunahme der Lichtstreuung bei konstantem Meßintervall ermittelt. Meßtechnisch wird eine kontinuierliche Differenzierung des Meßsignals nach der Zeit durchgeführt.

Der analytische Ablauf einer Plasmaproteinbestimmung ist folgendermaßen: Die Serumprobe wird mit PEG 6000- und NaCl-haltigem Puffer verdünnt, ein Aliquot mit Antiserum in die Meßkuvette pipettiert und unter Rühren inkubiert. Das Analysensystem mißt nephelometrisch die Zunahme der Streulichtintensität (Abb. 8, linke Abb.) während eines Zeitraumes bis zu 1 min, führt vermittels eines Mikroprozessors eine kontinuierliche Differenzierung des Meßsignalanstiegs über viele kurze identische Zeitintervalle durch und ermittelt somit die Reaktionsgeschwindigkeit (rate-Messung). Nach Beginn der Immunreaktion nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit und somit das rate-Signal kontinuierlich zu (Abb. 8, rechte Abb.), erreicht ein Maximum (peak rate) an dem die  $V_{max}$  der Immunkomplexbildung erreicht ist und nimmt wieder ab. Als Meßsignal wird die peak rate registriert und über eine Referenzkurve der Konzentrationswert ermittelt. Beim Beckman Array und dem Kallestad QM 300 wird über einen Meßzeitraum von im Mittel bis 1 min das vom Nephelometer anfallende Signal im Mikroprozessor im

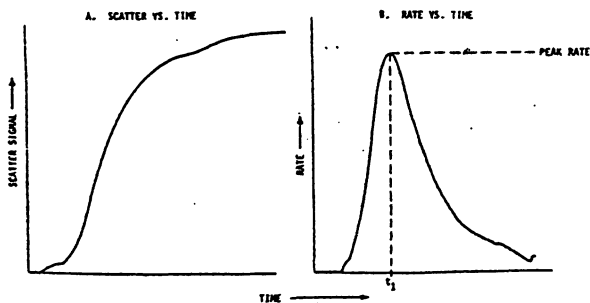


Abb. 8: Zeitliche Zunahme des Streulichtsignals (linke Abbildung) und Verlauf der Reaktionsgeschwindigkeit der Immunkomplexbildung. Die Reaktionsgeschwindigkeit (rate) nimmt bis zum Zeitpunkt  $t_1$  kontinuierlich zu, hat dort ihr Maximum (peak rate) und nimmt dann wieder ab. Die peak rate wird als Meßsignal vom Nephelometer registriert (6).

Abstand von Millisekunden laufend differenziert. Das Technicon DPA 1-System hat einen Meßzeitraum von 7 min, und das vom Nephelometer anfallende Signal wird im Abstand von 10 sec laufend differenziert.

Die Höhe der peak rate (H) ist eine Funktion

- der Antigenkonzentration bei konstanter Antikörperkonzentration (siehe Abb. 2),
- der Antikörperkonzentration im Reaktionsansatz (Abb. 9); wird sie erhöht, verschiebt sich der Äquivalenzpunkt zu höherer Antigenkonzentration. Die Höhe der peak rate am Äquivalenzpunkt nimmt mit dem Quadrat der Antikörperkonzentration zu (6),
- des Molekulargewichts, des zu bestimmenden Plasmaproteins (9),

$$H \propto \text{Alb} > H \propto \text{IgG} > H \propto \text{IgM}$$

Damit eine gut registrierbare peak rate erreicht wird, benötigen die Rate-Nephelometer eine zu messende Plasmaproteinmenge von 1–20  $\mu\text{g}$  in der Reaktionskuvette.

Die Rate-Nephelometer erkennen einen Antigenüberschuß. Beim Beckman-Array wird ein Antigenüberschußtest durchgeführt, wenn die peak rate einen bestimmten Wert überschreitet. Nach Ablauf der Reaktion wird verdünnter Kalibrator zum Ansatz gegeben und beurteilt, ob die peak rate zunimmt. Ist das der Fall, liegt kein Antigenexzeß vor. Keine Zunahme der peak rate bedeutet Antigenexzeß und die Probe muß mit einer höheren Probenverdünnung nochmals gemessen werden.

Der Kallestad QM 300 mißt zur Erkennung eines Antigenexzesses jede Probe primär schon in zwei verschiedenen Verdünnungen, z. B. Serum-IgG 1:216 und 1:1296 und vergleicht die Peak-rate-Signale.

Die Software des Technicon DPA 1-Systems enthält einen mathematischen Algorithmus zur Überprüfung der Analyseergebnisse auf Antigenüberschuß. Für jedes Plasmaprotein und Untersuchungsmaterial sind ein interner Meßbereich vorgegeben sowie ein Zeitintervall für das Erreichen des Peak-rate-Signals. Wird das Zeitintervall unterschritten, liegt ein Antigenexzeß vor, und es erfolgt die Wiederholung der Messung mit höherer Probenverdünnung.

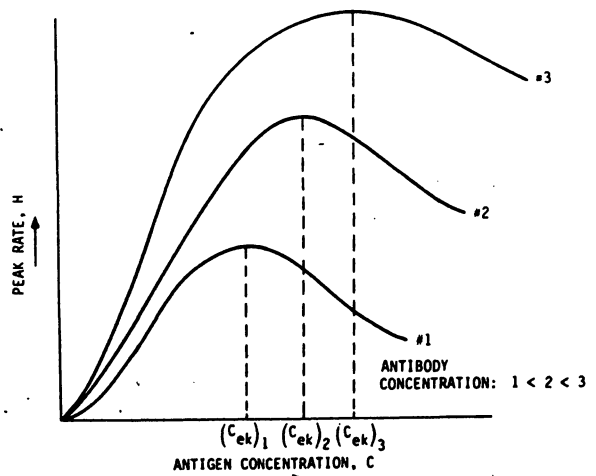


Abb. 9: Höhe der peak rate und ihre Verschiebung zu höherer Antigenkonzentration bei 3 verschiedenen Antikörperkonzentrationen (6).

Vorteile der rate-Nephelometrie sind die geringe Störanfälligkeit gegenüber Probenentrübung, Hämolyse und Hyperbilirubinämie sowie die kurze Analysenzeit. Der zuletzt genannte Vorteil gilt nicht für das Technicon DPA 1-System. Die Nachweisempfindlichkeit der ratenephelometrischen Plasmaproteinbestimmung im Serum liegt bei 10 mg/l.

## Peak-rate- und Reaktionszeit-Messung

Schwachpunkt der immunchemischen Plasmaproteinbestimmung in Form der Trübungsmessung ist, daß die Beziehung zwischen Konzentration und Meßsignal durch die Kurve nach Heidelberger und Kendall beschrieben wird. Eine gemessene peak rate oder Absorptionsdifferenz kann einer Plasmaproteinkonzentration auf dem linken oder dem rechten Schenkel zugeordnet werden (32). Gewöhnlich sind die nephelometrischen Analysensysteme und Reagenzien so aufeinander abgestimmt, daß in einem weiten Konzentrationsbereich auf dem aufsteigenden Schenkel der Kurve nach Heidelberger und Kendall gemessen wird. Sie enthalten außerdem eine Software, die eventuelle Messungen auf dem rechten Schenkel der Kurve und damit einen Antigenexzeß signalisieren. Klinisch-chemische Analysensysteme, die turbidimetrische Plasmaproteinbestimmungen durchführen, erkennen den Antigenüberschuß grundsätzlich nicht.

Die Problematik des Antigenexzesses ist hinfällig, wenn ein Analysensystem wie das TurbiTime System der Behringwerke das Meßsignal dem jeweiligen Schenkel der Kurve nach Heidelberger und Kendall zuordnen kann. Das System mißt turbidimetrisch die peak rate einer Immunkomplexreaktion und die Zeit, bis die peak rate erreicht ist (peak time).

Die Maximalgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) einer Immunkomplexreaktion (peak rate) und die Zeit, bis  $V_{max}$  erreicht wird (peak time), sind bei konstanter Antikörperkonzentration eine Funktion der Antigenkonzentration (Abb. 10). Beide werden im TurbiTime System unabhängig voneinander gemessen (31). Durch die Auswertung dieser Signale über eine der Abb. 10 vergleichbare Referenzkurve kann die Plasmaproteinkonzentration über einen weiten Meßbereich ermittelt werden. Das System hat am Maximum der Peak-rate-Konzentrationskurve eine höhere analytische Impräzision als in den anderen Bereichen. Proben mit einer Extinktion von über 1,5 bei 340 nm werden vom System nicht gemessen. Die analytische Sensitivität

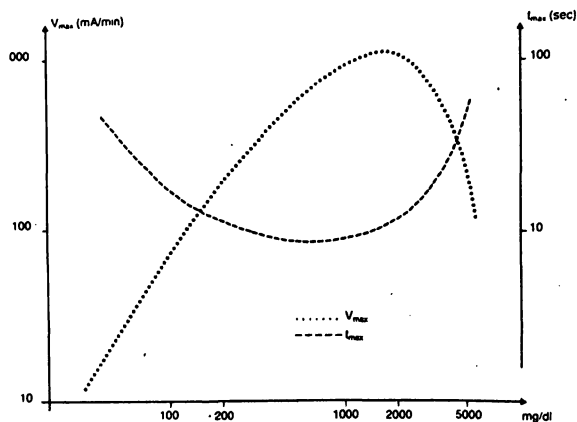


Abb. 10: Konzentrationsabhängigkeit von  $V_{max}$  (peak rate) und  $t_{max}$  (Zeit bis peak rate erreicht ist) einer Immunkomplexreaktion. Das Minimum der  $t_{max}$ -Kurve fällt nicht mit dem Maximum der  $V_{max}$ -Kurve zusammen (31).

für die Bestimmung von Plasmaproteinen im Serum, z. B. von C-reaktivem Protein beträgt 5 mg/l.

Plasmaprotein-Analysensysteme mit Peak-rate- und Reaktionszeitmessung wie der TurbiTimer haben den Vorteil, daß durch zwei unabhängige Messungen eine eindeutige Konzentrationsbestimmung vermittelt einer Analyse möglich ist.

### Schrifttum:

1. BUFFONE, G. J., LEWIS, S. A.: Manual immunochemical nephelometric assays for serum immunoglobulins IgG, IgA and IgM. Clin. Chem. 25, 1009–1012 (1979).
2. SHULMAN, G.: Comparison of specific protein assays in biological fluids by radial immunodiffusion and Laser Nephelometer. Clin. Biochem. 12, 123–125 (1979).
3. JOSEPH, J. C., BERNES, E. W.: Comparison of protein values in cerebrospinal fluid by nephelometry and radial immunodiffusion. Ann. Clin. Lab. Sci. 9, 408–416 (1979).
4. TÖPEL, U., RÖSLER-ENGELHARDT, A.: Eine kinetische nephelometrische Methode zur Messung von Serumproteinen. Lab.med. 3, 233–236 (1979).
5. ALEXANDER, R. L.: Comparison of radial immunodiffusion and laser nephelometry for quantitating some serum proteins. Clin. Chem. 26, 314–317 (1980).
6. CONRAD, A., SCHÜRMAN, J., KREUTZ, F. H., SIEBER, A.: Ausarbeitung einer Methode zur quantitativen Proteinbestimmung mit Hilfe eines Laser-Nephelometers im Routinelabor. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 16, 299–305 (1978).
7. SIEBER, A.: Plasmaproteinbestimmung durch Laser-Nephelometrie: Laborpraxis. Laboratoriumsblätter 27, 109–118 (1977).
8. STERNBERG, J. C.: A rate nephelometer for measuring specific proteins by immuno-precipitin reactions. Clin. Chem. 23, 1456–1464 (1977).
9. TRÄXLER, G.: Kinetische Nephelometrie – Eine neue Methode zur Bestimmung von Proteinen in der klinischen Chemie. Medizintechnik 99, 79–84 (1979).
10. GUIGUET, M., PADIEU, P., MACK, G.: Laser nephelometric measurement of seven serum proteins compared with radial immunodiffusion. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 21, 217–221 (1983).
11. FINK, P. C., RÖMER, M., HAECKEL, R., FATEH-MOGHADAM, M., DELANGHE, J., GRESSNER, A. M., DUBS, R. W.: Measurement of proteins with the Behring nephelometer. A multicentre evaluation. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 27, 261–276 (1989).
12. NEUMANN, U., KRETZLER, D., MUNZ, E., SCHRAPPE, K. H., ZIEGENHORN, J.: Bestimmung von Immunglobulinen an Analysenautomaten. Lab.med. 1, 1–7 (1978).
13. MORELL, J. G., BROMBACHER, P. J.: Rapid sensitive immunochemical determination of immunoglobulins by centrifugal analysis. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 19, 67–70 (1981).
14. MÜLLER-MATTHESIU, R., OPPER, C.: Der Einfluß von Meßzeit und Reaktionsmilieu bei kinetischen immunturbidimetrischen Plasmaproteinbestimmungen. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 18, 501–510 (1980).
15. BRUCKNER, A., MORETH, M., BERNHEIM, M.: Bewertung und Handhabung der turbidimetrischen Bestimmung der Immunglobuline IgG, IgA und IgM und Vergleich zur radialen Immunodiffusion. Ärztl. Lab. 27, 291–296 (1981).
16. STABER, G., MUNZ, E., PORTENHAUSER, R.: Erfahrungen mit der Bestimmung der Immunglobuline IgA, IgG und IgM mit einer turbidimetrischen Methode. Erprobungsergebnisse aus 15 klinischen Laboratorien. Med. Labor 34, 133–137 (1981).
17. RAMMELOO, T., BEUNIS, H. M.: An evaluation of immunoglobulin assays on the ACA III. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 21, 577–582 (1983).
18. DANNINGER, J., SPAUBECK, M., SPAETHE, R.: Verbesserte photometrische Bestimmung von immunologischen Parametern. Ärztl. Lab. 30, 348–350 (1984).
19. KIESER, M., DAMM, M., MÜLLER-MATTHESIU, R.: Immunturbidimetrische Immunglobulinbestimmungen am Analysenautomaten Technicon RA-1000. Ärztl. Lab. 32, 35–45 (1986).
20. AKITA, M., MÜLLER-MATTHESIU, R.: Turbidimetrische Bestimmung der Immunglobuline IgG, IgA und IgM am Hitachi 705 nach einem Verfahren mit 1-Punkt-Kalibration. Lab.med. 10, 143–148 (1986).
21. PALOHEIMO, L., PAJARI-BACKAS, M., PITKÄNEN, E.: Evaluation of an immunoturbidimetric microalbuminuria assay. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 25, 889–892 (1987).
22. SKURK, A., THOMAS, L.: Verbesserte immunturbidimetrische Bestimmung von C-reaktivem Protein. Lab.med. 14, 111–115 (1980).
23. RITCHIE, R. F., ALPER, C. A., GRAVES, J., PEARSON, N., LARSON, C.: Automated quantitation of proteins in serum and other biological fluids. Amer. J. Clin. Pathol. 59, 151 (1973).
24. HEIDELBERGER, M., KENDALL, F. E.: The precipitation reaction between type III pneumococcus polysaccharide and homologous antibody. III. A quantitative study and theory of the reaction mechanism. J. Exp. Med. 61, 563–591 (1935).
25. LIZANA, J., HELLSING, K.: Polymer enhancement of automated immunological nephelometric analysis, as illustrated by determination of urinary albumin. Clin. Chem. 20, 415–420 (1974).
26. KILLINGSWORTH, L. M., BUFFONE, G. J., SONAWANE, M. B., LUNSFORD, G. C.: Optimizing nephelometric measurement of specific serum proteins: Evaluation of three diluents. Clin. Chem. 20, 1548–1552 (1974).
27. KRYSZEK, M.: Zusammenhang zwischen optischen Kennzahlen und Stoffmengen bei spektrometrischen Analyseverfahren. In: ERB, W. (ed.) Leitfaden der Spektrometrie, 321–358. Springer, Berlin (1989).
28. MIE, G.: Ann. Physik 25, 377 (1908).
29. ZEHETBAUER, W.: Behring Nephelometer Analyzer. In: FATEH MOGHADAM, A. (ed.) Nephelometrie Symposium 1987. Verlag Deutsches Grünes Kreuz, Marburg.
30. TUENGLER, P.: Moderne Nephelometrie-Meßprinzipien und Techniken. In: FATEH MOGHADAM, A. (ed.) Nephelometrie Symposium 1987. Verlag Deutsches Grünes Kreuz, Marburg.
31. TUENGLER, P., METZMANN, E., PAULY, H. E., BECKER, W.: New immundiagnostic systems. Behring Institute Mitteilungen 82, 282–308 (1988).
32. METZMANN, E.: Protein quantitation on both branches of the Heidelberger curve by monitoring the kinetic of immunoprecipitation. Behring Institute Mitteilungen 78, 167–175 (1985).

### Anschrift des Verfassers:

Prof. Dr. Lothar Thomas  
Krankenhaus Nordwest  
Zentrallabor  
Steinbacher Hohl  
6000 Frankfurt