

Master-Abschlussarbeit:

Thema:

Entwicklung eines BIOCHIP basierten Multiparameter-Tests zum monospezifischen Nachweis anti-neutrophiler cytoplasmatischer Antikörper

Zusammenfassung:

Anti-neutrophile cytoplasmatische Antikörper (ANCA) sind Autoantikörper, die sich gegen Bestandteile neutrophiler Granulozyten richten. Sie gelten als wichtige Biomarker bei der Diagnose von Autoimmunerkrankungen wie ANCA-assoziierten Vaskulitiden (AAV). AAV können zur Schädigung lebenswichtiger Organe wie den Nieren oder der Lunge führen. Bei einer Organbeteiligung sterben bis zu einem Viertel aller Patienten innerhalb der ersten 6 Monate. Bei einem Drittel der Patienten sind die Organschäden irreversibel. Eine schnelle und möglichst differenzierte Methode zum Nachweis dieser serologischen Marker hat daher hohe Priorität.

Die wichtigsten Zielantigene der ANCA sind Myeloperoxidase (MPO), Proteinase 3 (PR-3), das Bakterien-permeabilisierende Protein (BPI), Kathepsin G (CatG), humane Leukozyten Elastase (HLE) und Laktoferrin (Lf).

In der klinischen Diagnostik werden ANCA mit einem indirekten Immunfluoreszenztest (IIFT) und einem monospezifischen Bestätigungstest (ELISA) nachgewiesen. Automatisierungslösungen ermöglichen die Abarbeitung einer Kombination aus einem IIFT sowie einem monospezifischen Nachweis für MPO und PR-3 oder einzelner Nachweise von den ANCA-Zielantigenen mittels ELISA.

Im Rahmen dieser Masterarbeit wurde eine neuartige Methode zum gleichzeitigen, monospezifischen Nachweis der sechs ANCA-Parameter BPI, CatG, HLE, Lf, MPO und PR-3 entwickelt. Neben der Herstellung eines solchen Nachweises auf Objektträgern (OT) wurde die Möglichkeit zur Abarbeitung eines IIFT in Mikrotiterplatten (MTP) untersucht, wodurch ein zusätzlichen Bestätigungstest mittels ELISA unnötig sein würde.

Die Methoden zur Herstellung sowie die Möglichkeiten zur Bildaufnahme und Auswertung dieses Nachweises wurden in der vorliegenden Masterarbeit etabliert. Hierzu wurde das Verhalten der Antigene in verschiedenen Konzentrationen und Puffern sowie das Fluoreszenzverhalten verschiedener Farbstoffe bei der Bildaufnahme und Auswertung untersucht. Die Leistungsfähigkeit wurde mit 86 humanen Serumproben evaluiert.

Es konnte aufgezeigt werden, dass die Entwicklung der neuen Nachweismethode erfolgreich war. Sowohl auf Objektträgern als auch in Mikrotiterplatten konnten ANCA in humanen Serumproben nachgewiesen werden. Das System zur Bildaufnahme der MTP weist dabei Antigen-abhängig eine leicht geringere Sensitivität auf als der Nachweis mit OT. Einzelnen Parameter müssen weiter optimiert und weitere Studien mit einem größeren Probenumfang zur Evaluierung durchgeführt werden.

Durch die Nachweismethode konnten sechs verschiedene ANCA innerhalb eines Ansatzes gleichzeitig nachgewiesen werden, wodurch die Möglichkeit besteht durch die Automatisierbarkeit sowohl Zeit als auch Material einzusparen und einen hohen Probendurchsatz zu gewährleisten.