

Evaluierung von Ecoline-Elastase™ zur Bestimmung von PMN-Elastase- α_1 -Proteinaseinhibitor-Komplex am Hitachi 917-Analysen-System

Evaluation of Ecoline-Elastase™ for the Determination of PMN Elastase- α_1 -Proteinase-Inhibitor Complexes on the Hitachi 917 Analyzer

N. Gässler^{1,2}

Zusammenfassung: Es wird ein Immunoassay zur spezifischen Bestimmung von Komplexen aus humaner Granulozyten-Elastase und α_1 -Proteinaseinhibitor auf dem Hitachi 917-Analysen-System beschrieben. Es handelt sich um einen Latexpartikel-verstärkten turbidimetrischen Immunoassay, der im Bereich von 5 bis 500 $\mu\text{g/l}$ linear mißt. Zur einmaligen Bestimmung reichen 4 μl Citrat- oder EDTA-Plasma aus. Als Impräzision innerhalb einer Serie ergaben sich Variationskoeffizienten zwischen 1,3% (Elastase-Konzentration: 240 $\mu\text{g/l}$) und 10,4% (Elastase-Konzentration 17,3 $\mu\text{g/l}$). Die Präzisionsprüfung von Tag zu Tag zeigte Variationskoeffizienten zwischen 3,3 und 5,2%. Bei der Richtigkeitsprüfung fanden sich durchschnittliche Abweichungen vom Sollwert in Höhe von +2,5 bzw. +5,3%. Hohe Triglyzerid- (> 13,5 mmol/l) und Bilirubin-Konzentrationen (> 240 $\mu\text{mol/l}$) interferieren bei der Messung. Bereits geringe Hämoglobin-Konzentrationen (> 1,0 g/l) stören empfindlich. Der direkte Vergleich der Meßmethode (x) mit dem homogenen kolorimetrischen Immunoassay der gleichen Herstellerfirma (y) zeigt eine gute Korrelation ($r = 0,924$) und für die Regression eine Geradengleichung: von $y = 0,880 x + 9,09$.

Schlüsselwörter: Elastase, Leukozyten-/Analytik; Immunoassay; Nephelometrie und Turbidimetrie.

Summary: An immunoassay is described for the specific determination of complexes of human granulocyte elastase and α_1 -proteinaseinhibitor on the Hitachi 917 analyzer. The assay is a latex particles enhanced turbidimetric immunoassay with a linear range from 5 to 500 $\mu\text{g/l}$. The determination only requires 4 μl of citrated or EDTA plasma. The imprecision of the assay is characterized by intra-assay coefficients of variation (CV) between 1.3% (elastase concentration: 240 $\mu\text{g/l}$)

and 10.4% (elastase concentration: 17.3 $\mu\text{g/l}$). The interassay CVs are 3.3 and 5.2%. Accuracy of the method described as mean recovery in control plasma is +2.5% or +5.3%, respectively. Interferences are observed at concentrations of triacylglycerol > 13.5 mmol/l and of bilirubin > 240 $\mu\text{mol/l}$. Even low concentrations of hemoglobin (>1.0 g/l) cause interference in the measurement. The direct comparison between the evaluated method and the homogeneous colorimetric immunoassay of the same manufacturer shows a good correlation ($r = 0.924$). Slope of the regression line is 0.880 and the intercept is +9.09 $\mu\text{g/l}$.

Keywords: Elastase, Leukocyte-/analysis; Immunoassay; Nephelometry and Turbidimetry.

Für die Routine-Diagnostik von entzündlichen Erkrankungen werden in Krankenhauslaboratorien häufig klinisch-chemische Kenngrößen eingesetzt. Hierzu gehören die Blutsenkungsgeschwindigkeit als gebräuchliche Screening-Methode [1], die Leukozytenzahl [2] und die Konzentrationsmessung des C-reaktiven Proteins, einem Akut-Phase-Protein mit hoher Spezifität [3].

Wesentlich seltener werden andere Entzündungsmarker, wie z.B. die Elastase aus polymorphkernigen Leukozyten (PMN-Elastase), Interleukine und Tumornekrose-Faktoren zur Diagnostik eingesetzt [4]. Der Grund hierfür ist vor allem, daß diese letztgenannten Kenngrößen im allgemeinen nur durch zeitaufwendige Analyseverfahren bestimmt werden können. Eine Ausnahme ist der homogene Immunoassay für die Bestimmung des PMN-Elastase- α_1 -Proteinase-Inhibitor-Komplexes. Zur Routine-Diagnostik ist es jedoch unabdingbar, diese Methode auf einem schnellen klinisch-chemischen Analyse-Automaten zu applizieren [5, 6].

Material und Methode

Material

Die zur Untersuchung eingesetzten Citrat-Plasmen waren maximal 4 Std. bei Raumtemperatur gelagert

¹Zentrum für Labordiagnostik, St. Bernward Krankenhaus, Hildesheim

²Korrespondenzadresse: PD Dr. N. Gässler, Zentrum für Labordiagnostik, St. Bernward Krankenhaus, D-31132 Hildesheim. Fax: +49-5121-901694

Eingegangen: 12. Februar 1998 / Angenommen: 2. September 1998

und wurden 10 Minuten bei 1500 g zentrifugiert. Zur Bestimmung von Linearität, Präzision und Wiederfindung wurden verschiedene Patientenplasmen gemischt und zusätzlich mit Natriumchloridlösung (155 mmol/l) versetzt, um Verdünnungsreihen herzustellen. Jede Verdünnungsstufe wurde 2-fach analysiert.

Als Kontrollplasma wurde die PMN-Elastase Kontrolle der Fa. Merck (Chargen-Nr. 604069 und 14026) und als Kalibrator der PMN-Elastase Kalibrator (Chargen-Nr. 4047) eingesetzt.

Methode

Es wurde ein vom Reagenzienhersteller (Fa. Merck) entwickeltes turbidimetrisches Meßverfahren für die Bestimmung des PMN-Elastase- α_1 -Proteinaseinhibitor-komplexes im Citrat- oder EDTA-Blut auf dem Hitachi 917-Analysen-System der Fa. Boehringer Mannheim evaluiert (Reagenzchargen-Nr. 714, 731, 642 und 70824).

Der homogene Immunoassay wird mit 5 Standards kalibriert. Linearität - über 12 Verdünnungsstufen -, Präzision, Wiederfindung und Richtigkeit wurden anhand von Kontrollmaterialien überprüft. Ergänzend wurden Patientenplasmen zur Beurteilung der Präzision eingesetzt.

Für die Versuche bezüglich der Triglyzeridinterferenz wurden Patientenplasmen ausgesucht, deren PMN-Elastase- α_1 -Proteinase-Inhibitor-komplex-Konzentrationen annähernd gleich waren (16,5 und 22,1 $\mu\text{g/l}$) während die Triglyzerid-Konzentrationen (15,6 und 0,87 mmol/l) deutlich differierten. Um den störenden Einfluß von Bilirubin auf die Messung der PMN-Elastase- α_1 -Proteinase-Inhibitor-komplex-Konzentrationen zu ermitteln, wurde ein stark ikterisches Patientenplasma (Bilirubin 270 $\mu\text{mol/l}$, PMN-Elastase 80,5 $\mu\text{g/l}$) mit Kochsalzlösung (155 mmol/l) verdünnt.

Zur Untersuchung des Störfaktors „Hämolyse“ wurden hämolysefreie Plasmapools mit Hämolysatverdünnungen (Hämoglobin 5, 4, 3, 2 und 1 g/l) aufgestockt. Das Hämolysat wurde aus EDTA-Blut nach Waschen der Erythrozyten mit 155 mmol/l Kochsalzlösung und anschließender Hämolyse mit Aqua destillata und Ultraschallbehandlung gewonnen.

Als Vergleichsmethode wurde das kolorimetrische Meßverfahren des gleichen Herstellers für den PMN-Elastase-alpha-1-Proteinase-Inhibitor-komplex, der auf dem Prinzip der sog. Immunaktivierung basiert (PMN-Elastase-IMAC®), eingesetzt [5]. Die benutzten Reagenzchargen waren Nr. 17037, 160697 und 20096. Die statistische Auswertung erfolgte nach dem nicht-parametrischen Verfahren nach *Passing und Bablok* [7].

Nicht standardisierte Abkürzungen: PMN, polymorphonuclear neutrophil(s); VK, Variationskoeffizient.

Ergebnisse

Linearität

Das turbidimetrische Meßverfahren ist für Konzentrationen von PMN-Elastase- α_1 -Proteinase-Inhibitor-komplex (turbidimetrische Methode) im Plasma zwischen 5 und 500 $\mu\text{g/l}$ linear (Abb. 1).

Untere Nachweisgrenze

Die untere Nachweisgrenze der evaluierten Methode wurde als 3-fache Standard-Abweichung des Mittelwertes einer 20-fachen Messung eines Patienten-Plasmas mit niedriger PMN-Elastase- α_1 -Proteinase-Inhibitor-komplex Konzentration (17,3 $\mu\text{g/l}$) errechnet. Sie liegt bei 5 $\mu\text{g/l}$.

Präzision

Die Präzision in der Serie, berechnet als Variationskoeffizient (VK), liegt für Kontrollplasma bei 3,7% (Abb. 2). Mit Patientenplasmen wurden VK's abhängig von der eingesetzten Konzentration zwischen 1,3 und 10,4% gemessen (Abb. 2). Ähnliche Ergebnisse (VK zwischen 1,0 und 6,7%) wurden bei den als Probe analysierten Kalibratoren gefunden (Abb.3). Auch hier wurden bei geringeren Analytkonzentrationen die höchsten Impräzisionen gemessen.

Die Impräzision von Tag zu Tag, berechnet als VK, liegt für Kontrollplasma bei 3,3% (\bar{x} = 147,4 $\mu\text{g/l}$, s = 4,86 $\mu\text{g/l}$; n = 18) und bei 5,2% (\bar{x} = 204,9 $\mu\text{g/l}$, s = 10,6 $\mu\text{g/l}$; n = 14).

Wiederfindung

Die Richtigkeit der Meßergebnisse wurde anhand der Sollwerte der eingesetzten Kontrollplasmen bewertet und eine durchschnittliche Wiederfindung von 102,5 und 105,3% erzielt (Tabelle 1).

Tabelle 1 Wiederfindung von PMN Elastase

| Sollwert ($\mu\text{g/l}$) | Mittelwert ($\mu\text{g/l}$) | % Abweichung |
|------------------------------|--------------------------------|--------------|
| 140 | 147,4 | +5,3 |
| 200 | 204,9 | +2,5 |

Methodenvergleich

Die beim Vergleich beider Meßverfahren zur Konzentrationsbestimmung des PMN-Elastase-alpha-1-Proteinase-Inhibitor-komplex auf dem Hitachi 917-Analysen-System erhaltene Regressionsgerade zeigt nach der Berechnung nach *Passing und Bablok* eine Steigung von 0,88 mit einem Achsenschnitt von 9,09 (n = 44; r = 0,924) (Abb. 4). Der Vertrauensbereich (95% Perzentile) für die Steigung liegt zwischen 0,78 und 1,01 und für den Achsenabschnitt zwischen -0,55 und 15,2.

Interferenzen

Triglyzeride bis 13,5 mmol/l und Bilirubin bis 240 $\mu\text{mol/l}$ beeinflussen das Analyseergebnis für den

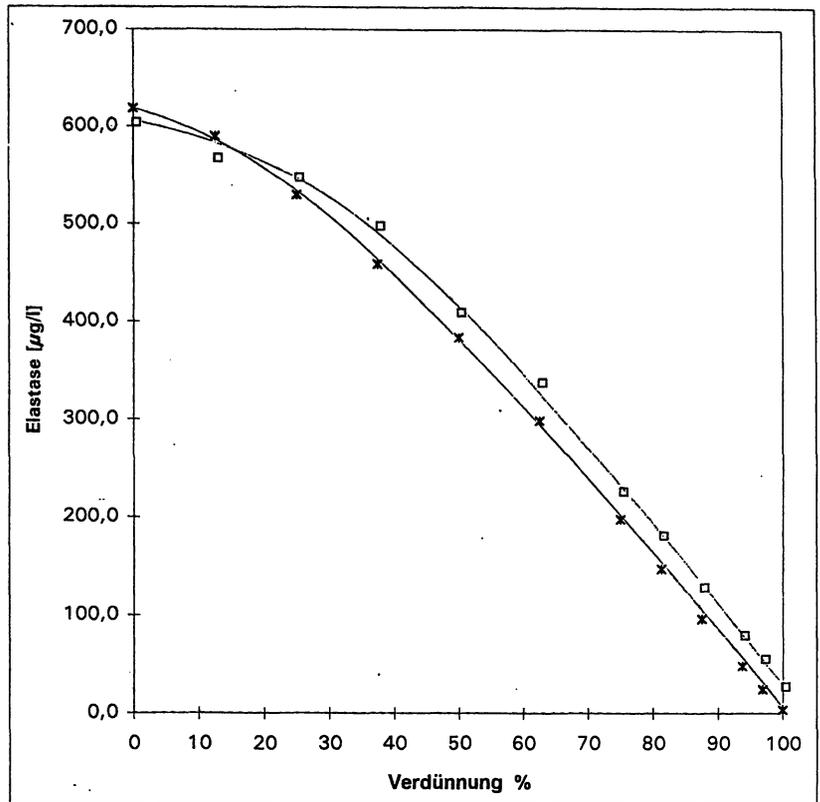


Abbildung 1 Linearität der Messung des PMN-Elastase- α_1 -Proteinase-Inhibitor-Komplexes bei Verdünnung mit 0,9% NaCl (x) und mit Patientenplasma (□)

PMN-Elastase- α_1 -Proteinase-Inhibitor-Komplex nicht oder nur sehr gering (Abb. 5). Jedoch verfälschen bereits geringe Mengen an Hämoglobin (Hämolyse) die gemessenen PMN-Elastase-Konzentrationen (Tabelle 2).

Tabelle 2 Einfluß von zugesetztem Hämoglobin auf die gemessene Konzentration von PMN-Elastase- α_1 -Proteinase-Inhibitor-Komplex ($\mu\text{g/l}$)

| Hämoglobin-Konzentration (g/l) | 0,0 | 1,0 | 2,0 | 3,0 | 4,0 | 5,0 |
|--------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Plasmaprobe Nr. | | | | | | |
| 1 | 31 | 60 | 85 | 121 | 137 | 173 |
| 2 | 59 | 89 | 120 | 144 | 173 | 196 |
| 3 | 62 | 101 | 132 | 167 | 177 | 212 |
| 4 | 120 | 156 | 164 | 206 | 245 | 264 |
| 5 | 165 | 226 | 231 | 260 | 268 | 317 |

Diskussion

Der Meßbereich der evaluierten Methode, der zwischen 5 und 500 $\mu\text{g/l}$ liegt entspricht den Angaben von Hafner et al. [6] für das kolorimetrische Meßverfahren; die obere Meßgrenze wird sogar um 11% über-

troffen.

Die Variationskoeffizienten für die Präzisionsmessung in der Serie, die konzentrationsabhängig zwischen 1,3 und 10,4% (für Patientenplasmen) liegen, entsprechen ebenfalls den Variationskoeffizienten von Hafner et al. [6]. Die Präzision von Tag zu Tag mit Variationskoeffizienten von 3,3 und 5,2% ist als gut zu bezeichnen, wird jedoch bei vergleichbaren Elastase-Konzentrationen von PMN-Elastase- α_1 -Proteinase-Inhibitor-Komplex von Hafner et al. [6] geringfügig besser gefunden (2,2%).

Die Mittelwerte aller Messungen mit den eingesetzten Kontrollplasmen liegen bei 147,4 und 204,9 $\mu\text{g/l}$. Die entsprechenden Sollwerte (und erlaubten Bereiche) sind mit 140 (112-168) und 200 (160-240) $\mu\text{g/l}$ angegeben. Die von uns beobachteten durchschnittlichen Abweichungen von den Sollwerten mit +2,5 und +5,3% sind als gut zu bezeichnen.

Der direkte Vergleich des evaluierten Meßverfahrens mit der kolorimetrischen IMAC®-Methode zeigt eine gute Übereinstimmung mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,924. PMN-Elastase- α_1 -Proteinase-Inhibitor-Komplex Konzentrationen bis ca. 150 $\mu\text{g/l}$ werden mit beiden Methoden in vergleichbaren Konzentrationen gefunden, während erhöhte Konzentrationen mit der evaluierten Methode vermutlich niedrigere Vergleichswerte ergeben.

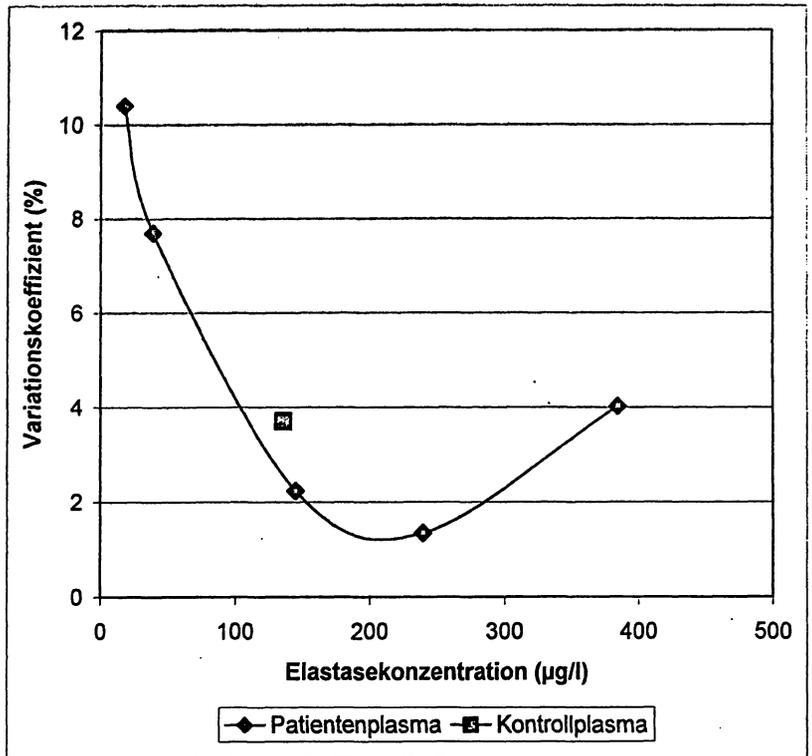


Abbildung 2 Präzision in Serie: Konzentrationsabhängigkeit des Variationskoeffizienten mit Patientenplasma und Kontrollplasma

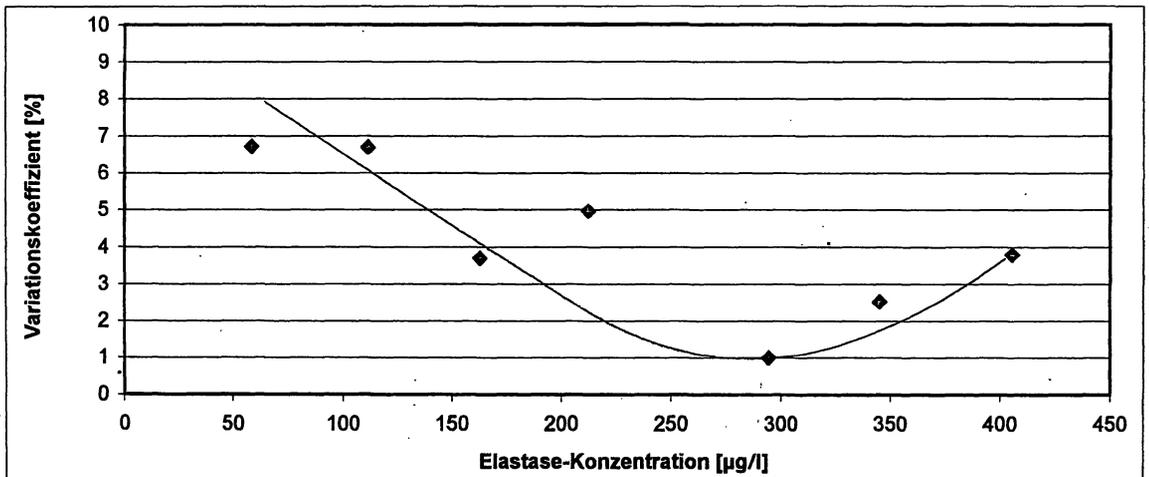


Abbildung 3 Präzision in Serie: Konzentrationsabhängigkeit des Variationskoeffizienten mit Kalibratorverdünnungen

Diese Ergebnisse sind nicht unerwartet, da bei beiden Meßverfahren die gleichen Antikörper und vermutlich auch die gleichen sekundären Kalibratoren verwendet werden. Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die Praktikabilität und Wertigkeit der Ecoline-Elastase™ am Hitachi-Analysensystem im Vergleich zur PMN-Elastase-IMAC® des gleichen Herstellers zu testen.

Um Standardisierungsprobleme und andere Fragestellungen zu beantworten ist es geplant, einen Methodenvergleich zwischen der evaluierten Methode und einer entsprechenden Methode eines anderen Herstellers durchzuführen.

Triglyzeride bis zu 13,5 mmol/l und Bilirubin bis 240 µmol/l beeinflussen nicht die gemessenen Konzentrationen von PMN-Elastase- α_1 -Proteinase-Inhibitor-

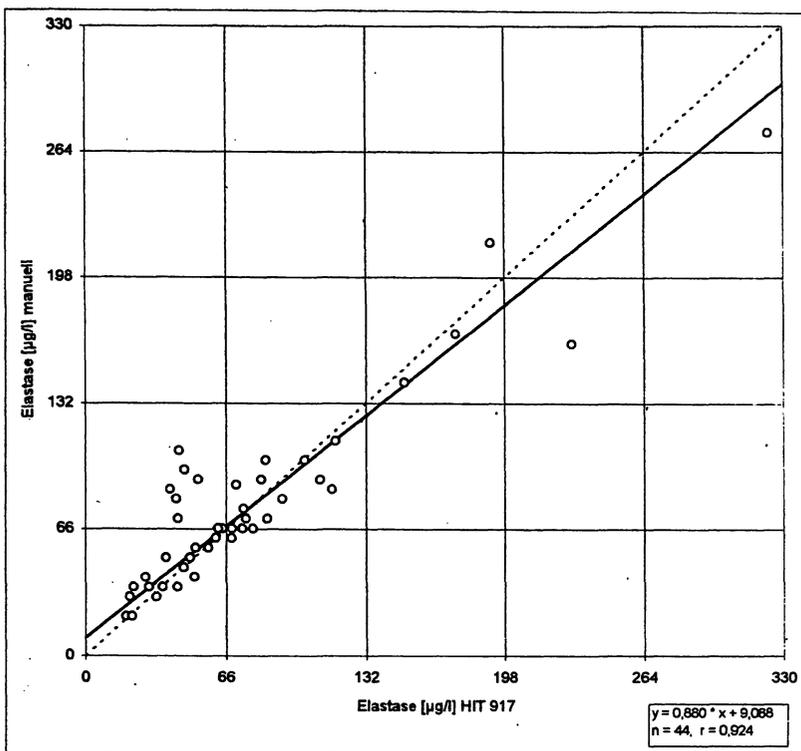


Abbildung 4 Methodenvergleich: PMN-Elastase (IMAC®) gegen latexverstärkte turbidimetrische Bestimmung von PMN-Elastase (Ecoline™) am Hitachi 917

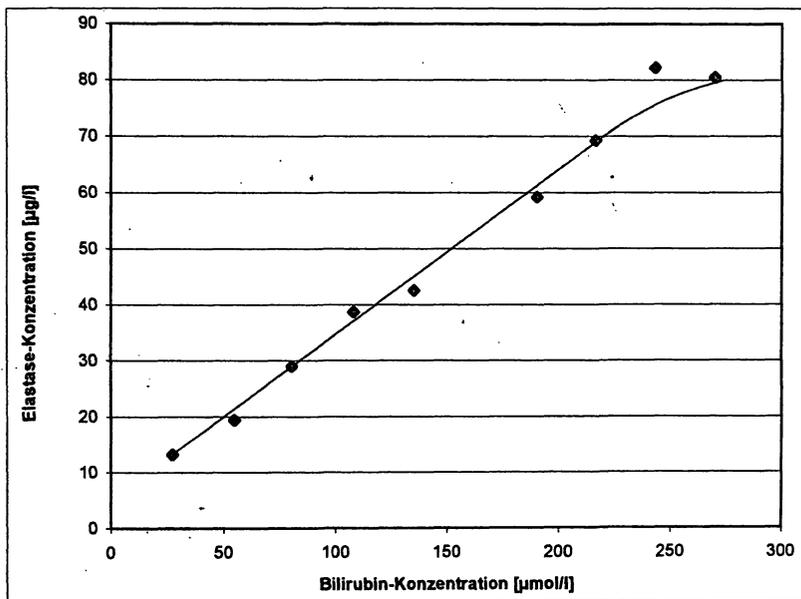


Abbildung 5 Einfluß der Bilirubinkonzentration in Patientenplasma auf die auf die gemessene PMN Elastase-Konzentration. Herstellung der Proben siehe bei „Methoden“

komplex. Bereits geringe Mengen von Hämoglobin (ab 1,0 g/l) stören empfindlich die Messung. Dies steht im Widerspruch zu Hafner et al. [6], die Interferenzen erst bei 10-fach höheren Triglyzerid-Konzentrationen, 10-fach höheren Hämoglobin-Konzentrationen und 2-

fach höheren Bilirubin-Konzentrationen gegenüber den oben angegebenen Werten feststellten.

Die beschriebene Analysenmethode hat sich als schnelles und voll automatisierbares Verfahren zur Messung von PMN-Elastase- α_1 -Proteinase-Inhibitor-

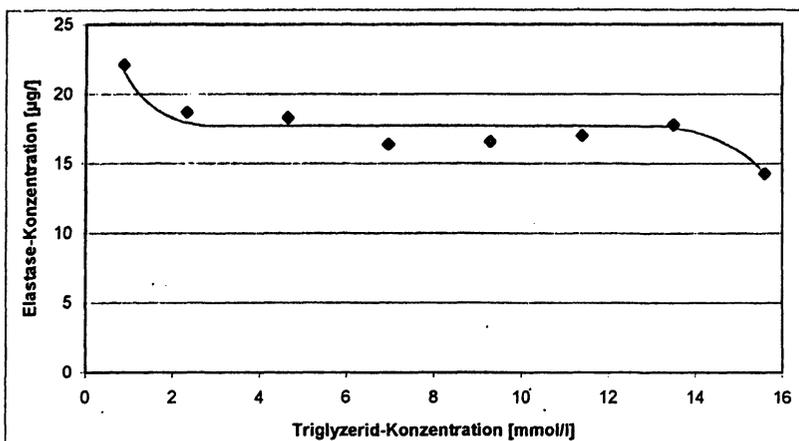


Abbildung 6 Einfluß der Triglyceridkonzentration auf die gemessene PMN Elastase-Konzentration. Herstellung der Proben siehe bei „Methoden“

komplex bewährt. Gerade die Plazierung des Meßverfahrens auf einem Routine-Analyzer des klinisch-chemischen Laboratoriums, hier dem Hitachi 917-Analysensystem, erlaubt einen jederzeitigen Einsatz dieser Kenngröße für die Diagnostik.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau *M. Seligmann* und Herrn *M. Hagenah* für die zuverlässige Hilfe bei den Untersuchungen. Der Fa. Merck danken wir für die Bereitstellung der Reagenzien.

Literatur

1. Shearn MA, King IY. Effect of age and sex on the erythrocyte sedimentation rate. *J Rheum* 1986;13:297.

2. Greenberg PL, Mara B, Steed S, Boxer L. The chronic idiopathic neutropenia syndrome: Correlation of clinical features with in vitro parameters of granulocytopoiesis. *Blood* 1980;55: 915-21.

3. Behr W. Nach Infektionen fahnden - die CRP-Bestimmung: Möglichkeiten und Grenzen. *Diagnose und Labor* 1989;39:95.

4. Neumann S. Leukozytäre Proteinase. In: Dargel R, editor. *Entzündung: Grundlagen, Klinik, Therapie*. Berlin (DE): Ullstein Mosby, 1995.

5. Hafner G, Dreher M, Lütgehaus M, Ehrental W, Heubner A, Swars H, Prellwitz W. Determination of human granulocyte elastase by the immunactivation method on the Hitachi 717 automated analyser. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991;29: 179-83.

6. Hafner G, Erbes H, Drosdat H, Lotz J, Ehrental W, Würzburg U. Evaluation of a New Assay for the Determination of PMN Elastase- α_1 -Proteinase Inhibitor Complexes in EDTA and Citrated Plasma. *Clin Lab* 1997;43:3-9.

7. Passing H, Bablok W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two differential analytical methods. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983; 21:709-20.