



Technische Universität München

Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie
Lehrstuhl für Analytische Chemie

**Entwicklung, Charakterisierung und Anwendung eines optischen
Immunosensors zur Bestimmung von Procalcitonin in humanem
Plasma und Vollblut**

Daniela Rascher

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende(r): Univ.-Prof. Dr. Lukas Hintermann
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Reinhard Nießner
2. apl. Prof. Dr. Anton Hartmann
Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 24.11.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie am 16.12.2014 angenommen.

„Around here, however, we don't look backwards for very long. We keep moving forward, opening up new doors and doing new things, because we're curious - and curiosity keeps leading us down new paths.“

– Walt Disney

Wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits in Fachzeitschriften veröffentlicht:

Rascher D, Geerlof A, Kremmer E, Kramer P, Michael S, Hartmann A, Rieger M (2014) Total internal reflection (TIRF)-based quantification of procalcitonin for sepsis diagnosis - A point-of-care testing application. *Biosensors & Bioelectronics* 59:251-258.

doi:10.1016/j.bios.2014.03.052

Rieger M, Kochleus C, Teschner D, Rascher D, Barton A, Geerlof A, Kremmer E, Schmid M, Hartmann A, Gehlen H (2014) A new ELISA for the quantification of equine procalcitonin in plasma as potential inflammation biomarker in horses. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*:1-6.

doi:10.1007/s00216-014-7944-z

Kurzfassung

Sepsis gehört nach wie vor zu den häufigsten Todesursachen auf Intensivstationen. Um die hohe Sterblichkeitsrate zu reduzieren, ist eine schnelle und sichere Diagnose nötig, wie es der Bereich des Point-of-Care-Testing (POCT) gewährleistet. In diesem Zusammenhang gilt Procalcitonin (PCT) als vielversprechendster Marker, der zuverlässig zwischen einer Sepsis und einem systemischen inflammatorischen Response-Syndrom (SIRS) unterscheiden und zur Verlaufskontrolle der Krankheit bzw. zur Kontrolle der Therapie eingesetzt werden kann. Die bisherigen Nachweismethoden entsprechen nicht den POCT-Kriterien. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein neuer, sensitiver Fluoreszenz-Immunoassay (FIA) für eine Anwendung auf einem TIRF (*total internal reflection fluorescence*)-basierenden POCT-Gerät entwickelt. In diesem Rahmen wurden weiterhin beide nativen Formen des humanen PCTs (hPCT) rekombinant hergestellt zur Verwendung als Standard.

Im ersten Schritt wurde ein Sandwich-ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) mit neu entwickelten monoklonalen Antikörpern (mAk) gegen hPCT entwickelt. Dieser wurde auf das POCT-Gerät im FIA-Format übertragen und erfüllte alle wichtigen Kriterien einer POCT-Anwendung. Dazu wurde zuerst ein Screening zur Identifikation des geeignetsten Ak-Paares durchgeführt und unspezifische Anbindung durch die Zugabe von passenden Substanzen verhindert. Weiterhin wurde die Reproduzierbarkeit der Messungen zwischen verschiedenen Geräten und Cartridgechargen getestet. Mit dem optimierten Assay wurden Standardkurven in humanem EDTA-Plasma und humanem Vollblut erstellt. Der Assay erreichte jeweils eine Nachweisgrenze von 0,04 ng/mL bzw. 0,02 ng/mL und eine Bestimmungsgrenze von 0,12 ng/mL bzw. 0,09 ng/mL. Dies entspricht den Anforderungen, um sicher zwischen gesunden und kranken Personen zu unterscheiden. Der gezeigte Assay ist, nach Kenntnisstand, der erste in Vollblut anwendbare Nachweis und zeigt zusätzlich die nötige Sensitivität. Anschließend wurde der entwickelte Assay mit Patientenproben validiert. Im Vergleich mit dem Goldstandard Kryptor[®] (Brahms) konnte eine sehr gute Korrelation von R^2 zwischen 0,94 und 0,99 für verschiedene Probensets und Fänger-Ak erzielt werden (n=8-25). Da Sepsis auch in der Veterinärmedizin eine der häufigsten Todesursachen darstellt und hPCT und equines PCT (ePCT) eine hohe Homologie in der Aminosäuresequenz aufweisen, wurde der entwickelte Sandwich-ELISA für ePCT angepasst. Zwischen hPCT und ePCT ergab sich eine Kreuzreaktivität von 409. Als Standard wurde erstmals ePCT rekombinant in einer Kooperation hergestellt. Der Assay zeigte einen Arbeitsbereich von 25-1000 ng/mL, Intra-Assay- und Inter-Assay-Variationskoeffizienten lagen je unter 15%. Weiterhin zeigte eine erste Untersuchung mit septischen und gesunden Pferden einen signifikanten Unterschied ($P = 0,0006$) in der mittleren PCT-Konzentrationen der gesunden im Vergleich zu den kranken Pferden.

Abstract

Sepsis is still one of the most common causes of death in intensive care units. To reduce the high mortality rate a fast and reliable diagnosis is required, a point ensured in the field of Point-of-Care Testing (POCT). In this context Procalcitonin (PCT) is one of the most promising markers. It distinguishes reliably between sepsis and systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and can be used for monitoring the state of the illness and the usefulness of the therapy. None of the current detection systems for PCT fulfills the conditions of a POCT application. Therefore, the aim of this study was to develop a new and highly sensitive fluorescence immunoassay (FIA) for the measurement of PCT with a TIRF (total internal reflection fluorescence) based POCT device. In addition, human recombinant PCT (hrPCT) used as a standard was developed in the native forms of hPCT.

First a Sandwich-ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) was developed with new monoclonal antibodies (mAb) targeting hPCT. This assay was transferred to the POCT device in a FIA format and fulfilled all necessary conditions of a POCT application. A screening was done to identify the most proper Ab pair and unspecific binding was inhibited by adding appropriate substances. Furthermore reproducibility of measurements between different devices and different batches of cartridges was tested. Standard curves in human EDTA plasma and whole blood were performed. The assay achieved a limit of detection of 0.04 ng/mL and 0.02 ng/mL, respectively, and a limit of quantification of 0.12 ng/mL and 0.09 ng/mL, respectively. These results fit the requirements for distinguishing between healthy and ill persons. According to literature, this assay is the first assay applicable in whole blood and also shows the necessary sensitivity. Afterwards the developed assay was validated with patient samples. The assay showed a good correlation to the standard assay Kryptor® (Brahms) with R^2 between 0.94 and 0.99 for different sets of samples and capture Ab (n = 8-25).

As sepsis is also one of the most common causes of death in the veterinary medicine and hPCT and equine PCT (ePCT) show a high homology in the amino acid sequence, the developed Sandwich-ELISA was adapted to ePCT. The assay showed a cross reactivity of 409 between hPCT and ePCT. In a cooperation ePCT was developed as a recombinant protein for use as a standard for the first time. The assay showed a working range of 25-1000 ng/mL, the intra assay and inter assay coefficients of variation were below 15 %. Moreover a first study with septic and healthy horses showed a significant difference (P = 0.0006) in the mean PCT concentration of healthy horses in comparison to the septic group.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen.....	V
Verzeichnis der Tabellen.....	XI
Abkürzungsverzeichnis	XIII
1 Einleitung und Zielsetzung der Arbeit.....	1
1.1 Bakterielle Infektionen und Sepsis beim Menschen	1
1.2 Bakterielle Infektionen und Sepsis beim Pferd	4
2 Theoretischer Hintergrund	7
2.1 Procalcitonin	7
2.1.1 <i>Das Protein</i>	7
2.1.2 <i>Der Sepsismarker</i>	9
2.1.3 <i>Bestimmung von humanem PCT</i>	12
2.1.4 <i>PCT beim Pferd</i>	16
2.2 Immunochemische Analysemethoden.....	17
2.2.1 <i>Antikörper als Erkennungselement in immunochemischen Analysemethoden</i>	17
2.2.2 <i>Oberflächenplasmonenresonanzmessung zur Charakterisierung eines Antikörpers</i>	20
2.2.3 <i>Enzym-gekoppelter Immunnachweis (ELISA)</i>	22
2.2.4 <i>Mögliche Störfaktoren eines Immunoassays</i>	26
2.3 Biosensoren für Point-of-Care-Testing (POCT).....	28
2.3.1 <i>Point-of-Care-Testing: Patientennahe Labordiagnostik</i>	29
2.3.2 <i>Biosensoren</i>	30
2.3.2.1 <i>Definition und Aufbau</i>	30
2.3.2.2 <i>Totale Interne Reflexionsfluoreszenz (TIRF) als Beispiel optischer Detektion</i>	31
2.3.3 <i>Respons® IQ</i>	33
3 Ergebnisse und Diskussion.....	39
3.1 Entwicklung des ELISA zur Detektion von hPCT	39
3.1.1 <i>Auswahl der Antikörper für den ELISA</i>	39

3.1.1.1	<i>Antikörper-Screening und 2-dimensionale Titration.....</i>	39
3.1.1.2	<i>Antikörper-Charakterisierung durch SPR-Messung mittels Biacore®.....</i>	42
3.1.2	<i>ELISA Entwicklung für humanes PCT.....</i>	47
3.1.2.1	<i>Optimierung des hPCT-ELISAs.....</i>	47
3.1.2.2	<i>Charakterisierung des hPCT-ELISAs.....</i>	49
3.1.3	<i>Herstellung von rekombinanten humanen PCT für die Verwendung als Standard.....</i>	52
3.1.3.1	<i>Vergleich mit kommerziell erhältlichem humanen rekombinanten PCT... </i>	53
3.1.3.2	<i>Lagerstabilität des hrPCT1-116.....</i>	58
3.2	<i>ELISA-Entwicklung für equines PCT.....</i>	61
3.3	<i>Entwicklung des PCT-Assay für eine POCT-Anwendung auf dem Analysegerät respons® IQ.....</i>	66
3.3.1	<i>Antikörper Screening.....</i>	66
3.3.2	<i>Optimierung des PCT-Assays.....</i>	70
3.3.2.1	<i>Zusätze gegen unspezifische Anbindung.....</i>	71
3.3.2.2	<i>Optimierung der Basislinie.....</i>	78
3.3.3	<i>Reproduzierbarkeit der Messungen.....</i>	79
3.3.3.1	<i>Vergleichbarkeit von Messungen mit verschiedenen Geräten.....</i>	79
3.3.3.2	<i>Reproduzierbarkeit bei der Cartridgeherstellung und der Herstellung der Detektorlösungen.....</i>	80
3.3.4	<i>Standardkurven.....</i>	83
3.3.4.1	<i>Humanes EDTA-Plasma.....</i>	83
3.3.4.2	<i>Humanes EDTA-Vollblut.....</i>	86
3.3.5	<i>Validierung mit Patientenproben.....</i>	88
3.3.6	<i>Messbereichserweiterung.....</i>	98
3.3.7	<i>Vergleich des entwickelten PCT-Assays mit den bisher bekannten Messsystemen.....</i>	104
4	<i>Zusammenfassung und Ausblick.....</i>	107
5	<i>Material und Methoden.....</i>	111
5.1	<i>Verwendete Geräte.....</i>	111

5.2	Software	112
5.3	Verbrauchsmaterialien	113
5.4	Chemikalien und Reagenzien	114
5.5	Immunoreagenzien, Plasmen/Seren und Patientenproben	116
5.6	Puffersysteme und Lösungen für immunochemische Methoden	118
5.7	ELISA	119
5.7.1	<i>Bestimmung der Antikörper für den Einsatz im Sandwich-ELISA</i>	119
5.7.1.1	<i>Antikörper Screening und 2-dimensionale Titration</i>	119
5.7.1.2	<i>Antikörper-Charakterisierung durch SPR-Messung mit dem Biacore®</i> ...	122
5.7.2	<i>Sandwich-ELISA für humanes rekombinantes PCT (hrPCT)</i>	125
5.7.2.1	<i>Standardprozedur des Sandwich-ELISAs</i>	125
5.7.2.2	<i>Charakterisierung</i>	126
5.8	Equines rekombinantes PCT (erPCT)	127
5.8.1	<i>Standardprozedur</i>	127
5.8.2	<i>Charakterisierung</i>	128
5.9	Respons® IQ-System	128
5.9.1	<i>Ablauf der Messung</i>	129
5.9.2	<i>Antikörper-Screening</i>	130
5.9.3	<i>Optimierung</i>	130
5.9.4	<i>Erstellen der Standardkurven</i>	131
5.9.5	<i>Patientenproben</i>	132
6	Literatur	133

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1 Bildung und proteolytische Spaltung des PCTs unter normalen Stoffwechselbedingungen: Das vom Calc-I Gen codierte Preprocalcitonin besitzt zusätzlich ein 25 AS langes hydrophobes Signalpeptid; das PCT wird selbst in drei verschiedene Fragmente unterteilt, den N-terminalen Bereich, das eigtl. Hormon Calcitonin und Katalcalcin (nach [42]).....	8
Abbildung 2 Anstieg der Plasma-PCT-Konzentration und das damit korrelierte Krankheitsstadium (nach [42]).....	10
Abbildung 3 AS-Sequenzen des humanen und equinen Preprocalcitonins und deren Übereinstimmung; grau = Signalsequenz des prePCTs, rot = N-terminaler Bereich, blau = Calcitonin; schwarz = Katalcalcin; erstellt mit ClustalW2 (nach [90]).....	17
Abbildung 4 Schematischer Aufbau eines Antikörpers, in diesem Fall eines Immunglobulin G-Moleküls; Fab = <i>fragment antigen binding</i> ; Fc = <i>fragment constant</i> (nach [91]).....	18
Abbildung 5 Prinzip der SPR-Messung mit der Kretschmann-Konfiguration (nach [91,96]); n_1, n_2 = Brechungsindex.....	22
Abbildung 6 Vergleich von Coating-Antigen-Format A) und Sandwich-ELISA B).....	24
Abbildung 7 Oxidation des TMBs; angegeben ist das Absorptionsmaximum des jeweiligen Moleküls [103].....	25
Abbildung 8 Schematische Darstellung verschiedener Störeffekte (nach [91]); a) Unbeeinflusster Assay; b) unspezifische Bindung des markierten Detektor-Ak an den Boden der Mikrotiterplatte (falsch positives Signal); c) Verknüpfung des Fänger-Ak mit dem Detektor-Ak aufgrund eines heterophilen Ak, HAAA oder einer anderen Störsubstanz (falsch positives Signal); d) Blockierung der Ag-Bindungsstelle durch einen heterophilen Ak, HAAA oder einer anderen Störsubstanz (falsch negatives Signal), c) Maskierung des Epitops des Analyten durch eine Störsubstanz (falsch negatives Signal).....	28
Abbildung 9 Aufbau eines Biosensors (nach [119,120])	31
Abbildung 10 Prinzip der Totalreflexion und des evaneszenten Feldes: blau = nicht angeregt, orange = angeregt (nach [114,122]).....	32

Abbildung 11 Das POCT-Analysesystem respons® IQ; während der Entwicklungsphase wird das Gerät extern über einen Computer gesteuert, um verschiedenen Parameter der Messung überprüfen zu können (rechtes Bild); später ist zur Steuerung nur noch das bereits integrierte Display zu verwenden	33
Abbildung 12 Aufsicht auf A) die ganze Cartridge; B) die Cartridge ohne Deckel; gekennzeichnet sind die einzelnen Bereiche.....	34
Abbildung 13 Schema des Messprinzips des respons® IQ	37
Abbildung 14 Schema des Scannen und des zeitabhängigen Fluoreszenzsignalanstiegs (zur Verfügung gestellt von pes diagnosesysteme GmbH, Markkleeberg, Deutschland)	38
Abbildung 15 Versuche zur Regenerierung; links: RU der Basislinie nach der Regenerierung; rechts: erhaltener response level der Belegung; A) 10 mM Glycin, pH 3,0; B) 10 mM Glycin, pH 2,5; C) 10 mM Glycin, pH 2,0; D) 10 mM Glycin, pH 1,5; E) 4 mM MgCl ₂	44
Abbildung 16 Surface-Performance-Test mit dem CALCA 4F6; links: RU der Basislinie über mehrere Läufe; rechts: erhaltener <i>response level</i> über mehrere Läufe	45
Abbildung 17 Sensorgramm verschiedener PCT-Konzentrationen; grün = 31,25 nM, rot = 62,5 nM; lila = 125 nM, blau = 250 nM, dunkelgrün = 500 nM	46
Abbildung 18 Hintergrundsignale der getesteten Blockreagentien; MP = Magermilchpulver; alt = alte Charge, neu = neue Charge; m = 48	48
Abbildung 19 Beispiel einer Standardkurve erstellt mit dem Ak-Paar CALCA 3C5/CALCA 4F6-B und PCT1-116 als Standard; n = 11; m = 3.....	50
Abbildung 20 Vergleich zweier hrPCT-Chargen von Prospec auf derselben Mikrotiterplatte, Ak-Paar CALCA 3C5/CALCA 4F6-B; n = 11; m = 4	54
Abbildung 21 Vergleich zweier Chargen des intern hergestellten GAM-PCTs, Ak-Paar CALCA 3C5/CALCA 4F6-B in PBS-Puffer; n = 11; m = 4.....	55
Abbildung 22 Vergleich der intern hergestellten hrPCTs, Ak-Paar CALCA 3C5/CALCA 4F6-F20; schwarz = PCT 1-116, rot = PCT 3-116, Blau = GAM-PCT, pink = M-PCT; A) in PBS-Puffer; B) in humanem EDTA-Plasma; n = 11, m = 2	56

Abbildung 23 Vergleich der zwei kommerziell erhältlichen hrPCT1-116 von HyTest und Prospec mit dem intern hergestellten; Ak-Paar CALCA 3C5/CALCA 4F6-B in humanem EDTA-Plasma; n = 11; m = 2-3	58
Abbildung 24 Lagerstabilität von PCT1-116 in Kühlschrank (K) bzw. Gefrierschrank (G) über einen Zeitraum von 28 Tagen	60
Abbildung 25 Box-Plot von equinen Plasmapatientenproben; der Median ist durch die gestrichelte Linie gekennzeichnet	65
Abbildung 26 Signalanstiege der einzelnen Scans von verschiedenen Plasmaeinzelspenden an den jeweiligen Fängerstreifen; grün = geringe Anbindung, gelb = leichte Anbindung, orange = mittlere Anbindung, lachs = starke Anbindung, rot = starke Anbindung an murinen Fänger-Ak	72
Abbildung 27 Ergebnisse zur Reduzierung unspezifischer Anbindung an die Fängerstreifen; m = 3.....	75
Abbildung 28 Reduzierung der unspezifischen Anbindung in verschiedenen Plasmapools; das + markiert die Proben mit 20 µg/mL Ratten-Ak und 1% Ziegenserum; angegeben ist die prozentuale Signalreduzierung; m = 3.....	76
Abbildung 29 Sensorgramm einer Beispielmessung mit dem Detektor-Ak CALCA 3C5-F; es ist die unspezifische Anbindung zwischen den Streifen auf der Cartridgeoberfläche in humanem EDTA-Vollblut mit dem Fänger-Ak CALCA 3C5-F dargestellt (roter Kasten); die Fänger-Ak sind im Diagramm über ihrer Position vermerkt	77
Abbildung 30 Ergebnisse zur Reduzierung unspezifischer Anbindung an die Fängerstreifen bei humanem EDTA-Vollblut; m = 3	78
Abbildung 31 Einfluss der Blockierlösung auf den Basislinienabfall; die grünen Scans wurden mit equinem Plasma ohne Blockierlösung aufgenommen, die blauen Scans mit equinem Plasma und Verwendung von Blockierlösung	79
Abbildung 32 Vergleich identischer Proben mit zwei verschiedenen Geräten des respons® IQ; m = 3.....	80
Abbildung 33 Reproduzierbarkeit der Cartridgeproduktion; Ak-Paar PCT 27A3/CALCA 3C5-F	81

Abbildung 34 Reproduzierbarkeit bei der Herstellung der Detektorlösungen; Ak-Paar PCT 27A3/CALCA 3C5-F.....	82
Abbildung 35 Standardkurve mit humanem EDTA-Plasma mit dem Ak-Paar CALCA 4F6/CALCA 3C5-F: Gezeigt ist das addierte Signal der drei Fängerstreifen; für eine bessere Ansicht sind die geringen Konzentrationen noch einmal vergrößert in der rechten unteren Ecke eingefügt; LOD = 0,04 ng/mL, LOQ = 0,12 ng/mL.....	84
Abbildung 36 Standardkurve mit humanem EDTA-Plasma mit dem Ak-Paar PCT 6F10/CALCA 3C5-F: Gezeigt ist das addierte Signal der drei Fängerstreifen; für eine bessere Ansicht sind die geringen Konzentrationen noch einmal vergrößert in der rechten unteren Ecke eingefügt; LOD = 0,11 ng/mL, LOQ = 0,21 ng/mL.....	85
Abbildung 37 Standardkurve mit humanem EDTA-Vollblut mit dem Ak-Paar CALCA 4F6/CALCA 3C5-F: Gezeigt ist das addierte Signal der drei Fängerstreifen; für eine bessere Ansicht sind die geringen Konzentrationen noch einmal vergrößert in der rechten unteren Ecke eingefügt; LOD = 0,02 ng/mL, LOQ = 0,09 ng/mL.....	86
Abbildung 38 Vergleich von Standardkurven mit humanem EDTA-Plasma und humanem EDTA-Vollblut (VB) mit dem Ak-Paar CALCA 4F6/CALCA 3C5-F: Gezeigt ist das addierte Signal der drei Fängerstreifen; für eine bessere Ansicht sind die geringen Konzentrationen noch einmal vergrößert in der rechten unteren Ecke eingefügt	88
Abbildung 39 Erstes Screening der Fänger-Ak mit Patientenproben; v=verdünnt 1:10 mit 0-Plasma; m = 1-3; die roten Pfeile markieren die Proben, die bei den Fängern-Ak PCT 27A3 und PCT 42 niedrigere Signalintensitäten im Vergleich zu den anderen Patientenproben ergaben als bei den Fänger-Ak CALCA 4F6 und PCT 6F10 (Plasma: 0,48 ng/mL dunkelblau; Plasma: 1,99 ng/mL orange).....	91
Abbildung 40 Korrelation zwischen den mit dem Kryptor [®] -System von Brahms gemessenen PCT Konzentrationen in Patientenproben und den erhaltenen Signalen des respons [®] IQ; A) CALCA 4F6/CALCA 3C5-F; B) PCT 6F10/CALCA 3C5-F	92
Abbildung 41 Berechnete Residuen für die Messungen der Patientenproben; die x-Achse entspricht den angegebenen PCT-Konzentrationen der einzelnen Proben; A) Fänger-Ak CALCA 4F6, n = 26, m = 1-3; B) Fänger-Ak PCT 6F10, n = 30, m = 1-3.....	94
Abbildung 42 Korrelation bei Patientenproben mit niedrigen PCT-Konzentrationen; A) CALCA 4F6/CALCA 3C5-F: Eine gute Korrelation bei PCT-konzentrationen bis 9 ng/mL ohne die	

Probe mit 6 ng/mL PCT; B) PCT 6F10/CALCA 3C5-F: Eine gute Korrelation der Patientenproben ohne der Proben des fzb über 6 ng/mL PCT	96
Abbildung 43 Korrelationen der Patientenproben aufgeteilt nach Herkunft; A) CALCA 4F6/CALCA 3C5-F; B) PCT 6F10/CALCA 3C5-F.....	97
Abbildung 44 Korrelation der Patientenproben für das Ak-Paar PCT 22A11/CALCA 3C5-F; zur Veranschaulichung sind die Konzentrationen bis 2,5 ng/mL PCT im rechten unteren Eck vergrößert dargestellt.....	99
Abbildung 45 Korrelation der Patientenproben bis 2,5 ng/mL PCT für das Ak-Paar PCT 22A11/CALCA 3C5-F.....	100
Abbildung 46 Signalanstiege mit verschiedenen hrPCTs bei verschiedenen Fänger-Ak; A) CALCA 4F6 und PCT 22A11; B) PCT 6F10 und PCT 22A11; HMGU = intern hergestelltes PCT, P = Prospec; H = HyTest, Brahms = Brahms-Kalibrator für den Kryptor®; P13/P19 = Patientenproben; m = 3.....	101
Abbildung 47 Relative Signalanstiege mit verschiedenen hrPCTs bei verschiedenen Fänger-Ak; A) CALCA 4F6 und PCT 22A11; B) PCT 6F10 und PCT 22A11; HMGU = intern hergestelltes PCT, P = Prospec; H = HyTest, Brahms = Brahms-Kalibrator für den Kryptor®; P13/P19 = Patientenproben.....	103
Abbildung 48 Plattenaufbau zur 2-dimensionale Titration.....	121
Abbildung 49 Aminkopplung des Sekundärantikörpers auf die Oberfläche des CM5 Chips	123
Abbildung 50 Einzelnes Sensorgramm zur Kinetikmessung; A) Laufpuffer; B) Anti-PCT-AK; C) Dissoziation; D) PCT-Assoziation; E) PCT-Dissoziation, F) Regenerierung; G) Stabilisierung	124

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1 Definition und Kriterien der ACCP/SCCM [6,8,9]	2
Tabelle 2 Charakteristiken der kommerziell erhältlichen PCT-Assays, zusammengestellt nach [42,78].....	13
Tabelle 3 Belegungen der Cartridges; PK = Positivkontrolle; NK = Negativkontrolle	35
Tabelle 4 Bindungsregionen der neu entwickelten mAk; 0 = keine Bindung; + = Bindung (mündliche Information, Elisabeth Kremmer, 2011);.....	40
Tabelle 5 Vorscreening der neuen PCT-Ak gegeneinander; 0 = kein Signal; + bis ++++ niedriges bis hohes Signal (mündliche Information Elisabeth Kremmer, 2011).....	41
Tabelle 6 Screening der besten Ak-Kombinationen mit den ermittelten Ak-Konzentrationen; -- nicht getestet; + bis +++ geringes bis hohes Signal	42
Tabelle 7 Bindungskonstanten der gemessenen Antikörper.....	47
Tabelle 8 Zusammenfassung der Ergebnisse der Assay-Charakterisierung; die Ergebnisse der Platte 1 sind mit I gekennzeichnet, die der Platte 2 mit II; angegeben ist der Mittelwert (MW) ± StabW.S.....	51
Tabelle 9 Zusammenfassung der intern hergestellten und der kommerziell erhältlichen hrPCTs	52
Tabelle 10 Zusammenfassung der IC ₅₀ -Werte in [mol/mL] der intern hergestellten hrPCTS in PBS-Puffer und humanem EDTA-Plasma.....	57
Tabelle 11 Zusammenfassung der Ergebnisse zum Versuch zur Lagerstabilität von PCT1-116, K = Kühlschrank, G = Gefrierschrank; aufgeführt ist der MW einer Dreifachmessung ± Standardabweichung	59
Tabelle 12 Zusammenfassung der Ergebnisse der Assay-Charakterisierung; die Ergebnisse der Platte 1 sind mit I gekennzeichnet, die der Platte 2 mit II, die der Platte 3 mit III; angegeben ist der Mittelwert (MW) ± StabW.S	63
Tabelle 13 Übersicht der Bindungsregionen der getesteten mAk gegen hPCT	67

Tabelle 14 Ergebnisse Gruppe 1 im Screening 1 (Fänger-Ak: Calcitonin/Katacalcin; Detektions-Ak: N-terminale Region)	68
Tabelle 15 Ergebnisse Gruppe 2 im Screening 1 (Fänger-Ak: N-terminal; Detektor-Ak: Calcitonin/Katacalcin).....	69
Tabelle 16 Fänger- und Detektions-Ak für Screening 2.....	70
Tabelle 17 Ergebnisse für Screening 2	70
Tabelle 18 Zusammenstellung der gemessenen Patientenproben; p = pur, v = verdünnt; fzmb = Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie, Graz	89
Tabelle 19 Antikörperkombinationen für den Einsatz im ELISA, kursiv = bereits veröffentlichtes Paar [22]	120

Abkürzungsverzeichnis

ACCP/SCCM	<i>American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine</i>
Ag	Antigen
AHL	Acetyl-Homoserin-Lacton
Ak	Antikörper
mAk	Monoklonaler Antikörper
pAk	Polyklonaler Antikörper
AS	Aminosäure
-B	biotinyliert
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
CR	Kreuzreaktivität (<i>cross reactivity</i>)
CRP	C-reaktives Protein
Da, kDa	Dalton, Kilodalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
Fc	<i>fragment constant</i>
FIA	Fluoreszenzimmunoassay

fzmb	Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie
HAAA	<i>human anti-animal antibody</i>
HAMA	<i>human anti-mouse antibody</i>
HBS-EP	HEPES gepufferte Lösung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horse radish peroxidase</i>)
IaA-CV	Intra-Assay-Variationskoeffizient (<i>intra assay coefficient of variation</i>)
IeA-CV	Inter-Assay-Variationskoeffizient (<i>inter assay coefficient of variation</i>)
IC ₅₀	Testmittelpunkt der Standardkurve
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IUPAC	<i>International Union for Pure and Applied Chemistry</i>
LOD	Nachweisgrenze (<i>limit of detection</i>)
LOQ	Bestimmungsgrenze (<i>limit of quantification</i>)
LPS	Lipopolysaccharide, bakterielle Endotoxine
m	Anzahl der Wiederholungen
M _R	relative Molekülmasse
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
n	Anzahl der Konzentrationen
NaCl	Natriumchlorid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OD	Optische Dichte

PaCO ₂	Partialdruck des Kohlenstoffdioxids
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBST	PBS mit 0,05% (v/v) Tween 20
PCT	Procalcitonin
ePCT	equines PCT
erPCT	equines rekombinantes PCT
hPCT	humanes PCT
hrPCT	humanes rekombinantes PCT
RIA	Radioimmunoassay
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RU	Resonanz-Einheit (<i>resonance unit</i>)
RT	Raumtemperatur
SIRS	Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz (<i>surface plasmon resonance</i>)
TAT	<i>turn-around-time</i>
TIRF	Interne Totalreflexionsfluoreszenz (<i>total internal reflection fluorescence</i>)
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
U/min	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumenanteil
w/v	Massenkonzentration in %
WBC	Weiße Blutkörperchen (<i>white blood cells</i>)
WR	Arbeitsbereich (<i>working range</i>)

1 Einleitung und Zielsetzung der Arbeit

1.1 *Bakterielle Infektionen und Sepsis beim Menschen*

Mit fast 155000 erwarteten Neudiagnosen einer Sepsis oder schweren Sepsis und einer Sterblichkeitsrate von 55 % bei schwerer Sepsis ist diese Erkrankung die dritthäufigste Todesursache in Deutschland [1,2]. Einer Studie des Deutschen Kompetenznetzes Sepsis zufolge sterben täglich durchschnittlich 154 Menschen in Deutschland an einer Sepsis [2], die umgangssprachlich auch als Blutvergiftung bezeichnet wird. In einer Studie in den USA von Martin et al. über eine Dauer von 22 Jahren zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Sepsisfälle um 8,7 % mit einer steigenden Anzahl an Todesfällen [3]. Gründe für diesen Anstieg können u.a. der steigende Gebrauch von Immunsuppressiva und die steigende Anzahl von Antibiotikaresistenzen aufgrund von Antibiotikaüberdosierung sein. Vincent et al. untersuchten die Häufigkeit von Sepsis in europäischen Intensivstationen. Hier ergab sich, dass über 35 % der Patienten auf Intensivstationen im Laufe ihres Aufenthalts eine Sepsis entwickeln, wobei sich die Sterblichkeitsrate bei Sepsis auf 27 % und bis zu 50 % bei septischem Schock beliefen [4]. Eine Reihe weiterer Studien zur Epidemiologie der Sepsis zeigen, dass in den meisten Ländern ein Intensivpatient von zehn eine schwere Sepsis hat [5]. Das alles macht Sepsis zur häufigsten Todesursache auf nichtkardiologischen Intensivstationen [6,7].

Sepsis wurde durch das *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM)* definiert als systemisches inflammatorisches Response-Syndrom (SIRS), das durch eine Infektion verursacht wird [6]. Die Kriterien der verschiedenen Stufen einer Sepsis sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die Tabelle zeigt, dass es bei einer Sepsis keine spezifischen klinischen Symptome gibt. Das macht die Diagnose für den Arzt schwierig.

Tabelle 1 Definition und Kriterien der ACCP/SCCM [6,8,9]

Nomenklatur	Definition und Kriterien
Infektion (I)	Entzündungsreaktion als Antwort auf die Anwesenheit von Mikroorganismen oder das Eindringen von Mikroorganismen in sonst steriles Gewebe; Diagnose über mikrobiologischen Nachweis oder durch klinische Kriterien
Bakteriämie	Anwesenheit lebensfähiger Bakterien im Blut
Systemisches inflammatorisches Respons-Syndrom (SIRS) (II)	systemische Entzündungsantwort in Abwesenheit einer Infektion; mind. 2 der folgenden Kriterien: <ul style="list-style-type: none"> • Temperatur $>38^{\circ}\text{C}$ oder $<36^{\circ}\text{C}$ • Herzfrequenz $<90/\text{min}$ (Tachykardie) • Atemfrequenz $>20/\text{min}$ (Tachypnoe) oder $\text{PaCO}_2 <23 \text{ mm Hg}$ (Hyperventilation) • $\text{WBC} > 12000/\text{mm}^3$ (Leukozytose), $<4000/\text{mm}^3$ (Leukopenie) oder $>10 \%$ unreife Neutrophile im Differenzialblut
Sepsis	systemische Entzündungsreaktion auf eine Infektion, Kriterien I + II
Schwere Sepsis	Sepsis mit begleitender Organdysfunktion, Hypotension oder Hypoperfusion
Septischer Schock	Sepsis oder schwere Sepsis mit Hypotension und Hypoperfusion

Die häufigste Infektionsursache ist eine Bakteriämie verursacht durch grampositiv oder gramnegative Bakterien [10,11]. In einer Studie wurde gezeigt, dass der Einfluss von Acetyl-Homoserin-Lactonen (AHL, Signalstoff gramnegativer Bakterien) auf die Immunantwort eine mögliche Erklärung der Deregulierung und Fehlfunktion in der Immunabwehr im Falle einer Sepsis darstellt [12].

Bei Verdacht auf Sepsis ist nach wie vor die Blutkultur zum Nachweis der Infektion und der Erregerresistenz empfohlen [8,13]. Manche Forscher sind allerdings der Meinung, dass eine Infektion nicht notwendigerweise nachgewiesen sein muss, sondern der Verdacht ausreicht; gerade auch im Hinblick darauf, dass bei bis zur Hälfte der Patienten mit Symptomen einer Sepsis kein definitiver Nachweis einer Infektion möglich ist [14]. In der Studie von Vincent et al. konnten nur bei 60 % der Patienten mit Sepsis Mikroben isoliert werden [4]. Zusätzlich dauert eine Blutkultur lange, so dass einige Zeit vergeht bis Ergebnisse vorliegen. Dies kann Tage dauern [15], zu lange für Patienten mit Sepsis. Denn eine frühe Erkennung der Sepsis und damit ein schneller Therapiebeginn, wie die Gabe von Antibiotika, sind entscheidend, um die hohe Letalität zu senken. In einer Studie von Kumar et al. zeigte sich, dass die Zahl der Überlebenden von 79,9 % auf 70,5 % sinkt, wenn der Beginn einer antimikrobiellen Therapie nicht innerhalb der ersten Stunde, sondern erst zwischen der ersten und zweiten Stunde nach dem Auftreten einer mit einem septischen Schock verbundenen Hypotension erfolgt [16]. In jeder weiteren Stunde Verzögerung sinkt die Überlebenschance durchschnittlich um weitere 7,6 % [16]. Allerdings konnten Garnacho-Montero et al. zeigen, dass eine falsche Antibiotikatherapie bei einer Sepsis zu einer höheren Sterblichkeit oder zumindest zu einem längeren Aufenthalt in der Intensivstation führt [17]. Das zeigt, wie dringend notwendig es ist eine Methode zu haben, die einerseits zuverlässig eine bakterielle Ursache von anderen Ursachen einer Sepsis unterscheidet; und andererseits, dass deren Ergebnisse dem Arzt früh zur Entscheidungsfindung zur Verfügung stehen.

Eine weitere Möglichkeit der Sepsisdiagnose ist ein Scoring System, wie es Elebute und Stoner 1983 entwickelt hatten [18]. Hier werden verschiedene Symptome in vier Klassen eingeteilt. Innerhalb dieser Klassen werden dann verschiedenen Kennzeichen Punkte zugeordnet und die Gesamtsumme ermöglichte eine Prognose. Dieses System setzte sich allerdings nicht in der Praxis durch. Für die Erkennung einer Entzündungsreaktion stehen weiterhin viele Inflammationsparameter zur Verfügung, u.a. Zytokine, wie die Interleukine IL-6 und IL-8 und der Tumornekrosefaktor α (TNF- α), Akut-Phase-Proteine wie das C-reaktive Protein (CRP) oder andere Parameter wie Neopterin. Diese sind zumeist nicht spezifisch genug für eine Sepsisdiagnose bzw. eine Verlaufskontrolle der Sepsis und können dem Arzt so nur Anhaltspunkte geben [19,20]. Zurzeit gilt Procalcitonin (PCT) als einer der vielversprechendsten Entzündungsmarker zur zuverlässigen Diagnose von Sepsis und zur Kontrolle der Therapie und des Krankheitsverlaufes (vgl. 2.1).

In einem früheren Projekt der Arbeitsgruppe wurden monoklonale Antikörper (mAk) hergestellt, die gegen humanes PCT (hPCT) gerichtet waren [21]. Hierzu wurden Peptidbruchstücke der verschiedenen Domänen des PCTs zur Immunisierung verwendet. Mit diesen wurde ein Sandwich-ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) zur Detektion von

PCT entwickelt. Als Standard wurde ein kommerziell erhältliches humanes rekombinantes PCT (hrPCT) verwendet. Bei Versuchen mit Patientenproben konnte mit diesen mAk allerdings das native hPCT nicht mit einer zufriedenstellenden Korrelation zum etablierten Detektionssystem für hPCT, dem Kryptor[®] von BRAHMS, nachgewiesen werden [22]. Daraufhin wurden neue mAk gegen hPCT hergestellt, indem die gesamte Polypeptidsequenz zur Immunisierung verwendet wurde [22].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein sensitiver hPCT-Assay entwickelt, der auf den neu entwickelten mAk beruht, und die Hauptcharakteristiken einer Point-of-Care-Testing (POCT) Anwendung erfüllt. Der Bereich des POCT eignet sich besonders für die Sepsisdiagnose, da hier eine einfache Handhabung und schnell zur Verfügung stehende Ergebnisse zwei Hauptcharakteristiken darstellen (vgl. 2.3.1). Bisher erfüllt kein Nachweis für hPCT alle erforderlichen Kriterien einer POCT-Anwendung. Der erste Abschnitt war die Entwicklung eines Sandwich-ELISA zur Quantifizierung von hPCT auf der Basis der neu entwickelten mAk. Der entwickelte Assay wurde dann in einem Fluoreszenzimmunoassay (FIA)-Format auf einen optischen Immunosensor übertragen und so angepasst, dass er alle Hauptkriterien für eine POCT-Anwendung erfüllt. Hierzu zählte eine einfache Handhabung, die keine Bearbeitung der Proben benötigte, d.h. der entwickelte Assay sollte sowohl in humanem Plasma als auch in humanem Vollblut angewendet werden können. Weiterhin sollte er die benötigte Sensitivität erreichen, die eine sichere Unterscheidung zwischen gesund und einer bakteriellen Infektion ermöglicht, sowie das Monitoring des Krankheitsverlaufes auch im niedrigen Konzentrationsbereich. Der Immunosensor wurde von der Firma pes diagnosesysteme GmbH (Markkleeberg, Deutschland) zur Verfügung gestellt und verwendet eine auf TIRF-beruhende optische Detektion. Der entwickelte Assay wurde abschließend mit Patientenproben validiert, deren PCT-Konzentration bereits mit dem Goldstandardgerät (Kryptor[®], Brahms, Henningsdorf, Deutschland) ermittelt worden war, um so eine Korrelation zwischen den Geräten erstellen zu können.

1.2 Bakterielle Infektionen und Sepsis beim Pferd

Bakterielle Infektionen bzw. Sepsis sind auch im Bereich der Haus- und Nutztiere ein häufig auftretendes Krankheitsbild. Bei neugeborenen Fohlen sind bakterielle Infektionen eine der Haupttodesursachen [23]. Bei adulten Pferden ist dies die Kolik, deren Mortalitätsrate eng mit dem Grad der Endotoxämie verbunden ist [24]. Pferde sind anfällig für eine Endotoxämie, da sie eine große Anzahl an Mikroorganismen im Colon beherbergen. Die Endotoxine der

Mikroorganismen, die Lipopolysaccharide (LPS), können die Darmschleimhaut bei einer nicht intakten Mucosabarriere überwinden und so in die Blutbahn geraten [25]. Zu einer Beeinträchtigung der Mucosabarriere kommt es durch eine gestörte Blutversorgung, wie es bei einer Kolik der Fall ist. Dies kann dann zur Entwicklung einer Sepsis führen, deren häufigster Auslöser bei Pferden Bakterien oder deren Produkte sind [26].

Für eine Sepsis bei Pferden gibt es keine eigene Definition. Hier werden zumeist die Kriterien aus der Humanmedizin übernommen; d.h. dass für eine Sepsis mindestens zwei der folgenden Kriterien erfüllt sein müssen (siehe hierzu auch Tabelle 1): Fieber bzw. Hypothermie, Tachykardie, Tachypnoe bzw. Hypokapnie, Leukozytose, Leukopenie oder eine erhöhte Anzahl unreifer, neutrophiler Granulozyten; für eine schwere Sepsis muss zusätzlich ein Multiorganversagen auftreten, wie z.B. in Form von Hufrehe [27]. Weitere Anzeichen bei Pferden sind u.a. depressive oder lethargische Verstimmung, abdominales Unwohlsein, schwacher Puls und kalte Extremitäten [26].

Um die Diagnose zu erleichtern, wurde auch für Pferde ein Scoring System für Sepsis eingeführt. Zuerst wurde ein System für Sepsis bei Fohlen mit einem Alter von maximal 12 Tagen entwickelt, bei dem 14 Kriterien beachtet wurden [28]. 2012 entwickelten Breuer et al. ein Scoring-System für adulte Pferde. Dieses beinhaltet 16 Parameter, die in der Human- und Veterinärmedizin Hinweise auf eine Sepsis liefern können. Erreicht der Patient ≥ 13 Punkte wird er als positiv für Sepsis eingestuft, bei 10-12 Punkten als fraglich und bei < 10 Punkten als negativ. Dieses System zeigte bei der Diagnose eine Sensitivität von 96 % und eine Spezifität von 100 % [27].

Eine weitere Möglichkeit stellt auch in der Veterinärmedizin der Erregernachweis mittels Blutkulturen dar. Allerdings zeigen Untersuchungen auch hier, dass zwischen 10-67% der bei einer Sektion gefundenen Bakterien nicht in Blutkulturen nachgewiesen werden konnten. Hierfür führen die Autoren verschiedenen Gründe an: Eine Behandlung mit Antibiotika im Vorhinein, zu wenig Probenmaterial, Fehler beim Transport usw. [29,30]. Weiterhin dauert es bei Blutkulturen sehr lange bis Ergebnisse vorliegen (48 – 72 Stunden), bei vielen Krankheiten zu lange, um darauf zu warten, wie z.B. im Falle einer Kolik [30].

Da PCT ein zuverlässiger Marker für Sepsis in der Humanmedizin ist, gibt es Überlegungen, dass das Prohormon auch für die Diagnose equiner Sepsis herangezogen werden kann. Für die Detektion von ePCT stehen der Veterinärmedizin allerdings keine Tests zur Verfügung. Daher war ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit einen Assay zum quantitativen Nachweis equinen PCTs (ePCT) auf der Basis der für hPCT hergestellten mAk zu entwickeln. Dieser wurde anschließend für die Anwendung mit equinem Plasma angepasst und charakterisiert. Abschließend wurde der Assay an Patientenproben von gesunden und erkrankten Pferden

validiert. Hier soll auch gezeigt werden, ob es möglich ist, als septisch eingestufte Pferde von gesunden zu unterscheiden.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 *Procalcitonin*

Eine richtige und zeitnahe Diagnose einer Sepsis stellt immer noch ein Problem in der Medizin dar, da für diese Diagnose kein Goldstandard zur Verfügung steht [31]. Dabei ist der entscheidende Faktor zur Reduzierung der hohen Letalität der Zeitpunkt der Diagnose [20]. Die gängigen mikrobiologischen Methoden haben große Nachteile, z.B. eine zeitliche Verzögerung und keine ausreichende Genauigkeit, wie bei Blutkulturen, oder sie sind zu aufwendig für die Routinediagnostik, wie eine Lungenbiopsie [32]. Oftmals kann mit Kulturen die verursachende Mikrobe nicht identifiziert werden [33,34]. Daher wird seit Langem ein zuverlässiger Entzündungsmarker gesucht, der die Ansprüche eines idealen Sepsismarkers erfüllt. Diese sind nach Russwurm die Ermöglichung einer frühen Diagnose, eine Hilfe zur Unterscheidung zwischen einer systemischen Entzündungsreaktion infektiösen bzw. nicht-infektiösen Ursprungs, und die Information über den Verlauf und die Prognose der Verfassung des Patienten [35].

In diesem Zusammenhang wurde Procalcitonin (PCT) in zahlreichen klinischen Studien der letzten Jahre als einer der vielversprechendsten Biomarker zum Nachweis von mikrobiellen Infektionen und Sepsis angesehen [8,15,36].

2.1.1 *Das Protein*

PCT ist eine Polypeptid-Vorstufe des Hormons Calcitonin, das den Calcium-Haushalt im menschlichen Körper reguliert. PCT besteht aus 116 Aminosäuren (AS) und hat ein Molekulargewicht (MW) von ca. 13 kDa [37,38]. Bei gesunden Personen wird PCT in der Schilddrüse gebildet und anschließend zum Hormon Calcitonin abgebaut. Die Plasmakonzentration liegt normalerweise unter 0,05 ng/mL [39]. Das PCT wird in drei Abschnitte unterteilt: N-terminaler Bereich, Calcitonin und Katalcalcin (siehe Abbildung 1) [40,41].

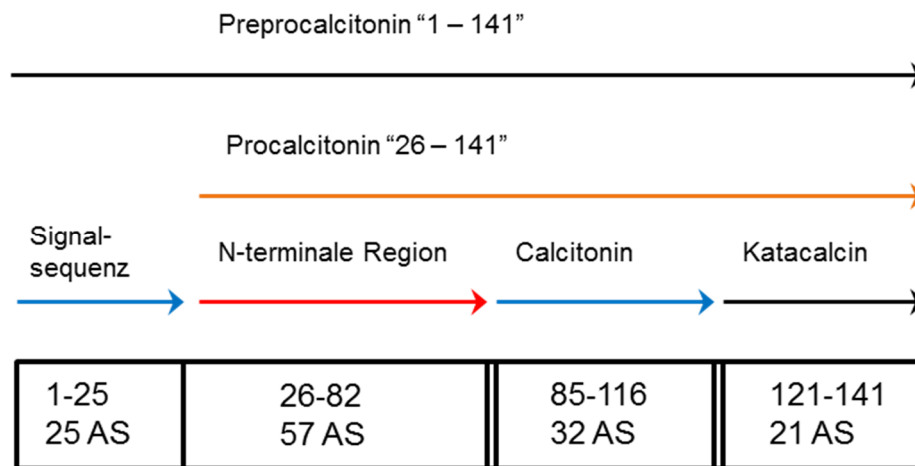


Abbildung 1 Bildung und proteolytische Spaltung des PCTs unter normalen Stoffwechselbedingungen: Das vom Calc-I Gen codierte Preprocalcitonin besitzt zusätzlich ein 25 AS langes hydrophobes Signalpeptid; das PCT wird selbst in drei verschiedene Fragmente unterteilt, den N-terminalen Bereich, das eigtl. Hormon Calcitonin und Katalcalcin (nach [42])

PCT wird vom CALC-I Gen auf Chromosom 11p15 kodiert [43]. Das Preprocalcitonin stellt die erste gebildete Stufe dar, das durch proteolytische Spaltung zum PCT abgebaut wird. Alternatives Spleißen des PCTs führt zu PCT-I, PCT-II und *calcitonin-gene-related peptide* (CGRP), einem Neuropeptid. PCT-I und PCT-II unterscheiden sich nur in den AS des C-terminalen Bereiches. Im Falle einer Sepsis werden PCT-I und PCT-II vorwiegend von anderen Geweben gebildet, wie Leber, Testikel, Lunge und Niere [41,44]. Auch mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC, *peripheral blood mononuclear cell*) produzieren *in vitro* PCT nach einer Stimulierung mit Zytokinen und Lipopolysacchariden (LPS, mikrobielle Endotoxine) [45,46]. Whang et al. konnten im Hamstermodell zeigen, dass eine Stimulierung durch die Gabe von TNF- α zu einer Erhöhung der PCT-Konzentration, ähnlich wie bei einer Sepsis, führt [47]. Diese Zytokine werden durch bakterielle Produkte evoziert, wie z.B. LPS aus der Zellwand gramnegativer Bakterien oder Teichonsäure aus der von grampositiven Bakterien. Diese können extern in den Körper gelangen oder endogen durch die Darmwand [48]; d.h. die PCT-Expression wird direkt über mikrobielle Toxine und indirekt über Entzündungsmediatoren wie Zytokine stimuliert. Die Induktionszeit von PCT beträgt zwei bis vier Stunden, wobei es die Maximalkonzentration nach acht bis 24 Stunden erreicht; die Halbwertszeit *in vivo* wird mit ca. 24 Stunden angegeben [46,49,50]. Die erhöhten PCT-Werte bleiben während der gesamten Entzündungsreaktion erhalten und sinken erst bei einer Verbesserung des Krankheitszustandes [14].

In einer Untersuchung von Weglöhner et al. stellte sich heraus, dass es neben der bisher bekannten Form des PCTs mit 116 AS (PCT1-116) auch eine Form mit 114 AS bei Patienten mit Sepsis gibt. Bei dieser Form fehlen die ersten zwei AS des N-terminalen Bereiches [51].

Es konnte gezeigt werden, dass die beiden AS durch die Dipeptidyl Peptidase IV abgespalten werden [52]. Struck et al. bestätigten die Ergebnisse von Weglöhner et al. und zeigten, dass PCT1-116 bereits kurze Zeit nach der Bildung zu PCT3-116 abgebaut wird und sich das Verhältnis der beiden Arten mit der Zeit zum PCT3-116 verschiebt [53].

Zusätzlich zum intakten PCT und dem Hormon Calcitonin lassen sich verschiedene Bruchstücke finden: Das Amino-PCT (N-terminale Region), das CT:CCP-1 (Calcitonin und Katalcalcin zusammen) und CCP-1 (Katalcalcin) [54]. Bei gesunden Personen fanden Snider et al. Konzentrationen von 0,19 fmol/mL PCT, 0,17 fmol/mL CT:CCP-1, 4,15 fmol/mL Amino-PCT, 3,17 fmol/mL CCP-1 und 1,84 fmol/mL Calcitonin [54]. Bei einer Sepsis ändert sich die Verteilung, so dass Calcitonin auf 0 % absinkt und das intakte PCT sowie das Amino-PCT im Vergleich zu CT-CCP-1 und CCP-1 stark ansteigen [55].

Zur biologischen Wirkung von PCT gibt es mittlerweile zahlreiche Studien, trotzdem ist sie noch nicht zur Gänze geklärt. Studien mit Hamstern und Schweinen zeigten, dass eine Injektion von hPCT in septische Tiere zu einer höheren Letalitätsrate führt. Die Immunneutralisation des PCTs hingegen erzielt eine höhere Überlebenschance, indem die Behandlung die physiologische und metabolische Verschlechterung hemmt [7,56,57]. U.a. konnte gezeigt werden, dass PCT die Induktion der NO-Synthase (iNOS) reguliert [58] und es als Chemokin wirkt, dem eine ähnliche Rolle wie die des CRP zugeschrieben wird. Zudem hat es einen Einfluss auf das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP) -System [59].

2.1.2 Der Sepsismarker

Die PCT-Konzentration im Plasma bei gesunden Menschen liegt normalerweise deutlich unter 0,1 ng/mL und steigt innerhalb von 24 Stunden im Falle einer bakteriellen Infektion mit dem Grade der Schwere auf bis zu über 1000 ng/mL an [15,21,36,41,50,60,61]. Zu systemischen Entzündungen mit erhöhter PCT-Konzentration gehören u.a. Verbrennungen [62], Pneumonitis [63], Hitzschlag [64], Endotoxämie [46] und Sepsis [21,60]. Der schweregradabhängige Anstieg der PCT-Konzentration macht es möglich, zwischen einer SIRS (*systemic inflammatory response syndrome*), einer Sepsis bzw. schweren Sepsis und einem septischen Schock zu unterscheiden [65] (siehe Abbildung 2). Eine PCT-Konzentration von 10 ng/mL und höher wird mit einem septischen Schock in Verbindung gestellt, wohingegen Konzentrationen zwischen 2 und 10 ng/mL für eine Sepsis und Konzentrationen zwischen 0,5 und 2 ng/mL für eine SIRS sprechen und auch andere Möglichkeiten einer

erhöhten PCT-Konzentration nicht ausschließen. Bei Konzentrationen von unter 0,5 ng/mL ist eine Sepsis unwahrscheinlich, es könnte aber eine lokale Infektion vorliegen [15,40].

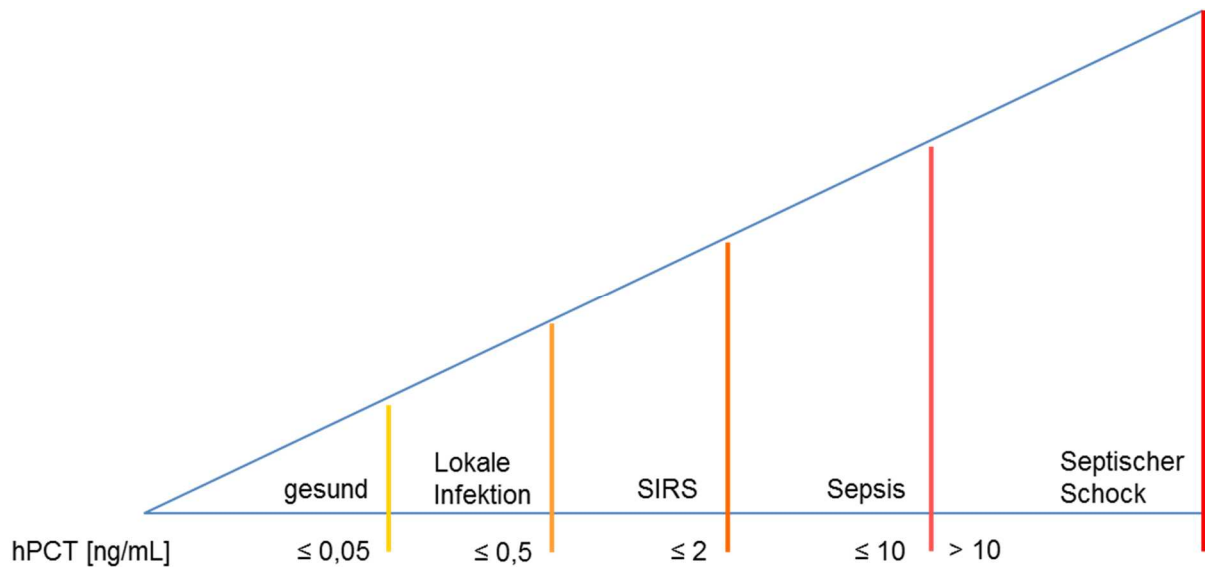


Abbildung 2 Anstieg der Plasma-PCT-Konzentration und das damit korrelierte Krankheitsstadium (nach [42])

Steinwald et al. konnten in einem Hamster-Modell zeigen, dass die Serum-PCT-Konzentration mit der Schwere der Erkrankung und der damit einhergehenden Sterberate ansteigt [66]. In einer Studie von Harbath et al. konnte anhand eines Schwellenwerts von 1,1 ng/mL PCT mit einer Sensitivität von 97% und einer Spezifität von 78% zwischen Patienten mit SIRS und solchen mit einer Sepsis, schweren Sepsis oder septischen Schock unterschieden werden (im Vergleich zu IL-6 mit einer Sensitivität von 67% und Spezifität von 72% und zu IL-8 mit je 63% und 78%) [36]. Diese Ergebnisse wurden in Meta-Analysen aus den Jahren 2000 [61] und 2013 [67] bestätigt.

Castelli et al. untersuchten den Nutzen von CRP und PCT als Marker. Sie kamen zu dem Schluss, dass bei Patienten mit schwerer systemischer Entzündung, schwerer Sepsis und Organdysfunktion PCT der bessere Parameter hinsichtlich der Einschätzung der Schwere, der Prognose sowie des zeitlichen Verlaufs der Krankheit ist. PCT reagierte schneller als CRP (24-48 h früher), die PCT-Konzentrationen waren erst erhöht bei schwerer Sepsis und septischen Schock (nicht bei SIRS) und stiegen mit dem Schweregrad an bzw. begannen erst anzusteigen, wenn sich im Falle eines Traumas eine Sepsis aufgrund einer Infektion entwickelte [60]. In einer Meta-Analyse von Simon et al. zeigte sich ebenfalls, dass PCT

sicherer zwischen einer bakteriellen und einer nichtinfektiös verursachten bzw. einer viralen Entzündungsreaktion unterscheiden kann [68].

Die PCT-Konzentrationen zeigen auch eine gute Übereinstimmung mit der klinischen Entwicklung der Patienten mit Sepsis [36,60,69]. Dauerhaft erhöhte oder sogar steigende Konzentrationen sind mit einem ungünstigen Verlauf der Erkrankung korreliert. Dabei ist es egal, ob diese aufgrund einer Infektion entstehen oder eine andere Ursache zugrunde liegt [14]. Regelmäßige Messungen der PCT-Konzentration machen es möglich einen Trend der Erkrankung erkennen zu können, da diese schnell ansteigt und PCT während der Entzündungsreaktion so lange gebildet wird, bis eine Besserung des klinischen Zustandes eintritt. Dies ist ein Vorteil im Vergleich zu anderen Entzündungsmarkern, wie TNF- α , IL oder CRP, die entweder sehr schnell sehr hohe Konzentrationen erreichen, aber eine kürzere Halbwertszeit haben, oder langsamer ansteigen als Reaktion auf eine Entzündung [49,70]. Weiterhin ist das PCT-Molekül sehr stabil in Blutproben, wodurch keine spezielle Behandlung der Proben nötig ist [49].

Es konnte in mehreren Studien für Infektionen der Lunge gezeigt werden, dass die Messung der PCT-Konzentration eine Reduzierung sowohl der Menge der verschriebenen Antibiotika als auch die Dauer der Antibiotikagabe ermöglicht. Christ-Crain et al. beschrieben in ihrer Studie eine Reduzierung der Dauer der Antibiotikagabe um 55% durch die PCT-Messungen für ambulant erworbene Pneumonie und eine deutlich geringere Verschreibung von Antibiotika bei Infektionen der unteren Atemwege bei gleichem klinischen Ausgang [33,34]. Der unangemessene Gebrauch von Antibiotika im Falle von akuten Atemwegserkrankungen steht im Verdacht einer der Hauptgründe für die weite Verbreitung von antibiotikaresistenten Bakterien zu sein [33]. Die Notwendigkeit, den Einsatz von Antibiotika sinnvoller zu gestalten und zu reduzieren, ist offensichtlich. Hierfür scheint die PCT-gesteuerte Behandlung eine gute Lösung zu sein, gerade auch da viele Atemwegserkrankungen viral verursacht sind.

In der 1. Revision der S-2k Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI) wird die frühe Messung der PCT-Konzentration empfohlen, um die Möglichkeit einer schweren Sepsis auszuschließen bzw. die Diagnose zu sichern und um die Effizienz einer antimikrobiellen Therapie zu überprüfen [71,72]. Auch die FDA (*Food and Drug Administration*) befürwortet das Messen von PCT für die Risikoabschätzung bei Patienten mit Sepsis [34]. Im Jahr 2008 wurde die „*Surviving Sepsis Campaign*“ ins Leben gerufen, die ebenfalls Leitlinien für die Handhabung schwerer Sepsis und septischen Schocks herausgab. In ihnen wird empfohlen bei Patienten, die keinen Beweis für eine Infektion haben, geringe Konzentrationen an PCT als Hinweis für das Einstellen der Antibiotikagabe heranzuziehen [13].

2.1.3 Bestimmung von humanem PCT

Auf Grund der unter 2.1.2 aufgeführten Eigenschaften, wie der frühen Induktion, der langen Halbwertszeit *in vivo* und der schnelleren Reaktion auf den klinischen Zustand des Patienten, wird PCT als guter Entzündungsmarker für eine Point-of-Care-Testing (POCT) Anwendung betrachtet; sei es alleine oder in Kombination mit anderen Entzündungsmarkern. Gerade bei einer Sepsis macht diese Anwendung Sinn, da es hier auf eine frühe Erkennung und einen raschen Therapiebeginn ankommt, um die Mortalitätsrate zu senken [73]. Auf das POCT wird in Abschnitt 2.3.1 genauer eingegangen.

Zurzeit gibt es mehrere Messsysteme zur Detektion von humanem PCT (hPCT) auf dem Markt. Diese basieren alle auf einem Sandwich-Immunoassay, der von der Firma Brahms GmbH (Henningsdorf, Deutschland) entwickelt wurde, und nun zur Anwendung auf verschiedenen Geräten verschiedener Hersteller zur Verfügung steht [15,74-77]. Einen Überblick über diese Immunoassays gibt Tabelle 2 wieder. Diese detektieren alle das intakte PCT und das CT:CCP-1 Bruchstück.

Tabelle 2 Charakteristiken der kommerziell erhältlichen PCT-Assays, zusammengestellt nach [42,78]

Name	Messbereich [ng/mL]	Analytische Sensitivität [ng/mL]	Funktionale Sensitivität [ng/mL]	Messzeit [min]	Proben- volumen [µL]
PCT[®]-Q (Brahms)	-	0.5	-	30	200
PCT LIA (Brahms) ¹	0.1 – 500	0.08	0.3	> 60	20
LIAISON[®] (Brahms/DiaSorin)	0.1 – 500	< 0.04	0.3	30	75
Sensitiv Kryptor[®] (Brahms) ¹	0.02 – 50 (5000) ⁺	0.019	0.06	19	50
ADVIA Centaur[®] CP/XP (Brahms/Siemens)	0.02 – 75.00	< 0.02	< 0.05	26 / 29	100
ELECSYS[®] (Brahms/Roche)	0.02 – 100	<0.02	0.06	18	30
VIDAS[®] (Brahms/bioMérieux) ¹	0.05 – 200	0.05	0.09	20	200

* 0,02 bis 50 ng/mL in der Direktmessung, oder bis zu 5000 ng/mL verdünnt

¹ von der FDA zugelassen

Der PCT[®]-Q ist ein semi-quantitativer Sandwich-Assay. Es handelt sich hierbei um einen immunochromatographischen Test, der keine Kalibrierung benötigt. Hierbei wird ein mit kolloidalem Gold markierter muriner monoklonaler Antikörper (mAk) gegen die Katalcalcin-Region und ein polyklonale Antikörper (pAk) vom Schaf gegen die Calcitonin-Region verwendet. Die PCT-Konzentration wird dann durch Vergleich der Farbintensität der Testbande mit den Farbfeldern der Referenzkarte ermittelt [9,42].

Der PCT-LIA ist ein immunoluminometrischer Assay (ILMA) und wird manuell durchgeführt. Er verwendet zwei mAk, die gegen den Calcitonin- und Katalcalcin-Teil des PCTs gerichtet sind, wobei der Katalcalcin-Ak auf der Innenseite eines Röhrchens immobilisiert ist und der lumineszenzmarkierte Calcitonin-Ak mit der Probe für 1 h im Röhrchen inkubiert wird. Hierbei bildet sich ein Sandwich-Komplex aus. Für jeden Lauf muss eine 2-Punkt-Kalibrierung durchgeführt werden. Der Test misst das hPCT quantitativ [9,42,77].

Der LIAISON® (DiaSorin, Saluggia, Italien) ist ein Sandwich-immunoluminometrischer Assay. Hierbei werden die mit Isoluminol markierten murinen mAk gegen die Calcitonin-Region mit der Probe für 10 min inkubiert und anschließend mit Magnetpartikeln, die mit dem murinen mAk gegen die Katalcalcin-Region beschichtet sind, für weitere 10 min inkubiert. Es soll eine 2-Punkt-Kalibrierung der Masterkurve nach ca. zwei Wochen oder bei Chargenwechsel durchgeführt werden (Informationen aus der Packungsbeilage und den Quellen [42,75]).

Der Sensitiv Kryptor® basiert auf der TRACE (*time resolved amplified cryptate emission*)-Technik und stellt ein automatisiertes Messsystem dar. Hierbei kommt es zu einem strahlungslosen Energietransfer von einem Donator- zu einem Akzeptormolekül, die jeweils an einen für PCT spezifischen Ak gebunden sind. Bildet sich der Sandwich-Komplex zwischen dem pAk vom Schaf gegen die Calcitonin-Region und dem mAk gegen die Katalcalcin-Region in Gegenwart des Analyten aus, bringt dies die beiden Tracer so nah zusammen, dass ein Energie-Transfer möglich wird. Im Vergleich zu den anderen aufgeführten Assays handelt es sich hier um einen homogenen Assay, wohingegen es sich bei den anderen aufgeführten Assays um heterogene Assays handelt. Alle Reagenzien und die Probe werden über ein Pipettiermodul in die Kavitäten pipettiert. Alle 14 Tage muss eine 1-Punkt-Kalibrierung durchgeführt werden [15,42,76,77]. Dieses System findet momentan die weiteste Anwendung in Kliniken und bei Studien und wird daher als Gold-Standard der automatisierten Systeme angesehen.

Der ADVIA Centaur® XP/CP von Siemens (Siemens Healthcare Diagnostics Ltd, Camberley, Großbritannien) ist ein Sandwich-Chemilumineszenz-Immunoassay [79]. Hierbei wird ein Ak auf magnetischen Kügelchen (*beads*) immobilisiert. Der Detektor-Ak trägt einen Acridinium-Ester als Label. Nach einem Waschschrift wird Wasserstoffperoxid als Substrat zugegeben und die Chemilumineszenzreaktion gestartet.

Beim ELECSYS® handelt es sich um einen Elektrochemilumineszenz-Immunoassay (ECLIA), der auf dem automatisierten Elecsys, Modular oder Cobas e von Roche (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) angewendet werden kann. Der Sandwich-Komplex wird aus einem biotinylierten mAk und einem mit einem Ruthenium-Komplex markierten mAk gebildet. Über Streptavidin wird der Sandwich-Komplex an Mikropartikel gekoppelt, die durch magnetische Wirkung an die Oberfläche der Elektrode fixiert werden. Die Chemilumineszenz wird anschließend mit einem Photomultiplier gemessen. Zusätzlich wird eine 2-Punkt-Kalibrierkurve erstellt, über die die Ergebnisse berechnet werden (Informationen aus der Packungsbeilage und den Quellen [42,74]).

Der VIDAS® von bioMérieux (Marcy L'Etoile, Frankreich) verwendet einen automatisierten Sandwich ELFA (*enzyme-linked fluorescent assay*). Hierbei sind die mAk gegen die

Calcitonin-Region in einer Art Pipette immobilisiert. Die Probe und verschiedene Reagenzien werden in dieses Röhrchen gezogen, wobei sich der Sandwich-Komplex mit dem enzymgekoppelten mAk gegen die Katakalcin-Region bildet. Eine 2-Punkt-Kalibrierung erfolgt alle 28 Tage [42,76].

Mit den Anti-Katakalcin mAks und den Anti-Calcitonin pAks von Brahms wurde weiterhin ein PCT-Assay für den automatisierten SphereLight 180 entwickelt. Dieser wurde damals von der Olympus Corporation gebaut (Tokio, Japan), ist aber mittlerweile nicht mehr zu erwerben [80].

Weiter wurden auch in der Forschung verschiedene POCT-Assays für PCT entwickelt. Sauer et al. entwickelten einen Protein-Chip zur simultanen Quantifizierung mehrerer Sepsismarker, u.a. PCT [81]. Sie verwendeten kommerziell erhältliche mAk von Hytest (Turku, Finnland) gegen hPCT. Dieser Test erreichte einen LOD (*limit of detection*) von 0,078 ng/mL und dauert 4 h mit einem Probenvolumen von 50 µL. Dieses Testsystem hat die Gruppe weiterentwickelt, so dass durch den Einsatz von Magnetpartikeln, die einerseits die Reagenzien und die Probe intern mischen, und andererseits selbst als Detektionsreagenz dienen, das Probenvolumen auf 4 µL und die Dauer auf 2,5 h reduziert werden konnte. Allerdings wurde der PCT-Assay in diesem Ansatz nicht erneut getestet [82]. Dieses System wurde bisher nur auf humanes Serum und Plasma angewendet.

In einer früheren Studie wurden bereits mAk gegen hPCT in dieser Arbeitsgruppe entwickelt und in einem Sandwich-ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assays*) eingesetzt [21]. In phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) erreichte dieser LODs zwischen 1,4 und 8,2 ng/mL und LOQs (*limit of quantification*) von 2,3 und 12,8 ng/mL. Die mAk wurden dann auf verschiedenen optischen Immunosensoren angewendet:

Ein optischer Immunosensor wurde zur Multiparameter-Detektion mehrerer Entzündungsmarker eingesetzt [83]. In verschiedenen Puffersystemen erzielte dieses System Arbeitsbereiche von 1120 – 3240 ng/mL bzw. 640 – 3400 ng/mL, d.h. deutlich über dem klinisch relevanten Bereich.

Weiterhin wurden diese mAk gegen PCT auf einem fluoreszenzbasierten optischen Immunosensor für POCT von Baldini et al. angewendet [84,85]. Dieses Testsystem erreichte in PBS einen LOD von 88 ng/mL, LOQ von 420 ng/mL und einen Arbeitsbereich von 280 – 50000 ng/mL. In dotiertem humanem Serum erreichte der Assay einen LOD von 20 ng/mL, einen LOQ von 500 ng/mL und einen Arbeitsbereich von 760 – 20000 ng/mL. Für eine klinische Anwendung sind diese Ergebnisse nicht ausreichend.

Ein weiteres kompaktes POCT-System für die klinische Diagnose, das die hier entwickelten mAk nutzte, wurde von Kemmler et al. entwickelt [86,87]. Hierbei handelt es sich um einen Immunofluoreszenz-Assay (FIA), der auf TIRF beruht. Die Messung dauert 25 min und

benötigt 10 – 75 µL Serum bzw. Plasma. In einer 4 % (w/v) HSA (Humanserum Albumin)-Lösung erreichte der Assay einen LOD von 0,34 ng/mL und in dotiertem humanem Plasma einen LOD von 1 bzw. 37 ng/mL. Auch hier wurde nicht die benötigte Sensitivität erreicht.

In späteren Versuchen mit Realproben zeigte sich, dass diese mAk das native hPCT nicht mit einer zufriedenstellenden Korrelation mit dem Goldstandard Kryptor[®] von Brahms nachweisen können [22].

2.1.4 PCT beim Pferd

Da bei Pferden noch keine Standardmethode zur Sepsisdiagnose zur Verfügung steht, rückt auch in der Veterinärmedizin die Suche nach zuverlässigen Sepsismarkern in den Fokus. Bisher gibt es nur wenige Daten bzgl. der Rolle von equinem PCT (ePCT) bei Sepsis von Pferden. Experimente mit Hamstern, Schweinen und Pavianen zeigten, dass PCT im Falle einer Sepsis exprimiert wird und somit auch in der Veterinärmedizin als Marker eingesetzt werden könnte [7,66,88,89]. Pusterla et al. versuchten Transkripte verschiedener Entzündungsmarker im Blut neugeborener Fohlen nachzuweisen. Hier konnte keine signifikante Zunahme der PCT-Transkripte festgestellt werden. Dies erklären Pusterla et al. damit, dass PCT nicht in weißen Blutkörperchen gebildet wird und daher wohl keine große Anzahl an Transkripten zu finden ist [30]. Dies lässt vermuten, dass PCT auch bei Pferden als Marker verwendet werden kann. Hierfür gibt es allerdings bisher keine Testsysteme.

Das ePCT besteht aus 115 AS mit einem Molekulargewicht (MW) von 12,5 kDa. Toribio et al. zeigten, dass das ePCT mit mehr als 74 % die größte Homologie innerhalb der AS-Sequenz mit dem hPCT aufweist [90]. Beim Abschnitt innerhalb der AS-Sequenz, der das Hormon Calcitonin darstellt, beträgt die Übereinstimmung sogar 90 % (siehe Abbildung 3). Durch die hohe Übereinstimmung in der AS-Sequenz könnte eine Detektion des ePCTs mit hPCT-Assays möglich sein, wenn die verwendeten Ak in den homologen AS-Sequenz Abschnitten binden und die mAk mit beiden Analyten kreuzreagieren.

hPCT	1	MGFQKFSPPFLALSILVLLQAGSLHA	APFRSALESSPADPATLSEDEARLLLLAALVQDYVQ
ePCT	1	MGFWKFSPPFLPLSILVLYQVGIIQA	APFRSALES LP-DPAVLPEEESRLLLLAALVKDYVQ
Übereinstimmung		*** ***** ***** * *	***** * ** * * * ***** ****
hPCT	61	MKASELEQEQEREGSSLDSPRS	KRCGNLSTCILGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAPGKKR
ePCT	60	MKVRALEQEQETGGASLDSPRA	KRCNSLSTCVLGTYTODLNKFHTFPQTAIGVGAPGKKR
		** ***** * ***** *** ***** ***** * *****	
hPCT	121	DMSSDLERDHRPHVSMQPQAN	
ePCT	120	VMARGLERDHGPHIGTSQDAY	
		* ***** ** * *	

Abbildung 3 AS-Sequenzen des humanen und equinen Preprocalcitonins und deren Übereinstimmung; grau = Signalsequenz des prePCTs, rot = N-terminaler Bereich, blau = Calcitonin; schwarz = Katalcalcin; erstellt mit ClustalW2 (nach [90])

2.2 Immunochemische Analysemethoden

Immunochemische Methoden haben eine weite Verbreitung sowohl im Medizin-, als auch im Umweltbereich. Dies liegt an der hohen Sensitivität, mit der noch kleinste Spuren des gesuchten Stoffes in einer Fülle anderer Substanzen bei relativ einfacher Handhabung nachgewiesen werden können. Die selektive Erkennungseinheit im Immunoassay ist der Antikörper, dessen Interaktion mit dem passenden Antigen die zugrunde liegende Reaktion darstellt. Zu den immunochemischen Analysemethoden gehören u.a. der Radioimmunoassay (RIA), der Fluoreszenzimmunoassay (FIA), der Chemilumineszenzassay (CLIA) und der enzymgekoppelte Immunnachweis (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*). Auf Letzteren wird im Folgenden genauer eingegangen, da dieser Bestandteil der vorliegenden Arbeit war.

2.2.1 Antikörper als Erkennungselement in immunochemischen Analysemethoden

Antikörper (Ak), auch Immunglobuline (Ig) genannt, sind wichtige Bestandteile der Immunantwort von Wirbeltieren. Sie erkennen spezifisch ein entsprechendes Antigen (Ag), binden es und rekrutieren auch andere an der Immunantwort beteiligte Zellen. Somit sorgen sie für die Ausschleusung körperfremder Substanzen aus dem Organismus. Es gibt fünf

Hauptklassen an Immunglobulinen: IgG, IgM, IgA, IgE und IgD, die sich durch die Isotypen der schweren Ketten unterscheiden. Die Klasse der Immunglobuline G (IgG) tritt von den genannten Gruppen mit ca. 85% der Gesamtglobulinmenge im Serum am häufigsten auf [91] und wird daher zumeist im Immunoassay zum Einsatz kommen. Die zwei Aufgaben der Ak sind in ihrem strukturellen Aufbau wiederzufinden (vgl. Abbildung 4).

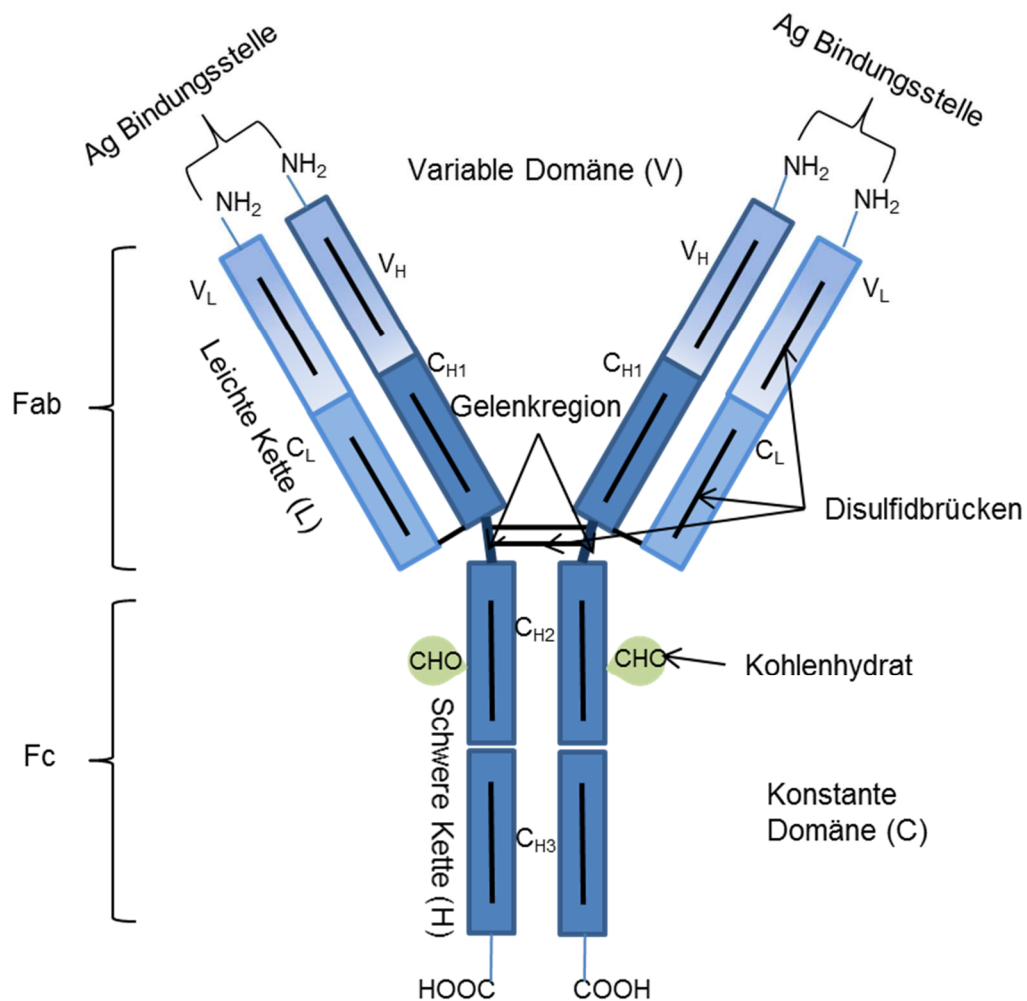


Abbildung 4 Schematischer Aufbau eines Antikörpers, in diesem Fall eines Immunglobulin G-Moleküls; Fab = *fragment antigen binding*; Fc = *fragment constant* (nach [91])

Ein Immunglobulin besteht aus zwei verschiedenen Typen von Polypeptidketten, der schweren Kette (*heavy chain*, H-Kette) und der leichten Kette (*light chain*, L-Kette). Diese liegen jeweils doppelt vor und sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden. Es werden zwei Typen von L-Ketten unterschieden (κ, λ) und fünf Typen von H-Ketten ($\gamma, \alpha, \mu, \delta, \epsilon$). Durch eine proteolytische Verdauung der Gelenkregion mit dem Enzym Papain erhält man zwei

verschiedene Abschnitte des Ak. Das C-terminale Ende des Ak stellt die konstante Region dar (Fc-Fragment). Diese ist für die biologischen Effektorfunktionen der Ak zuständig, besteht ausschließlich aus schweren Ketten (C_{H2} und C_{H3}) und variiert nur in den Klassen der Ak. Jeweils eine leichte Kette (V_L und C_L) und die, mit dieser über Disulfidbindungen verbundenen schweren Ketten (C_{H1} und V_H), ergeben einen von zwei identischen Fab-Teilen (*fragment antigen binding*). Der N-terminale Teil des Ak bildet die Ag-Bindungsregion und liegt im Fab-Teil des Ak. Die Ag-Bindungsstelle wird auch als Paratop, die entsprechende Struktur beim Ag als Epitop bezeichnet. Die Bindung zwischen dem Paratop und dem Epitop beruht auf der Ausbildung von nichtkovalenten Bindungen, wie Van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe und elektrostatische Bindungen, sowie der räumlichen Passform („Schlüssel-Schloss-Prinzip“) und wird durch das Massenwirkungsgesetz bestimmt. Der in dieser Arbeit beschriebene Assay verwendet IgG-Moleküle zur Detektion [91-93].

Es gibt verschiedene Herstellungsmethoden für Ak, die zu polyklonalen Antikörper (pAk) oder monoklonalen Antikörpern (mAk) führen.

Handelt es sich bei dem zu detektierenden Ag um ein Protein, kann dieses meist direkt zur Immunisierung genommen werden. Ist das Ag eine niedermolekulare Substanz mit $M_R < 5000$, z.B. ein Umweltgift, kommt es normalerweise zu keiner Immunantwort [94]. Diese kleinen Moleküle werden als Hapten bezeichnet. Ein Hapten wird daher an ein höhermolekulares Molekül (normalerweise ein Protein; Trägermolekül) kovalent gebunden und dann zur Immunisierung verwendet [95].

Bei der Herstellung von pAk wird dem Tier zuerst das Ag injiziert, woraufhin eine Immunantwort eingeleitet wird. Das Serum des Tieres enthält dann sowohl Ak gegen die verschiedenen Epitope des gesuchten Ag, als auch gegen das Trägermolekül im Falle einer Immunisierung mit einem Hapten. Ebenso enthält das Serum Ak gegen Substanzen, mit denen das Tier früher in Berührung kam. Weitere Nachteile sind, dass die Ak-Produktion mit der Lebensdauer des Tieres zusammenhängt und jedes Tier unterschiedlich auf eine Immunisierung in Hinblick auf Zusammensetzung des Antiserums und der enthaltenen Ak-Menge reagiert. Damit variiert auch die Spezifität der pAk zwischen den Tieren und zwischen den einzelnen Immunisierungen eines einzelnen Tieres, wodurch es keine Stabilität zwischen den Chargen gibt [91-93].

Bei mAk ist der entscheidende Unterschied, dass es sich hier um einen definierten Ak handelt. Zur Herstellung wird die Hybridomatechnik von Köhler und Milstein (1975) verwendet. Tiere (zumeist Mäuse, aber auch Ratten) werden mit dem Ag immunisiert. Die Tiere produzieren nun als Immunantwort ebenfalls erst einmal pAk. Den Tieren wird anschließend die Milz entnommen und aus ihr werden B-Lymphozyten isoliert, die als Quelle für die Ak-Produktion

dienen. Die B-Lymphozyten werden dann mit Krebszellen (Myelomzellen) fusioniert, es entsteht die sogenannte Hybridomazelle. Diese trägt die Information zur spezifischen Ak-Bildung der B-Lymphozyten und eine unendliche Teilungsfähigkeit der Krebszelle in sich. Die Hybridomazellen werden vereinzelt, wodurch Zellkulturen entstehen, die jeweils einen spezifischen Ak produzieren und nur aus einem Klon bestehen und daher als monoklonal bezeichnet werden. Die Überstände der Zelllinien enthalten die sezernierten mAk. Die Überstände werden in Immunoassays eingesetzt, wodurch diejenigen Hybridomazellen gefunden werden, deren Ak die höchste Affinität und Spezifität zum gesuchten Ag aufweisen. Die Hybridomazellen werden dann in Zellkulturen vermehrt, so dass eine unbegrenzte Anzahl des gewünschten Ak identisch gebildet werden kann [91-93].

In beiden Fällen folgt meist ein Aufreinigungsschritt, obwohl, sowohl das Serum mit pAk als auch der Zellüberstand mit mAk direkt eingesetzt werden können. Die direkte Verwendung hat oft den Nachteil, dass es u.a. zu Matrix-Effekten kommen kann, die langfristige Lagerung problematisch ist und ein Markieren der Ak aufgrund der hohen Anzahl irrelevanter Proteine nicht möglich ist. Mögliche Methoden für die Reinigung sind z.B. die Verwendung von Protein-A bzw. G-Sepharose oder die spezifische Aufreinigung durch Affinitätschromatographie [91].

Mittels der Hybridomatechnik war es möglich, Ak auch rekombinant herzustellen. Hier wird nicht der gesamte Ak produziert, sondern nur die relevanten Abschnitte. Für die Ag-Ak-Bindung ist alleinig der Fab-Teil des Ak entscheidend. Bei dieser Technik wird entweder der Fab- oder der scFv-Teil (*single chain fragment variable*, V_L und V_H mit einem Linker verknüpft) eines spezifischen Ak gebildet. Die passende mRNA wird aus einer Hybridomazelle isoliert, in eine cDNA umgewandelt und einem zumeist einfacheren Organismus wie *Escherichia coli* (*E.coli*) ins Genom eingebaut. Dieser exprimiert dann das gewünschte Bruchstück. Hierbei handelt es sich um eine aufwendige Methode, die nicht den Stellenwert der pAk oder mAks in Immunoassays hat [92], sondern vorwiegend zur Herstellung therapeutischer Ak angewandt wird [91].

2.2.2 Oberflächenplasmonenresonanzmessung zur Charakterisierung eines Antikörpers

Der Ak ist der entscheidende Faktor für die Sensitivität und Spezifität eines Immunoassays. Um die Affinität des Ak zu seinem Ag zu bestimmen, wird oft die Oberflächenplasmonenresonanzmessung (*surface plasmon resonance*, SPR) verwendet.

Diese Technik wird vom Biacore[®]-System (GE Healthcare Europe, München, Deutschland) genutzt, um in Echtzeit die Kinetik und die Affinität von Molekülen zu bestimmen [96].

Als Oberflächenplasmonen werden die Schwingungen freier Elektronen an Metalloberflächen bezeichnet. Diese können erzeugt werden, indem polarisiertes Licht an eine Grenzfläche zwischen einem Prisma und einem Metallfilm im Winkel einer Totalreflexion eingestrahlt wird. Auf der Metallseite entsteht daraufhin ein evaneszentes Feld (zur genaueren Erklärung siehe 2.3.2). Dieses dringt in den Metallfilm ein und kann Energie auf die freien Elektronen auf der Metalloberfläche übertragen, was zur Schwingung dieser führt. Im Resonanzfall verbleibt die Energie in den Plasmonen und kein Licht wird reflektiert. Es kommt zu einem Minimum im Reflektivitätsdiagramm. Die Plasmonen breiten sich in einer elektromagnetischen Welle (Plasmonwelle) an der Grenzfläche von Metalloberfläche und umgebenden Medium aus, wobei deren Intensität exponentiell mit Entfernung vom Entstehungspunkt abnimmt. Oberflächenplasmonen können allgemein in Metallfilmen entstehen; zumeist wird allerdings Gold verwendet wegen seiner hohen chemischen Beständigkeit und da Gold keine natürliche Oxidationsschicht ausbildet [91].

Die Anwendung im Biacore[®] beruht auf einer Verschiebung der Resonanz und damit des Minimums im Reflektivitätsdiagramm aufgrund einer Anlagerung auf der Metallschicht. Durch die Anlagerung der Moleküle ändert sich die Schichtdicke und damit auch der Brechungsindex des an der Goldfläche anliegenden Mediums. Dadurch verschiebt sich der Einfallswinkel, bei dem es zum Intensitätsminimum kommt. Diese Verschiebung kann anschließend quantitativ mit der angelagerten Menge an Molekülen korreliert werden [91,96,97]. Das Prinzip ist in Abbildung 5 dargestellt.

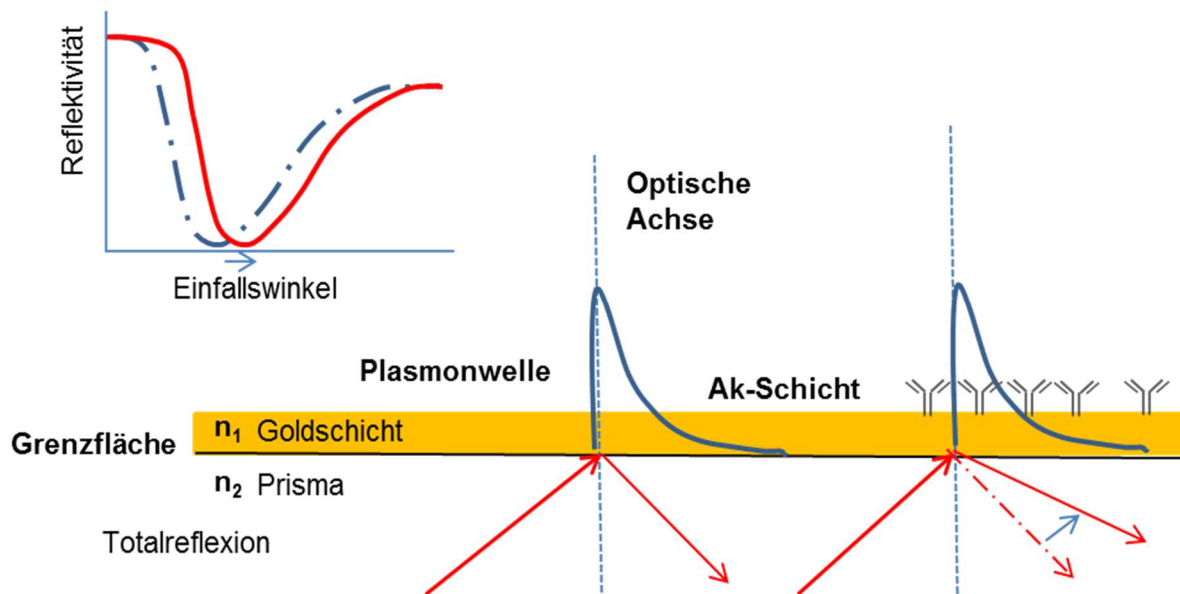


Abbildung 5 Prinzip der SPR-Messung mit der Kretschmann-Konfiguration (nach [91,96]); n_1, n_2 = Brechungsindex

Bei der SPR handelt es sich um eine markierungsfreie bzw. direkte optische Detektion. Sie wird genutzt, um minimale Änderungen bei der Schichtdicke oder des Brechungsindex in dünnen Filmen zu erfassen. Sie ermöglicht in Echtzeit die Untersuchung von biospezifischen Interaktionen [98]. Daher ist es möglich, mit dieser Methode u.a. die Bindungsaffinität eines Ak zu seinem Analyten zu bestimmen [99]. Ein Nachteil der Methode stellt die Sensitivität zu anderen angelagerten Stoffen aus der Begleitmatrix dar.

2.2.3 Enzym-gekoppelter Immunnachweis (ELISA)

Ein weit verbreiteter Immunoassay ist der ELISA, da er leicht durchzuführen ist. Durch die weiterentwickelte Technik kann ein ELISA in großer Anzahl durchgeführt werden, was gerade in Laboren mit großen Probenvorkommen hilfreich ist.

Beim ELISA erfolgt der quantitative Nachweis des gesuchten Stoffes direkt über die Bindung eines spezifischen Ak an den gesuchten Analyten. Entweder der Ak oder ein Derivat des Ag wird hierbei mit einem Enzym markiert (z.B. eine Peroxidase oder eine Phosphatase). Detektiert wird dann der Analyt-Ak-Komplex über den Substratumsatz des ebenfalls im Komplex gebundenen Enzyms. Die Messung erfolgt entweder kolorimetrisch, fluorimetrisch oder luminometrisch. Dabei ist entweder das Ag oder der Ak an eine Festphase immobilisiert

(zumeist eine Mikrotiterplatte), um eine Trennung von gebundenem und ungebundenem Material mittels Waschschritten zu ermöglichen (heterogener Assay). Der ELISA ist eine sehr sensitive Methode, da durch die Substratumsetzung des Enzyms eine Signalverstärkung stattfindet [91,100].

Es gibt verschiedene Prinzipien eines ELISAs. Diese können in „direkte“ und „indirekte“ Formate unterteilt werden. Im Falle des direkten Formats trägt der verwendete Ak das Enzym, während beim indirekten Format das Enzym über ein weiteres Molekül an den spezifischen Ak gebunden wird. Dies ist meist ein gegen den Fc-Teil des spezifischen Primär-Aks gerichteter Sekundär-Ak, der entweder direkt das Enzym trägt oder zur Signalverstärkung ein oder mehrere Biotinmoleküle, die wiederum mehrere enzymmarkierte Streptavidinmoleküle binden können. Der Vorteil des direkten Assayformats ist, dass er weniger Schritte benötigt, somit auch weniger Fehlerquellen bietet. Das indirekte Assayformat hingegen hat den Vorteil, dass nicht der Primär-Ak oder das Ag markiert werden muss, was eine Konformationsänderung zur Folge haben kann und damit einen negativen Einfluss auf die Bindungsfähigkeit hätte. Weiterhin ist hier, wie bereits erwähnt, eine Signalverstärkung möglich und es stehen mittlerweile eine Vielzahl von markierten Sekundär-Ak kommerziell zur Verfügung [91,101].

Eine weitere Unterscheidung ist die zwischen dem „kompetitiven“ und „nichtkompetitiven“ Assayformat. Beim kompetitiven Format wird eine Konkurrenzsituation aufgebaut. Der Analyt in der Probe und das Ag, das dem Assay in einer vorgegebenen Konzentration zugegeben wurde, konkurrieren um die Bindungsstellen des limitierten Ak. Hierbei kann sowohl der Ak als auch das Ag an die Festphase gebunden sein. In diesem Format ist das erhaltene Signal umgekehrt proportional zur enthaltenen Analytkonzentration. D.h., ist kein Analyt in der Probe, erhält man das höchste Signal. Dieses Format wird überwiegend für die Detektion von niedermolekularen Substanzen verwendet. Beim nichtkompetitiven Format handelt es sich meistens um einen Sandwich-ELISA. Hierbei wird der Analyt zwischen zwei spezifischen Ak gebunden. D.h. zugleich, dass nur Moleküle mit diesem Format detektiert werden können, die zumindest zwei unterschiedliche Epitope aufweisen, die räumlich soweit getrennt vorliegen, dass gleichzeitig zwei Ak binden können. Dies trifft vorwiegend auf große Proteine zu. Der sogenannte Fänger-Ak wird auf der Festphase immobilisiert. Dieser bindet dann den Analyten aus der Probe. Der Detektor-Ak wiederum bindet an dem gebundenen Analyten. Entweder trägt der Detektor-Ak bereits das Enzym oder ein weiterer Bindungsschritt mit einem Sekundär-Ak, der das Enzym trägt, folgt. Das erhaltene Signal ist hier direkt proportional zur Analytkonzentration. Sprich, ist kein Analyt enthalten, gibt es kein Signal, und mit ansteigender Konzentration steigt auch die Signalstärke an. Dieses Format stellt das Sensitivste der dargestellten Formate dar [91,101].

Abbildung 6 zeigt beispielhaft den Ablauf für einen indirekt kompetitiven Assay (A) am Coating-Antigen Format und für einen nichtkompetitiven Assay (B) an einem Sandwich-ELISA. Letzterer wird in dieser Arbeit zur Detektion des hPCTs verwendet (der genaue Ablauf ist unter 5.7.2.1 beschrieben).

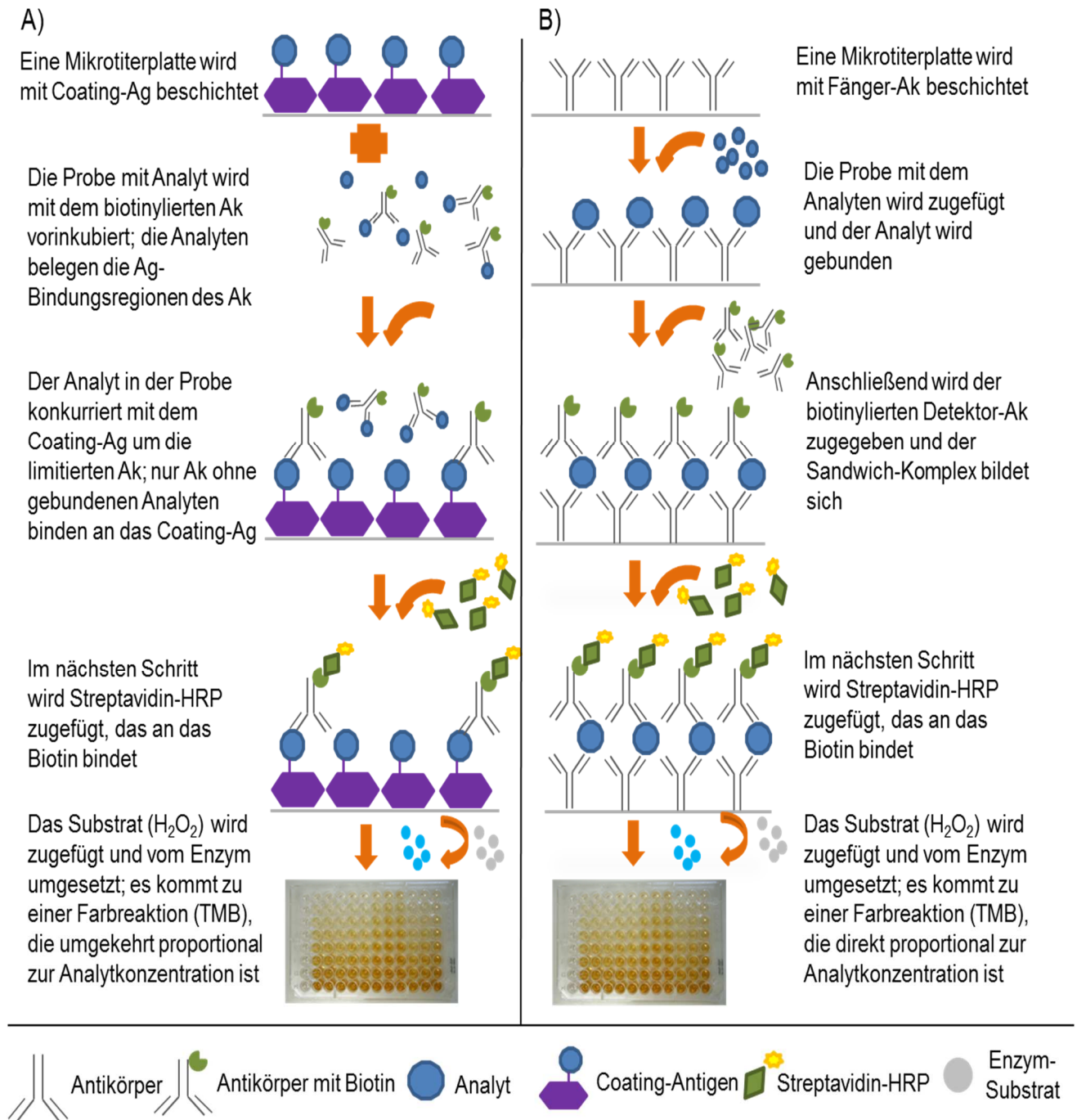


Abbildung 6 Vergleich von Coating-Antigen-Format A) und Sandwich-ELISA B)

In den meisten Fällen wird als Enzym eine Peroxidase eingesetzt, die Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umsetzt. Beim Beispiel in Abbildung 7 handelt es sich um eine Meerrettichperoxidase (HRP, *horseradish peroxidase*). Für die Farbreaktion wird dem als Substrat dienendem H_2O_2 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) zugesetzt. Bei der Umsetzung des H_2O_2 durch die Peroxidase wird ein Elektron frei, welches das farblose TMB zu einem blauen Radikalkation oxidiert. Um diese Umsetzung zu stoppen, wird in einem letzten Schritt Schwefelsäure zugegeben, die einerseits die Peroxidase denaturiert, so dass keine weitere Umsetzung erfolgt, und andererseits das blaue Radikal weiter zum gelben 3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-diphenochinon-4,4'-diimoniumion oxidiert [102,103]. Dies ist nötig, da geringste Mengen an Enzym bereits das gesamte Substrat umsetzen würden. Durch das Abstoppen nach einem bestimmten Zeitraum wird eine Vergleichbarkeit einzelner Assays ermöglicht.

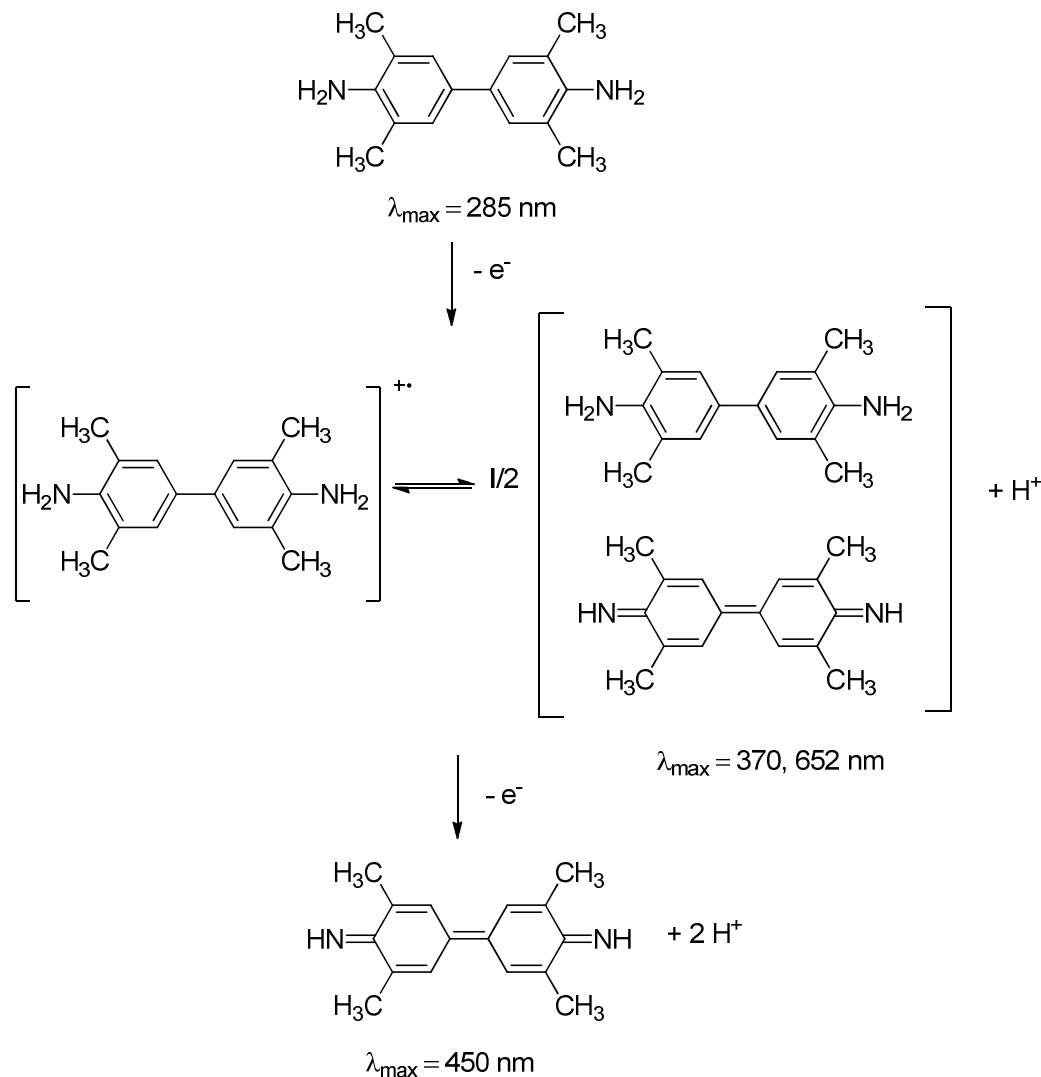


Abbildung 7 Oxidation des TMBs; angegeben ist das Absorptionsmaximum des jeweiligen Moleküls [103]

2.2.4 Mögliche Störfaktoren eines Immunoassays

Die Detektion des Analyten im Immunoassay kann durch verschiedene Störfaktoren beeinflusst werden. Häufig treten Kreuzreaktivitäten, unspezifische Bindungen und Matrixeffekte auf. Bei Letzteren kommt es zu Interaktionen zwischen dem Analyten bzw. den Ak mit Störsubstanzen aus den Realproben, wie z.B. Proteinen, heterophilen Ak, HAAAs (*human anti-animal antibodies*) bzw. HAMAs (*human anti-mouse antibodies*) oder Rheumafaktoren [91,104]. Da es aber gerade für den Einsatz im POCT darauf ankommt, Vollblutproben oder zumindest Plasmaproben messen zu können, stellt es eine große Herausforderung an die Assayentwicklung dar, diese zu erkennen und zu vermeiden.

Um eine unspezifische Anbindung des Detektor-Aks oder des Analyten an den Boden der Mikrotiterplatte zu unterbinden, werden die freien Stellen zwischen dem Fänger-Ak mit Blockierungssubstanzen belegt. Normalerweise werden dafür Proteine wie Casein oder Milchproteine eingesetzt (vgl. Abbildung 8 b)). Weitere unspezifische Bindungen können zwischen den verwendeten Ak und Substanzen aus der Matrix auftreten. Gerade humane Realproben stellen komplexe Matrices dar, die eine Vielzahl verschiedener Substanzen beinhalten. Plasma enthält eine große Menge an Albumin (55 %) und anderen Proteinen [105]. Diese können die Bindungsstellen des Fänger- oder des Detektor-Aks blockieren oder eines der Epitope des Analyten maskieren, so dass es zu einem falsch negativen Resultat kommt. Genauso ist es möglich, dass diese wie der Analyt von beiden Ak erkannt werden und es so zu einem falsch positiven Signal kommt [91] (vgl. Abbildung 8 e)).

Eine große Fehlerquelle bei der Analyse von Plasma- bzw. Vollblutproben stellen humane Ak dar, die gegen eine bestimmte Tierart gerichtet sind. Stammen die im Assay verwendeten Ak von derselben Tierart, können sie spezifisch von den humanen Ak verknüpft werden. Diese Ak sind monospezifisch und werden als *human anti-animal antibodies* (HAAA) bezeichnet. Sie entstehen durch den Kontakt mit Immunglobulinen von Tieren, z.B. bei Haustieren, oder einer Behandlung mit Ak im Rahmen einer Krebserkrankung, wobei Ak gegen die tierischen Immunglobuline gebildet werden. Auch Impfungen und Bluttransfusionen scheinen eine Quelle zu sein [106]. Eine weitere Hypothese ist, dass Ak gegen IgG-Moleküle von Rindern nach dem Verzehr von Milch gebildet werden [107]. Die bekanntesten Ak dieser Sorte sind die HAMAs (*human anti-mouse antibodies*). Sie binden spezifisch und mit hoher Affinität an den Fc-Teil von Maus-Ak. Enthält eine Probe HAMAs, die in einem Sandwich-ELISA analysiert werden soll, der auf murinen mAks beruht, kann es zu falsch positiven Resultaten kommen. Die HAMAs können den Detektor-Ak und den Fänger-Ak über die Fc-Teile verbinden, wodurch ein Signal entsteht, wie es sonst nur in Gegenwart des Analyten der Fall wäre. In diesem Fall

bezeichnet man die HAMAs als anti-isotypische Störer. Genauso können falsch negative Ergebnisse entstehen, wenn die HAMAs die Bindungsstelle des Fänger- oder des Detektor-Aks belegt. Dann werden sie als anti-idiotypische Störer bezeichnet [91,106] (vgl. Abbildung 8 c) und d)).

Eine weitere Fehlerquelle sind heterophile Ak, deren Definition nicht einheitlich ist. Im Gegensatz zu den HAAA werden die heterophilen Ak nicht durch Kontakt mit Tier-Immunglobulinen gebildet, sondern stellen multispezifische Ak der frühen Immunantwort dar bzw. entstehen aufgrund eines unbekanntes Antigens. Sie können ebenfalls zu falsch negativen Resultaten durch eine Überbrückung der Assay-Ak führen, wobei diese auch von verschiedenen Tierspezies stammen können [108]. Sie zeigen eine niedrigere Affinität als HAAAs, es gibt aber unterschiedliche Gruppen, die entweder den Fc-Teil oder den Fab-Teil der IgG-Moleküle binden können [91,109]. Hierzu gehören u.a. Rheumafaktoren. Diese sind IgM-Ak, die an den Fc-Teil von humanen IgG-Ak binden, wodurch es zu einer Agglomeration kommt [110]. Sie können allerdings auch artenübergreifend an die Fc-Abschnitte binden, wodurch es bei einer Verknüpfung des Fänger- und Detektor-Aks ebenfalls zu einem falsch positiven Resultat kommt [91] (vgl. Abbildung 8 c) und d)).

Um die Störeffekte, die durch humane Ak in der Probe verursacht werden, zu verhindern, wird zumeist ein Blockreagenz der Probe zugefügt. Hierbei kann es sich ebenfalls um pAk oder mAk handeln, die im Überschuss zugesetzt werden, um tierisches Serum oder auch fertige kommerziell erhältliche Blockingreagenzien [106].

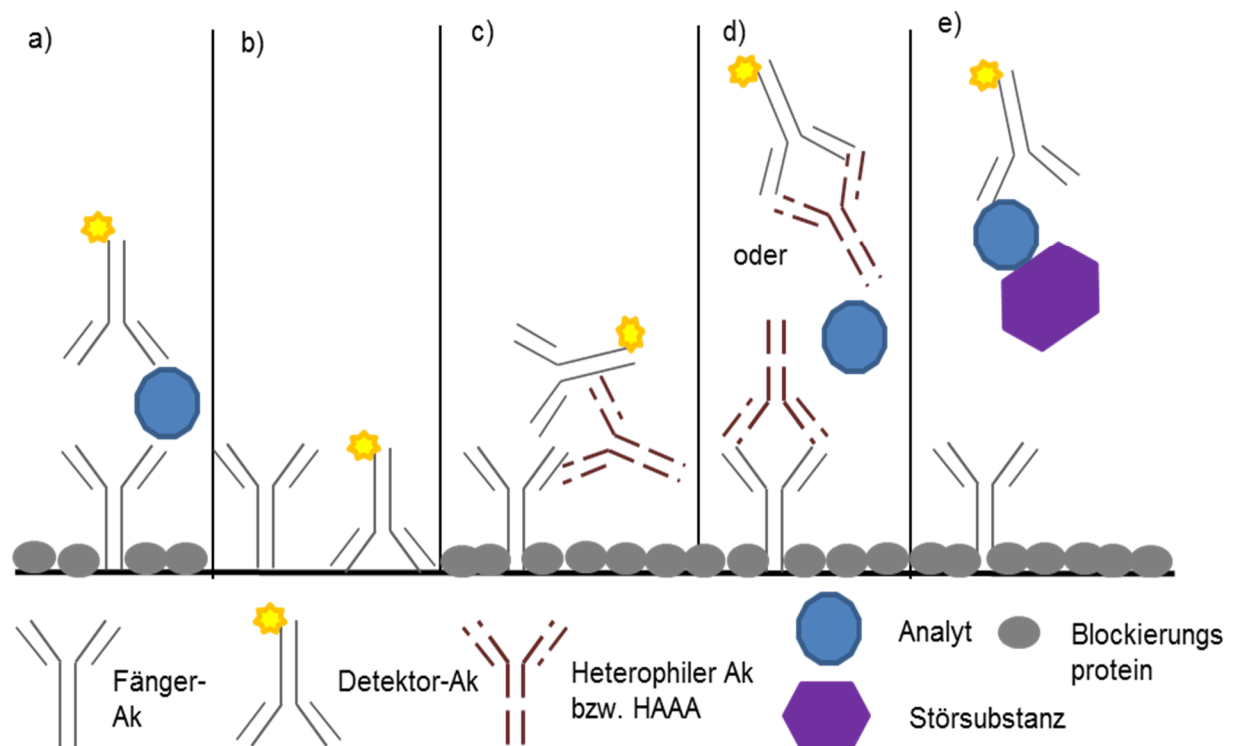


Abbildung 8 Schematische Darstellung verschiedener Störeffekte (nach [91]); a) Unbeeinflusster Assay; b) unspezifische Bindung des markierten Detektor-Ak an den Boden der Mikrotiterplatte (falsch positives Signal); c) Verknüpfung des Fänger-Ak mit dem Detektor-Ak aufgrund eines heterophilen Ak, HAAA oder einer anderen Störsubstanz (falsch positives Signal); d) Blockierung der Ag-Bindungsstelle durch einen heterophilen Ak, HAAA oder einer anderen Störsubstanz (falsch negatives Signal), c) Maskierung des Epitops des Analyten durch eine Störsubstanz (falsch negatives Signal)

2.3 Biosensoren für Point-of-Care-Testing (POCT)

Seit einigen Jahren geht die Tendenz zu gemeinschaftlichen Zentrallaboren, die für mehrere Kliniken oder Arztpraxen eines Gebietes Proben analysieren. Durch die große Durchsatzrate der Proben, weniger benötigtes Fachpersonal, Räumlichkeiten und Laborausstattung werden Kosten eingespart. Der große Nachteil ist die lange TAT (*turn-around-time*), d.h. die Zeit zwischen Probennahme und Ergebnis. Gerade bei Erkrankungen, die eine schnelle Entscheidung zum Therapiebeginn verlangen, wie z.B. im Falle einer Sepsis, benötigt eine Analyse im Zentrallabor zu viel Zeit. In solchen Fällen haben sich sogenannte POCT-Geräte bewährt, die zumeist auf Biosensoren beruhen.

2.3.1 *Point-of-Care-Testing: Patientennahe Labordiagnostik*

Beim POCT finden die Messungen direkt beim Patienten statt, wodurch schnell ein Ergebnis vorliegt und der Arzt die Möglichkeit hat sofort die entsprechende Therapie einzuleiten. Mögliche Anwendungsorte sind der Operationssaal, die Intensivstation, die Ambulanz, normale Arztpraxen, aber auch beim Patienten zuhause [111]. Ein weiteres Anwendungsgebiet sind Tests zur Lebensmittelsicherheit und Trinkwasserüberwachung [112,113]. Wichtige Merkmale des POCT sind [97,111,114,115]:

- Patientennähe
- (semi-)quantitative Einzelmessungen, meistens eines einzelnen klinisch interessanten Parameters
- Durchführbarkeit durch ungeschultes Personal
- Kurze TAT
- Gebrauch von vorgefertigten Reagenzien
- Einfache Bedienbarkeit der Analysegeräte
- Keine Probenvorbereitung/keine Pipettierschritte

Der letzte Punkt setzt voraus, dass die Analyse mit Vollblut durchgeführt werden kann, oder das Gerät einen integrierten Mechanismus zur Entfernung der zellulären Bestandteile aufweist. Letzteres wird nötig, wenn Störeffekte aufgrund der zellulären Bestandteile auftreten, wie es bei Absorptionstechniken oder Fluoreszenz möglich ist [112]. Zu den getesteten Substanzen gehören u.a. Proteine, Nukleinsäuren, Metabolite, Drogen und Mikroben [112].

Luppa et al. unterscheiden drei Arten von POCT-Anwendungen: Den qualitativen auf Teststreifen basierenden Nachweis (z.B. Schwangerschaftstests), das Unit-Use-Analysegerät (z.B. Blutzuckermessgeräte, die nur die Teststreifen auslesen) und Tischgeräte (*bench-top system*) [97,114,115].

Für die Detektion von Entzündungsmarkern, die auch zur Diagnose einer Sepsis verwendet werden könnten, gibt es noch nicht viele Anwendungen im POCT-Bereich. Momentan gibt es vorwiegend POCT-Systeme für den Entzündungsmarker CRP. Für PCT kann gerade einmal das semiquantitative System des PCT[®]-Q als POCT-geeignet angesehen werden, dieser erlaubt allerdings keine Überwachung des Patienten. Dabei wäre gerade PCT gut geeignet für eine POCT Anwendung, entweder als alleiniger Marker oder in Kombination mit anderen Entzündungsmarkern wie dem CRP [73].

2.3.2 Biosensoren

2.3.2.1 Definition und Aufbau

Biosensoren finden in der Industrie, in der Umweltüberwachung und auch in der Medizin immer größere Anwendung [116,117]. Nach IUPAC sind Biosensoren, analytische Geräte zur Detektion von Analyten, die eine biologische Komponente mit einem physikalisch-chemischen Signalwandler kombinieren [114,118]. Hierbei müssen alle Teile in demselben Gerät vereint sein, d.h. es muss ein in sich geschlossenes System sein oder der Biosensor muss als Detektor in einem bioanalytischen System dienen [118,119]. Die biologischen Komponenten sind zumeist Antikörper, Enzyme, DNA oder Zellen. Deren biochemische Reaktion mit einem Analyten bzw. Liganden wird dann u.a. in ein elektrisches, optisches oder thermisches Signal umgewandelt [120]. Die Erkennungselemente (Rezeptoren) werden auf einer Schutzschicht immobilisiert, die wiederum auf dem Signalumwandler (*Transducer*) aufgebracht ist (vgl. Abbildung 9), sie stehen also im direkten Kontakt mit dem Signalumwandler. Wenn das biologische Erkennungselement ein Ak ist, spricht man auch von einem Immunosensor [119] oder einem Affinitätssensor. Die hier stattfindende Komplexbildung erzeugt eine physikalisch-chemische Änderung, z.B. durch die Änderung der Schichtdicke, des Brechungsindex oder der Lichtabsorption, die dann gemessen werden kann [121]. Die biochemischen Prozesse entsprechen in diesem Fall meist den unter 2.2.3 beschriebenen Assayformaten. Den meisten POCT-Messsystemen liegt ein Immunosensor zugrunde [120].

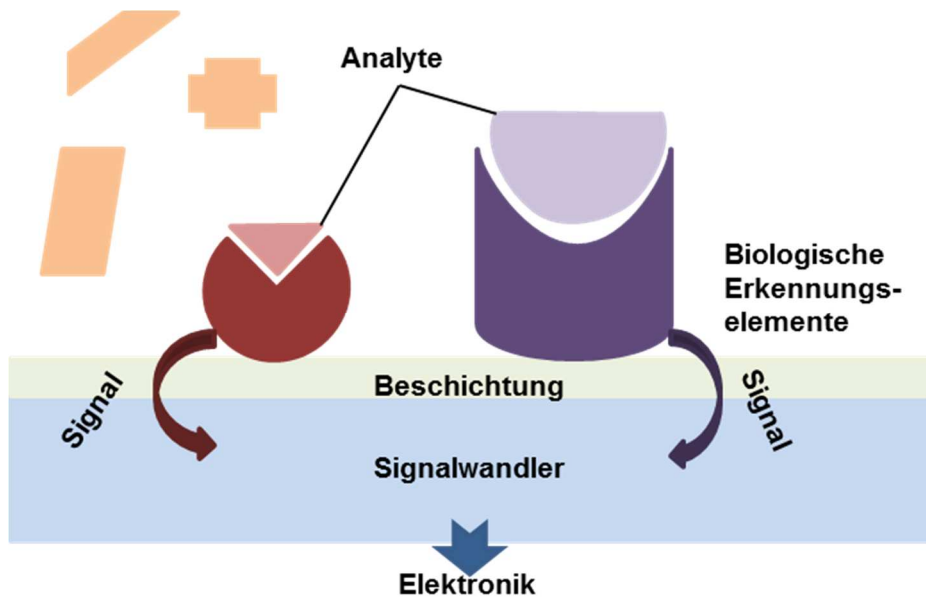


Abbildung 9 Aufbau eines Biosensors (nach [119,120])

2.3.2.2 *Totale Interne Reflexionsfluoreszenz (TIRF) als Beispiel optischer Detektion*

Bei der optischen Detektion handelt es sich häufig um Fluoreszenzspektroskopie, mit der auch noch sehr geringe Konzentrationen quantifiziert werden können. Weitere Beispiele für eine optische Detektion sind Förster–Resonanzenergietransfer (FRET), Chemilumineszenz und Oberflächenplasmonresonanz (SPR) [112]. Im Folgenden soll die vom respons® IQ verwendete Totale Interne Reflexionsfluoreszenz (TIRF) als optisches Messverfahren dargestellt werden [97,120,122,123].

An einer Grenzfläche zwischen zwei Medien mit unterschiedlichem Brechungsindex wird Strahlung im Medium mit dem niedrigeren Brechungsindex von der optischen Achse weg gebrochen. Ab einem gewissen Einstrahlwinkel (kritischer Winkel) erfolgt an der Grenzfläche eine Totalreflexion. Diese erzeugt auf der Mediumseite mit geringerem Brechungsindex ein elektromagnetisches Feld (evaneszentes Feld), das bis zu einer gewissen Tiefe in das Medium eindringt und sich auch parallel zur Oberfläche ausbreitet. Dieses kann in einem gewissen Abstand zur Grenzfläche Fluorophore anregen. Da die Energie des evaneszenten Feldes mit der Entfernung zur Phasengrenze exponentiell abnimmt, werden nur fluoreszierende Moleküle bzw. Fluorophore in einer Probenlösung angeregt, wenn sie direkt an der Oberfläche, also in der biomolekularen Erkennungsschicht, gebunden sind (ca. 200 nm

bei Einstrahlung im sichtbaren Spektralbereich [114]). Das Prinzip ist in Abbildung 10 dargestellt.

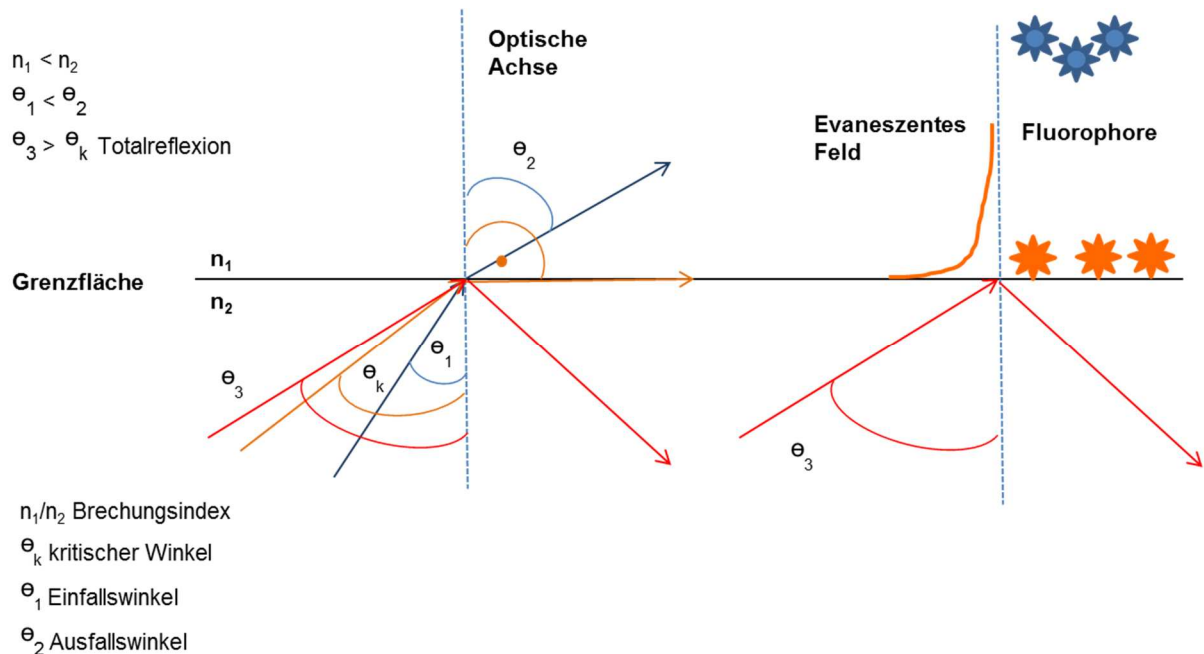


Abbildung 10 Prinzip der Totalreflexion und des evaneszenten Feldes: blau = nicht angeregt, orange = angeregt (nach [114,122])

Die angeregten Fluorophore geben die aufgenommene Energie in Form von Fluoreszenz ab, die dann gemessen werden kann und proportional zur gebundenen Menge an Fluorophoren ist. Bei der entstehenden Fluoreszenz handelt es sich um eine Art der Lumineszenz. Gibt ein Molekül, das zuvor z.B. durch ein Photon angeregt wurde, diese Energie im Zuge einer strahlenden Deaktivierung ab, kann ein Leuchten beobachtet werden (falls die Strahlung im sichtbaren Bereich abgegeben wird). Dies wird als Lumineszenz bezeichnet. Bei der Anregung durch Licht spricht man von Photolumineszenz. Es gibt zwei Arten der strahlenden Deaktivierung: die Phosphoreszenz und die Fluoreszenz. Bei der Fluoreszenz erlischt die emittierte Strahlung sofort, wenn keine weitere Anregung des Moleküls stattfindet. Bei der Phosphoreszenz kann die Emission über einen längeren Zeitraum bestehen bleiben. Fluoreszenz beruht darauf, dass ein Elektron aus einem angeregten Zustand in ein Orbital geringerer Energie fällt und hierbei ein Photon emittiert. Die Wellenlänge des emittierten Lichtes entspricht nicht der des eingestrahlten Lichtes, sondern es tritt eine Verschiebung hin zu einer höheren Wellenlänge auf (Stokes'sche Regel). Der Grund hierfür ist, dass das angeregte Elektron durch Schwingungsrelaxation, die strahlungsfrei erfolgt, auf ein

niedrigeres Energieniveau fällt. Von diesem Zustand fällt es unter Abgabe eines Photons in den Grundzustand. Durch diese Verschiebung kann bei der Detektion zwischen der Wellenlänge des eingestrahnten und des emittierten Lichtes unterschieden werden [94,124].

2.3.3 Respons® IQ

Das Messgerät respons® IQ basiert auf einem bereits zuvor entwickelten Immunosensor, der sowohl bereits für medizinische Analysen als auch für Umweltanalytik eingesetzt wurde [113,125-128]. Das Bench-Top System (Messgerät und Einweg-Cartridges) wurde von pes diagnosesysteme GmbH (Markkleeberg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Das verwendete Gerät ist in Abbildung 11 gezeigt. Für weitere Informationen zum Gerät und Messverfahren siehe auch die aufgeführten Patente [129-131].

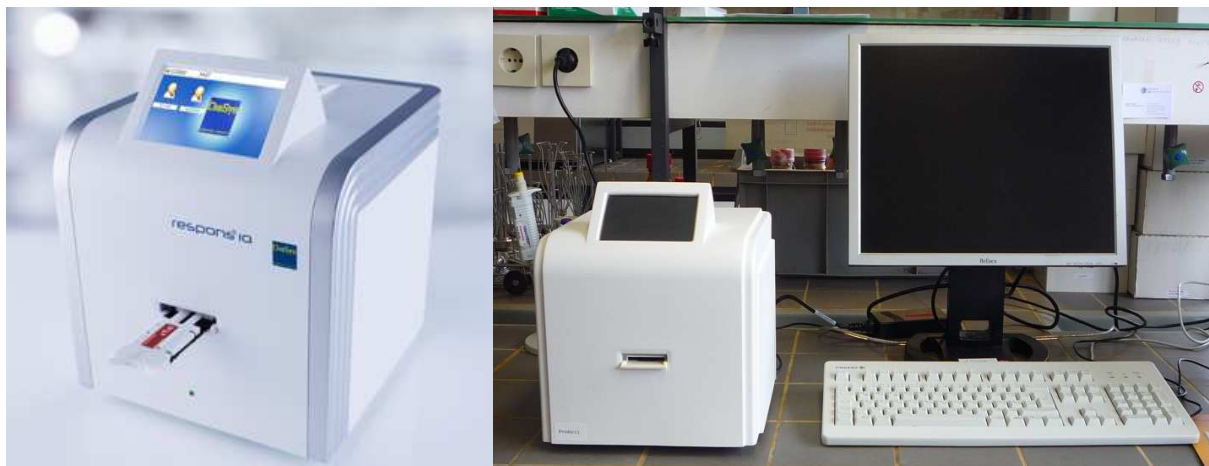


Abbildung 11 Das POCT-Analysesystem respons® IQ; während der Entwicklungsphase wird das Gerät extern über einen Computer gesteuert, um verschiedenen Parameter der Messung überprüfen zu können (rechtes Bild); später ist zur Steuerung nur noch das bereits integrierte Display zu verwenden

Cartridge Design

Die Einweg-Cartridge besteht aus drei Teilen: einem Deckel, einem transparenten Korpus und einem Boden. Weiter ist auf der Cartridge ein RFID-Chip aufgebracht (Aufkleber), der alle wichtigen Informationen der Cartridge enthält, u.a. welcher Analyt detektiert wird, die passende Kalibrierkurve und das Verfallsdatum. Im transparenten Teil ist ein Mikrofluidkanalsystem integriert, das aus zwei Mischbereichen, einem Bereich zum Lösen der gespotteten fluoreszenzmarkierten Tracer und einem Probenabfallbehälter besteht (siehe Abbildung 12). Für die anfänglichen Versuche wurde der Tracer nicht in die Cartridge

integriert, sondern lag extern vor, um mehr Flexibilität zu gewährleisten. Hier wurde der Tracer zusammen mit der Probe in die Cartridge gegeben. Bei den späteren Versuchen, und auch in der normalen Produktion, wird der Tracer in der Zone zum Auflösen des Tracers aufgebracht.

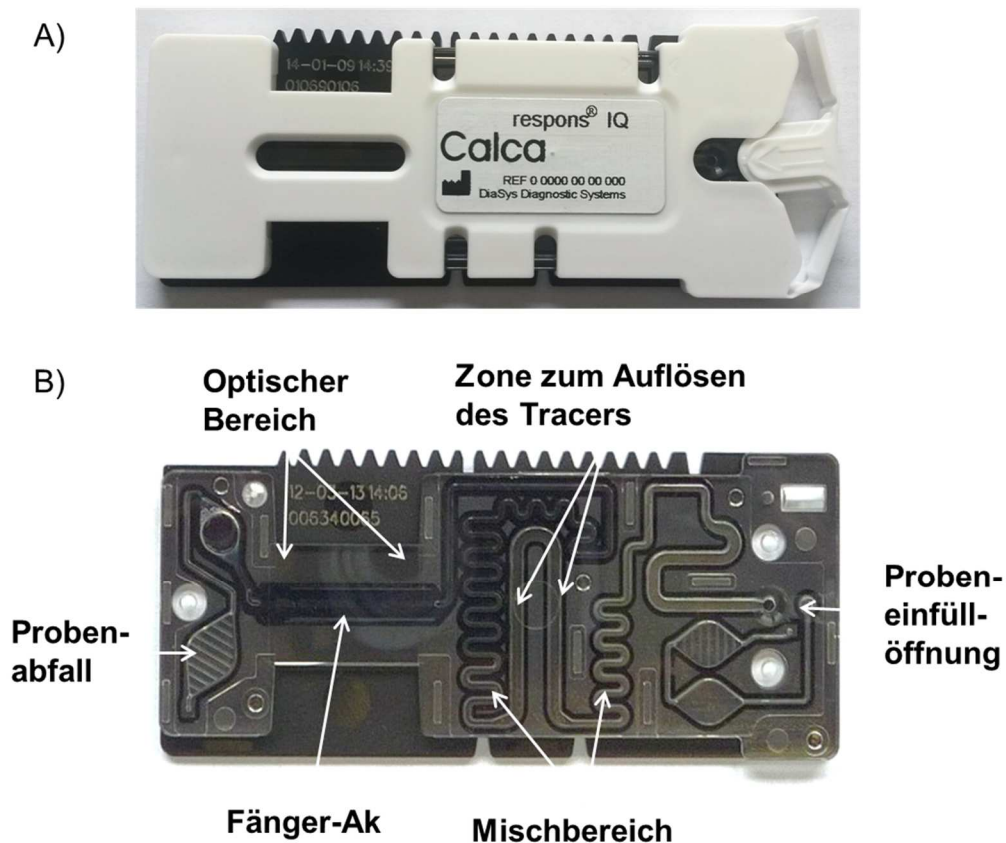


Abbildung 12 Aufsicht auf A) die ganze Cartridge; B) die Cartridge ohne Deckel; gekennzeichnet sind die einzelnen Bereiche

Die Detektions-Ak sind mit einem kommerziell erhältlichen Cyanin-Farbstoff markiert (Cy5 Analog) und werden im weiteren Text mit -F gekennzeichnet, z.B. CALCA 3C5-F. Das Messgerät enthält Fluidiksensoren, die den Probenfluss innerhalb des Mikrokanalsystems überwachen und steuern. Dies erfolgt durch Einkopplung von Licht, das an der Grenzschicht Korpus/Luft gebrochen wird. Bei Vorhandensein der Probe ändert sich der Brechungsindex, wodurch sich auch der Winkel des gebrochenen Lichtes ändert. Dadurch trifft der Lichtstrahl nicht mehr auf den Detektor, das sonst durch einige Aussparungen im Boden der Cartridge gewährleistet ist.

Weiterhin enthält der transparente Korpus einen optischen Bereich, auf dem die Fänger-Ak mittels eines Piezodispensiersystems aufgedruckt sind. Pro Streifen werden wenige nL aufgebracht. Die Ak haften adsorptiv an der Oberfläche des Korpus. Die Fänger-Ak sind in

separaten Linien gespottet, die auch „Streifen“ genannt werden (L01 – L10). Durch diese lokale Begrenzung ist es möglich, bis zu zehn verschiedene Analyten gleichzeitig zu detektieren, da in den verschiedenen Streifen verschiedene Fänger-Ak gespottet und diese Bereiche auch einzeln ausgewertet werden können. Die verschiedenen Belegungen (Spotting 1- 3), die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Nachdem die Probe eingefüllt wurde, wird die Cartridge verschlossen, d.h. die Humanprobe kann das Auslesegerät nicht verunreinigen und ist für das Personal sicher zu handhaben. Nach abgeschlossener Messung wird die Cartridge entsorgt, wodurch keine Regenerierung des Assays notwendig wird. Es handelt sich nach der IUPAC-Definition hier um einen Einweg-Biosensor [118].

Tabelle 3 Belegungen der Cartridges; PK = Positivkontrolle; NK = Negativkontrolle

Streifen	L01	L02	L03	L04	L05	L06	L07	L08	L09	L10
Spotting 1	PK	CALCA 4F6	PCT 27A3	PCT 42	PCT 6F10	CALCA 4F6	PCT 27A3	PCT 42	PCT 6F10	PK
Spotting 2	-	CALCA 4F6	CALCA 4F6	CALCA 4F6	NK	PK	-	-	-	-
Spotting 3	-	PCT 6F10	PCT 6F10	PCT 6F10	NK	PK	-	-	-	-

Messprinzip

Das Messprinzip wird in Abbildung 13 dargestellt. Die Probe (humanes Serum, Plasma oder Vollblut) wird in die Cartridge eingefüllt und dann mit positiven oder negativen Druck mittels einer Pumpe durch das Mikrokanalsystem gedrückt bzw. gezogen. Hierbei löst die Probe die fluoreszenzmarkierten Detektor-Ak und gleichzeitig wird dieses Ak-Proben-Gemisch durchmischt. Anschließend wird dieses Gemisch über den optischen Bereich gezogen, in dem die Fänger-Ak durch das Spotten immobilisiert wurden, und die Sandwich-Komplex-Bildung findet statt. Während dieses Prozesses beleuchtet eine Laserdiode den optischen Bereich kontinuierlich. Sie erzeugt ein evaneszentes Feld an der Grenzfläche zwischen dem transparenten optischen Bereich mit hohem Brechungsindex und der Probe mit niedrigem Brechungsindex auf Grund einer TIRF. Dieses evaneszente Feld regt ausschließlich

Fluorophore an, die sehr nah an der Oberfläche des transparenten Korpus lokalisiert sind, da die Intensität des evaneszenten Feldes mit dem Abstand zur Grenzfläche in der Probe abnimmt; d.h. nur diejenigen Fluorophore, die im Sandwich-Komplex gebunden sind, werden angeregt. Daher kommt es hier zu keiner Anregung nichtgebundener Fluorophore in der Probe bzw. zu einer Anregung von Molekülen in der Probe, die zu einer Eigenfluoreszenz fähig sind. Weiterhin kommt es während die Blutprobe über die Fängerstreifen gezogen wird zum Magnus-Effekt: im Randbereich der Kanäle werden die Zellen zur Rotation angeregt, wodurch die entstehende Kraft sie in die Mitte treibt. So entsteht ein Plasmasaum, in dem keine störenden Blutzellen vorkommen. Störeinflüsse der Matrix werden weiterhin dadurch vermieden, dass der benutzte Fluoreszenzfarbstoff im langwelligen Bereich emittiert. Damit wird verhindert, dass es zu einer Überlagerung mit der Eigenfluoreszenz des Hämoglobins kommt. Dies alles macht auch Waschschrte, um ungebundene Fluorophore zu entfernen, unnötig. Die Fluoreszenz wird von einem Photomultiplier detektiert. Während der Messung wird die Cartridgeoberfläche kontinuierlich gescannt, indem die Cartridge relativ zum optischen Block bewegt wird.

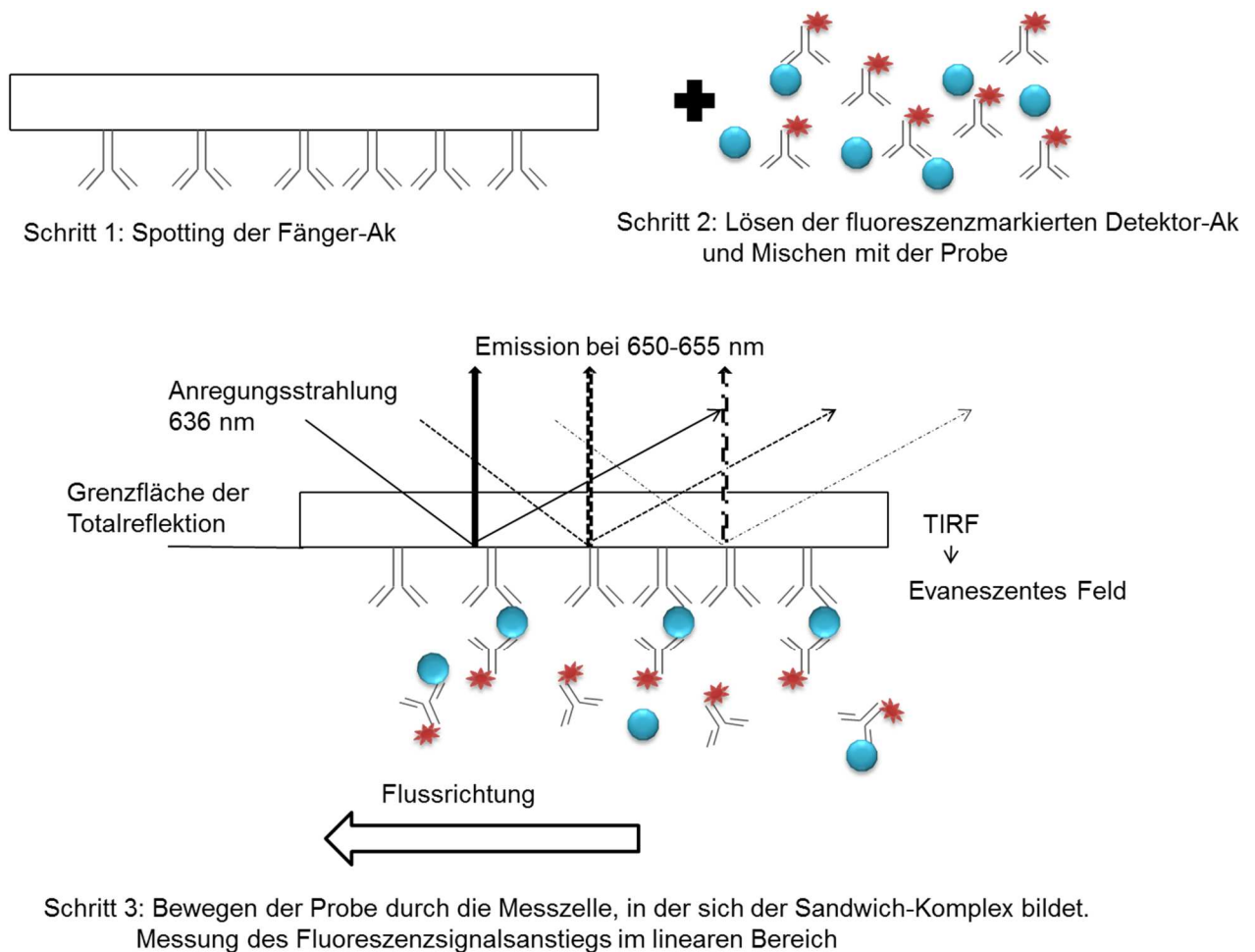


Abbildung 13 Schema des Messprinzips des respons® IQ

In diesem Messsystem wird die Kinetik der Sandwich-Komplex-Bildung gemessen. Der Anfangsanstieg des Fluoreszenzsignals ist linear und hängt proportional von der Analytkonzentration ab, da zu diesem Zeitpunkt k_{off} vernachlässigt werden kann (siehe Abbildung 14). Der Fluss durch das konstante Pumpen und die geringe Höhe der Messkapillare von ca. 200 μm wirkt einer Verarmung der Analytkonzentration in der Nähe des Fängerstreifens entgegen. So hängt die Reaktionskinetik der Sandwich-Bildung vorwiegend von der Affinität zwischen Ak und Analyt (k_{on}) und nicht von der Diffusion ab. Bei kleinen Analytkonzentrationen und einer kurzen Zeitspanne, ist der Signalanstieg dann linear.

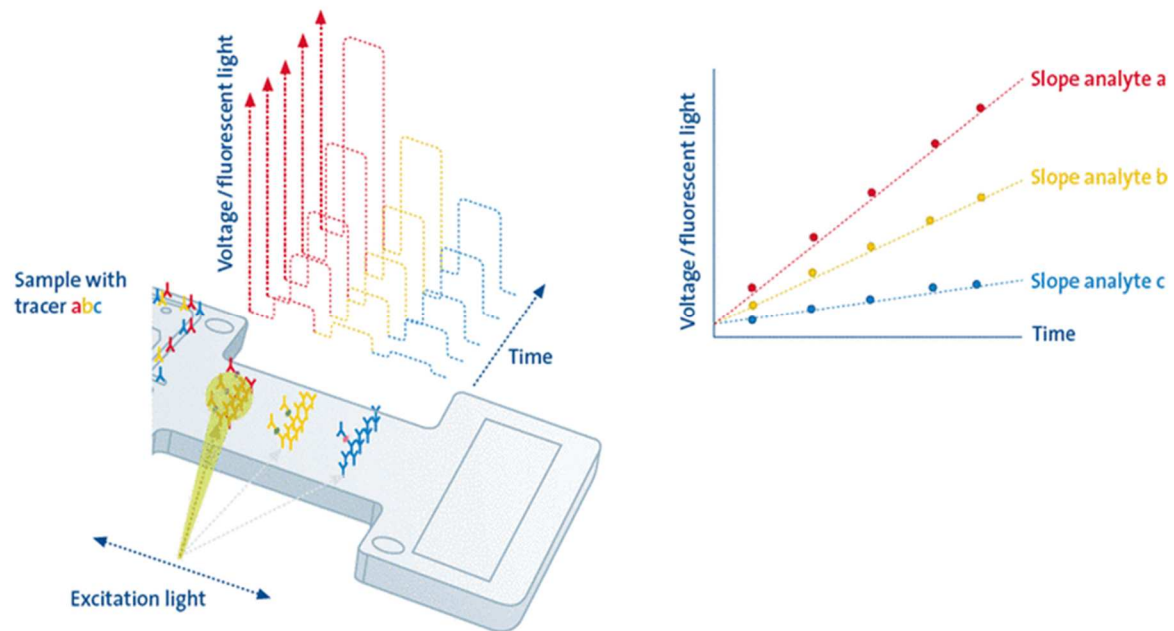
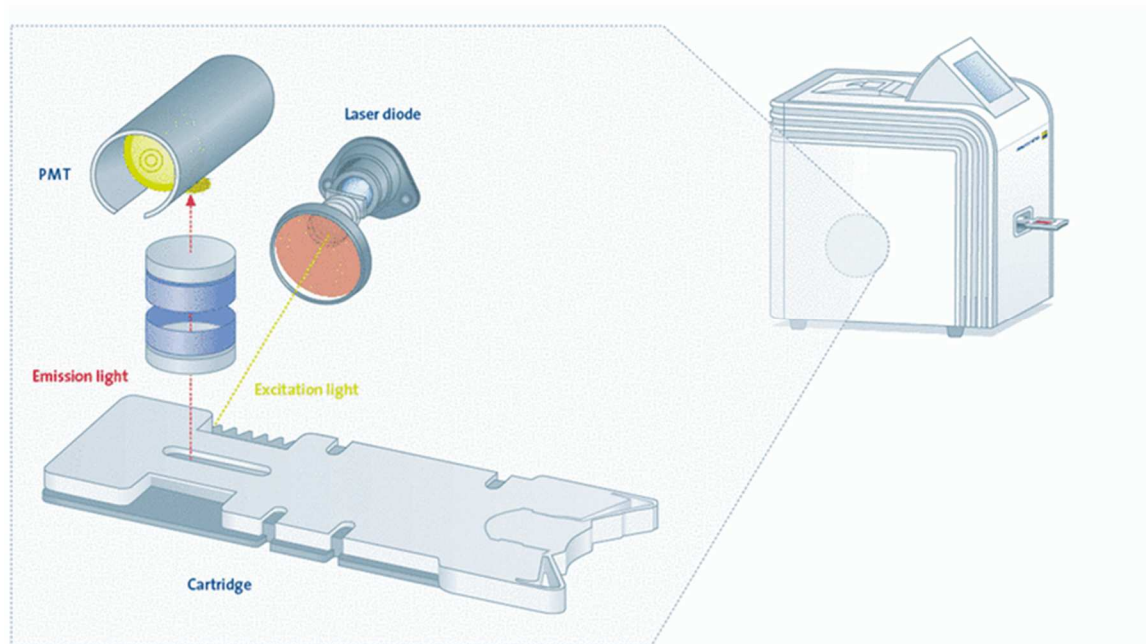


Abbildung 14 Schema des Scannens und des zeitabhängigen Fluoreszenzsignalanstiegs (zur Verfügung gestellt von pes diagnosesysteme GmbH, Marktleeburg, Deutschland)

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Entwicklung des ELISA zur Detektion von hPCT

Krämer et al. entwickelten 2008 mAk aus der Ratte zur Detektion von hPCT [22]. Auf diesen mAk basierend wurde ein Sandwich-ELISA entwickelt, der, wie sich später zeigte, natives hPCT in Patientenproben nicht binden konnte [21,83]. Daraufhin wurden erneut in einer Kooperation mit Elisabeth Kremmer (Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum München, Deutschland) 50 mAk aus der Ratte gegen hPCT hergestellt [22]. Diese wurden zuerst hinsichtlich ihres Bindungsortes, ihrer Fähigkeit zur Bildung eines sensitiven Pärchens innerhalb eines Sandwich-ELISAs und ihrer Affinität zum hPCT getestet. Anschließend wurde mit den besten mAk ein Sandwich-ELISA entwickelt. Dieser wurde optimiert und abschließend charakterisiert. Weiterhin wurden verschiedene humane rekombinante PCTs (hrPCTs) in einer internen Kooperation hergestellt, die als Standard für die Assay-Entwicklung dienen.

3.1.1 Auswahl der Antikörper für den ELISA

3.1.1.1 Antikörper-Screening und 2-dimensionale Titration

Im ersten Schritt wurden alle neu entwickelten mAk der 50 erhaltenen Hybridomazellen in Hinblick auf ihre Affinität getestet, indem die mAk im Zellüberstand mit hrPCT als Standard und kommerziell erhältlichen mAk gegen hPCT (Hytest; Turku, Finnland) in einem Sandwich-ELISA eingesetzt wurden. Neun dieser Ak zeigten hier eine ausreichend hohe Affinität zum hrPCT und wurden im nächsten Schritt auf ihre Bindungsregion im PCT-Molekül untersucht. Die Kartierung der Bindungsregion eines mAk auf dem Protein wird benötigt, um Pärchen von vornherein ausschließen zu können, die in einem Sandwich-ELISA nicht funktionieren. Dies ist der Fall, wenn beide mAk dasselbe Epitop innerhalb eines Proteins binden. Dann belegt bereits der Fänger-Ak diese Stelle, wodurch die Bindung des Detektor-Ak sterisch gehindert wird und es zu einem falsch negativen Signal kommt. Die mAk wurden erneut in Sandwich-ELISA mit kommerziell erhältlichen Maus-Ak gegen hPCT (Hytest; Turku, Finnland) getestet, deren Bindungsregion bekannt ist. Ergab der Assay mit dem hrPCT kein Signal, konnte daraus geschlossen werden, dass der neu entwickelte mAk in derselben Region bindet, wie der kommerziell erhältliche. Eine weitere Variante war, dass eine Bindung mit den zuvor

hergestellten PROC-Peptiden (Bruchstücke des hPCTs) getestet wurde, die für die erste Herstellung der PCT-Ak genutzt wurden und deren AS-Sequenz ebenfalls bekannt ist (Elisabeth Kremmer, Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum München, Deutschland) [21]. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4 Bindungsregionen der neu entwickelten mAk; 0 = keine Bindung; + = Bindung (mündliche Information, Elisabeth Kremmer, 2011);

Detektor	Fänger 3C5	Fänger 2F3	Fänger 4H6	Fänger 4A6	Fänger 4F6	Fänger 3B12	Fänger 7D4	Fänger 6H5	Fänger 2H8
Katacalcin	0	0	0	0	0	0	+	+	+
Calcitonin	+	+	+	0	0	0	0	0	0
N-Terminus	0	0	0	+	+	+	0	0	0
PROC 4	0	0	0	0	0	0	+	0	0
AS 124-134	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PROC 5	+	+	+	0	0	0	0	0	0
AS 96-107	+	+	+	0	0	0	0	0	0

Die Ak CALCA 3C5, CALCA 2F3 und CALCA 4H6 bildeten kein Sandwich mit den gegen Calcitonin gerichteten Ak und binden daher ebenfalls in dieser Region. Dies unterstützt das positive Signal mit dem PROC 5 Peptid, welches der Calcitonin-Region entspricht. CALCA 6H5, CALCA 2H8 und CALCA 7D4 erkennen die Katacalcin-Region, da es zu keiner Sandwichbildung mit den HyTest Ak kam, die diese Region des PCTs erkennen. Letzterer erkannte zusätzlich das Peptid PROC 4, ein Abschnitt des Katacalcin-Bereiches. Den N-Terminalen Bereich erkannten die Ak CALCA 4A6, CALCA 4F6 und CALCA 3B12, die auf die AS 43-55 kartiert wurden (mündliche Information Elisabeth Kremmer, 2012). Zur Illustration der einzelnen Abschnitte des PCT, sei der Leser auf Abbildung 1 in 2.1.1 verwiesen.

Im nächsten Schritt wurden die neun mAk gegeneinander erneut im Sandwich-ELISA getestet, um die besten Kombinationen für die hPCT-Detektion zu finden. Die Ergebnisse der verschiedenen Kombinationen sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5 Vorscreening der neuen PCT-Ak gegeneinander; 0 = kein Signal; + bis ++++ niedriges bis hohes Signal (mündliche Information Elisabeth Kremmer, 2011)

Detektor	Fänger	Fänger	Fänger	Fänger	Fänger	Fänger	Fänger	Fänger	Fänger
CALCA	3C5	2F3	4H6	4A6	4F6	3B12	7D4	6H5	2H8
3C5	0	0	0	++++	++++	+++	0	0	0
2F3	0	0	0	++++	++++	++++	+	0	0
4H6	0	0	0	+++	+++	+++	0	0	0
4A6	+++	++++	+++	0	0	0	++	0	0
4F6	++++	++++	++++	0	0	0	+++	0	0
3B12	++++	++++	+++	0	0	0	+	0	0
7D4	++	++	++	++	++	++	0	0	0
6H5	+	0	0	0	+	+	0	0	0
2H8	+	+	+	+	++	++	0	0	0

Anhand dieses Vorscreenings wurden die vielversprechendsten Antikörper-Kombinationen (++++ bzw. +++ Signal) in einer 2-dimensionalen Titration wiederum im Sandwich-ELISA-Format eingesetzt, um die optimale Konzentration der beiden Antikörper und das beste Pärchen für den Assay zu ermitteln. Für alle Kombinationen wurden 10 µg/mL als optimale Konzentration für den Fänger-Ak gefunden und für den jeweiligen Detektor eine Verdünnung von 1:2000. Beim Vergleich der erreichten Signale bei 4 ng/mL hrPCT erkannte die Kombinationen mit dem CALCA 4F6 als Detektor am sensitivsten hrPCT (siehe Tabelle 6). Aus den drei Kombinationen zeigte der Fänger CALCA 3C5 die besten Ergebnisse und daher wurde diese Kombination bei den folgenden Versuchen verwendet.

Tabelle 6 Screening der besten Ak-Kombinationen mit den ermittelten Ak-Konzentrationen; -- nicht getestet; + bis +++ geringes bis hohes Signal

Detektor	Fänger	Fänger	Fänger	Fänger	Fänger	Fänger	Fänger
CALCA	3C5	2F3	4H6	4A6	4F6	3B12	7D4
3C5	--	--	--	+	+	+	--
2F3	--	--	--	++	+	+	--
4H6	--	--	--	+	+	+	--
4A6	++	++	++	--	--	--	--
4F6	+++	+++	+++	--	--	--	+
3B12	+	+	+	--	--	--	--

3.1.1.2 Antikörper-Charakterisierung durch SPR-Messung mittels Biacore®

Die intern hergestellten mAk CALCA 4A6, CALCA 3C5, CALCA 4F6 und CALCA 2F3 wurden auf ihre Affinität zum hPCT mittels SPR-Messung getestet. Dies ermöglicht eine Einschätzung der Bindungseigenschaften der mAk im Sandwich-ELISA und kann somit die Auswahl eines geeigneten Pärchens unterstützen. Die ausgewählten mAk zeigten die besten Resultate im Vorscreening. Die hier dargestellten Abbildungen wurden mit der Software BIAevaluation® 4.1 (GE Healthcare Europe, München, Deutschland) erstellt.

Nach der erfolgreichen Belegung der Chips mit 10000 RU (*resonance unit*) eines Fängerantikörpers, wurden Tests zur Regenerierung der Chipoberfläche durchgeführt. Da es sich bei den entwickelten CALCA mAk um Ratten-Ak handelt, reichte die Belegung des Chips mit einem anti-Ratte Ak aus, welcher dann die verschiedenen mAk gegen PCT binden konnte. Mittels eines vorgefertigten Programms konnten die besten Bedingungen für die Regenerierung der Chipoberfläche ermittelt werden, d.h. unter welchen Bedingungen der Primärantikörper möglichst vollständig vom Sekundärantikörper gelöst werden kann, ohne dabei die Oberfläche bzw. den Primärantikörper zu zerstören. Hierzu wurde Glycin mit verschiedenen pHs (pH 3,0; 2,5; 2,0; 1,5) und MgCl₂ als Regenerierungslösung getestet. Abbildung 15 A) – D) zeigt, dass die Regenerierung mit Glycin unabhängig vom pH

unvollständig war. Eine ansteigende Basislinie (*baseline level*) zeigte, dass die Ak nicht vollständig von der Oberfläche entfernt werden konnten und die Belegung über die einzelnen Läufe (*replicate*) anstieg. Auch nahm die Anzahl der RUs bei der Belegung mit den Ak ab, was sich in einem fallenden *response level* zeigte. Dieser stellt die Netto-RUs dar, die durch eine Bindung gemessen werden. Da nicht alle Primär-Ak aufgrund der nicht vollständigen Regenerierung wieder freie Bindungsstellen aufwies, konnten weniger PCT-Ak binden, wodurch eine niedrigere Netto-Belegung gemessen wurde. Die Ergebnisse mit $MgCl_2$ (Abbildung 15 E) zeigten hingegen eine stabile Basislinie und eine relativ stabile RU-Belegung über die Zyklen hinweg. Daher wurde dieses zur Regenerierung verwendet.

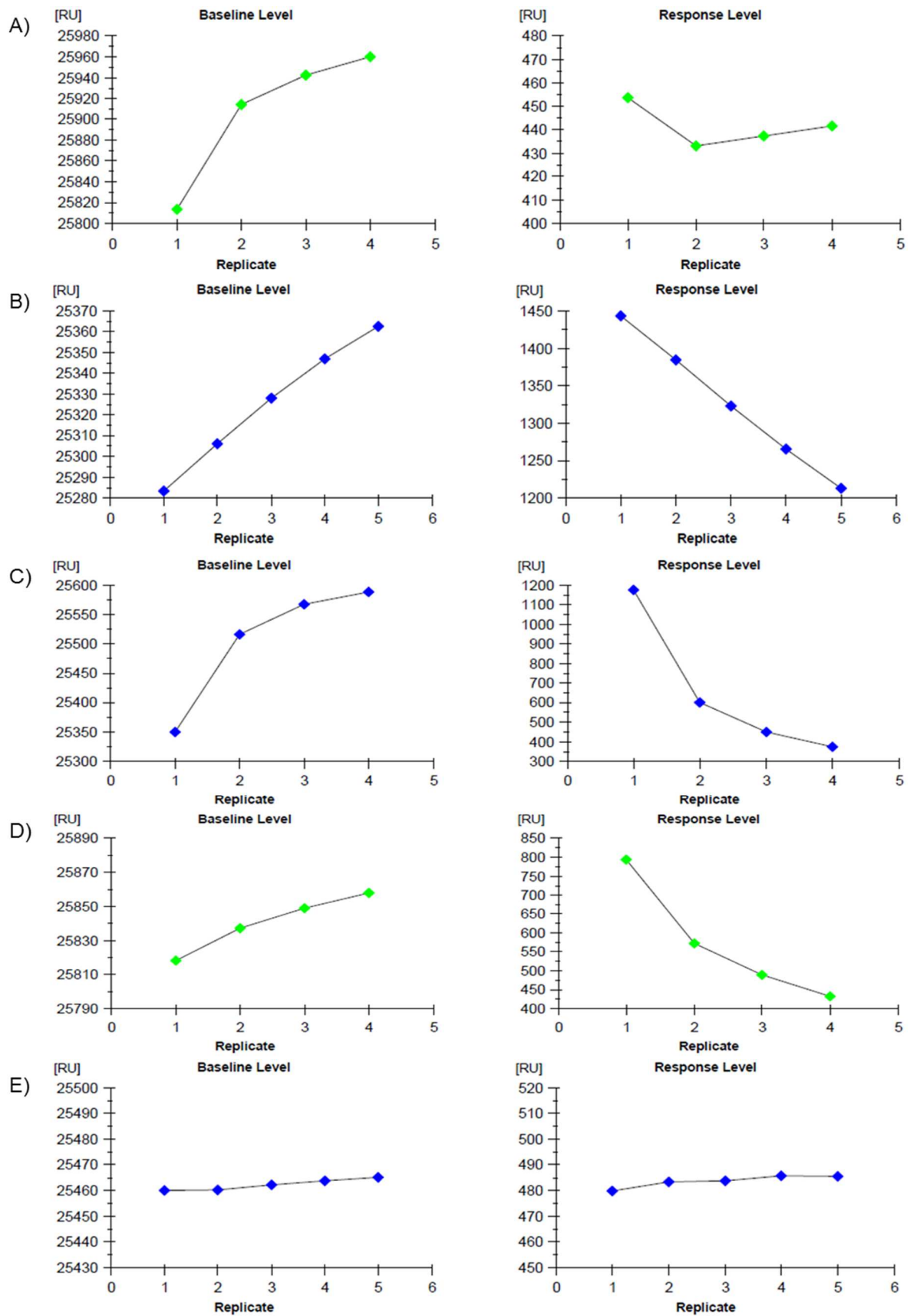


Abbildung 15 Versuche zur Regenerierung; links: RU der Basislinie nach der Regenerierung; rechts: erhaltener response level der Belegung; A) 10 mM Glycin, pH 3,0; B) 10 mM Glycin, pH 2,5; C) 10 mM Glycin, pH 2,0; D) 10 mM Glycin, pH 1,5; E) 4 mM MgCl₂

Im nächsten Schritt wurde ein Surface-Performance-Test durchgeführt, der zeigt, wie reproduzierbar die Messungen unter den gewählten Bedingungen ablaufen. Dies soll am Beispiel des CALCA 4F6 veranschaulicht werden (siehe Abbildung 16). Die Flusszelle 3 (*Flow Cell 3*) stellt die Referenzzelle dar, die eigentliche Messzelle ist Flusszelle 4 (*Flow Cell 4*).

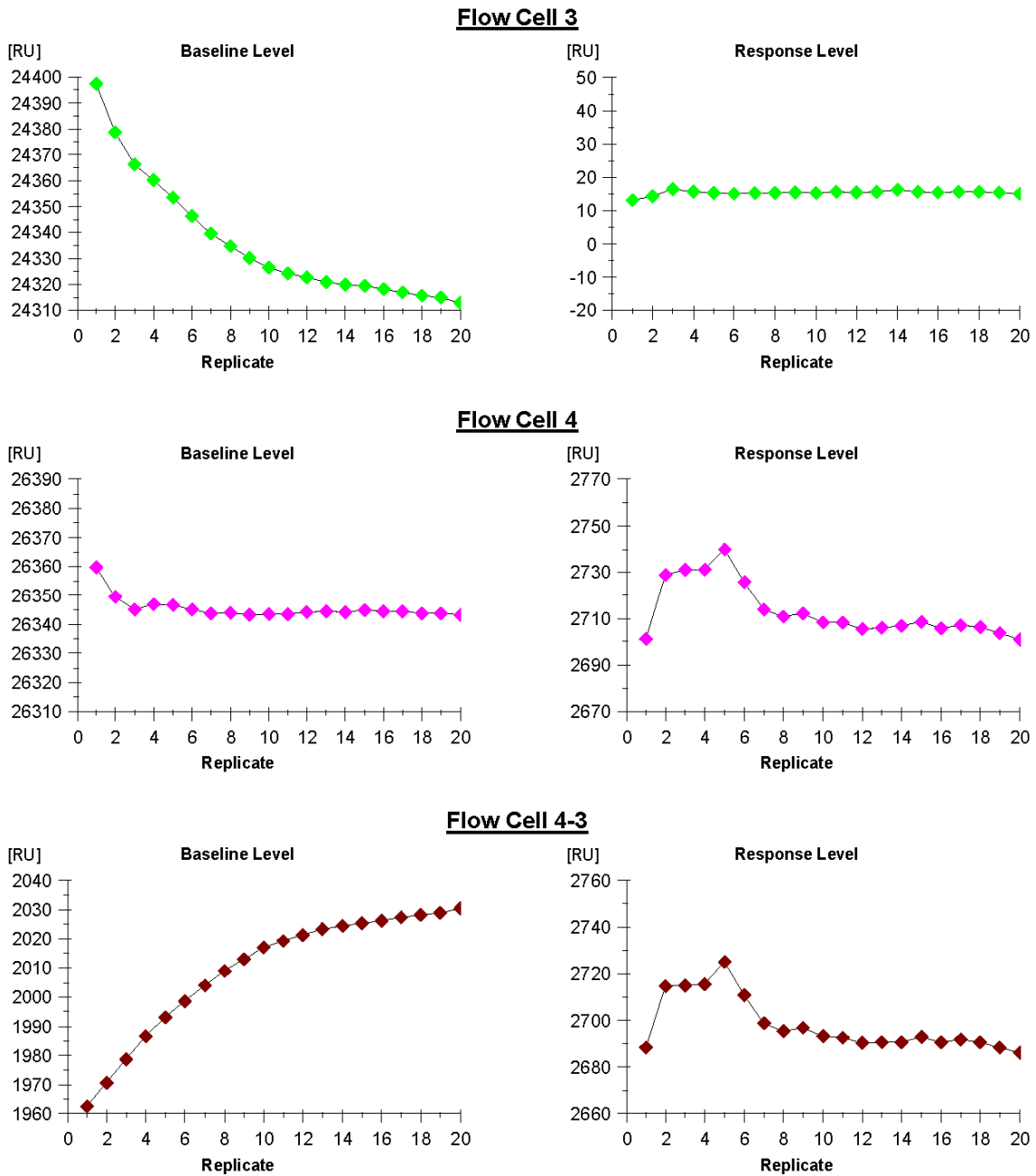


Abbildung 16 Surface-Performance-Test mit dem CALCA 4F6; links: RU der Basislinie über mehrere Läufe; rechts: erhaltener *response level* über mehrere Läufe

Wie aus diesem Test zu erkennen ist, konnte die Messung reproduzierbar wiederholt werden. Auch die Regenerierung war vollständig. Die Ergebnisse bei der korrigierten Flusszelle zeigten einen Anstieg der Basislinie. Dies hängt allerdings mit der Referenzzelle zusammen. Diese zeigte über die 20 Zyklen hinweg einen Abfall der Basislinie, was durch die Subtraktion der RU-Werte der Referenzzelle von der Messzelle zu einem sichtbaren Anstieg der Basislinie führt. Die eigentliche Messzelle (Flusszelle 4) zeigte einen konstanten Verlauf der Basislinie und des Response-Levels.

Die Messungen wurden daraufhin mit den gefundenen Bedingungen durchgeführt (siehe 5.7.1.2). Am Beispiel des CALCA 4A6 wird in Abbildung 17 ein Sensorgramm für die Messung verschiedener PCT-Konzentrationen gezeigt. Dargestellt sind die mit der Referenzzelle korrigierten Messungen. Zu sehen ist, dass der Anstieg der *response* mit zunehmender Konzentration steiler wird. Es handelt sich hier um eine Echtzeit-Messung, d.h. der Anstieg pro Zeit stellt die wirkliche Bindungsgeschwindigkeit des Analyten an den PCT-Ak dar.

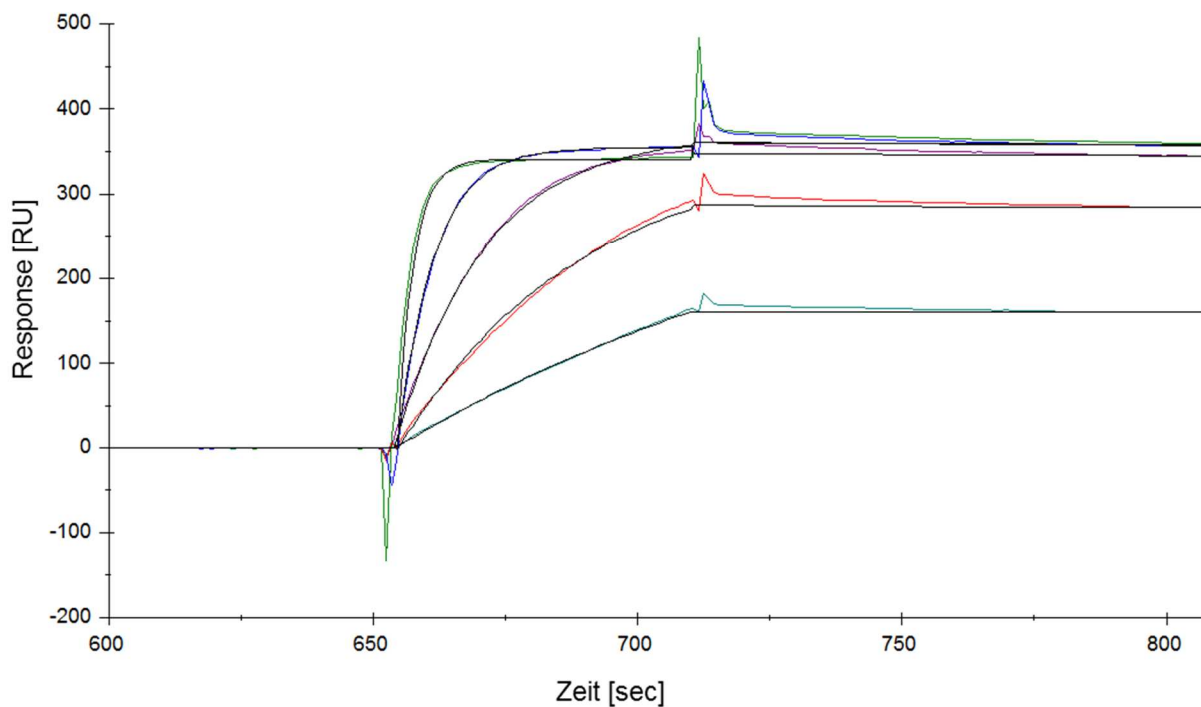


Abbildung 17 Sensorgramm verschiedener PCT-Konzentrationen; grün = 31,25 nM, rot = 62,5 nM; lila = 125 nM, blau = 250 nM, dunkelgrün = 500 nM

Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Alle Antikörper zeigten hohe Assoziationskonstanten (K_A von 10^8 - 10^{10} M^{-1}) und niedrige Dissoziationskonstanten (K_D von 10^{-9} - 10^{-10} M). Dies korreliert mit einer guten Antikörper-Antigen-Interaktion mit einer hohen

Affinität zum Analyten [132] und bestätigt somit die Ergebnisse aus der Voruntersuchung der Ak. Der Parameter X^2 ist ein Indiz für die Qualität des 1:1 Langmuir-Bindungsmodells und war für alle Messungen gut (d.h. $< 1\%$ des maximalen RU-Wertes im Sättigungsbereich).

Tabelle 7 Bindungskonstanten der gemessenen Antikörper

	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_A (M^{-1})	K_D (M)	X^2	PCT-Bindungsregion
4F6	2,2E+05	2,7E-04	8,9E+08	1,3E-09	0.3	N-terminus
3C5	4,5E+04	9,0E-06	6,5E+09	2,0E-10	0.7	Calcitonin
4A6	5,1E+05	7,3E-05	7,8E+09	1,4E-10	2.1	N-terminus
2F3	3,1E+04	5,5E-05	8,5E+10	1,9E-09	0.1	Calcitonin

3.1.2 ELISA Entwicklung für humanes PCT

Die besten Ak aus den Vorversuchen wurden dann in den optimierten Konzentrationen im Sandwich-ELISA eingesetzt (Fänger-Ak: CALCA 3C5, [10 μ g/mL]; Detektor-Ak: CALCA 4F6-B, Vdg. 1:2000) und dieser hinsichtlich des Blockings, der Substratlösung und Vermeidung von unspezifischen Bindungen durch Substanzen in humanem Plasma optimiert. Das verwendete Protokoll des Assays beruht auf einem bereits zuvor entwickelten und veröffentlichten Protokoll dieser Gruppe für einen Sandwich-ELISA zur Detektion von hPCT [22]. Abschließend wurde der optimierte Sandwich-ELISA anhand verschiedener Validierungsparameter charakterisiert.

3.1.2.1 Optimierung des hPCT-ELISAs

Als erstes wurden vier verschiedenen Substanzen zum Blocken der unbesetzten Oberfläche zwischen den Fänger-Ak in den Kavitäten der Mikrotiterplatten getestet: 1% Magermilchpulver (MP, alte und neue Charge), 2% BSA und 1% Casein. Die Platten ($n = 2$, je Blocksubstanz 24 Kavitäten) wurden geblockt und anschließend Streptavidin-HRP für 1 h inkubiert. Abschließend wurde Substrat zugegeben, um zu sehen, welche Blocksubstanz das niedrigste

Hintergrundsignal erzeugt bzw. ob eine Blocksubstanz das zugefügte Streptavidin gebunden hat. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt. BSA zeigte das höchste Hintergrundsignal und wurde als Blocksubstanz ausgeschlossen. MP und Casein erzeugten ähnliche Signale. Da MP Biotin enthalten kann und es somit zu falsch positiven Signalen kommen kann, wurde Casein als Blocksubstanz ausgewählt (mündliche Information Elisabeth Kremmer, 2011).

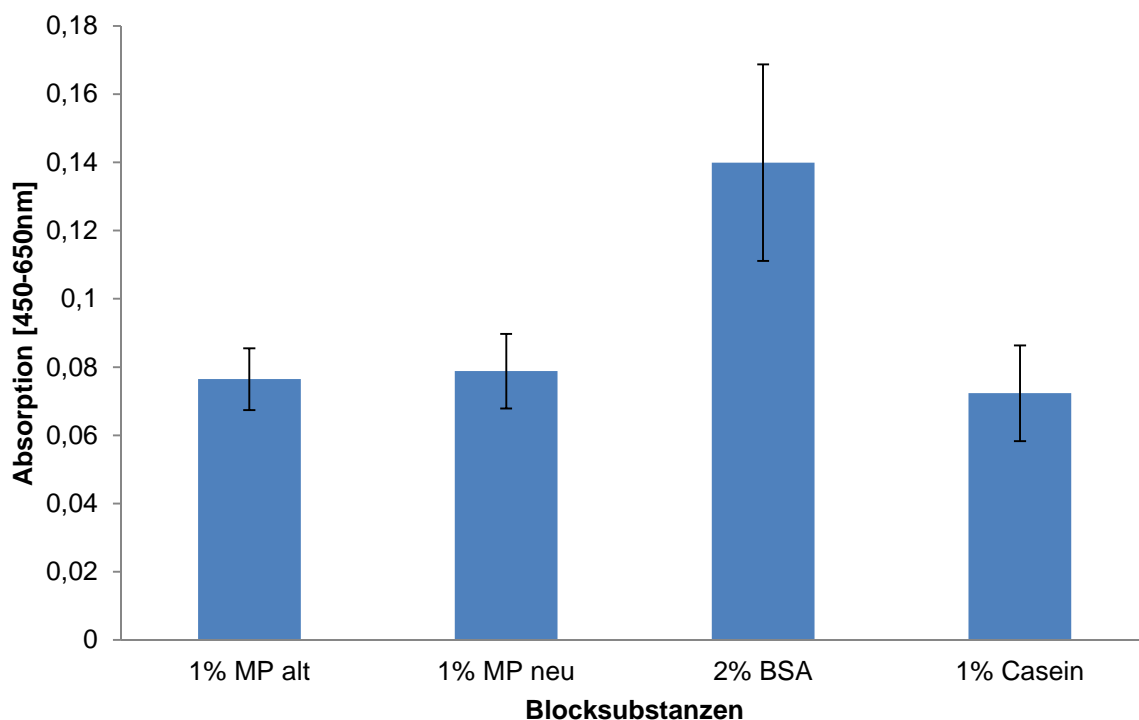


Abbildung 18 Hintergrundsignale der getesteten Blockreagentien; MP = Magermilchpulver; alt = alte Charge, neu = neue Charge; m = 48

Des Weiteren wurden zwei verschiedene Substrate getestet. Einerseits das kommerziell erhältliche 1-Step Ultra TMB-ELISA in der Originalkonzentration und eine selbst hergestellte Substratlösung, die TMB in einer Konzentration von 96 µg/mL enthielt (siehe 5.6). Es wurden mit den beiden Substraten jeweils mehrere Standardkurven aufgenommen. Es zeigte sich, dass mit dem kommerziell erhältlichen Produkt die Farbreaktionen stabiler verliefen (Daten nicht gezeigt). Der Grund hierfür war die Abweichung der TMB-Einwaage zwischen den verschiedenen Substratlösungen. Die geringen Mengenunterschiede im Fehlerbereich der verwendeten Waage führten z.T. zu starken Schwankungen bei den erhaltenen Absorptionswerten, so dass eine Vergleichbarkeit zwischen den Platten nicht mehr gegeben

war. Daher wurde das 1-Step Ultra TMB-ELISA als Substrat für die weiteren Versuche gewählt, da dieses über verschiedene Chargen hinweg stabile Werte lieferte.

Zur Reduzierung unspezifischer Anbindung bei der Messung von humanen Plasmaproben, wurden dem humanen EDTA-Plasma Ratten-Ak mit einer Konzentration von 50 µg/mL zugesetzt und 1% Ziegen Serum. Diese Zusätze waren bei den Versuchen zur Reduzierung unspezifischer Anbindung auf dem respons[®] IQ am geeignetsten. Da der entwickelte Sandwich-ELISA die gleichen Ak verwendet wie der Sandwich-FIA auf dem respons[®] IQ, wurden diese Zusätze auch für den Sandwich-ELISA übernommen (siehe 3.3.2.1).

3.1.2.2 Charakterisierung des hPCT-ELISAs

Der entwickelte hPCT-Assay (Ak-Paar CALCA 3C5/CALCA 4F6-B) wurde abschließend anhand verschiedener Validierungsparameter charakterisiert, die bei der *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) gelistet und beschrieben wurden [133,134].

Da die verwendeten mAks gegen Abschnitte des PCTs gerichtet sind, die nach der proteolytischen Spaltung als Bruchstücke in humanen Patientenproben vorkommen, ist es wichtig abzuklären, dass in dem entwickelten Assay nur das gesuchte intakte PCT detektiert wird und nicht dessen Abbauprodukte. Die Kreuzreaktivität (CR) der PCT-Ak gegen die Bruchstücke Katalcalcin und Calcitonin wurde bereits früher getestet. Es trat keine Kreuzreaktivität bis 1000 ng/mL auf [22]. Das zeigt, dass der Assay PCT spezifisch erkennen kann.

Zusätzlich wurde für eine Beispielstandardkurve die Nachweisgrenze (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ) berechnet sowie der Arbeitsbereich (WR, *working range*). Der LOD beschreibt die kleinste Analytmenge, die noch detektierbar, aber nicht zwingend quantifizierbar ist. Der LOQ zeigt die kleinste quantifizierbare Analytmenge in einer Probe [126,133]. Die Berechnung des LOD und LOQ wurde gemäß der IUPAC-Bestimmungen durchgeführt [135]. Der WR zeigt die untere und obere Grenze, in denen der Assay richtig und präzise arbeitet [126,133]. Er wurde nach einer in der Literatur gängigen Methode berechnet [83,84,136].

LOD = Leerwert + 3x Standardabweichung des Leerwertes

LOQ = Leerwert + 10x Standardabweichung des Leerwertes

WR = 10 - 90 % des Signalbereiches

Für eine Beispielstandardkurve mit einem IC_{50} von 0,96 ng/mL wurden ein LOD von 0,06 ng/mL und ein LOQ vom 0,18 ng/mL berechnet. Der WR lag hier zwischen 0,41 – 3,34 ng/mL (siehe Abbildung 19).

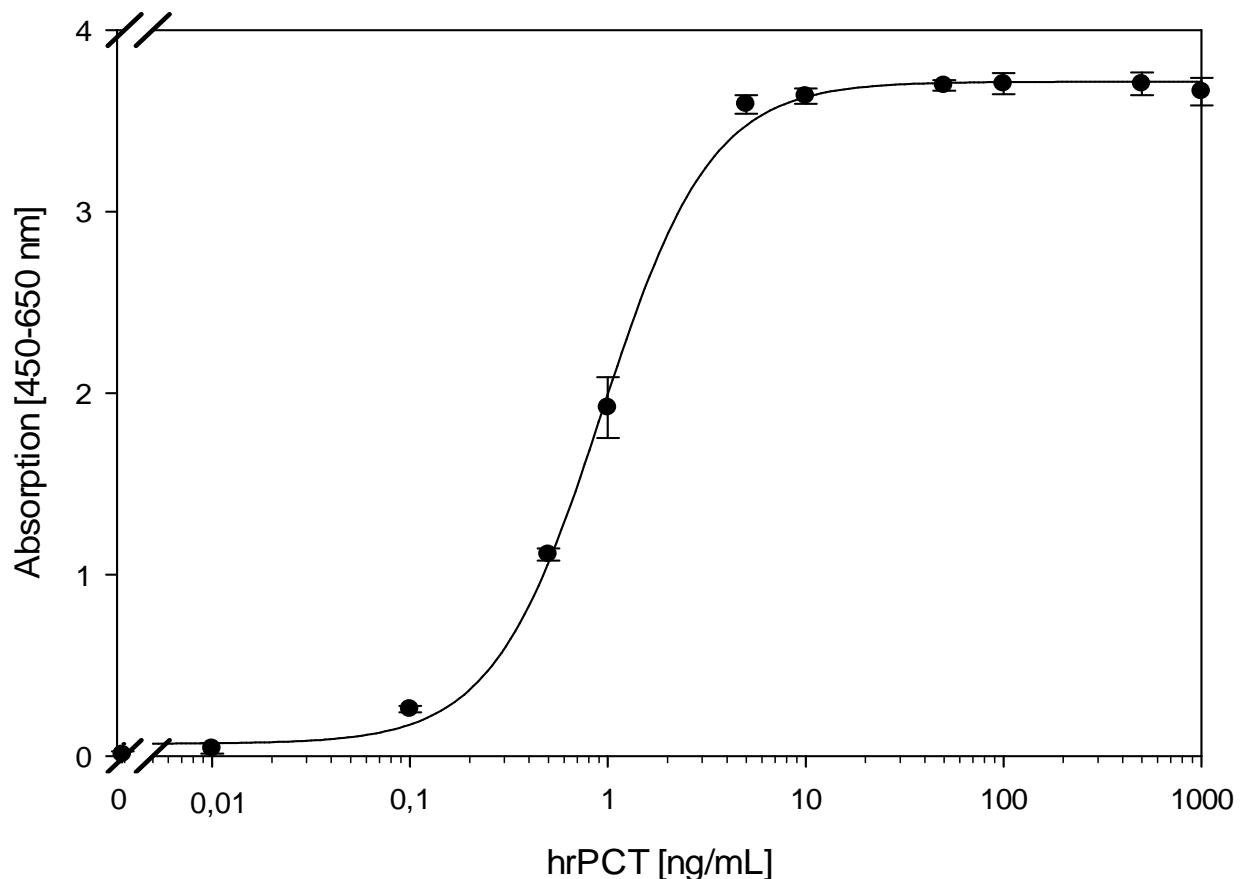


Abbildung 19 Beispiel einer Standardkurve erstellt mit dem Ak-Paar CALCA 3C5/CALCA 4F6-B und PCT1-116 als Standard; n = 11; m = 3

Des Weiteren wurden der Intra-Assay-Variationskoeffizient (IaA-CV) und der Inter-Assay-Variationskoeffizient (IeA-CV) als Maß für die Präzision des PCT-Assays bestimmt und die Wiederfindung des Analyten in dotierten Plasmaproben zur Bestimmung der Richtigkeit des Assays [91,95,137] berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Die IaA-CVs zeigen, dass der Assay innerhalb einer Platte bis zu einer Konzentration von 7,5 ng/mL richtig arbeitet (%CVs < 20%). Über verschiedene Tage und Platten hinweg, zeigt sich eine zufriedenstellender IeA-CV von 0,1 bis einschließlich 2 ng/mL mit einer Abweichung von unter 20%. Dieser Bereich zeigt ebenfalls den Arbeitsbereich des Assays und deckt sich gut mit

dem zuvor berechneten WR. Bei der Wiederfindung zeigt sich eine Überbestimmung der Soll-PCT-Konzentrationen über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich. Ein möglicher Grund hierfür ist, dass die PCT-Konzentration in der Stammlösung nicht direkt vor der Herstellung der Proben erneut bestimmt wurde und es Hinweise gibt, dass das hrPCT bei der Lagerung zu Agglomeration neigt und es so zu einer Konzentrationsänderung kommen könnte, wenn sich die Agglomerate trennen.

Tabelle 8 Zusammenfassung der Ergebnisse der Assay-Charakterisierung; die Ergebnisse der Platte 1 sind mit I gekennzeichnet, die der Platte 2 mit II; angegeben ist der Mittelwert (MW) \pm StabW.S

C_{soll} (ng/mL)	$C_{\text{ist-I}}$ (ng/mL)	IaA-CV _I (%)	$C_{\text{ist-II}}$ (ng/mL)	IaA-CV _{II} (%)
10	9,34 \pm 2,03	24,7	16,71 \pm 4,98	29,8
7,5	8,22 \pm 1,8	1,8	14,88 \pm 2,57	17,3
5	5,97 \pm 1,05	11,7	8,97 \pm 0,96	10,7
2	1,91 \pm 0,08	4,7	1,53 \pm 0,14	4,9
0,5	0,54 \pm 0,02	3,1	0,39 \pm 0,01	2,2
0,25	0,31 \pm 0,02	1,5	0,23 \pm 0,02	0,9
0,1	0,17 \pm 0,01	2,8	0,16 \pm 0,01	7

C_{soll} (ng/mL)	C_{ist} (ng/mL)	IaA-CV (%)	Wiederfindung (%)
10	14,05 \pm 7,14	50,80	140,52
7,5	10,89 \pm 3,04	27,94	145,14
5	6,20 \pm 1,91	30,87	124,04
2	1,85 \pm 0,35	18,99	92,26
0,5	0,53 \pm 0,10	18,12	106,05
0,25	0,28 \pm 0,04	14,60	113,10
0,1	0,16 \pm 0,01	9,32	157,00

3.1.3 Herstellung von rekombinatem humanen PCT für die Verwendung als Standard

Im Laufe der Entwicklung des Sandwich-ELISAs wurde beschlossen, innerhalb dieser Arbeit einen eigenen Standard für die Assayentwicklung herzustellen. Ein Grund hierfür war, dass kommerziell die verkürzte Form des hPCTs, das hPCT3-116, weder nativ noch rekombinant erhältlich war. Die verkürzte Form wurde bisher nur enzymatisch hergestellt, indem das PCT1-116 mittels des Nierenenzym Dipeptidyl Peptidase IV verkürzt wurde [52]. Ein weiteres Problem war, dass beim käuflich erwerbbaaren humanem rekombinanten PCT (hrPCT) mit His-Tag von Prospec, das bisher als Standard verwendet wurde, z.T. große Unterschiede in den Chargen auftraten. Aus diesen Gründen wurden in einer internen Kooperation mit Dr. Arie Geerlof (Institut für Strukturbiologie, Helmholtz Zentrum München, Deutschland) hrPCT in verschiedenen Formen rekombinant hergestellt, d.h. biotechnologisch in gentechnisch veränderten Organismen. Das Ziel war beide native Formen des hPCTs herzustellen, das komplette Protein (PCT1-116) und die verkürzte Form, der die ersten beiden AS am N-terminalen Bereich fehlen (PCT3-116). Tabelle 9 fasst alle hrPCTs zusammen.

Tabelle 9 Zusammenfassung der intern hergestellten und der kommerziell erhältlichen hrPCTs

	<i>HMGU GAM-PCT</i>	<i>HMGU M-PCT</i>	<i>HMGU PCT1-116</i>	<i>HMGU PCT3-116</i>	<i>Prospec 1-116</i>	<i>Prospec + His-Tag</i>	<i>HyTest 1-116</i>
<i>Molekular gewicht</i>	13,1 kDa	12,8 kDa	12,7 kDa	12,5 kDa	12,7 kDa	17,13 kDa	12,7 kDa
<i>AS- Sequenz</i>	Gly-Ala- Met-1-116	Met-1- 116	1-116	3-116	1-116	His-Tag*- 3-116	1-116
<i>Preis</i>					5200 €/mg	4800 €/mg	n.a.

(* = Unbekannte AS-Sequenz)

Da die Herstellung der verschiedenen hrPCTs nicht im Rahmen dieser Arbeit erfolgte, wird für Details auf folgende Publikation hingewiesen: Herstellung und Aufreinigung des hrPCT1-116 und hrPCT3-116 siehe Rascher et al. [138]. Es war möglich, beide native Formen des hPCTs

rekombinant herzustellen. Der Methioninrest, der während des Klonens hinzugefügt wurde, bzw. die ersten beiden Aminosäuren des PCTs wurden durch zwei Durchführungen ortsspezifischer Mutagenesen entfernt. Beide Konstrukte für das hrPCT wurden in *E.coli* gut in einer löslichen Form exprimiert und in einer typischen Ausbeute von 35 mg/L_{Kultur} erhalten.

3.1.3.1 *Vergleich mit kommerziell erhältlichem humanen rekombinanten PCT*

Die von Dr. Arie Geerlof (Institut für Strukturbiologie, Helmholtz Zentrum München, Deutschland) intern hergestellten hrPCTs wurden mit kommerziell erhältlichen hrPCTs von Prospec und HyTest auf seine Erkennung im ELISA verglichen, um eventuelle Unterschiede in den Proteinen zu erkennen. Es wurden jeweils Standardkurven von den einzelnen zu vergleichenden hrPCTs auf einer Mikrotiterplatte erstellt, damit die gleichen Bedingungen für die Messung hergestellt wurden. Die eingesetzten Konzentrationen in ng/mL wurden bei der Auswertung in molare Konzentrationen (mol/mL) mit den in Tabelle 9 aufgeführten Molekulargewichten umgerechnet.

Im ersten Schritt wurde ein hrPCT hergestellt, das zusätzlich drei AS am N-terminalen Ende der AS-Sequenz aufweist (Glycin-Alanin-Methionin, im Weiteren GAM-PCT). Dieses wurde mit dem bisher verwendeten hrPCT mit His-Tag von Prospec verglichen, indem von beiden Standardkurven erstellt und diese verglichen wurden. Hier zeigte sich, dass das neu hergestellte GAM-PCT sensitiver erkannt wurde. Dies hängt wahrscheinlich mit der Bindungsregion der Ak zusammen. Im verwendeten Assay bindet der Detektor-Ak CALCA 4F6-B im N-terminalen Bereich, der durch den sehr großen His-Tag teilweise verdeckt werden könnte. Somit können weniger Sandwich-Komplexe gebildet werden als im Falle eines Proteins, bei dem der N-terminale Bereich frei zugänglich ist.

Als eine zweite Charge des GAM-PCT zur Verfügung stand, wurde diese mit der ersten Charge verglichen. Es sollte überprüft werden, wie stabil das hrPCT reproduziert werden kann. Dies war wichtig, da es bei dem kommerziell erhältlichen hrPCT mit His-Tag von Prospec z.T. deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Chargen gab, die Einfluss auf die Ergebnisse im ELISA hatten (Abbildung 20). Diese Unterschiede konnten nicht auf die Lagerung zurückgeführt werden, da für beide Standardkurven frisch aufgetaute Stammlösungen verwendet wurden und die Lagerung im Gefrierschrank den Abbau des PCTs hemmt (siehe 3.1.3.1). Auch waren die erhaltenen Standardkurven mit derselben Stammlösung über einen weiten Zeitraum stabil (Daten nicht gezeigt). Das intern hergestellte hrPCT zeigte hingegen ein weitgehend identisches Verhalten im ELISA (siehe Abbildung 21)

und kann somit reproduzierbar hergestellt werden (IC_{50} (Charge 1) = $1,48e^{-13}$ mol/mL, IC_{50} (Charge 2) = $1,33e^{-13}$ mol/mL).

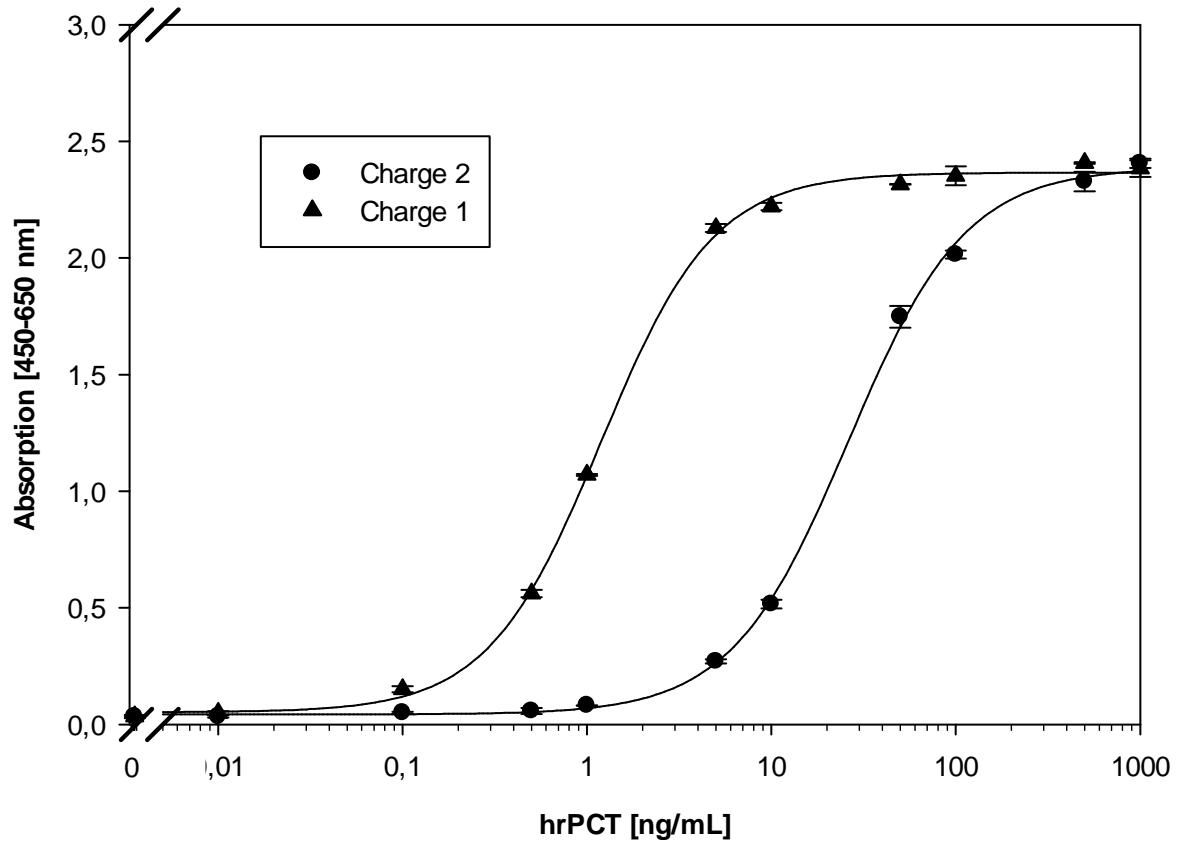


Abbildung 20 Vergleich zweier hrPCT-Chargen von Prospec auf derselben Mikrotiterplatte, Ak-Paar CALCA 3C5/CALCA 4F6-B; n = 11; m = 4

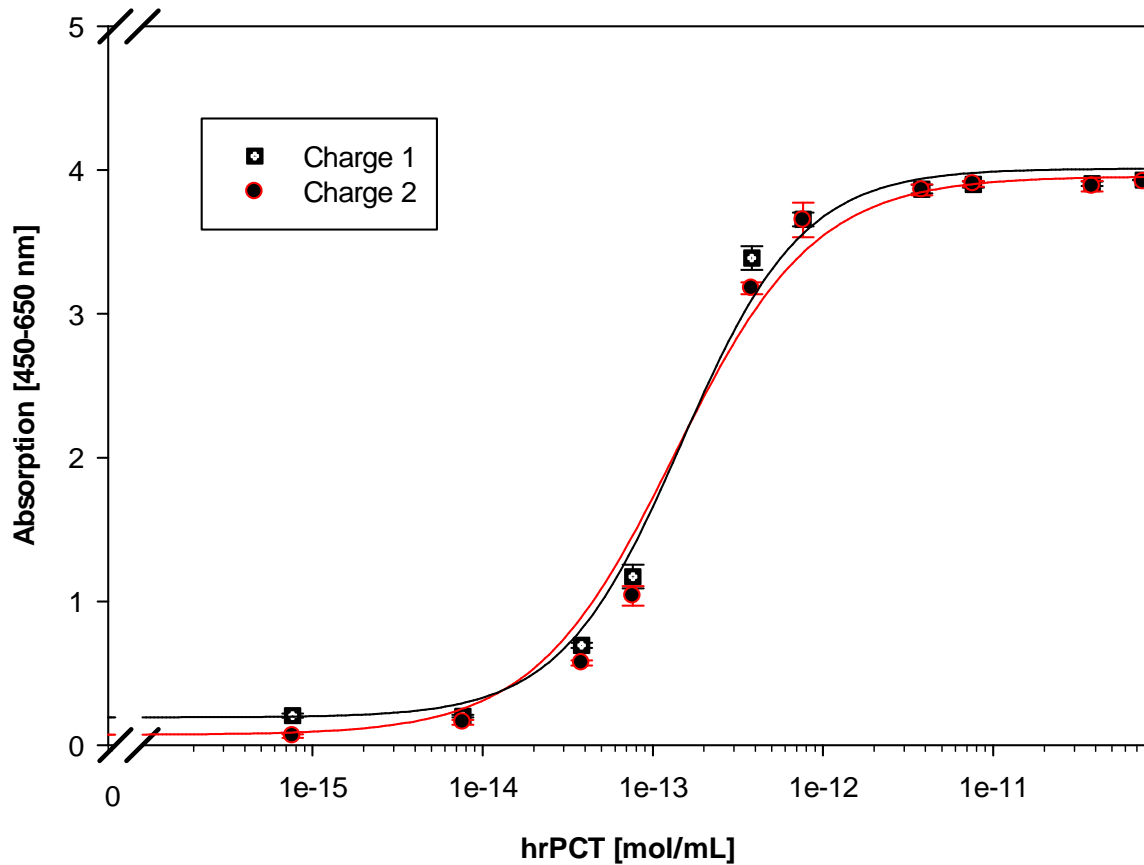


Abbildung 21 Vergleich zweier Chargen des intern hergestellten GAM-PCTs, Ak-Paar CALCA 3C5/CALCA 4F6-B in PBS-Puffer; n = 11; m = 4

Im nächsten Schritt wurden von Herrn Dr. Geerlof weitere verschiedene hrPCTs hergestellt. Es standen am Schluss GAM-PCT, M-PCT (Methionin-Rest), PCT1-116 und PCT3-116 zur Verfügung. Letztere entsprechen den Formen, die, der Literatur zur Folge, nativ im Menschen bei einer Sepsis gefunden werden können [53]. M-PCT und gerade auch das PCT3-116 waren bisher nicht käuflich erhältlich.

Abbildung 22 zeigt den Vergleich dieser vier verschiedenen PCTs mit dem Ak-Paar CALCA 3C5/CALCA 4F6-B in PBS-Puffer (A) und den Vergleich mit dem entwickelten Assay in humanem EDTA-Plasma (B).

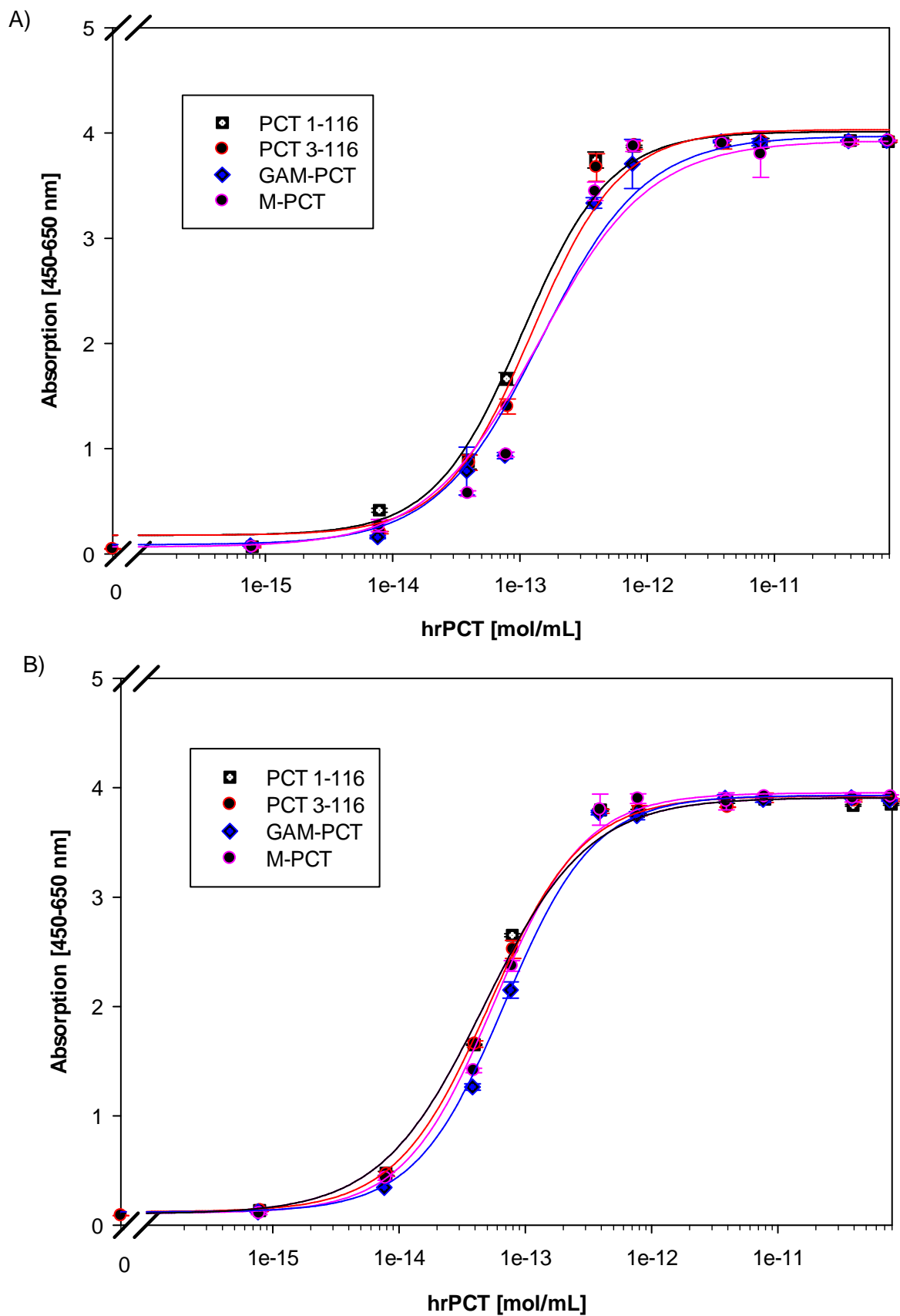


Abbildung 22 Vergleich der intern hergestellten hrPCTs, Ak-Paar CALCA 3C5/CALCA 4F6-F20; schwarz = PCT 1-116, rot = PCT 3-116, blau = GAM-PCT, pink = M-PCT; A) in PBS-Puffer; B) in humanem EDTA-Plasma; n = 11, m = 2

Einerseits erkennt man an diesem Versuch, dass die zwei natürlichen Formen des PCTs am sensitivsten vom entwickelten Assay erkannt werden. Da beide gleich sensitiv erkannt werden, ist es möglich unseren Assay während der kompletten Erkrankung anzuwenden ($CR\%_{\text{Plasma}} = 90\%$). Des Weiteren ist ersichtlich, dass umso mehr zusätzliche AS am N-terminalen Bereich des PCTs angefügt sind, eine Verschiebung des IC_{50} -Wertes zu höheren Konzentrationen erfolgt. Die Antikörper erkennen spezifische Abschnitte der Aminosäuresequenz. Der Fängerantikörper CALCA 3C5 bindet in der Calcitonin-Region, wohingegen der Detektorantikörper CALCA 4F6 in der N-terminalen Region des PCTs bindet. Die zusätzlichen AS scheinen die Bindung des Detektors zu beeinflussen. Bei der geringen Größe einer oder dreier AS im Vergleich zu einem His-Tag ist der Einfluss allerdings sehr gering. Andererseits kann man ebenfalls erkennen, dass der entwickelte Assay sehr gut in humanem EDTA-Plasma funktioniert, da hier sogar noch bessere IC_{50} -Werte erreicht werden, d.h. der Assay sensitiver arbeitet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10 Zusammenfassung der IC_{50} -Werte in [mol/mL] der intern hergestellten hrPCTS in PBS-Puffer und humanem EDTA-Plasma

	PBS-Puffer	humanes EDTA-Plasma
GAM-PCT	$1,45e^{-13}$	$6,85e^{-14}$
M-PCT	$1,39e^{-13}$	$5,66e^{-14}$
PCT3-116	$1,24e^{-13}$	$5,22e^{-14}$
PCT1-116	$1,04e^{-13}$	$4,71e^{-14}$

Anschließend wurde das intern produzierte PCT1-116 mit zwei kommerziell erhältlichen PCT1-116 verglichen. Alle drei hrPCTs werden im entwickelten Assay ähnlich sensitiv erkannt. Etwas schlechter im Vergleich zeigt sich das hrPCT von HyTest. Die erhaltenen Standardkurven der drei hrPCTs zeigt Abbildung 23. Die ermittelten IC_{50} -Werte sind wie folgt: IC_{50} (HyTest) = $7,42e^{-14}$ mol/mL; IC_{50} (intern) = $5,5e^{-14}$ mol/mL; IC_{50} (Prospec) = $4,96e^{-14}$ mol/mL. Damit konnte das intern hergestellte PCT1-116 für die Entwicklung des PCT-Assays als Standard verwendet werden, da es qualitativ keine Unterschiede aufwies.

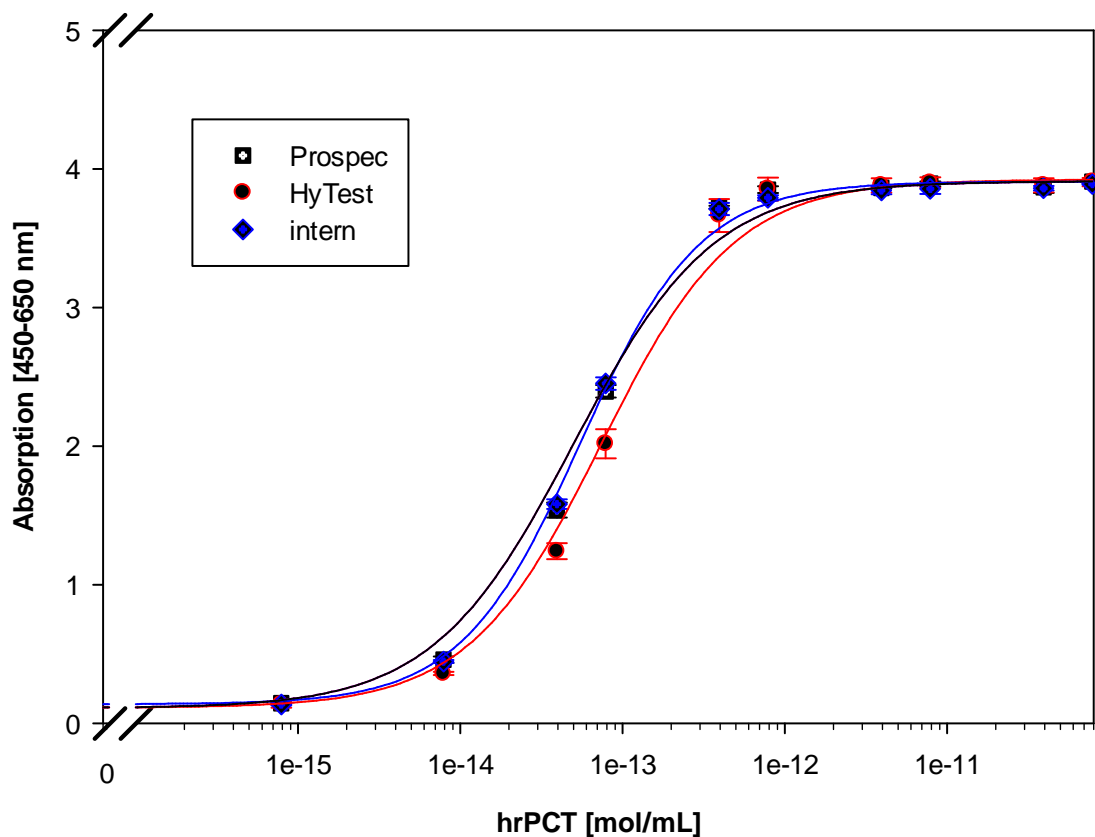


Abbildung 23 Vergleich der zwei kommerziell erhältlichen hrPCT1-116 von HyTest und Prospec mit dem intern hergestellten; Ak-Paar CALCA 3C5/CALCA 4F6-B in humanem EDTA-Plasma; n = 11; m = 2-3

3.1.3.2 Lagerstabilität des hrPCT1-116

Mit dem auf dem respons[®] IQ entwickelten Assay wurde der Einfluss der Temperatur und der Dauer der Lagerung auf die hrPCT-Konzentration einer Plasmaprobe getestet, um eine optimale Lagerung des Standards zu gewährleisten. Hierzu wurde humanes 0-Plasma mit 1 ng/mL PCT1-116 aufgestockt, diese Stammlösung aliquotiert und im Kühlschrank bzw. Gefrierschrank gelagert. Die Aliquote wurden frisch (am Tag der Herstellung), nach einem, sieben und 28 Tagen gemessen. Die Wiederfindung bezieht sich in diesem Versuch auf die erhaltene Signalhöhe der verschiedenen Proben im Vergleich zu der frisch angesetzten Stammlösung P01, da die Signalhöhe direkt mit der hrPCT-Konzentration zusammenhängt. Es wurde für diesen Versuch dieselbe Charge an Cartridges verwendet, wodurch identische Assaybedingungen herrschten, die ein Vergleichen der Signallintensitäten ermöglichten. Die erhaltenen Unterschiede in den Signalintensitäten hingen so nur von der detektierbaren hrPCT-Menge ab. Der Abbau stellt den Signalabfall der Proben im Vergleich zur Stammlösung über den gesamten Zeitraum (Abbau gesamt %) bzw. zwischen den einzelnen Proben (Abbau

%) dar. Das erhaltene Signal der Probe P01 wurde als 100% angenommen und die Signale der weiteren Proben auf die Probe P01 bezogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11 Zusammenfassung der Ergebnisse zum Versuch zur Lagerstabilität von PCT1-116, K = Kühlschrank, G = Gefrierschrank; aufgeführt ist der MW einer Dreifachmessung \pm Standardabweichung

	Wiederfindung (%)	Abbau gesamt (%)	Abbau (%)
P01 - frisch	100 \pm 6,2	0	0
P02- 1d K	81,24 \pm 3,09	18,8	18,8
P05- 1d G	92,31 \pm 2,16	7,7	7,7
P03 - 7d K	80,20 \pm 2,90	19,8	2,8
P06 - 7d G	89,88 \pm 1,48	10,1	1,5
P04 - 28d K	75,15 \pm 0,35	24,9	0,9
P07 - 28d G	94,04 \pm 0,61	6,0	0,2

Es gibt einen relativ starken Abbau von 8 - 19% bei der frisch angesetzten Stammlösung hin zur ersten Messung nach einem Tag. Hier macht es dazu einen Unterschied, ob das Aliquot im Kühlschrank (19%) oder Gefrierschrank (8%) gelagert wurde. Eine Einflussmöglichkeit wäre die Temperatur der Probe bei der Messung, da die frisch angesetzte Stammlösung RT besaß, die nächsten Proben allerdings relativ zeitnah nach dem Herausnehmen aus dem Kühlschrank gemessen wurden und dadurch etwas kühler waren. Eine weitere Möglichkeit ist, dass es bei dem PCT1-116 wirklich innerhalb der ersten 24 Stunden zu einem starken Abbau in die Spaltprodukte kommt. Diese Spaltprodukte (Katacalcin, Calcitonin) werden von unserem Assay nicht erkannt. Insgesamt kommt es zu einem deutlich geringeren Abbau bei der Lagerung im Gefrierschrank mit 6%. Im Vergleich kommt es bei der Lagerung der Aliquote im Kühlschrank über die getesteten 28 Tage zu einem deutlichen Abbau des PCT1-116 (25%). Diese Verhältnisse sind in Abbildung 24 graphisch dargestellt.

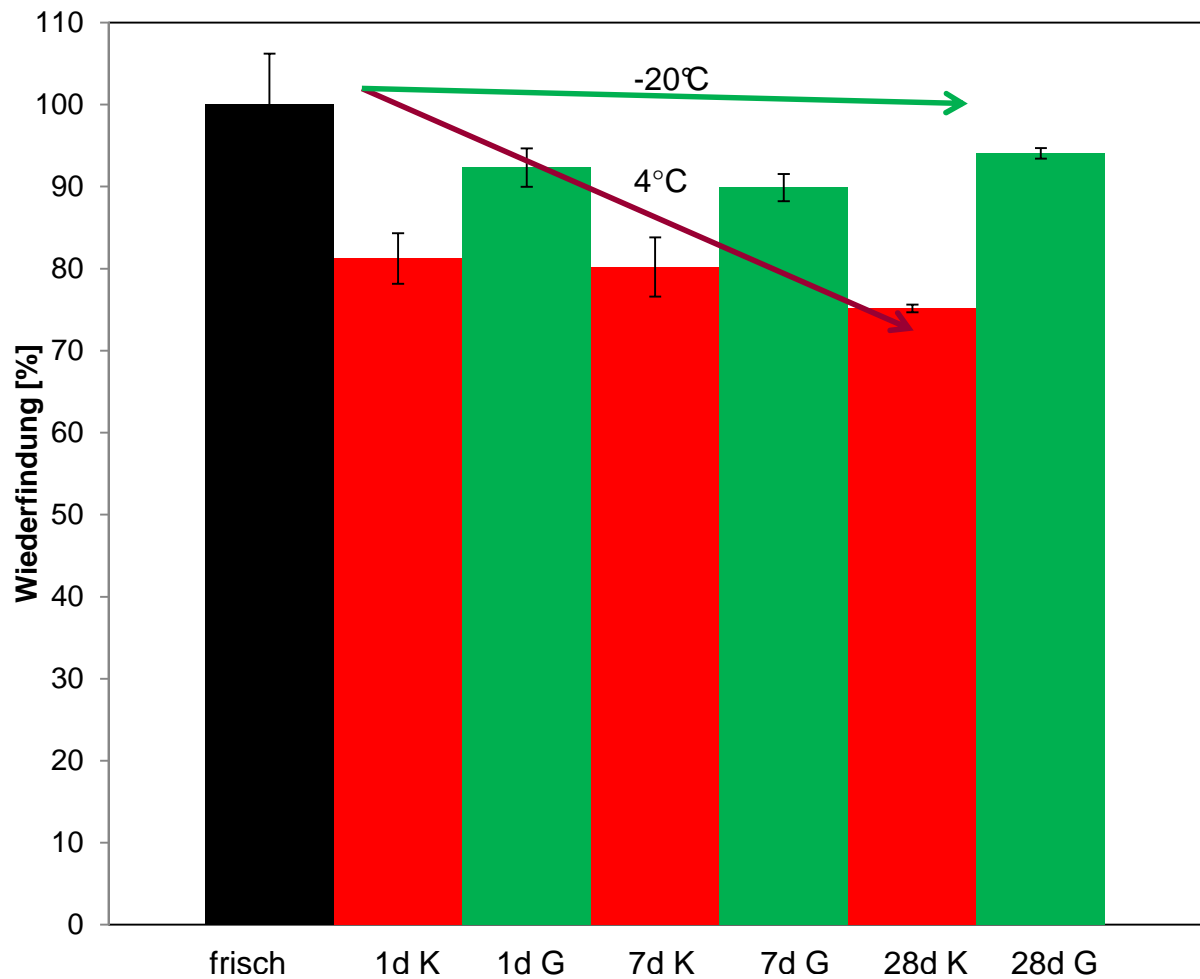


Abbildung 24 Lagerstabilität von PCT1-116 in Kühlschrank (K) bzw. Gefrierschrank (G) über einen Zeitraum von 28 Tagen

Meisner et al. führten einen Versuch zum Einfluss der Lagerung von Plasmaproben mit hPCT von Patienten mit diagnostizierter Sepsis, schwerer bakterieller Infektion oder einer erhöhten PCT-Konzentration nach einer Operation durch [50]. In dieser Studie zeigte sich bei einer Lagerung der Proben bei 4°C nach 24 Stunden ein Abbau von 12 %. Da es sich hierbei um die native Form des PCTs handelt und die Konzentration mit einer unterschiedlichen Methode durchgeführt wurde, sind die hier aufgeführten Ergebnisse mit den Ergebnissen von Meisner et al. eingeschränkt vergleichbar, liegen aber in einem ähnlichen Bereich. Struck et al. untersuchten ebenfalls die Stabilität von nativen PCT1-116 ex vivo. Der Abbau des PCTs in Plasma bei 4°C betrug hier nach 24 h <10 % und lag so geringfügig niedriger als bei Meisner et al. [53]. In dieser Studie wurden die Patientenproben allerdings mit einem selbstentwickelten Assay gegen das PCT1-116 gemessen. Der geringere Abbau bei -20°C

zeigt, dass dies die beste Lagerungsmöglichkeit ist. Daher wurden die Stammlösungen an hrPCTs im weiteren Verlauf im Gefrierschrank gelagert.

3.2 ELISA-Entwicklung für equines PCT

Da Sepsis und bakterielle Infektionen auch bei Pferden eine große Rolle spielen, gibt es Überlegungen, dass auch hier PCT ein möglicher Marker zur Diagnose sein kann. Da das ePCT eine sehr hohe bis vollständige Homologie mit dem hPCT aufweist (vgl. Abbildung 3 und Tabelle 4), sollte in einem Teilprojekt der vorliegenden Arbeit getestet werden, ob der für das menschliche PCT entwickelte Assay auch bei der Diagnose von ePCT eingesetzt werden kann. Die mAk, die im Sandwich-ELISA für hPCT eingesetzt werden, binden an AS-Sequenzen, die die höchste Homologie zum ePCT aufweisen. Dies unterstützt die Theorie, dass ein Nachweis von ePCT mit dem entwickelten Assay möglich sein sollte. Um den Assay an die Detektion von ePCT anzupassen, war die Herstellung ePCTs als Standard nötig, da diese nicht kommerziell erhältlich war. In diesem Rahmen wurde zum ersten Mal, nach meinem Stand des Wissens, ePCT rekombinant hergestellt. Da die Herstellung nicht Teil dieser Arbeit war, sei für die Herstellung und Aufreinigung des erPCTs auf die Publikation Rieger et al. [139] verwiesen. Das Konstrukt für ePCT wurde in löslicher Form gut in *E.coli* exprimiert. Hier betrug die Ausbeute 28 mg/L_{Kultur}.

Der unter 3.1.2 beschriebene entwickelte Assay für hPCT wurde für die Anwendung bei Pferden adaptiert. Hierzu wurden einige zusätzliche Versuche zur Adaption und Optimierung innerhalb einer Bachelorarbeit durchgeführt [140]. Die Ergebnisse werden im Folgenden kurz zusammengefasst.

Die neun intern entwickelten Ak und zwei Ak von HyTest (PCT 27A3 und PCT 6F10) wurden in einem erneuten Ak-Screening einerseits mit erPCT und andererseits mit nativen ePCT getestet. Bei diesem Versuch stellte sich heraus, dass das bereits für den humanen PCT-Assay verwendete Ak-Paar CALCA 3C5/CALCA 4F6-B als einziges sowohl das rekombinante als auch das native ePCT erkennt und ausreichend hohe Signale liefert. Im nächsten Schritt wurden verschiedene Zusätze gegen das Auftreten unspezifischer Anbindung getestet. Auch hier zeigte sich, wie bereits beim Assay für hPCT, dass die Zugabe von 50 µg/mL Ratten-Ak derselben Subklasse, der die verwendeten mAk angehören, die beste Reduzierung der Hintergrundsignale des 0-Plasmas erreicht. Als Blocksubstanz wurde für den ePCT-Assay zuerst 5% (w/v), später 3,3% (w/v) BSA-Lösung verwendet und die selbsthergestellte Substratlösung (siehe 5.6).

Der adaptierte Sandwich-ELISA wurde anschließend mittels Intra-Assay Variationskoeffizienten (IaA-CV), Inter-Assay Variationskoeffizienten (IeA-CV) und Arbeitsbereich (WR) charakterisiert (für Erläuterungen siehe 3.1.2.2). Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Der Arbeitsbereich des Assays wurde in Anlehnung an die Richtlinien der FDA festgelegt [137]. Diese besagen, dass die zu medizinischen Zwecken verwendeten ELISAs einen IeA-CV von <15% zeigen müssen. Gemäß dessen wurde der Arbeitsbereich auf 25 bis 1000 ng/mL festgesetzt, da in diesem Bereich die Anforderungen erfüllt werden. Die Wiederfindung im Arbeitsbereich zeigt eine Unterbestimmung der Soll-PCT-Konzentration, was vermutlich auf Verdünnungseffekte beruht.

Tabelle 12 Zusammenfassung der Ergebnisse der Assay-Charakterisierung; die Ergebnisse der Platte 1 sind mit I gekennzeichnet, die der Platte 2 mit II, die der Platte 3 mit III; angegeben ist der Mittelwert (MW) \pm StabW.S

C_{Soll} (ng/mL)	$C_{\text{Ist-I}}$ (ng/mL)	IaA-CV _I (%)	$C_{\text{Ist-II}}$ (ng/mL)	IaA-CV _{II} (%)	$C_{\text{Ist-III}}$ (ng/mL)	IaA-CV _{III} (%)
5	7,6 \pm 2,3	30,5	10,4 \pm 0,3	2,6	/	/
10	14,0 \pm 3,5	24,9	16,4 \pm 0,9	5,6	9,9 \pm 2,2	22,5
25	26,9 \pm 1,9	7,2	26,3 \pm 2,7	10,4	26,0 \pm 4,5	17,2
50	47,4 \pm 0,4	0,8	38,4 \pm 0,6	1,5	44,9 \pm 1,0	2,3
100	75,4 \pm 3,6	4,8	65,0 \pm 2,5	3,9	79,1 \pm 1,9	2,4
250	240,3 \pm 21,9	9,1	194,7 \pm 20,2	10,4	215,7 \pm 5,4	2,5
500	432,5 \pm 33,4	7,7	409,1 \pm 27,8	6,8	471,6 \pm 33,9	7,2
1000	882,0 \pm 159,9	18,1	865,7 \pm 105,0	12,1	795,7 \pm 64,3	8,1
2500	1897,8 \pm 914,9	48,2	1402,2 \pm 113,0	8,1	1459,7 \pm 169,6	11,6

C_{Soll} (ng/mL)	C_{Ist} (ng/mL)	IaA-CV (%)	Wiederfindung (%)
5	9 \pm 2	22	178
10	13 \pm 4	26	135
25	26 \pm 3	11	106
50	44 \pm 4	9	87
100	73 \pm 7	9	73
250	214 \pm 25	12	87
500	438 \pm 39	9	88
1000	848 \pm 108	13	85
2500	1587 \pm 524	33	63

Weiterhin wurde die CR der verwendeten Ak ermittelt. Da die Ak gegen humanes PCT gerichtet sind, wurden Standardkurven von hrPCT und erPCT verglichen. Der CR-Wert wurde als 409 ermittelt, d.h. 1 ng/mL erPCT ergibt nur 1/409 des Signales von hrPCT. Dies hat nur geringe Auswirkungen auf die Detektion, da die Versuche mit equinen Patientenproben zeigten, dass die PCT Konzentrationen im Pferd deutlich höher sind als im Menschen [41].

Mit dem optimierten und charakterisierten PCT-Assay wurden daraufhin erste Patientenproben gemessen. Hierbei wurden Proben von 24 klinisch unauffälligen und fünf septischen Pferden verwendet. Diese wurden angelehnt an den Sepsis-Score von Breuer et al. [27] eingeteilt (für Details siehe [139]). In der Gruppe der Kontrollpferde wurden vier Pferde als fraglich hinsichtlich Sepsis eingestuft (4-6 Punkte im Sepsis-Score) und 20 als negativ (≤ 3 Punkte im Sepsis-Score). Die Gruppe der fünf septischen Pferde wurde auch mit dem Sepsis-Score als positiv für Sepsis eingestuft (≥ 7 Punkte im Sepsis-Score). Diese Einteilung stützt das Ergebnis des entwickelten ELISAs. Hier zeigte die Sepsisgruppe eine signifikant höhere mittlere PCT-Konzentration von 8450 ng/mL als die Kontrollgruppe mit 47 ng/mL ($P = 0,0006$). Zwei Proben der Kontrollgruppe wurden als statistische Ausreißer identifiziert. Bei einer zweiten Untersuchung waren diese Pferde immer noch klinisch unauffällig und eine Untersuchung der Plasmaproben drei Wochen später zeigte die gleichen erhöhten PCT-Werte. Die Ursache für dieses Phänomen ist bislang noch nicht geklärt.

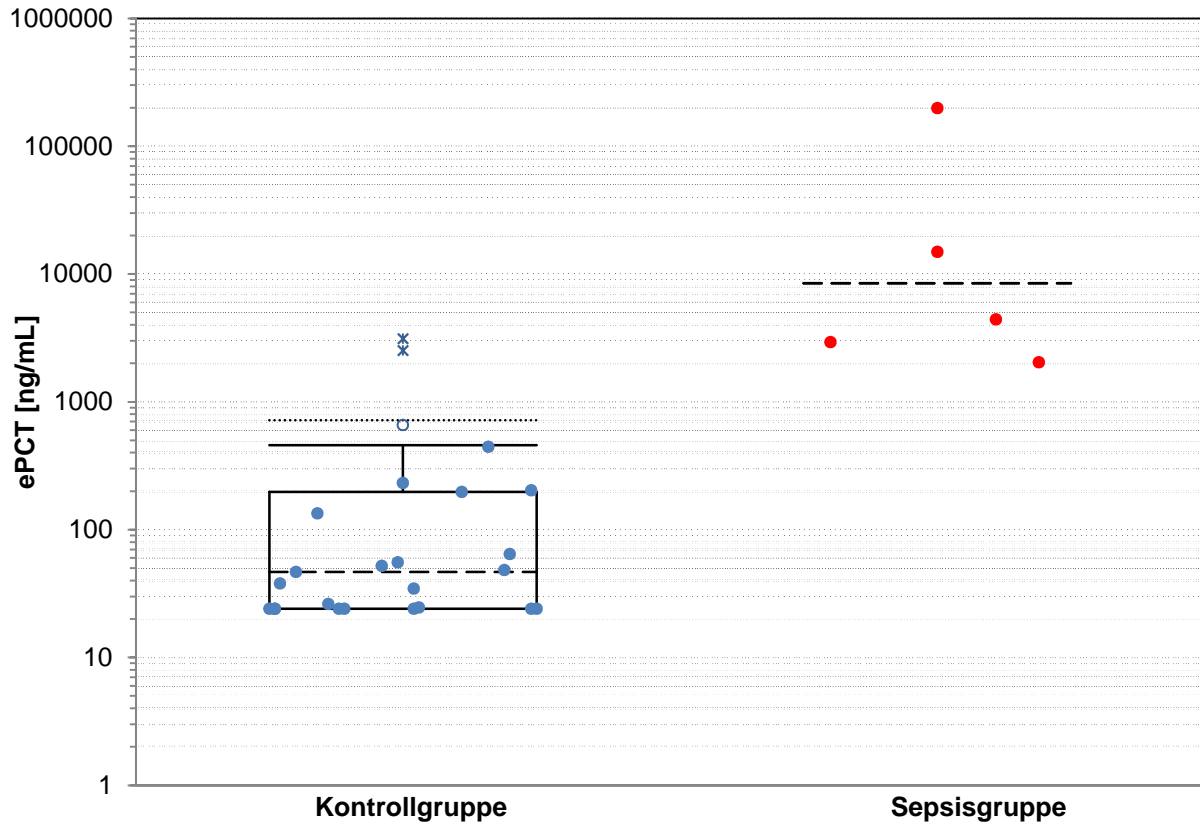


Abbildung 25 Box-Plot von equinen Plasmapatientenproben; der Median ist durch die gestrichelte Linie gekennzeichnet

Ein Punkt, der hier noch erwähnt werden muss, ist, dass das verwendete 0-Plasma von einem klinisch gesunden Pferd stammt, dieses aber eine Grundkonzentration an ePCT besitzt. D.h., die erhaltenen Werte stellen relative Konzentrationen in Bezug auf diesen Grundlevel dar. Bisher wurde noch kein durchschnittlicher PCT-Wert für gesunde Pferde bestimmt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es mit dem entwickelten Assay möglich ist ePCT in einem klinisch relevanten Konzentrationsbereich zu messen. Weiterhin zeigen die Versuche mit Patientenproben, dass mit Hilfe eines PCT-Assays die Möglichkeit besteht Sepsis zu diagnostizieren.

3.3 Entwicklung des PCT-Assay für eine POCT-Anwendung auf dem Analysegerät respons® IQ

Das Kernthema der vorliegenden Arbeit war die Übertragung des zuvor im Sandwich-ELISA Format entwickelten Assays zur Detektion menschlichen PCTs auf das POCT-Gerät respons® IQ. Der Assay sollte den wichtigen Punkten einer POCT-Anwendung genügen, wie keine Probenvorbereitung, schnelle Ergebnisse und einfache und sichere Handhabung. Hierzu wurde der Assay in ein Sandwich-FIA-Format übertragen, wobei erneut ein Ak-Screening durchgeführt wurde und er für die Messbedingungen auf dem Gerät optimiert wurde. Eine direkte Übertragung des Assays war nicht möglich, da bei der Messung auf dem respons® IQ der Detektor-Ak zuerst mit der Probe vermischt wird. Daher ist es wichtig, dass dieser eine sehr hohe Affinität zum Analyten aufweist, um diesen aus der Probe binden zu können. Im ELISA ist dies der Fall beim Fänger-Ak, der hier eine hohe Affinität haben muss, um den Analyten im ersten Schritt aus der Probe zu binden. Daher eignen sich oft Fänger-Ak im ELISA gut als Detektor-Ak auf dem respons® IQ. Ein weiterer Punkt ist, dass die Messung auf dem respons® IQ eine Kinetikmessung ist, nicht eine Endpunktmessung wie bei einem ELISA. Weiterhin wurden die Reproduzierbarkeit der Cartridges und die Vergleichbarkeit der einzelnen Geräte getestet. Abschließend wurden Standardkurven mit humanem EDTA-Plasma und humanem Vollblut erstellt und der Assay mit Patientenproben validiert. Die ersten Versuche wurden mit einer externen Detektorlösung durchgeführt (enthält den Detektor-Ak und evtl. Zusätze), um eine höhere Flexibilität zu gewährleisten. Diese lag als Lyophilisat vor und wurde mit der Probe gemischt und dann in die Cartridge eingefüllt. Nachdem der beste Detektor-Ak und Zusätze gegen unspezifische Anbindungen gefunden wurden, wurden diese in die Cartridge integriert. Somit müssen keine weiteren Substanzen der Probe zugeführt werden, da alle benötigten Reagenzien bereits in der Cartridge vorliegen (*lab on a chip*).

3.3.1 Antikörper Screening

Für eine Anwendung auf dem POCT Gerät respons® IQ wurden die fünf der in einer internen Kooperation mit Frau Dr. Elisabeth Kremmer (Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum München) hergestellten Antikörper gegen hPCT, die sich zuvor im Sandwich-ELISA als am besten geeignet gezeigt hatten, in einem Sandwich-FIA erneut getestet. Des Weiteren wurden neun PCT-Antikörper von der Firma HyTest, Turku, Finnland, getestet, um eine Paarung für eine sensitive Detektion zu bekommen.

Die mAk wurden anhand ihrer Bindungsregion zu Paaren für das Screening zusammengeführt. In Gruppe 1 wurden die Antikörper als Fängerantikörper eingesetzt, die in der Calcitonin bzw. Katalcalcin-Region des PCTs binden, und als Detektoren die Antikörper, die im N-terminalen Bereich des PCTs binden. Letztere sind fluoreszenzmarkiert und im Weiteren mit –F gekennzeichnet. In Gruppe 2 wurden die Antikörper andersherum überprüft. Alle Fängerantikörper einer Gruppe waren auf einer Cartridge vorhanden, so dass diese unter identischen Bedingungen mit derselben Probe getestet werden konnten. Gemessen wurden eine 0-Probe und eine hohe PCT-Konzentration (10 ng/mL). Die Bindungsregionen der mAk sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13 Übersicht der Bindungsregionen der getesteten mAk gegen hPCT

mAK	Bindungsregion
CALCA 3C5	Calcitonin
CALCA 2F3	Calcitonin
PCT 14A2	Calcitonin
PCT 16B5	Calcitonin
PCT 14C12	Katalcalcin
PCT 22A11	Katalcalcin
CALCA 4A6	N-terminale Region
CALCA 4F6	N-terminale Region
CALCA 3B12	N-terminale Region
CALCA 4H6	N-terminale Region
PCT 6F10	N-terminale Region
PCT 44D9	N-terminale Region
PCT 38F11	N-terminale Region
PCT 42	N-terminale Region
PCT 27A3	N-terminale Region

Tabelle 14 fasst die Ergebnisse für das Screening 1 der Gruppe 1 zusammen, in der die Antikörper als Fänger eingesetzt wurden, die in der Calcitonin/Katacalcinregion des PCTs binden. In dieser Gruppe zeigte nur der Fänger-Ak PCT 16B5 gute Signalintensitäten. Als Detektor-Ak zeigten der CALCA 4A6-F, CALCA 4F6-F und PCT 44D9-F gute Signale. Für weitere Tests wurden nur die beiden CALCA-Ak ausgewählt, da diese ein geringeres Signal mit dem Leerwert-Plasma ergaben.

Tabelle 14 Ergebnisse Gruppe 1 im Screening 1 (Fänger-Ak: Calcitonin/Katacalcin; Detektions-Ak: N-terminale Region)
 UB = unspezifische Anbindung bei 0 ng/mL; 0 - +++ schwaches bis ausgezeichnetes Paar

	CALCA 3C5	CALCA 2F3	PCT 14A2	PCT 16B5	PCT 14C12	PCT 22A11
CALCA 4A6-F	UB	UB	0	+	0	0
CALCA 4F6-F	UB	UB	0	+	0	0
PCT 6F10-F	0	0	0	0	0	0
PCT 44D9-F	0	UB	0	+	0	0
PCT 38F11-F	0	0	0	0	0	0
CALCA 4H6-F	UB	UB	0	0	0	0

Die Ergebnisse der Gruppe 2 im Screening 1, in der die Fänger-Ak in der N-terminalen Region des PCTs binden, sind in Tabelle 15 zusammengefasst. Aus dieser Gruppe wurden auf Grund der guten Signale CALCA 4F6, PCT 6F10, PCT42 und PCT 27A3 als Fänger-Ak ausgewählt und als Detektor-Ak CALCA 3C5-F, CALCA 2F3-F, PCT 14A2-F und PCT 16B5-F. Der Fänger-Ak PCT 44D9 zeigte insgesamt niedrigere Signale als der PCT 42 und wurde daher für weitere Versuche nicht mehr in Betracht gezogen.

Tabelle 15 Ergebnisse Gruppe 2 im Screening 1 (Fänger-Ak: N-terminal; Detektor-Ak: Calcitonin/Katacalcin)
UB = unspezifische Anbindung bei 0 ng/mL; 0 - +++ schwaches bis ausgezeichnetes Paar

	CALCA 4A6	CALCA 4F6	PCT 6F10	PCT 38F11	PCT 44D9	PCT 42	PCT 27A3
CALCA 3C5-F	UB/+++	UB/+++	++	++	++	++	+++
CALCA 2F3-F	UB/+++	UB/+++	+++	++	UB/+++	UB/+++	UB/+++
PCT 14A2-F	++	+++	++	++	++	++	+++
PCT 16B5-F	++	+++	+	+	UB/+++	UB/+++	UB/+++
PCT 14C12-F	0	0	0	0	0	0	0
PCT 22A11-F	0	+	0	0	0	0	0

Tabelle 16 fasst noch einmal die im zweiten Screening verwendeten fünf Fänger- und sechs Detektorantikörper zusammen, die auf Grund ihrer hohen Signale und nur gering auftretender unspezifischer Anbindung ausgewählt wurden. Tabelle 17 zeigt dann die Ergebnisse des Screenings 2. Die Klassifizierung der Ergebnisse des Screening 2 erfolgte nach den erreichten LOD- und LOQ-Werten in den erstellten Standardkurven. Als Detektor-Ak zeigte der neu entwickelte CALCA 3C5-F die besten Ergebnisse in fast allen Kombinationen mit den verschiedenen Fänger-Ak. Da er auch bei der Affinitätsbestimmung mit der SPR-Messung gute K_A - und K_D -Werte zeigte (siehe 3.1.1.2), wurde dieser als einziger Detektions-Ak für die weiteren Versuche ausgewählt. Die Fänger-Ak PCT 27A3, PCT 42 und PCT 6F10 erreichten gute LOD- und LOQ-Werte und wurden ebenfalls für weitere Versuche ausgewählt. Der CALCA 4F6 zeigte ein höheres Signal mit dem Leerwert, was einer unspezifischen Anbindung mit Substanzen im humanem EDTA-Plasma zugesprochen werden kann. Da dieser aber sehr gute Anstiege im Screening und ebenfalls gute K_A und K_D Werte zeigte (siehe 3.1.1.2), wurde er dennoch für weitere Versuche herangezogen.

Tabelle 16 Fänger- und Detektions-Ak für Screening 2

Fänger-Ak	CALCA 4F6	PCT 27A3	PCT 42	PCT 6F10	PCT 16B5	
Detektions-Ak	CALCA 3C5-F	CALCA 2F3-F	PCT 14A2-F	PCT 16B5-F	CALCA 4F6-F	CALCA 4A6-F

Tabelle 17 Ergebnisse für Screening 2

– Kein Fitting möglich; UB = unspezifische Anbindung bei 0 ng/mL; 0 - ++ schwaches bis ausgezeichnetes Paar

	CALCA 4F6	PCT 27A3	PCT 42	PCT 6F10	PCT 16B5
CALCA 3C5-F	UB/O	++	++	++	/
CALCA 2F3-F	--	O	O	+	/
PCT 14A2-F	O	O	+	--	/
PCT 16B5-F	++	--	--	O	/
CALCA 4F6-F	/	/	/	/	O
CALCA 4A6-F	/	/	/	/	+

3.3.2 Optimierung des PCT-Assays

Ein wichtiger Punkt bei der Optimierung des PCT-Assays war die Reduzierung der auftretenden unspezifischen Anbindung. Diese war unter verschiedenen Umständen zu beobachten. Zum einen kam es in verschiedenen humanen EDTA-0-Plasmen von Einzelspendern zu einer unspezifischen Bindung zwischen den gespotteten Fänger-Ak und den Detektor-Ak an den Streifen selbst. Zum anderen trat eine unspezifische Anbindung in

humanem Vollblut an die Cartridgeoberfläche zwischen den immobilisierten Fänger-Ak auf. Ein weiterer Punkt war die Verhinderung eines Basislinienabfalls während der Messung.

3.3.2.1 Zusätze gegen unspezifische Anbindung

Bei der Messung von 20 Plasmaeinzelspenden gesunder Personen, die von pes diagnosesysteme, Markleeberg, Deutschland, zur Verfügung gestellt wurden, war das Auftreten unspezifischer Bindungen an die Fänger-Ak besonders deutlich. Abbildung 26 zeigt die Signalanstiege der einzelnen Plasmaeinzelspenden. Aufgetragen sind die einzelnen Scans über die gesamte Cartridge, wobei die einzelnen Fängerstreifen, d.h. deren Position auf der Cartridge, zu erkennen sind. Es handelt sich um das Spotting 1, d.h. von links nach rechts haben die Fänger-Ak folgende Reihenfolge: CALCA 4F6, PCT 27A3, PCT 42, PCT 6F10, CALCA 4F6, PCT 27A3, PCT 42, PCT 6F10. Die Einzelspenden sind nach der Höhe des Signals farblich markiert, wobei grün für einen geringen Anstieg, d.h. eine geringe unspezifische Anbindung, steht, gelb für einen leichten und orange für einen mittleren Anstieg. Eine Einzelspende (lachsfarben) zeigte einen besonders hohen Signalanstieg und eine Weitere zeigte vor allem einen Anstieg an den Streifen 2 und 3, mit den kommerziell erhaltenen Mausantikörpern.

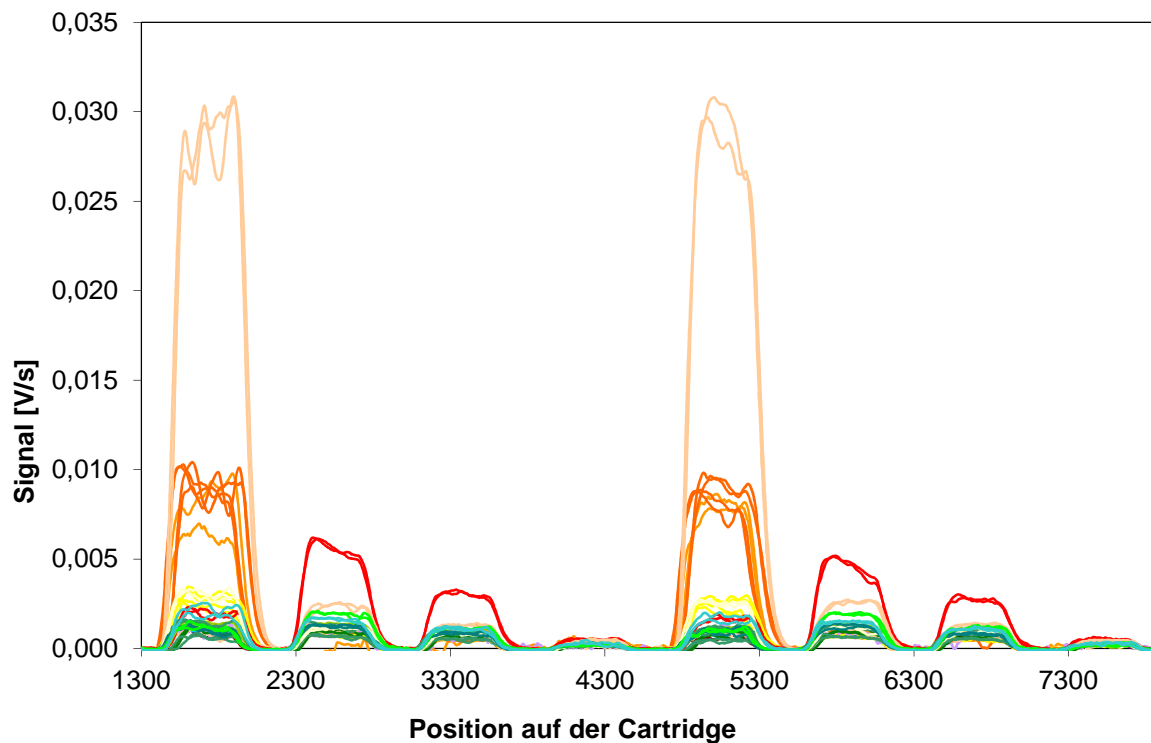


Abbildung 26 Signalanstiege der einzelnen Scans von verschiedenen Plasmaeinzelspenden an den jeweiligen Fängerstreifen; grün = geringe Anbindung, gelb = leichte Anbindung, orange = mittlere Anbindung, lachs = starke Anbindung, rot = starke Anbindung an murinen Fänger-Ak

Da dieses Phänomen vor allem bei den intern hergestellten Antikörpern sichtbar war und es sich hierbei um eine Verbindung zwischen zwei Rattenantikörpern handelt, ist anzunehmen, dass diese unspezifische Bindung wahrscheinlich durch humane Anti-Ratte-Antikörper verursacht wurde. Menschliche Anti-Tier-Antikörper sind bereits seit längerem dafür bekannt Störungen in Immunoassays zu verursachen, gerade bei Sandwich Assays [106]. Diese humanen Antikörper erkennen spezifisch Antikörper einer einzigen Tierart, in diesem Fall die beiden in Ratten produzierten PCT-Antikörper, und können Fänger- und Detektor-Ak über den Fc-Teil miteinander verknüpfen. Es kommt dadurch zu einem falsch positiven Signal. Diese Ak können bei Kontakt mit Ratten entstehen, die z.B. als Haustiere gehalten werden, oder wenn Ratten-Ak zu Therapiezwecken eingesetzt werden. Eine weitere Möglichkeit sind heterophile Antikörper. Diese sind allerdings weniger spezifisch und können somit auch die deutlich geringere unspezifische Anbindung erklären, die zwischen den internen PCT-Ak aus der Ratte und den kommerziell erhaltenen PCT-Ak aus der Maus erklären [108,110].

Um die Wirkung verschiedener Substanzen zur Reduzierung dieser unspezifischen Anbindungen zu testen, wurden obige Einzelspenden nach ihrem endogenen Signalanstieg zu verschiedenen Plasmapools vereinigt:

- Pool I: geringe unspezifische Anbindung
- Pool II: leichte unspezifische Anbindung
- Pool III: mittlere unspezifische Anbindung.

Es wurden verschiedene Zusätze getestet, um eine unspezifische Anbindung an den Fängerstreifen zu verhindern: Bovines γ -Globulin, Ziegenserum, Rattenserum, Pferdeplasma, LowCross-Buffer® (LCB) und für PCT unspezifische Rattenantikörper derselben Subklasse (IgG2a) wie die PCT-Antikörper. Ebenfalls wurde geprüft, ob es sich bei den Effekten um reine Verdünnungseffekte handelt, indem PBS mit dem Volumen des Ratten-Ak zugegeben wurde. Als Matrix für die Untersuchung geeigneter Zusätze wurde eine Plasmaeinzelspende verwendet, die im Rahmen der Herstellung von 0-Plasmen eine hohe unspezifische Anbindung zwischen Fänger- und Detektor-Ak aufwies (lachsfarben, siehe Abbildung 26). Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich immer auf die Messlösung.

Die Ergebnisse des ersten Screenings zeigt Abbildung 27 A). Die deutlichste Reduzierung in der Signalhöhe und damit der unspezifischen Anbindung zwischen den beiden Ratten-Ak wurden mit der Zugabe von γ -Globulin und Ratten-Ak erreicht. Bei Letzteren konnte ein Einfluss durch einen Verdünnungseffekt ausgeschlossen werden, da die Zugabe von reinem PBS mit dem gleichen Volumen nur eine geringe Reduzierung des Signals erzeugte. Keinen Einfluss zeigte die Zugabe von 0,5% LCB. Auf die Zugabe der verschiedenen Seren bzw. Plasmen folgte eine deutliche Reduzierung des Signales, diese war aber nicht so stark wie beim γ -Globulin und Ratten-Ak.

Im nächsten Schritt wurden die Zusätze, die eine gute Signalreduzierung zeigten, in verschiedenen Konzentrationen getestet. Ziel war die optimale Konzentration zu finden, die ein gutes Ergebnis erreicht, zugleich aber auch mit zukünftigen Kosten und der Integrierung auf den Cartridges vereinbar ist. Hierfür wurden γ -Globulin, Ratten-Ak, Ziegenserum und Pferdeplasma erneut getestet. Letztere vor allem in Hinblick auf die später zu beachtenden Kosten in der Cartridgeproduktion. Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 B) zusammengefasst. Das γ -Globulin zeigt selbst bei einer Verdünnung der Stammlösung von 1:100 (auf 130 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

noch eine gute Reduzierung des endogenen Signals. Beim Ratten-Ak ist eine Konzentration von 20 µg/mL anstatt 200 µg/mL immer noch ausreichend für eine starke Reduzierung der unspezifischen Anbindung. Beim Ziegen Serum und Pferdeplasma hat eine Reduzierung von 5% auf 1% keinen starken Einfluss auf die Wirkung, insgesamt haben diese Zusätze einen geringeren Reduzierungseffekt.

Die Zugabe von IgG2a Ratten-Ak in einer Konzentration von 20 µg/mL zeigte mit die besten Ergebnisse für den Fänger CALCA 4F6, der selbst ein IgG2a Ratten-Ak ist. Dieses Ergebnis bekräftigt die Vermutung, dass die unspezifische Anbindung durch humane Anti-Ratte-Ak verursacht wird, die durch die Zugabe von unspezifischen Ratten-Ak im Überschuss abgefangen werden. An den Fängerstreifen, auf denen Maus-Ak als Fänger dienen, konnten mit der Zugabe von 1% Ziegen Serum sehr gute Ergebnisse erzielt werden.

Um zu sehen, ob bei einer Kombination der besten Substanzen eine weitere Verbesserung zu erreichen ist, und dass die ermittelten Zusätze auch in anderen Proben funktionieren, wurden als nächstes γ-Globulin bzw. Ratten-Ak und Ziegen Serum in den entsprechend ermittelten Konzentrationen kombiniert und in den Pools II und III aus Plasmaeinzelspenden getestet (Erläuterung Pools siehe 3.3.2). Die Ergebnisse zeigt Abbildung 27 C). In beiden Pools und an allen Fängerstreifen konnte mit der Kombination von IgG2a Ratten-Ak mit 20 µg/mL und 1% Ziegen Serum anstatt 5% die deutlichste Reduzierung erzielt werden. Das γ-Globulin konnte das endogene Signal in Pool II nicht im gleichen Maße reduzieren wie die Zugabe von Ratten-Ak. Auch die Kombination von γ-Globulin und Ratten-Ak konnte keine weitere Reduzierung des endogenen Signals herbeiführen.

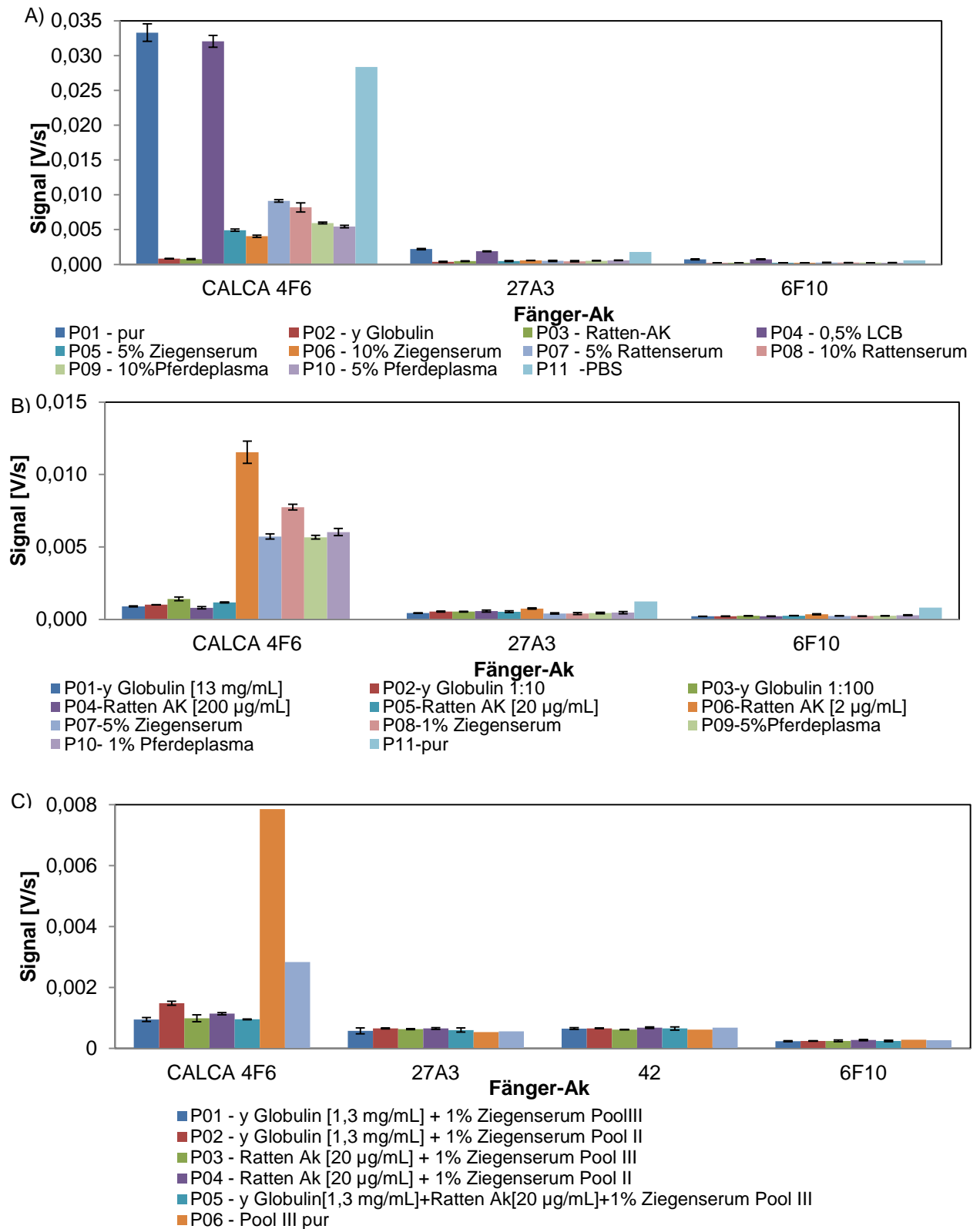


Abbildung 27 Ergebnisse zur Reduzierung unspezifischer Anbindung an die Fängerstreifen; m = 3
A) Erstes Screening verschiedener Zusätze in einer humanen EDTA-Plasmaeinzelspende mit hoher unspezifischer Anbindung
B) Reduzierung der Konzentration der besten Zusätze aus dem ersten Screening in derselben Plasmaeinzelspende; die pure Probe ergab ein zu hohes Signal und konnte nicht ausgewertet werden
C) Ergebnisse für die Kombination der besten Zusätze in den entsprechenden Konzentrationen getestet mit humanem EDTA-Plasma Pool II und Pool III

Mit den ermittelten Zusätzen in der entsprechenden Konzentration wurden daraufhin erneut die aus Einzelspenden nach ihren endogenen Signalen erstellten Pools I – III, eine Einzelspende mit sehr hohem endogenen Signal (PE) und zwei kommerziell gekaufte Pools gemessen (Pool 1 + 2). Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 aufgeführt, wobei A) die gekauften humanen EDTA-Plasmapools darstellt und zusätzlich den aus Einzelspenden mit geringer bis keiner unspezifischen Anbindung hergestellten Pool I (entspricht in der Abbildung Pool 1). B) zeigt die intern aus Einzelspenden hergestellten Pools (vergleiche 3.3.2). Es konnte bei allen endogenen Plasmapools, die einen Signalanstieg aufwiesen, eine deutliche Reduzierung von bis zu 96% der unspezifischen Anbindung erzielt werden. Für alle weiteren Versuche wurden daraufhin den Proben Ratten-Ak und Ziegenserum zugegeben.

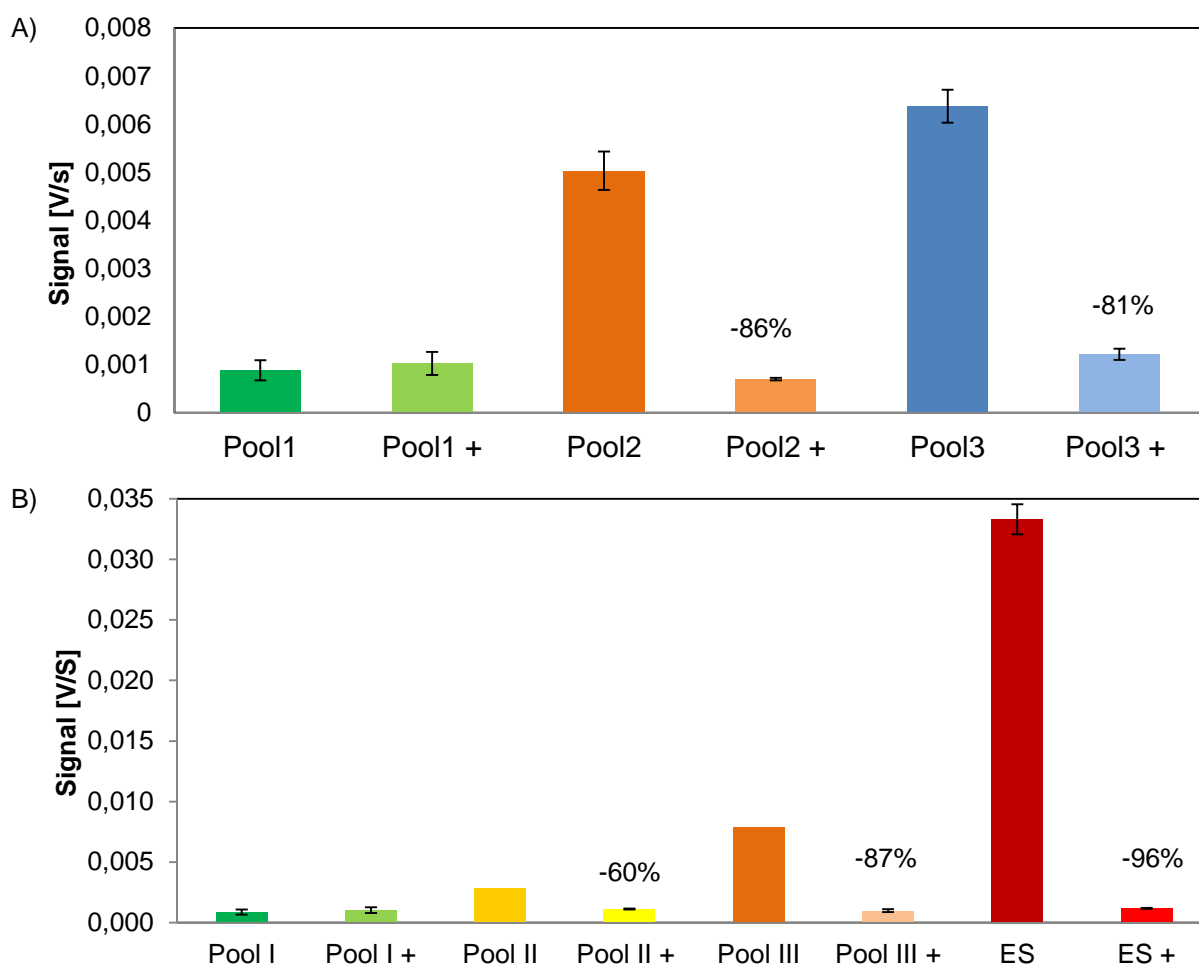


Abbildung 28 Reduzierung der unspezifischen Anbindung in verschiedenen Plasmapools; das + markiert die Proben mit 20 µg/mL Ratten-Ak und 1% Ziegenserum; angegeben ist die prozentuale Signalreduzierung; m = 3

Des Weiteren zeigte sich unspezifische Anbindung an die Cartridgeoberfläche zwischen den Fängerstreifen bei endogenem humanem EDTA-Vollblut (siehe Abbildung 29). Hier verknüpfen Substanzen aus der Matrix die Detektor-Ak an die Oberfläche, wodurch es zu einem Signalanstieg kommt.

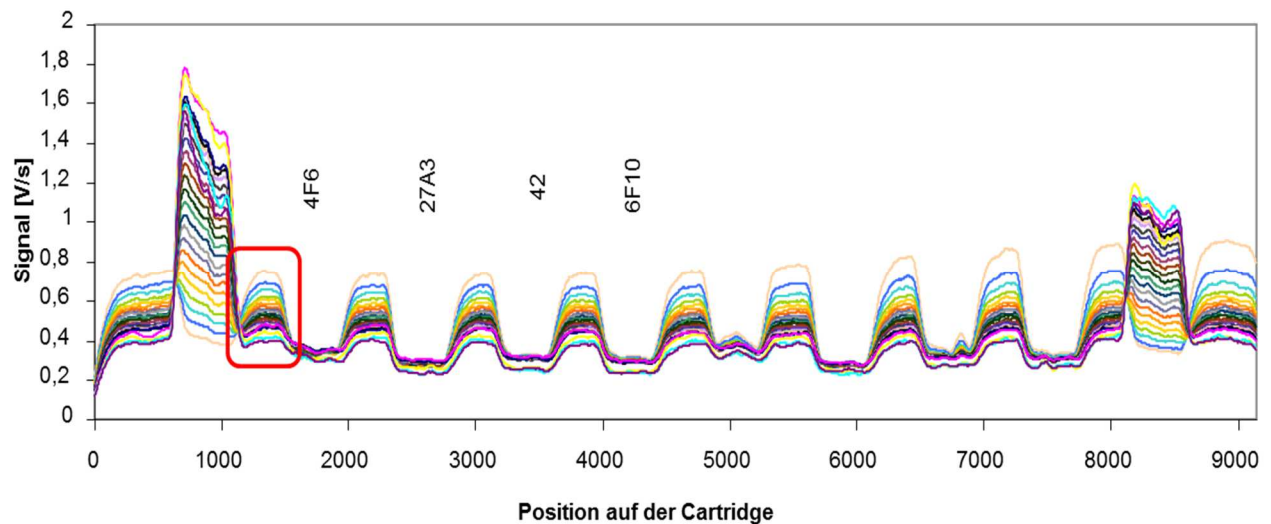


Abbildung 29 Sensorgramm einer Beispielmessung mit dem Detektor-Ak CALCA 3C5-F; es ist die unspezifische Anbindung zwischen den Streifen auf der Cartridgeoberfläche in humanem EDTA-Vollblut mit dem Fänger-Ak CALCA 3C5-F dargestellt (roter Kasten); die Fänger-Ak sind im Diagramm über ihrer Position vermerkt

Die unspezifische Anbindung an die Cartridgeoberfläche konnte mit der Zugabe von LowCross-Buffer® (LCB) in ersten Versuchen verhindert werden (Daten nicht gezeigt). LCB zeigte allerdings keine deutliche Verbesserung bei der unspezifischen Anbindung zwischen Fänger- und Detektor-Ak an den Streifen. Es wurde getestet, ob die für Plasma gefundenen Zusätze ebenfalls für humanes EDTA-Vollblut geeignet sind. Hierzu wurde Vollblut einerseits pur gemessen und andererseits mit 1% Ziegenserum und 50 µg/mL Ratten-Ak. Des Weiteren wurde erneut 1% LCB getestet. Ebenso wurde getestet, ob die Kombination aller drei Zusätze eine weitere Verbesserung bringt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 dargestellt. Eine Reduzierung war durch die Zugabe von 1% LCB nicht möglich. Die Zugabe von Ziegenserum und Ratten-Ak hingegen zeigte eine Reduzierung des Signals, wohingegen zusätzlicher LCB keine weitere Verbesserung brachte. Allerdings waren die Signalintensitäten der endogenen Blutprobe bereits gering, d.h. es lag keine deutliche unspezifische Anbindung vor. Es wurde daher auch für Vollblut die für Plasma gefundenen Zusätze verwendet.

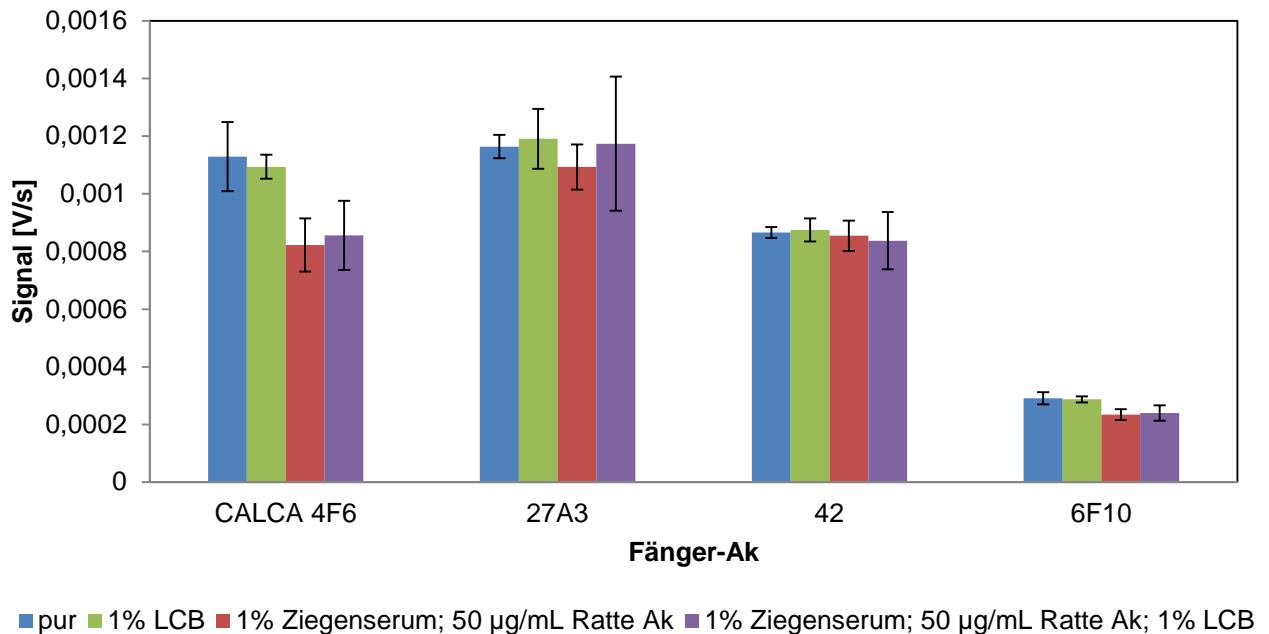


Abbildung 30 Ergebnisse zur Reduzierung unspezifischer Anbindung an die Fängerstreifen bei humanem EDTA-Vollblut; m = 3

3.3.2.2 Optimierung der Basislinie

In einigen Versuchen in humanem Plasma zeigte sich im Scan ein Abfall der Basislinie zwischen den Fängerstreifen. Die Ursache für diesen Abfall ist noch nicht endgültig geklärt. Mögliche Überlegungen sind zum Beispiel das Ausbleichen der Autofluoreszenz des Plastiks, aus dem die Cartridgeoberfläche hergestellt ist. Allerdings erklärt dies nur einen Teil des sichtbaren Signalabfalls. Eine weitere Erklärung ist, dass sich Bestandteile der Probe an die Oberfläche binden. Hier gibt es zwei Möglichkeiten: Die erste ist, dass die Bestandteile an das Prisma binden und somit den Brechungsindex in der Grenzschicht verändern. Dies hätte wiederum zur Folge, dass sich die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes ändert. Eine andere Möglichkeit ist, dass die fluoreszenzmarkierten Detektor-Ak an freie Bindungsplätze auf dem Prisma binden. Die Fluorophore können durch die Bestrahlung ausbleichen. Beide Effekte haben eine zeitliche Komponente (Vroman-Effekt). Um die Basislinie zu stabilisieren, wird daher eine Blockierlösung in die Cartridge integriert (mit den Detektoren in der Tracer-Zone aufgebracht), die von pes diagnosesysteme entwickelt wurde. Diese verhindert das Anbinden von Molekülen an die Oberfläche, was einen Teil des Basislinienabfalls verhindert, wie in Abbildung 31 zu sehen ist.

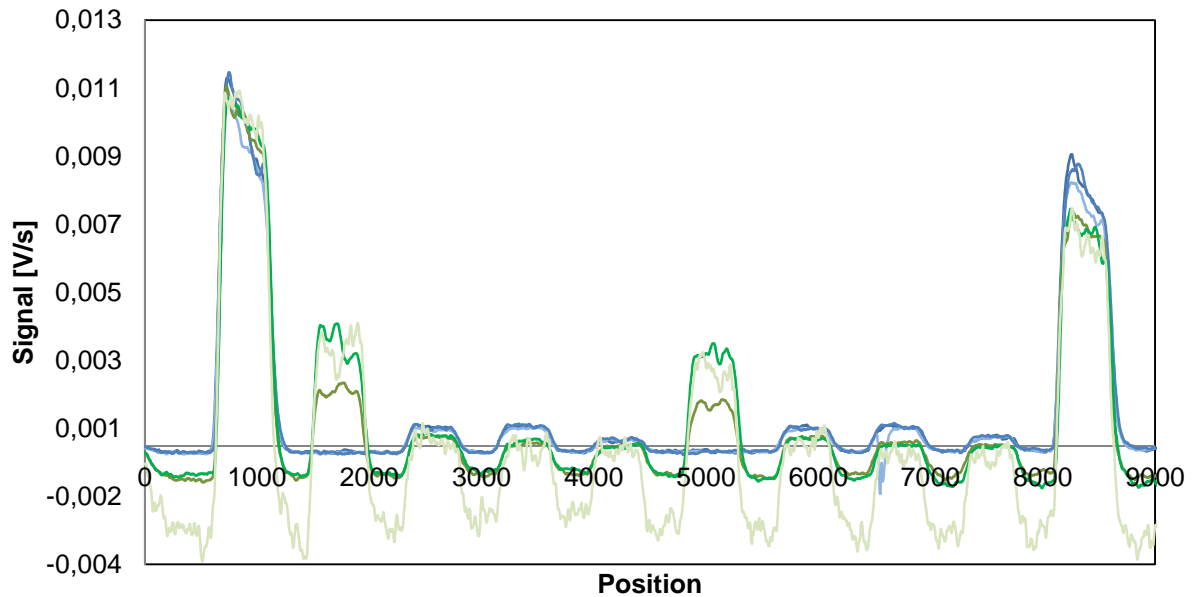


Abbildung 31 Einfluss der Blockierlösung auf den Basislinienabfall; die grünen Scans wurden mit equinem Plasma ohne Blockierlösung aufgenommen, die blauen Scans mit equinem Plasma und Verwendung von Blockierlösung

3.3.3 Reproduzierbarkeit der Messungen

Gubala et al. [112] wiesen in ihrer Literaturübersicht zur Point-of-Care-Diagnose darauf hin, dass die Messergebnisse von Einweg-Cartridges von Stichproben und dem Vergleich verschiedener Cartridges für eine Kalibrierung abhängen. Auch die Prozesse des Gerätes stellen eine Fehlerquelle dar, da diese wohl nicht so überprüft werden wie bei großen Laborgeräten. Daher wurde eine identische Probe auf zwei verschiedenen Messgeräten getestet, um die Vergleichbarkeit zwischen den Geräten zu zeigen, sowie ein Versuch durchgeführt, der die Reproduzierbarkeit bei der Cartridgeherstellung und der Herstellung der Detektorlösungen zeigt.

3.3.3.1 Vergleichbarkeit von Messungen mit verschiedenen Geräten

Um die Vergleichbarkeit zwischen den Messergebnissen zu testen, wenn diese von zwei unterschiedlichen Geräten erhalten wurden, wurde eine identische Probe (10 ng/mL hrPCT in humanem EDTA-Plasma) auf zwei verschiedenen respons[®] IQ-Geräten (DT09, DT04)

gemessen. Hier zeigte sich, dass zwar die absolute Signalintensität auf beiden Geräten unterschiedlich war, der Signalverlauf und das Verhältnis zwischen beiden Messungen an denselben Fängern aber gleich (siehe Abbildung 32). Es handelt sich bei den Geräten um Prototypen, die noch nicht vollständig aufeinander abgeglichen sind. Sobald die Geräte identisch auf die ermittelten Parameter für den entwickelten PCT-Assay eingestellt sind, sollten somit identische Messergebnisse erzielt werden.

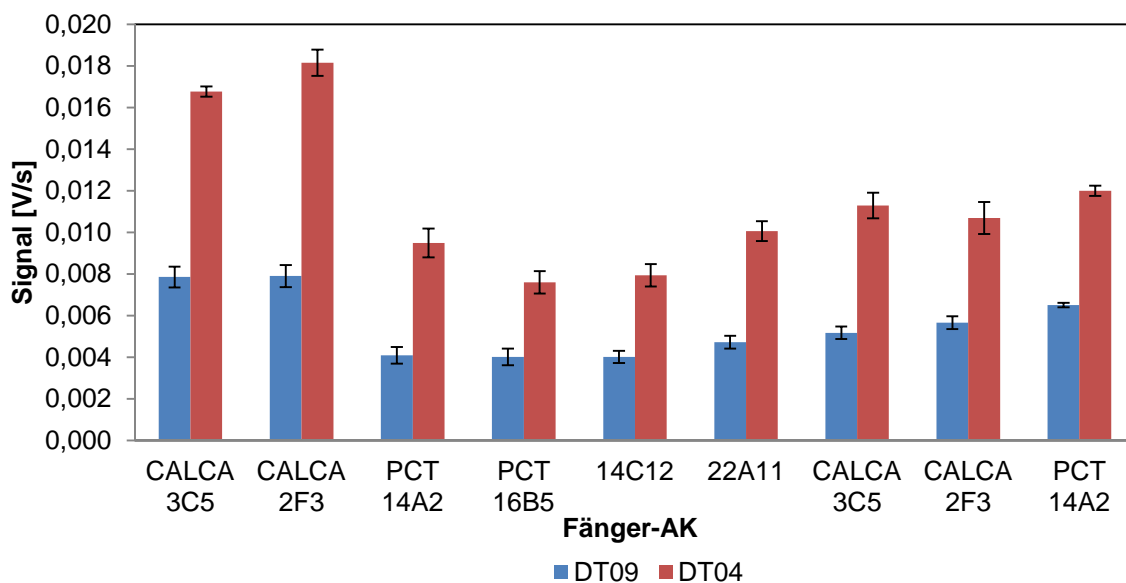


Abbildung 32 Vergleich identischer Proben mit zwei verschiedenen Geräten des respons[®] IQ; m = 3

3.3.3.2 Reproduzierbarkeit bei der Cartridgeherstellung und der Herstellung der Detektorlösungen

Um die reproduzierbare Herstellung der Cartridges und der Detektorlösungen zu überprüfen, wurde mit jeweils zwei verschiedenen Chargen Cartridges und Detektorlösungen je eine Standardkurve aus identischen Proben erstellt. Abbildung 33 zeigt die Reproduzierbarkeit der Cartridgeproduktion am Beispiel des Ak-Paars PCT 27A3/CALCA 3C5-F. Hierzu wurde jeweils eine Standardkurve aus Messungen mit Cartridges identischer Belegung aus zwei verschiedenen Chargen erstellt. Die Verdünnungsreihen des hrPCTs wurden aus derselben Stammlösung hergestellt und die verwendete Detektorlösung war identisch. Die Detektorlösungen lagen extern als Lyophilisate vor und wurden mit der Probe resuspendiert (Ablauf wie bei Antikörperscreening, siehe 5.9.1.). Hier ist darauf hinzuweisen, dass in diesem

Versuch noch keine Zusätze gegen unspezifische Anbindung zugegeben wurden. Die 0-Proben liegen daher höher als bei späteren Versuchen. Beide Standardkurven weisen einen fast identischen Verlauf auf, d.h. eine gleichbleibende Qualität in der Cartridgeproduktion ist sicher gestellt.

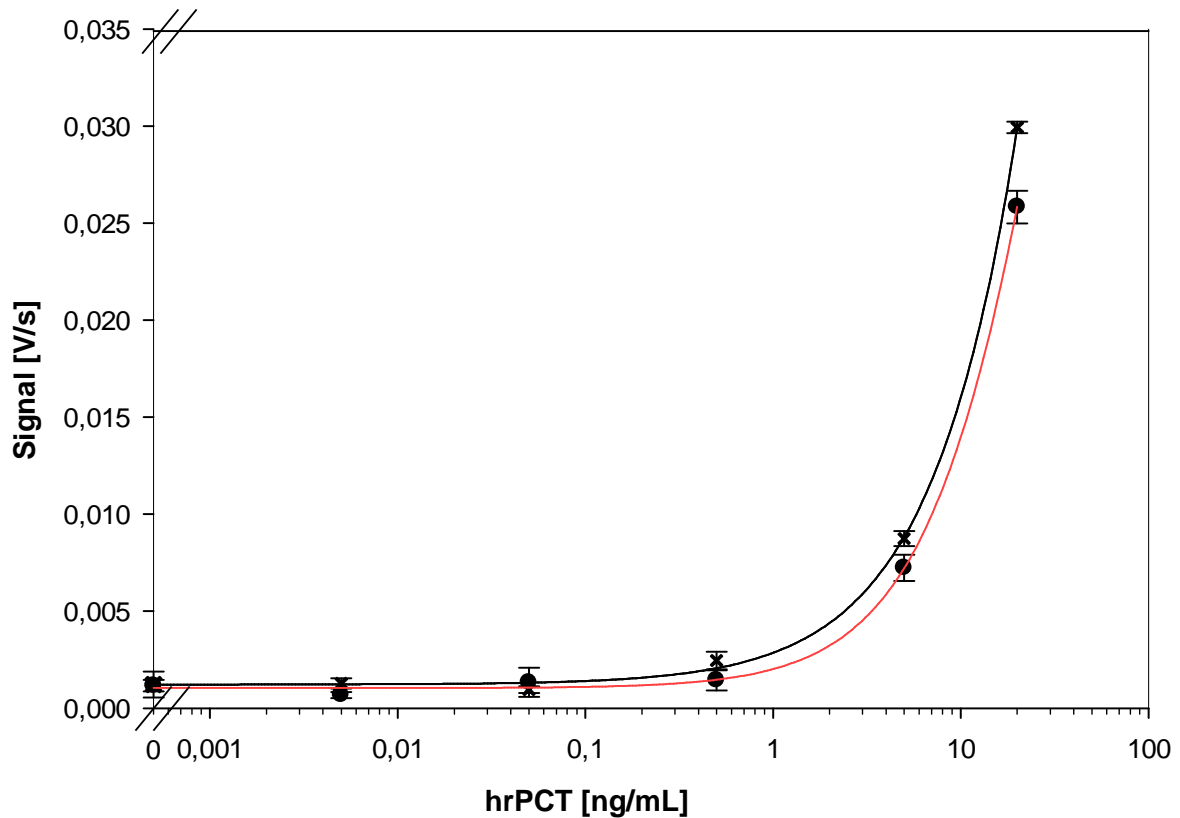


Abbildung 33 Reproduzierbarkeit der Cartridgeproduktion; Ak-Paar PCT 27A3/CALCA 3C5-F

Des Weiteren wurde die Reproduzierbarkeit bei der Herstellung der Detektorlösungen getestet. Hierzu wurden Cartridges aus einer einzigen Charge benutzt und die Verdünnungsreihe des hrPCTs aus derselben Stammlösung hergestellt. Auch hier lagen die Detektorlösungen extern als Lyophilisate vor und wurden mit der Probe vor dem Einfüllen in die Cartridge resuspendiert.

Die erhaltenen Standardkurven zeigten bei allen Fängern mit beiden Chargen eine Übereinstimmung. Abbildung 34 zeigt beispielhaft das Ak-Paar PCT 27A3/CALCA 3C5-F, das zwei identische Kurvenverläufe aufweist. Leichte Abweichungen bei einigen Fänger-Ak (Daten nicht gezeigt) könnten davon herrühren, dass die beiden Detektorlösungen aus Ak hergestellt wurden, die unterschiedlich lange im Kühlschrank gelagert wurden. Die

Abweichungen sind allerdings sehr gering und hatten daher keinen Einfluss auf die Messergebnisse.

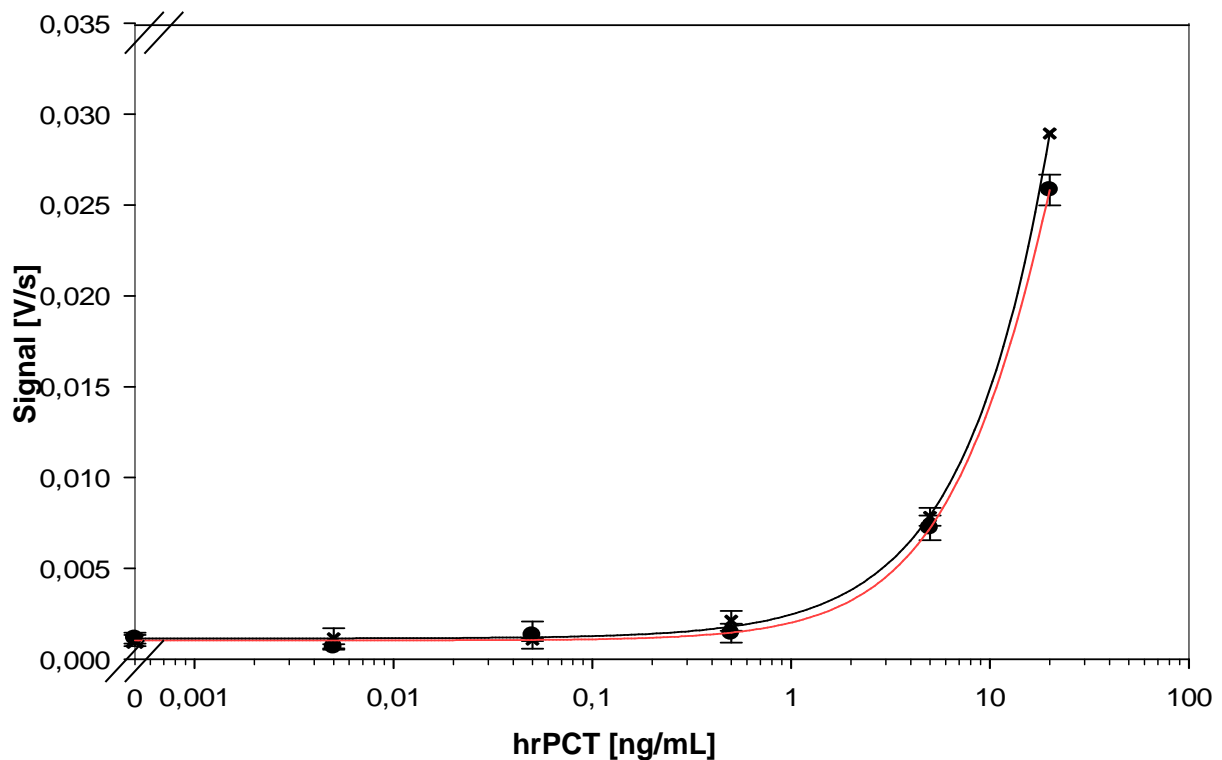


Abbildung 34 Reproduzierbarkeit bei der Herstellung der Detektorlösungen; Ak-Paar PCT 27A3/CALCA 3C5-F

Die hier aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Geräte untereinander vergleichbar messen und auch die Herstellung der Cartridges reproduzierbar abläuft, wodurch Messfehler bei der Messung durch verschiedene Chargen vermieden werden. Später wird auf den Cartridges zusätzlich noch eine chargenspezifische Kalibrierung enthalten sein, die eine reproduzierbare Messung sicherstellt.

3.3.4 Standardkurven

Mit dem optimierten PCT-Assay wurden anschließend Standardkurven mit humanem EDTA-Plasma und humanem EDTA-Vollblut erstellt. Hierzu wurden Cartridges verwendet, auf denen nur noch ein Fänger-Ak auf drei Streifen gespottet ist. Für die Auswertung wurden die Signale der einzelnen Streifen addiert, um eine höhere Sensitivität zu erreichen. Da sich in Versuchen mit Patientenproben zeigte, dass die Fänger PCT 27A3 und PCT 42 natives hPCT nicht zuverlässig erkennen, wurden diese für die Erstellung der Standardkurven nicht ausgewählt. Daher wurden nur die Fänger CALCA 4F6 und PCT 6F10 getestet. Mit den Standardkurven wurden dann die LOD- und LOQ-Werte des jeweiligen Assays berechnet.

3.3.4.1 *Humanes EDTA-Plasma*

In diesem Abschnitt wird beispielhaft je Ak-Paar eine Standardkurve gezeigt.

Die Standardkurve in EDTA-Plasma für das Ak-Paar CALCA 4F6/CALCA 3C5-F ist in Abbildung 35 dargestellt. Der berechnete LOD-Wert für diesen Assay betrug 0,04 ng/mL, der LOQ-Wert 0,12 ng/mL. Das Bestimmtheitsmaß der Standardkurve war mit einem Wert für R^2 von 1 sehr gut ($n = 6$, $m = 3-5$). Dieses Paar zeigte eine höhere Sensitivität als das Ak-Paar PCT 6F10/CALCA 3C5-F und konnte in dem gezeigten Versuch nur eine Konzentration von 2,5 ng/mL hrPCT messen. Die nächsthöhere Konzentration von 10 ng/mL konnte nicht mehr ausgewertet werden (bei einem späteren Versuch mit humanem EDTA-Plasma war es mit diesem Ak-Paar möglich eine Standardkurve mit einer maximalen Konzentration von 7,18 ng/mL zu erstellen; siehe hierzu den Versuch *Vergleich Vollblut und Plasmakurve* in 3.3.4.2).

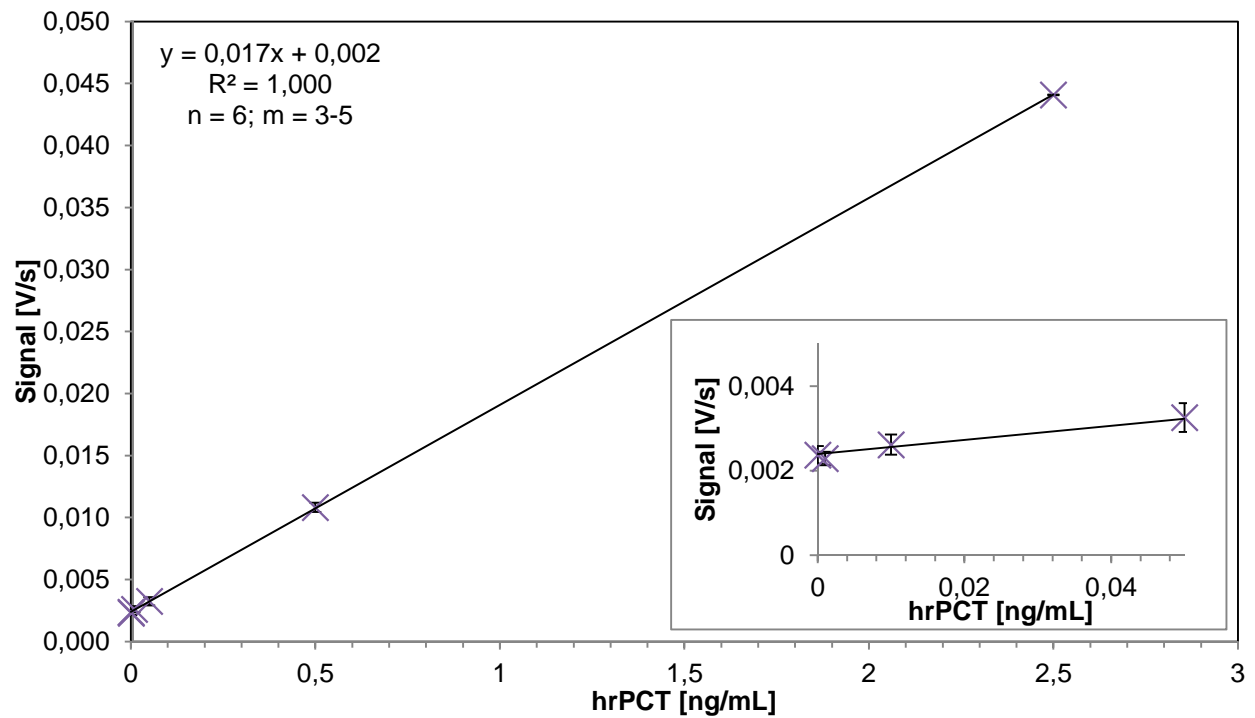


Abbildung 35 Standardkurve mit humanem EDTA-Plasma mit dem Ak-Paar CALCA 4F6/CALCA 3C5-F: Gezeigt ist das addierte Signal der drei Fängerstreifen; für eine bessere Ansicht sind die geringen Konzentrationen noch einmal vergrößert in der rechten unteren Ecke eingefügt; LOD = 0,04 ng/mL, LOQ = 0,12 ng/mL

Die Ak-Kombination PCT 6F10/CALCA 3C5-F erreichte einen LOD-Wert von 0,11 ng/mL und einen LOQ-Wert von 0,21 ng/mL. Allerdings zeigte dieses Paar ein etwas schlechteres Bestimmtheitsmaß als die Kombination mit dem Fänger CALCA 4F6 mit einem R^2 von 0,998 ($n = 9$; $m = 3-5$) (siehe Abbildung 36). Dieser Assay zeigt eine etwas geringere Sensitivität, wodurch es möglich war PCT-Konzentrationen von 10 ng/mL zu messen.

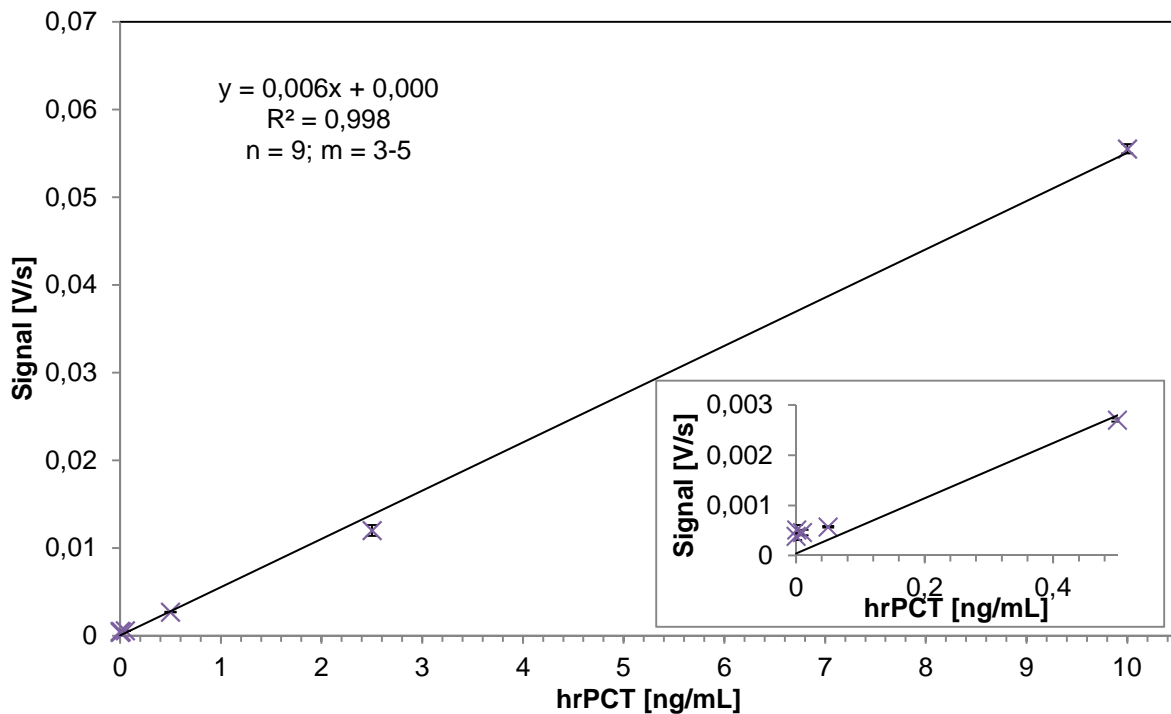


Abbildung 36 Standardkurve mit humanem EDTA-Plasma mit dem Ak-Paar PCT 6F10/CALCA 3C5-F: Gezeigt ist das addierte Signal der drei Fängerstreifen; für eine bessere Ansicht sind die geringen Konzentrationen noch einmal vergrößert in der rechten unteren Ecke eingefügt; LOD = 0,11 ng/mL, LOQ = 0,21 ng/mL

Beide Assays konnten keine Konzentrationen über 10 ng/mL hrPCT messen bzw. es konnten diese Ergebnisse nicht ausgewertet werden. Das bedeutet auch, dass eine Detektion höheren PCT-Konzentrationen in Patientenproben nicht möglich ist. Dies ist allerdings nötig, um den Assay für eine Verlaufskontrolle der Krankheit bzw. eine Überwachung der Medikamentenwirksamkeit einsetzen zu können. Patientenproben können bis zu 100 ng/mL hrPCT und mehr bei einem schweren Krankheitsbild enthalten. In diesem Bereich müssen Modifizierungen des Assays und weitere Versuche durchgeführt werden, damit auch hohe PCT-Konzentrationen gemessen werden können. Dies wurde in späteren Versuchen getestet, bei denen, durch den Einsatz eines weiteren weniger sensitiven mAk der Messbereich deutlich erweitert wurde. Auf diese Messbereichserweiterung wird in Kapitel 3.3.6 eingegangen.

Allerdings reichen die hier gezeigten Sensitivitäten der Assays und deren Messbereich bereits aus, um die PCT-Grenzen der verschiedenen Krankheitsstadien zuverlässig zu unterscheiden, die in den Leitlinien von Brahms (Henningsdorf, Deutschland) für die Interpretation der Testergebnisse in Hinblick auf das Krankheitsstadium beschrieben sind.

3.3.4.2 Humanes EDTA-Vollblut

Da der entwickelte Assay seine Anwendung im Bereich des Point-of-Care-Testing haben soll, ist es wichtig, dass er mit Vollblutproben angewendet werden kann. Daher wurde mit dem entwickelten Assay eine Standardkurve aus einer Verdünnungsreihe des hrPCTs in Vollblut erstellt. Da das Ak-Paar CALCA 4F6/CALCA 3C5-F sensitiver in den Versuchen mit EDTA-Plasma war als das Paar PCT 6F10/CALCA 3C5-F, wurde ersteres für den Test mit Vollblut ausgewählt. Dies ist, nach Stand des Wissens, der erste beschriebene Test für PCT in Vollblut.

Der Assay erreichte einen LOD-Wert von 0,02 ng/mL und einen LOQ-Wert von 0,09 ng/mL. Das Bestimmtheitsmaß war mit einem R^2 -Wert von 1 ($n = 8$) erneut sehr gut. Das zeigt, dass der entwickelte PCT-Assay gleich gut, wenn nicht sogar besser, mit Vollblut arbeitet (siehe Abbildung 37). Der Assay konnte nur eine Konzentration von 2,16 ng/mL hrPCT messen. Die nächsthöhere Konzentration (7,18 ng/mL) konnte nicht mehr ausgewertet werden.

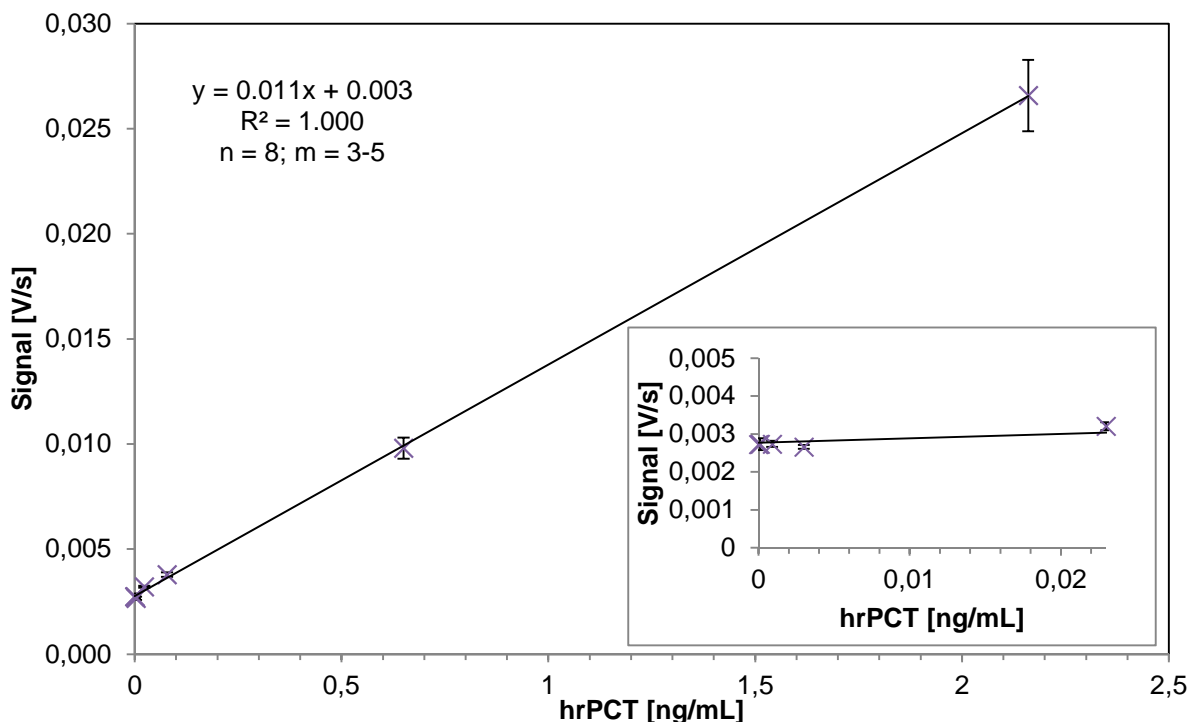


Abbildung 37 Standardkurve mit humanem EDTA-Vollblut mit dem Ak-Paar CALCA 4F6/CALCA 3C5-F: Gezeigt ist das addierte Signal der drei Fängerstreifen; für eine bessere Ansicht sind die geringen Konzentrationen noch einmal vergrößert in der rechten unteren Ecke eingefügt; LOD = 0,02 ng/mL, LOQ = 0,09 ng/mL

Es wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, der zeigen sollte, dass der Assay mit humanem Plasma und mit humanem Vollblut gleich zuverlässig arbeitet. Dafür wurde eine Verdünnungsreihe zum Erstellen einer Standardkurve mit humanem EDTA-Vollblut hergestellt und gemessen (identisch mit 5.9.4). Anschließend wurde aus diesen Proben Plasma mittels Zentrifugieren (5000 U/min, 10 min, RT) erzeugt und ebenfalls gemessen. Da so die gleichen Matrixbedingungen in Bezug auf das enthaltene Plasma gegeben waren, und es zu keinen Unterschieden auf Grund unterschiedlicher Spender kommen konnte, war ein Vergleich der Sensitivität und des Verhaltens des Assays in den unterschiedlichen Matrices möglich.

Abbildung 38 zeigt den Verlauf beider Standardkurven. Es ist deutlich zu sehen, dass der Verlauf identisch ist, was in der Geradengleichung an der identischen Steigung zu erkennen ist. Die Plasmaproben erzeugten insgesamt etwas geringere Signalstärken. Daher war es hier auch möglich eine Probe mit 7,18 ng/mL hrPCT zu messen (für den Vergleich ist in der Abbildung die Vollblutlinie extrapoliert). Eine Vermutung zu diesem Ergebnis ist, dass die höheren Signale im Vollblut auf eine höhere Detektor-Ak-Konzentration zurückzuführen sind. Die Detektor-Ak waren bei diesem Versuch bereits in den Cartridges integriert. Da auf Grund des im Blut enthaltenen Hämatokrits, die reine Flüssigkeitsmenge des eingefüllten Probenvolumens nicht den 50 µL entsprach, wie es bei einer Plasmaprobe der Fall ist, ist die Endkonzentration der Detektor-Ak im Vollblut höher. Das lässt vermuten, dass eine höhere Detektor-Ak-Konzentration die Sensitivität noch verbessern kann. Dazu sollten weitere Versuche mit verschiedenen Konzentrationen durchgeführt werden, die im Rahmen dieser Arbeit zeitlich nicht mehr möglich waren.

Insgesamt ist aus diesem Versuch ersichtlich, dass der entwickelte Assay sowohl in humanem Plasma als auch in humanem Vollblut gleich gut arbeitet. Nach meinem Stand des Wissens ist der hier gezeigte Assay der erste, der Vollblutproben messen kann und den benötigten Konzentrationsbereich von PCT abdeckt.

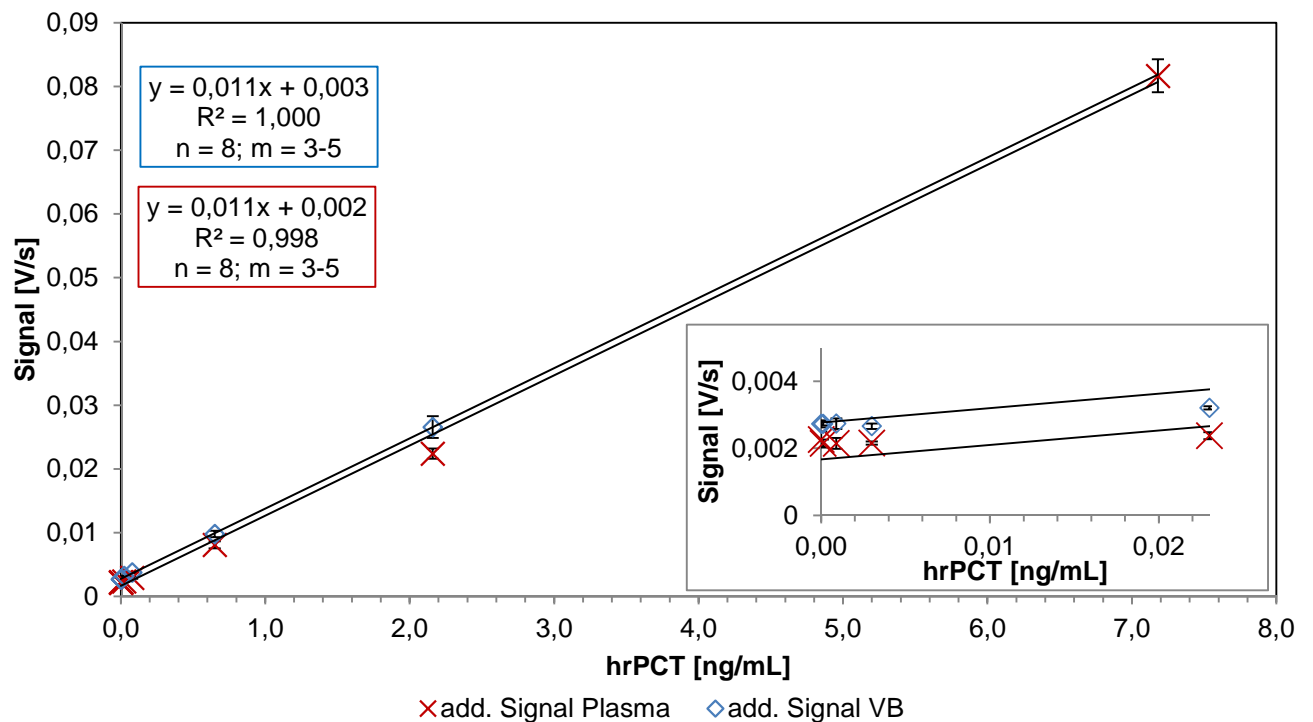


Abbildung 38 Vergleich von Standardkurven mit humanem EDTA-Plasma und humanem EDTA-Vollblut (VB) mit dem Ak-Paar CALCA 4F6/CALCA 3C5-F: Gezeigt ist das addierte Signal der drei Fängerstreifen; für eine bessere Ansicht sind die geringen Konzentrationen noch einmal vergrößert in der rechten unteren Ecke eingefügt

3.3.5 Validierung mit Patientenproben

Der nächste Schritt war die Validierung des entwickelten PCT-Assays mit Plasma-Patientenproben. Bei diesen wurde vor der Lagerung im Gefrierschrank die PCT-Konzentration mit dem Kryptor®-System von Brahms bestimmt. Es gab drei verschiedene Probensets: Zwei Sets zur Verfügung gestellt vom Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie (fzmb) und ein Probenset von der Universität Graz. Die Proben lagen in geringen Volumina vor, so dass sie auf Grund der geringen Plasmamenge z.T. nur einmal pur gemessen werden konnten und für weitere Messungen mit 0-Plasma verdünnt werden mussten. Daher konnten insgesamt nur wenige Wiederholungen durchgeführt werden. Das erste Set Patientenproben (\triangleq fzmb 1) wurde mit Spotting 1 gemessen, wohingegen das zweite Set (\triangleq fzmb 2 und Graz) mit Spotting 2 gemessen wurde (siehe 2.3.2). Zur Übersicht, welche Proben pur und verdünnt gemessen wurden bzw. welche Probe zu welchem Proben-set gehört, siehe Tabelle 18.

Tabelle 18 Zusammenstellung der gemessenen Patientenproben; p = pur, v = verdünnt; fzmb = Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie, Graz

Erhalten von	Konzentration	Verdünnung	Matrix	Gemessen	Set
fzmb 1	5,96	1:10	Serum	p/v	1
fzmb 1	5,96	1:10	Plasma	p/v	1
fzmb 1	0,48	1:10	Plasma	p/v	1
fzmb 1	9,32	1:10	Plasma	p/v	1
fzmb 1	0,73	1:10	Plasma	v	1
fzmb 1	3,13	1:10	Plasma	p/v	1
fzmb 1	1,99	1:10	Plasma	p/v	1
fzmb 2	0,03	/	Plasma	p	2
fzmb 2	0,06	/	Plasma	p	2
fzmb 2	0,07	/	Plasma	p	2
fzmb 2	0,09	/	Plasma	p	2
fzmb 2	15,83	/	Plasma	p	2
fzmb 2	22,78	/	Plasma	p	2
fzmb 2	49,1	/	Plasma	p	2
fzmb 2	186,4	1:4	Plasma	p/v	2
Graz	0,2	/	Serum	p	2
Graz	0,3	/	Serum	p	2
Graz	18,5	/	Serum	p	2
Graz	1,0	/	Serum	p	2
Graz	43,1	/	Serum	p	2
Graz	0,8	/	Serum	p	2

Graz	21,9	/	Serum	p	2
Graz	0,4	/	Serum	p	2
Graz	2,4	/	Serum	p	2
Graz	1,0	/	Serum	p	2

Mit dem ersten Set des fzmb wurden die Fänger-Ak CALCA 4F6, PCT 27A3, PCT 42 und PCT 6F10 getestet. In diesem Versuch zeigte sich, dass die Fänger-Ak PCT 6F10 und CALCA 4F6 endogenes PCT in Realproben zuverlässig messen. Die erhaltenen Signalintensitäten korrelieren gut mit den vom Kryptor[®]-System bestimmten PCT-Konzentrationen. Die Fänger-Ak PCT 27A3 und PCT 42 zeigten in zwei Proben zu niedrige Signale für die darin enthaltene PCT-Konzentration. Die unterschiedliche Erkennung bei zwei Patientenproben ist in Abbildung 39 dargestellt. Die zwei unterschiedlich erkannten Proben sind mit roten Pfeilen markiert. Das Muster der Signalintensitäten über alle Patientenproben ist zwischen allen Fängern gleich. Nur der relative Anstieg der Proben 0,48 ng/mL (dunkelblau) und 1,99 ng/mL (orange) stellen eine Ausnahme dar. Für diese Proben ergaben die Fänger-Ak CALCA 4F6 und PCT 6F10 glaubwürdigere Signalanstiege, wenn man die Signalanstiege von anderen Proben mit Konzentrationen, die um den betrachteten PCT-Wert liegen, anschaut. Die Fänger-Ak PCT 27A3 und PCT 42 detektierten diese in Korrelation zu den Kryptor[®]-Werten zu niedrig.

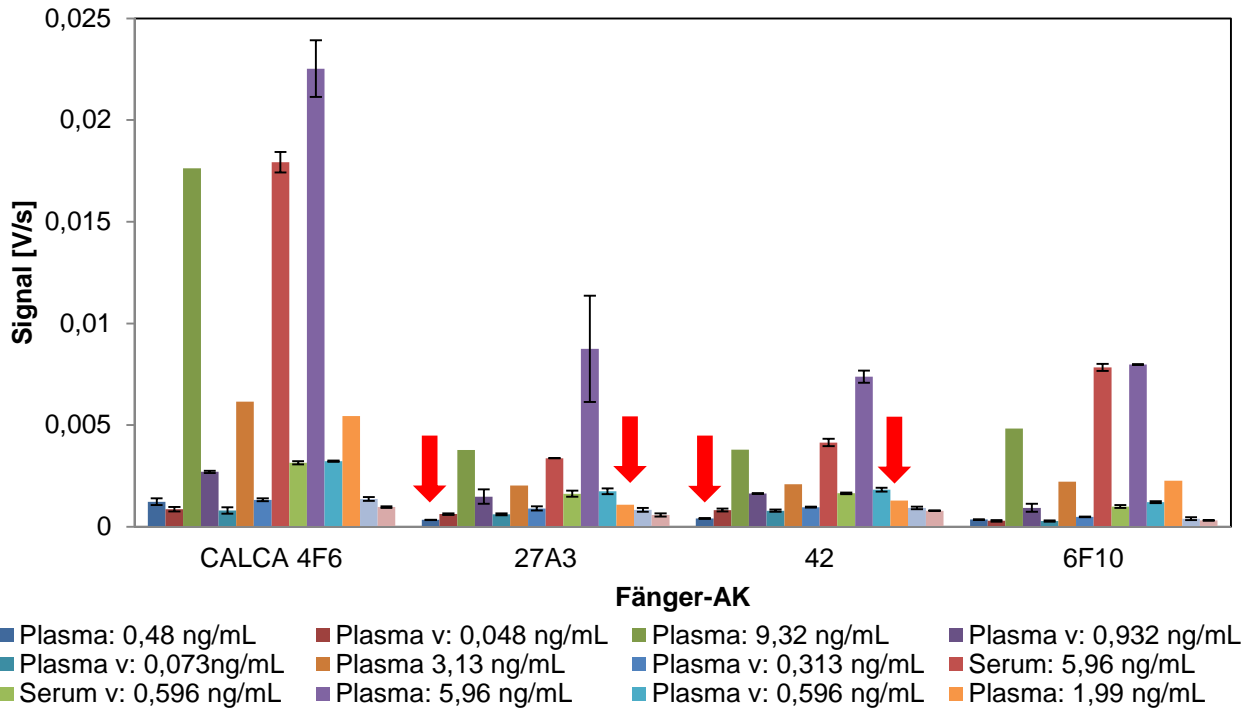


Abbildung 39 Erstes Screening der Fänger-Ak mit Patientenproben; v=verdünnt 1:10 mit 0-Plasma; m = 1-3; die roten Pfeile markieren die Proben, die bei den Fängern-Ak PCT 27A3 und PCT 42 niedrigere Signalintensitäten im Vergleich zu den anderen Patientenproben ergaben als bei den Fänger-Ak CALCA 4F6 und PCT 6F10 (Plasma: 0,48 ng/mL dunkelblau; Plasma: 1,99 ng/mL orange)

Mit den Fängern-Ak CALCA 4F6 und PCT 6F10 wurden daraufhin weitere Patientenproben gemessen (Set 2 vom fzmb und Proben aus Graz).

Zwischen den zuvor mit dem Kryptor®-System bestimmten PCT-Konzentrationen und den mit dem respons® IQ enthaltenen Signalen wurde eine Korrelation erstellt. Die Ergebnisse für alle gemessenen Proben der drei Sets zeigt Abbildung 40. Für das Ak-Paar CALCA 4F6/CALCA 3C5-F zeigt sich, dass eine gute Korrelation für niedrige Konzentrationen möglich ist. Die höheren PCT-Konzentrationen allerdings geben im Vergleich zu geringe Signale. Ein ähnliches Bild zeigt sich für das Ak-Paar PCT 6F10/CALCA 3C5-F. Auch hier zeigt sich bei den niedrigen Konzentrationen eine gute Korrelation und erst bei höheren PCT-Konzentrationen ist keine Korrelation zwischen dem respons® IQ-Signal und den auf dem Kryptor®-System bestimmten Konzentrationen mehr gegeben. Dies stimmt mit den Ergebnissen der erstellten Standardkurven im Hinblick auf die Arbeitsbereiche überein, dass der Assay im PCT-Konzentrationsbereich bis 10 ng/mL gut arbeitet und höhere Konzentrationen nicht mehr zuverlässig detektiert.

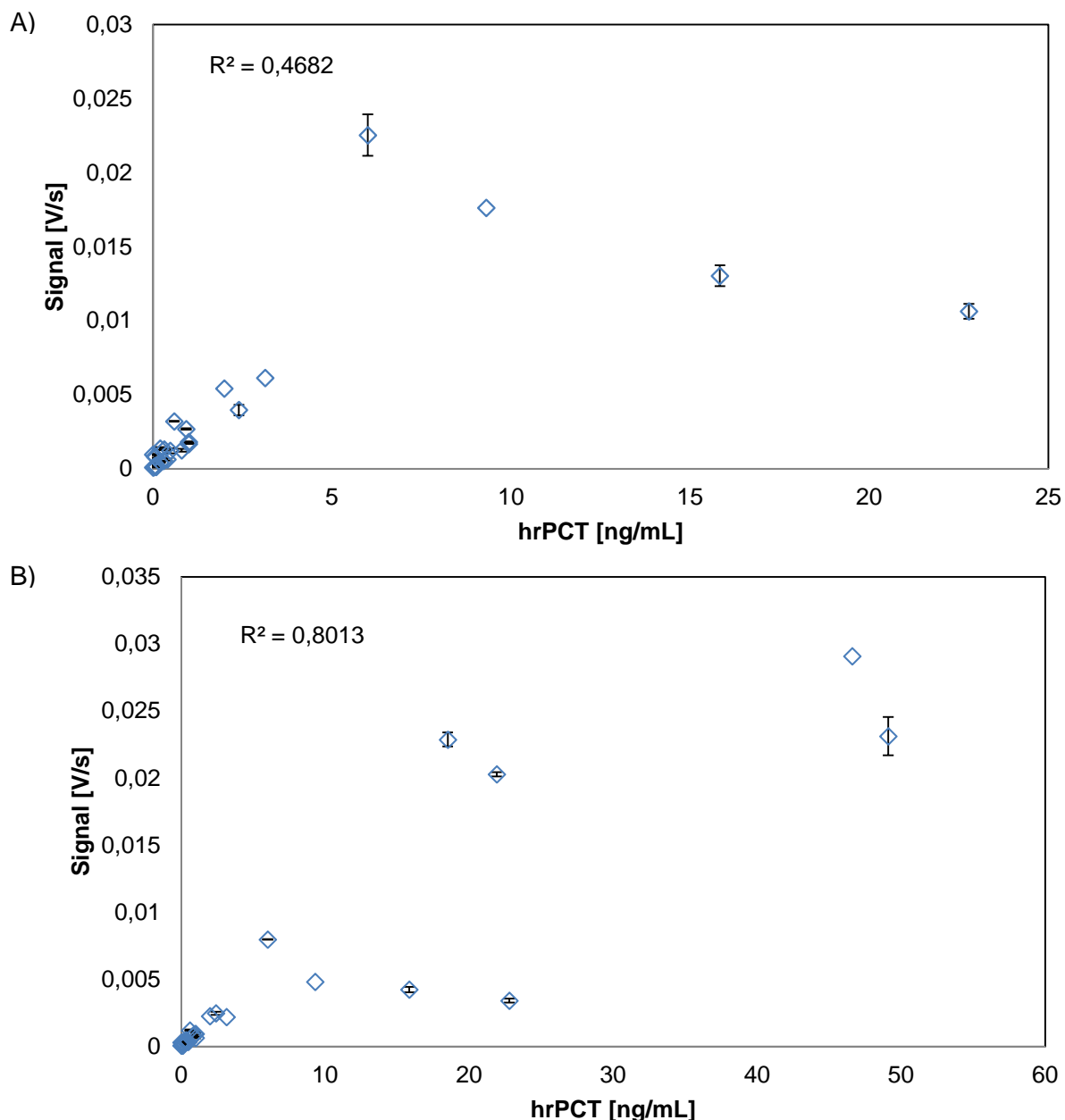


Abbildung 40 Korrelation zwischen den mit dem Kryptor[®]-System von Brahms gemessenen PCT Konzentrationen in Patientenproben und den erhaltenen Signalen des respons[®] IQ; A) CALCA 4F6/CALCA 3C5-F; B) PCT 6F10/CALCA 3C5-F

Bei der Betrachtung der Residuen für beide Fänger-Ak bestätigt sich diese Einschätzung. Residuen stellen ein Maß für die Abweichung der y-Werte von einer Regressionsgeraden dar und sollten in einem waagrechten Bereich konstanter Breite liegen. Sie werden berechnet, indem der x-Wert in die erhaltene Regressionsgeradengleichung eingesetzt wird und das Ergebnis dann vom y-Wert abgezogen wird. Diese wurden für den Fänger CALCA 4F6 mit in Abbildung 42 A) gezeigten Regressionsgerade berechnet. Hier ist deutlich erkennbar, dass für den Fänger-Ak CALCA 4F6 die gemessenen Werte für Konzentrationen bis einschließlich 9 ng/mL in einem Bereich zwischen +/- 0,005 liegen (siehe Abbildung 41 A)). Bei höheren

Konzentrationen liegen die Messwerte außerhalb dieses Bereichs. Die Patientenprobe mit 6 ng/mL liegt ebenfalls deutlich außerhalb des Bereiches. Das ist ein Hinweis, dass diese Werte nicht mehr im linearen Bereich des Assays liegen und daher nicht valide gemessen werden konnten. Auch die Ergebnisse des Arbeitsbereiches beim Erstellen der Standardkurven zeigen diese Abweichungen bei hohen Konzentrationen auf.

Ähnliches zeigt sich für den Fänge-Ak PCT 6F10. Die Regressionsgerade aus Abbildung 42 B) wurde zur Berechnung der Residuen herangezogen. Die Messwerte niedriger PCT-Konzentrationen liegen ebenfalls in einem Bereich von $\pm 0,005$. Hier ist zu sehen, dass die Werte für Patientenproben vom fzmb mit Konzentrationen über 9 ng/mL deutlich außerhalb des Bereiches liegen und somit ebenfalls nicht mehr korrekt gemessen werden konnten (siehe Abbildung 41 B)).

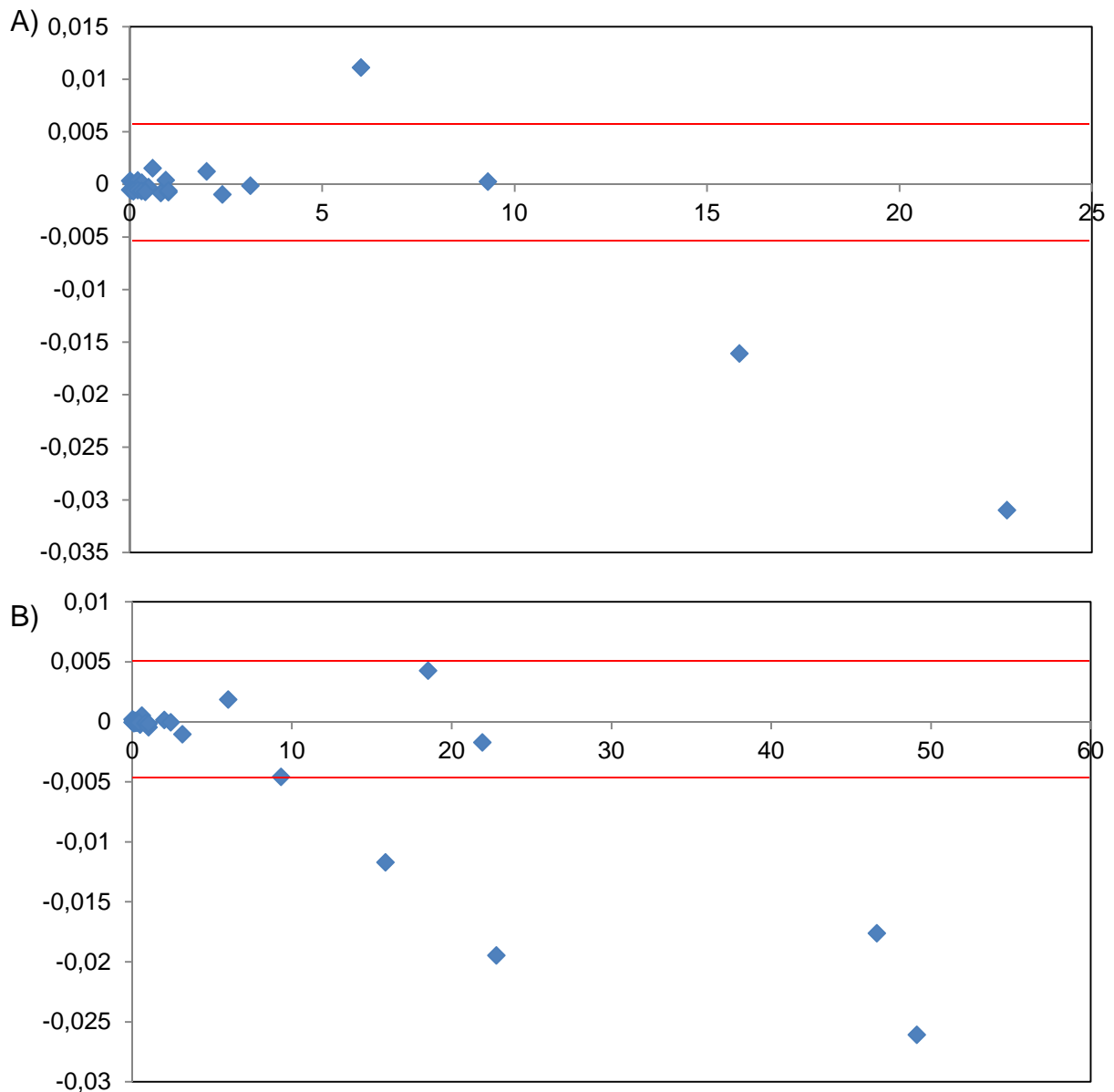


Abbildung 41 Berechnete Residuen für die Messungen der Patientenproben; die x-Achse entspricht den angegebenen PCT-Konzentrationen der einzelnen Proben; A) Fänger-Ak CALCA 4F6, n = 26, m = 1-3; B) Fänger-Ak PCT 6F10, n = 30, m = 1-3

Abbildung 42 zeigt Regressionsgeraden mit einem eingeschränkten Konzentrationsbereich für beide Assays, welche nur geringe Residuen aufweisen. Für das Paar CALCA 4F6/CALCA 3C5-F wurde eine Regressionsgerade der Proben innerhalb des Konzentrationsbereichs bis 9 ng/mL erstellt. In diesem Bereich ergibt sich eine sehr gute Korrelation mit einem R^2 von 0,94 (n = 23) (siehe Abbildung 42 A)), erst höhere Werte korrelieren nicht mehr, wie es auch die Residuen vermuten ließen. Einzige Ausnahme stellt die Probe mit 6 ng/mL dar. Diese Probe wurde herausgelassen, da sie die Korrelation deutlich verschlechterte und sich somit das Ergebnis der Residuenberechnung, dass diese Probe wohl einen Ausreißer darstellt, bestätigt. Eine Möglichkeit ist, dass die angegebene Konzentration wohl nicht der

tatsächlichen enthaltenen PCT-Konzentration entspricht. Das Ergebnis stimmt mit dem gefundenen Arbeitsbereichen des Assays bei der Erstellung der Standardkurven in humanem EDTA-Plasma überein, der unter 10 ng/mL PCT lag.

Bei dem Paar PCT 6F10/CALCA 3C5-F zeigte es sich, dass ohne die Proben des fzmb über 6 ng/mL PCT eine sehr gute Korrelation mit R^2 von 0,972 ($n = 25$) bis zu einer Konzentration von 21 ng/mL PCT möglich war (siehe Abbildung 42 B)). Auch hier verschlechterte sich die Korrelation deutlich, sobald Proben höherer Konzentration mit einbezogen wurden, was ebenfalls bei der Residuenberechnung erkennbar war. Die Proben des fzmb über 6 ng/mL lagen hier nicht mehr im linearen Bereich der Messung. Die Probe mit 9 ng/mL PCT liegt bei den Residuen auf der Grenze, bei der Erstellung der Regressionsgerade verschlechterte sie allerdings die Regression, daher wird vermutete, dass auch sie nicht mehr im linearen Messbereich dieses Assays lag. Da der Assay einen größeren Arbeitsbereich aufweist als der Assay CALCA4F6/CALCA 3C5-F lag die Probe mit 6 ng/mL in diesem Fall noch innerhalb dessen. Die Ergebnisse für diesen Assay passen zu dem in humanem EDTA-Plasma gefundenen Arbeitsbereich. Mit dem Assay PCT 6F10/CALCA 3C5-F war es möglich Konzentrationen bis einschließlich 10 ng/mL PCT zu messen, da er etwas weniger sensitiv arbeitet als der Assay CALCA 4F6/CALCA 3C5-F. Höhere Konzentrationen wurden bei der Erstellung der Standardkurven nicht gemessen. Der Versuch mit Patientenproben zeigt, dass dieser Assay Konzentrationen bis 22 ng/mL messen kann.

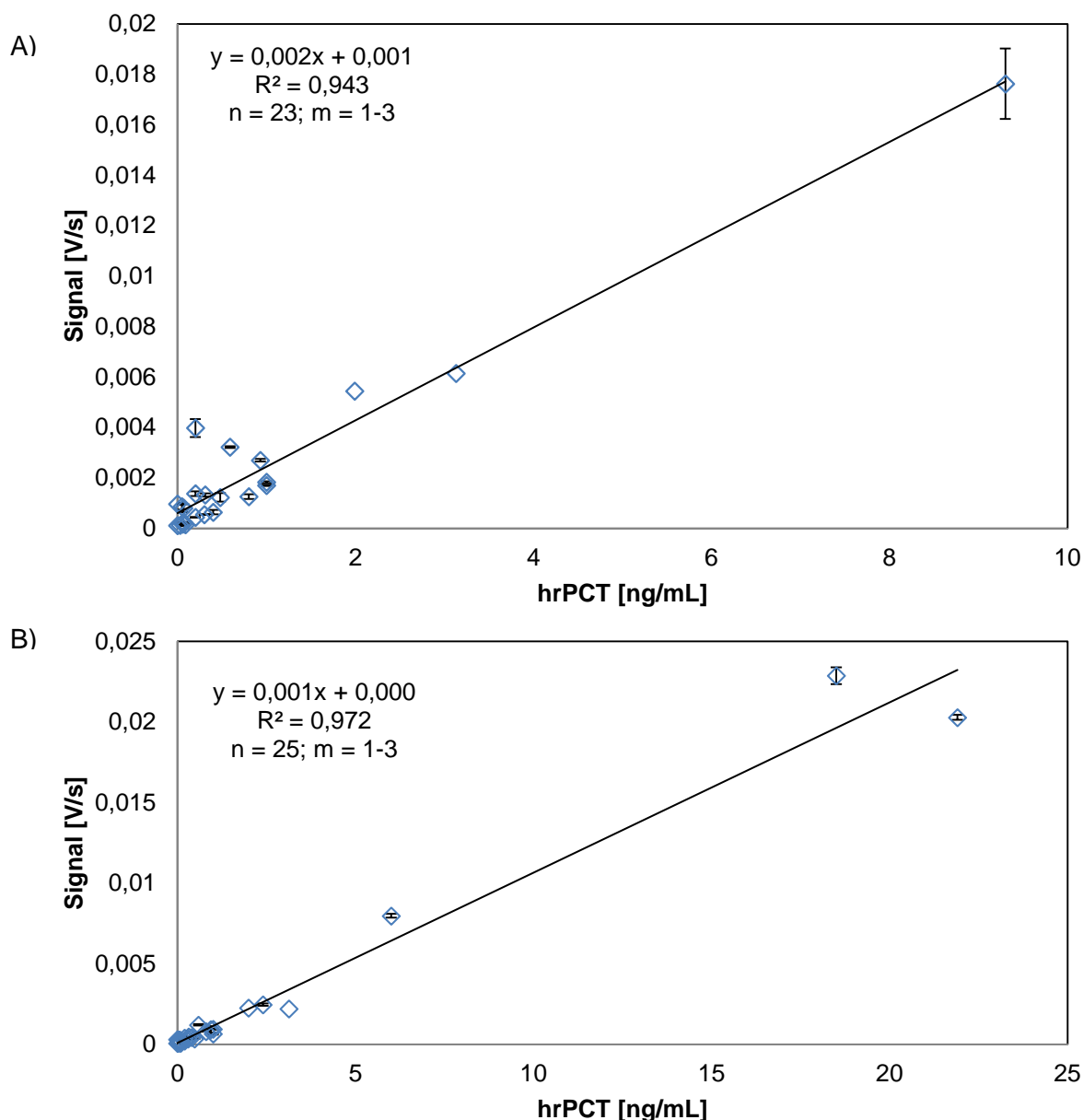


Abbildung 42 Korrelation bei Patientenproben mit niedrigen PCT-Konzentrationen; **A)** CALCA 4F6/CALCA 3C5-F: Eine gute Korrelation bei PCT-konzentrationen bis 9 ng/mL ohne die Probe mit 6 ng/mL PCT; **B)** PCT 6F10/CALCA 3C5-F: Eine gute Korrelation der Patientenproben ohne der Proben des fzmb über 6 ng/mL PCT

Weiterhin fällt bei den Messwerten mit einer hohen PCT-Konzentration auf, dass die fzmb-Proben über 6 ng/mL kleinere Signale liefern als die Graz-Proben mit einer vergleichbaren Konzentration. Diese fzmb-Proben verschlechtern daher bei beiden Assays die erhaltene Korrelation. Daher liegt die Vermutung nahe, dass eine weitere Verbesserung der Korrelation für das Patientenprobenset aus Graz erreicht werden kann, wenn die Patientenproben nach Herkunft getrennt aufgetragen werden. Diese Trennung ist in Abbildung 43 dargestellt. Beim CALCA 4F6 ergibt sich so für die Proben des fzmb ein R^2 von 0,934 ($n = 16$) und für die

Proben aus Graz ein R^2 von 0,996 ($n = 8$) (siehe Abbildung 43 A)). Ein ähnliches Bild zeigt der PCT 6F10: Für die fzmb-Proben wird ein R^2 von 0,939 ($n = 16$) erhalten und für die Graz-Proben ein R^2 von 0,972 ($n = 10$) (siehe Abbildung 43 B)).

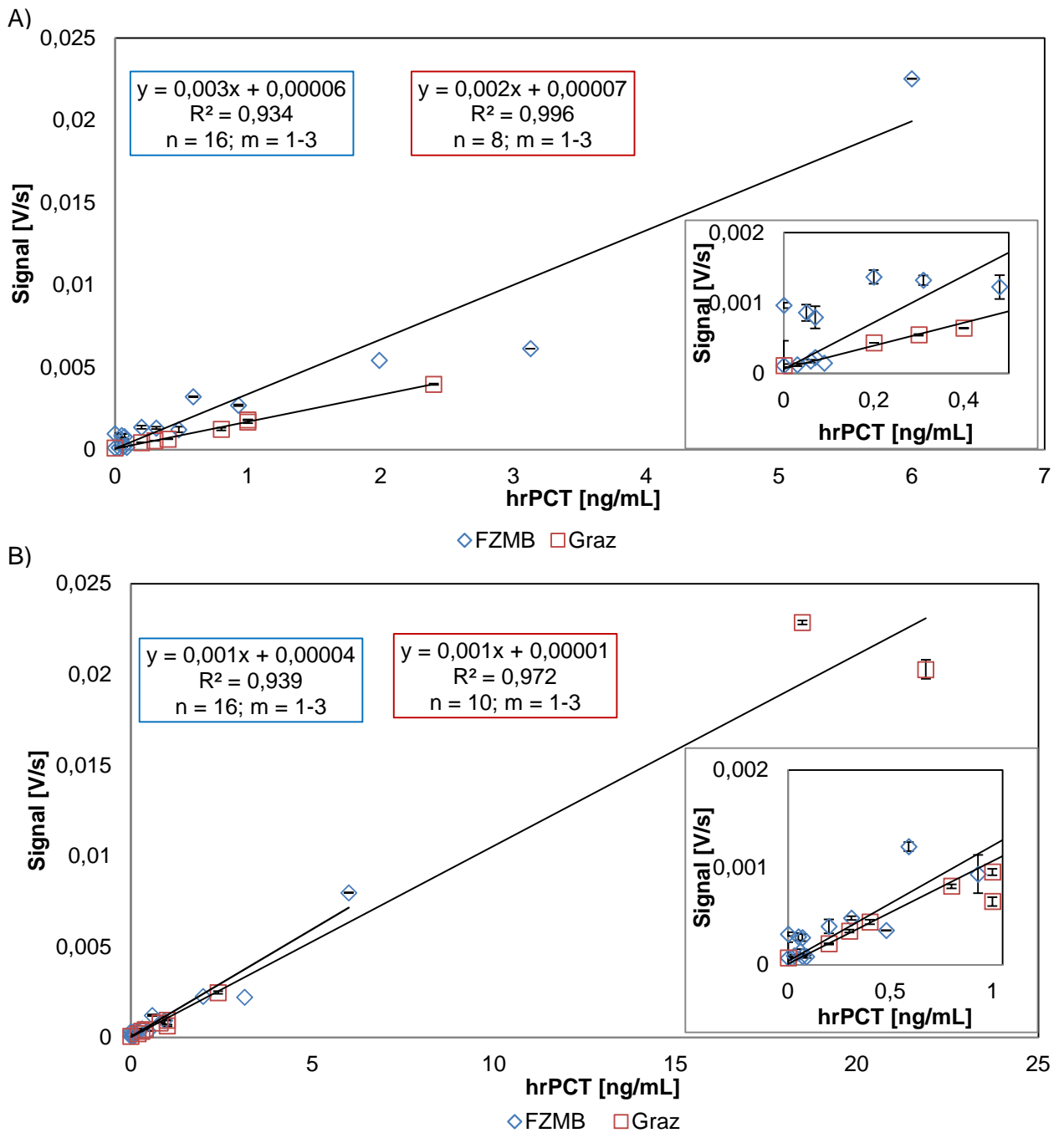


Abbildung 43 Korrelationen der Patientenproben aufgeteilt nach Herkunft; A) CALCA 4F6/CALCA 3C5-F; B) PCT 6F10/CALCA 3C5-F

Es gibt mehrere mögliche Gründe für die bessere Korrelation innerhalb der einzelnen Patientenprobensets. Einer ist, dass beide Sets auf unterschiedlichen Kryptor[®]-Systemen gemessen wurden, d.h. auch mit unterschiedlichen Kalibrierungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. So kann es zu leichten Abweichungen bei der Konzentrationsbestimmung kommen, die sich bei einem Vergleich aller Sets in leichten systematischen Abweichungen auswirken. Innerhalb eines Sets sind die erhaltenen PCT-Konzentrationen auf Grund einer Bestimmung vermutlich auf demselben Gerät mit identischer Kalibrierung kohärenter. Eine weitere Ursache könnte in einer unterschiedlichen Lagerung begründet liegen. Es war bei den Proben nicht bekannt, wie lange diese vor dem Einfrieren bei RT gelagert worden waren, und eben so wenig wie lange diese bereits eingefroren waren, bevor sie auf dem respons[®] IQ gemessen wurden. In einer Untersuchung von Schuetz et al. zeigte sich ein Abbau bei tiefgefrorenen Serumproben von ca. 10 %, wobei ein Trend zu einem höheren Abbau bei längerer Lagerung zu erkennen war [76]. Bei der Lagerung, gerade bei RT, kommt es zu einem Abbau des PCTs, wodurch auf dem respons[®] IQ niedrigere Signale erzeugt werden (siehe hierzu 3.1.3.1). Da die Lagerung der verschiedenen Sets sicherlich unterschiedlich war, innerhalb eines Sets aber durchaus dieselben Bedingungen herrschten, kann es zu unterschiedlich starkem Abbau zwischen den Sets gekommen sein. Bei den Proben vom fzbm könnte bei den Proben mit höheren PCT-Konzentrationen ein stärkerer Abbau stattgefunden haben als bei den Proben aus Graz.

Insgesamt zeigt sich aber, dass in sehr guter Korrelation zu dem vorherrschenden Messsystem von Brahms, der hier entwickelte Assay natives hPCT in Patientenproben messen kann. Dieser Assay kann im Vergleich zu dem bereits früher publizierten Assay von Krämer et al. natives PCT in Patientenproben detektieren [21,22]. Die neu entwickelten mAk zeigen im Vergleich zu den früher hergestellten Ak gegen hPCT weiterhin eine sehr gute Korrelation zu dem etablierten Brahms System.

3.3.6 Messbereichserweiterung

Da es zur Verlaufskontrolle der Krankheit bzw. der Überwachung der Antibiotikawirksamkeit wichtig ist, auch hohe Konzentrationen des hPCT messen zu können, wurden Versuche durchgeführt, um den Messbereich zu erweitern. Hierzu wurde ein zusätzlicher Fänger-Ak getestet, der hPCT weniger sensitiv erkennt. Das Ziel war, dass mit einer Kombination des CALCA 4F6 bzw. PCT 6F10 und des hinzugenommenen Ak PCT 22A11 von HyTest ein größerer Konzentrationsbereich abgedeckt werden kann. Es wurde jeweils einer der N-

terminalen Fänger (CALCA 4F6, PCT 6F10) und der im Katalcalcin-Bereich bindende PCT 22A11 auf einer Cartridge immobilisiert, um einen direkten Vergleich der beiden Fänger-Ak unter identischen Bedingungen zu ermöglichen. Auf den Cartridges war als Detektor-Ak der fluoreszenzmarkierte mAk CALCA 3C5 und 1% Ziegen Serum enthalten, sowie eine Blockierlösung gegen den Abfall der Basislinie. 50 µg/mL Ratten-Ak wurden den Proben extern zugegeben.

Um zu sehen, ob es mit einer dieser Kombinationen möglich ist, den Messbereich zu erweitern, wurde die Patientenproben fzb 2 und Graz mit Cartridges gemessen, die auch den PCT 22A11-Ak als Fänger enthielten, und eine Korrelation erstellt. Diese war mit R^2 gleich 0,96 ($n = 20$) bis zu sehr hohen PCT-Konzentrationen gut. Der höchste Wert einer Probe, die gemessen werden konnte, lag bei 186,4 ng/mL PCT (siehe Abbildung 44). Die Vergrößerung der Kalibrierkurve für geringe Konzentrationen zeigt allerdings, dass im unteren Konzentrationsbereich der Fänger-Ak PCT 22A11 nicht sensitiv genug arbeitet, um auch kleine PCT-Mengen zuverlässig zu detektieren und zu unterscheiden.

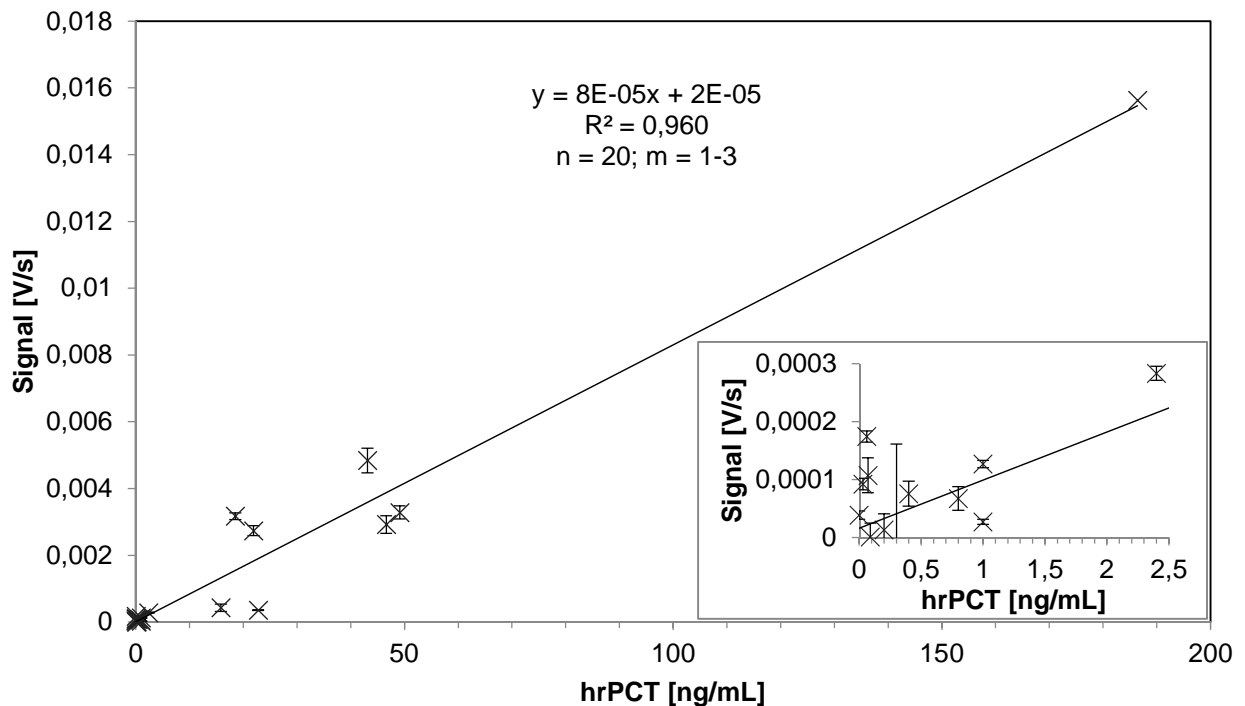


Abbildung 44 Korrelation der Patientenproben für das Ak-Paar PCT 22A11/CALCA 3C5-F; zur Veranschaulichung sind die Konzentrationen bis 2,5 ng/mL PCT im rechten unteren Eck vergrößert dargestellt

Erstellt man eine Korrelation der Patientenproben bis 2,5 ng/mL PCT für den Fänger-Ak 22A11, sieht man, dass diese mit einem R^2 von 0,41 ($n = 12$) deutlich schlechter ist als bei den Fängern CALCA 4F6 ($R^2 = 0,94$; $n = 23$) und PCT 6F10 ($R^2 = 0,97$; $n = 25$) (siehe Abbildung 45). Dieser Fänger-Ak allein zeigt somit nicht die benötigte Sensitivität bei der Unterscheidung geringer PCT-Konzentrationen. Allerdings in der Kombination mit einem der N-terminalen Fänger-Ak CALCA 4F6 oder PCT 6F10, die den unteren Konzentrationsbereich abdecken, ist es mit dem PCT 22A11-Ak möglich den Arbeitsbereich um ein Vielfaches zu erweitern. Damit ist die Abdeckung eines großen Konzentrationsbereiches mit dem entwickelten Assay möglich.

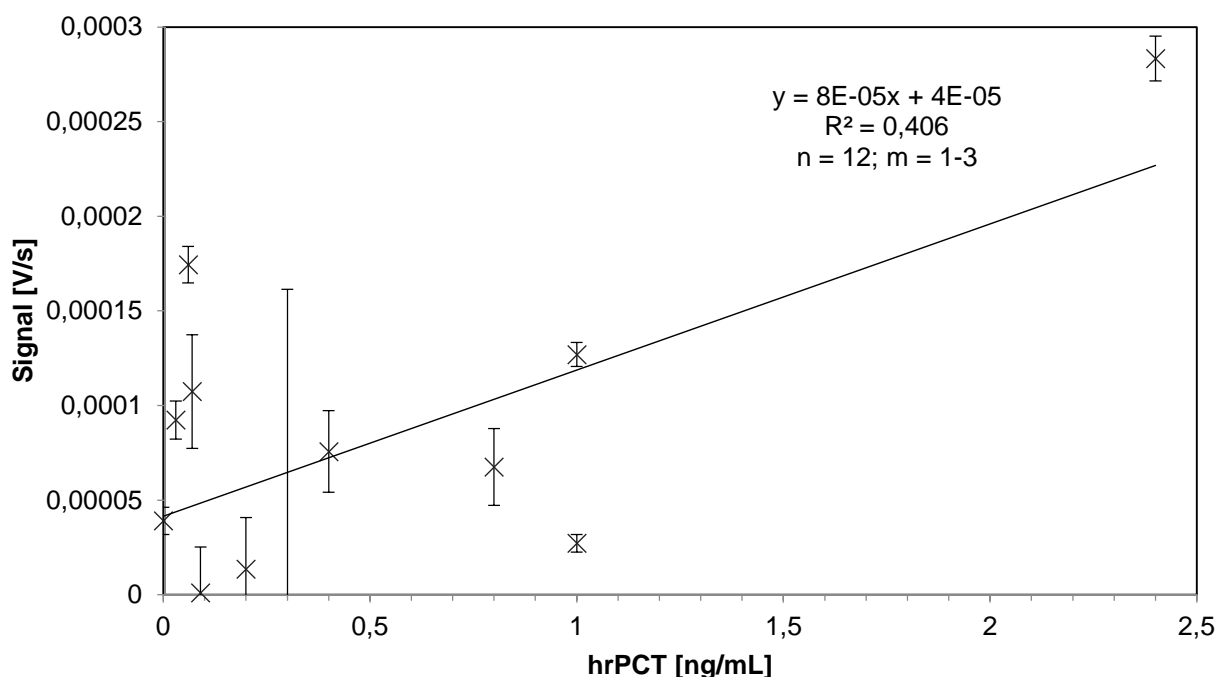


Abbildung 45 Korrelation der Patientenproben bis 2,5 ng/mL PCT für das Ak-Paar PCT 22A11/CALCA 3C5-F

Als Vorversuch wurden diese Cartridges mit der Kombination eines N-terminalen Fängers und des Katalcalcin-Fängers PCT 22A11 verwendet, um Proben mit verschiedenen hrPCT Konzentrationen zu messen. Als Standard wurden hier einmal das hrPCT von Prospec mit His-Tag und das intern hergestellte PCT1-116 verwendet. Dabei zeigte sich, dass der mAk PCT 22A11 im Vergleich zu den N-terminalen Fängern mit den verschiedenen hrPCTs unterschiedliche Signalstärken lieferte. Um dies zu überprüfen, wurden alle zur Verfügung stehenden kommerziell erhältlichen hrPCTs und die intern hergestellten Varianten mit jeweils

1 ng/mL als Triplikat gemessen. Zusätzlich wurden zwei Patientenproben, die ebenfalls 1 ng/mL PCT enthalten sollten (PCT-Bestimmung vor der Lagerung mit dem Kryptor®-System von Brahms), gemessen, um zu sehen, welche hrPCTs eine ähnliche Signalstärke wie die nativen Proben erreichen.

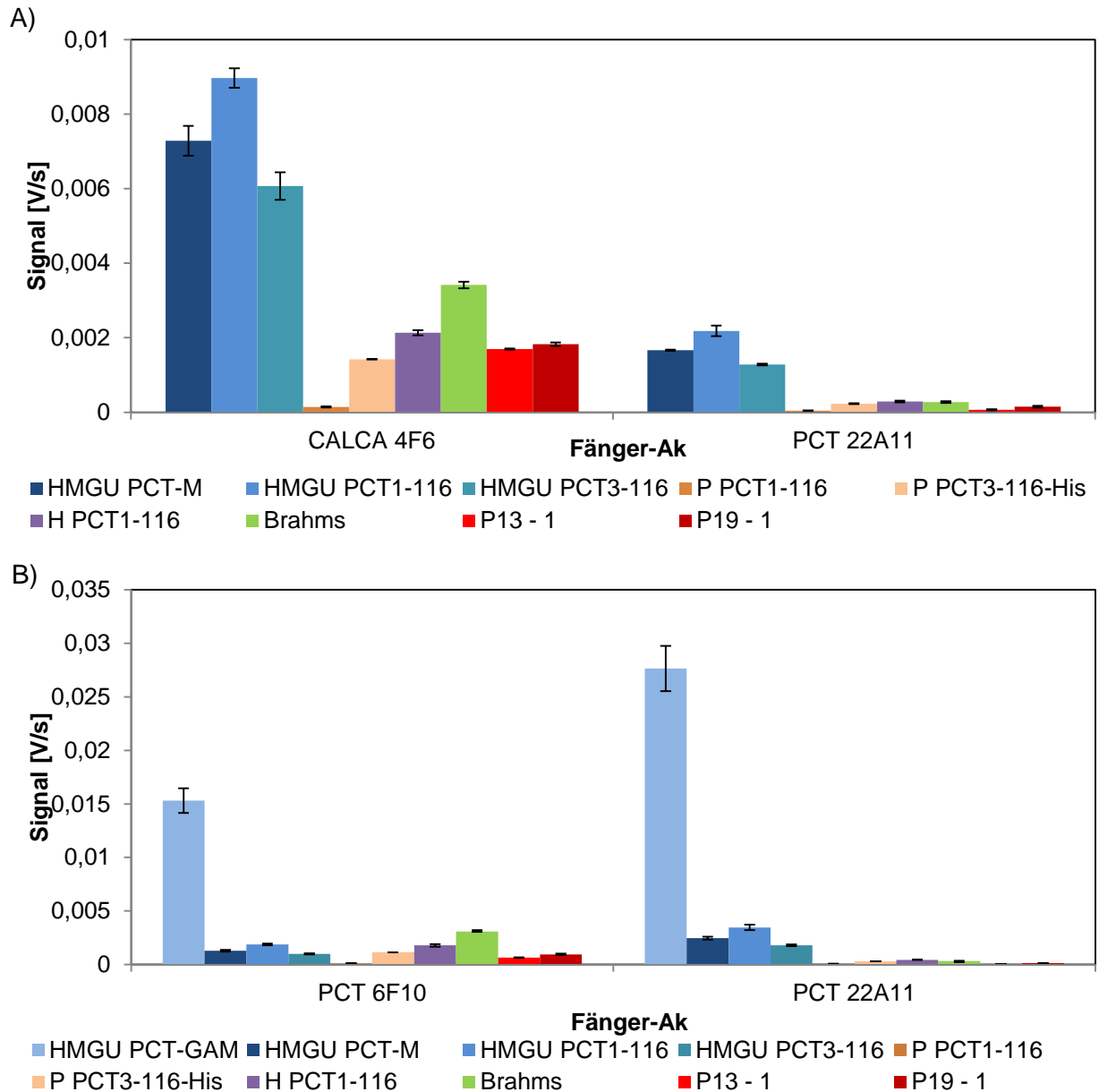


Abbildung 46 Signalanstiege mit verschiedenen hrPCTs bei verschiedenen Fänger-Ak; A) CALCA 4F6 und PCT 22A11; B) PCT 6F10 und PCT 22A11; HMGU = intern hergestelltes PCT, P = Prospec; H = HyTest, Brahms = Brahms-Kalibrator für den Kryptor®, P13/P19 = Patientenproben; m = 3

Abbildung 46 zeigt die Signalanstiege aller gemessenen Proben. Vergleicht man die erhaltenen Signale der einzelnen Proben je Fänger-Ak, zeigt sich beim CALCA 4F6 und PCT 22A11 ein ähnliches Verlaufsmuster in den erhaltenen Signalintensitäten der einzelnen Proben (vgl. Abbildung 46 A)). Die unterschiedlichen Signalintensitäten der einzelnen Proben können teilweise mit der Konzentrationsbestimmung der verschiedenen Standards zusammenhängen. Die Konzentrationen der intern hergestellten hrPCTs wurden mit einem NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA) bestimmt. Bei den kommerziell erhältlichen hrPCTs wurden die vom Hersteller genannten Konzentrationen nicht erneut überprüft. Auch wurden die Stammlösungen nicht direkt vor der Herstellung der einzelnen Proben erneut gemessen. Bei der Lagerung kann es zu Agglomeration von PCT-Molekülen kommen bzw. zu einem Abbau.

Die intern hergestellten hrPCTs (PCT-M, PCT1-116, PCT3-116) ergeben im Vergleich zu den kommerziell erhältlichen und den beiden Patientenproben höhere Signale beim CALCA 4F6 von 0,006 – 0,009 V/sec im Vergleich zu 0,001-0,003 V/sec. Dies ist ebenfalls beim PCT 22A11 zu sehen mit 0,001-0,002 V/sec für die HMGU-hrPCTs im Vergleich zu 0,0004-0,0003 V/sec für die Kommerziellen.

Im Gegensatz dazu ergeben im Vergleich zum CALCA 4F6, die intern hergestellten hrPCTs beim PCT 6F10 geringere Signalintensitäten (0,001-0,002 V/sec), wenn man diese mit den Signalen der kommerziell erhältlichen hrPCTs von Prospec, HyTest und Brahms vergleicht und sind im Falle des Brahms hrPCTs und HyTest PCT1-116 sogar niedriger (0,00003-0,003 V/sec) (vgl. Abbildung 46 B)). Der Fänger-Ak PCT 22A11 hingegen zeigt auch hier ähnliche Ergebnisse wie im Versuch mit dem CALCA 4F6: 0,002-0,003 V/sec für die HMGU-hrPCTs und 0,00005-0,0004 V/sec für die Kommerziellen. Dass die Unterschiede durch Messfehler oder Produktionsfehler verursacht wurden, konnte somit ausgeschlossen werden. Dies lässt vermuten, dass das intern hergestellte hrPCT in der Region, die vom PCT 6F10 erkannt wird, vom nativen hPCT bzw. den kommerziell erhältlichen abweicht. Der PCT 6F10 bindet im N-terminalen Bereich des hPCTs, ebenso wie der CALCA 4F6. Bei diesem ist die Bindungsregion bekannt (AS 43-55; vgl. 3.1.1.1), wohingegen beim PCT 6F10 keine genaueren Angaben zu finden sind. Da dieses Phänomen beim CALCA 4F6 nicht auftritt, kann dessen Bindungsregion allerdings ausgeschlossen werden.

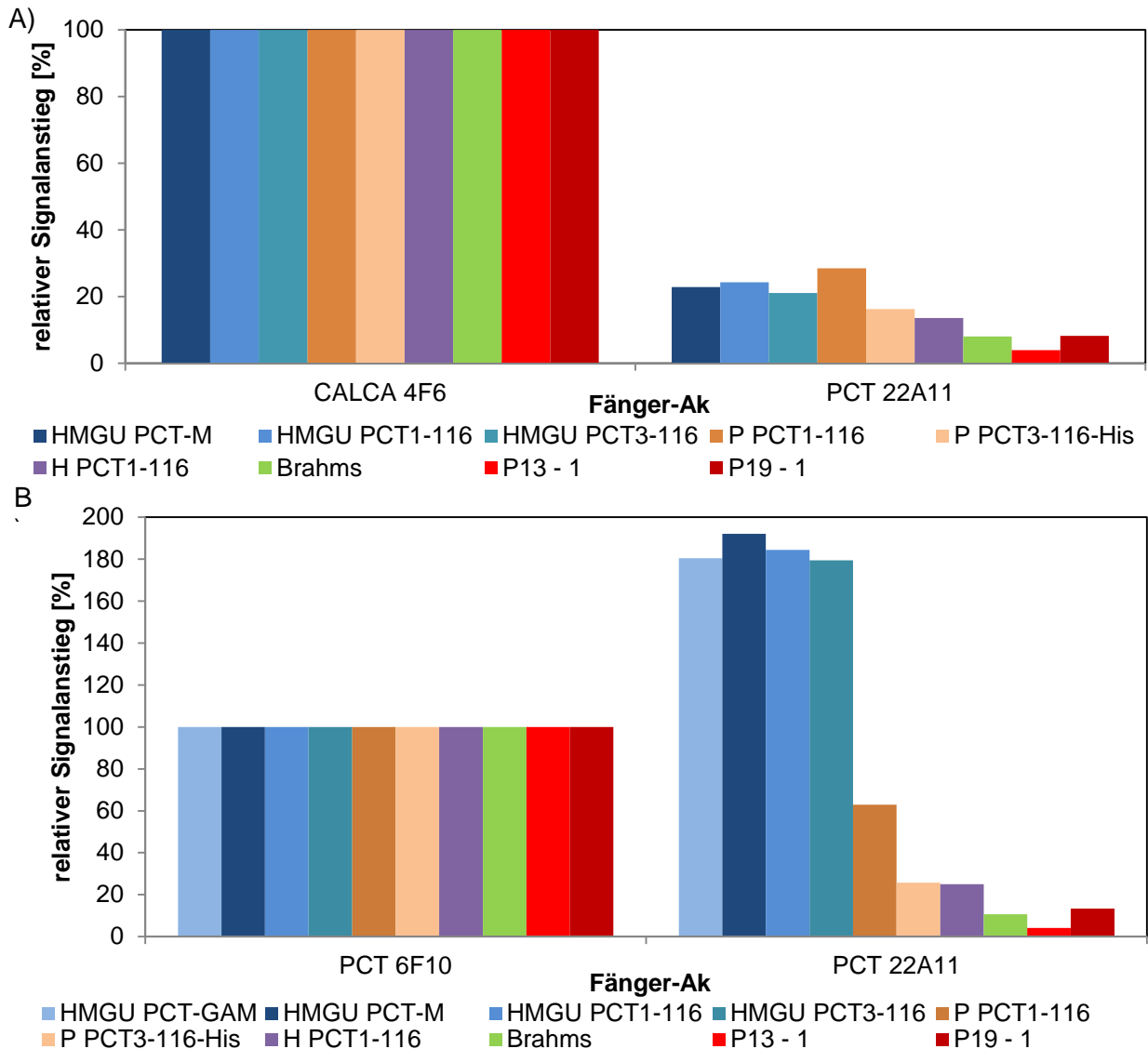


Abbildung 47 Relative Signalanstiege mit verschiedenen hrPCTs bei verschiedenen Fänger-Ak; A) CALCA 4F6 und PCT 22A11; B) PCT 6F10 und PCT 22A11; HMGU = intern hergestelltes PCT, P = Prospec; H = HyTest, Brahms = Brahms-Kalibrator für den Kryptor®; P13/P19 = Patientenproben

Abbildung 47 zeigt zur Verdeutlichung der Unterschiede in den erhaltenen Signalstärken für die verschiedenen hrPCTs die relativen Signalanstiege des Fänger-Ak PCT 22A11 im Vergleich zu den im N-terminalen Bereich bindenden mAks. Hierzu wurde die erreichte Signalstärke der jeweiligen Probe des N-terminalen Fänger-Ak auf 100% festgelegt und das erreichte Signal bei der entsprechenden Probe des PCT 22A11 dazu in Relation gesetzt. Beim Vergleich der Fänger-Ak zeigt sich, dass nur beim Vergleich mit dem PCT 6F10 die intern hergestellten hrPCTs beim PCT 22A11 ein deutlich höheres relatives Signal aufweisen (179,5-192,1%; vgl. Abbildung 47 B)). Die kommerziell erhältlichen hrPCTs geben niedrigere Signale beim PCT 22A11 als beim PCT 6F10 (10,7-63,0%). Das stimmt mit früheren Ergebnissen

eines Vorversuches mit dem PCT 22A11-Ak überein, dass dieser weniger sensitiv hrPCT nachweist als die bisher verwendeten Fänger-Ak (Daten nicht gezeigt). Die zwei getesteten Patientenproben geben mit dem Ak PCT 22A11 ebenfalls niedrigere relative Signalstärken (4,2-13,3%). Im Vergleich mit dem CALCA 4F6 liegen alle relativen Signalstärken des PCT 22A11 deutlich unter 100% (vgl. Abbildung 47 A)). Da es nur beim PCT 6F10 zu Unterschieden kommt, ist dies ein Hinweis, dass sich das intern hergestellte hrPCT in seiner AS-Sequenz oder seiner Faltung im N-terminalen Bereich zu dem nativen hPCT in Patientenproben unterscheidet. Die kommerziell erhältlichen Varianten des hrPCTs entsprechen der nativen Form in diesem Versuch besser. Diese Ergebnisse haben allerdings keinen weiteren Einfluss auf die Entwicklung des Assays, da dieser, wie zuvor gezeigt, natives hPCT mit sehr guter Korrelation zum Kryptor®-System detektiert. Der Assay, der ausschließlich die intern hergestellten mAks verwendet, wird nach diesem Versuch nicht von den eventuellen Unterschieden beeinflusst.

3.3.7 Vergleich des entwickelten PCT-Assays mit den bisher bekannten Messsystemen

Verschiedene Immunoassays für hPCT sind kommerziell erhältlich. Diese basieren alle auf einem Sandwich-Immunoassay, der von Brahms GmbH entwickelt wurde (vgl. Tabelle 2). Diese Assays weisen nicht alle Charakteristiken einer POCT-Anwendung auf (siehe 2.3.1). Alle Geräte wurden für einen Gebrauch im Labor konstruiert und die Messzeit ist zu lang für eine POCT-Anwendung. Die Kürzeste weist der Elecsys® mit 18 min auf. Hierbei muss beachtet werden, dass es sich um die reine Messzeit handelt. Die Zeit ist nicht einkalkuliert, die für den Transport in das Zentrallabor benötigt wird, d.h. die TAT ist bei diesen Systemen deutlich länger. Als einziger Test kann der PCT®-Q direkt am Patientenbett durchgeführt werden. Dieser erlaubt allerdings nur eine semiquantitative PCT-Messung und ist somit nicht für eine Überwachung des Zustandes eines Patienten geeignet. Weiterhin brauchen alle aufgeführten Messsysteme eine Probenvorbereitung, da sie nur mit Serum oder Plasma durchgeführt werden können. Für den VIDAS® gibt es zusätzlich noch die Einschränkung, dass kein EDTA-Plasma verwendet werden soll, da es hierbei zu zu niedrigen Werten bei der Messung kommt (Hinweis in der Packungsbeilage). Hierfür wird qualifiziertes Personal gebraucht. Auch für die Durchführung der Messung an den Geräten muss das Personal geschult werden, da diese u.a. kalibriert werden müssen. Weiterhin sind alle aufgeführten Systeme noch zu wenig sensitiv. Mit einer analytischen Sensitivität von 0,019 ng/mL zeigt der Sensitiv Kryptor® die höchste Sensitivität, wobei die funktionelle Sensitivität auch hier bei

0,06 ng/mL liegt und damit über der PCT-Konzentration gesunder Individuen, wodurch keine kleinen Konzentrationsänderungen z. B. zur Verlaufskontrolle im niedrigen PCT-Bereich zuverlässig gemessen werden können [141]. In einer Studie von Barassi et al. zeigte sich, dass für die biologische Variabilität der PCT-Konzentrationen der Kryptor[®]-Assay nicht sensitiv genug war, um diese detektieren zu können [15,142]. Alle kommerziell erhältlichen Assays binden die Calcitonin- und die Katalcalcin-Region des PCTs. Das heißt, dass sie in Patienten mit Sepsis das intakte PCT und das CT:CCP-1-Bruchstück erkennen. Im Gegensatz dazu kann der hier vorgestellte Assay nur das intakte PCT erkennen, da er im N-terminalen Bereich und im Katalcalcin/Calcitonin-Bereich bindet. Da bisher kein verfügbarer Assay das intakte PCT alleine erkennt, gibt es keine Studien, ob die verschiedenen Bruchstücke oder deren Konzentrationsänderung eine Aussage haben für den Verlauf der Sepsis. Dies wäre mit dem in dieser Arbeit entwickelten Assay möglich.

Auch in der Forschung wurden verschiedene POCT-Assays für PCT entwickelt. Kemmler et al. entwickelten ein kompaktes POCT-System, das allerdings für das PCT nicht die nötige Sensitivität erreichte [86,87]. Baldini et al. entwickelten einen optischen Immunosensor für POCT, der ebenfalls nicht die benötigte Sensitivität für einen klinischen Einsatz erreichte [84,85]. Die von beiden Gruppen verwendeten mAk gegen PCT waren die Vorläufer, der in dieser Studie verwendeten mAk [21,83]. Diese konnten aber das native hPCT in Patientenproben nicht mit einer annehmbaren Korrelation zu den Brahms-Assays nachweisen [22,84]. Weiterhin entwickelten Sauer et al. einen Proteinchip zur gleichzeitigen Detektion mehrere Biomarker für Sepsis, u.a. PCT [81,82]. Sie benutzten kommerziell erhältliche mAk für PCT und erreichten eine gute Sensitivität, allerdings war die Messzeit zu lange für eine POCT-Anwendung.

Im Gegensatz dazu besitzt der in dieser Arbeit entwickelte PCT-Assay alle nötigen Charakteristika für eine POCT-Anwendung. Für den Assay ist keine Probenvorbereitung nötig, da er sowohl mit humanem Plasma als auch mit humanem Vollblut anwendbar ist. Der hier entwickelte PCT-Assay ist, soweit bekannt, der einzige, der in Vollblut angewendet werden kann. Die Einmal-Cartridges ermöglichen einen sicheren Gebrauch, da bereits alle Reagenzien enthalten sind, die Probe nur eingefüllt werden muss und eine Kontamination nach dem Verschließen nicht mehr möglich ist. Die Messzeit von neun Minuten entspricht in diesem Fall der TAT, da die Messung direkt am Patientenbett durchgeführt werden kann und es so keine Verzögerung durch den Transport zum Zentrallabor gibt. Dies und das geringe benötigte Probenvolumen machen den entwickelten Assay geeignet für eine POCT-Anwendung, die dem Arzt eine schnelle Hilfe für Therapieentscheidungen liefern kann. Die erreichten Sensitivitäten liegen mit einem LOD (entspricht der analytischen Sensitivität) von 0,04 ng/mL in humanem Plasma bzw. 0,02 ng/mL für humanes Vollblut bereits im Bereich der

kommerziell erhältlichen Geräte oder bereits darunter. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der entwickelte Assay natives PCT in Patientenproben erkennt und die Konzentration in einer sehr guten Korrelation zu dem Goldstandard Gerät Kryptor® bestimmen kann.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Sepsis gehört zu den häufigsten Todesursachen im klinischen Alltag. Diese frühzeitig zu erkennen und richtig zu behandeln ist für Mediziner nicht leicht, da ihre Symptome nicht spezifisch sind. Auch ihr Ursprung ist nicht immer eindeutig nachweisbar und damit kommt es häufig zu einem nicht notwendigen Antibiotikaeinsatz. Ein schneller und effektiver Therapiebeginn ist im Falle einer Sepsis allerdings der entscheidende Faktor, die immer noch sehr hohe Letalitätsrate zu senken. Daher werden dringend Möglichkeiten für eine sichere und schnelle Diagnose benötigt.

Eine Möglichkeit stellen Entzündungsmarker dar. Der Vielversprechendste für die Unterscheidung zwischen einer bakteriell verursachten Sepsis und einer SIRS (*systemic inflammatory response syndrome*) anderen Ursprungs ist Procalcitonin (PCT), eine Vorstufe des Hormons Calcitonin. Für eine schnelle Diagnose sind POCT (*Point-of-Care Testing*) Geräte sinnvoll, da sie direkt am Patientenbett zum Einsatz kommen. Sie ermöglichen eine schnelle, und einfach zu handhabende Analyse. Die bisherigen Detektionssysteme für humanes PCT (hPCT) sind allerdings entweder Geräte für den Einsatz im Labor oder erreichen nicht die benötigte Sensitivität.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neuer sensitiver Fluoreszenzimmunoassay (FIA) zur Detektion von PCT für ein TIRF (*total internal reflection fluorescence*)-basiertes POCT-Gerät entwickelt. Die in einer vorherigen Arbeit entwickelten neuen monoklonale Antikörper (mAk) gegen hPCT wurden zuerst in einem Sandwich-ELISA eingesetzt. In diesem System wurde die sensitivste Ak-Kombination gesucht, wobei sich der CALCA 3C5 als Fänger-Ak und der CALCA 4F6 als Detektor-Ak bewährten. Weiterhin wurden die mAks mittels SPR-Messungen charakterisiert, wobei auch hier die ausgewählten mAk mit K_A -Werten von $10^8 - 10^{10} \text{ M}^{-1}$ und K_D -Werten von $10^{-9} - 10^{-10} \text{ M}$ eine hohe Affinität zum Analyten zeigten. Mit dieser Kombination wurde der Assay in Hinblick auf Blocking (1% Casein) und Zusätze gegen unspezifische Anbindung (1% Ziegen Serum, 50 $\mu\text{g/mL}$ Ratten-Ak) optimiert. Der entwickelte Assay wurde zum Abschluss in humanem EDTA-Plasma anhand von Messbereich, Intra-Assay Variationskoeffizient und Inter-Assay Variationskoeffizient charakterisiert.

Dieser Assay wurde daraufhin auf ein POCT-Gerät übertragen, welches von der Firma pes diagnosesysteme (Markkleeberg, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurde. Der Immunoassay läuft hierbei vollständig innerhalb einer Einmal-Cartridge ab und wird anschließend im Gerät ausgewertet. Es handelt sich hierbei um ein Tischgerät (*bench-top system*), das alle nötigen Charakteristiken einer POCT-Anwendung erfüllt. Dazu gehört eine kurze Messzeit von unter neun Minuten, keine Probenvorbereitung, da das System sowohl

mit Plasma als auch mit Vollblut arbeitet und eine Anwendung direkt beim Patienten möglich ist. Die neuen mAk wurden zusätzlich mit kommerziell erhältlichen mAk gegen PCT erneut getestet, wobei sich auch hier die Ak-Kombination CALCA 4F6/CALCA 3C5 als am vielversprechendsten zeigte. Weiterhin wurden verschiedene Zusätze getestet, um die unspezifische Anbindung an die Cartridge-Oberfläche und an die Fängerstreifen zu reduzieren. Die Zugabe von 50 µg/mL Ratten-Ak und von 1% Ziegen Serum zeigten dabei die besten Ergebnisse. Diese wurden mit den Detektor-Ak in die Cartridge integriert (*lab on a chip*). Die Vergleichbarkeit verschiedener Analysegeräte und die reproduzierbare Herstellung der Cartridges wurden ebenfalls überprüft. Mit dem entwickelten Assay wurden Standardkurven in humanem EDTA-Plasma und humanem EDTA-Vollblut aufgenommen. Für Plasma erreichte er ein *limit of detection* (LOD) von 0,04 ng/mL und ein *limit of quantification* (LOQ) von 0,12 ng/mL. Bei Vollblut wurden ein LOD von 0,02 ng/mL und ein LOQ von 0,09 ng/mL erreicht. Beides zeigt eine ausreichend gute Sensitivität, um kleinste Schwankungen im PCT-Level erkrankter Personen zu überwachen, und sicher zwischen einer gesunden und einer erkrankten Person zu unterscheiden. Auch stellt dieser Nachweis von hPCT, soweit der Autorin bekannt, den ersten dar, der in Vollblut durchgeführt werden kann. Erste Plasmapatientenproben wurden gemessen und mit dem Goldstandard-Gerät Kryptor® von Brahms verglichen. Hier zeigte sich eine sehr gute Korrelation mit R²-Werten zwischen 0,94 und 0,99 für verschiedene Probensets und Fänger-Ak (n = 8-25). Dies ist eine deutliche Verbesserung zu dem bereits publizierten PCT-Assay von Krämer et al. mit den früher entwickelten mAk, der kein natives PCT messen konnte und auch eine schlechte Korrelation mit dem Kryptor®-System aufwies [21,22]. Zusätzlich konnte durch die Ergänzung mit einem weiteren weniger sensitiven Fänger-Ak (PCT 22A11) mit Plasma-Patientenproben gezeigt werden, dass eine Messbereichserweiterung bis ca. 180 ng/mL möglich ist. Durch die Kombination des sensitiven Fänger-Ak mit dem weniger sensitiven Ak, kann sowohl im unteren Konzentrationsbereich die benötigte Sensitivität erreicht werden, um auch einen leichten Anstieg von PCT zu erkennen, als auch eine Verlaufskontrolle bei Patienten mit sehr hohen PCT-Werten bewerkstelligt werden. Da dies notwendig ist, um auch stark erhöhte PCT-Werte messen zu können und eine Verlaufskontrolle durchzuführen, sollte dieser Ansatz weiter verfolgt werden. Die nächsten Schritte wären das Messen einer großen Anzahl von Patientenproben, um den Assay nach FDA-Standard charakterisieren zu können. Diese sollten auch Vollblut-Patientenproben enthalten. In diesem Rahmen wäre es auch sinnvoll, identische Proben möglichst zeitgleich mit dem Kryptor®- und dem respons® IQ-System zu messen, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erzielen.

Der entwickelte Sandwich-ELISA wurde weiterhin für eine Anwendung für equines PCT (ePCT) modifiziert. Sepsis stellt auch bei Pferden eine häufige Todesursache dar. In der

Veterinärmedizin gibt es weder einen Test, der PCT nachweist, noch gibt es bisher Studien die einen Zusammenhang zwischen einer Sepsis und dem Level von ePCT untersuchen. Da allerdings andere Tierarten im Falle einer Erkrankung erhöhte PCT-Werte zeigen, lässt sich vermuten, dass PCT auch als Sepsismarker beim Pferd Anwendung finden könnte. Die Aminosäuresequenzen des ePCTs und des hPCTs zeigen eine hohe Übereinstimmung und dies auch gerade in den Bereichen, in denen die neu entwickelten mAk binden. Daher wurde angenommen, dass ePCT mit dem etablierten Assay detektierbar ist. Dies konnte anhand erster Plasmaproben erkrankter Pferde gezeigt werden. Die Kreuzreaktivität von hPCT zu ePCT betrug 409. Der Assay zeigte hier einen Arbeitsbereich von 25 – 1000 ng/mL und IaA-CV und IaA-CV von unter 15 %. Weiterhin wurden Plasmaproben von 24 gesunden und fünf septischen Pferden gemessen, um zu sehen, ob anhand der PCT-Werte eine Aussage hinsichtlich der Erkrankung getroffen werden kann. Hierzu wurden die kranken Pferde mit einem Sepsis-Score beurteilt und als septisch eingestuft. In dieser Gruppe wurden signifikant erhöhte mittlere PCT-Werte von 8450 ng/mL gefunden, im Vergleich zu 47 ng/mL in der Gruppe der gesunden Pferde ($P = 0,0006$). Diese Arbeit ermöglichte eine Folgekooperation mit der FU Berlin, in deren Rahmen zwei Doktorarbeiten entstanden, die den Zusammenhang zwischen PCT-Werten und dem Krankheitsbild genauer untersuchen. In der Doktorarbeit von Frau Anna Pelli wird untersucht, welche PCT-Anstiege bei Erkrankungen der Lunge zu verzeichnen sind. Frau Conny Koopmann untersucht in ihrer Doktorarbeit die PCT-Werte bei Pferden mit Kolikerkrankungen. Eine Weiterentwicklung des Assays für ePCT durch die Entwicklung von mAk, die spezifisch ePCT detektieren, wäre möglich.

In einer internen Kooperation mit Dr. Arie Geerlof (Institut für Strukturbiologie, Helmholtz Zentrum München, Deutschland) wurden humanes rekombinantes PCT (hrPCT) und equines rekombinantes PCT (erPCT) hergestellt, die als Standard für die Tests eingesetzt wurden. ErPCT war bisher kommerziell nicht erhältlich. Beim hPCT gibt es in Patienten verschiedene native Formen, das PCT1-116, das die gesamte Aminosäuresequenz des PCTs enthält, und die verkürzte Form PCT3-116, der die ersten beiden Aminosäuren des N-terminalen Bereiches fehlen. Hier ist nur das PCT1-116 kommerziell erhältlich. Die hrPCTs wurden mit hoher Ausbeute hergestellt mit den kommerziell erhältlichen verglichen. Die intern hergestellten wurden genauso gut erkannt wie die vergleichbaren rekombinanten PCTs. Im Vergleich zu den käuflichen Proteinen gab es keine Qualitätsunterschiede bzw. Unterschiede in den Eigenschaften verschiedener Chargen.

5 Material und Methoden

5.1 Verwendete Geräte

BIACORE 3000	GE Healthcare Europe, München, Deutschland
ELx405 Mikrotiterplatten Washer	Bio-Tek, Bad Friedrichshall, Deutschland
Eppendorf Multikanalpipetten, 8-Kanal/12-Kanal, 20-300 µL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Pipetten, variable, 0,1-2,5 µL, 1-10 µL, 2-20 µL, 10-100 µL, 20-200 µL, 1-10 mL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
MS2 Minishaker	IKA® Works Inc., Wilmington, NC, USA
Micro Centrifuge	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Microman® Pipette, 50-250 µL	Gilson Inc., Middleton, WI, USA
Milli-Q Gradient und RiOs™	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
pH-Meter/pH-Elektrode SenTix®81	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätte GmbH, Weilheim, Deutschland
SpectraMax® M5 Mikrotiterplatten-Reader	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA
TITRAMAX 100	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland
Waage Sartorius 3716 MP Typ 250/75111/43613 und Typ A210P-0D1; Fab.-Nr. 20800331	sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Waage SI61; Nr. 27503268	Denver Instrument, NY, USA

5.2 Software

BIAevaluation 4.1	GE Healthcare Europe, München, Deutschland
ClustalW2	EMBL-EBI, Cambridge, UK
Microsoft Office 2010	Microsoft, Redmond, WA, USA
SigmaPlot® 12.0	Systat Software Inc., CA, USA
Softmax® Pro v5.2	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA

5.3 Verbrauchsmaterialien

96-Kavität Mikrotiterplatten MaxiSorp™ (442404)	NUNC, Roskilde, Dänemark
CM5 Chips	GE Healthcare Europe, München, Deutschland
epTIPS Standard 0,1-10 µL (30000.811) 2-200 µL (30000.870) 50-1000 µL (30000.919) 10 mL (Z666564-200EA)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
epTIPS LoRetention Dualfilter 0,1-10 µL (30077610) 2-300 µL (30077636) 50-1000 µL (30077652)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kapillaren für Microman® (F148014)	Gilson, Middleton, WI, USA
Protein Low Binding Reagiergefäß, 1,5 mL (72.706.600)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

5.4 Chemikalien und Reagenzien

1-Step Ultra TMB-ELISA	Pierce/Perbio Thermo Fischer, Bonn, Deutschland
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Amin-Kopplungsset BIACORE	GE Healthcare Europe, München, Deutschland
BIAnormalizing solution (70 % Glycerol-Lösung)	GE Healthcare Europe, München, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Casein Natrium	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Citronensäure-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid 99 % (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
ePCT	Dr. Arie Geerlof; Helmholtz Zentrum München, Deutschland
HBS-EP Puffer	GE Healthcare Europe, München, Deutschland
hrPCTs:	
PCT-HisTag, PCT 1-116	Prospec-Tany Technogene Ltd, Rehovot, Israel
PCT 1-116	oder HyTest, Turku, Finnland
PCT-GAM, PCT-M,	oder Institut für Strukturbiologie,
PCT 1-116, PCT 3-116	Dr. Arie Geerlof, Helmholtz Zentrum München, Deutschland
ImmunoPure® Streptavidin-HRP-Konjugat	Pierce/Perbio Thermo Fisher, Bonn, Deutschland

LowCross-Buffer®	CANDOR Bioscience GmbH, Wangen, Deutschland
Magermilchpulver (Skim Milk Powder)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PCT Kalibrator von Brahms	Thermo Fisher Scientific, Brahms GmbH, Henningsdorf, Deutschland
Regenerierlösungen BIACORE	GE Healthcare Europe, München, Deutschland
Tween® 20	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Schwefelsäure 95-97 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30 % (H ₂ O ₂)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

5.5 Immunoreagenzien, Plasmen/Seren und Patientenproben

γ-Globulin bovine	Sigma Aldrich GmbH, München, Deutschland
Equine Patientenproben	Freie Universität Berlin, Berlin, Deutschland
Equines 0-Plasma	Freie Universität Berlin, Berlin, Deutschland
Equines Serum	Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Humanes EDTA-Plasma	Sera Laboratories International Ltd., West Sussex, United Kingdom oder PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich oder gepoolte Einzelspenden, zur Verfügung gestellt von pes diagnosesysteme GmbH, Leipzig, Deutschland
Humanes EDTA-Vollblut	Sera Laboratories International Ltd., West Sussex, United Kingdom
Humane Patientenproben	Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie, Bad Langensalza, Deutschland
Monoklonale Maus-Antikörper PCT 27A3, PCT 42, PCT 6F10, PCT 14A2, PCT 16B5, PCT 14C12, PCT 22A11	HyTest Ltd., Turku, Finnland
Monoklonale Ratten-Antikörper CALCA 3C5, CALCA 4F6, CALCA 2F3, CALCA 4A6, CACA 3B12, CALCA 4H6, IgG2a Ratten-Antikörper	Institut für Molekulare Immunologie, Serviceeinheit Monoklonale Antikörper, Helmholtz Zentrum München, Deutschland

Monoklonaler Maus-anti-Ratte Antikörper
TIB 173 gegen IgG2a Fc

American Type Culture Collection,
Manassas, VA, USA

Rattenserum

PAA Laboratories GmbH, Cölbe,
Deutschland

Ziegenserum

Invitrogen GmbH, Darmstadt,
Deutschland

5.6 Puffersysteme und Lösungen für immunochemische Methoden

50 mM Carbonatpuffer, pH 9,6 -9,8 (Angaben für 1 L Milli-Q-Wasser)

15 mM Na ₂ CO ₃ (MW 105,99)	1,59 g
35 mM NaHCO ₃ (MW 84,01)	2,94 g

40 mM PBS Puffer, pH 7,6 (Angaben für 1L Milli-Q-Wasser)

5 mM NaH ₂ PO ₄ (MW 137,99)	0,689 g
35 mM Na ₂ HPO ₄ (MW 177,99)	6,23 g
100 mM NaCl (MW 58,44)	5,84 g

100 mM Natriumacetatpuffer (Substratpuffer), pH 5,5 (Angaben für 1 L Milli-Q-Wasser)

100 mM Natriumacetat (MW 82,03)	8,2 g
---------------------------------	-------

Mit 1% (w/v) Zitronensäure auf pH 5,5 einstellen

Substratlösung

400 µL TMB-Stammlösung (6 mg TMB (MW 240,35) in 1 mL DMSO)

100 µL 1 % (v/v) H₂O₂

25 mL 100 mM Natriumacetatpuffer, pH 5,5

Waschpuffer

4 mM PBST

(40 mM PBS 1:10 verdünnt + 0,05 % (v/v) Tween 20)

5.7 ELISA

5.7.1 Bestimmung der Antikörper für den Einsatz im Sandwich-ELISA

5.7.1.1 Antikörper Screening und 2-dimensionale Titration

Die verschiedenen Antikörper-Kombinationen (Tabelle 19), der in einer internen Kooperation hergestellten Antikörper gegen hPCT [22], wurden in einer 2-dimensionalen Titration im Sandwich-ELISA-Format getestet, um die optimale Konzentration der beiden Antikörper und das beste Pärchen für den PCT-Assay zu ermitteln.

Tabelle 19 Antikörperkombinationen für den Einsatz im ELISA, kursiv = bereits veröffentlichtes Paar [22]

Fänger-Antikörper	Detektor-Antikörper
CALCA 4A6	CALCA 3C5-Biotin
CALCA 4A6	CALCA 4H6-Biotin
CALCA 4F6	CALCA 3C5-Biotin
CALCA 4F6	CALCA 2F3-Biotin
CALCA 4F6	CALCA 4H6-Biotin
CALCA 3B12	CALCA 3C5-Biotin
CALCA 3B12	CALCA 2F3-Biotin
CALCA 3B12	CALCA 4H6-Bioin
CALCA 3C5	CALCA 4A6-Biotin
CALCA 3C5	CALCA 3B12-Biotin
CALCA 3C5	CALCA 4F6-Biotin
CALCA 2F3	CALCA 3B12-Biotin
CALCA 2F3	CALCA 4F6-Biotin
CALCA 4H6	CALCA 4A6-Biotin
CALCA 4H6	CALCA 3B12-Biotin
CALCA 4H6	CALCA 4F6-Biotin
CALCA 7D4	CALCA 4F6-Biotin
<i>CALCA 4A6</i>	<i>CALCA 2F3-Biotin</i>
<i>CALCA 2F3</i>	<i>CALCA 4A6-Biotin</i>

Dabei werden die beiden Antikörper, der Fänger-Antikörper und der biotinylierte Detektor-Antikörper, in unterschiedlichen Konzentrationen auf der Platte eingesetzt und mit verschiedenen Konzentrationen des Analyten, in diesem Fall humanes rekombinantes

Procalcitonin (hrPCT mit His-Tag, Prospec-Tany Technogene Ltd, Rehovot, Israel), inkubiert. Abbildung 48 zeigt beispielhaft einen Plattenaufbau zur Verdeutlichung. Die Mikrotiterplatten werden mit demselben Fängerantikörper in drei verschiedenen Konzentrationen (2 µg/mL, 4 µg/mL, 10 µg/mL) beschichtet. Der Detektorantikörper wird ebenfalls in drei verschiedenen Verdünnungsstufen getestet (1:2000, 1:4000, 1:10000).

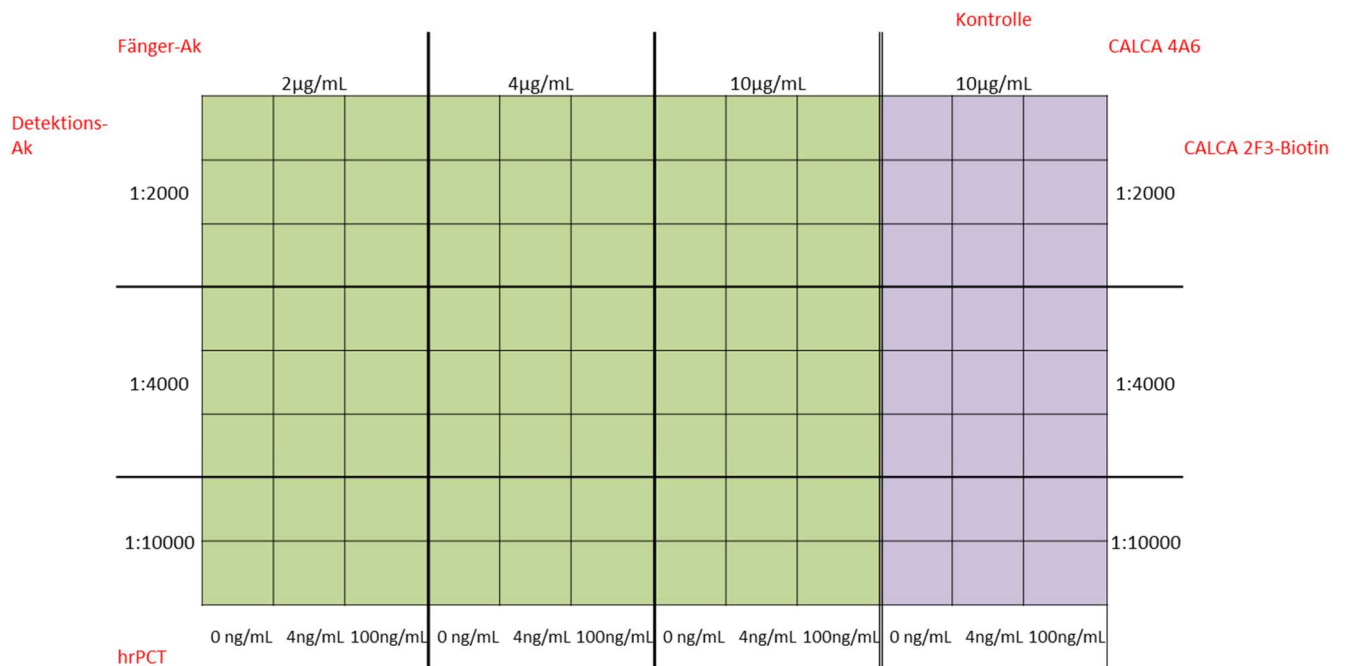


Abbildung 48 Plattenaufbau zur 2-dimensionale Titration

Die Analyt-Konzentrationen werden so gewählt, dass ein Wert im Bereich des Plateaus der sigmoidalen Standardkurve liegt und einer in den linearen Bereich fällt (aus früheren Versuchen ungefähre Bereich bekannt, siehe [21,22]), um die Sensitivität besser unterscheiden zu können (hrPCT 0 ng/mL, 4 ng/mL, 10 ng/mL). Der Plattenaufbau beinhaltet zusätzlich einen Vergleichsassay, mit dem bereits gearbeitet wurde [22], und war bei allen zu testenden Pärchen gleich.

Der Ablauf des Sandwich-ELISA entspricht der unter 5.7.2.1 beschriebenen Standardprozedur des PCT-ELISAs. Die Auswertung erfolgte bei der Pärchentestung mittels Microsoft Excel.

5.7.1.2 Antikörper-Charakterisierung durch SPR-Messung mit dem Biacore®

Oberflächenplasmonresonanzmessungen wurden verwendet, um die Bindungscharakteristiken fünf neu entwickelter Antikörper gegen hrPCT zu bestimmen. Die SPR-Messungen (*surface plasmon resonance*) wurden mit einem Biacore® 3000 (GE Healthcare Europe, München, Deutschland) auf CM5 Chips durchgeführt. Um möglichst wenige Chips zu benötigen, wurde ein Maus-anti-Ratte Antikörper TIB 173 von ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) auf der Chipoberfläche immobilisiert, der gegen den Fc Teil der IgG2a PCT-Antikörper gerichtet ist. Somit konnten alle PCT-Antikörper mit einem Chip unter gleichen Bedingungen gemessen werden. Als Laufpuffer und für etwaige Verdünnungen wurde ein HBS-EP Puffer verwendet. Dieser enthält 0,005 % (v/v) des Tensids P20, 10 mM HEPES [2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure], 3 mM EDTA und 0,15 M NaCl.

Chipbelegung und Regenerierungsmethode

Vor der eigentlichen Kopplung, wurde eine Normierung durchgeführt. Hierbei wurde das Resonanzsignal aller Flusszellen mit einer 70 % Glycerol-Lösung (BIAnormalizing solution, Biacore AB) normalisiert, um eventuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Sensorchips auszugleichen.

Anschließend wurde ein Fänger-Ak kovalent auf die Chipoberfläche gebunden (*mouse-anti-rat* mAb TIB 173; ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) gegen IgG2a Fc). Hierzu wurde das Amin-Kopplungsset der Firma verwendet. Zuerst wurden Die Carbonsäuren auf der Chip-Oberfläche mit einer Mischung aus 0,05 M N-Hydroxysuccinimid (NHS) und 0,2 M 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) aktiviert. Danach wurde der Fänger-Ak in einer Konzentration von 4,4 µg/mL in 10 mM Natrium-Acetatpuffer mit pH 5,5 über die Flusszelle geleitet bis das Ziel von ca. 10000 RU (*resonance units*) erreicht wurde. Die restlichen aktivierten Carbonsäuren wurden durch 1 M Ethanolamin inaktiviert. Gleichzeitig wurde so nicht-kovalent gebundenes Material entfernt (siehe Abbildung 49).

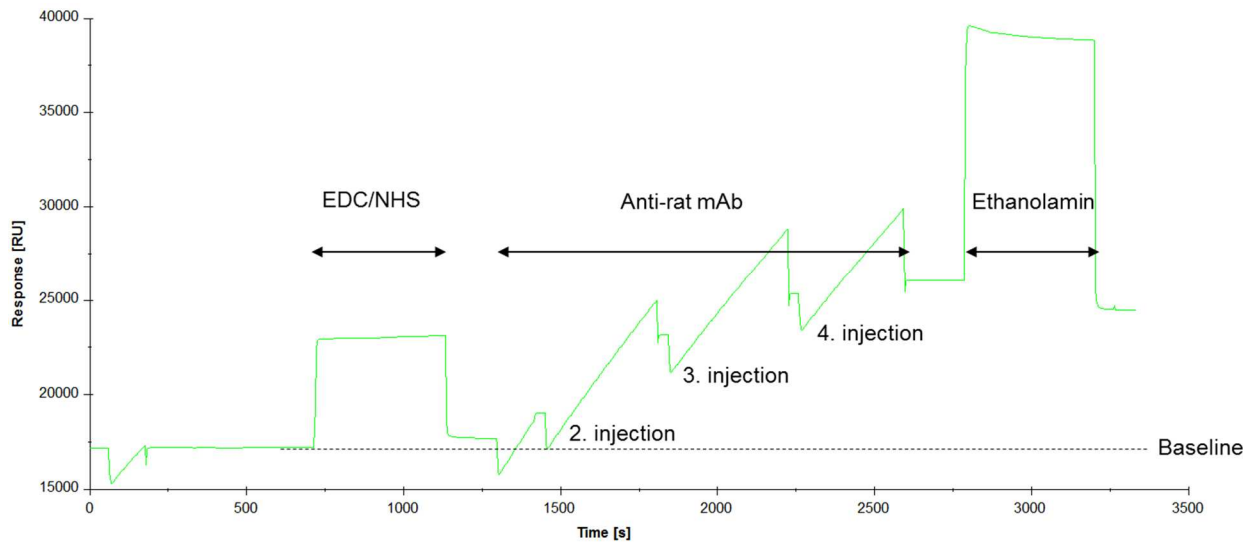


Abbildung 49 Aminkopplung des Sekundärantikörpers auf die Oberfläche des CM5 Chips

Die Referenzflusszelle wurde wie oben beschrieben behandelt, nur dass hier ein irrelevanter Antikörper derselben Subklasse gebunden wurde, der keine Ratten-Ak bindet.

Zur Regenerierung wurden verschiedene Regenerierlösungen getestet: Glycin pH 3,0/2,5/2,0/1,5 und 4 M MgCl_2 . Es wurde jeweils ein Volumen von 15 μL der Regenerierlösung mit einer Geschwindigkeit von 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ über die Chipoberfläche geleitet.

Surface-Performance-Test

Der Surface-Performance-Test zeigt, wie reproduzierbar Messungen unter bestimmten Umständen durchgeführt werden können.

Hierbei wurde der Antikörper CALCA 4A6 in einer Konzentration von 36 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mit einer Geschwindigkeit von 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ für eine Minute über den Chip geleitet. Zur Regenerierung wird 4 M MgCl_2 mit einer Geschwindigkeit von 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ für zwei Minuten über die Oberfläche geleitet. Dies wurde in 20 Zyklen wiederholt, mit einer Stabilisierungszeit von 10 Minuten zwischen den einzelnen Läufen.

Kinetikmessung mit dem Biacore® - SPR-Messsystem

Es wurden die Antikörper CALCA 4A6, CALCA 3C5, CALCA 4F6, CALCA 2F3 und CALCA 7D4 vermessen.

Diese wurden in einer Konzentration von 36 µg/mL mit einer Geschwindigkeit von 30 µL/min für eine Minute durch die Flusszelle geleitet. Die Dissoziationszeit betrug 15 Minuten. Anschließend wurde das hrPCT in verschiedenen Konzentrationen über den Primärantikörper geleitet (500; 250; 125; 62,5; 31,25; 0 nM), ebenfalls mit 30 µL/min für eine Minute. Auch hier betrug die Dissoziationszeit 15 Minuten. Regeneriert wurde mit 4 M MgCl₂ bei einer Geschwindigkeit von 30 µL/min für 30 Sekunden. Zwischen den Zyklen wurde die Oberfläche für 10 Minuten stabilisiert. Als Laufpuffer und zur Herstellung der Verdünnungen des PCTs und der Antikörper wurde HBS-EP Puffer verwendet.

Das folgende mit der Referenzzelle korrigierte Sensorgramm veranschaulicht den Ablauf (Abbildung 50).

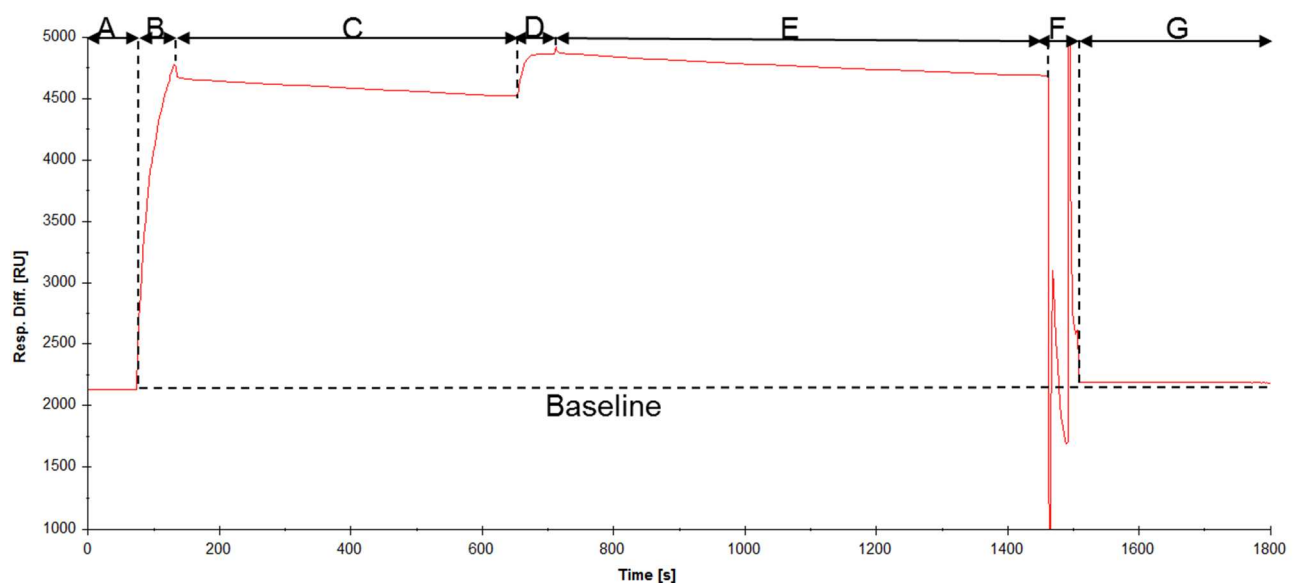


Abbildung 50 Einzelnes Sensorgramm zur Kinetikmessung; A) Laufpuffer; B) Anti-PCT-AK; C) Dissoziation; D) PCT-Assoziation; E) PCT-Dissoziation, F) Regenerierung; G) Stabilisierung

Für die Ermittlung der Affinitätskonstanten sind nur die Assoziation (Bereich D) und die anfängliche Dissoziationskinetik (Bereich E) relevant, die die Antigen-Antikörper-Reaktion zeigen.

Die Sensorgramme wurden mit der Referenzflusszelle korrigiert und die Assoziationsraten (k_a) und Dissoziationsratenkonstanten (k_d) wurden mit der Software BIAevaluation 4.1 berechnet unter Anwendung des 1:1-Langmuir-Bindungsmodells. Die Assoziations- (K_A) und Dissoziationskonstanten (K_D) im Gleichgewicht entsprechen den Quotienten der Reaktionsraten: $K_A = k_a/k_d$ bzw. $K_D = k_d/k_a$ [132].

5.7.2 Sandwich-ELISA für humanes rekombinantes PCT (hrPCT)

5.7.2.1 Standardprozedur des Sandwich-ELISAs

Die Mikrotiterplatten (Nunc MaxiSorp™, 96-Kavitäten) werden mit 100 µL pro Kavität des Fängerantikörpers (10 µg/mL in 50 mM Carbonatpuffer, pH 9,6) beschichtet und bei 4 °C im Kühlschrank über Nacht inkubiert. Nachdem die Platten mittels eines automatisierten Mikrotiterplatten Washers (Bio-Tek, ELX405R) dreimal mit je 200 µL 4 mM PBST-Puffer (pH 7,6) gewaschen wurden, werden sie mit 200 µL pro Kavität einer 1 % Caseinlösung bei Raumtemperatur für eine Stunde geblockt. Nach erneutem Waschen werden 100 µL pro Kavität des Analyten (hrPCT: 0,01 – 1000 ng/mL; 0 ng/mL) zugegeben und ebenfalls für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift werden 100 µL pro Kavität des biotinylierten Detektorantikörpers (Verdünnung 1:2000 der Stammlösung mit unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen in 40 mM PBS-Puffer) für eine weitere Stunde auf die Platte gegeben. Nachdem die Platte erneut gewaschen wurde, werden 100 µL pro Kavität Streptavidin-HRP (50 ng/mL, Verdünnung 1:20000 in 40 mM PBS-Puffer) für die Verknüpfung des Enzyms mit dem Detektorantikörper durch die Streptavidin-Biotin-Reaktion für eine Stunde auf der Platte inkubiert. Zuletzt wird die Platte gewaschen und das Substrat für die Peroxidase zugegeben (1-Step Ultra TMB, Pierce/Perbio; 100 µL). Dieses wird 5 Minuten auf der Platte umgesetzt, anschließend wird die Enzymreaktion mit 50 µL pro Kavität 2 M H₂SO₄ abgestoppt. Die Absorption wird mit einem Mikrotiterplatten-Reader (SPECTRAmax, Molecular Devices Analytical Technologies) bei 450 nm gemessen (Referenz 650 nm). Die Daten werden mit der Software Softmax® PRO (Molecular Devices) über eine 4-Parameter-Kurvenfunktion ausgewertet.

Das Kurvenfitting erfolgt über folgende Gleichung:

$$y = \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B} + D$$

Hierbei ist A der Y-Wert gemäß der Asymptote bei niedrigen Werten der X-Achse (untere Asymptote), D der Y-Wert der Asymptote bei hohen Werten der X-Achse (obere Asymptote), der Koeffizient C ist der X-Wert gemäß dem Mittelwert zwischen A und D (IC_{50} , Wendepunkt) und der Koeffizient B beschreibt die Steigung der Kurve im Testmittelpunkt.

5.7.2.2 Charakterisierung

Der entwickelte Sandwich-ELISA für hPCT wurde anhand des IaV-CV, IeV-CV und des Arbeitsbereiches (WR) charakterisiert. Als Standard wurde das intern hergestellte PCT1-116 verwendet.

Für die Bestimmung des IaV-CV und des IeV-CV werden sieben identische Proben (0,1; 0,25; 0,5; 2; 5; 7,5; 10 ng/mL; PCT1-116 in humanes 0-Plasma; m=4) an zwei verschiedenen Tagen auf insgesamt vier Mikrotiterplatten gemessen. Auf jeder Platte wurde eine separat hergestellte Verdünnungsreihe zur Erstellung einer Standardkurve mitgeführt (0,01 – 1000 ng/mL; n=11; m=3).

Der Intra-Assay-Variationskoeffizient wird für jede Konzentration auf jeder einzelnen Platte ermittelt. Der Inter-Assay-Variationskoeffizient hingegen wird aus einer Konzentration über alle vier Platten hinweg berechnet. Unter Beachtung der Anforderungen der *Food and Drug Administration (FDA)* für die Validierung von bioanalytischen Methoden wird der Arbeitsbereich des ELISAs für den Bereich definiert, in dem der Inter-Assay Variationskoeffizient und der Intra-Assay- Variationskoeffizient kleiner 15% ist [137].

5.8 Equines rekombinantes PCT (erPCT)

5.8.1 Standardprozedur

Der ELISA wird in 96er Mikrotiterplatten von Nunc (MaxiSorp™) durchgeführt. Als Fänger wird der PCT-Antikörper CALCA 3C5 in einer Endkonzentration von 10 µg/mL in 50 mM Carbonatpuffer (pH 9,7) über Nacht bei 4°C auf der Platte inkubiert. Anschließend werden die Platten mit einem automatisierten Mikrotiterplatten-Washer (Bio-Tek, ELX405R) gewaschen (dreimal 200 µL pro Kavität, 4 mM PBST-Puffer, pH 7,6). Noch freie Bindungsstellen der Platten werden mit 300 µL pro Kavität einer 3,3 %igen BSA-Lösung (3,3 % (w/v) in PBS-Puffer, pH 7,6) für eine Stunde bei RT unter Schütteln (450 rpm) geblockt. Nach einem erneuten Waschschrift werden Standardreihen von erPCT in equinem Plasma gesunder Pferde (im Folgenden O-Plasma) mit einer Konzentration zwischen 0 bis 50000 ng/mL und verschiedene Verdünnungen von Proben (100, 10, 1, 0,1 0,01 % (v/v) verdünnt in O-Plasma) auf der Platte inkubiert (100 µL pro Kavität; RT, 1 h; 450 rpm). Sowohl den Standards als auch den Proben werden unspezifische Rattenantikörper gleicher Subklasse in einer Konzentration von 50 µg/mL gegen unspezifische Anbindung zugegeben. Danach werden die Platten erneut gewaschen und 100 µL pro Kavität des Antikörpers CALCA 4F6-B in einer Verdünnung von 1:2000 der Stocklösung (verschiedene Ausgangskonzentrationen) in 40 mM PBS-Puffer als Detektor für eine Stunde bei RT und 450 rpm inkubiert. 100 µL pro Kavität Streptavidin-HRP wird nach einem weiteren Waschschrift in einer Konzentration von 50 ng/mL (Verdünnung 1:20000 in 40 mM PBS) auf die Platte gegeben und inkubiert (1 h, RT, 450 rpm). Nach einem letzten Waschschrift werden 100 µL pro Kavität der 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) Substrat-Lösung zugegeben (200 µL 1 % H₂O₂, 800 µL of 6 mg/mL TMB in DMSO, 50 mL 100 mM Natriumacetat-Puffer, pH 5,5) und die Enzymreaktion unter Lichtausschluss bei RT inkubiert. Nach fünf Minuten wird die Farbreaktion mit 50 µL pro Kavität 2 M H₂SO₄ gestoppt und die Absorption bei 450 nm (Referenz 650 nm) mit einem Mikrotiterplatten-Reader (SPECTRAMax, Molecular Devices Analytical Technologies) gemessen und die Ergebnisse mit der Software Softmax® PRO (Molecular Devices) ausgewertet.

5.8.2 Charakterisierung

Für den entwickelten Sandwich-ELISA gegen equines PCT wurden die Intra- und Inter-Assay-Variationskoeffizienten ermittelt. Hierzu werden dieselben Proben (5, 10, 25, 50, 100, 205, 500, 1000, 2500 ng/mL erPCT in 0-Plasma) mit drei Mikrotiterplatten gemessen, die jeweils eine separat angesetzte Standardkurve enthalten. Der IaA-CV wird für jede Konzentration innerhalb einer einzelnen Platte ermittelt, wohingegen der IaA-CV aus derselben Konzentration auf allen drei Platten berechnet wird. Gemäß der Anforderungen der *Food and Drug Administration (FDA)* für die Validierung von bioanalytischen Methoden wird der Arbeitsbereich des ELISAs für den Bereich definiert, in dem der IaA-CV und der IaA-CV kleiner 15% liegt [137].

Weiter wurde die Kreuzreaktivität (CR) der verwendeten Antikörper zwischen erPCT und hrPCT ermittelt, da die verwendeten Antikörper ursprünglich gegen das menschliche PCT produziert wurden. Hierzu werden mit dem entwickelten PCT-Assay Standardkurven mit den beiden rekombinanten PCTs erstellt und die Kreuzreaktivität wie folgt berechnet:

$$CR = \frac{IC_{50}(erPCT)}{IC_{50}(hrPCT)}$$

5.9 respons® IQ-System

Das respons® IQ-Gerät wurde von der Firma pes diagnosesysteme GmbH (Markkleeberg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die gebrauchsfertigen Cartridges wurden ebenfalls von pes diagnosesysteme nach Absprache hergestellt und geliefert.

Das Auslesegerät basiert auf einem zuvor entwickelten Immunosensor. Für detailliertere Angaben zum System, Cartridgeherstellung und der der Messung zugrunde liegenden Technik siehe auch die Veröffentlichungen [125-127] und die Patente [129-131], sowie den Abschnitt 2.3.3 der vorliegenden Arbeit.

Falls nicht anders vermerkt, waren der Detektorantikörper, 1% Ziegenserum und eine Substanz zur Verhinderung eines Basislinienabfalls (pes diagnosesysteme, Markkleeberg) bereits in der Cartridge enthalten.

5.9.1 Ablauf der Messung

50 μL der Probe (humanes Serum, Plasma oder Vollblut) werden in die Cartridge gefüllt. Anschließend wird die Cartridge verschlossen und in das Gerät gegeben. Die Probe wird mit positivem bzw. negativem Druck fünf Minuten im Mikrokanalsystem bewegt, um die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Detektorantikörper ($C_{\text{AK in Plasma}} = 2,68 \mu\text{g/mL}$) zu lösen und die Probe zu mischen. Das Proben–Detektorantikörper-Gemisch wird nach dem Mischen über den optischen Bereich der Cartridge gezogen, in dem die Fängerantikörper gespottet vorliegen, und es kommt zur Sandwich-Bildung. Währenddessen scannt die Laserdiode den optischen Bereich (λ_{ex} : 636 nm), wobei jede Position ca. alle drei Sekunden gescannt wird, und initiiert ein evaneszentes Feld an der Grenzfläche zwischen dem transparenten optischen Bereich und der Probe durch eine interne Totalreflexion (TIRF). Das Scannen und Messen dauert ca. drei Minuten. Das evaneszente Feld regt nur Fluorophore an, die sehr nahe an der Oberfläche gebunden sind. Die Fluoreszenzemission wird nach optischer Filterung mit einem Photomultiplier detektiert (λ_{em} : 650 - 655 nm). Die Probe wird nach der Messung in einem in der Cartridge integrierten Abfallbehälter aufgefangen und anschließend wird die gesamte Cartridge entsorgt, wodurch eine Regenerierung entfällt.

In diesem System wird die Kinetik der Sandwichbildung gemessen. Der Anstieg im linearen Bereich des Fluoreszenzsignals ist direkt proportional zur Analytkonzentration. Das Signal wird in [V/sec] angegeben. Die erhaltenen Signale wurden mit einer firmeneigenen Software ausgewertet. Hierbei wurden die Signalanstiege jedes einzelnen Scans an den einzelnen Fängerstreifen zwischen zwei festgelegten Zeitpunkten betrachtet und hieraus der Gesamtsignalanstieg von der Software berechnet. Diese Daten wurden anschließend mit Microsoft Excel mittels folgender Gleichung analysiert:

$$y = ax + b$$

Die Nachweisgrenze (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ) wurden wie folgt berechnet:

LOD = Leerwert + 3x Standardabweichung des Leerwertes

LOQ = Leerwert + 10x Standardabweichung des Leerwertes

5.9.2 Antikörper-Screening

Fünf der in einer Kooperation mit Dr. Elisabeth Kremmer (Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum München, Deutschland) hergestellten Antikörper gegen humanes PCT (CALCA XXX) und neun kommerziell erhältliche Antikörper (PCT XXX) von HyTest (Turku, Finnland) wurden in einem Sandwich –FIA auf dem respons[®] IQ-System getestet (für eine Auflistung siehe Tabelle 13). Im ersten Screening wurden die Antikörper in zwei Gruppen geteilt: In Gruppe 1 wurden die Antikörper, die in der Calcitonin- und Katalcalcin-Region des PCTs binden (Anzahl: 6), als Fängerantikörper eingesetzt und die Antikörper, die im N-terminalen Bereich des PCTS binden, als Detektor-Ak. In Gruppe 2 wurden die Antikörper in umgekehrter Weise überprüft. Alle Fängerantikörper einer Gruppe waren auf einer Cartridge vorhanden, so dass diese unter identischen Bedingungen mit derselben Probe getestet werden konnten. Die Detektorantikörper lagen als Lyophilisat extern vor und enthielten zusätzlich eine Positivkontrolle und 10 µg/mL Ziegen Serum (\cong 1,5 µg). Sie wurden mit 150 µL der Probe resuspendiert, so dass der Detektor eine Konzentration von 2,68 µg/mL in der Probenlösung hatte. Als Standard wurde in diesem Versuch das hrPCT von Prospec mit His-Tag verwendet. Die Antikörper wurden mit zwei verschiedenen hrPCT-Konzentrationen in humanem EDTA-Plasma getestet (0 ng/mL und 10 ng/mL; n = 3). Die Messungen des undotierten EDTA-Plasmas (0 ng/mL hrPCT) dienten als Leerwert, d.h. das erhaltene Signal der Messungen mit 10 ng/mL hrPCT wurde mit dem Signal der undotierten Proben korrigiert, um den eigentlichen Signalanstieg zu erhalten, ohne Einfluss eventuell auftretender Signalanstiege durch unspezifische Bindungen.

5.9.3 Optimierung

Zur Reduzierung unspezifischer Anbindung, die in undotierten O-Plasmen auftraten, wurden verschiedene Zusätze getestet: Bovines γ -Globulin (13 mg/mL), Ziegen Serum (5%, 10%), Rattenserum (5%, 10%), Pferdeplasma (5%, 10%), LowCross-Buffer[®] (0,5%) und für PCT unspezifische Rattenantikörper (200 µg/mL) derselben Subklasse (IgG2a) wie die PCT-Antikörper. Ebenfalls wurde eine Zugabe von PBS getestet, die der Menge des zugegebenen Ratten-Ak entspricht, um einen eventuellen Verdünnungseffekt auszuschließen. Es wurden Cartridges mit Spotting 1 verwendet (siehe 2.3.3). Auf diesen war der Detektorantikörper CALCA 3C5-F und ein Zusatz gegen den Abfall der Basislinie bereits integriert. Es wurde jeweils eine Dreifachmessung der verschiedenen Substanzen durchgeführt. Diese wurden

ebenfalls für die Messung der humanen Plasma-Einzelspenden verwendet. Letztere wurden in einer Doppelbestimmung gemessen.

Eine erste Überprüfung der Wirksamkeit der verschiedenen Substanzen wurde mit einer humanen EDTA-Plasmaeinzelspende durchgeführt, die undotiert ein sehr hohes Signal zeigte. Anschließend wurden die vielversprechendsten Zusätze in verschiedenen Konzentrationen in derselben Plasmaeinzelspende im Assay eingesetzt:

- Bovines γ -Globulin: 13 mg/mL, Verdünnungen 1:10 und 1:100
- Ratten-Ak: 200, 20, 2 μ g/mL
- Ziegen Serum: 5%, 1%
- Pferdeplasma: 5%, 1%

Im nächsten Schritt wurden die Zusätze in den ermittelten Konzentrationen kombiniert, um eventuell eine weitere Verbesserung zu erzielen. Hierzu wurden humane EDTA-Plasmapools verwendet, die undotiert ein leichtes (Pool II) bzw. mittleres (Pool III) Signal zeigten.

- P01: γ -Globulin [1,3 mg/mL], 1% Ziegen Serum, Pool III
- P02: γ -Globulin [1,3 mg/mL], 1% Ziegen Serum, Pool II
- P03: Ratten-Ak [20 μ g/mL], 1% Ziegen Serum, Pool III
- P04: Ratten-Ak [20 μ g/mL], 1% Ziegen Serum, Pool II
- P05: γ -Globulin [1,3 mg/mL], Ratten-AK [20 μ g/mL], 1% Ziegen Serum, Pool III
- P06: Pool III pur
- P07: Pool II pur

Mit der besten Kombination wurden im Anschluss sechs verschiedene Pools gemessen, die pur verschieden starke Signalanstiege auf Grund unspezifischer Anbindung zeigten.

5.9.4 Erstellen der Standardkurven

Mit dem entwickelten Assay (Spotting 2 bzw. 3, siehe 2.3.2) wurden Standardkurven in humanem EDTA-Plasma und humanem Vollblut von gesunden Personen erstellt.

Hierzu wird dem humane EDTA-Plasma (0,001; 0,01; 0,05; 0,5; 2,5; 10 ng/mL hrPCT) bzw. dem humane Vollblut (0,0001; 0,0009; 0,003; 0,023; 0,078; 0,65; 2,16; 7,18 ng/mL hrPCT) PCT1-116 (intern) als hrPCT-Standard zugegeben und eine Verdünnungsreihe hergestellt. Für die Vollblutproben wurde der Hämatokrit-Wert des Vollblutbatches mittels Hämatokrit-Röhrchen bestimmt. Dieser gibt den Anteil der zellulären Bestandteile an. Mit dem Hämatokrit-Wert wurde das zuzusetzende Volumen der PCT-Stammlösung berechnet, so dass die gewünschte Konzentration in der Probe erreicht wurde. Um eine unspezifische Anbindung zwischen den beiden Antikörpern des PCT-Assays zu verhindern, wird den beiden Matrices 1% Ziegenserum und 20 bzw. 50 µg/mL IgG2a Rattenantikörper zugegeben. Jede Konzentration wird dreifach gemessen, der Leerwert der Matrix wird fünfmal gemessen.

Beim Vergleich der Standardkurven in Vollblut und humanem EDTA-Plasma, wurden die gespikten Vollblutproben zentrifugiert, um das Plasma von den zellulären Bestandteilen zu trennen. Mit diesem wurde dann erneut eine Standardkurve erstellt und dann verglichen.

Der weitere Ablauf der Messung ist unter 5.9.1 aufgeführt.

5.9.5 Patientenproben

Insgesamt wurden 25 Patientenproben gemessen, deren PCT-Gehalt auf verschiedenen Kryptor[®]-Geräten von Brahms zuvor bestimmt wurde. Alle Proben wurden tiefgefroren gelagert. Den Patientenproben wurden zur Reduzierung unspezifischer Anbindungen 1% Ziegenserum und 50 µg/mL Rattenantikörper (Subklasse IgG2a) zugefügt bzw. war das Ziegenserum bereits in der Cartridge enthalten. Die Proben wurden in der ursprünglichen Konzentration gemessen. Zum Teil wurden die Proben mit humanem o-Plasma verdünnt und erneut gemessen. Das o-Plasma wurde fünffach gemessen. Die erhaltenen Signalanstiege wurden gegen die mit dem Kryptor[®]-System ermittelten Konzentrationen aufgetragen und eine Korrelationsgerade erstellt. Jede Probe wurde ein- bis dreimal gemessen, abhängig vom zur Verfügung stehendem Volumen. Der Ablauf der einzelnen Messungen ist unter 5.9.1 beschrieben.

Tabelle 18 in 3.3.5 fasst die Daten der Patientenproben zusammen.

6 Literatur

1. Deutsche Sepsis-Hilfe e.V. www.sepsis-hilfe.org. aufgerufen am 25.07.2014
2. Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K (2007) Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Medicine* 33 (4):606-618. doi:10.1007/s00134-006-0517-7
3. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M (2003) The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *New England Journal of Medicine* 348 (16):1546-1554. doi:10.1056/NEJMoa022139
4. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, Moreno R, Carlet J, Le Gall JR, Payen D (2006) Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study. *Critical Care Medicine* 34 (2):344-353. doi:10.1097/01.ccm.0000194725.48928.3a
5. Linde-Zwirble WT, Angus DC (2004) Severe sepsis epidemiology: sampling, selection, and society. *Critical Care* 8 (4):222-226. doi:10.1186/cc2917
6. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101 (6):1644-1655. doi:10.1378/chest.101.6.1644
7. Nylen ES, Whang KT, Snider RH, Steinwald PM, White JC, Becker KL (1998) Mortality is increased by procalcitonin and decreased by an antiserum reactive to procalcitonin in experimental sepsis. *Critical Care Medicine* 26 (6):1001-1006
8. Hagel S. BF (2011) *Intensivmedizin und Notfallmedizin. German Interdisciplinary Journal of Intensive Care Medicine* 48:57-73
9. Meisner M (2000) *Procalcitonin: ein neuer, innovativer Infektionsparameter; biochemische und klinische Aspekte.* Thieme, Stuttgart
10. Bates DW, Sands K, Miller E, Lanken PN, Hibberd PL, Graman PS, Schwartz JS, Kahn K, Snyderman DR, Parsonnet J, Moore R, Black E, Johnson BL, Jha A, Platt R (1997) Predicting bacteremia in patients with sepsis syndrome. *Journal of Infectious Diseases* 176 (6):1538-1551
11. Bates DW, Pruess KE, Lee TH (1995) How bad are bacteremia and sepsis? Outcomes in a cohort with suspected bacteremia. *Archives of Internal Medicine* 155 (6):593-598. doi:10.1001/archinte.155.6.593
12. Boontham P, Robins A, Chandran P, Pritchard D, Camara M, Williams P, Chuthapisith S, McKechnie A, Rowlands BJ, Eremin O (2008) Significant immunomodulatory effects of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules: possible link in human sepsis. *Clinical Science* 115 (11-12):343-351. doi:10.1042/cs20080018
13. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R (2013) *Surviving Sepsis Campaign: international*

- guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Medicine* 39 (2):165-228
14. Becker KL, Snider R, Nylan ES (2008) Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection, and sepsis: Clinical utility and limitations. *Critical Care Medicine* 36 (3):941-952. doi:10.1097/ccm.0b013e318165babb
 15. Schneider H, Lam QT (2007) Procalcitonin for the clinical laboratory: a review. *Pathology* 39:383-390
 16. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, Suppes R, Feinstein D, Zanotti S, Taiberg L, Gurka D, Cheang M (2006) Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Critical Care Medicine* 34 (6):1589-1596. doi:10.1097/01.ccm.0000217961.75225.e9
 17. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Herrera-Melero I, Aldabó-Pallás T, Cayuela-Dominguez A, Marquez-Vacaro JA, Carbajal-Guerrero J, Garcia-Garmendia JL (2008) Mortality and morbidity attributable to inadequate empirical antimicrobial therapy in patients admitted to the ICU with sepsis: a matched cohort study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61 (2):436-441
 18. Elebute EA, Stoner HB (1983) The grading of sepsis. *The British Journal of Surgery* 70 (1):29-31. doi:10.1002/bjs.1800700111
 19. Brunkhorst F, Karzai W, Reinhart K (2002) Aktuelle Aspekte zur Sepsisdiagnose. *Zentralblatt für Chirurgie* 127 (03):165-173
 20. F.M. B, K R (2009) Diagnosis and causal treatment of sepsis. *Internist* 50:810-816
 21. Krämer PM, Gouzy M-F, Keß M, Kleinschmidt U, Kremmer E (2008) Development and characterization of new rat monoclonal antibodies for procalcitonin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392:727-736
 22. Kremmer E, Meyer K, Grässer FA, Flatley A, Kösters M., Lupp PB, Krämer PM (2011) A new strategy for the development of monoclonal antibodies for the determination of human procalcitonin in serum samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402:989-995
 23. Cohen ND (1994) Causes of and farm management factors associated with disease and death in foals. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 204 (10):1644-1651
 24. Sykes BW, Furr M (2005) Equine endotoxaemia - A state-of-the art review of therapy. *Australian Veterinary Journal* 83 (1-2):45-50. doi:10.1111/j.1751-0813.2005.tb12191.x
 25. Vidovic A, Huskamp B (1999) Endotoxaemia in colic illnesses in horses - quantitative analysis and clinical relevance. *Pferdeheilkunde* 15 (4):325-334
 26. Roy MF (2004) Sepsis in adults and foals. *Veterinary Clinics of North America-Equine Practice* 20 (1):41-+. doi:10.1016/j.cevq.2003.12.005
 27. Breuer J, Schusser GF (2012) Establishing a sepsis-score for adult equine patients. *Pferdeheilkunde* 28 (4):421-428
 28. Brewer BD, Koterba AM (1988) Development of a scoring system for the early diagnosis of equine neonatal sepsis. *Equine Veterinary Journal* 20 (1):18-22

29. Wilson WD, Madigan JE (1989) Comparison of bacteriologic culture of blood and necropsy specimens for determining the cause of foal septicemia: 47 cases (1978-1987). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 195 (12):1759-1763
30. Pusterla N, Magdesian KG, Mapes S, Leutenegger CM (2006) Expression of molecular markers in blood of neonatal foals with sepsis. *American Journal of Veterinary Research* 67 (6):1045-1049. doi:10.2460/ajvr.67.6.1045
31. Muller B, Christ-Crain M, Nylen ES, Snider R, Becker KL (2004) Limits to the use of the procalcitonin level as a diagnostic marker. *Clinical Infectious Diseases* 39 (12):1867-1868. doi:10.1086/426148
32. Schuetz P, Albrich W, Mueller B (2011) Procalcitonin for diagnosis of infection and guide to antibiotic decisions: past, present and future. *BMC Medicine* 9 (1):107
33. Christ-Crain M, Jaccard-Stolz D, Bingisser R, Gencay MM, Huber PR, Tamm M, Muller B (2004) Effect of procalcitonin-guided treatment on antibiotic use and outcome in lower respiratory tract infections: cluster-randomised, single-blinded intervention trial. *Lancet* 363 (9409):600-607. doi:10.1016/s0140-6736(04)15591-8
34. Christ-Crain M, Stolz D, Bingisser R, Muller C, Miedinger D, Huber PR, Zimmerli W, Harbarth S, Tamm M, Muller B (2006) Procalcitonin guidance of antibiotic therapy in community-acquired pneumonia a Randomized trial. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 174 (1):84-93. doi:10.1164/rccm.200512-1922OC
35. Russwurm S, Reinhart K (2004) Procalcitonin mode of action: New pieces in a complex puzzle. *Critical Care Medicine* 32 (8):1801-1802. doi:10.1097/01.ccm.0000136010.07232.37
36. Harbarth S, Holeckova K, Froidevaux C, Pittet D, Ricou B, Grau GE, Vadas L, Pugin J, Geneva Sepsis N (2001) Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 164 (3):396-402
37. Jacobs JW, Lund PK, Potts JT, Jr., Bell NH, Habener JF (1981) Procalcitonin is a glycoprotein. *The Journal of Biological Chemistry* 256 (6):2803-2807
38. Le Moullec JM, Jullienne A, Chenais J, Lasmoles F, Guliana JM, Milhaud G, Moukhtar MS (1984) The complete sequence of human procalcitonin. *FEBS Letters* 167 (1):93-97
39. Morgenthaler NG, Struck J, Fischer-Schulz C, Seidel-Mueller E, Beier W, Bergmann A (2002) Detection of procalcitonin (PCT) in healthy controls and patients with local infection by a sensitive ILMA. *Clinical Laboratory* 48 (5-6):263-270
40. McGee KA, Baumann NA (2009) Overview of Sepsis. *Clinical Laboratory News* 35 (7)
41. Russwurm S, Wiederhold M, Oberhoffer M, Stonans I, Zipfel PF, Reinhart K (1999) Molecular aspects and natural source of procalcitonin. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 37 (8):789-797. doi:10.1515/cclm.1999.119
42. Brahms GmbH. www.procalcitonin.com. aufgerufen am 11.07.2014
43. Broad PM, Symes AJ, Thakker RV, Craig RK (1989) Structure and methylation of the human calcitonin/alpha-CGRP gene. *Nucleic Acids Res* 17 (17):6999-7011

44. Russwurm S, Stonans I, Stonane E, Wiederhold M, Lubner A, Zipfel PF, Deigner HP, Reinhart K (2001) Procalcitonin and CGRP-I mRNA expression in various human tissues. *Shock* 16 (2):109-112. doi:10.1097/00024382-200116020-00004
45. Oberhoffer M, Stonans I, Russwurm S, Stonane E, Vogelsang H, Junker U, Jäger L, Reinhart K (1999) Procalcitonin expression in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by lipopolysaccharides and sepsis-related cytokines in vitro. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 134 (1):49-55
46. Dandona P, Nix D, Wilson MF, Aljada A, Love J, Assicot M, Bohuon C (1994) Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 79 (6):1605-1608. doi:10.1210/jc.79.6.1605
47. Whang KT, Vath SD, Becker KL, Snider RH, Nysten ES, Muller B, Li Q, Tamarkin L, White JC (2000) Procalcitonin and proinflammatory cytokine interactions in sepsis (vol 12, pg 268, 1999). *Shock* 14 (1):73-78. doi:10.1097/00024382-200014010-00013
48. Becker KL (2010) Immunoneutralization of procalcitonin or its component peptides: a promising treatment of sepsis. *Clinical Science* 119 (11-12):515-517. doi:10.1042/cs20100361
49. Meisner M (2010) Procalcitonin: Biochemie und klinische Diagnostik. UNI-MED-Verlag, Bremen
50. Meisner M, Tschaikowsky K, Schnabel S, Schmidt J, Katalinic A, Schuttler J (1997) Procalcitonin - Influence of temperature, storage, anticoagulation and arterial or venous asservation of blood samples on procalcitonin concentrations. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 35 (8):597-601
51. Weglöhner W, Struck J, Fischer-Schulz C, Morgenthaler NG, Otto A, Bohuon C, Bergmann A (2001) Isolation and characterization of serum procalcitonin from patients with sepsis. *Peptides* 22 (12):2099-2103. doi:10.1016/S0196-9781(01)00541-1
52. Wrenger S, Kähne T, Bohuon C, Weglöhner W, Ansorge S, Reinhold D (2000) Amino-terminal truncation of procalcitonin, a marker for systemic bacterial infections, by dipeptidyl peptidase IV (DP IV). *FEBS Letters* 466:155-159. doi:DOI 10.1007/s00216-008-2589-4
53. Struck J, Strebelow M, Tietz S, Alonso C, Morgenthaler NG, van der Hoeven JG, Pickkers P, Bergmann A (2009) Method for the selective measurement of amino-terminal variants of procalcitonin. *Clinical Chemistry* 55 (9):1672-1679. doi:10.1373/clinchem.2008.123018
54. Snider Jr RH, Nysten ES, Becker KL (1997) Procalcitonin and its component peptides in systemic inflammation: immunochemical characterization. *Journal of Investigative Medicine: the Official Publication of the American Federation for Clinical Research* 45 (9):552-560
55. Becker KL, Snider R, Nysten ES (2010) Procalcitonin in sepsis and systemic inflammation: a harmful biomarker and a therapeutic target. *British Journal of Pharmacology* 159 (2):253-264. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00433.x
56. Martinez JM, Wagner KE, Snider RH, Nysten ES, Muller B, Sarani B, Becker KL, White JC (2001) Late immunoneutralization of procalcitonin arrests the progression of lethal porcine sepsis. *Surgical Infections* 2 (3):193-202; Discussion 202-193. doi:10.1089/109629601317202678

57. Becker KL, Nylen ES, Snider RH, Muller B, White JC (2003) Immunoneutralization of procalcitonin as therapy of sepsis. *Journal of Endotoxin Research* 9 (6):367-374. doi:10.1179/096805103225003295
58. Hoffmann G, Totzke G, Seibel M, Smolny M, Wiedermann FJ, Schobersberger W (2001) In vitro modulation of inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide synthesis by procalcitonin. *Critical Care Medicine* 29 (1):112-116. doi:10.1097/00003246-200101000-00023
59. Wiedermann FJ, Kaneider N, Egger P, Tiefenthaler W, Wiedermann CJ, Lindner KH, Schobersberger W (2002) Migration of human monocytes in response to procalcitonin. *Critical Care Medicine* 30 (5):1112-1117. doi:10.1097/00003246-200205000-00025
60. Castelli GP, Pognani C, Meisner M, Stuani A, Bellomi D, Sgarbi L (2004) Procalcitonin and C-reactive protein during systemic inflammatory response syndrome, sepsis and organ dysfunction. *Critical Care* 8 (4):R234-R242. doi:10.1186/cc2877
61. Brunkhorst FM, Wegscheider K, Forycki ZF, Brunkhorst R (2000) Procalcitonin for early diagnosis and differentiation of SIRS, sepsis, severe sepsis, and septic shock. *Intensive Care Medicine* 26:148-152. doi:10.1007/bf02900728
62. Nylen ES, O'Neill W, Jordan MH, Snider RH, Moore CF, Lewis M, Silva OL, Becker KL (1992) Serum procalcitonin as an index of inhalation injury in burns. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 24 (9):439-443. doi:10.1055/s-2007-1003354
63. Nylen ES, Snider RH, Thompson KA, Rohatgi P, Becker KL (1996) Pneumonitis-associated hyperprocalcitoninemia. *American Journal of the Medical Sciences* 312 (1):12-18
64. Nylen ES, AlArifi A, Becker KL, Snider RH, Alzeer A (1997) Effect of classic heatstroke on serum procalcitonin. *Critical Care Medicine* 25 (8):1362-1365. doi:10.1097/00003246-199708000-00024
65. Alzahrani AJ, Hassan MI, Obeid OE, Diab AE, Qutub HO, Gupta RK (2009) Rapid detection of procalcitonin as an early marker of sepsis in intensive care unit in a tertiary hospital. *International Journal of Medicine and Medical Sciences* 1 (11):516-522
66. Steinwald PM, Whang KT, Becker KL, Snider RH, Nylen ES, White JC (1999) Elevated calcitonin precursor levels are related to mortality in an animal model of sepsis. *Critical Care* 3 (1):11
67. Wacker C, Prkno A, Brunkhorst FM, Schlattmann P (2013) Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases* 13 (5):426-435. doi:10.1016/s1473-3099(12)70323-7
68. Simon L, Gauvin F, Amre DK, Saint-Louis P, Lacroix J (2004) Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: A systematic review and meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases* 39 (2):206-217. doi:10.1086/421997
69. Schneider CP, Yilmaz Y, Kleespies A, Jauch KW, Hartl WH (2009) Accuracy of procalcitonin for outcome prediction in unselected postoperative critically ill patients. *Shock* 31 (6):568-573. doi:10.1097/SHK.0b013e318193cb52
70. Becker K, Nylen E, White J, Muller B, Snider Jr R (2004) Procalcitonin and the calcitonin gene family of peptides in inflammation, infection, and sepsis: A journey from

- calcitonin back to its precursors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89 (4):1512-1525
71. Brunkhorst FM, Gastmeier P, Kern W, Kruger W, Mayer K, Weimann A, Welte T, Putensen C, Werdan K, Reinhart K (2010) Prevention and Follow-up Care of Sepsis. 1st revision of S2k guidelines of the German Sepsis Society (Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V., DSG) and the German Interdisciplinary Association of Intensive Care and Emergency Medicine (Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin, DIVI). *Internist* 51 (7):925-932. doi:10.1007/s00108-010-2663-9
 72. Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone HG, Bardutzky J, Dempfle CE, Forst H, Gastmeier P, Gerlach H, Grundling M, John S, Kern W, Kreymann G, Kruger W, Kujath P, Marggraf G, Martin J, Mayer K, Meier-Hellmann A, Oppert M, Putensen C, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Seifert H, Spies C, Stuber F, Weiler N, Weimann A, Werdan K, Welte T (2010) Prevention, diagnosis, therapy and follow-up care of sepsis: 1st revision of S-2k guidelines of the German Sepsis Society (Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG)) and the German Interdisciplinary Association of Intensive Care and Emergency Medicine (Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI)). *German Medical Science : GMS e-journal* 8:Doc14. doi:10.3205/000103
 73. Pfäfflin A, Schleicher E (2009) Inflammation markers in point-of-care testing (POCT). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393 (5):1473-1480. doi:10.1007/s00216-008-2561-3
 74. de Wolf HK, Gunnewiek JK, Berk Y, van den Ouweland J, de Metz M (2009) Comparison of a new procalcitonin assay from Roche with the established method on the Brahms Kryptor. *Clinical Chemistry* 55 (5):1043-1044. doi:10.1373/clinchem.2008.117655
 75. Hubl W, Krassler J, Zingler C, Pertschy A, Hentschel J, Gerhards-Reich C, Mack M, Demant T (2003) Evaluation of a fully automated procalcitonin chemiluminescence immunoassay. *Clinical Laboratory* 49 (7-8):319-327
 76. Schuetz P, Christ-Crain M, Huber AR, Muller B (2010) Long-term stability of procalcitonin in frozen samples and comparison of Kryptor (R) and VIDAS (R) automated immunoassays. *Clinical Biochemistry* 43 (3):341-344. doi:10.1016/j.clinbiochem.2009.08.029
 77. Steinbach G, Rau B, Debard AL, Javourez JF, Bienvenu J, Ponzio A, Bonfa A, Hubl W, Demant T, Kulpmann WR, Buchholz J, Schumann G (2004) Multicenter evaluation of a new immunoassay for procalcitonin measurement on the Kryptor (R) System. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 42 (4):440-449. doi:10.1515/cclm.2004.077
 78. Thermo Fisher Scientific Inc. www.thermoscientific.com/ecom/servlet/productsdetail_11152_L11403_82230_127_06144_-1. aufgerufen am 27.07.2013
 79. Sanders RJ, Schoorl M, Dekker E, Snijders D, Boersma WG, Ten Boekel E (2011) Evaluation of a new procalcitonin assay for the Siemens ADVIA Centaur (R) with the established method on the BRAHMS Kryptor (R). *Clinical Laboratory* 57 (5-6):415-420
 80. Yamada H, Matsuda S, Ushio Y, Nakamura K, Kobatake S, Satomura S, Matsuura S (2008) Determination of procalcitonin concentration using the SphereLight 180 clinical auto-analyzer. *Clinica Chimica Acta* 388 (1-2):38-40. doi:10.1016/j.cca.2007.09.028

81. Sauer U, Domnanich P, Preininger C (2011) Protein chip for the parallel quantification of high and low abundant biomarkers for sepsis. *Analytical Biochemistry* 419 (1):46-52. doi:10.1016/j.ab.2011.07.038
82. Buchegger P, Sauer U, Toth-Szekely H, Preininger C (2012) Miniaturized protein microarray with internal calibration as point-of-care device for diagnosis of neonatal sepsis. *Sensors* 12 (2):1494-1508. doi:10.3390/s120201494
83. Krämer PM, Keß M, Kremmer E, Schulte-Hostede S (2011) Multi-parameter determination of TNF alfa, PCT and CRP for point-of-care testing. *Analyst* 136:692-695
84. Baldini F, Bolzoni L, Giannetti A, Kess M, Krämer PM, Kremmer E, Porro G, Senesi F, Trono C (2009) A new procalcitonin optical immunosensor for POCT applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393 (4):1183-1190. doi:10.1007/s00216-008-2547-1
85. Baldini F, Carloni A, Giannetti A, Porro G, Trono C (2008) A new optical platform for biosensing based on fluorescence anisotropy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391 (5):1837-1844. doi:10.1007/s00216-008-1904-4
86. Kemmler M, Koger B, Sulz G, Sauer U, Schleicher E, Preininger C, Brandenburg A (2009) Compact point-of-care system for clinical diagnostics. *Sensors and Actuators B-Chemical* 139 (1):44-51. doi:10.1016/j.snb.2008.08.043
87. Kemmler M, Sauer U, Schleicher E, Preininger C, Brandenburg A (2014) Biochip point-of-care device for sepsis diagnostics. *Sensors and Actuators B-Chemical* 192:205-215. doi:10.1016/j.snb.2013.10.003
88. Holowaychuk MK, Martin LG (2007) Review of hypocalcemia in septic patients. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 17 (4):348-358. doi:10.1111/j.1476-4431.2007.00246.x
89. Redl H, Schiesser A, Togel E, Assicot M, Bohuon C (2001) Possible role of TNF on procalcitonin release in a baboon model of sepsis. *Shock* 16 (1):25-27. doi:10.1097/00024382-200116010-00005
90. Toribio RE, Kohn CW, Leone GW, Capen CC, Rosol TJ (2003) Molecular cloning and expression of equine calcitonin, calcitonin gene-related peptide-I, and calcitonin gene-related peptide-II. *Molecular and Cellular Endocrinology* 199 (1-2):119-128. doi:10.1016/s0303-7207(02)00289-7
91. Raem AM, Rauch P (2007) *Immunoassays*. Elsevier GmbH, München
92. Krämer PM (2010) 4.8. Immunochemische Methoden in der Umweltanalytik. In: Nießner R (ed) *Karl Höll, Wasser: Nutzung, Kreislauf, Hygiene, Analyse und Bewertung*. vol 9. Walter de Gruyter, Berlin, New York, pp 221-233
93. Vanderlaan M, Watkins BE, Stanker L (1988) ES&T critical review: environmental monitoring by immunoassay. *Environmental Science & Technology* 22 (3):247-254
94. Nelson D, Cox M (2001) *Lehninger Biochemie*. 3., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, vol 5. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, Deutschland
95. Marco MP, Gee S, Hammock BD (1995) Immunochemical techniques for environmental analysis II. Antibody production and immunoassay development. *Trends in Analytical Chemistry* 14 (8):415-426

96. General Electric Company. www.biacore.com/lifesciences/introduction/index.html. aufgerufen am 07.08.2014
97. Gauglitz G, Luppä PB (2009) Patientennahe Labordiagnostik. *Chem Unserer Zeit* 43:308-318
98. Homola J, Yee SS, Gauglitz G (1999) Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors and Actuators B: Chemical* 54 (1–2):3-15. doi:10.1016/S0925-4005(98)00321-9
99. Liedberg B, Nylander C, Lunström I (1983) Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators* 4:299-304
100. Marco MP, Gee SJ, Hammock BD (1995) Immunochemical techniques for environmental analysis I. immunosensors. *Trends in Analytical Chemistry* 14 (7):341-349
101. Kirkegaard&Perry Laboratories Inc. Technical guide for ELISA. www.kpl.com. aufgerufen am 08.08.2014
102. Gallati H, Pracht I (1985) Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien und Optimierung der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H₂C₂ und 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 23 (8):453-460
103. Josephy PD, Eling T, Mason RP (1982) The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3, 5, 3', 5'-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates. *Journal of Biological Chemistry* 257 (7):3669-3675
104. Kricka LJ (2000) Interferences in immunoassay - Still a threat. *Clinical Chemistry* 46 (8):1037-1038
105. Sauer U, Pultar J, Preininger C (2012) Critical role of the sample matrix in a point-of-care protein chip for sepsis. *Journal of Immunological Methods* 378 (1-2):44-50. doi:10.1016/j.jim.2012.02.002
106. Kricka LJ (1999) Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. *Clinical Chemistry* 45 (7):942-956
107. Bjerner J, Nustad K, Norum LF, Olsen KH, Børmer OP (2002) Immunometric assay interference incidence and prevention. *Clinical Chemistry* 48 (4):613-621
108. Boscato LM, Stuart MC (1988) Heterophilic antibodies a problem for all immunoassays. *Clinical Chemistry* 34 (1):27-33
109. Hennig C, Rink L, Fagin U, Jabs WJ, Kirchner H (2000) The influence of naturally occurring heterophilic anti-immunoglobulin antibodies on direct measurement of serum proteins using sandwich ELISAs. *Journal of Immunological Methods* 235 (1):71-80
110. Levinson SS (1992) Antibody multispecificity in immunoassay interference. *Clinical Biochemistry* 25 (2):77-87. doi:10.1016/0009-9120(92)80048-I
111. Albrecht C, Gauglitz G (2011) DIAGNOSTIK-Entwicklungen in der Labordiagnostik-POCT—vollständiger Ersatz für die traditionelle diagnostische Analytik? *GIT Labor-Fachzeitschrift* 55 (2):111-113
112. Gubala V, Harris LF, Ricco AJ, Tan MX, Williams DE (2011) Point of care diagnostics: status and future. *Analytical Chemistry* 84 (2):487-515

113. Krämer PM, Weber CM, Forster S, Rauch P, Kremmer E (2010) Analysis of DDT isomers with enzyme-linked immunosorbent assay and optical immunosensor based on rat monoclonal antibodies as biological recognition elements. *Journal of AOAC International* 93 (1):44-58
114. Luppá PB, Müller C, Schlichtiger A, Schlebusch H (2011) Point-of-care testing (POCT): Current techniques and future perspectives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 30 (6):887-898. doi:10.1016/j.trac.2011.01.019
115. Gauglitz G, Luppá PB (2009) Point-of-care laboratory testing. *Chemie in Unserer Zeit* 43 (5):308-318
116. Baldini F (2005) New trends in biosensors for health care. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381 (5):1003-1003
117. Krämer PM (1996) Biosensors for measuring pesticide residues in the environment: Past, present, and future. *Journal of AOAC International* 79 (6):1245-1254
118. Thévenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS (2001) Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics* 16 (1):121-131
119. Stöcklein W (2006) Molekül-Detektive. *Biosensoren*. *Chemie in unserer Zeit* 40 (1):32-40
120. Gauglitz G (2014) Point-of-Care Platforms. *Annual Review of Analytical Chemistry (Palo Alto, Calif)* 7 (1):297-315. doi:10.1146/annurev-anchem-071213-020332
121. Wollenberger U, Renneberg R, Bier FF, Scheller FW (2012) *Analytische Biochemie: Eine praktische Einführung in das Messen mit Biomolekülen*. John Wiley & Sons,
122. Gauglitz G, Proll G (2008) Strategies for label-free optical detection. In: Renneberg R, Lisdat F (eds) *Biosensing for the 21st Century*, vol 109. *Advances in Biochemical Engineering-Biotechnology*. Springer-Verlag Berlin, Berlin, pp 395-432. doi:10.1007/10_2007_076
123. Axelrod D, Burghardt TP, Thompson NL (1984) Total internal reflection fluorescence. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* 13:247-268. doi:10.1146/annurev.bb.13.060184.001335
124. Atkins PW (2002) *Kurzlehrbuch Physikalische Chemie*, vol 3. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGa, Weinheim, Deutschland
125. Meusel M, Trau D, Katerkamp A, Meier F, Polzius R, Cammann K (1998) New ways in bioanalysis—one-way optical sensor chip for environmental analysis. *Sensors and Actuators B: Chemical* 51 (1–3):249-255. doi:10.1016/S0925-4005(98)00202-0
126. Peter C, Meusel M, Grawe F, Katerkamp A, Cammann K, Borchers T (2001) Optical DNA-sensor chip for real-time detection of hybridization events. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 371 (2):120-127. doi:10.1007/s002160101006
127. Schult K, Katerkamp A, Trau D, Grawe F, Cammann K, Meusel M (1999) Disposable optical sensor chip for medical diagnostics: new ways in bioanalysis. *Analytical Chemistry* 71 (23):5430-5435. doi:10.1021/ac9907686
128. Krämer PM, Weber CM, Kremmer E, Räuber C, Martens D, Forster S, Stanker LH, Rauch P, Shiundu PM, Mulaa FJ (2007) Optical immunosensor and ELISA for the analysis of pyrethroids and DDT in environmental samples. In: *Rational Environmental*

- Management of Agrochemicals, vol 966. ACS Symposium Series, vol 966. American Chemical Society, pp 186-202
129. Katerkamp A (1997). DE19628002C1,
 130. Meusel M, Trau D, Katerkamp A (1998). DE19711281C1,
 131. Schenk R (2012). Germany Patent DE102010038431A1,
 132. Brent R (2006) Analysis of Protein Interactions. In: Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc., Somerset, pp 20.20.21-20.20.26. doi:10.1002/0471142727.mb2000s74
 133. Products TEAftEoM (1995) ICH Topic Q2A - Note for guidance on validation of analytical methods: definitions and terminology CPMP/ICH/381/95.
 134. Products TEAftEoM (1995) ICH Topic Q2B - Note for guidance on validation of analytical procedures: methodology CPMP/ICH/281/95.
 135. Inczedy J LT, Ure AM (ed) (1998) Compendium of analytical nomenclature: the orange book, 3rd edn. Blackwell Science, Oxford
 136. Albrecht C, Kaepfel N, Gauglitz G (2008) Two immunoassay formats for fully automated CRP detection in human serum. Analytical and Bioanalytical Chemistry 391 (5):1845-1852. doi:10.1007/s00216-008-2093-x
 137. U.S. Department of Health and Human Services FaDA, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM) (2001) Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation.
 138. Rascher D, Geerlof A, Kremmer E, Kramer P, Michael S, Hartmann A, Rieger M (2014) Total internal reflection (TIRF)-based quantification of procalcitonin for sepsis diagnosis - A point-of-care testing application. Biosensors & Bioelectronics 59:251-258. doi:10.1016/j.bios.2014.03.052
 139. Rieger M, Kochleus C, Teschner D, Rascher D, Barton A, Geerlof A, Kremmer E, Schmid M, Hartmann A, Gehlen H (2014) A new ELISA for the quantification of equine procalcitonin in plasma as potential inflammation biomarker in horses. Analytical and Bioanalytical Chemistry:1-6. doi:10.1007/s00216-014-7944-z
 140. Kochleus C (2013) Entwicklung eines serologischen ELISA-basierten Testsystems zur Quantifizierung equinen Procalcitonins als potentiellen Entzündungsmarker für Pferde. Hochschule Weihenstephan-Triesdorf,
 141. Nylen E, Muller B, Becker KL, Snider R (2003) The future diagnostic role of procalcitonin levels: The need for improved sensitivity. Clinical Infectious Diseases 36 (6):823-824. doi:10.1086/368088
 142. Barassi A, Pallotti F, d'Eril GM (2004) Biological variation of procalcitonin in healthy individuals. Clinical Chemistry 50 (10):1878-1878. doi:10.1373/clinchem.2004.037275

Danksagung

Zuallererst möchte ich Herrn Prof. Dr. Reinhard Nießner für die Möglichkeit danken, bei ihm am Lehrstuhl für Analytische Chemie zu promovieren. Ihr konstruktives Feedback, die Tipps und Ratschläge bei meinen Vorträgen im Lehrstuhl waren stets eine große Hilfe.

Weiterhin möchte ich meinem Institutsleiter beim Helmholtz Zentrum München, Prof. Dr. Anton Hartmann, danken, dass ich meine Promotion am Institut für Mikrogen-Pflanzen Interaktion durchführen konnte. Vor allem möchte ich mich für die Unterstützung in der Anfangsphase bedanken, bei der ich oft nicht wusste, ob es möglich ist, das Thema dieser Promotion weiterzuverfolgen. Der Einsatz, für mich einen Betreuer zu finden, ermöglichte erst die Vollendung dieser Arbeit.

In diesem Zusammenhang möchte ich auch meiner 2011 verstorbenen Betreuerin Frau Dr. Petra Krämer danken. Dieses spannende Thema und die Möglichkeit, während meiner Promotion am Helmholtz Zentrum München in einer Kooperation mit der pes diagnosesysteme GmbH zu arbeiten, verdanke ich ihr.

Meinem Betreuer Dr. Martin Rieger gilt ebenso mein Dank, der mir mit Rat und Tat zur Seite stand. Danke für die schöne Zeit und für deine Hilfe in so vielen Fällen. Ohne dich wäre diese Arbeit nicht so schnell und so gut fertig geworden.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer bei pes diagnosesysteme GmbH, Dr. Uwe Kempin. Die herausfordernden Fragestellungen und die spannenden Diskussionen waren ein liebgewonnener Teil meiner Promotion. Ich habe sehr viel von Ihnen gelernt und danke Ihnen für den ungezwungenen Umgang, und dass Sie mich genauso oft zum Grübeln wie zum Lächeln brachten.

Natürlich gilt mein Dank auch all den Menschen, die mir geholfen haben bei dieser Arbeit: Herr Dr. Arie Geerlof für die Herstellung der Proteine und das geduldige Erklären der Abläufe; Frau Dr. Elisabeth Kremmer für die Beantwortung so vieler Fragen in Bezug auf Antikörper und ELISAs; Frau Anna Nowak für die Geduld bei meinen ersten ELISAs und die vielen hilfreichen Tipps; die guten Feen in den Laboren bei pes diagnosesysteme, vor allem Frau Butze, die mir bei den Besuchen in Leipzig stets eine große Hilfe war und viel über den respons® IQ beibrachte. Weiterhin allen aus dem Institut Mikrogen-Pflanzen Interaktion, die mir in den verschiedensten Situationen geholfen haben.

Ein ganz großes Danke gilt all den lieben Menschen, die ich während meiner Promotion im Helmholtz Zentrum kennen gelernt habe und die mittlerweile so viel mehr sind als Arbeitskollegen:

Meinen Mädels Theresa und Josie: Ohne euch wäre ich oft verzweifelt! Danke für all die Tränen und all das Lachen, das wir geteilt haben, für euer offenes Ohr und eure Hilfe! Ich bin froh, dass ich euch kennen gelernt habe.

Felix, Dominik und Jasper, wie soll ich euch danken für all die Unterstützung, sei es im Labor oder wenn mich der Computer zum Wahnsinn trieb oder für die aufbauenden Gespräche bei einem Kaffee. Ohne euch wäre diese Zeit nicht annähernd so schön gewesen und ich hätte sie nicht so erfolgreich abgeschlossen.

Simone, Kerstin und Matze, ihr wart die Unterstützung in unserem Institut. Ich denke gerne an all die schönen Stunden, die wir diskutiert haben, bei Weihnachtsfeiern, Sommerfesten oder Retreaten.

Und nicht zu vergessen, meine Partyhelmis: Kathrin, Sebastian, Michael F., Janos, Markus, Matthias, Michael E., Beate, Bene. Meine Zeit am HMGU wäre nicht so schön gewesen ohne euch! Und ich wäre bei Weitem nicht so kaffeesüchtig.

Auch meinen Freunden möchte ich von Herzen danken, die mir oft Mut zusprachen, mich aufbauten oder sich mit mir freuten. Alle guten Taten aufzuzählen, würde hier den Rahmen sprengen. Zweien gilt an dieser Stelle allerdings ein besonderer Dank: Steffi und Eike. Ihr wart oft meine Stütze bei so vielen Gelegenheiten! Ohne euch wäre ich oft verzweifelt und hätte gerade in der Endphase, zwischem all dem Stress, vergessen mich über den Erfolg zu freuen.

Und zum Schluss gilt der Dank meinen Eltern, meiner Patin und Bubi. Ohne euch hätte ich diesen Weg nicht beschreiten können. Worte können nicht ausdrücken, wie dankbar ich für eure Unterstützung bin. Das Wissen, dass ihr da seid, ist die größte Hilfe!

Danke!!

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe. Die benutzten Hilfsmittel und Quellen sind in der Arbeit vollständig angegeben. Die Dissertation ist bis auf die gekennzeichneten Teile noch nicht veröffentlicht worden. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- oder Beratungsdiensten (Promotionsberaterinnen oder Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir mittelbar oder unmittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Ich habe weder früher noch gleichzeitig ein Promotionsverfahren bei einem anderen Fachbereich bzw. einer anderen Hochschule im In- oder Ausland beantragt.

München, den 21.11.2014

Daniela Rascher