

Birgit Steiner

Dr. med.

## **Entwicklung eines immunologischen Nachweisverfahrens für Serum-Amyloid-A mit Lumineszenz-Detektion**

Geboren am 11.08.1973 in Karlsruhe

Reifeprüfung am 18.05.1993 in Philippsburg

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1994 bis SS 2000

Physikum am 21.03.1996 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Karlsruhe

Staatsexamen am 20.11.2000 an der Universität Freiburg

Promotionsfach: Labormedizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. H. Schmidt-Gayk

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines immunologischen Nachweises zur Bestimmung von Serum-Amyloid-A (SAA) im Blut. Dabei ist als Nachweisverfahren die Chemilumineszenzreaktion verwendet worden, weshalb als Tracer ein Acridiniumester-Derivat eingesetzt wurde. Aufgrund der guten Handhabung wurde ein heterogenes Trennverfahren bevorzugt, was mit Hilfe der Kopplung von Antikörper bzw. Antigen an eine Polystyrenekugel mit einem Durchmesser von 6,25 µm möglich war.

Zu Beginn der Arbeit wurde untersucht, ob es möglich ist, auf der Grundlage eines Immunochemilumineszenz-Assays (ILMA) einen entsprechenden Assay zum SAA-Nachweis aufzubauen. Dazu wurden drei verschiedene Antikörper, zwei polyklonale Antikörper (Anti-Serum-Amyloid-A, Rabbit und Anti-Serum-Amyloid-A, Sheep) und ein monoklonaler Antikörper (mAK DAKO) zur Tracerherstellung verwendet. Zur Kugelherstellung („coated beads“) wurden die beiden polyklonalen Antikörper mit den Polystyrenekugeln gekoppelt. Es folgte der Aufbau von Ein-Schritt- und Zwei-Schritt-Assays mit Kombination der verschiedenen Kugeln und Tracer. Dabei war es jedoch nicht möglich, ein befriedigendes Ergebnis zu erzielen, da die höchsten RLU-Werte bei der Messung verschiedener Serumproben jeweils mit dem Puffer gemessen worden sind. Bei dem verwendeten Puffer

handelt es sich um einen Phosphatpuffer mit Natriumazid, EDTA und 2 % BSA (PPNE 2 % BSA). Diese Ergebnisse verhielten sich umgekehrt zu den zu erwartenden Ergebnissen.

Durch das Verwenden eines proteinfreien Puffers (1/15 M Phosphatpuffer, 1/15 M PP) und durch Vorbehandlung des zu untersuchenden Serums mit einem Delipidationsverfahren sollte die Lösung des Problems erzielt werden. Die Ergebnisse zeigen, daß dies mit diesen Maßnahmen nicht möglich war.

Daraufhin wurde der Versuchsaufbau komplett umgestellt und statt des bisherigen ILMA's ein Lumineszenz-Immunoassay (LIA) aufgebaut. Dabei ist bei den verschiedenen Schritten der Kugel- und Tracerherstellung und zum Verdünnen der Proben ein Caseinpuffer verwendet worden. Zur Kugelherstellung wurden die beiden polyklonalen Antikörper Anti-Serum-Amyloid-A, Rabbit und Anti-Serum-Amyloid-A, Sheep (c = 30 mg/l) eingesetzt. Zur Tracerherstellung diente anstelle des Antikörpers jetzt das Antigen, das Serum-Amyloid-A (c = 50 µg/l). Anschließend ist aus Serumproben, bei denen ein erhöhtes C-reaktives Protein (CRP) gemessen wurde, eine optimale Verdünnungsreihe ermittelt und diese in einem zweiten Schritt mit Hilfe einer definierten Menge des Antigens kalibriert worden. Dadurch standen sechs Standardverdünnungen mit einer definierten SAA-Konzentration zur Verfügung, die vor der jeweiligen Meßreihe pipettiert wurden und mit deren Hilfe eine Berechnung der Konzentration aus den „relative light units“ (RLU) möglich war.

Nach Abschluß der Versuche zur Kinetik und Haltbarkeit, sowie der optimalen Konzentrationen und Volumina konnte eine exakte Arbeitsanleitung zur Assaydurchführung erstellt werden. Bei der Qualitätskontrolle zeigte sich, daß der erstellte SAA-Assay eine untere Nachweisgrenze von 0,4 mg/l hat und bei den Versuchen zur Linearität sehr zufriedenstellende Ergebnisse liefert, da eine Probenverdünnung bis zu einem SAA-Gehalt von ca. 100 mg/l nicht notwendig ist. Dagegen erwies sich die Recovery des Assays als weniger zufriedenstellend, ebenso die Versuche zur Inter- und Intraassayvarianz. Dabei ergab die Intraassayvarianz bei Messung von drei Kontrollen mit unterschiedlicher SAA-Konzentration Variationskoeffizienten (VK) zwischen 21-26 %. Bei der Interassayvarianz lag der VK der Kontrolle mit geringer SAA-Konzentration bei 35 %, für die mittlere und hohe Konzentration dagegen bei 20 und 21 %.

Die Bestimmung des Normalbereiches erfolgte zuerst aus einem Probenpool von 120 Personen, bei denen zuvor eine  $\beta$ -HCG-Bestimmung erfolgt war. Der ermittelte Normalbereich betrug 1,4-55,8 mg/l (95 %-Perzentile). Da dieser Wert aufgrund des weiten Bereiches, den er umfaßt, nicht plausibel schien, wurde eine erneute Normalbereichbestimmung mit Blutproben von Blutspendern als „gesichert gesunden Personen“ vorgenommen. Die Messung der 120 Proben ergab unter Verwendung der 95 %-

Verteilung einen Normalbereich von 1,0-6,8 mg/l, was mit den Ergebnissen anderer Forschergruppen in hohem Maße übereinstimmt.

Eine Prüfung der Korrelation von 118 Serumproben zwischen den beiden Akute-Phase-Proteinen CRP und SAA ergab einen Korrelationskoeffizienten von 0,69. Dies entspricht den bisherigen Untersuchungen, daß beide Entzündungsproteine bei einer Akute-Phase-Reaktion zwar ansteigen, dieser Anstieg jedoch je nach Ursache der Akute-Phase-Reaktion nicht unbedingt proportional zueinander vonstatten gehen muß.

Bei dem in dieser Arbeit entwickelten Lumineszenz-Immunoassay handelt es sich um einen in der Handhabung einfachen und dennoch sensitiven Nachweis für das Serum-Amyloid-A (SAA). Der Einfluß verschiedener Parameter auf die SAA-Bestimmung wurde systematisch und gründlich untersucht. Durch eine Erforschung der klinischen Anwendung dieses Assays wird es in Zukunft möglich sein, neben dem CRP als diagnostischem Parameter eine Akute-Phase-Reaktion schneller zu erkennen und die Diagnose von Entzündungsreaktionen, die bisher nur schwer mit dem CRP erfaßt wurden, wie zum Beispiel die Abstoßungsreaktion nach einer Nierentransplantation, zu vereinfachen und abzusichern.