

(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **272 134 A1**

4(51) G 01 N 33/53

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP G 01 N / 315 247 5

(22) 29.04.88

(44) 27.09.89

(71) Humboldt-Universität zu Berlin, Direktorat für Forschung, Unter den Linden 6, Berlin, 1086, DD

(72) Porstmann, Tomas, Prof. Dr. sc. med.; Porstmann, Bärbel, Doz. Dr. sc. med.; von Baehr, Rüdiger, Prof. Dr. sc. med.; Nugel, Elsa, DD

(54) Verfahren zum simultanen Nachweis von Antigen und spezifischen Antikörpern

(55) Infektionserreger, Antigen, Antikörper, Nachweis, Festphasenimmunoassay, Kombination, Zwei-Seiten-Bindungsassay, Brückentechnik, Medizin, Diagnostik, HIV-Nachweis, HBsAg-Nachweis

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum simultanen Nachweis von Antigen und Antikörper im Festphasenimmunoassay. Sie dient dem Nachweis von Infektionserregern. Die Lösung der erfindungsgemäßen Aufgabe liegt darin, daß der Zwei-Seiten Bindungstest zum Antigennachweis mit der Brückenantikörpertechnik oder der Antiglobulin (Sandwich)-technik zum Antikörpernachweis kombiniert wird oder daß Antigenstruktur-tragende Antikörper (Antigen-Antikörperkonjugate) im Zwei-Seiten-Bindungstest eingesetzt werden. Die Erfindung eignet sich z. B. zum simultanen HIV- und HBsAg-Nachweis. Das Anwendungsgebiet ist die medizinische Diagnostik.

Patentansprüche:

1. Verfahren zum simultanen Nachweis von Antigen und spezifischen Antikörpern in Festphasenimmunoassays, **gekennzeichnet dadurch**, daß in einem Ansatz Erreger
 - a) direkt als Antigen
 - b) indirekt über induzierte Antikörper
 simultan erfaßt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß Antikörper zur Bindung nachzuweisenden Antigens und Antigen sowie Antigene zur Bindung spezifischer Antikörper koimmobilisiert werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß Antigen sowie Antigene zur Bindung spezifischer Antikörper an Antikörper kovalent zu antigenstrukturtragenden Antikörpern gebunden werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1 und 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die antigenstrukturtragenden Antikörper wahlweise immobilisiert oder markiert werden.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, **gekennzeichnet dadurch**, daß bei vorhandenem Erregerantigen oder/und Antikörper gegen ein Antigen eines anderen Erregers entweder markierter Antikörper sich bindet oder markiertes Antigen gebunden wird und bei Doppelfunktionen sich beide parallel binden.
6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein Peptid sowie unterschiedliche Peptide kovalent am Antikörper gebunden werden.
7. Verfahren nach Anspruch 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Peptide Proteinsequenzen von Erregern sind.
8. Verfahren nach Anspruch 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß Proteinsequenzen des HIV-1 und HIV-2 verwendet werden.

Hierzu 7 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft diagnostische Verfahren zur Erkennung von Infektionskrankheiten in der Human- und Veterinärmedizin. Das Verfahren dient dem kombinierten Nachweis mehrerer Infektionserreger, wobei man sich der Diagnostik zirkulierenden Antigens und zirkulierender Antikörper bedient. Es kann auf dem Gebiet der Humanmedizin, in der Klinischen Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, in der mikrobiologisch-virologischen und der klinisch-immunologischen Diagnostik eingesetzt werden. Ferner findet es Anwendung in Hygieneeinrichtungen zur Aufklärung epidemiologischer Situationen hinsichtlich der Verbreitung der nachzuweisenden Erreger sowie in Blutspendezentralen und der Pharmaindustrie bei der Elimination erregershaltiger biologischer Flüssigkeiten oder Organe, die zum Zwecke eines therapeutischen Einsatzes entnommen wurden und aufgearbeitet werden.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Festphaseimmunoassaytechniken sind die am häufigsten angewendeten Methoden zum Nachweis infektiöser Erreger (Bakterien, Viren). Da die Infektion mit einem Erreger in dem befallenen Organismus die Erzeugung spezifischer Antikörper hervorruft, wird deren Nachweis als indirekter Beweis eines stattgefundenen Kontaktes mit dem entsprechenden Erreger gewertet und überall dort angewendet, wo sich virales oder bakterielles Antigen aufgrund sehr geringer Konzentration in dem Untersuchungsgut nicht sicher nachweisen lassen. Kommen letztere in den für die Nachweistechiken ausreichenden Konzentrationen vor, wird ihrem Nachweis als direkter Beweis für die Infektion der Vorzug gegeben (Literaturübersicht bei Porstmann, T. und B. Porstmann, Dt. Gesundheitswesen 36, 1986–1990 [1981]). Damit werden Antikörper- und Antigennachweis als Immunoassayvarianten **nebeneinander** in verschiedenen Testen praktiziert. Die ständige Zunahme der sich als pathogen herausstellenden Infektionserreger führt zu einer steigenden Zahl unterschiedlicher Tests bei der Diagnostik, vor allem aber bei der Überwachung der für die Therapie vorgesehenen biologischen Produkte. Bisher wurde für den Nachweis eines Erregers mindestens ein Test benötigt. Dabei bedient man sich beim Antigentest bekannter Verfahren wie des kompetitiven Festphasenimmunoassays mit insolubilisiertem Antigen oder Antikörper sowie des Zwei-Seiten-Bindungstestes (Abb. 1) Schnur, A. H. W. M. und B. K. van Wemen: Chin Chim. Acta 81, 1–40 (1977)]. Für den Nachweis spezifischer Antikörper sind vier verschiedene Verfahren — Antiglobulin- oder Sandwichtechnik, Competitionstechnik, Capturetechnik und Brückentechnik (Abb. 2) — beschrieben worden (R. Tedder: in J. C. Gluckmann und E. Vilmer [Hrsg.]: Acquired Immuno Deficiency Syndrome; Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford. Parix, 1986, S. 173–181).

Ziel der Erfindung

Es ist das Ziel der Erfindung, Antigen bakterieller oder viraler Infektionserreger sowie spezifische Antikörper gegen andere Infektionserreger in ein und demselben Ansatz nachzuweisen und damit die Zahl der Testansätze gegenüber der Anwendung bei bisherigen Testverfahren zu reduzieren.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zum simultanen Nachweis von Antigen und spezifischen Antikörpern im Festphasenimmunoassay zu entwickeln. Die Aufgabe wurde dadurch gelöst, daß Antikörper zur Bindung nachzuweisenden Antigens und Antigen zur Bindung spezifischer Antikörper koimmobilisiert werden bzw. daß Antigen an den Antikörper vor seiner Immobilisierung kovalent gebunden wird. Bei vorhandenem Erregerantigen oder/und Antikörper gegen ein Antigen eines anderen Erregers bindet sich entweder ein markierter Antikörper oder ein markiertes Antigen; bei Doppelinfektionen befinden sich beide parallel. Durch Kovalentbindung unterschiedlicher Peptide sowie durch deren Koimmobilisierung und Enzymmarkierung lassen sich spezifische Antikörper gegen mehr als einen Erreger gleichzeitig in einem Ansatz nachweisen. Das Wesen der Erfindung zielt darauf ab, die Aussagen von zwei oder mehreren Tests in einem zu vereinigen, wobei in dem Fall auf die exakte Erregerdiagnose verzichtet werden kann, wenn bereits einer der nachgewiesenen Erreger definierte antiepidemische Maßnahmen oder die Sperrung des biologischen Produktes nach sich zieht. Erfindungsgemäß wird das dadurch erreicht, daß der zwei-Seiten Bindungsassay zum Antigennachweis mit der Brückenantikörpertechnik zum Antikörpernachweis kombiniert wird. Dazu wird bakterielles oder virales Antigen (z. B. gereinigt aus Viruslysat, rekombiniertes Antigen oder synthetische Peptide) entweder mit dem Antikörper zur Bindung des zusätzlich nachzuweisenden Antigens nach bekannten Verfahren an der festen Phase koimmobilisiert oder aber an den Antikörper kovalent gebunden, und nur dieser wird an der festen Phase nach bekannten Verfahren insolubilisiert. Im Falle der Kovalentbindung von Peptiden an den Antikörper wird dessen Reaktivität kaum beeinflusst, so daß mehrere (unterschiedliche) Peptide, die Sequenzen aus Proteinen verschiedener Erreger (z. B. HIV-1 und HIV-2) simulieren, koimmobilisiert werden können. Bei vorhandenem Antigen und/oder spezifischem Antikörper in der zu untersuchenden Probe wird ersteres von dem insolubilisierten Antikörper gebunden, während sich letzterer an das koimmobilisierte bzw. kovalent an den Antikörper fixierte Antigen bindet (Abb. 3 u. 4). Nach bekanntem Verfahren wird die Probe zwischen 30–120 min bei 20–37°C inkubiert und nach deren Entfernung durch Absaugen unspezifisch gebundene Bestandteile durch Spülung mit Waschpuffer bekannter Zusammensetzung entfernt. Im Anschluß daran erfolgt die Inkubation mit einer Kombination von markierten Antikörpern und markiertem Antigen oder markierten Antikörpern unterschiedlicher Spezifität (Abb. 3) bzw. die Inkubation mit einem markierten Antigen-Antikörperkonjugat (kovalente Bindung von Antigen an den Antikörper vor oder nach Markierung) über einen Zeitraum von 30–120 min bei 20–37°C. Nach erneuter Abtrennung der ungebundenen Bestandteile erfolgt die Substratreaktion nach bekannten Verfahren bzw. die Radioaktivitätsmessung oder die Bestimmung der Fluoreszenzintensität.

Ausführungsbeispiel

Methode

Monoklonales anti-HBsAg IgG (finale Konzentration 10 mg/ml) wurde mit einem 21er Peptid aus dem envGenbereich von HIV-1 (Aminosäuresequenz 586–606) (Wang, J. J. G., S. Steel, R. Wisniewolski und C. Y. Wang: Proc. Natl. Acad. Sci., USA 83, 6159–6163 [1986]) mit Carbodiimid (finale Konzentration 5 mmol/l) im molaren Verhältnis 1:50 über 120 min bei 20°C nach bekannter Methode (Talamo, P. C., E. Haber und K. F. Austen: J. Immunol. 101, 333–341 [1968]) gekoppelt und anschließend von freiem Carbodiimid und nicht gebundenem Peptid durch Geifiltration über Sephacryl S200 getrennt. Ein Teil dieses Konjugates wurde mit peroxidaktivierter Merrettichperoxidase (finale Peroxidkonzentration 10 mmol/l, Aktivierungsdauer 10 min, Abtrennung von freiem Peroxid durch Sephadex G-25 Gelfiltration) im molaren Verhältnis von IgG zu POD von 1:4 nach Wilson und Nakane (In: Knapp/Holubar/Wick [Hrsg]: Immunofluorescence and related staining techniques, Elsevier, Amsterdam, 1978, S. 215–221) über zwei Stunden bei Raumtemperatur gekoppelt. Die Konjugatstabilisierung erfolgte durch Reaktion mit Natriumborhydrid (finale Konzentration 5 mmol/l) über zwei Stunden bei 4°C. Anschließend wurde überschüssiges Natriumborhydrid durch Dialyse gegen PBS entfernt.

Peptid-Antikörper Konjugat wurde in einer Konzentration von 10 µg IgG/ml nach bekanntem Verfahren (Catt, K. und G. W. Tregear, Science 158, 1570–1572 [1967]) an der festen Phase (Polystyrenmikrotestplatten) adsorbiert. Anschließend wurde ein Serum mit bekanntem Gehalt an HBsAg und ein Serum mit Antikörpern gegen HIV-1 sowie ein Gemisch gleicher Volumenteile beider Seren geometrisch verdünnt und in jeweils separate Kavitäten 2 h bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Serumgemisch von 10 Einzelseren, die weder HBsAg noch anti-HIV-1 Antikörper enthielten, geometrisch verdünnt und unter gleichen Bedingungen in den Kavitäten inkubiert. Nach Abtrennung der ungebundenen Reaktanten erfolgte die Substratreaktion mit O-Phenylendiamin und H₂O₂ nach bekanntem Verfahren (T. Porstmann, B. Porstmann, R. Wietschke, R. von Baehr und E. Egger: J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 23, 41–45 [1985]) und die Messung des Produktes bei 492 nm.

Ergebnis:

- HBsAg ist in diesem Kombinationstest bis zu einer Konzentration von 1,0 µg/l nachweisbar (Abb. 5)
- anti-HIV-Antikörper (anti-gp 41) in einem positiv reagierenden Kontrollserum lassen sich in diesem Kombinationstest bis zu einer Verdünnung von 1:1280% nachweisen (Abb. 6)
- das Gemisch der HBsAg-positiven und anti-HIV-Antikörperhaltigen Probe weist eine höhere Extinktion als die entsprechenden Einzelproben auf (additiver Effekt) (Abb. 7)
- das Gemisch der 10 negativen Seren überschreitet mit seiner Extinktion weder den Grenzwert für den Nachweis einer HBsAg-reaktiven Probe ($\bar{X}$ Ext. NKS + 0,05 Extinktionseinheiten) noch den Grenzwert für den Nachweis einer anti-HIV-Antikörper-reaktiven Probe ($\bar{X}$ Ext NKS + 0,10 Extinktionseinheiten).

Die Erfindung bezieht sich demnach auf einen Festphasenimmunoassay zum Nachweis von verschiedenen Antigenen und/oder Antigenen und spezifischen Antikörpern in einem Ansatz. Darin werden Erreger entweder direkt als Antigen oder indirekt über induzierte Antikörper simultan erfaßt.

Abb. 1

Immunoassay-(ETA)-Varianten zum Nachweis von Antigen

1. Kompetitionstechnik mit immobilisiertem antigenspezifischen Antikörper und enzymmarkiertem Antigen
2. Kompetitionstechnik mit immobilisiertem Antigen und enzymmarkierten antigenspezifischen Antikörper
3. Zwei-Seiten-Bindungstechnik mit insolubilisiertem und enzymmarkiertem Antikörper

Abb. 2

Immunoassay-(ELISA)-Varianten zum Nachweis spezifischer Antikörper

1. Antiglobulin- oder Sandwichtechnik mit insolubilisiertem Antigen und enzymmarkiertem anti-human IgG (IgM) Antikörper
2. Kompetitionstechnik mit insolubilisiertem Antigen und enzymmarkiertem antigenspezifischen Antikörper
3. Capturetechnik mit insolubilisiertem anti-human IgG- (IgM)-Antikörper, unmarkiertem Antigen und enzymmarkiertem antigenspezifischen Antikörper
4. Brückenantikörpertechnik mit insolubilisiertem und enzymmarkiertem Antigen

Abb. 3

Kombinationsteste zum simultanen Nachweis von Antigen und spezifischen Antikörpern durch Reaktanten-Koimmobilisierung

1. Kombinationstest mit koimmobilisiertem Antigen und Antikörper und einem Gemisch aus enzymmarkiertem Antigen und Antikörper
2. Kombinationstest mit koimmobilisiertem Antigen und Antikörper und einem Gemisch enzymmarkierter Antikörper unterschiedlicher Spezifität

Abb. 4

Kombinationsteste zum simultanen Nachweis von Antigen und spezifischen Antikörpern durch Antigenstruktur tragende Antikörper

1. Kombinationstest mit 1-Antigenstruktur tragendem immobilisierten und enzymmarkierten Antikörper
2. Kombinationstest mit 2-Antigenstruktur tragendem immobilisierten und enzymmarkierten Antikörper

Abb. 5

Standardkurve für Hepatitis-B-Oberflächenantigen im sukzessiven Zwei-Seiten-Immunoassay mit insolubilierten und enzymmarkierten monoklonalen anti-HBs-Antikörpern ohne (○—○) (Assayprinzip 3, Abb. 2) und mit koimmobilisiertem und enzymmarkiertem HIV-1-Antigen (●—●) (Assayprinzip 1, Abb. 3)

Abb. 6

Titration eines anti-HIV antikörperhaltigen Serums in der Antiglobulin-(Sandwich)-technik (□—□) und in der Brückenantikörpertechnik mit koimmobilisierten und enzymmarkierten anti-HBs-Antikörpern (●—●) sowie ohne koimmobilisierte und enzymmarkierte Antikörper (○—○) sowie die Reaktion eines Gemischs von 10 anti-HIV antikörpernegativen Seren in den drei Testvarianten

Abb. 7

Extinktion eines Gemischs von 10 Normalseren (□), eines HBsAg positiven Serums (□), eines anti-HIV antikörperhaltigen Serums (□) sowie eines HBsAg positiven Serums, welches anti-HIV-Antikörper enthält (■).

Abbildung 1

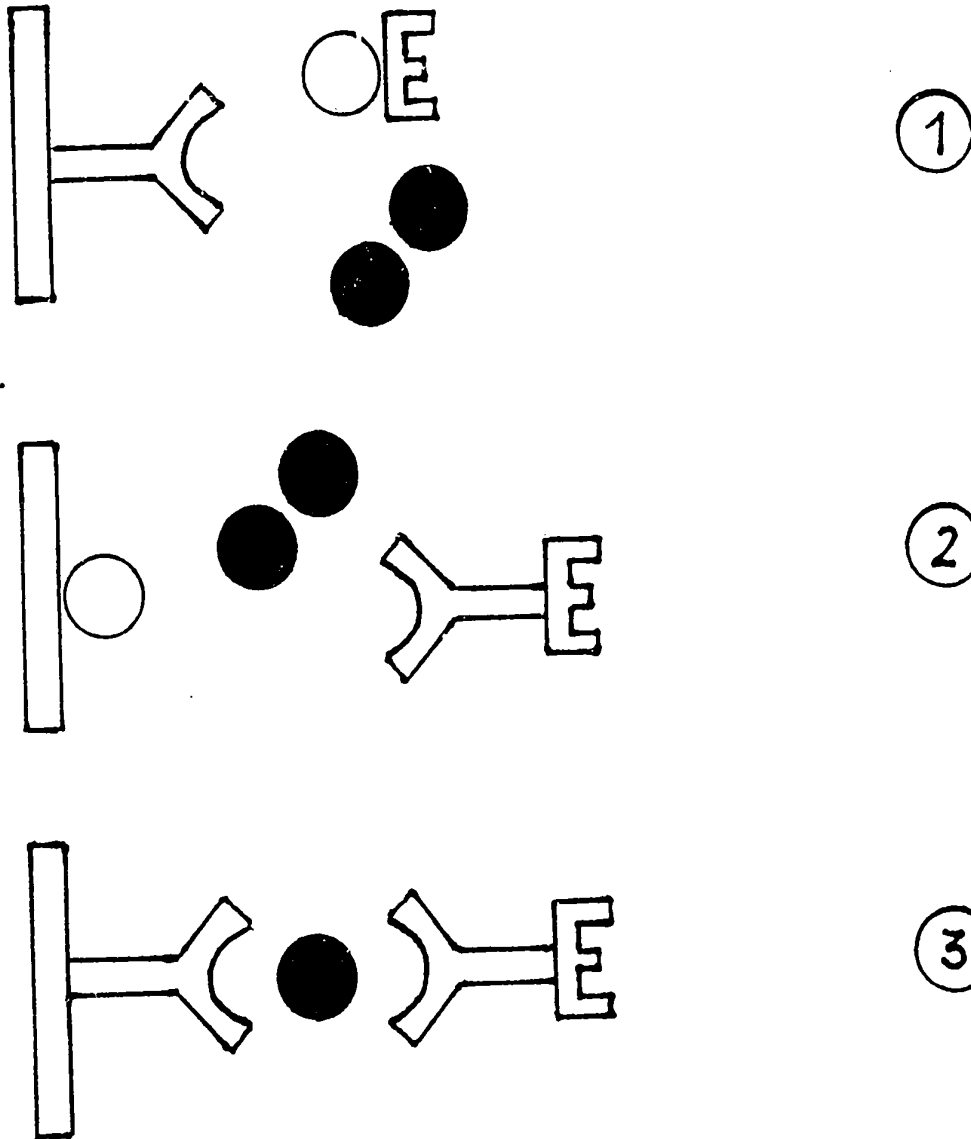
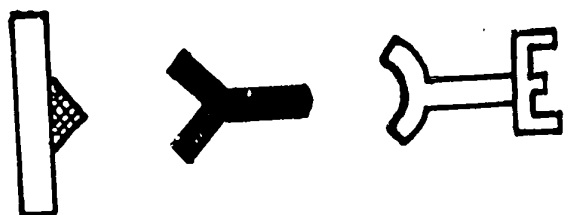
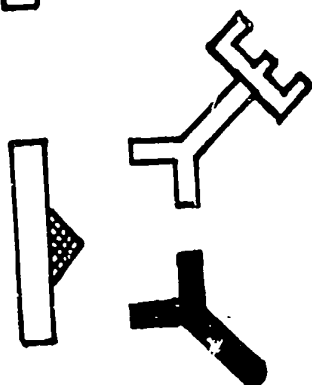


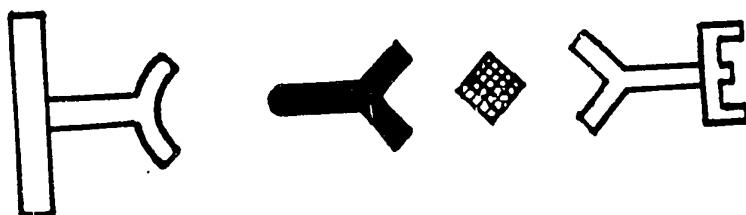
Abbildung 2



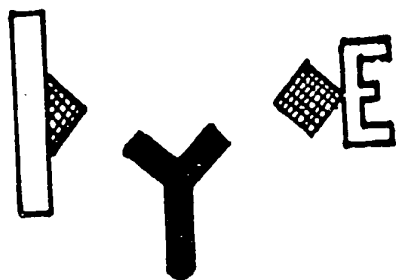
①



②

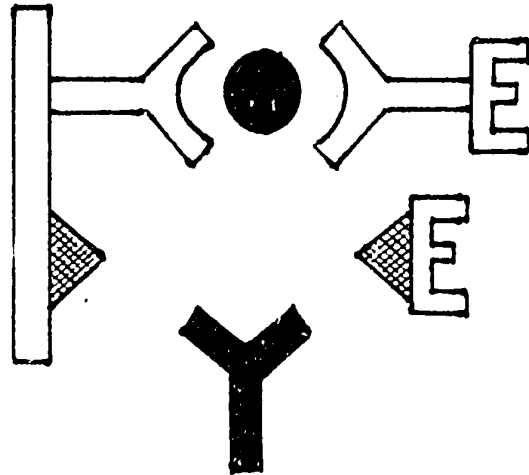


③

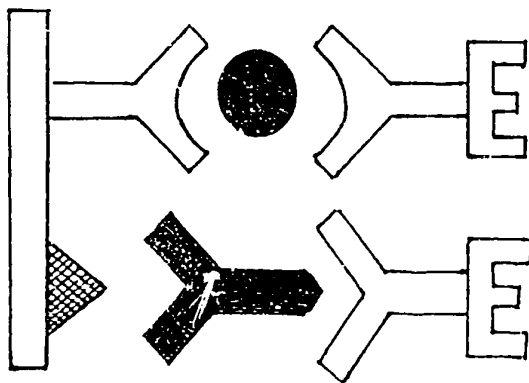


④

Abbildung 3

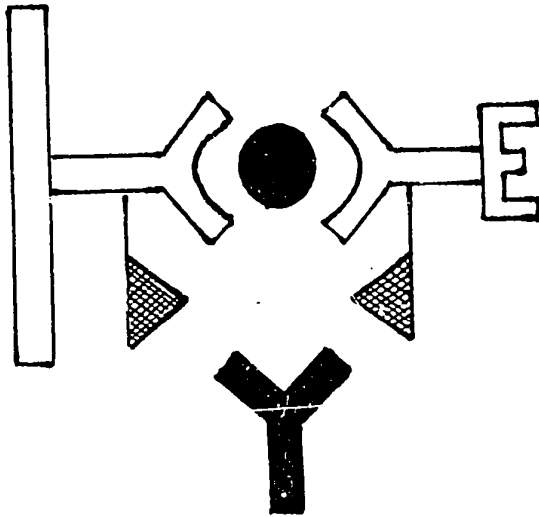


①

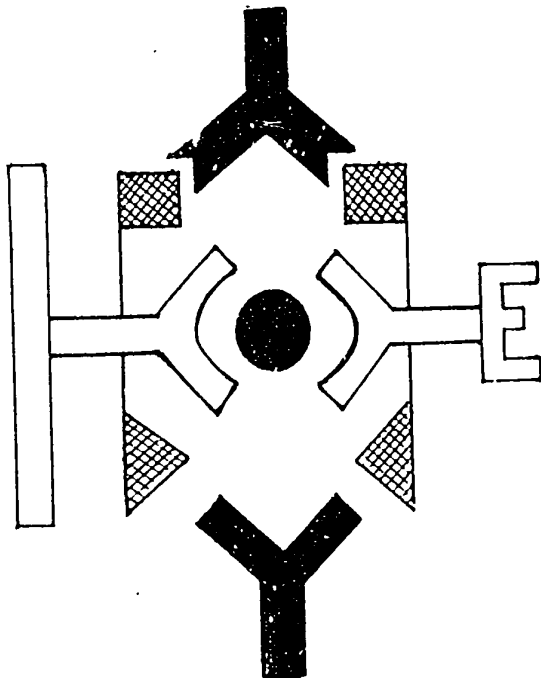


②

Abbildung 4



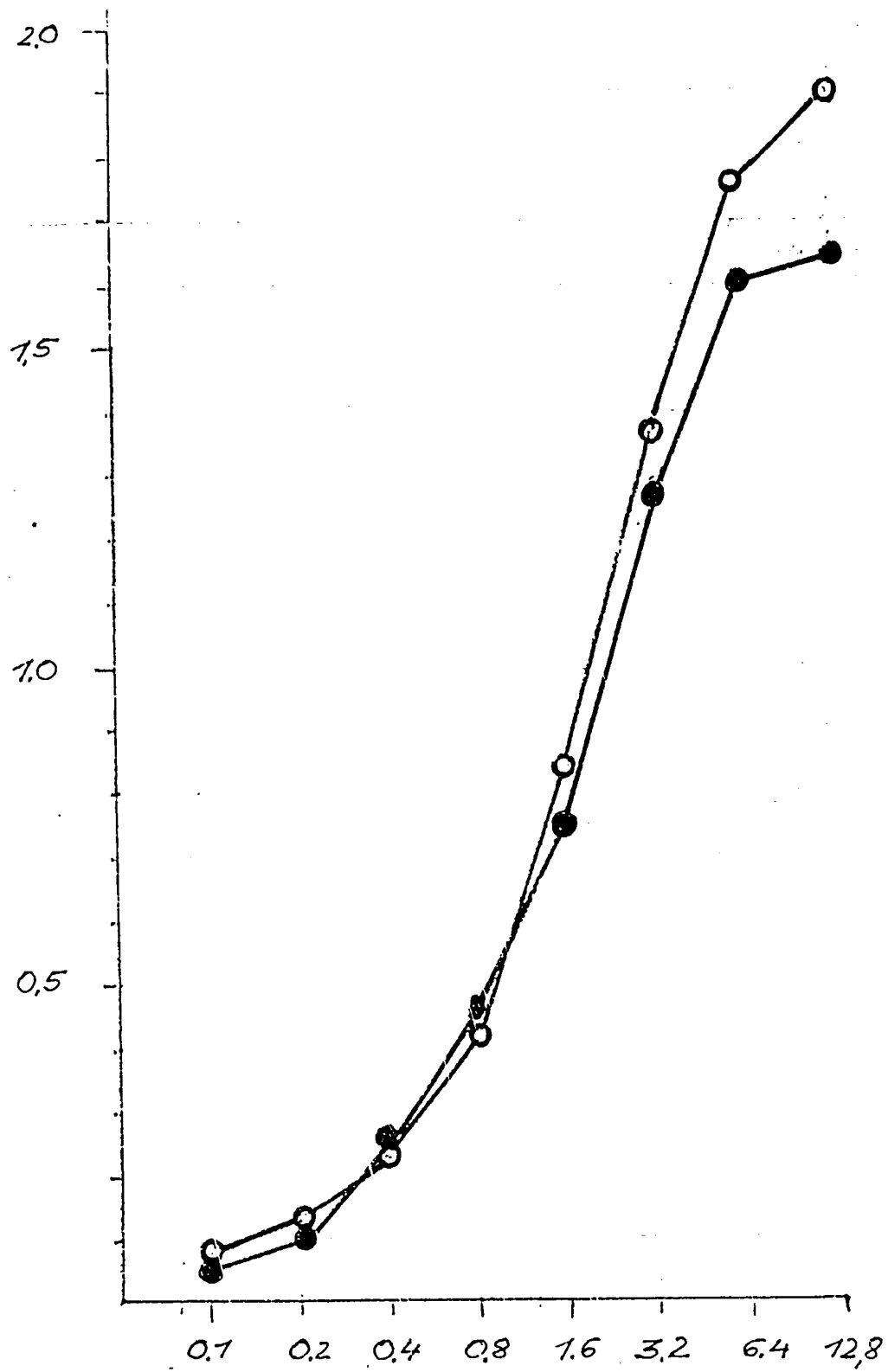
①



②

Abbildung 5

Extinktion 492 nm



HBsAg - Konzentration (µg/L)

Abbildung 6

Extinktion 492 nm

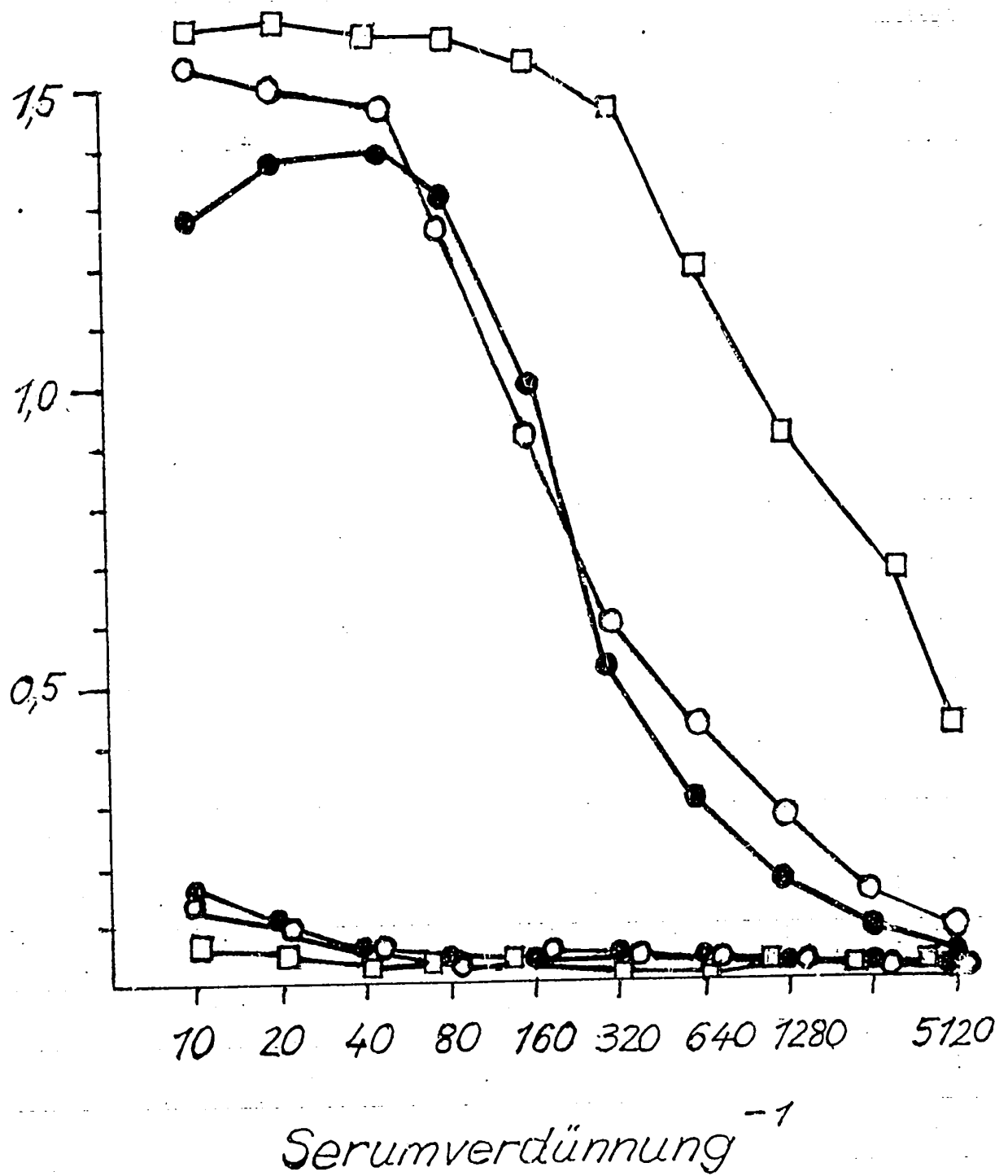


Abbildung 7

Extinktion 492 nm

