

Quantifizierung der Elastase aus neutrophilen Granulozyten (PMN-Elastase) in humanem Seminalplasma: Vergleich dreier enzymimmunologischer Testverfahren

H. GERS-BARLAG¹, W. D. KUHLMANN¹, U. SCHIRMER², M. D. KRAMER²

¹*Ernst-Rodenwaldt-Institut, Fachbereich Immunologie, 5400 Koblenz, Deutschland*

²*Institut für Immunologie und Serologie, Immunpathologie, 6900 Heidelberg, Deutschland*

Klin. Lab. 38, 365-371, 1992

Zusammenfassung

Die Bestimmung der Elastase aus neutrophilen Granulozyten (PMN-Elastase) ist ein laboratoriumsdiagnostischer Parameter zur Erfassung der Abwehrreaktion neutrophiler Granulozyten. In der vorliegenden Arbeit wird die Leistungsfähigkeit dreier immunologischer Testverfahren zur PMN-Elastasemessung verglichen. Es handelt sich dabei um zwei kommerziell verfügbare Systeme (EIA-2h- und IMAC-Test der Fa. Merck, Darmstadt) und ein selbst entwickeltes Testsystem. Die vergleichenden Untersuchungen wurden anhand dreier Probenmatrices durchgeführt: in Blutplasma, Seminalplasma und in Lysaten neutrophiler Granulozyten. Sehr gute Leistungsfähigkeit bei der Testung von Blutplasma zeigt die IMAC-Methode, ein homogener Enzymimmuntest. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die Durchführbarkeit auf automatisierten Analysesystemen. In anderen Probenmatrices, beispielsweise bei Seminalplasmen, sollte man wegen der individuell schwankenden matrixspezifischen Einflüsse einen Festphasen-Immuntest vorziehen. Interpretationen sollten dabei nur anhand von Norm- und Diskriminierungswerten vorgenommen werden, die mit dem gleichen Testverfahren ermittelt wurden.

Schlüsselwörter: PMN-Elastase, homogene und heterogene Enzymimmunteste, EIA, Methodenvergleich, Seminalplasma

Einleitung

Die neutrale Serinproteinase Elastase (PMN-Elastase) liegt in den azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten vor. Bei Entzündungsvorgängen unterschiedlichster Genese kommt es zu einer erhöhten Phagozytoseaktivität dieser Zellen und damit verbunden zu einer gesteigerten Freisetzung der PMN-Elastase und anderer lysosomaler Enzyme. Die PMN-Elastase wurde deshalb als laboratoriumsdiagnostischer Marker für Entzündungsreaktionen mit granulozytärer Beteiligung vorgeschlagen. Bisher wurde die PMN-Elastasebestimmung zur frühzeitigen Erkennung postoperativer septischer Zustände (Jochum et al., 1990; Jochum et al., 1985a) und auch zur Erkennung der neonatalen Sepsis herangezogen. Aber auch bei Leukämie (Hastka, 1988; Hiller und Jochum, 1989), Urämie (Heidland et al., 1984), rheumatischen Arthritiden (Banks et al., 1990) und bei schweren Kopfverletzungen (Harm et al., 1989) stellt die Bestimmung der PMN-Elastase eine Hilfe in der Diagnostik dar.

Im allgemeinen erfolgt die PMN-Elastasebestimmung im Plasma: aufgrund des Verdünnungseffektes können jedoch auf diese Weise nur ausgeprägte pathologische Zustände erkannt werden. Die Bestimmung in Körperflüssigkeiten, die durch eine Diffusionsbarriere vom Blut getrennt sind, sollte zu einer noch empfindlicheren Erkennung granulozytärer Entzündungen in diesen Kompartimenten führen. In der Literatur sind diesbezüglich Messungen in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (Jochum et al., 1985b), in Synovialflüssigkeit (Kleesiek et al., 1982) sowie in Seminalplasmen (Jochum et al., 1986) beschrieben.

Zur enzymimmunologischen Bestimmung der PMN-Elastase stehen derzeit zwei kommerzielle Testbestecke zur Verfügung, zum einen ein Festphasenimmuntest (EIA-2h-Test) und ein automatisierbarer homogener Immuntest (IMAC-Test). In den wissenschaftlichen Untersuchungen werden zudem häufig Eigenentwicklungen eingesetzt. Direkte vergleichende Untersuchungen sind nur selten beschrieben. So berichten Fink und Mitarb. (Fink et al., 1989) von einer guten Übereinstimmung zwischen EIA-2h- und IMAC-Test bei der Untersuchung von EDTA-Plasma. Banks und Mitarb. (Banks et al., 1990) kommen zu dem Ergebnis, daß bei der Untersuchung von Plasma Störeffekte bei dem EIA-2h-Test auftreten, die sich in einem von ihm entwickelten Festphasenimmuntest nicht auswirken.

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluß der eingesetzten Methode und der Probenmatrix auf die Beurteilung der PMN-Elastasekonzentration untersucht. Zu diesem Zweck wurden drei verschiedene Testverfahren eingesetzt: Die o.g. zwei kommerziell verfügbaren Testsysteme (EIA-2h- und IMAC-Test der Fa. Merck)1 und ein selbstentwickelter Festphasenimmuntest (EIA-mAk; Kramer et al., 1990). Mit diesen drei Testverfahren wurde die PMN-Elastasekonzentration in Blutplasmen, in Seminalplasmen und in Lysaten isolierter neutrophiler Granulozyten bestimmt. Die Auswahl der drei Probenmatrices erfolgte unter dem Gesichtspunkt, daß erwartungsgemäß die individuellen Schwankungen in der Zusammensetzung der Probenmatrix für Seminalplasma höher ausfallen als für Blutplasma; insbesondere sei hier auf das Vorhandensein ejakulatspezifischer Proteinaseinhibitoren hingewiesen. Die Granulozytenlysate dagegen sollten die PMN-Elastase in freier Form, d.h. nicht im Komplex mit Serumproteinaseinhibitoren, enthalten.

Material und Methoden

Material

Aktivierete Flachbodenmikrotiterplatten (F16, no. 4-69914) waren von Nunc GmbH (Wiesbaden, BRD). Polyklonale Schaf-anti-Human-PMN-Elastase Antikörper (Kat.-Nr. AHP 051) waren von Serotec (Camon Laborservice GmbH, Wiesbaden, BRD) und peroxidase-markierte Kaninchenantikörper gegen die Fc-Region von Maus-IgG (Nr. 315-035-046) waren von Dianova GmbH (Hamburg, BRD). Monoklonale Mausantikörper gegen humane PMN-Elastase wurden von uns hergestellt (Kramer et al., 1990). Gelatine und Hydrogenperoxid waren von Merck (Darmstadt, BRD) und Tween 20 und ortho-Phenylendiamin waren von Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen, BRD).

Enzymimmunteste zur Bestimmung der humanen PMN-Elastase (EIA-2h: Nr. 12589; IMAC: Nr. 11332) waren von Merck (Darmstadt, BRD). Die Testsysteme enthielten Standards für die Kalibration.

Methoden

Die Bestimmungen der PMN-Elastase wurden nach dem kürzlich publizierten Protokoll (Kramer et al., 1990) bzw. nach den Herstellerangaben durchgeführt. Die Methoden werden im folgenden kurz beschrieben.

EIA-mAk

Mikrotiterplatten wurden über Nacht mit polyklonalem Schaf anti-PMN-Elastase IgG beschichtet (Antikörperkenndaten unter *Material*). Nach Blockierung mit Gelatinelösung und intensivem Spülen der Vertiefungen wurden die verdünnten Proben (Standardvorverdünnung 1:20) zugegeben. Zur Detektion gebundener PMN-Elastase wurde mit monoklonalem Maus-anti-PMN-Elastase (Klon 6.2.4) und dann mit peroxidasemarkiertem Kaninchen anti-Maus-IgG (Fc) für jeweils eine Stunde inkubiert. Die Menge gebundener Peroxidase wurde mit dem Substrat ortho-Phenylendiamin in Gegenwart von Wasserstoffperoxid quantifiziert. Die Peroxidase-reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 1 mol/l Schwefelsäure abgestoppt. Nach jedem Inkubationsschritt wurde fünfmal mit Waschlösung (phosphatgepufferte Saline, pH 7,4, 0,5% (v/v) Tween-20) gewaschen. Die resultierende Farbe wurde in einem Titertek Multiscan MCC ELISA-Reader quantitativ vermessen.

EIA-2h

Proben in geeigneter Verdünnung (standardmäßig 1:51) wurden in Röhren inkubiert, die mit Schaf-anti-PMN-Elastase beschichtet sind. Gebundene PMN-Elastase im Komplex mit α_1 -Proteinaseinhibitor wurde dann über die Inkubation mit alkalische Phosphatase markiertem Kaninchen-anti-Human- α_1 -Proteinaseinhibitor Antiserum und die nachfolgende Inkubation mit para-Nitrophenylphosphat als Substrat quantifiziert. Nach Zugabe von 50 µl 1 mol/l NaOH als Stopplösung wurde die gelbe Farbe spektralphotometrisch vermessen.

IMAC

Der IMAC Test, ein homogener Enzymimmuntest, wurde an einem Cobas Fara II Analyser (Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen, BRD) durchgeführt. Ein Programm wurde nach Angaben des Herstellers für die maschinelle Durchführung des Tests erstellt. 20 µl der unverdünnten Probe wurde zu Peroxidase markiertem polyklonalem Schaf-anti-PMN-Elastase Antikörper (Fab'-Fragment) zupipettiert. Nach 150 sec Inkubation wurde die Peroxidase-reaktion durch Zugabe von Wasserstoffperoxid und Phenol/Aminophenazon gestartet. Nach definiertem Zeitintervall wurde die Absorption bei 500 nm vermessen.

Kalibrierung und Berechnung

Alle Proben wurden als Duplikate getestet und jeder Testdurchgang wurde durch die Mitführung von Standardproben mit PMN-Elastase/ α_1 -Proteinaseinhibitor Komplexen kalibriert. Für die beiden Festphasen-Enzymimmunteste wurden die rekonstituierten Lyophilisate des EIA-2h Testbestecks eingesetzt, während der IMAC-Test mit höher konzentrierten Standards kalibriert wurde. Unter Verwendung der IMAC-Kalibratoren fanden wir mit den beiden anderen Testsystemen, EIA-mAk und EIA-2h, gute Übereinstimmung mit den vorhergesagten Werten. Die Abweichungen lagen unter 10 %. Die Austestung der Kalibratoren in der anderen Richtung war nicht möglich, da die Standardproben des EIA-2h Testsystems Natriumazid enthielten, welches die Peroxidaseaktivität beeinflusst.

Die erhaltene Absorption bei den Meßwellenlängen wurde gegen die Standardkonzentrationen bzw. den Logarithmus der Standardkonzentrationen (EIA-mAk) aufgetragen. Die unbekanntenen Werte der PMN-Elastase-Konzentration wurden durch lineare Regression über die Standardkurve berechnet.

Probenmaterial

Seminalplasmaproben wurden aus der Andrologie-Abteilung der Universitäts-Hautklinik Heidelberg zur Verfügung gestellt und bei -70 °C gelagert. Unmittelbar vor der Testdurchführung wurden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut, bei 10 000 x g abzentrifugiert und verdünnt im Test eingesetzt.

Granulozyten wurden aus dem Blut von fünf freiwilligen Spendern nach der Methode von Savage und Mitarb. (Savage et al., 1987) isoliert. Die Lysate wurden durch hypotone Schockbehandlung der Zellen und dreimaliges Einfrieren und Auftauen hergestellt. Vor der Messung wurden die Suspensionen bei 10 000 x g für 5 min abzentrifugiert und der Überstand wurde im Test eingesetzt. Parallel wurde EDTA-Plasma dieser Probanden vermessen.

Resultate

Meßbereich

Zur Bestimmung der Meßbereiche wurden Seminalplasmen mit bekannt hohen PMN-Elastase-Konzentrationen seriell verdünnt und die Verdünnungen wurden in den drei Testsystemen vermessen. Die unteren Grenzen der Meßbereiche wurden als die Punkte festgelegt, bei denen sich die gemessenen Absorptionswerte deutlich (Mindestabweichung = Mittelwert des Leerwerts + 3 x die Standardabweichung von Mehrfachbestimmungen des Leerwerts) vom Leerwert (Negativkontrolle, d. h. Verdünnungspuffer ohne Probenzugabe) unterschieden. Die oberen Grenzen der Meßbereiche waren die Punkte, bei denen die erhaltenen Meßwerte den Bereich linearer Abhängigkeit von der Probenverdünnung verließen. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Tab. 1. Meßbereich der drei getesteten Methoden zur Bestimmung der PMN-Elastase.

Methode	Meßbereich (ng/ml)
EIA-mAk	1,2 – 45,0
EIA-2h	0,2 – 5,4
IMAC	20,0 – 550,0

Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Bestimmungen anhand einer Verdünnungsreihe von Seminalplasma mit bekannter PMN-Elastasekonzentration

Der EIA-2h-Test zeigt von allen Testsystemen die weitaus höchste Sensitivität. Es lassen sich PMN-Elastasekonzentrationen bis zu 0,2 ng/ml sicher nachweisen. Die Nachweisgrenze der beiden anderen Testsysteme liegt dagegen um Größenordnungen höher: Sie beträgt für den EIA-mAk-Test 1,2 ng/ml und für den IMAC-Test 20 ng/ml. Die Werte stimmen mit den bisher publizierten Daten überein (Fink et al., 1989; Kramer et al., 1990). Den größten Meßbereich weist der EIA-mAk-Test auf. Berechnet man den Quotienten aus dem Maximum und dem Minimum der Meßbereiche, so erhält man für den EIA-mAk-Test einen Wert von 37,5, während die Werte für den EIA-2h- und den IMAC-Test um etwa 30 % niedriger ausfallen (27,0 bzw. 27,5). Bei einer Probenvorverdünnung von 1 :20 können mit dem EIA-mAk-Test in einem Durchgang PMN-Elastasekonzentrationen zwischen 24 und 900 ng/ml exakt erfaßt werden.

Präzision

Die Präzision innerhalb einer Versuchsreihe und von Tag zu Tag bestimmten wir an ausgewählten Seminalplasmaproben, die entsprechend der jeweiligen Testmethode eine hohe, mittlere bzw. niedrige PMN-Elastasekonzentration aufwiesen. Die erhaltenen Variationskoeffizienten sind in Tab. 2 aufgelistet.

Tab.2. Bestimmung der Intraassay- und der Interassay-Variabilität bei der PMN-Elastase-Bestimmung mit drei verschiedenen Methoden (EIA-mAk-, EIA-2h- und IMAC-Methode)

	EIA-mAk	EIA-2h	IMAC
Intraassay-Variabilität			
PMN-Elastase-Konzentration			
hoch	5,83 (22,7; 20)	6,04 (4,57; 20)	2,39 (450,6; 19)
mittel	7,42 (13,1; 20)	3,42 (1,93; 20)	5,12 (184,7; 19)
niedrig	6,72 (3,2; 20)	14,10 (0,62; 20)	8,61 (38,3; 19)
Interassay-Variabilität			
PMN-Elastase-Konzentration			
hoch	6,02 (22,4; 54)	12,48 (4,48; 62)	3,30 (449,1; 54)
mittel	9,77 (12,2; 54)	12,23 (2,12; 62)	5,69 (178,0; 54)
niedrig	10,60 (3,4; 54)	15,71 (0,60; 62)	14,21 (36,9; 54)

Angegeben sind die Variationskoeffizienten bei drei verschiedenen PMN-Elastasekonzentrationen, die je nach dem Meßbereich des Testverfahrens (siehe Tab. 1) als hoch, mittel oder niedrig einzustufen sind. In Klammern sind angegeben: Die getestete PMN-Elastasekonzentration und die Zahl der Bestimmungen

sind jedoch im Vergleich zu anderen diagnostischen Verfahren als sehr gut einzustufen. Der EIA-2h-Test erreicht zwar sehr gute Intra-assay-Variationskoeffizienten (6-14 %), jedoch ist die Reproduzierbarkeit an verschiedenen Tagen mit einem Variationskoeffizient von 12-15% deutlich höher.

Neben der Präzision sollte auch die Sicherheit der Meßergebnisse beurteilt werden. Diesbezüglich konnten bei dem IMAC-Test einige Unstimmigkeiten festgestellt werden, allerdings nur bei der Messung von Seminalplasmen mit sehr hohen PMN-Elastasekonzentrationen. Bei etwa 20-30% dieser Proben wurden bei unverdünntem Einsatz in das Testsystem Werte ermittelt, die fast im mittleren Meßbereich lagen. Erst durch Verdünnung konnten die wirklichen Konzentrationen ($>> 600$ ng/ml) festgestellt werden, die dann durch die beiden anderen Verfahren in ihrer Höhe bestätigt wurden. Die Ursache für dieses Reaktionscharakteristikum des IMAC-Tests ist unklar.

Korrelationsanalysen (Seminalplasma)

Mit der IMAC-Technik, in unserem Fall einer automatisierten Version an dem Meßgerät Cobas Fara II, wurden in Bezug auf die Variationskoeffizienten hervorragende Werte erreicht, die bei hohen und mittleren PMN-Elastasekonzentrationen unter 6 % lagen. Überraschend hoch fiel allerdings die Variation bei niedrigen Konzentrationen aus. Dies liegt möglicherweise daran, daß auch in Abwesenheit von PMN-Elastase ein relativ hoher Substratumsatz und damit ein hoher Leerwert zu beobachten ist: Es werden daher im unteren Meßbereich Absorptionsdifferenzen erreicht, die kleiner als 10 % der Leerwertabsorption sind ($[X_{\text{Probe}} - X_{\text{Leer}}] < 10 \% [X_{\text{Leer}}]$). Diese Tatsache sehen wir als entscheidenden Grund für die starke Variabilität in dem unteren Meßbereich an. Die mit den beiden anderen Methoden erhaltenen Variationskoeffizienten liegen deutlich über denen des IMAC-Verfahrens. Der EIA-mAk-Test zeigt über den gesamten Meßbereich eine annähernd gleichbleibende Streuung, die innerhalb einer Versuchsreihe etwa 7 % beträgt und die sich bei Messungen an verschiedenen Tagen auf etwa 9% erhöht. Beide Werte

Den direkten Vergleich der drei Methoden begannen wir mit der Messung von mehr als einhundert Seminalplasmen mit der IMAC Methode. Anhand der erhaltenen Ergebnisse wurden die geeigneten Verdünnungen für die zeitlich längeren Verfahren festgelegt: Auf diese Weise konnte eine fast zeitgleiche Bearbeitung gewährleistet werden und es konnten Störeffekte durch Zwischenlagerung der Proben weitgehend ausgeschaltet werden.

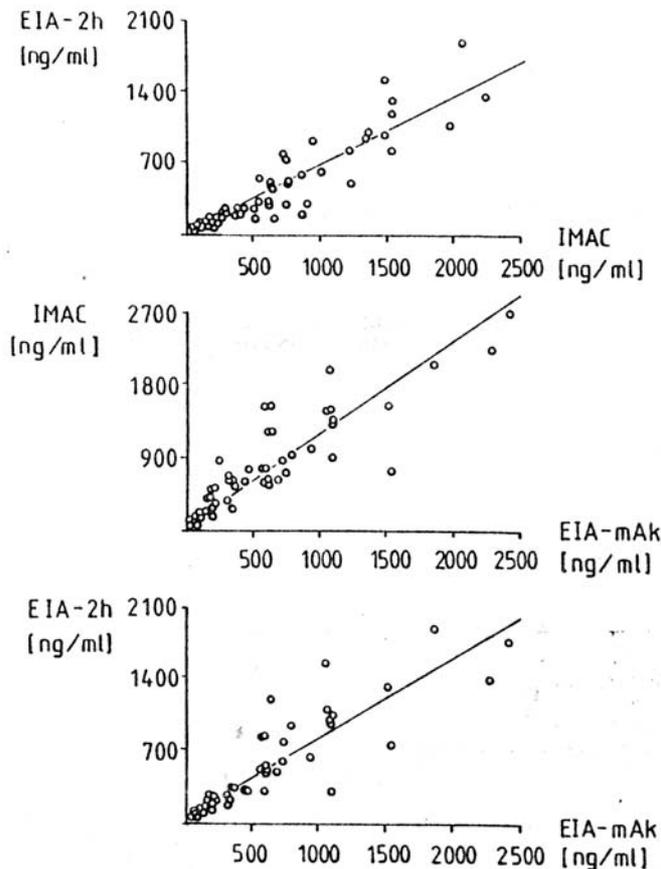


Abb. 1. Bestimmung der PMN-Elastasekonzentration in Seminalplasmen. Korrelation der mit drei verschiedenen Methoden für individuelle Seminalplasmen erhaltenen PMN-Elastasekonzentrationen
 Figure 1. Determination of PMN elastase concentrations in seminal plasma samples. Correlation of the PMN elastase concentrations obtained with three different methods in individual seminal plasma samples

H. Gers-Barlag et al.: Klin. Lab. 1992; 38: 365-371

Der Vergleich der drei Verfahren deckte keine widersprüchlichen Einzelergebnisse auf. Der enge Zusammenhang der mit den drei Methoden erhaltenen Ergebnisse wird sowohl durch den Eindruck der graphischen Darstellung (siehe Abb. 1a-1c) als auch durch die berechneten Korrelationskoeffizienten (zwischen 0,96 und 0,97; siehe Tab. 3a) dokumentiert.

Es läßt sich aus den Korrelationskoeffizienten nicht ablesen, wie groß die prozentualen Unterschiede einzelner Proben bei Verwendung unterschiedlicher Bestimmungsverfahren ausfallen. Deshalb errechneten wir für alle untersuchten Proben die entsprechenden Faktoren (durch Division der Konzentrationen, die mit den beiden verglichenen Methoden bestimmt wurden) und unterzogen diese Daten einer statistischen Auswertung (Tab. 4a). Bezogen auf den Median dieser Faktoren liegen die PMN-Elastasekonzentrationen, die mit dem EIA-mAk-Test bestimmt wurden, um 12,5 % über denen, die mit dem EIA-2h-Test bestimmt wurden, und sie liegen um 25,9 % niedriger als die mit dem IMAC-Test erhaltenen Werte. Die Differenz

zwischen IMAC-Test und EIA-2h-Test beträgt 45%.

Korrelationsanalysen (Blutplasma und Granulozytenlysat)

Weiterhin sind in Tab. 3 und 4 die Vergleichsparameter für die PMN-Elastasebestimmung in menschlichem Blutplasma und in den Lysaten von menschlichen Granulozyten zusammengefaßt. Die beiden kommerziellen Testverfahren (IMAC- und EIA-2h-Test) sind auf die PMN-Elastasemessung im Plasma abgestimmt. Demgemäß findet man nicht nur einen sehr guten Korrelationskoeffizienten (0,983) für die mit diesen beiden Methoden erhaltenen Ergebnisse, sondern auch die Differenz zwischen den einzelnen Ergebnissen ist vernachlässigbar klein (4,1 %). Im Gegensatz zu dieser sehr starken Übereinstimmung fallen die Ergebnisse des EIA-mAk niedriger aus: etwa 20 % niedriger gegenüber dem IMAC-Test und etwa 10% niedriger gegenüber dem EIA-2h-Test (Tab. 4b). Dies ist unterschiedlich zur PMN-Elastase-Bestimmung im Seminalplasma: Während der IMAC-Test bei Blutplasmen und bei

Seminalplasmen deutlich höhere Werte liefert, zeigt der EIA-2h-Test für das Seminalplasma durchschnittlich geringere Werte und für das Blutplasma deutlich höhere Werte als der EIA-mAk-Test.

Die immunologische Bestimmung der PMN-Elastase ist davon abhängig, daß die Epitope des Moleküls, gegen die die jeweiligen Antikörper gerichtet sind, immunologisch frei verfügbar, d. h. zugänglich sind. In einer dritten Versuchsreihe wurden die PMN-Elastasekonzentrationen in Lysaten von Granulozyten bestimmt. In dieser Probenmatrix sollte die PMN-Elastase in freier Form vorliegen, zumindest kann die Komplexbildung mit plasma-oder ejakulatabhängigen Proteinaseinhibitoren ausgeschlossen werden. Diese Überlegung wurde dadurch bestätigt, daß der EIA-2h-Test keinerlei Signal ergab, da kein α_1 -Proteinaseinhibitor zur Komplexbildung mit PMN-Elastase zur Verfügung stand. Die mit dem EIA-mAk- bzw. dem IMAC-Test erhaltenen Werte belegten dagegen, daß die Lysate einen sehr hohen Gehalt an PMN-Elastase aufwiesen. Die mit den beiden Testen erhaltenen Werte zeigten eine gute Korrelation ($r = 0,978$), aber die Konzentrationswerte nach dem homogenen Enzymimmuntest (IMAC) betragen nur etwa 30 % der Werte, die mit dem EIA-mAk-Test erhalten wurden (Tab. 4).

Tab. 3. Korrelation der mit den drei verschiedenen Testverfahren (EIA-mAk-, EIA-2h- und IMAC-Verfahren) bestimmten PMN-Elastasekonzentrationen

Korrelierte Methoden	Gleichung der Regressionsgeraden	$K_{(corr)}$
A) Seminalplasma		
EIA-mAk – EIA-2h (116)	$0,768 x + 33,98$	0,966
EIA-mAk – IMAC (114)	$1,048 x + 60,18$	0,962
IMAC – EIA-2h (114)	$0,699 x + 13,07$	0,971
B) Blutplasma		
EIA-mAk – EIA-2h (25)	$1,025 x + 36,23$	0,976
EIA-mAk – IMAC (25)	$1,015 x + 32,20$	0,987
IMAC – EIA-2h (109)	$1,043 x + 0,02$	0,983
C) Granulozytenlysate		
EIA-mAk – EIA-2h	n. b.	
EIA-mAk – IMAC (5)	$0,307 x + 972,6$	0,978
IMAC – EIA-2h	n. b.	

Es wurden drei verschiedene Probenmatrices vermessen: Seminalplasma, Blutplasma und Lysate isolierter neutrophiler Granulozyten. In Klammern ist jeweils die Anzahl der getesteten Proben angegeben. $K_{(corr)}$ = Korrelationskoeffizient. n. b. = nicht berechnet (siehe dazu auch unter Resultate)

Tab. 4.

Verglichene Methoden	n	Quotient	
		Mittelwert +/- Standardabweichung	Median
Seminalplasma			
EIA-mAk – EIA-2h	109	1,211 +/- 0,528	1,125
EIA-mAk – IMAC	109	0,950 +/- 0,741	0,741
IMAC – EIA-2h	102	1,632 +/- 1,032	1,442
Blutplasma			
EIA-mAk – EIA-2h	25	0,778 +/- 0,174	0,770
EIA-mAk – IMAC	25	0,825 +/- 0,186	0,878
IMAC – EIA-2h	106	0,974 +/- 0,213	0,959
Granulozytenlysate			
EIA-mAk – EIA-2h		n. b.	n. b.
EIA-mAk – IMAC	5	2,491 +/- 0,676	2,612
IMAC – EIA-2h		n. b.	n. b.

Vergleich von jeweils zwei der drei getesteten PMN-Elastasebestimmungsverfahren anhand individueller Proben. n = Anzahl der verglichenen Proben. Es wurde jeweils der Quotient aus PMN-Elastasewerten individueller Proben gebildet. Angegeben ist der Mittelwert +/- Standardabweichung und der Median für jeweils n verglichene Proben. n. b. = nicht berechnet

Diskussion

Die PMN-Elastase ist ein Parameter zur Aktivitätsbestimmung eines Teils der körpereigenen zellulären Abwehr, nämlich der neutrophilen Granulozyten. Die diagnostische Wertigkeit der PMN-Elastasebestimmung in Körperflüssigkeiten liegt in der Erkennung und möglicherweise quantitativen Erfassung von Entzündungsvorgängen mit granulozytärer Beteiligung. So wurde die Bestimmung der PMN-Elastase beispielsweise zur Erkennung septischer Zustände im postoperativen Verlauf polytraumatisierter Patienten (Jochum et al., 1990) und als Marker für Entzündungsvorgänge im männlichen Genitaltrakt (Jochum et al., 1986) vorgeschlagen.

Meistenteils wurde die freigesetzte PMN-Elastase systemisch, d. h. in Blutproben, erfaßt, demgemäß sind die meisten Testsysteme auf die Probenmatrix Blutplasma optimiert. Die vorliegende Studie belegt mittels eines Vergleichs dreier Methoden zur PMN-Elastasebestimmung und anhand dreier Probenmatrices (Blutplasma, Seminalplasma und Granulozytenlysat), daß zum Teil beachtliche Unterschiede bei den Meßergebnissen auftreten, die beim Einsatz einzelner Verfahren und bei der Beurteilung der Meßwerte berücksichtigt werden sollten.

Wir haben gefunden (Tab. 1), daß die Meßbereiche der drei verwendeten Methoden sehr stark differieren, so daß dem in einer unterschiedlichen Probenvorbereitung Rechnung getragen werden muß. Ausgehend von Durchschnittswerten bei gesunden Probanden von 22 ng/ml im Blutplasma (Angaben der Fa. Merck) bzw. etwa 100 ng/ml im Seminalplasma (Gers-Barlag et al., unveröffentlichte Daten) können die Proben nur für die IMAC-Methode unverdünnt eingesetzt werden, während sie bei EIA-mAk und EIA-2h verdünnt werden müssen (1:20 bzw. 1:50). Das von Kramer und Mitarbeitern (Kramer et al., 1990) beschriebene Verfahren erfaßte PMN-Elastase Konzentrationen von 24-900 ng/ml und übertraf damit in der Spannweite des Meßbereichs die beiden anderen Methoden um gut 30%. Die Bestimmung der Präzision fiel bei der IMAC-Methode am besten aus. Der entscheidende Vorteil dieser Methode ist wohl die Durchführbarkeit des homogenen Enzymimmunoassays auf automatisierten Analysesystemen. Mit Ausnahme der Bestimmung der Variation von Tag zu Tag bei niedrigen PMN-Elastasekonzentrationen überschritten die Variationskoeffizienten hier nicht 10%. Ähnlich war auch das Bild für den EIA-mAk. Nur der EIA-2h erreichte nicht dieses Niveau: Hier fielen insbesondere die Interassay-Variationskoeffizienten höher aus (12-15%).

Meßbereiche und Variationskoeffizienten stimmen gut überein mit den Angaben von Kramer und Mitarb. (Kramer et al., 1990) und Fink und Mitarb. (Fink et al., 1989), so daß diese Verfahrensparameter als matrixunabhängig angesehen werden können. Ebenso wenig lassen sich aus den Korrelationskoeffizienten zwischen den einzelnen Methoden (Tab. 3) Anhaltspunkte für matrixspezifische Effekte ablesen. Nur bei genauerer Betrachtung fällt auf, daß die Korrelationskoeffizienten bei den Untersuchungen im Seminalplasma geringfügig niedrigere Werte aufweisen als im Blutplasma (Tab. 3a).

Je nach gewählter Methode haben die Probenmatrices einen starken Einfluß auf die Ergebnisse der PMN-Elastasebestimmung. Besonders fällt dies auf, wenn man eine Reihenfolge nach der Höhe der bestimmten PMN-Elastasekonzentrationen aufstellt (siehe dazu die Gleichung der Regressionsgeraden in Tab. 3, bei denen die Steigung z. T. erheblich von 1,0 abweicht). Im Blutplasma finden wir die höchsten Werte mit der EIA-2h Methode (100%; die folgenden Prozentangaben beziehen sich auf die relative Höhe der Mediane in Tab. 4), gefolgt von der IMAC Methode (96%). Deutlich geringere Konzentrationen (77%) liefert die Bestimmung mit der EIA-mAk Methode. Bei der Vermessung von Seminalplasma liefert die Messung mit der IMAC-Methode die höchsten Konzentrationen (= 100%). Bei diesem Untersuchungsmaterial werden mit den beiden Festphasenenzymimmuntests, EIA-mAk (89%) und EIA-2h (69%) geringere Werte ermittelt. Besonders auffällig wird der Einfluß jedoch bei der PMN-Elastasebestimmung in Granulozytenlysaten. IMAC liefert nur 38% der Konzentration verglichen mit EIA-mAk (= 100%). Wegen der Abwesenheit von α_1 -Proteinaseinhibitor bilden sich in diesem Probenmaterial keine PMN-Elastase/ α_1 -Proteinaseinhibitor-Komplexe, so daß der EIA-2h-Test keine Ergebnisse liefert.

In diesem Zusammenhang sollte auch beachtet werden, daß die Streuungen der Quotienten (Standardabweichung in Tab. 4) nur bei den Bestimmungen in den Seminalplasmen sehr hoch ausfallen: Sie liegen bei diesem Probenmaterial zwischen 44 und 78%. Im Blutplasma

dagegen liegt der gleiche Wert relativ konstant bei 22%. Diese verhältnismäßig große Streuung bei den Seminalplasmen führen wir auf eine individuell wesentlich variablere Zusammensetzung der Ejakulate im Vergleich zu den Blutplasmen zurück. Somit könnten in Seminalplasmen wesentlich mehr, bis jetzt nicht identifizierte, Komponenten in unterschiedlicher Weise auf die einzelnen PMN-Elastase-Meßsysteme einwirken. In den Granulozytenlysaten haben wir wiederum ein homogenes Kollektiv, in dem die Streuung mit 27 % ähnlich niedrig wie im Plasma ausfällt.

Zusammenfassend lassen sich aus den Ergebnissen die folgenden Punkte zur PMN-Elastasebestimmung festhalten:

- I Alle drei getesteten Methoden eignen sich zur Messung der PMN-Elastasekonzentration in unterschiedlichen Körperflüssigkeiten. Das von Serumproteinaseinhibitoren freie Granulozytenlysate soll hierbei außer acht gelassen werden, da es für diagnostische Zwecke als Probenmaterial im allgemeinen nicht auftaucht.
- II Die Variation der einzelnen Methoden wurde für EIA-mAk- und IMAC-Test mit Variationskoeffizienten unter 10 % als sehr günstig ermittelt. Nur der EIA-2h-Test erwies sich in diesem Punkt als vergleichsweise ungünstig, allerdings immer noch in einem für biologische Nachweisverfahren tolerablen Bereich.
- III Bei Bestimmungen im Plasma können EIA-2h- und IMAC-Test gegeneinander ausgetauscht werden. Die Verwendung des EIA-mAk-Test erfordert die Anwendung eines Korrekturfaktors, um die Ergebnisse mit denen der beiden anderen Verfahren vergleichen zu können.
- IV In anderen Körperflüssigkeiten - wie hier am Beispiel der Seminalplasmen gezeigt - sollte man wegen der individuellen Schwankungen und der matrixspezifischen Einflüsse Interpretationen nur anhand von Norm- und Diskriminierungswerten vornehmen, die mit dem gleichen Verfahren ermittelt wurden.

Bei einer abschließenden Beurteilung der drei untersuchten Verfahren sollte herausgestellt werden, daß die IMAC-Version eindeutige Vorteile gegenüber den beiden Festphasen-EIAs besitzt in Bezug auf Schnelligkeit, einfache Durchführung und Präzision der Meßergebnisse: Diese Methode ist sicherlich bei der Bestimmung der PMN-Elastase im Plasma die Methode der Wahl. Bei der Untersuchung anderer Körperflüssigkeiten würden wir dagegen zur Verwendung eines Festphasen-EIA raten, da diese Methode gegenüber Störungen durch die Probenmatrix weniger anfällig ist. Der EIA-mAk-Test weist von den verglichenen Festphasen-Testen den größeren Meßbereich auf; das kann u.U. bei Proben mit stark variierenden PMN-Elastase-Konzentrationen von Vorteil sein.

Danksagung

Die Untersuchungen erfolgten mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Kr 931/2-2).

Literatur

1. Banks RE, Evans SW, Taylor KF, Bird HA, Whicher JT. Measurement of plasma concentrations of polymorphonuclear elastase/ α_1 -proteinase inhibitor in patients with rheumatoid arthritis: interference by rheumatoid factor. Ann Rheum Dis 1990; 49: 18-21

2. Fink PC, Suin de Boutemard C, Haeckel R. Measurement of leukocyte elastase/ α_1 -proteinase inhibitor complex using a homogeneous and a heterogenous enzyme-immunoassay. *J Clin Chem Clin Biochem* 1989; 27: 869-871
3. Harm K, Bartfeld KP, Mathew T. Plasma concentrations of granulocytic elastase/ α_1 -proteinase inhibitor complex in patients with severe head injury, multiple trauma or cerebral bleeding. *Clin Biochem* 1989; 22: 149-153
4. Hastka J. The importance of granulocyte elastase in haematological diagnosis. *Blut* 1988; 57: 69-75
5. Heidland A, Hört WH, Heller N, Heine H, Neumann S, Schaefer RM, Heidbreder E. Granulocyte lysosomal factors and plasma elastase in uremia: a potential factor of catabolism. *Klin Wschr* 1984; 62: 218-224
6. Hiller E, Jochum M. Plasma levels of human granulocytic elastase/ α_1 -proteinase inhibitor complex in leukemia. *Blut* 1984; 48: 269-275
7. Jochum M, Duswald KH, Dittmer H, Fritz H. Elastase/ α_1 -Proteinaseinhibitor-Komplex: Ein Indikator für pathobiochemische Veränderungen in der Sepsis und nach Polytrauma. In: *Neue Wege in der Entzündungsdiagnostik*. Jochum M, Gabi F, Greiling H, Fritz H (eds) 1985a. GIT-Verlag, Darmstadt, pp 17-32
8. Jochum M, Pelletier A, Boudier C, Pauli G, Bieth J. The concentration of leukocyte elastase α_1 proteinase inhibitor complex in bronchoalveolar lavage fluids from healthy human subjects. *Am Rev Respir Dis* 1985b; 132: 913-914
9. Jochum M, Pabst W, Schill WB. Granulocyte elastase as a sensitive diagnostic parameter of silent male genital tract inflammation. *Andrologia* 1986; 18: 413-419
10. Jochum M, Fritz H, Nast-Kolb D, Inthorn D. Granulozyten-Elastase als prognostischer Parameter. *Dtsch Ärztebl* 1990; 87: 952-956
11. Kleesiek K, Neumann S, Greiling H. Determination of the elastase α_1 -proteinase inhibitor complex, elastase activity and proteinase inhibitors in the synovial fluid. *Fresenius Z Anal Chem* 1982; 311: 434-435
12. Kramer MD, Müller-Bardorff M, Simon MM, Tilgen W, Schickel E, Petzoldt D. Measurement of free human leukocyte elastase and human leukocyte elastase/ α_1 -proteinase inhibitor complexes by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Meth* 1990; 131: 41-48
13. Savage COS, Winearls CG, Jones S, Marshall PD, Lockwood CM. Prospective study of radioimmunoassay for antibodies against neutrophil cytoplasm in diagnosis of systemic vasculitis. *Lancet* 1987; 1389-1393