



Einführung in die 3D-Immunofiltrations- Technologie

EINSATZBEREICH

Die 3D-IF (3D-Immunofiltration) Technologie ist eine Kombination aus Elementen der Affinitätschromatographie mit Immunoassayprinzipien. Dabei werden Rezeptoren (Antikörper, Antigene, Streptavidin, DNA) auf porösen 3-dimensionalen Filtern immobilisiert und nachfolgende Reaktionsschritte (Analytbindung, Tracerbindung, Substratzugabe) im Durchfluß durchgeführt. Diese Verfahrensweise bietet prinzipiell folgende Vorteile:

- Analytanreicherung
- kurze Analysezeit (5-15 Minuten)
- Vorkalibrierung der Assays

Das Grunddesign sind Minidurchflusssäulen wie sie in Abb. 1 und 2 gezeigt werden. Durch Kombination dieser Technik mit der PolyHRP-Technologie können ultrasensitive Schnelltests realisiert werden. Die Technik kann aber auch mit anderen Detektionsverfahren (Fluorimetrie, Luminometrie, etc.) kombiniert, oder für die Probenextraktion eingesetzt werden.

DIE STRUKTUREN 3-DIMENSIONALEN FILTERN

Die Schlüsselkomponente der 3D-IF-Technologie sind 3-dimensionale Filterelemente (3D-Filter). Sie basieren auf polymeren Sinter- oder Fasermaterialien. Diese sind oberflächenbehandelt, so dass eine definierte Immobilisierung von Proteinen oder anderen Rezeptoren möglich wird. Die Porengrößen können in einem weiten Bereich von etwa 5µm bis etwa 100µm gewählt werden (Abb. 3). Standardmaterial auf Basis von Polyethylen hat einen mittleren Porenradius von etwa 20µm bei einem Porenvolumenanteil von etwa 50%. Ein typischer 5*5mm (h*d) zylinderförmiger Filter wie er in den Senova Minisäulen entsprechend Abb. 2 eingesetzt wird weist eine innere Oberfläche von etwa 40cm² auf.

DETEKTIONSVERFAHREN

Die 3D-Filterelemente können mit vielen Detektionsverfahren kombiniert werden, wobei entweder direkt auf dem Säulenfilter oder nach der Elution im Eulat eine Quantifizierung vorgenommen werden kann. Im einfachsten Fall kann ein Assay in Kombination mit konventioneller ELISA-Technik (Mikroplattenreader) realisiert werden.

Unter der Bezeichnung ABICAP[®] werden von Senova Schnelltestsysteme auf Basis der 3D-IF Technologie in Kombination mit optischer Auswertung angeboten. Hier kommen PolyHRP-Tracer (siehe Senova „Einführung in die PolyHRP Technologie“) in Kombination mit einem präzipitierenden Enzymsubstrat (TMB) oder Farbstoffkonjugate DSC (Dye Suspensoid Conjugate) zum Einsatz. Das Auslesen erfolgt direkt auf dem 3D-Filter mit einer optischen Messanordnung entsprechend Abb. 4. Diese wurde in einem kleinen Säulenphotometer entsprechend Abb. 5. realisiert.

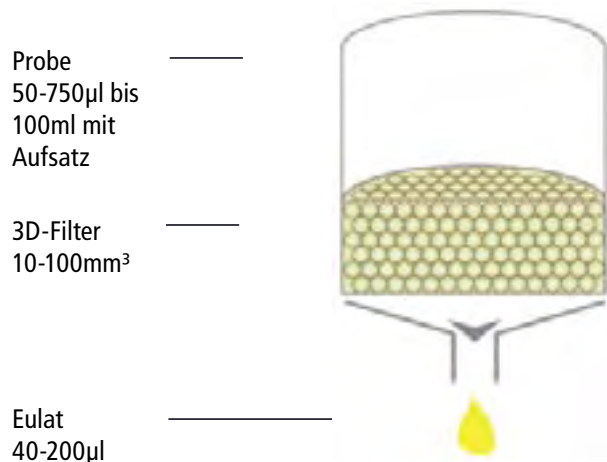


Abb. 1: Schematische Darstellung der 3D-IFA- Technologie



Abb. 2: Minisäulen

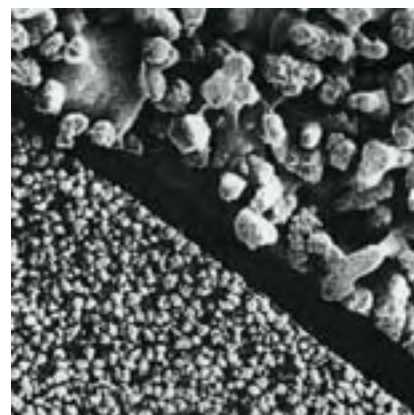


Abb. 3: Typische Struktur von 3D-Filtern (Typ 5µm und Typ 100µm)

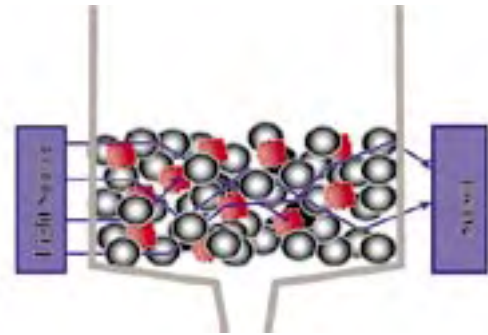


Abb. 4: Die Detektion von Farbstoffen auf 3D-Filtern mittels Lichtdiffusionsmessung



Abb. 5: Handgerät zum photometrischen Auslesen von Senova Minisäulen

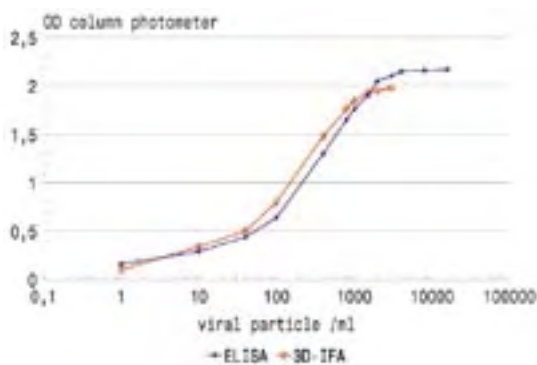


Abb. 6: Kalibrationskurve für den Nachweis von EBOLA Viren; PolyHRP40-ELISA im Vergleich zum entsprechenden Durchflussimmunoassay auf Basis von 3D-IF- und PolyHRP-Technologie

(Daten nach A. Lucht et al. Bundeswehr Institut für Mikrobiologie, München)

ABICAP® SCHNELLTESTS

ABICAPs sind säulenbasierte Schnelltests mit Assayzeiten im Bereich bis 5-15 Minuten. Dabei weisen sie eine mit anderen Laborverfahren (z.B. ELISA) vergleichbare Sensitivität auf.

Ein Beispiel zeigt Abb. 6. Bei dem darin gezeigten Referenzsystem handelt es sich um einen ultrasensitiven ELISA auf Basis von PolyHRP. Unter Ausnutzung von Anreicherungseffekten ist es möglich die Nachweisgrenzen weiter zu verbessern.

In der Regel ist es möglich, etablierte Immunoassay-Reagenzien auf das 3D-IF Format zu übertragen.

Senova bietet einen entsprechenden Entwicklungs-service an. Tabelle 2 zeigt eine Auswahl von Assays, bei denen das Verfahren erfolgreich eingesetzt wurde. Das Analytenspektrum ist sehr breit und reicht von niedermolekularen Verbindungen über Proteine bis zu viralen Partikeln oder ganzen Mikroorganismen.

3D-IFA Protokolle sind in ihrem Grundaufbau vergleichbar mit denen von ELISAs mit extrem verkürzter Assayzeit. In Abb. 7 ist ein typisches Protokoll (Bestimmung von Prostata Spezifischen Antigenen) wiedergegeben. Abb. 8, Abb. 9 und Tabelle 1 zeigen die damit erhaltenen Resultate.

ZUBEHÖR

Für die sichere Handhabung und zum Auslesen der ABICAP-Säulen werden von Senova Pipetierständer im 96er Format und zwei Typen von Photometern angeboten. Zusätzlich bietet Senova die benötigten PolyHRP Reagenzien, DSC und gebrauchsfertige Substratlösungen sowie Puffer an.

AUFTRAGSENTWICKLUNG

Die Mitarbeiter von Senova haben langjährige 3D-IFA-Erfahrung. Senova stellt Ihnen diese in Form von Auftragsentwicklungen zur Verfügung.

Dies kann sowohl ausgehend von einem bereits existierenden kundenspezifischen ELISA erfolgen oder die Reagenzienentwicklung einschließen. Senova kann dabei auf ein breites Portfolio von Antikörpern, Antigenen und Standards zurückgreifen, aber auch neuartige Antigene und Antikörper im Kundenauftrag entwickeln. Diese Entwicklungen erfolgen entsprechend dem in Abb. 10 dargestellten Projektschema. In Abhängigkeit von der Ausgangssituation, den technischen Anforderungen und dem gewünschten Projektergebnis erstellen wir Ihnen darauf aufbauend gern ein individuelles Angebot.

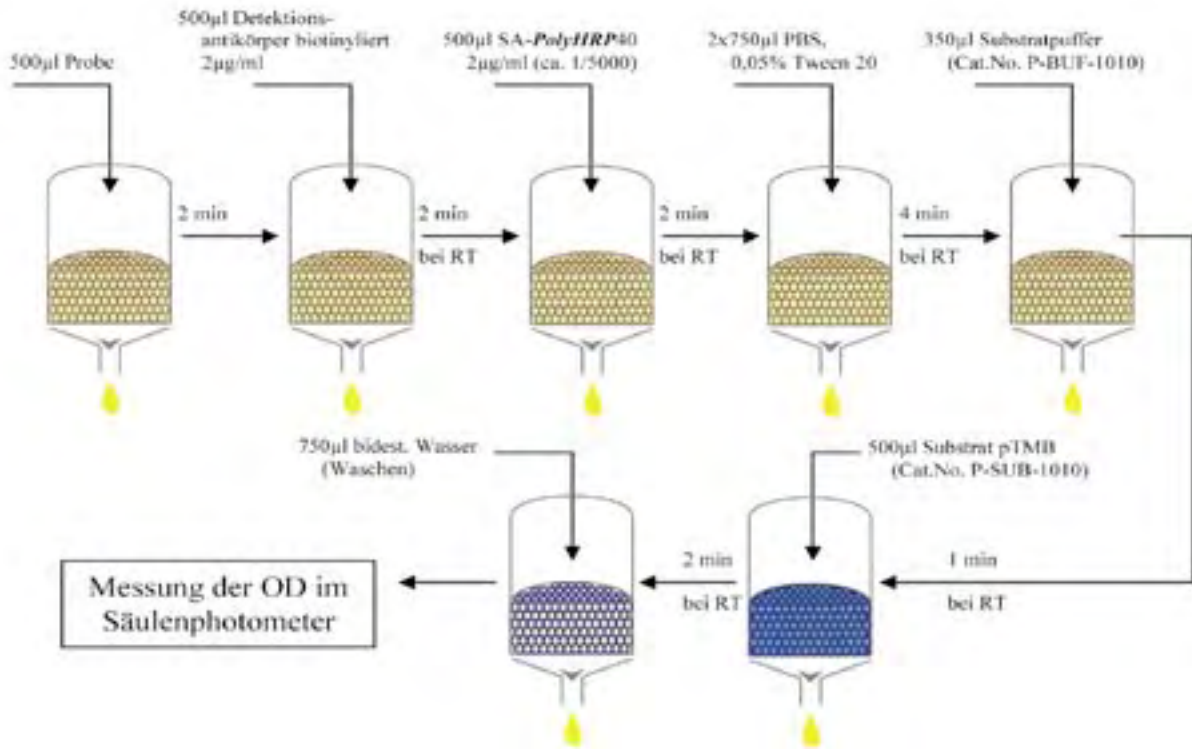


Abb. 7: 3D-IFA am Beispiel PSA

	Mittelwert [ng/ml]	Intra-Assay-VK [%OD]	Intra-Assay-VK [%Konzentration]
Probe 1	0,8	12,2	10,1
Probe 2	2,7	6,3	8,8
Probe 3	6,8	6,0	10,7
Probe 4	15	5,5	16,8

Tabelle 1: Intraassay Variationskoeffizient der 3D-IFA PSA Bestimmung (n=12)

Analyt	Art des Analyten	Einsatzgebiet
Prostata spezifisches Antigen	Serumprotein	Marker für Prostatakrebs
C3a /C5a	Serumproteine	septischer Schock/ Komplementaktivierung
CRP	Serumprotein	Entzündungsmarker / Kardiovask.marker
IgE	Serumprotein	Allergie
anti Tetanus	spezifisches IgG	Serologie, Impfschutz
anti HIV	spezifisches IgG/IgM	Serologie
anti Borrelia	spezifisches IgG/IgM	Serologie, Zeckeninfektion
Adenovirus	Virus	Stuhldiagnostik
Rotavirus	Virus	Stuhldiagnostik
Ebolavirus	Virus	Nachweis in Körperflüssigkeiten
Influenza A/B	Virus	Nachweis in Nasensekret
Hepes Simplex Virus	Virus	Nachweis in Tränenflüssigkeit
Coxiella	Mikroorganismus	Nachweis in Umwelt- /Patientenproben
F.tularensis	Mikroorganismus/ LPS	Nachweis in Umwelt- /Patientenproben
Legionella	Mikroorganismus	Nachweis in Wasserproben
Cotinin	Nikotinmetabolit	Nachweis im Urin von Rauchern

Tabelle 2: Auswahl von 3D-IF Assays mit PolyHRP Detektion

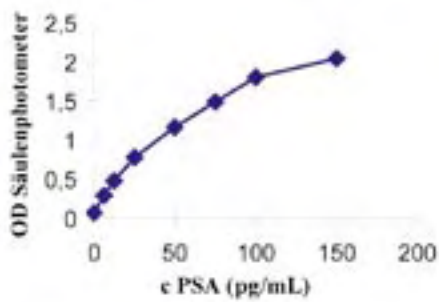


Abb. 8: Typische 3D-IFA-Standardkurve am Beispiel PSA

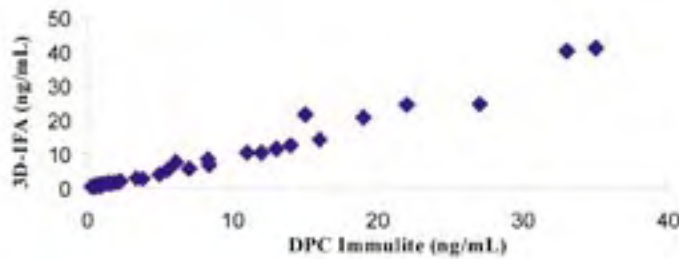
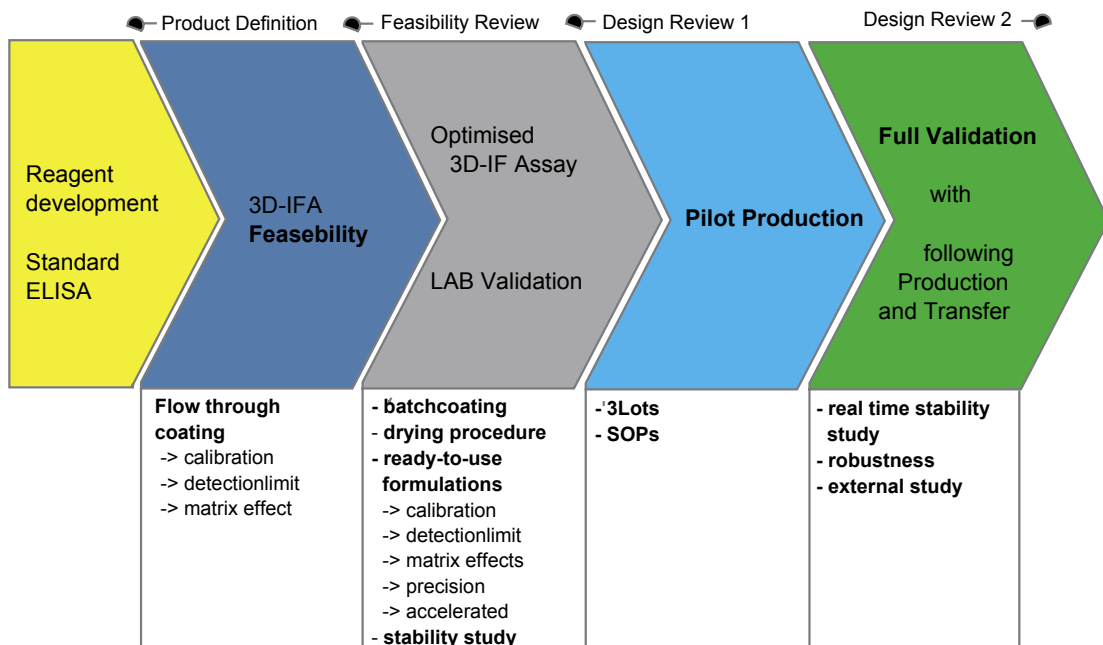


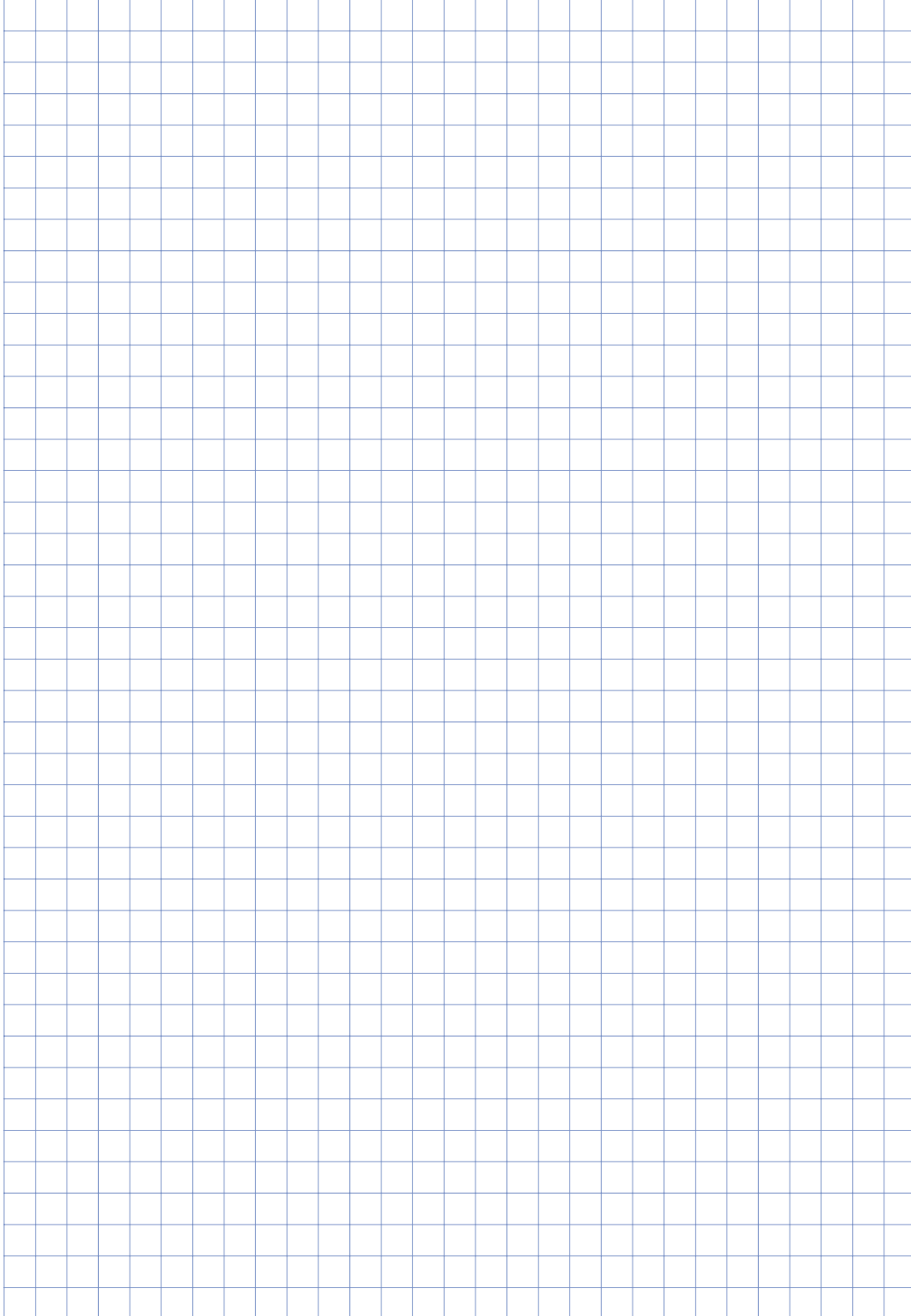
Abb. 9: Korrelation zwischen kommerziellen ELISA (DPC Immulite) und 3D-IFA für die PSA-Bestimmung

Product Idea



LAUNCH

Notes





Entwicklung eines Schnelltests für die Ebola-Virus-Diagnostik



A. LUCHT^{1*}, M. GÖTZ¹, P. MÖLLER², H. FELDMANN²,
S. BECKER², R. GRUNOW¹

¹ Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, Neuherbergstrasse 11, D-80937 München

(* z.Zt. ZlnstBw München, Laborabteilung I, Ingolstädter Landstrasse 102, 85748 Garching-Hochbrück)

² Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg, Robert-Koch-Straße 17, D-35037 Marburg

Einführung

Das Ebolavirus ist ein potentieller biologischer Kampfstoff mit hoher Letalität. In den letzten Jahren haben dramatische Ausbrüche von Ebola-Hämorrhagischem-Fieber in Afrika die Gefährlichkeit von Ebolaviren wiederholt gezeigt. Bislang gibt es weder eine Immunprophylaxe noch eine spezifische Therapie. Deshalb kommt der Früherkennung von Infektionen eine besondere Bedeutung zu. Der Schnelldiagnose stellt jedoch bislang ein diagnostisches Problem dar. Die Spezialdiagnostik ist zeitaufwendig und wenigen Hochsicherheitslaboratorien vorbehalten, da für die Virusanzucht die Einhaltung der Sicherheitsstufe BSL4 erforderlich ist. Für die Diagnostik unter einfachen Bedingungen in den Endemiegebieten, aber auch vor dem Hintergrund der Bedrohung durch Bioterrorismus und biologische Kriegsführung, werden daneben jedoch auch einfach und schnell durchzuführende Tests benötigt.

Zielsetzung

Ziel dieses Projekts war die Nutzung im InstMikroBioBw hergestellter monoklonaler Antikörper (mAk) gegen Ebolavirus zur Entwicklung eines einfachen und feldtauglichen, trotzdem aber sensitiven und spezifischen Schnelltests.



Abb. 1:
Elektronenmikroskopie des Ebolavirus, Originalvergrößerung x 90 000
F.A. Murphy, 1978

Material und Methoden

ABICAP-Säulen der Fa. SENOVA, Jena (3D-Immunofiltrationstechnik) wurden mit dem murinen monoklonalen Ebolavirus-Antikörper 2C4 (20 µg/ml) vorab beschichtet und sind so über Monate lagerbar.

Die eigentliche Durchführung des Tests dauert etwa 30 Minuten und umfasst folgende acht Arbeitsschritte:

- Auftragen von 750 µl Probe (z.B. Serum 1:2 in PBS/0,05% Tween)
- Detektion mit 500 µl biotiniertem Antikörper 5F6 (10 µg/ml)
- Zugabe von 500 µl SA-HRP40 Konjugat
- 2 x Waschen mit 750 µl 0,1% BSA in PBS/0,05% Tween
- Waschen mit 750 µl Citratpuffer (pH 4,9)
- Zugabe von 750 µl TMB-Substrat
- Waschen mit 750 µl Citratpuffer (pH 4,9)
- OD-Messung mit dem ABICAP-Reader bei 500 nm

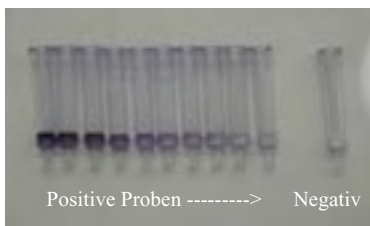


Abb. 2:
ABICAP-Säulen mit Verdünnungsreihe, eine rein visuelle Auswertung ist möglich.
Negative Proben: weiß
Positive Proben: blau



Abb. 3:
ABICAP-Reader zur photometrischen Auswertung (Betrieb mit 9V-Batterie möglich)

Ergebnis:

Dieser Immunfiltrationstest mit ABICAP-Säulen ist eine Weiterentwicklung des auf denselben zwei monoklonalen Antikörpern gegen das virale Strukturprotein VP40 beruhenden Antigen-Capture-ELISAs, der auf dem 33. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Wehrmedizin und Wehrpharmazie 2002 in Potsdam vorgestellt und mittlerweile im Journal of Virological Methods publiziert wurde.

Das Detektionslimit dieses ABICAP-Tests liegt bei einer Antigenverdünnung von mehr als 1:10.000 in den gespikten Serumproben, das entspricht einer Virusmenge von ca. 100 p.f.u./ml. Die Inaktivierung des Serums vor der Testung mit 1% SDS beeinflusst die Sensitivität des Tests nicht negativ (s. Abb. 4).

Die Sensitivität ist im ABICAP deutlich besser als im ELISA, was daran liegt, dass zur Bindung mehr Antikörper eingesetzt werden und durch das Filtrationsprinzip deutlich größere Probenvolumina aufgetragen werden können (s. Abb. 5).

Die Spezifität bleibt durch den Wechsel des Testsystems unverändert, alle vier bekannten Ebolavirus-Spezies (Zaire, Sudan, Ivory Coast und Reston) werden erkannt.

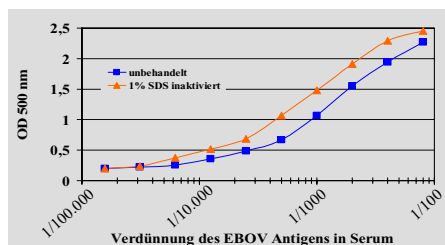


Abb. 4:
Nachweis von Ebolavirus in gespikten Seren, die zum Teil vor der Testung mit 1% SDS behandelt wurden

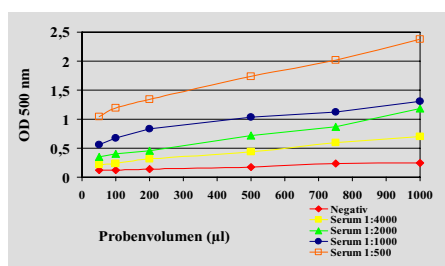


Abb. 5:
Testung von verschiedenen Probenvolumina bei unterschiedlich stark gespikten Seren (übliches Probenvolumen im ELISA 50-100 µl, im ABICAP 750 µl)

Zusammenfassung und Schlußfolgerung

1. Es konnte ein Immunfiltrationstest etabliert werden, der mit Hilfe von murinen monoklonalen Antikörpern gegen das VP40-Strukturprotein alle bekannten Ebolaviren in Serum detektiert.
2. Die Sensitivität dieses Testsystems ist besser als die des vergleichbaren ELISA. Der Test ist von der Handhabung her sehr einfach, er ist schnell, preiswert und benötigt keinen elektrischen Strom, sondern kann mit Batterien betrieben werden.
3. Besonders vorteilhaft ist, dass mit diesem Test inaktivierte Serumproben ohne Sensitivitätsverlust untersucht werden können. Das ermöglicht Laboruntersuchungen bei Verdacht auf Ebola-Hämorrhagisches-Fieber auch unter Routinebedingungen oder im Feld, ohne dass ein Sicherheitslabor erforderlich wäre.