

*Entwicklung eines quantitativen Lateral-Flow-
Immunoassays zum Nachweis von Analyten
in geringsten Konzentrationen*

Von dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von
Dipl. Chem. Timo M. Klewitz
geboren am 01.09.1973, in Gifhorn

Hannover 2005

Hauptreferent: Prof. Dr. Thomas Scheper
Korreferent: PD Dr. Bernd Hitzmann
Tag der Promotion: 20.12.2004

,And the wheel,’ said the Captain, ‘what was this thingy? It sounds a terribly interesting project.’

‘Ah’, said the marketing girl, ‘well, we’re having a little difficulty there.’

‘Difficulty?’ exclaimed Ford. ‘Difficulty? What do you mean difficulty? It’s the single simplest machine in the Universe!’

The marketing girl soured him with a look.

‘All right, Mr. Wiseguy,’ she said, ‘you’re so clever, you tell us what colour it should be.’

Douglas Adams

The Hitchhiker’s guide to the Galaxy

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2000 bis März 2004 am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Thomas Scheper angefertigt. Ihm möchte ich herzlich für die Ermöglichung der Arbeit und für seine wertvolle Unterstützung danken.

Herrn PD Dr. Hitzmann danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Während meiner Promotion hatte ich das Glück in drei außergewöhnlichen Arbeitskreisen meine Versuche durchzuführen. Ohne diese hervorragende Zusammenarbeit hätte ich niemals so viel Freude an der vorliegenden Arbeit gehabt. Überall wurde ich herzlich aufgenommen und unterstützt; mein besonderer Dank gilt daher:

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Professor Dr. Thomas Scheper, insbesondere den Kollegen im DADDEL-Office. Henning Stückmann für seine interessierte Mitarbeit im Rahmen seiner Diplomarbeit, für das Korrekturlesen und die Hilfe bei der optischen Auswertung. Melanie Sossna und Kirsten Hantelmann für die hilfreichen Anmerkungen zu meinen hilflosen Schreibversuchen.

Bei der Sartorius AG in Göttingen Herrn Dr. Pflanz für die Ermöglichung dieser Kooperation, seiner fachlichen und menschlichen Unterstützung und seinem offenen Ohr für meine Fragen und Probleme. Ich werde die so wichtig gewordene Gesprächsrunde mit Herrn Dr. Beer, seine Unterstützung und seinen hervorragenden Cappuccino schmerzlich vermissen. Frau Ulrich und Frau Hickmann ließen sich nicht nur von mir mit Fragen löchern, sie haben auch durch Ihre Aufmerksamkeit und Ihr chemisches Gespür so manchen Zusammenhang erst erkennen lassen. Herrn Dr. Thom möchte ich für das Korrekturlesen und die anregenden Diskussionen danken.

Innerhalb des Instituts für angewandte Biotechnologie in den Tropen in Göttingen hat mich Herr Dr. Frank Gessler kompetent und geduldig in die Welt des *Clostridium botulinum* eingeführt. Die Gespräche und seine Erfahrungen haben mir sehr geholfen, seine hervorragenden Antikörper richtig einzusetzen. Im Labor wurde ich von Michaela Schmidt und von Katrin Hampe perfekt in die Arbeitstechniken eingeführt und durch ihre Erfahrungen und gute Laune motiviert.

Meiner Mutter möchte ich für ihre Liebe und Unterstützung während der letzten 30 Jahre danken.

Ohne die ermunternde und liebevolle Unterstützung von meiner Frau Christiane wäre die vorliegende Arbeit kaum in ihrem Umfang zustande gekommen. Sie musste während der Korrektur meiner Arbeit innerhalb von drei Monaten ein komplettes Chemiestudium nachholen.

Botulismus ist eine schwere, häufig tödliche Intoxikation bei Mensch und Tier, welche durch die Botulinum-Neurotoxine (BoNT) verursacht wird. Keine *In-vitro*-Methode konnte bisher die Nachweisempfindlichkeit der Maus sicher erreichen, da die Toxine mit einer intraperitonealen Mausdosis LD₅₀ (BoNT/D) von 0,4 ng/kg sehr hohe Ansprüche an die Testsensitivität stellen. Der Toxinnachweis in der Maus fordert nicht nur eine vergleichsweise hohe Zahl an Versuchstieren, sondern die eingesetzten Tiere werden auch einem nicht unerheblichen Leidensdruck ausgesetzt. Daher ist es das Anliegen dieser Arbeit, immunochromatographische Assays als alternative *In-vitro*-Methode näher zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit werden die Entwicklungen immunochromatographischer Assays im Flow-Through- und Lateral-Flow-Format beschrieben, die zum Nachweis des als Modelltoxin fungierenden Botulinum-Neurotoxin Typ D (BoNT/D) geeignet sind. Drei entwickelte Flow-Through-Assays nutzen einen separaten Probenvorbereitungsschritt, der die Bildung eines „mobilen Sandwichassays“ optimiert. Bei der Testdurchführung erfolgt die Aufkonzentrierung dieses „mobilen Sandwichassays“ mittels einer immunologischen Reaktion innerhalb einer Membranmatrix. Wird eine enzymatische Färbereaktion zum Nachweis der immobilisierten Sandwichkomplexe verwendet, gelingt ein Nachweis mit einer Testsensitivität von 50 pg/mL (Testzeit 6 h). Die Verwendung von goldkonjugierten Antikörpern führt bei zwei weiteren Flow-Through-Assays zu einer Abnahme der Testsensitivität auf 50 ng/mL (Testzeit 6h).

In einem weiteren Abschnitt wird die Entwicklung eines Lateral-Flow-Testformats mit einem separaten Probenvorbereitungsschritt beschrieben. Ähnlich wie im Falle der Flow-Through-Assays gewährleistet diese separate Probenvorbereitung die Bildung eines „mobilen Sandwich-Komplexes“, der während der Testdurchführung innerhalb einer Testlinie eines Lateral-Flow-Assays immobilisiert wird. Als Markierungsreagenz werden Goldpartikel verwendet. Mit diesem Testformat werden drei Lateral-Flow-Assays entwickelt, mittels derer ein BoNT/D-Nachweis mit einer Sensitivität von 50 pg/mL möglich ist, wenn die in dieser Arbeit etablierten Bedingungen zur optischen Auswertung verwendet werden. In einem Fall kann die unzureichende Sensitivität von 5 ng/mL nachträglich mittels einer Silberfixierung um den Faktor 100 auf eine Sensitivität von 50 pg/mL erhöht werden (Testzeit 5h). Zur Optimierung der Lateral-Flow-Assays werden verschiedene Einflüsse auf die Testsensitivitäten untersucht.

Schließlich werden in dem dritten Arbeitsteil dotierte Pferdekotproben untersucht und mit den Ergebnissen eines Toxinnachweises in der Maus verglichen. Hierbei ergibt sich, dass ein Lateral-Flow-Testformat bei einer Dreifachbestimmung gefolgt von einer optischen Auswertung eine Sensitivität von 50 pg/mL aufweist. Der mittlere relative Fehler der arithmetisch gemittelten Ergebnisse der Testlinienintensitäten liegt bei ca. 7%.

STICHWORTE

Immunochromatographie; Lateral-Flow-Assay, Botulinum Neurotoxin Typ D, Immunoassay

Botulism is a heavy, frequently deadly intoxication of humans and animals and is caused by the botulinum neurotoxins (BoNT). So far no *in-vitro*-method is able to reach the detection limit of the mouse bioassay. Having a mouse intraperitoneal LD₅₀ (BoNT/D) of 0.4 ng/kg the toxins have high requirements on the assay detection limit. However, although the mouse bioassay provides high sensitivities it also demands a lot of laboratory animals and the animals are also exposed to arches and pains. Therefore, a simple and sensitive *in-vitro*-assay which may be readily adapted for routine laboratory use would be desirable.

This study describes the development of flow-through- and lateral-flow-immunochromatographic assays for the detection of botulinum neurotoxin type D (BoNT/D). Three investigated flow-through-assays use an effective sample pre-treatment to optimize the formation of a “mobile sandwich complex“. By means of an immunological reaction this sandwich complex is immobilized -and therefore concentrated- within a membrane matrix during the test procedure. When an enzymatic staining reaction is used for the detection of the immobilized sandwich complexes a test sensitivity of 50 pg/mL can be detected (test time 6 h). Two other flow-through assays demonstrate that the use of gold conjugated antibodies cause decreasing test sensitivities. Thus only toxin concentrations down to 50 ng/mL can be detected, with a test time of 6 h.

Another approach describes the results of lateral-flow-assays with an optimized and effective sample pre-treatment. Similarly as in the case of the flow-through-assays this separately accomplished sample pre-treatment secures the formation of a „mobile sandwich complex, which is immobilized during the test procedure within the test line of a lateral-flow-assay. Colloidal gold particles are used as a labeling reagent. Using the established sample treatment three lateral-flow assays can detect BoNT/D with a sensitivity of 50 pg/mL, when a three-determination analysis in combination with an image analysing system is carried out. In one assay the insufficient sensitivity of 5 ng/mL is further increased by means of a later silver enhancing step. Using this silver enhancement step the sensitivity of the test signal is increased by 100 times resulting in a overall test sensitivity of 50 pg/mL, with a total test time of less than 5 h. During the development of the lateral-flow-assays different parameters were investigated to optimize the respective assay.

Finally, spiked hoarse faeces samples were investigated with two of the described lateral-flow assays. These results were compared with the test results of a mouse bioassay. One lateral-flow-assay demonstrated a sensitivity of 50 pg/mL, using a three-determination analysis in combination with an image analysing system. The mean relative error of the arithmetic mean of the test line intensity amount to circa 7%

KEYWORDS

Immunochromatography, lateral flow assay, Botulinum neurotoxin type D, immunoassay

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
2	<i>CLOSTRIDIUM-BOTULINUM</i> UND BOTULINUM-NEUROTOXINE	3
2.1	Grundlagen	3
2.2	Diagnose und Nachweismethoden der Botulinum-Neurotoxine	7
2.2.1	Diagnose von Botulismus	7
2.2.2	Der Toxinnachweis in der Maus	8
2.2.3	Der Endopeptidase-Assay	10
2.2.4	Immunologische Nachweismethoden	10
2.2.5	Der „Immunochromatographische Säulentest“	11
2.2.6	Der „Magnetic-Beads-Assay“	13
2.2.7	Biowarefare Agent Detection Devices (BADD) Test	16
2.3	Patentsituation von Lateral-Flow-Tests und für BoNT	20
2.4	Zusammenfassung	21
3	IMMUNOCHROMATOGRAPHISCHE ASSAYS	23
3.1	Der Lateral-Flow-Assay	24
3.1.1	Kompetitive und nicht-kompetitive LFD	24
3.1.2	Aufbau und Prinzipien	26
3.1.3	Typische Entwicklungsprobleme	29
3.1.4	Erstellung eines exemplarischen Anforderungsprofils Der Schwangerschaftstest	31
3.1.5	Entwicklung eines „klassischen“ BoNT/D-LFD-Assays	34
3.2	Der Flow-Through-Assay (FTA)	39
3.2.1	Entwicklung des BoNT/D-Flow-Through-Assays 1	40
3.2.2	Entwicklung des BoNT/D-Flow-Through-Assays 2	43
3.2.3	Entwicklung des BoNT/D-Flow-Through-Assays 3	45
3.3	Zusammenfassung	47
4	ERGEBNISSE DER LATERAL-FLOW-ASSAYS	49
4.1	Lateral-Flow-Assay 1	51
4.2	Lateral-Flow-Assay 2	60
4.3	Lateral-Flow-Assay 3	75
4.4	Lateral-Flow-Assay 4	86

4.5	Zusammenfassung	89
4.6	Ergebnisse dotierter Realproben (Kotproben)	91
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	98
6	LITERATUR	103
7	ANHANG	128
7.1	Arbeitsvorschriften der immunologischen Referenzmethoden	128
7.1.1	Immuno-chromatographischer Säulentest	128
7.1.2	Dynabead-Test	128
7.2	Arbeitsvorschriften der entwickelten Flow-Through-Tests	130
7.2.1	Flow-Through-Test 1	130
7.2.2	Flow-Through-Test 2	131
7.2.3	Flow-Through-Test 3	132
7.3	Ergebnisse des entwickelten Schwangerschaftstests	133
7.3.1	Arbeitsvorschrift zur Herstellung von Schwangerschaftstests	133
7.3.2	Optischen Auswertung von Lateral-Flow-Assays	135
7.3.3	Arbeitsvorschrift zur optischen Auswertung von LFD	138
7.3.4	Silberfixierung als Methode der Signalverstärkung	138
7.3.5	Zusammenfassung	142
7.4	Arbeitsvorschriften der entwickelten BoNT/D-Lateral-Flow-Assays	143
7.4.1	"Klassischer" Lateral-Flow-Assay (ohne Probenvorbereitung)	143
7.4.2	Lateral-Flow-Assay 1 (mit separater Probenvorbereitung)	143
7.4.3	Lateral-Flow-Assay 2 (mit separater Probenvorbereitung)	145
7.4.4	Lateral-Flow-Assay 3 (mit separater Probenvorbereitung)	146
7.4.5	Lateral-Flow-Assay 4 (mit separater Probenvorbereitung)	146
7.5	Verwendete Chemikalien	147
7.6	Verwendete Membranen	150
7.7	Verwendete Lösungen	151
7.8	Abkürzungen	154
7.9	Optimas 6.5 [®] Quellcode	155

LEBENS LAUF

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Im frühen 19. Jahrhundert traten die ersten dokumentierten Botulismusfälle auf [Kerner, 1820]. Ursache schien der Verzehr von giftigen Würsten zu sein, bei denen auffallend war, dass sie zuvor längere Zeit unter Luftausschluss aufbewahrt wurden. Obwohl es sich um geräucherte Würste handelte, gingen die Wurstwaren anscheinend in einen „*gewissen Grad der Fäulnis*“ [Zitat: Gruesser, 1986] über. Zur Lösung dieses Problems begann Justinus Kerner 1817 seine innovative und vorbildliche Forschung in Bezug auf die Diagnose, Vorhersage und Behandlung von Botulismus. Er erwog während seiner Arbeiten die Möglichkeit, das Botulinum-Toxin – bzw. das Wurstgift, wie er es nannte - als Therapeutikum zu nutzen [Gruesser, 1986]. Erst nach 150 Jahren wurde seine Grundlagenforschung wieder aufgenommen und seit 1970 ist das Toxin wieder Gegenstand medizinischer Untersuchungen. Wie wir heute wissen, sind die Botulinum-Neurotoxine (BoNT) die wirkungsvollsten, natürlich vorkommenden Toxine [Lamanna, 1959].

In Anbetracht des Wirkungsgrades der botulinen Neurotoxine werden äußerst hohe Anforderungen an die Sensitivität und Spezifität der Nachweismethoden gestellt. So ist der einzige validierte und allgemein anerkannte Standardnachweis der Toxinnachweis in der Maus [Schantz und Kautter, 1978]. Diese Methode ist äußerst sensitiv - die letale, intraperitoneale Dosis liegt im pg/mL-Bereich [Smith und Sugiyama, 1988] -, aber auch teuer und aufgrund von langen Testzeiten für einen klinischen Einsatz nur bedingt geeignet. Ein schnellerer und einfacherer quantitativer Nachweis würde daher im Notfall eine erhebliche Erleichterung bedeuten. Auch wären so präventive Maßnahmen mit einem geringeren zeitlichen und personellen Aufwand möglich.

Ein Anliegen dieser Arbeit ist es Ansätze zu finden, den Toxinnachweis in der Maus durch eine *In-vitro*-Methode zu ersetzen. In der Literatur sind bis dato mehrere sensitive Nachweismethoden beschrieben worden. Zu den bekanntesten Methoden gehören beispielsweise der Endopeptidase-Assay [Ekong et al., 1999; Wictome et al., 1999b], der Radioimmunoassay (RIA) [Ashton et al., 1985], der PHA (**p**assive **h**aemagglutination **a**ssay) [Johnson et al., 1966] und der ELISA (**e**nzyme-**l**inked **i**mmunosorbent **a**ssay) [Notermans et al., 1978]. Diese Nachweismethoden besitzen zwar teilweise die erforderliche Sensitivität, sind jedoch zeitintensiv bzw. sehr komplex in ihrer Durchführung. Keine der angeführten Nachweismethoden war bisher in der Lage, den Toxinnachweis in der Maus zu ersetzen. Die für einen Botulinum-Neurotoxinnachweis essentiellen Anforderungen an die Spezifität und Kostengüns-

tigkeit entsprechen den positiven Eigenschaften von immunochromatografischen Querfließschnelltests (Lateral-Flow- oder Dipstick-Tests). Die einfache Handhabung, Kostengünstigkeit und die reproduzierbaren und schnellen Ergebnisse tragen entscheidend zu der erfolgreichen Verbreitung der Lateral-Flow-Assays bei. Abhängig von der Applikation sind momentan mittels eines Lateral-Flow-Sandwichassays Analytkonzentrationen im ng/mL-Bereich detektierbar [Birnbaum et al., 1992; Horton et al., 1991; Van Amerongen et al., 1994; Müller-Bardorff et al., 1999]. Diese Sensitivität ist für einen BoNT/D-Nachweis nicht hinreichend, um den Toxinnachweis in der Maus mit einer Sensitivität von 50 pg/mL als Standardnachweis zu ersetzen. Hierfür ist eine Nachweisgrenze in einem Bereich von ca. 50-500 pg/mL notwendig. Die Reproduzierbarkeit der größtenteils qualitativen bzw. semi-quantitativen Lateral-Flow-Testformate ist für viele klinische Anwendungen ausreichend. Dennoch, eine signifikante Einschränkung dieser Tests ist, dass die Ergebnisse nur qualitativ oder semiquantitativ sind. Die Ziele und Aufgabengebiete der vorliegenden Arbeit lassen sich mit diesem Hintergrund in drei Punkte zusammenfassen:

Unter Berücksichtigung der Anforderungen des Analyten soll ein Lateral-Flow-Assay zum Nachweis von BoNT/D entwickelt werden. Hierfür ist es zunächst notwendig ein Anforderungsprofil zu erarbeiten, um dann diese Voraussetzungen mittels der verfügbaren Antikörper und mittels verschiedener Formatansätze umzusetzen. Innerhalb der vorliegenden Arbeit werden alle Arbeiten mit dem als Modelltoxin fungierenden Botulinum-Neurotoxin Typ D durchgeführt.

Der zu entwickelnde Lateral-Flow-Test soll als weitere Anforderung zusätzlich eine Möglichkeit der Quantifizierung besitzen. Dazu ist ein optisches Auswertungssystem zur Quantifizierung der Testergebnisse zu etablieren.

Um den Ansprüchen an die Sensitivität und Quantifizierbarkeit der Ergebnisse gerecht zu werden, müssen im Falle von unzulänglichen Sensitivitäten Möglichkeiten der Signalverstärkung betrachtet werden.

2 *CLOSTRIDIUM-BOTULINUM* UND BOTULINUM-NEUROTOXINE

Um die Anforderungen des Analyten BoNT/D an ein Nachweisverfahren besser verstehen zu können, werden in diesem Kapitel zunächst die Eigenschaften des *C. botulinum* und der Botulinum-Neurotoxine dargestellt. Im Abschnitt „Diagnose und Nachweismethoden der Botulinum-Neurotoxine“ erfolgt anhand dieser Grundlagen die Diskussion von allgemein anerkannten Nachweismethoden. Die in dieser Arbeit verwendeten und bereits beim Institut für angewandte Biotechnologie in den Tropen als immunologische *In-vitro*-Nachweismethoden etablierten Verfahren werden in den Kapiteln 2.2.5 und 2.2.6 dargestellt. Der „Immunochromatische Säulentest“ und der „Magnetic-Beads-Assay“ wurden u.a. dazu genutzt, die Toxinkonzentration der verwendeten Stammlösung über einen Lagerungszeitraum von 2 Jahren zu verfolgen. In Kapitel 2.2.7 werden die Ergebnisse und Eigenschaften eines in der vorliegenden Arbeit verwendeten kommerziellen Lateral-Flow-Tests dargestellt. Dieser Test bietet die Möglichkeit, typenspezifisch BoNT ab einer bestimmten Schwellenkonzentration qualitativ nachzuweisen. Patente sind eine der wenigen Literaturquellen für die Entwicklung eines Lateral-Flow-Assays, die interessante Testformate und Lösungsansätze für bestimmte Entwicklungsprobleme beschreiben. In Kapitel 2.3 ist eine Auswahl von Patenten aufgeführt, die teilweise Entwicklungsansätze für die vorliegende Arbeit bieten. Abschließend werden die wichtigsten Ergebnisse in Kapitel 2.4 zusammengefasst und ein Anforderungsprofil des Analyten BoNT an ein Nachweisverfahren diskutiert.

2.1 Grundlagen

Wie alle Clostridien ist das *Clostridium-botulinum* ein anaerobes, gram-positives Bakterium, das widerstandsfähige Sporen bildet [Cato et al., 1986]. Der taxonomische Nenner des *C. botulinum* ist die Produktion des Botulinum-Neurotoxins (BoNT). Basierend auf den serologischen Eigenschaften des jeweils produzierten Neurotoxins, können zurzeit sieben verschiedene Typen des *C. botulinum* unterschieden werden. Diese werden üblicherweise mit den Buchstaben A – G gekennzeichnet. Generell sind die *C. botulinum* Stämme A, B, E und F für den Menschen pathogen, wohingegen die Stämme C und D für Tiere pathogen sind. *C. botulinum* Typ G wurde bisher mit keinem Erkrankungsfall in Verbindung gebracht. Aufgrund der signifikanten Unterschiede zwischen den Stämmen in Bezug auf den Metabolismus und den phänotypischen sowie genotypischen Eigenschaften wurden die Stämme in vier Gruppen (I – IV) eingeteilt¹. Gruppe I umfasst die proteolytischen Stämme der *C. botulinum* Typen A, B und F, während Gruppe II aus den aproteolytischen Stämmen der *C. botulinum*

¹ Lee und Riemann, 1970b; Wu et al., 1972; Johnson und Francies, 1975; Smith und Sugiyama, 1988

Typen B, E und F besteht. Gruppe III enthält alle Stämme der *C. botulinum* Typen C und D. Die Gruppe IV des *C. botulinum* umfasst die Toxintyp G produzierenden Stämme [Gimenez und Ciccarelli, 1970]. Als Speziesbezeichnung der Organismen der IV. Gruppe wurde aufgrund von deutlichen phänotypischen und genotypischen Ähnlichkeiten der Name *Clostridium-argentinense* gebräuchlich [Suen et al., 1988]. Außer *C. botulinum* sind auch einige Stämme der nahen Verwandten *Clostridium-butyricum* und *Clostridium-baratii* dafür bekannt, in Ausnahmefällen das Botulinum-Neurotoxin Typ E bzw. Typ F zu produzieren.

Seit dem ersten dokumentierten Auftreten von Botulismus im frühen neunzehnten Jahrhundert hat das *Clostridium-botulinum* besonders Nahrungsmittelhersteller in der Konservenfabrikation und Räucherfischindustrie in Angst und Schrecken versetzt. Außerdem zählen die CDC [The Centers for Disease Control and Prevention, 2003] das *Clostridium-botulinum* zu den 6 Organismen, die das größte Potenzial bei einem terroristischen Akt besitzen. Auch die Bundesregierung hat die BoNT neben 8 weiteren Toxinen als potentielle Kampfstoffe eingestuft [Bundesanzeiger, 1995]. Das Gefährdungspotenzial der Neurotoxine steht schon lange im Interesse der Öffentlichkeit², zumal zwischen 1990 und 1995 der terroristische Einsatz bereits von der japanischen Sekte Aum Shinrikyō in Japan³ glücklicherweise erfolglos versucht wurde.

Struktur des Botulinum-Neurotoxins (BoNT)

Botulinum-Neurotoxine werden mit einer einkettigen Polypeptidstruktur gebildet und haben eine Größe von ca. 150 kDa. Diese einkettigen Polypeptide werden mittels Proteasen gespalten, um eine biologisch aktive zweikettige Form zu erhalten. Die biologisch aktive Form (Abb. 2-1) besteht aus der Schweren (S-Kette, 100 kDa) und der Leichten Kette (L-Kette, 50 kDa). Die beiden Ketten sind über mindestens eine Disulfidbindung verbunden [DasGupta und Sugiyama, 1979; Yokosava et al., 1986; Oguma et al., 1995].

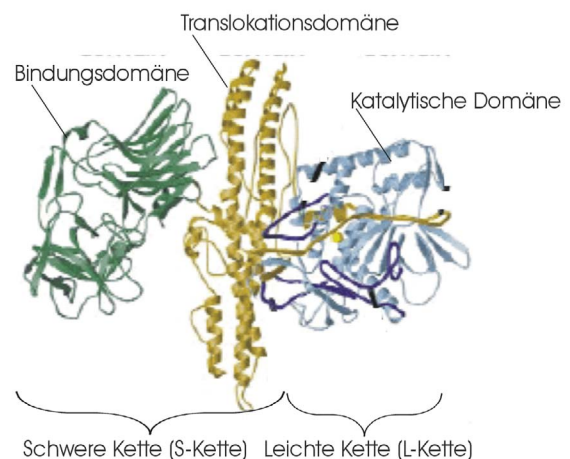


Abb. 2-1: Kristallstruktur des BoNT/A;
Quelle: PDB Funding, 2004.

² Tucker, 2000; Greenfield et al., 2002

Die zur Gruppe I gehörenden proteolytischen Organismen produzieren die für die Bildung der zweikettigen Toxinform benötigten Proteasen selbst. Im Gegensatz dazu benötigen die aproteolytischen Stämme der Gruppe II externe proteolytische Aktivitäten, wie beispielsweise durch Trypsin im Magen-Darm-Trakt. Botulinum-Neurotoxine sind Metalloendopeptidasen mit einem Zink-Atom, das mit der Leichten Kette assoziiert ist. Die Leichte Kette besitzt eine Proteaseaktivität [Oguma et al., 1997]. In Kulturmedien und in Nahrungsmitteln treten die Toxinmoleküle mit einer Gruppe von Neurotoxin-assoziierten-Proteinen (NAP`s) auf, d.h. in größeren Komplexen. Das einkettige Polypeptid wird hierbei von verschiedenen atoxischen Begleitsubstanzen mit unterschiedlichsten Molekulargewichten komplexiert [Kitamura et al., 1968; Sugii und Sakaguchi, 1975]. Dieser Proteinkomplex besteht hauptsächlich aus Non-Toxic Non Haemagglutinin (NTNH) und Haemagglutinin (HA) mit verschiedensten Zusammensetzungen der Aminosäuren und Molekülmassen [Oguma et al., 1997]. Abhängig vom *C. botulinum* Typ werden unterschiedlich aufgebaute Proteinkomplexe gebildet.

Wirkungsmechanismus

Nach der oralen Aufnahme des Toxins ist es die Rolle des NAP-Toxin-Komplexes, das Neurotoxin vor zu sauren Milieubedingungen und vor Proteasen, wie sie z. B. in Nahrungsmitteln und im Gastrointestinaltrakt vorgefunden werden können [Oguma et al., 1995], zu schützen. Die nicht sauren Bedingungen im Dünndarm bewirken, dass das Toxinmolekül aus dem NTNHA-Komplex dissoziiert und die atoxischen Komplexanteile von dem lymphatischen System absorbiert werden [Sugii et al., 1977]. Als Ergebnis der Aktivität der proteolytischen Enzyme wird das einkettige Toxinmolekül in die aktive zweikettige Form überführt. Der genaue Eindringungsmechanismus des Toxins in die Lymphvesikel konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Im Dünndarm erfolgt aufgrund der HA-Komponente des NAP-Toxin-Komplexes die Adhäsion des einkettigen Toxins durch das Darmzellgewebe, was zu einer effizienten Absorption des Toxins führt [Oguma et al., 1995; Fujinaga et al., 1997 + 2000]. Un-sialylierte Oligosaccharide an der Oberfläche des Dünndarms scheinen hierbei die Rezeptoren für den NAP-Neurotoxin Typ A-Komplex zu sein, nicht jedoch für das Toxin selbst [Inoue et al., 2001].

Der Wirkungsmechanismus des Botulinum-Neurotoxins auf eine Nervenzelle in Abb. 2-2 kann in vier Schritte eingeteilt werden: Bindung an die Zellmembran, Internalisierung, Membrantranslokalisierung und im letzten Schritt die Spaltung des Zielmoleküls im Zytoplasma [Montecucco und Schiavo, 1994]. Im ersten Schritt bindet das C-Terminal der Schwere Kette des BoNT mittels hoch affiner typspezifischer Rezeptoren an die präsynapti-

³ Arnon et al., 2001; Förger, 2002

sche Membran [Nishiki et al., 1996]. Nach seiner Bindung an die Membran durch die Schwere Kette wird das BoNT aufgrund eines energetisch gesteuerten Prozesses in die Nervenzelle eingeschleust [Black und Dolly, 1986]. Nun kann das BoNT nicht mehr durch ein spezifisches Antitoxin neutralisiert werden. Innerhalb der Nervenzelle wird die Leichte Kette des BoNT durch Membrantranslokalisierung in das Zytoplasma freigesetzt.

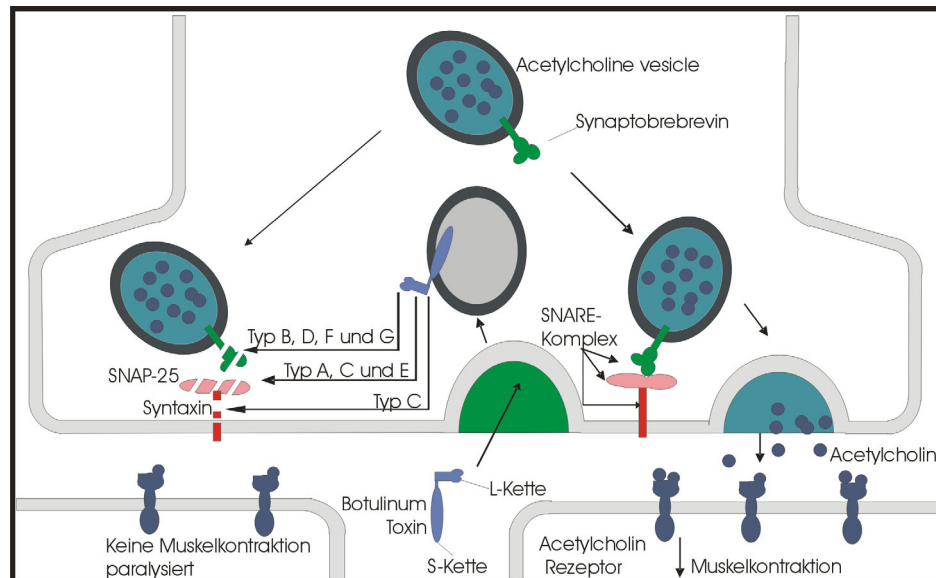


Abb. 2-2: Wirkungsmechanismus der BoNT nach Moore (1995).

Die Leichte Kette reagiert nun aufgrund ihrer Zink-Endopeptidaseaktivität und spaltet spezifisch einzelne an der Exozytose beteiligte Proteine [Montecucco und Schiavo, 1993]. Es werden lösliche NSF-Anlagerungsproteinrezeptoren (*N*-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) wie beispielsweise VAMP/Synaprobrevin (vesicle-associated membrane protein)⁴, SNAP-25 (synaptosomal associated protein, 25 kDa)⁵ und Syntaxin⁶ gespalten, die alle eine wichtige Rolle bei der Neurotransmitterfreisetzung spielen. Mittels dieser Spaltung werden die neuronalen Impulse blockiert und damit der Muskel gelähmt. Aufgrund dieser Fähigkeit des Toxins wird es in der Medizin auch zur Behandlung von Schielen⁷, Migräne⁸, Spastiken⁹ und verschiedenartigen Dystonien¹⁰ verwendet.

⁴ Schiavo et al., 1992

⁵ Blasi et al., 1993; Schiavo et al., 1993

⁶ Schiavo et al., 1995

⁷ Scott, 2002

⁸ Brin et al., 2002

⁹ Moore, 2002

¹⁰ Jankovic, und Brin, 1997; Schantz und Johnson, 1992

2.2 Diagnose und Nachweismethoden der Botulinum-Neurotoxine

Nachdem der Wirkungsmechanismus der BoNT näher betrachtet wurde, bietet es sich für die Entwicklung eines *In-vitro*-Assays an, auf die Diagnose und auf bereits bestehende Nachweismethoden einzugehen. Der validierte und allgemein anerkannte Standardnachweis ist der Toxinnachweis in der Maus. Dieser wird auch in der vorliegenden Arbeit zur Toxizitätsbestimmung der genutzten BoNT/D Stammlösung und von dotierten Realproben verwendet. Weitere in diesem Abschnitt beschriebenen Testmethoden können in verschiedene Verfahren, wie beispielsweise den Endopeptidase-Assay und in immunologische Nachweismethoden unterteilt werden. Zwei weitere *In-vitro*-Nachweisverfahren – der „immunochromatographische Säulentest“ und der „Magnetic-Beads-Assay“ - werden dazu genutzt, den Toxingehalt der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stammlösung über einen Lagerungszeitraum von 2 Jahren zu beobachten. Auch verwenden diese immunologischen Assays die in dieser Arbeit eingesetzten Antikörper, so dass erste Kenntnisse über die Eigenschaften dieser Antikörper gewonnen werden können.

2.2.1 Diagnose von Botulismus

Die Diagnose von Botulismus stellt im Ernstfall eine nicht zu unterschätzende Schwierigkeit dar. Zwar unterscheidet sich Botulismus von anderen Paralyse in seinem typischen Krankheitsbild, dennoch ist dieses schwer zu diagnostizieren. So werden die meisten niedergelassenen Ärzte nicht in der Lage sein, auf Anhieb die richtige Diagnose zu stellen. Sogar Fachärzte tun sich schwer und verwechseln durchaus die Botulismus-Intoxikation mit anderen ähnlichen neurologischen Krankheitsbildern.

Die klinische Diagnose von Botulismus wird in spezialisierten Laboratorien durchgeführt und auf das Ergebnis muss häufig Tage gewartet werden. Routineuntersuchungen ergeben gewöhnlich keinerlei Hinweise auf Botulismus. So basiert die Diagnose primär darauf, dass vor der Vergiftung nachweislich verdächtige Nahrungsmittel verzehrt wurden oder darauf, dass das BoNT bei dem Patienten und in verdächtigen Nahrungsmitteln nachgewiesen wurde [Kautter und Solomon, 1977; Centers for Disease Control and Prevention, 1988; Nordic Committee on Food Analysis, 1991a; Nordic Committee on Food Analysis, 1991b]. Zusätzlich kann die Simulations-Elektromyographie (EMG) dazu genutzt werden, Botulismus von ähnlichen neurologischen Erkrankungen abzugrenzen [Centers for Disease Control and Prevention, 1988]. Die Komplexität der Diagnose ergibt sich dadurch, dass sensitive und spezifische *In-vitro*-Methoden zum Nachweis von Botulinum-Neurotoxinen noch nicht ausreichend validiert wurden. Auch ist die Kultivierungsmethode als analytisches Mittel kompliziert, da kein ideales Wachstumsmedium sowohl für proteolytische als auch gleichzeitig für

aproteolytische *C. botulinum* Stämme existiert. Der Nachweis des Organismus wird darüber hinaus im Falle von Nahrungsmitteln und ökologischen Proben durch atoxische, dem *Clostridium-botulinum* aber sehr ähnlichen Stämmen, erschwert [Broda et al., 1998].

2.2.2 *Der Toxinnachweis in der Maus*

Der Nachweis in der Maus ist in der Bundesrepublik Deutschland als Nachweismethode von Botulinum-Neurotoxinen in Lebensmitteln gesetzlich vorgeschrieben [§ 35 LMBG]. Auch ist er zur Qualifizierung von BoNT-Antitoxin und –Impfstoff für Tiere bindend [DIN-Norm 10102; Deutsches Arzneibuch, 1991]. In der einschlägigen Literatur zur Anaerobierdiagnostik wird die Durchführung dieses Tierversuches beschrieben [Dowell und Hawkins, 1974; Holdemann et al., 1977]. Neben dem Toxinnachweis in klinischen Proben und in Nahrungsmitteln kann dieser Assay auch dazu genutzt werden, um in Kulturen eine Toxizitätsprüfung und Typisierung des *C. botulinum* Stammes durchzuführen [Kautter und Solomon, 1977].

Grundlagen

Das in einer Probe enthaltene Toxin wird bei diesem Tierversuch in einem Gelantine-Phosphatpuffer gelöst und Mäusen intraperitoneal gespritzt. Eine Trypsin-Aktivierung des Eluats ist erforderlich, wenn die Stämme der Gruppe II des *C. botulinum* betroffen sind [Duff et al., 1956], da diese Stämme nicht die erforderliche proteolytische Aktivität besitzen.

Bei einer toxischen Probe zeigen die Mäuse typische Anzeichen von Botulismus, wie beispielsweise Lähmungserscheinungen, mühsames Atmen und schließlich eine periphere Atemlähmung, die durch eine Ausbildung einer Wespentaille angekündigt wird. Diese Symptome treten normalerweise bis zu vier Tagen nach der Injektion auf. Durch unterschiedliche Toxizitäten variiert die Zeit bis zum Erhalt eines positiven Ergebnisses. So sind beispielsweise die Toxintypen A und B potenter als der Toxintyp E. Der Toxintyp kann mittels Sero-neutralisation der Probe mit dem spezifischen Antitoxin ermittelt werden [Centers for Disease Control, 1987]. Bei diesem Test überleben die Mäuse, denen das neutralisierende Antitoxin gespritzt wurde, während die anderen typische Anzeichen von Botulismus aufzeigen. Jedoch wurde in der Literatur das Phänomen von falsch-positiven Ergebnissen bekannt, die durch das Vorherrschen einer hohen *C. botulinum* Sporenkonzentration [Mitamura et al., 1982] oder durch die Anwesenheit von gram-negativen Bakterien [Solberg et al., 1985] begründet werden konnten.

Ein anderer Ansatz des Toxinnachweises in der Maus verwendet eine lokale Muskelschwächung [Sesardic et al., 1996]. Dieser nicht letale Toxinnachweis in der Maus ist dem letalen Ansatz in Bezug auf die Sensitivität und Spezifität ebenbürtig, es entfallen jedoch bei den Mäusen die deutlichen Anzeichen einer Vergiftung oder von einer lokalen Lähmung der Hintergliedmaßen [Sesardic et al., 1996]. Ethische Gesichtspunkte und weitere Erkenntnisse über die verschiedenen Toxintypen trugen zur Entwicklung alternativer Nachweismethoden bei.

Durchführung

Der hier durchgeführte Toxinnachweis in der Maus entspricht dem von dem von der Association of Official Analytical Chemists (1977) erläuterten Verfahren und stellt als Nachweismethode einen Tierversuch im Sinne des § 7 Tierschutzgesetzes dar. Diese Tierversuche unterliegen der Anzeigepflicht, sie müssen jedoch nicht genehmigt werden. Für die Testdurchführung werden verschiedene Verdünnungen des BoNT/D-Kulturüberstands in Gelatine-Phosphatpuffer (28 M, pH 6) hergestellt und anschließend werden den Mäusen jeweils 0,5 mL intraperitoneal injiziert. Die Mäuse werden nach der Injektion innerhalb der ersten 8 Stunden alle zwei Stunden, danach zweimal täglich kontrolliert.

Die Tiere werden insgesamt über einen Zeitraum von vier Tagen beobachtet. Soweit typische Symptome einer Botulinum-Neurotoxinvergiftung, wie beispielsweise Lähmungsercheinungen, mühsames Atmen und die Ausbildung einer Wespentaille auftreten, werden diese dokumentiert. Im Falle einer positiven Probe zeigt das Tier die typischen Symptome einer BoNT-Vergiftung und verendet meist innerhalb von 4 – 24 Stunden. Sollten die Tiere unter atypischen Symptomen leiden, so ist ein Tod infolge einer Infektion, eines Injektionstraumas oder aufgrund einer anderen Vergiftung möglich. Der Test ist dann mit einem entsprechenden Antiserum zu wiederholen. Sterben die Tiere hingegen unter typischen Symptomen und überleben die Tiere, die die Blindprobe erhielten, so ist der Toxinnachweis erbracht. Gegebenenfalls kann an dieser Stelle eine Typisierung des Toxins mit Antiseren erfolgen. In Tab. 2-1 ist das Ergebnis der Konzentrationsbestimmung der BoNT/D-Stammlösung dargestellt.

Die letale intraperitoneale BoNT/D-Dosis für eine Labormaus beträgt 25 pg/Maus. Das dargestellte Ergebnis zeigt, dass das verwendete Botulinum-Neurotoxin Typ D (aus Kulturüberstand) eine Toxinkonzentration von mindestens 200.000 intraperitonealen mäuseletalen Dosen/mL (5 µg/mL) besitzt. Dieses lässt sich aus der Tatsache ableiten, dass die Versuchstiere 7 und 8, nicht aber die Tiere 9-12, verendet sind.

Tab. 2-1: Ergebnisse der in der vorliegenden Arbeit verwendeten BoNT/D-Stammlösung, getestet mit dem Toxinnachweis in der Maus. Den Mäusen werden jeweils 500 µL intraperitoneal gespritzt.

Tiere	Verdünnung der Stammlösung	BoNT/D [ng/mL]	Symptome der Mäuse	Tod
1 und 2	1:10 ²	50,0	4 h Wespentaille	8 h
3 und 4	1:10 ³	5,0	8 h Wespentaille, Hechelatem	20 h
5 und 6	1:10 ⁴	0,5	8 h leichte Wespentaille	20 h
7 und 8	1:10 ⁵	0,05	8 h leichte Wespentaille	20 h
9 und 10	1:10 ⁶	0,005	20 h leichte Wespentaille	-
11 und 12	Blindprobe		Keine	-

2.2.3 Der Endopeptidase-Assay

Das BoNT besitzt eine hochspezifische Zink-Endopeptidaseaktivität gegenüber bestimmten Zielmolekülen in den synaptischen Bläschen bzw. in dem Anlagerungssystem der synaptischen Membran. Dieses führte zu der Entwicklung eines *In-vitro*-Nachweissystems, der auf der spezifischen Spaltung der SNARE-Proteine durch Botulinum-Neurotoxine basiert. So sind in der Literatur bereits Formate zum Nachweis der BoNT-Typen A¹¹, B¹² und E¹³ beschrieben. Der Endopeptidase-Assay bietet ähnliche oder sogar bessere Sensitivitäten als der Toxinnachweis in der Maus [Wictome et al., 1999b]; des Weiteren wurden keine Kreuzreaktivitäten mit anderen Toxintypen berichtet. Trotzdem konnte eine erhöhte Tendenz für falsch-positive Signale festgestellt werden. Dieses konnte auf serologische Unterschiede des BoNT/B zurückgeführt werden, die auftreten, wenn Typ D von proteolytischen oder aproteolytischen *C. botulinum* produziert wird [Wictome et al., 1999b].

2.2.4 Immunologische Nachweismethoden

Für den Nachweis von botulinen Neurotoxinen werden in der Literatur überwiegend auf polyklonalen Antikörpern basierende Immunoassays beschrieben. Die Herstellung von Antikörpern gegen BoNT geht in der Regel mit hohen Kosten und langwierigen Entwicklungszeiten der Antikörper einher. In den meisten Fällen sind die dann entwickelten Immunoassays jedoch relativ einfach und schnell zu handhaben [Ekong, 2000]. Dennoch besitzen vie-

¹¹ Ekong et al., 1997; Hallis et al., 1996

¹² Hallis et al., 1996; Wictome et al., 1999 a, b

¹³ Ekong et al., 1999

le dieser Assays, wie beispielsweise der **Radioimmunoassay (RIA)**¹⁴, der **Geldiffusionsassay**¹⁵ und der **PHA (passive haemagglutination assay)**¹⁶ sowohl eine schlechtere Sensitivität als auch Spezifität gegenüber dem Toxinnachweis in der Maus, was den diagnostischen Wert dieser Assays herabsetzt.

Das meistverwendete Format ist der **ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)** mit einer Vielzahl von Variationen [Notermans et al., 1978; Doellgast et al., 1993; Roman et al., 1994]. Die auf ELISA-Technologie basierenden Testformate können teilweise ähnliche Sensitivitäten wie der Toxinnachweis in der Maus erreichen [Dezfulian und Bartlett, 1984; Shone et al., 1985; Ekong et al., 1995; Ferreira et al., 2003]. Auch für den Nachweis in klinischen Proben¹⁷ und in Lebensmitteln¹⁸ wurde in der Literatur dieses Testformat untersucht. Nur wenige Autoren beschäftigten sich bisher mit dem Nachweis der Neurotoxine Typ C und D [Notermans et al., 1982; Thomas, 1991]. Bereits 1979 beschrieb Hayes (1979) von dem ersten Ansatz und Gebrauch von Gangliosidaffinitätsfiltern, um toxische Stämme von *C. botulinum* C und D mittels eines typspezifischen Antitoxins nachzuweisen. Thomas (1991) stellt in seinem Test eine Sensitivität von 70 % und eine Spezifität von 96% bei der Verwendung polyklonaler Antikörper und eines halbgereinigten Toxinkomplexes fest. Der von ihm entwickelte ELISA zeigte jedoch Kreuzreaktionen zu *C. novyi*. Auch die Ergebnisse von Notermans et al. (1982) bestätigten, dass eine Differenzierung zwischen BoNT/C und D schwierig ist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich bis dato der Toxinnachweis in der Maus noch nicht durch einen *In-vitro*-Nachweis ersetzen lässt. Immunologische Testverfahren wie beispielsweise ELISA-Tests bieten jedoch interessante Ansätze, mittels derer die Entwicklung eines neuen Testsystems möglich wird.

2.2.5 Der „*Immunochromatographische Säulentest*“

Bei diesem immunologischen *In-vitro*-Test kommt es innerhalb einer optimierten Probenvorbereitung zu einer Ausbildung von Sandwich-Komplexen zwischen dem Analyten Botulinum-Neurotoxin Typ D und einem monoklonalen Antikörper (Maus) sowie einem biotinylierten polyklonalen Antikörper (Ziege). Anschließend werden diese Sandwich-Komplexe mit Hilfe einer Testsäule (Abb. 2-3) filtriert. Die verwendeten Säulen bestehen aus einem Röh-

¹⁴ Ashton et al., 1985

¹⁵ Vermilyea et al., 1968; Ferreira et al., 1981

¹⁶ Johnson et al., 1966

¹⁷ Poli et al., 2002

chen (Durchmesser ca. 0,5 cm), das jeweils mit drei Polyethylen-Fritten gepackt ist. Die Polyethylen-Fritten werden mittels entsprechender Vorbehandlungen aktiviert und belegt. Die obere und untere Fritte wurden vor dem Packen der Säule mit einem Blockierungsreagenz vorbehandelt und dienen der Einstellung einer Durchflussgeschwindigkeit von ca. 100 $\mu\text{L}/\text{Min}$. bei einem Säulendurchmesser von 0,5 cm. Die mittlere der drei Fritten wurde mit einem monoklonalen Anti-Maus-IgG belegt und stellt die Testfritte dar.

Die Säulen werden nach ihrer Präparation mit PBS-Puffer gefüllt aufbewahrt. Bei der Filtration werden die Sandwich-Komplexe mittels eines immobilisierten sekundären Antikörpers (Anti-Maus-IgG, Ziege) innerhalb einer Testfritte immobilisiert und somit aufkonzentriert. In einem weiteren Schritt wird an das Biotin des biotinylierten polyklonalen Antikörpers HRP-konjugiertes (horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase) Streptavidin gekoppelt. Der Farbnachweis des Toxin-Komplexes erfolgt aufgrund einer enzymatischen Reaktion von Meerrettichperoxidase mit einem Färbungsreagenz. Diese enzymatische Reaktion wird nach 5 Minuten mittels Zugabe eines Stoppreagenzes (Schwefelsäure) gestoppt, in eine Mikrotiterplatte überführt und photometrisch ausgewertet. Die genaue Durchführung der Probenvorbereitung und des Nachweises sind in Kapitel 7.1.1 beschrieben. Das Testprinzip beruht auf der ABICAP®-Technologie (ABICAP TOOL, Biogenesis).

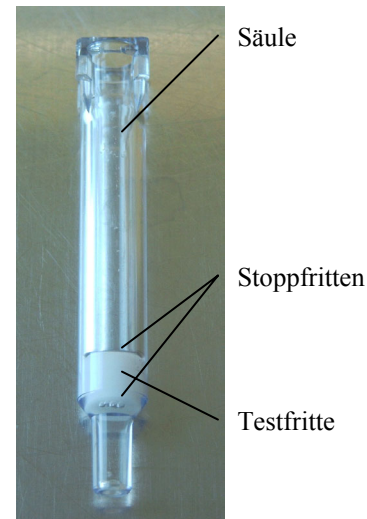


Abb. 2-3: Testsäule eines „immunochromatographischen Säulentests“.

Photometrische Auswertung:

Die in eine Mikrotiterplatte überführte farbige Stopplösung wird mit einem Digiscan Reader V2.0 Photometer (ASYS Hitech GmbH, Eugendorf, Österreich) bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch ausgewertet.

In Abb. 2-4 sind die Ergebnisse der halbjährigen Überprüfung des BoNT-Standards mittels des „Immunochromatographischen Säulentests“ dargestellt. Da Botulinum-Neurotoxine instabile Proteine sind [Schantz und Kautter, 1978], müssen die Proben bei einer Temperatur von $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Die Konzentration der verwendeten und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

¹⁸ Shone et al., 1985; Potter et al., 1993; Rodriguez und Dezfulian, 1997; Ferreira et al., 2001

gelagerten Stammlösung wird nach einer Lagerungszeit von 6 Monaten mittels eines Toxin-nachweises in der Maus erneut bestimmt und bestätigt. Für jeden in dieser Arbeit beschriebenen Versuch wird eine Toxinprobe frisch aufgetaut und nach Gebrauch verworfen.

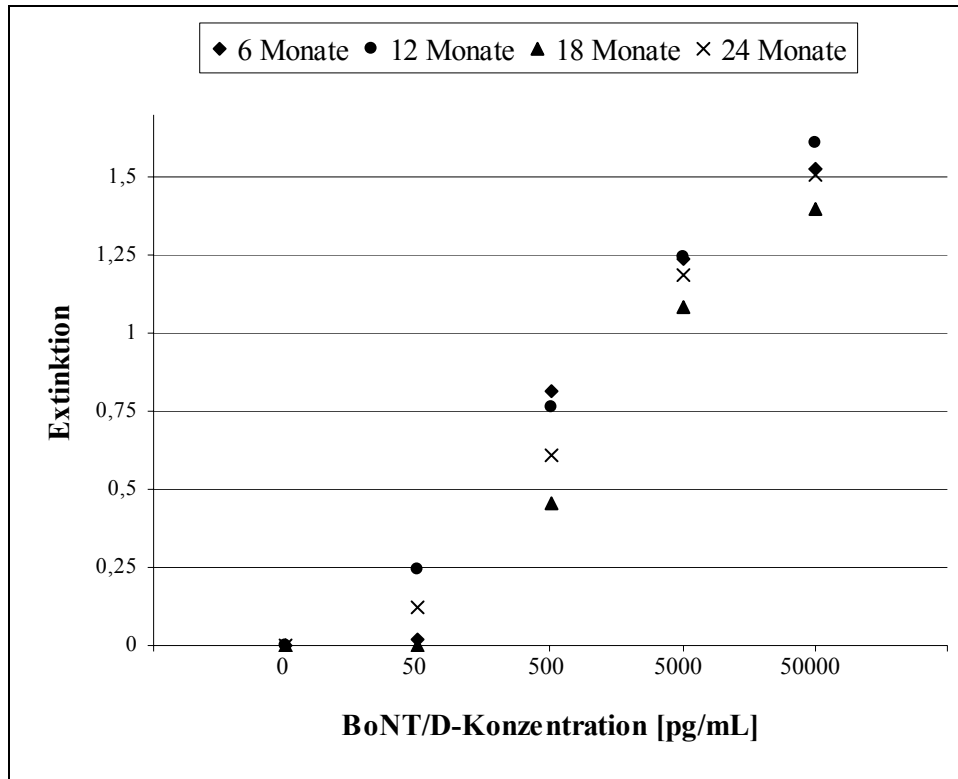


Abb. 2-4: Ergebnisse der photometrischen Auswertung des „immunochromatographischen Säulentests“. Die in dieser Arbeit verwendete BoNT/D-Stammlösung wird halbjährig überprüft, indem eine Verdünnungsreihe hergestellt und analysiert wird.

Die Ergebnisse der photometrischen Auswertung zeigen eine Testempfindlichkeit von ca. 500 pg/mL, da diese Konzentration deutlich vom Nullwert diskriminierbar ist. Ein Abfall der Toxinkonzentration im betrachteten Zeitraum kann mit diesen Ergebnissen nicht erkannt werden.

2.2.6 Der „Magnetic-Beads-Assay“

Das Prinzip des Magnetic-Beads-Assays ist dem des immunochromatographischen Säulentests ähnlich. So wird auch bei diesem Assay mit Hilfe einer Probenvorbereitung zuerst die Bildung eines Sandwich-Komplexes zwischen dem Analyten BoNT/D und einem monoklonalen Antikörper (Maus) und einem biotinylierten polyklonalen Antikörper (Ziege) optimiert. Jedoch erfolgt die Immobilisierung dieses Sandwich-Komplexes nicht innerhalb einer Testfritte, sondern mittels eines sekundären Antikörpers (Anti-Maus-IgG) an der Oberfläche von

magnetischen Kügelchen (Dynabeads) während einer zweiten Inkubation. In einem weiteren Schritt wird, ähnlich wie bei dem immunochromatographischen Säulentest, an das Biotin des biotinylierten polyklonalen Antikörpers HRP-konjugiertes Streptavidin gekoppelt. Der Nachweis des Toxin-Komplexes erfolgt aufgrund einer enzymatischen Reaktion von Meerrettichperoxidase mit einem Färbungsreagenz.

Diese zeitabhängige Färbungsreaktion wird zuerst direkt photometrisch ausgewertet. Danach wird ein Stoppreagenz zugegeben wodurch die zeitabhängige enzymatische Reaktion gestoppt wird und es erfolgt hierdurch ein Farbumschlag der Lösung von Blau nach Gelb. Es schließt sich eine zweite photometrische Auswertung an. Die genaue Probenvorbereitung und Testdurchführung sind im Kapitel 7.1.2 beschrieben.

Photometrische Auswertung:

Für die erste photometrische Auswertung werden nach Zugabe des Färbungsreagenzes 150 µL der blau gefärbten Substratlösung dynabeadfrei abpipetiert, in eine Mikrotiterplatte überführt und mit einem Digiscan Reader V2.0 (ASYS Hitech GmbH, Eugendorf, Österreich) bei einer Wellenlänge von 655 nm ausgewertet.

In Abb. 2-5 sind Auswertungsergebnisse von Verdünnungsreihen der verwendeten und bei – 80°C gelagerten Stammlösung dargestellt. Hierzu wird nach einer Lagerungszeit von 6, 12, 18 und 24 Monaten jeweils eine Verdünnungsreihe in Gelantine-Phosphatpuffer (28 M, pH 6) angesetzt und mittels eines Magnetic-Bead-Assays getestet. Für jeden in dieser Arbeit beschriebenen Versuch wird eine Toxinprobe frisch aufgetaut und nach Gebrauch verworfen. Die Konzentration der Stammlösung wurde zur Bestätigung der Ergebnisse einmal frisch und einmal nach einer Lagerungszeit von 6 Monaten mit einem Toxinnachweis in der Maus analysiert und bestätigt.

Die Ergebnisse dieser ersten photometrischen Auswertung des Magnetic-Bead-Assays zeigen eine Empfindlichkeit von ca. 500 pg/mL, da diese Konzentrationen deutlich vom Nullwert diskriminierbar sind. Werden diese Ergebnisse mit den Ergebnissen des immunochromatographischen Säulentest in Abb. 2-4 verglichen, so wird deutlich, dass hier die Testsensitivität um einen Faktor von ca. 10 geringer ist.

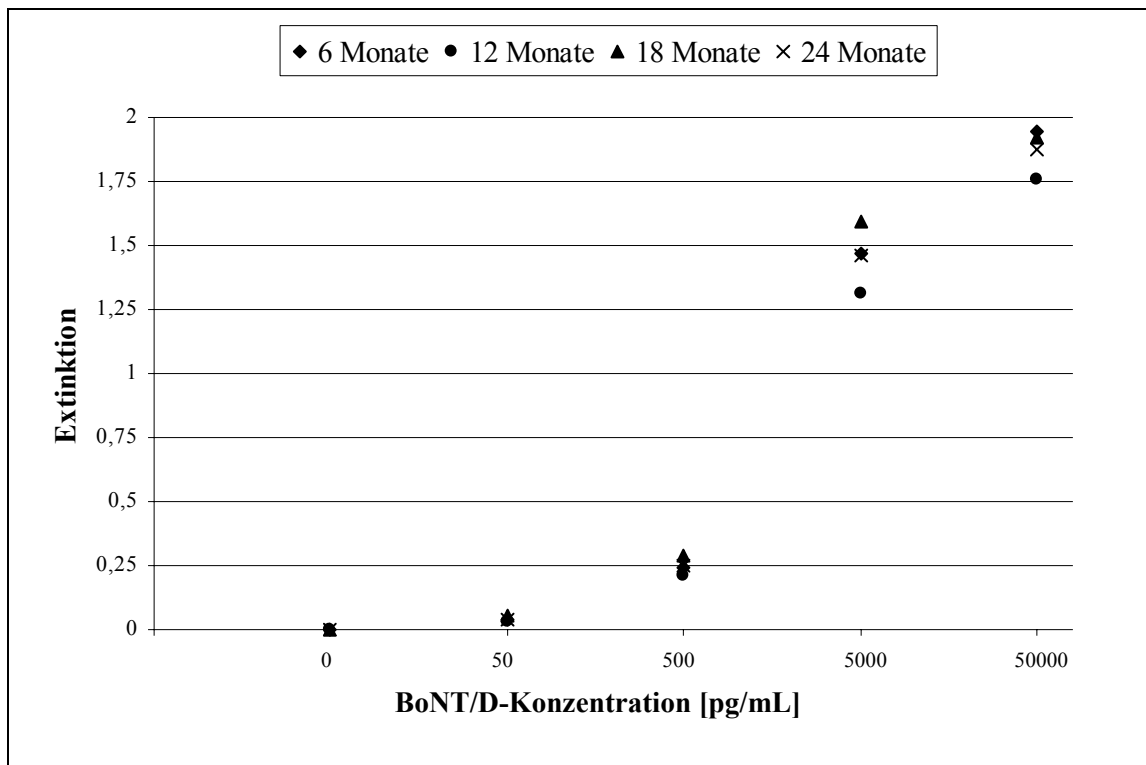


Abb. 2-5: Ergebnisse der photometrischen Auswertung des „Magnetic-Beads-Assays“ vor Zugabe eines Stoppreagenzes zum Stoppen der enzymatischen Färbereaktion. Die in dieser Arbeit verwendete BoNT/D-Stammlösung wird halbjährig überprüft, indem eine Verdünnungsreihe hergestellt und analysiert wird.

Zur Sensitivitätserhöhung werden zu den gerade dynabeadfrei abpipetierten Substratlösungen 50 µL einer Stopplösung zugegeben. Hierdurch wird die zeitabhängige enzymatische Färbungsreaktion gestoppt; es erfolgt durch die Zugabe ein Farbumschlag von blau nach gelb. Von der Zugabe des Färbungsreagenzes bis zur Zugabe des Stoppreagenzes sind 5 Minuten vergangen. Es schließt sich eine weitere photometrische Auswertung mittels eines Digiscan Readers V2.0 bei einer Wellenlänge von 450 nm an.

In Abb. 2-6 sind die Ergebnisse der halbjährigen Überprüfung des BoNT-Standards mittels des „Magnetic-Beads-Assays“ nach der Zugabe des Stoppreagenzes dargestellt. Eine Testempfindlichkeit von ca. 50 pg/mL kann erreicht werden, da diese Konzentration deutlich vom Nullwert diskriminierbar ist. In Abb. 2-5 und Abb. 2-6 ist keine Veränderung des gelagerten Toxinstandards zu erkennen. Somit hatte die Lagerung bei -80°C keinen Einfluss auf die Toxinkonzentration.

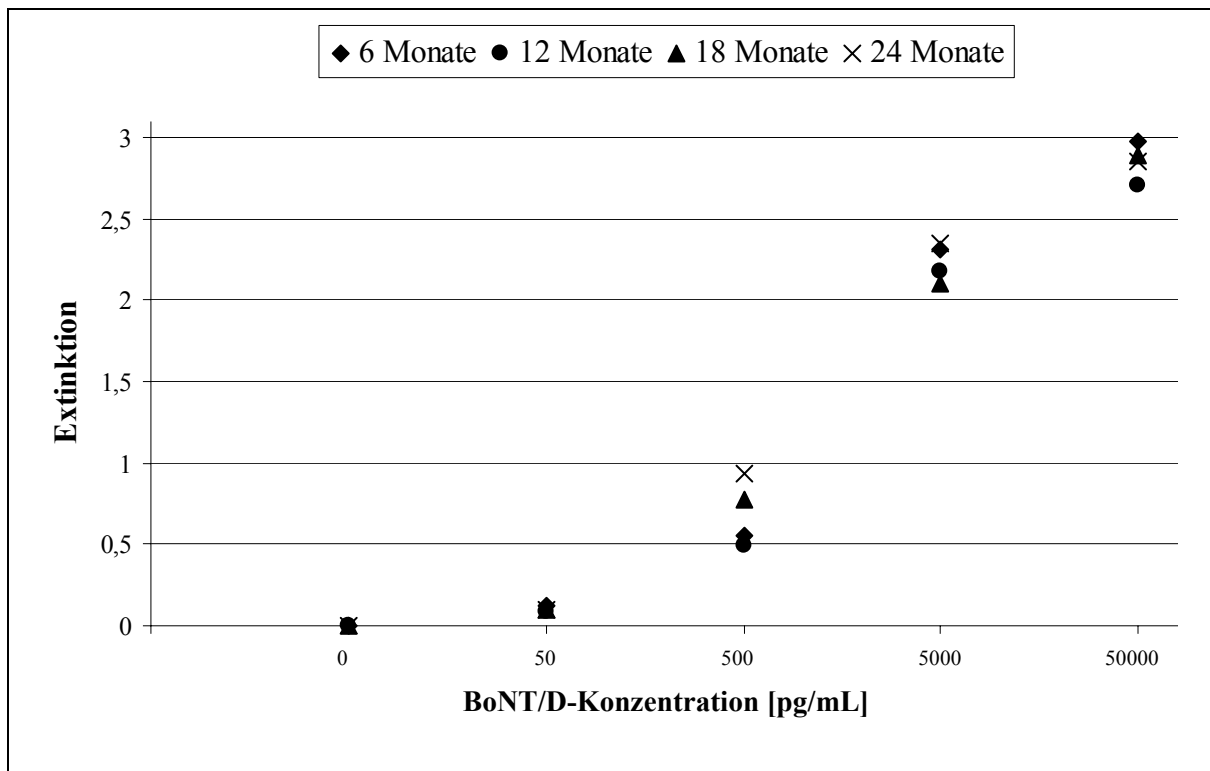


Abb. 2-6: Ergebnisse der photometrischen Auswertung des „Magnetic-Beads-Assays“ nach Zugabe eines Stoppreagenzes zum Stoppen der enzymatischen Färbereaktion. Die in dieser Arbeit verwendete BoNT/D-Stammlösung wird halbjährig überprüft, indem eine Verdünnungsreihe hergestellt und analysiert wird.

2.2.7 Biowarefare Agent Detection Devices (BADD) Test

Der von der Osborn Scientific Group entwickelte BADDTM Botulinum-Toxin-Test (BOT-E500-4, USA) wird dazu verwendet, Wischproben kontaminierter Oberflächen oder flüssiges Probenmaterial zu prüfen. Laut Herstellerangaben kann jedes der sieben *Clostridium-botulinum*-Neurotoxine (Typen A-G) nachgewiesen werden. Er bietet hierbei keine Möglichkeit der näheren Bestimmung des Botulinum-Toxin Typs, sondern weist typenspezifisch die Anwesenheit von einem oder mehreren BoNT nach. Bei Durchführung einer Wischprobe besitzt der BADDTM Test laut Herstellerangabe eine Nachweisgrenze von 50 ng bzw. von 100 ng/mL im Falle einer „verdächtigen“ Lösung.

Verschiedene Faktoren, wie beispielsweise nicht näher definierte störende Substanzen, können zu falschen Ergebnissen führen. Angaben über eine maximal nachweisbare Toxinkonzentration werden vom Hersteller nicht gemacht. Zur sicheren Testdurchführung und Probenhandhabung enthält der BADDTM Test neben einem Lateral-Flow-Assay ein Wattestäbchen zur Probenentnahme, einen speziellen Probenpuffer, eine Plastikpipette, eine widerverschließbare Probenröhre und eine detaillierte Gebrauchsanweisung. In Abb. 2-7 sind die einzelnen Kom-

ponenten des BADD™ Tests abgebildet. Es ist ersichtlich, dass der Aufbau einem typischen Lateral-Flow-Assay entspricht (Abb. 3-4).

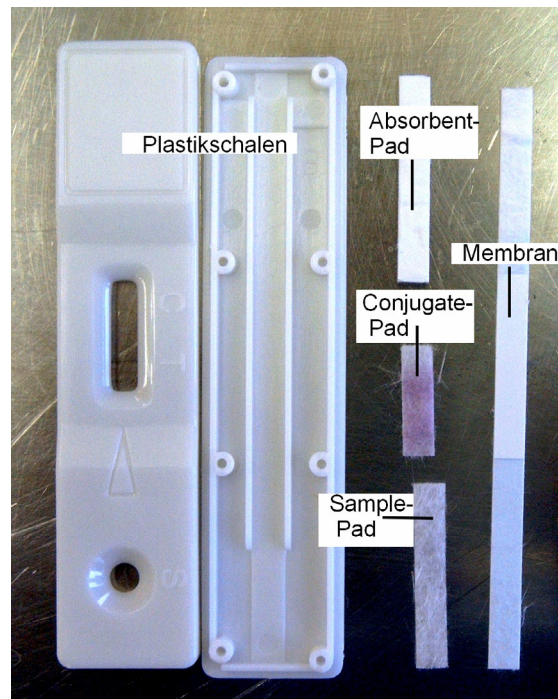
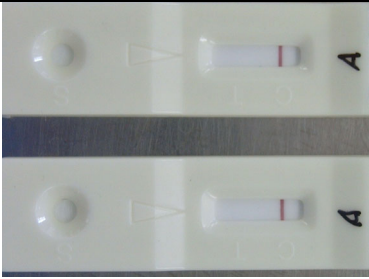

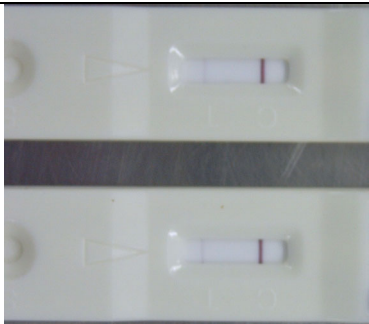




Abb. 2-7: Komponenten eines kommerziell erhältlichen BADD-Tests (Lateral-Flow-Test) zum Nachweis von BoNT.

Als Label wird ein goldkonjugierter Antikörper verwendet, welcher die rötlich-violette Färbung des Conjugate-Pads verursacht. Im Folgenden sollen verschiedene Botulinum-Neurotoxin Typ D Konzentrationen mittels des BADD™ Tests untersucht werden.

Die Testdurchführung erfolgt entsprechend der Gebrauchsanweisung. Im ersten Schritt werden 150 μL eines mit verschiedenen BoNT/D-Konzentrationen dotierten Probenpuffers (im Testkit enthalten) auf das Testfeld eines frisch geöffneten Tests pipettiert. Das Ergebnis wird innerhalb eines Zeitfensters von 10-15 Minuten abgelesen, da nach 15 Minuten laut Herstellerangaben keine reproduzierbaren Ergebnisse mehr zu garantieren sind und eventuell erst jetzt auftretende Signale daher nicht mehr gewertet werden können. Die in Tab. 2-2 abgebildeten BADD™ Ergebnisse wurden alle 13 Minuten nach dem Probenauftrag aufgenommen.

Tab. 2-2: Testergebnisse des BADD™-Tests. Dieser kommerziell erhältliche LFD-Test kann für den Nachweis aller BoNT-Typen verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde ein mit verschiedenen BoNT/D-Konzentrationen dotierter PBS-Puffer (im BADD™-Testkit enthalten) getestet.

Konzentration BoNT/D	Visueller Eindruck	Bild
Negativkontrolle (PBS-Puffer)	Negatives Ergebnis Kein Signal der Testlinie	
500 ng/mL Aus Kultur PBS Puffer verdünnt	Negatives Ergebnis Kein Signal der Testlinie	
5 µg/mL Aus Kultur PBS Puffer verdünnt	Positives Ergebnis Signal der Testlinie	
9,5 µg/mL Aus Kultur PBS Puffer verdünnt	Positives Ergebnis Sehr schwaches Signal der Testlinie	
48 µg/mL Aufgereinigtes Toxin	Negatives Ergebnis Kein Signal der Testlinie	

Anhand einer farbigen Kontrolllinie wird bei allen dargestellten Tests ein korrekter Testverlauf ersichtlich. Da während der Testdurchführung durch die Anwesenheit eines Analyten ein farbiges Testsignal hervorgerufen wird, handelt es sich bei diesem Lateral-Flow-Test

um einen nicht kompetitiven Assay (Kapitel 3.1.1). Die Ergebnisse zeigen, dass erst ab einer Konzentration von 5 µg/mL eine sehr schwache Färbung der Testlinie und damit ein positives Signal zu erkennen ist. Dieser Wert liegt um den Faktor 50 unter der vom Hersteller angegebenen Sensitivität. Die Signalintensität des Tests nimmt bei einer Konzentration von 9,5 µg/mL deutlich ab und bei einer Konzentration von 48 µg/mL ist kein positives Signal mehr sichtbar. Fraglich ist, warum kein positives Testsignal bei einer hohen Analytkonzentration auftritt. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, dass auf dem Conjugate-Pad immer eine bestimmte Menge an gelabelten Antikörpern abgelegt wird. Wird der markierte Antikörper durch die Probenflüssigkeit wieder in Lösung gebracht, so reagiert er mit dem Analyten innerhalb einer Antigen-Antikörperreaktion. Ist die Konzentration des Analyten deutlich höher als die Konzentration des gelabelten Antikörpers, so stehen nicht genügend Reaktionspartner für jedes Analytmolekül zur Verfügung und als Folge kommt es innerhalb der Testlinie zu einer Konkurrenzsituation zwischen den gebildeten Antigen-Antikörperkomplexen und den Analytmolekülen, die keinen Reaktionspartner gefunden haben. Durch diese Konkurrenzsituation nimmt die resultierende Signalintensität ab. Tatsächlich stellt eine Analytkonzentration von 48 µg/mL eine sehr hohe Analytkonzentration für einen Lateral-Flow-Assay dar, so dass dieses eine mögliche Ursache darstellen könnte. Nach 30 Minuten wiesen alle in Tab. 2-2 abgebildeten Tests ein unspezifisches und konzentrationsunabhängiges Signal der Testlinie auf. Somit ergibt sich das folgende Ergebnis:

- Der BADDTM Test besitzt eine Sensitivität von 5 ng/mL in Bezug auf BoNT/D. Er liegt damit um den Faktor 50 unter der vom Hersteller angegebenen Sensitivität von 100 µg/mL und um den Faktor 10^4 - 10^5 unter der in dieser Arbeit angestrebten Sensitivität.
- Der zum Nachweis geeignete Konzentrationsbereich von 5 µg/mL - 48 µg/mL ist für einen Lateral-Flow-Test relativ eng.
- Die Testzeit beträgt 10-15 Minuten. Besondere Probenvorbereitungen müssen nicht vom Anwender durchgeführt werden.
- Die Stabilität der Testsignale ist nur für einen Zeitraum von 15 Minuten nach der Applikation der Probenflüssigkeit garantiert. In den hier untersuchten Tests trat in allen Fällen ein falsch-positives Signal nach 30 Minuten auf, was auf nicht optimale Bedingungen hinweist (Kapitel 3.1).
- Eine optische Auswertung ist wegen der Instabilität des Testsignals nicht möglich.

2.3 Patentsituation von Lateral-Flow-Tests und für BoNT

Neben der gängigen Fachliteratur stellen Patente eine sehr gute Quelle für Informationen dar, die konsequent genutzt werden sollte. Zur Patentrecherche stehen beispielsweise die Internetseiten des PTO¹⁹ zur Verfügung. Eine andere Recherchemöglichkeit außerhalb der USA bietet auch das europäische Patentamt²⁰.

Einige interessante Patente auf dem Gebiet immunochromatographischer Schnelltests und immunologischer Nachweisverfahren für BoNT sind in Tab. 2-3 angeführt. Diese Patente können in die vier Bereiche „geschützte Konstruktionen bzw. Formate“, „LF-Tests zum Nachweis spezieller Analyte“, „Tests mit einer Verstärkung des Testsignals“ und „für LFD geschützte Label“ eingeteilt werden.

Tab. 2-3: Auswahl einiger für die vorliegende Arbeit relevanter Patente aus dem Bereich der Lateral-Flow-Testformate, Testformate für bestimmte Analyte, Möglichkeiten der Signalverstärkung bei LFD und für den Einsatz bei LFD geschützter Label-Reagenzien.

Geschützte Konstruktionen bzw. Formate	Okumara (2002); Medel-Hartvig et al. (2002); Ford et al. (2002); Kitawaki et al. (2001); Chandler et al. (2002); Carlsson und Loennberg (2001a); Feistel (2001); Cullmann et al. (2001a); Carlsson und Loennberg (2001b); Hajizadeh und Wijesuriya (2000); Dinello et al. 2000; Jones (1999); Kroll et al. (1999); Miyazaki et al. (1999); Cunningham et al. (1998); Mortensen und Tom (1993); Chandler (1999); May et al. (1987); Chowdhury und Mc Clintock (1999); Chambers und Fathallah (2001); Harris und Richards (2002); Lee (2002); Marsen (2002); Sun und Hill (2002)
LF-Tests zum Nachweis spezieller Analyte	Duan und Hartmann (2002); Ford et al. (2002); Brooks et al. (2001); Barrantes et al. (2001); Cullmann et al. (2001); Metzger und Terletskaia-Ladwig (2000); Cheng et al. (1999); Cunningham et al. (1999); Muscat et al. (2000)
Verstärkung des Testsignals	Chandler (1999); Cunningham et al. (1998)
Für LFD geschützte Label	Laborde und La Borde (2001); Jones (1999); Ashhara et al. (1998); Cunningham et al. (1998); Chang et al. (1997); Yongsheng et al. (1999); Chowdhury und Mc Clintock (1999); Ames et al. (2000)

¹⁹ The US Patent and Trademark Office, <http://www.uspto.gov/patft/>

²⁰ <http://www.epo.co.at/epo/>

Beispielsweise werden in dem Patent der Firma Unilever N.V. [May et al., 1987] Lateral-Flow-Tests im Dipstickformat geschützt. Diese „Dipsticks“ zeichnen sich dadurch aus, dass sie direkt in eine Probenflüssigkeit getaucht werden können, d. h. die Testlösung muss nicht in ein „Testfeld“ aufgetragen werden. Andere Patente beschreiben BoNT-Nachweise, beispielsweise mittels der Messung der Endopeptidaseaktivität [Hallis et al., 1995], der Messung elektrochemischer Änderungen [Case und Worley, 1993], des Western Blotts [Aoki und Spanoyannis, 2001] und der Messung von Fluoreszenzänderungen [Song und Swanson, 1999]. Auch werden für die Verwendung von rekombinanten Antikörperfragmenten [Burans et al., 1999] oder dem Nachweis von BoNT-Antikörpern [Aoki und Spanoyannis, 1998; Miller, 1996] entsprechende Verfahren beschrieben. Abe et al. (1998) beschreiben in ihrem Patent eine geeignete Konstruktion zur Probensammlung und Kultivierung von verschiedenen Bakterien, zu denen auch das *Clostridium-botulinum* gehört. Eine Signalverstärkung mittels Silberverstärkung wird in dem Patent von Chandler (1999) beschrieben. Es schützt ein Lateral-Flow-Testformat, das durch seinen speziellen Aufbau eine zeitlich getrennte Anwesenheit von bestimmten Chemikalien an der Testlinie sicherstellt.

2.4 Zusammenfassung

Zurzeit können sieben verschiedene Toxintypen aufgrund ihrer serologischen Eigenschaften unterschieden werden, die sich strukturell sehr ähneln. Diese strukturelle Ähnlichkeit stellt sehr hohe Anforderungen an einen typspezifischen immunologischen Nachweis. Unter Berücksichtigung der in diesem Kapitel beschriebenen Eigenschaften und Nachweismethoden des Analyten BoNT, lassen sich folgende erste Anforderungen an den zu entwickelnden BoNT/D Lateral Flow Assay formulieren.

- Der Toxinnachweis in der Maus ist nur dann durch eine *In-vitro*-Methode zu ersetzen, wenn diese eine Nachweisgrenze im Bereich von 50-500 pg/mL besitzt.
- Zusätzlich sollte die Handhabung, Reproduzierbarkeit und Testzeit im Vergleich zu dem Toxinnachweis in der Maus entsprechend bzw. verbessert sein.
- Die Ergebnisse sollten quantifizierbar sein.

Zwei in dieser Arbeit verwendete *In-vitro*-Nachweisverfahren – der „immuno-chromatographische Säulentest“ und der „Magnetic-Beads-Assay“ – erfüllen die Sensitivitätsansprüche; auch sind sie im Vergleich zu anderen in der Literatur beschriebenen Nachweisverfahren vergleichsweise einfach in der Durchführung. Dennoch benötigen sie im Durchschnitt eine

Testzeit von ca. 14 Stunden, was immer noch deutlich schneller als der Toxinnachweis in der Maus ist. Die bei diesen Assays verwendeten BoNT/D-Antikörper sind vom Institut für angewandte Biotechnologie in den Tropen entwickelt worden, und stehen Dank Ihrer freundlichen Unterstützung auch für diese Arbeit zur Verfügung.

Ein kommerzieller Lateral-Flow-Assay (BADDTM-Test) zum Nachweis von BoNT zeigt unter den getesteten Bedingungen folgende Eigenschaften:

- Der BADDTM-Test besitzt eine Sensitivität von 5 µg/mL. Er liegt damit um den Faktor 50 unter der vom Hersteller angegebenen Sensitivität von 100 ng/mL und um den Faktor 10^4 - 10^5 unter der in dieser Arbeit angestrebten Sensitivität.
- Der zum Nachweis geeignete Konzentrationsbereich von 5 µg/mL - 48 µg/mL ist für einen Lateral-Flow-Test gering.
- Die Stabilität der Testsignale ist nur für einen Zeitraum von 15 Minuten nach der Applikation der Probenflüssigkeit garantiert. Bei den hier untersuchten Tests trat in allen Fällen ein falsch-positives Signal nach 30 Minuten auf, was auf nicht optimale und unreproduzierbare Bedingungen hinweist.

Eine Betrachtung der existierenden Patente zeigt, dass es verschiedene Möglichkeiten der Sensitivitätserhöhung von Lateral-Flow-Tests gibt. Ein spezielles Lateral-Flow-Format zum Nachweis von BoNT wurde im Rahmen der vorliegenden Patentrecherche nicht gefunden.

3 IMMUNOCHROMATOGRAPHISCHE ASSAYS

In Kapitel 2 wurden Eigenschaften und Nachweismethoden des BoNT/D näher betrachtet und erste grundlegende Anforderungen des Analyten an einen *In-vitro*-Assay ermittelt. Der kommerziell erhältliche und im Rahmen der vorliegenden Arbeit getestete BADDTM Lateral-Flow-Assay (LFA) bietet eine schnelle Möglichkeit, BoNT typenspezifisch mit einer Nachweisgrenze von 5 µg/mL nachzuweisen. Obwohl der BADDTM Test keine hinreichende Sensitivität und Quantifizierungsmöglichkeit der Testergebnisse besitzt, bestätigt sich aufgrund der deutlich verkürzten Testzeit das Potenzial der Lateral-Flow-Assays als interessante alternative *In-vitro*-Nachweismethode. Um die Leistungsfähigkeit sowie verschiedene Entwicklungsansätze des Lateral-Flow-Testformates besser einschätzen zu können, wird in diesem Kapitel zunächst auf allgemeine theoretische Grundlagen eingegangen. Die Diskussion eines Anforderungsprofils an einen LFA erfolgt im nächsten Schritt anhand eines Schwangerschaftstests. Nach diesen Betrachtungen werden die allgemeinen Anforderungen an die Nachweismethode (z.B. reproduzierbare Testbedingungen oder Haltbarkeit) und die Anforderungen des Analyten BoNT/D an einen immunologischen Assay zu einem Anforderungsprofil eines BoNT/D-Lateral-Flow-Assay zusammengeführt. Die Ergebnisse eines „klassischen“ LFD-Testansatzes und weiterführende Untersuchungen verschiedener Reaktionsparameter mittels eines Flow-Through-Assays dienen als Grundlage für die im nächsten Kapitel beschriebenen Entwicklungen verschiedener Lateral-Flow-Assays.

Bereits seit 1960 gelten immunologische Testverfahren als verlässliches und spezifisches Werkzeug der analytischen Chemie, die kontinuierlich verbessert und weiterentwickelt werden [O’Beirne und Cooper, 1979; Price und Newman, 1991; Tijssen, 1993; Ishikawa, 1993; Wild, 1994; Deshpande, 1996; Buttler, 2000]. Charakteristisch ist für alle immunologischen Nachweisverfahren, dass sie auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion basieren [Jefferis et al., 1991]. Mittels dieser immunologischen Reaktion ist der Nachweis von einem der Reaktionspartner und die Bestimmung seiner Konzentration möglich. Der Testaufbau eines immunochemischen Tests kann hierbei besonders in Bezug auf die Bildung und Auswertung der Testsignale stark variieren. Als bekannte und häufig genutzte Formate können hierfür radioimmunologische Verfahren (RIA: radio-immunoassay), ELISA-Testsysteme (enzyme linked immunospecific assay) bis hin zu Lateral-Flow-Devices (LFD) genannt werden. Als schnelle Immunoassay-Technik bietet die im Folgenden beschriebene Immunochromatographie bzw. Lateral-Flow-Technologie binnen Minuten reproduzierbare und sensitive Ergebnisse [Price und Newman, 1991].

3.1 Der Lateral-Flow-Assay

Immuno-chromatographischer Test (ICT), Lateral-Flow-Assay (LFA), Lateral-Flow-Device (LFD), Dipstick-Assay oder One-Stepp-Test sind nur einige Namen unter denen das nun diskutierte Testformat in der Literatur gefunden werden kann. Alle Bezeichnungen sind Synonyme für ein auf Partikeln basierendes immuno-chromatographisches Aufkonzentrierungsformat, das sich mittlerweile eines sehr breiten Einsatzgebietes erfreut. Der Grund hierfür liegt in den positiven Eigenschaften eines Lateral-Flow-Assays, die ein anwenderfreundliches Testformat, Langzeitstabilität und günstige Produktionskosten beinhalten. So konnte diese Technologie während der letzten 15 Jahre für über 150 verschiedene Analyte erschlossen werden [Klewitz, 2000]. Als rezeptfreie Produkte werden überwiegend qualitative - bzw. semiquantitative - Testformate angeboten.

3.1.1 Kompetitive und nicht-kompetitive LFD

Eine Möglichkeit der Nomenklatur von immunologischen Tests bietet neben der Probenart (antigenhaltig oder antikörperhaltig) oder der Analysenart (z.B. qualitativ oder quantitativ) die Form des Gesamtsystems [Miyai, 1991], welche in Abb. 3-1 dargestellt ist.

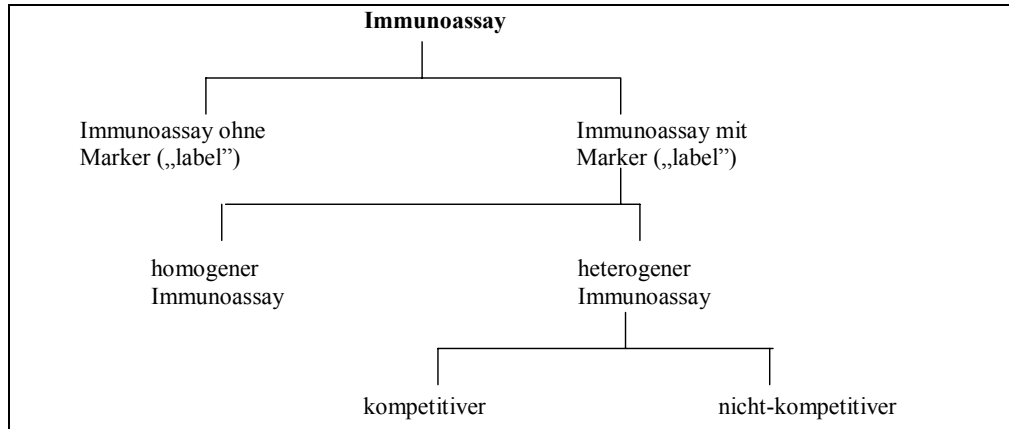


Abb. 3-1: Klassifikation eines Immunoassays nach der Form des Gesamtsystems.

Wendet man diese Klassifikation auf die Lateral-Flow-Devices (LFD) an, so ergibt sich die folgende Nomenklatur. Zunächst verwenden LFD mit Labeln versehene Reaktanden. Innerhalb dieser Gruppe der „Immunoassays mit Labeln“ kann eine weitere Einteilung in homogene und heterogene Testdurchführungen vorgenommen werden. Zu der letzteren Gruppe gehört das Lateral-Flow-Testformat, da einer der Reaktanden innerhalb einer Testzone immobilisiert ist, während sich die anderen Reaktanden in einer flüssigen Phase befinden. Als weitere wichtige Untergruppen der heterogenen Immunoassays werden im Allgemeinen das nicht-kompetitive Format und das kompetitive Testformat unterschieden [Miyai, 1991; Arista

Biologicals, 2002; Whatman, 2002]. Beide Formate können sowohl bei einem LFD als auch bei einem Flow-Through-Assay Anwendung finden.

Nicht-kompetitiver LFD-Immunoassay (Sandwich Assay)

Bei einem nicht-kompetitiven LFD bildet ein mit einem Label markierter Antikörper aufgrund einer immunologischen Reaktion mit dem nachzuweisenden Antigen (Analyt) in der Probenlösung einen Antigen-Antikörper-Komplex. Dieser Komplex wird mittels einer zweiten immunologischen Reaktion zwischen einem anderen Epitop des Antigens und einem immobilisierten Antikörper nachgewiesen.

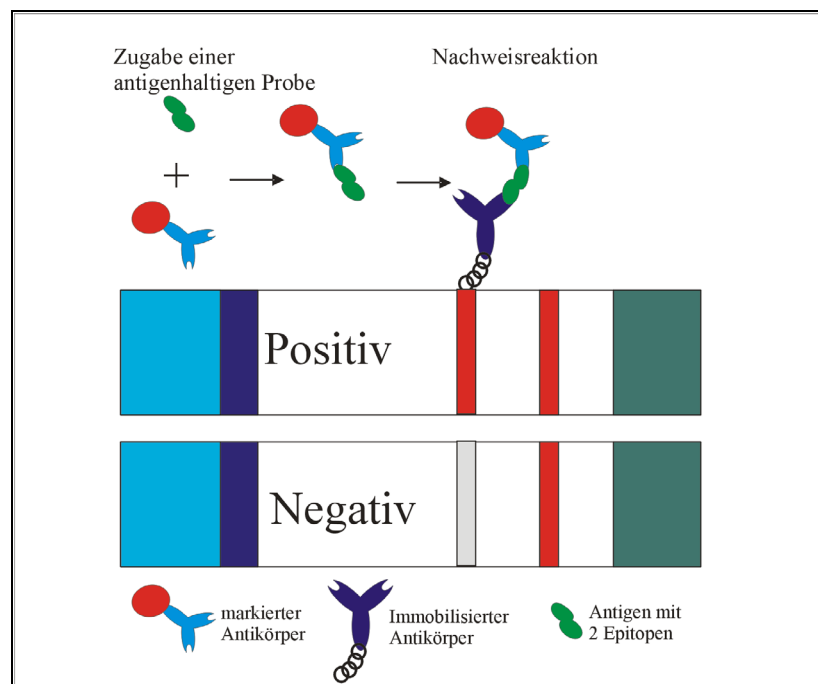


Abb. 3-2: Verlauf eines nicht-kompetitiven LFD.

Der Nachweis erfolgt über die Auswertung eines Farbsignals. Mit zunehmender Konzentration des Analyten nimmt die Intensität des Testsignals zu (Abb. 3-2). Grundlegende Voraussetzungen für die Entwicklung eines solchen Nachweises sind, dass das nachzuweisende Antigen groß genug ist, um von mehreren Antikörpern gebunden zu werden und zusätzlich über mehrere immunologisch unterscheidbare Epitope verfügt.

Kompetitiver LFD-Immunoassay

Bei einem kompetitiven LFD wird zu einem mit einem Label markierten Reaktanden - der das gleiche Epitop wie der Analyt besitzt - in einer Probenlösung das Antigen hinzugegeben. Innerhalb einer Testzone ist ein spezifischer Antikörper gegen das Epitop des markierten Reaktanden und des Antigens immobilisiert.

Aufgrund der Bindungskonkurrenz zwischen dem markierten Reaktanden und dem Analyten kommt es bei einem kompetitiven LFD mit zunehmender Analytkonzentration zu einer Intensitätsabnahme des Testsignals (Abb. 3-3). Dieses Testformat bietet sich für kleine Analyte an, die nur über ein Epitop verfügen bzw. die nicht von mehreren Antikörpern gebunden werden können.

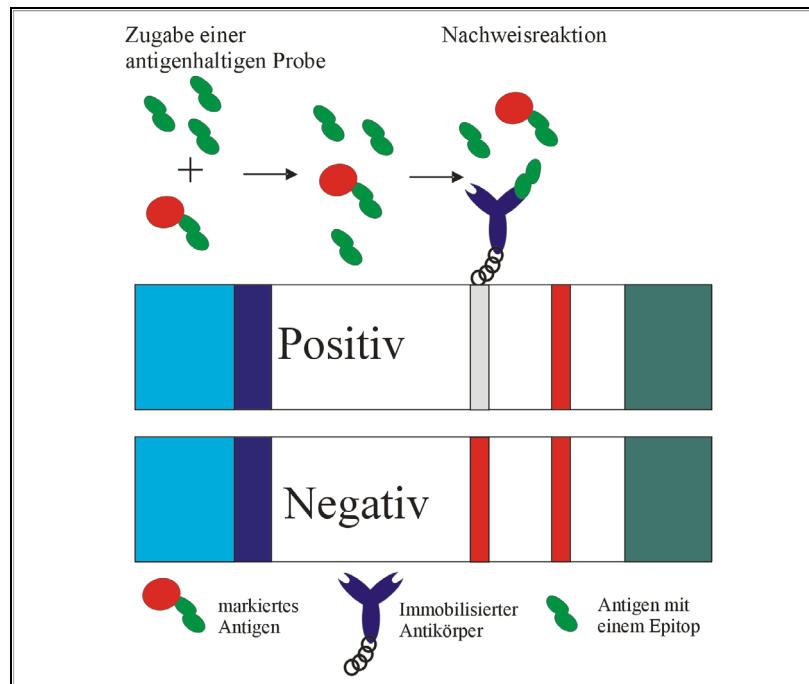


Abb. 3-3: Verlauf eines kompetitiven LFD.

3.1.2 Aufbau und Prinzipien

Gemeinsam ist allen Lateral-Flow-Assays, dass die Anwesenheit eines Analyten ab einer bestimmten Schwellenkonzentration mittels eines Farbsignals nachgewiesen wird, wobei die Farbintensität innerhalb einer Testzone mit der Analytkonzentration korreliert. Abb. 3-4 zeigt einen schematischen Aufbau, der prinzipiell allen immunochromatographischen Lateral-Flow-Tests zugrunde liegt [Tisone et al., 1999].

Mit seinen weltweit verkauften Stückzahlen stellt der Lateral-Flow-Schwangerschaftstest wohl die bekannteste Anwendung dar. Aus diesem Grund und da ein Schwangerschaftstest in der vorliegenden Arbeit zur Entwicklung einer chemischen Signalverstärkung genutzt wird, werden die verschiedenen Aufgaben der einzelnen Komponenten eines Lateral-Flow-Tests nun anhand eines Schwangerschaftstests erläutert (Abb. 3-4).

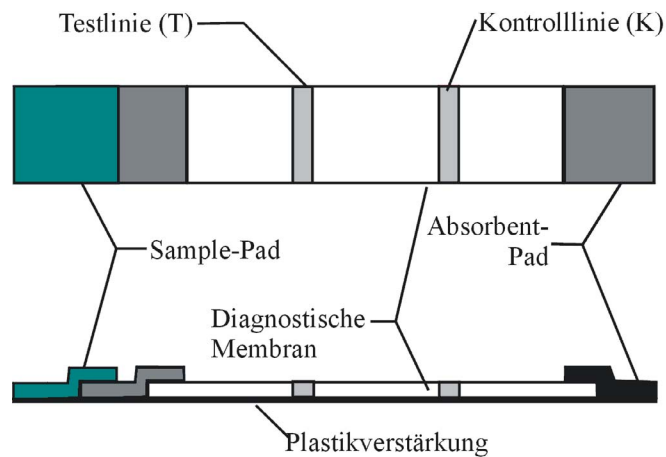


Abb. 3-4: Aufbau und Komponenten eines Lateral-Flow-Assays.

Wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben, liegt das humane Choriongonadotropin (hCG) erst im Falle einer Schwangerschaft im Urin vor. Demzufolge kann es zum immunologischen Nachweis einer Schwangerschaft genutzt werden. Die Anwenderin trägt bei der Verwendung des Tests ihren Urin auf ein Aufnahmepapier („Sample-Pad“) auf. Das Sample-Pad dient als grober „Vorfilter“ für Schwebeteilchen und ist im Allgemeinen mit verschiedenen Puffersalzen belegt. Diese Puffersalze stellen die Probenflüssigkeit auf einen für die immunologische Reaktion optimalen pH-Wert ein. Der aufgetragene Urin fließt dann durch ein Reagenzienvlies („Conjugate-Pad“/„Release-Pad“). Hierbei bringt die Probenflüssigkeit neben weiteren Puffersalzen, Tensiden, Zuckern und Proteinen einen zuvor abgelegten markierten Anti- β -hCG-Antikörper in Lösung. Die erste immunologische Reaktion zwischen der β -Untereinheit des hCG und dem markierten Anti- β -hCG-Antikörper findet in der Lösung statt und hat die Bildung eines immunologischen Komplexes zur Folge. Die Probenflüssigkeit wandert mit den gebildeten immunologischen Komplexen aufgrund von Kapillarkräften durch eine Polymermembran und über zwei Reagenzienlinien - die Testlinie („Capture Line“) und die Kontrolllinie („Control Line“) - in ein weiteres Aufnahmevlies („Absorbent-Pad“). Innerhalb der Testlinie wurden bei der Herstellung des Schwangerschaftstests Anti- α -hCG-Antikörper immobilisiert. Diese reagieren spezifisch mit der α -Untereinheit des hCG-Hormons. Sobald der zuvor gebildete immunologische Antigen-Antikörper-Komplex in ihre Nähe kommt. Das Resultat ist ein innerhalb der Testlinie immobilisierter Sandwich-Komplex, der aufgrund des Labels des Anti- β -hCG-Antikörpers eine Farbinformation trägt.

Ist die Konzentration des immobilisierten Labels innerhalb der Testlinie groß genug, so wird ein positives Ergebnis durch eine farbige Testlinie erkennbar. Das Ergebnis eines Tests kann nach wenigen Minuten mit bloßem Auge abgelesen werden und eine verfärbte Kontrolllinie stellt für die Anwenderin sicher, dass der Test korrekt verlief.

Als Label in Lateral-Flow-Assays werden verschiedenste Partikel, wie beispielsweise blaue Latexpartikel (Polystyrol), paramagnetische Partikel (magnetische Eisenoxide (Fe_xO_y)), Russpartikel und verschiedene kolloidale Metallpartikel verwendet. Jedes Label besitzt hierbei verschiedene Vor- und Nachteile, wie z.B. Haltbarkeit, Löslichkeit, Verfügbarkeit und Farbe. Als Faustregel gilt lediglich, dass die Partikelgröße nicht 10% der Membranporengröße überschreiten darf, damit eine gute Mobilität in der Membranstruktur gegeben ist.

Aufgrund der Ähnlichkeit zu ELISA werden viele Lateral-Flow-Tests auf der Grundlage bereits bestehender ELISA entwickelt. Im Vergleich zu diesen besitzen Lateral-Flow-Assays im Allgemeinen die gleiche oder sogar eine höhere Sensitivität. Abhängig von den verwendeten Antikörpern, dem nachzuweisenden Analyten und dem verwendeten Label können Sensitivitäten im ng/mL Bereich erreicht werden [Horton et al., 1991; Birnbaum et al., 1992; Van Amerongen et al., 1994; Müller-Bardorff et al., 1999]. Viele Analyten, wie beispielsweise die Botulinum-Neurotoxine, benötigen jedoch für einen effektiven Nachweis sogar noch deutlich höhere Sensitivitäten. Um diesen Ansprüchen gerecht zu werden, müssen neue Wege beschritten werden. Im Folgenden werden daher einige Möglichkeiten zur Sensitivitätserhöhung erläutert.

Methoden zur Sensitivitätserhöhung

Der Einsatz einer neuen Generation von Labeln stellt eine interessante Möglichkeit zur Sensitivitätserhöhung dar. Zu dieser Generation können Reagenzien wie beispielsweise paramagnetische Partikel [LaBordee und O'Farrell, 2002], Kohlenstoffpartikel [Lönnberg und Carlsson, 2001; Van Amerongen et al., 1994] oder UPT –Reporter (Up-Converting Phosphor-Reporters) [Corstjens et al., 2001 und Corstjens et al., 2003] gezählt werden. Die Nutzung von magnetischen Nanopartikeln als Markierungsreagenz ist nicht neu; dennoch wurde erst in jüngerer Zeit ein entsprechendes System für Lateral-Flow-Testformate auf den Markt gebracht. Mittels eines Auslesegerätes können nun alle innerhalb der Test- und Kontrolllinie immobilisierten magnetischen Partikel erfasst und analysiert werden. Der Vorteil dieser Methode liegt darin begründet, dass nicht nur die optisch zugängliche Oberfläche, sondern das gesamte Volumen der Testzone ausgelesen wird. Es werden Nachweisgrenzen von 10 fg/mL mit diesem System von der U.S Navy erreicht [LaBordee und O'Farrel, 2002].

Kohlenstoffpartikel scheinen gegenüber den herkömmlichen Labeln wie kolloidalem Gold oder Latex eine höhere Signalintensität zu besitzen [Lönnberg und Carlsson, 2001; Van Amerongen et al., 1994]. Sie sind für eine Konjugierung gebrauchsfertig in verschiedensten Formen und definierten Partikelgrößen erhältlich. Außerdem sind sie kostengünstig, nicht toxisch und Antikörper könnten absorptiv an die große Oberfläche binden.

UPT-Reporter in Kombination mit einer neuartigen optoelektronischen Auswertung [Corstjens et al., 2001 und Corstjens et al., 2003] erlauben ebenfalls eine signifikante Signal-erhöhung. Bei diesem System werden innerhalb der Testzone immobilisierte Lumineszenz-partikel mittels eines Lasers angeregt. Die Auslesung der verzögerungsfreien Emission des Labels zeigt aufgrund von reduzierten Hintergrundsignalen eine um den Faktor 10 erhöhte Empfindlichkeit.

Ein anderer Ansatz stammt von der Sartorius AG [Sartorius AG, 2002] und befindet sich momentan noch in der Patentierungsphase. Eine Signalverstärkung wird dadurch erreicht, dass die poröse Struktur der diagnostischen Cellulosenitratmembran mittels einer Lösung zerstört und in einen klaren, transparenten Cellulosenitratfilm überführt wird. Beträgt die Sicht-tiefe einer diagnostischen Membran ungefähr 10-20 μm , so nimmt der „Signalbeitrag“ tieferer Schichten ab und ein Teil des Testsignals eines LFD geht in der Struktur verloren. Durch die Möglichkeit die Membran transparent zu machen, wird dieser Signalverlust auf mindestens 50% herabgesetzt. Die transparente Membran kann nun im Durchlicht oder Auflicht optisch ausgewertet werden.

Eine chemische Signalverstärkung durch eine Silberfixierung von Goldlabeln [Chandler, 1996; Shyu et al., 2002] kann die Signalintensität um den Faktor 10–100 erhöhen. Somit wer-den Nachweisgrenzen im pg/mL möglich. Bei dieser indirekten Methode lagern sich Silberionen an die in der Testzone immobilisierten Label (kolloidale Goldpartikel) an und werden dann zu elementarem Silber „entwickelt“. Der Anwender kann so mit dem bloßen Auge posi-tive Ergebnisse geringster Analytkonzentrationen ablesen, die ohne Silberfixierung aufgrund der geringen Farbintensität nicht sichtbar gewesen wären.

3.1.3 Typische Entwicklungsprobleme

Die schematische Abbildung eines LFD (Abb. 3-4) zeigt ein relativ einfach aufgebautes Testformat. Dennoch werden die folgenden Kapitel zeigen, dass die Interaktionen der einzel-nen Komponenten eines LFD nicht einfach zu optimieren sind. Der beachtliche Aufwand bis zur Produktionsreife eines verlässlichen Tests zahlt sich dadurch aus, dass einfache, reprodu-zierbare Soforttests für den Laien kostengünstig hergestellt werden können. Die wichtigsten Komponenten und Einflussparameter sind hierbei die Vorbehandlung der verschiedenen Pads, das verwendete Label, die diagnostische Membran und deren Vorbehandlung, Applikation von Test- und Kontrolllinie und die Güte und Eigenschaften der verwendeten Antikörper. Durch die Interaktion der einzelnen Komponenten eines LFD steigt der Entwicklungsaufwand

noch einmal signifikant. In Abb. 3-5 sind einige kritische Zonen eines fertigen Lateral-Flow-Teststreifens dargestellt.

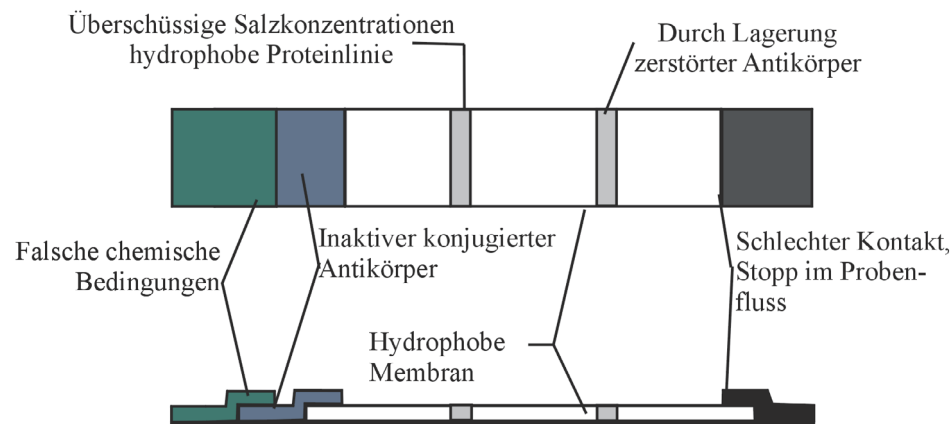


Abb. 3-5: Komponenten eines Lateral-Flow-Tests, die für Entwicklungsprobleme besonders anfällig sind.

So kann die Lösung eines der in Abb. 3-5 dargestellten Probleme durch die Interaktion der Komponenten zu einem anderen Problem führen. Die Schwierigkeiten der Verarbeitung steigen für quantitative Tests, da hier die Farbintensität der Testlinie im Rahmen der Produktionsschwankungen in engen Grenzen reproduzierbar sein muss. Sechs Phänomene beschreiben die Entwicklungsprobleme, die bei der Herstellung eines Lateral-Flow-Tests auftreten können. Sie sind in der Abb. 3-6 dargestellt, ansonsten wird an dieser Stelle auf die einschlägige Literatur verwiesen [Tijssen, 1993.; Price und Newman, 1997; Jones, 1999a; Jones, 1999b; Chandler et al., 2001; Beer et al., 2002].

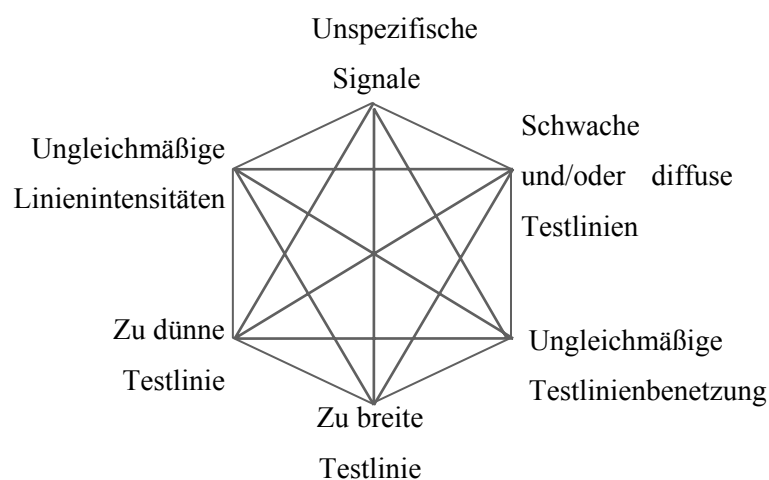


Abb. 3-6: Typische Probleme bei der Entwicklung eines Lateral-Flow-Assays.

Eine wichtige Frage während der Entwicklungsphase ist, ob der Prototyp des betreffenden Testformats eine genügende Stabilität aufweist. Das ist dann der Fall, wenn die Lage-

rungsfähigkeit und die von der Lagerungszeit abhängige Leistungsfähigkeit des Tests dem Anforderungsprofil und dem Kunden genügen. Da in der Entwicklungsphase generell nicht ausreichend Zeit für einen realen Lagertest von beispielsweise drei Jahren vorhanden ist, muss ein Stresstest zur Hilfe genommen werden.

Faktoren wie Luftfeuchtigkeit, Licht und zu hohe Temperaturen wirken sich negativ auf die Stabilität von Membranen, Stabilisatoren, Benetzungsreagenzien, Blockierungsreagenzien und von gelabelten Antikörpern aus. Da Stressfaktoren wie Licht und Luftfeuchtigkeit durch entsprechende Verpackungen fast beseitigt werden können, bleibt als Stressfaktor die Hitze. Daher sind bestimmte Hitzestresstests auch von einigen Regulierungsbehörden verbindlich vorgeschrieben. In Tab. 3-1 werden die Testintervalle für einen typischen Hitzestresstest einer Membran dargestellt. In Tab. 3-2 wird aufgezeigt, wie lange eine Membran verschiedenen Temperaturen ausgesetzt werden muss, um verschiedene Lagerungszeiten zu simulieren [Arista Biologicals; 2002]. Weist der Prototyp eine genügende Stabilität auf, so kann das endgültige Testdesign festgelegt werden.

Tab. 3-1: Empfohlene Testintervalle eines Lateral-Flow-Assays bei einem Lagerungstest in Abhängigkeit von der Temperatur [Arista Biologicals; 2002].

Temperatur [°C]	Testintervall
70	Jeden 2.-3. Tag
60	Einmal wöchentlich
50	Einmal wöchentlich
40	Einmal alle 14 Tage
Raumtemperatur	Einmal monatlich
2-8	Einmal monatlich
-20	Einmal monatlich

Tab. 3-2: Abhängigkeit der simulierten Lagerungszeit eines Lateral-Flow-Assays von der Lagerungstemperatur [Arista Biologicals 2002].

Lagerungstemperatur [°C]	Lagerungszeit 3 Jahre bei RT	Lagerungszeit 2 Jahre bei RT	Lagerungszeit 1 Jahr bei RT
70	3-4 Wochen	2 Wochen	1 Woche
60	2 Monate	1 Monat	2 Wochen
50	6 Monate	2-4 Monate	1 Monat
40	ein Jahr	5-7 Monate	2-3 Monate

3.1.4 Erstellung eines exemplarischen Anforderungsprofils

Der Schwangerschaftstest

Um die Anforderungen an einen LFD besser nachvollziehen zu können, wird nun ein in der Literatur beschriebenes Anforderungsprofil eines Lateral-Flow-Schwangerschaftstests nä-

her betrachtet. Hierfür werden zunächst die biologischen Aspekte des Analyten dargestellt, um diese mit dem beschriebenen Anforderungsprofil abzugleichen.

Das Ausbleiben der Menstruationsblutung ist für die meisten Frauen der erste Hinweis auf eine Schwangerschaft. Zu diesem Zeitpunkt sind seit der Befruchtung der Eizelle im Eileiter mindestens 15 Tage vergangen. Die Eierstöcke beginnen ein bis zwei Tage nach dem Einströmen der befruchteten Eizelle mit der Hormonproduktion, bis ab der 10.-12. Schwangerschaftswoche der Mutterkuchen selbst in der Lage ist, ausreichend humanes Choriongonadotropin (hCG = *human Chorion Gonadotropin*) zu bilden. Als ärztliche Untersuchungsmethoden zur Feststellung einer Schwangerschaft kommen neben der Anamnese die vaginale Untersuchung, der Urintest und der Schwangerschaftsbluttest in Betracht. Wenn der Choriongonadotropin-Wert 10 IU/l im Blut überschritten hat, kann grundsätzlich von einer Schwangerschaft ausgegangen werden (Ausnahmen: Tab. 3-3). Der Bluttest kann schon zu einem sehr frühen Schwangerschaftsstadium für einen Nachweis genutzt werden. Im Harn gelingt der Nachweis bei empfindlichen Tests etwa zum Zeitpunkt der erwarteten Regelblutung und damit erst ein paar Tage später. Als Urintest gibt es in der Apotheke frei verkäufliche Schnelltests nach dem bekannten Lateral-Flow-Format, welche die Frau alleine zu Hause durchführen kann.

Tab. 3-3: Gründe für falsch-negative und falsch-positive Ergebnisse immunologischer Nachweismethoden für humanes Choriongonadotropin.

Falsch-negatives Ergebnis (Test zeigt keine Schwangerschaft an, es besteht aber eine)	Falsch-positives Ergebnis (Test zeigt eine Schwangerschaft an, es besteht aber keine)
Zu starke Verdünnung des Hormons aufgrund einer zu großen Harnmenge.	Blasenmole (Tumor)
Der Eisprung erfolgte später als angenommen.	Keimzelltumoren außerhalb der Keimdrüsen
Die Schwangerschaft ist noch zu jung, um ein positives Ergebnis zu verursachen.	Seltener durch andere Tumoren des Darms, der Niere, der Brust, des Magen-Darmtraktes, der Leber, der Bauchspeicheldrüse, der Lunge, der Eierstöcke.
hCG-Konzentration ist im letzten Schwangerschaftsabschnitt bereits wieder niedrig.	Starke Erhöhung bei Frauen nach der Menopause und Eklampsie.

Humanes Choriongonadotropin (hCG) besteht aus einer Alpha- und einer Beta-Untereinheit. Klinisch wichtig sind das gesamte hCG-Molekül sowie seine Beta-Untereinheit, da bestimmte Tumoren lediglich die freie Beta-Kette sezernieren können. Zur Bestimmung

von hCG und/oder seiner Beta-Untereinheit stehen momentan drei verschiedene Immunoassays zur Verfügung. Diese Immunoassays erfassen entweder das intakte hCG-Molekül, nur die freie Beta-Untereinheit (Beta-hCG) oder sowohl das intakte hCG-Molekül als auch die freie Beta-Untereinheit (hCG + Beta-hCG) [Cole et al., 1994; Alfthan und Stenman, 1996; Birken et al., 1996; Cole, 1997; Elliott et al., 1997].

Ein Anforderungsprofil, das von dem verantwortlichen Forschungs- und Entwicklungsleiter verwirklicht werden sollte, wird beispielsweise von Weiss (1999) beschrieben. Er fordert für die Entwicklung vom Labormaßstab bis hin zur Produktionsreife eines Lateral-Flow-Tests zum Nachweis von hCG im Urin folgende Voraussetzungen:

Anforderungen an den Nachweis einer Schwangerschaft

- 99% der getesteten Realproben mit einer hCG-Konzentration von 25 mIU/mL zeigen ein positives Ergebnis an (Nachweisgrenze zum Nachweis einer Schwangerschaft).
- 99% der getesteten Proben mit einer hCG-Konzentration von unter 5 mIU/mL sind negativ (Ausschluss von falsch-positiven Ergebnissen aus Gründen, wie sie beispielsweise in Tab. 3-3 dargestellt sind).

Anforderungen an die Testperformance

- Im Falle eines funktionsfähigen und richtig verwendeten Tests muss die Kontrolllinie bei allen Proben ein Signal geben (Sicherheit für den Anwender, dass der Test korrekt verlief).
- Das Ergebnis einer positiven Probe ist für den Fachmann innerhalb von 3 Minuten erkennbar (Effektivität des Tests und Einhaltung einer Testzeit von maximal 8 Minuten).
- Dieses Testergebnis muss mindestens 30 Minuten stabil sein (Stabile Reaktionsbedingungen, die zu reproduzierbaren Ergebnissen führen).
- Der Teststreifen wird mit einer entsprechenden Verpackung und mit einer Gebrauchsanweisung geplant und entwickelt (Berücksichtigung und Verbesserung der Lagerungsfähigkeit).
- Die Haltbarkeit des verpackten Produktes beträgt mindestens 18 Monate bei Raumtemperatur (Anforderungen des Kunden).

Wirtschaftliche Aspekte

- Die Herstellungskosten des verkaufsfertigen Produktes dürfen nicht über 25 Cent liegen. Dieser Orientierungsbetrag beinhaltet keine Lizenzgebühren oder andere Verbindlichkeiten, die zur Herstellung nötig sind. Die benötigten Gerätschaften sollten über einen längeren Zeitraum über jährlich verkaufte Stückzahlen abgeschrieben werden. Hierbei bietet es sich an, primär Materialkosten und Laborkosten zu berücksichtigen.
- Das Produkt muss innerhalb von 18 Monaten verkaufsfertig sein. Dieser Zeitrahmen umfasst auch einen Stabilitätstest (4 Monate bei RT), eine Überprüfung der Leistungsfähigkeit, ein abgeschlossenes Produktdesign und ein potentielles Produktionsvolumen, das den vorläufigen Marktanalysen entspricht (Entwicklungs- und Einführungskosten dürfen einen bestimmten Rahmen nicht überschreiten).

Die prinzipiellen Anforderungen an die Testperformance können auf einen BoNT/D-LFD übertragen und angepasst werden. Dieses wird nun im nächsten Kapitel bei der Verwirklichung eines „klassischen“ Entwicklungsansatzes beschrieben.

3.1.5 Entwicklung eines „klassischen“ BoNT/D-LFD-Assays

Das generelle Anforderungsprofil

Die strukturellen Ähnlichkeiten der sieben serologisch unterscheidbaren BoNT-Typen stellen sehr hohe Anforderungen an einen typspezifischen immunologischen Nachweis. Ein möglicher Ansatz zur Berücksichtigung dieses Aspektes stellt ein Sandwich Immunoassay dar, der zum Nachweis die Bildung eines Komplexes zwischen einem Antigen und zwei Antikörpern nutzt. Die biologisch aktive zweikettige Form der Botulinum-Neurotoxine (siehe Kapitel 2) besteht aus einer Schwere (S-Kette, 100 kDa) und einer Leichten Kette (L-Kette, 50 kDa). Damit sind die BoNT mit einer Molekülgröße von ca. 150 kDa groß genug, um von mehreren Antikörpern gebunden zu werden. Darüber hinaus verfügen sie über mehrere immunologisch unterscheidbare Epitope, so dass die Voraussetzungen für die Entwicklung eines LFD im Sandwichformat erfüllt sind (Kapitel 3.1.1). Durch die Verwendung von zwei Antikörpern und somit von zwei Epitopen zum Nachweis eines BoNT-Typs kann die Spezifität soweit erhöht werden, dass ein typspezifischer Nachweis möglich wird.

Wie in Kapitel 2.2.2 dargestellt, ist der Toxinnachweis von BoNT in der Maus nur dann durch eine *In-vitro*-Methode ersetzbar, wenn diese eine Nachweisgrenze in einem Bereich von ca. 50-500 pg/mL besitzt.

In Kapitel 3.1.4 werden grundlegende Voraussetzungen und Anforderungen an einen Lateral-Flow-Schwangerschaftstest dargestellt. Von diesem Profil können die Anforderungen an die Testperformance generell übernommen werden, so dass sich die folgenden Ziele für ein BoNT/D-Lateral-Flow-Assay Anforderungsprofil ergeben:

- Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeiten wird für einen typspezifischen immunologischen Nachweis des BoNT/D ein Sandwich-Immunoassay entwickelt.
- Die Sensitivität des Tests muss zwischen 50-500 pg/mL liegen. Gegebenenfalls müssen Methoden zur Signalverstärkung etabliert und Versuchsdurchführungen standardisiert werden.
- Der Test muss eine einfache Handhabung mit reproduzierbaren Ergebnissen ermöglichen und die Testzeiten müssen vergleichsweise verkürzt sein.
- Der Test muss eine Möglichkeit der Quantifizierung der Testergebnisse besitzen.
- Im Falle eines funktionsfähigen und richtig verwendeten Tests muss die Kontrolllinie bei allen Proben ein Signal geben.
- Das Testergebnis muss mindestens 30 Minuten stabil sein und darf sich nicht verändern. Eine Veränderung der Testlinie deutet auf instabile und nicht reproduzierbare Bedingungen hin.
- Ein Stabilitätstest (3 Monate bei RT) muss zufrieden stellend verlaufen sein.

Ansätze zur Entwicklung eines „klassischen“ BoNT/D-Sandwichassays

Ausgehend von den für diese Arbeit zur Verfügung stehenden Antikörpern und dem erarbeiteten Anforderungsprofil werden in diesem Abschnitt einige mögliche Entwicklungsansätze diskutiert. Dem Anforderungsprofil folgend beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Entwicklung eines Lateral-Flow-Devices im Sandwich-Format zum Nachweis von BoNT/D. Dank der freundlichen Unterstützung des Instituts für angewandte Biotechnologie in den Tropen stehen für die Entwicklung eines BoNT/D Lateral-Flow-Tests folgende drei Toxinantikörper zur Verfügung:

- **Monoklonaler BoNT/D-Antikörper IgG (Maus)** (zukünftig: monoklonaler Antikörper (Maus)), gegen determinante Gruppen der S-Kette gerichtet.
- **Polyklonaler BoNT/D-Antikörper IgY (Huhn)** (zukünftig: polyklonaler Antikörper (Huhn)), gegen determinante Gruppen der S- und L-Kette gerichtet.
- **Biotinylierter polyklonaler BoNT/D-Antikörper IgG (Ziege)** (zukünftig: biotinylierter polyklonaler Antikörper (Ziege)), gegen determinante Gruppen der S- und L-Kette gerichtet.

Für eine Lateral-Flow-Applikation sind kolloidale Goldpartikel mit einer Partikelgröße von ca. 40 nm ein gängiges und in der Literatur gut beschriebenes direktes Markierungsreagenz. Goldkonjugierte Antikörper besitzen hinsichtlich ihrer Verarbeitung in Lateral-Flow-Testformaten hervorragende Eigenschaften (Chandler, 2000; Chandler et al., 2001; Chaudhuri und Raychaudhuri, 2001). Ferner bieten sie die Möglichkeit einer Silberverstärkung mittels der die Testsensitivität erhöht werden kann (Kapitel 3.1.2). Die Goldkonjugierung des monoklonalen Antikörpers (Maus) und des polyklonalen Antikörpers (Huhn) wird von der Firma Alchemy Labs (Dundee, Vereinigtes Königreich) durchgeführt. Für eine Konjugierung des biotinylierten polyklonalen Antikörpers (Ziege) steht nicht die benötigte Antikörpermenge zur Verfügung.

Ausgehend von den verfügbaren Antikörpern bietet es sich an, verschiedene Sandwich-Assays parallel zu entwickeln. Das Probenformat bzw. ein schematischer Aufbau eines „klassischen“ Lateral-Flow-Assay zum Nachweis von BoNT/D ist in Abb. 3-7 dargestellt. Innerhalb eines Sample-Pads eines Lateral-Flow-Assays ist ein goldkonjugierter Antikörper abgelegt.

Durch den Probenauftrag wird dieser in Lösung gebracht und reagiert mit dem Analyten (BoNT/D) innerhalb einer Antigen-Antikörperreaktion. Aufgrund von Kapillarkräften der Membran migriert die Reaktionslösung in Richtung des Absorbent-Pads, wobei sie die Testzone passiert. Innerhalb der Testzone ist ein zweiter, gegen andere determinante Gruppen des Antigens gerichteter Antikörper, immobilisiert. Es kommt zur zweiten immunologischen Reaktion zwischen dem immobilisierten Antikörper und dem Analyten. Die Bildung eines Sandwichkomplexes zwischen dem immobilisierten Antikörper, dem Analyten und dem goldkonjugierten Antikörper ist damit abgeschlossen. Der Sandwichkomplex wird in diesen Testformaten demnach während der Testdurchführung gebildet. Ausgehend von den verfügbaren Antikörpern ergeben sich die vier in Tab. 3-4 dargestellten Kombinationsmöglichkeiten.

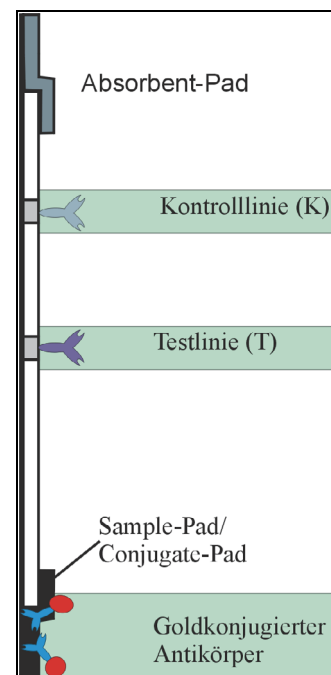


Abb. 3-7: Aufbau und Komponenten eines möglichen „klassischen“ Lateral-Flow-Assay zum Nachweis von BoNT/D.

Tab. 3-4: Mögliche Kombinationen der in der vorliegenden Arbeit verfügbaren BoNT/D-AK zur Entwicklung eines „klassischen“ LFD-Testformats zum Nachweis von BoNT/D (Abb. 3-7).

Goldkonjugierter Antikörper (AK)	Testlinie (Immobilisierter Antikörper)	Kontrolllinie (Immobilisierter Antikörper)
Monoklonaler AK (Maus)	Polyklonaler AK (Huhn)	Anti-Maus-IgG
Monoklonaler AK (Maus)	Biotinylierter polyklonaler AK (Ziege)	Anti-Maus-IgG
Polyklonaler AK (Huhn)	Monoklonaler AK (Maus)	Anti-Huhn-IgY
Polyklonaler AK (Huhn)	Biotinylierter polyklonaler AK (Ziege)	Anti-Huhn-IgY

Mit jeder der vier Kombinationsmöglichkeiten werden im ersten Schritt verschiedene pH-Werte zur Optimierung der immunologischen Reaktion untersucht. Die Vorbehandlung des Release-Pads erfolgt in der Form, dass der als Probenpuffer verwendete Puffer auch zur Release-Pad-Vorbehandlung genutzt wird. In Tab. 3-5 sind die entsprechenden Bedingungen zusammengefasst.

Tab. 3-5: Zur Optimierung der „klassischen“ Lateral-Flow-Assays untersuchte pH-Werte des Probenpuffers und des Belegungspuffers zur Release-Pad-Vorbehandlung.

Probenpuffer	Für die Release-Pad-Vorbehandlung genutzter Belegungspuffer	Zusätzliche Komponenten des Belegungspuffers
KhPhtH-Puffer ²¹ (40 mM, pH 5,2)	KhPhtH-Puffer (40 mM, pH 5,2)	0,6 Gew.-% BSA, 0,4 Gew.-% Tween 20, 1,5 Gew.-% Saccharose
NaP-Puffer (40 mM, pH 6,2)	NaP-Puffer (40 mM, pH 6,2)	
NaP-Puffer (40 mM, pH 7,2)	NaP-Puffer (40 mM, pH 7,2)	
Borat-Puffer (40 mM, pH 8,2)	Borat-Puffer (40 mM, pH 8,2)	
Borat-Puffer (40 mM, pH 9,2)	Borat-Puffer (40 mM, pH 9,2)	

Insgesamt ergeben sich vier verschiedene Kombinationsmöglichkeiten für die Entwicklung eines Lateral-Flow-Tests, die jeweils bei 5 verschiedenen pH-Werten getestet wer-

²¹ KhPhtH-Puffer: Kaliumhydrogenphthalat-Puffer

den. 200 μL des jeweiligen verwendeten und mit verschiedenen BoNT/D-Konzentrationen dotierten Probenpuffers (50, 5, 0,5 und 0 ng/mL) werden direkt auf das den goldkonjugierten Antikörper enthaltene Release-Pad des Teststreifens appliziert. Bei den 20 betrachteten Versuchsbedingungen werden jeweils drei diagnostische Membranen mit unterschiedlichen Migrationsgeschwindigkeiten verwendet (Unisart CN 90, Unisart CN 140 und Unisart CN 200 (Sartorius AG, Göttingen)), die ein breites und gängiges Spektrum an Migrationszeiten bieten. Die Herstellung der Teststreifen und die Testdurchführung sind in Kapitel 7.4.1 beschrieben.

Ergebnisse und Diskussion

Bei keiner der in diesem Kapitel betrachteten 60 verschiedenen Reaktionsbedingungen gelingt ein BoNT/D-Nachweis. Dieses Ergebnis kann durch mehrere Ursachen hervorgerufen werden, wie beispielsweise durch einen inaktivierten immobilisierten Antikörper, ein durch Lagerung beschädigtes Goldkonjugat oder durch andere unspezifische Interaktionen. Ein weiterer Erklärungsansatz ist, dass die Reaktionszeit für die Bildung aller hier diskutierten Sandwichkomplexe in einem Lateral-Flow-Assay durch die Migrationszeit der Membran determiniert wird. Braucht beispielsweise die Probenflüssigkeit 20 Sekunden um bis zur Testlinie zu fließen, so stehen für die Reaktion des goldkonjugierten Antikörpers mit dem Analyten nur diese 20 Sekunden zur Verfügung. Entsprechend ist die Situation für die Reaktion zwischen dem Antigen und dem in der Testlinie immobilisierten Antikörper. Die Reaktionszeit entspricht der durchschnittlichen Durchflussgeschwindigkeit der Testlinie von ca. 1 – 3 Sekunden. Benötigt die immunologische Reaktion für die Einstellung eines für den Nachweis vorteilhaften Gleichgewichtszustandes länger, so ist beispielsweise die Einführung einer Probenvorbereitung ratsam. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Die Bildung eines immunologischen Sandwichkomplexes findet bei den hier untersuchten Bedingungen offensichtlich nicht statt, wodurch ein BoNT/D-Nachweis nicht möglich ist. Die Ursache hierfür ist nicht ersichtlich und für Optimierungsversuche müssen die Eigenschaften der verwendeten Antikörper näher betrachtet werden.
- Weitere Versuche sollten mit einer Probenvorbereitung arbeiten, die optimale Bedingungen (z.B.: pH-Wert, Temperatur, Reaktionszeit) für einen Toxinnachweis bietet. Ein möglicher Ansatz hierfür ist ein Flow-Through-Testformat, welches vom Testablauf dem „immuno-chromatographischen Säulentest“ (Kapitel 2.2.5) ähnlich ist.

Aus diesen Gründen wird im folgenden Abschnitt die Entwicklung eines Flow-Through-Assays beschrieben.

3.2 Der Flow-Through-Assay (FTA)

Mit der Entwicklung von RIA- und ELISA-Technologien begannen immunologische Testformate ihren erfolgreichen Einzug in die klinische Diagnostik. Trotz des großen Potenzials dieser Technologien können auch heute noch Ansatzpunkte zu ihrer Optimierung gefunden werden. So könnte der Kostenfaktor gesenkt werden, indem die relativ zeitintensiven Testdurchführungen durch schnellere Methoden ersetzt würden. Eine Lösung bieten auf diagnostische Membranen aufgebaute Testformate. Dieser Ansatz führte in den frühen 1980er Jahren zu den ersten immunologischen Aufkonzentrierungsformaten, den so genannten Immunoconcentration-/Flow-Through-Tests.

Zum ersten Mal wurde eine Membran nicht nur als Trägermaterial für die Immobilisierung von Antikörpern genutzt. Vielmehr kam die Membran in vertikaler Probenflussrichtung auch als Filtrationsmembran zum Einsatz. Der Vorteil dieses Filtrationsansatzes im Vergleich zu ELISA-Tests besteht darin, dass ein relativ großes Probenvolumen verwendet werden kann, wodurch pro Nachweis mehr potentielle Analytmoleküle zur Verfügung stehen. Auch verringerten sich mittels dieser Formate die Inkubationszeiten von entsprechenden ELISA-Tests um den Faktor 10 [Arista, 2002]. Im Vergleich zu RIA- und ELISA-Technologien entfielen hierbei spezielle Gerätschaften. Mit diesen Verbesserungen konnten Nachweisverfahren für Laien, also einfache und reproduzierbare Soforttests für den Heimanwender, auf den Markt gebracht werden.

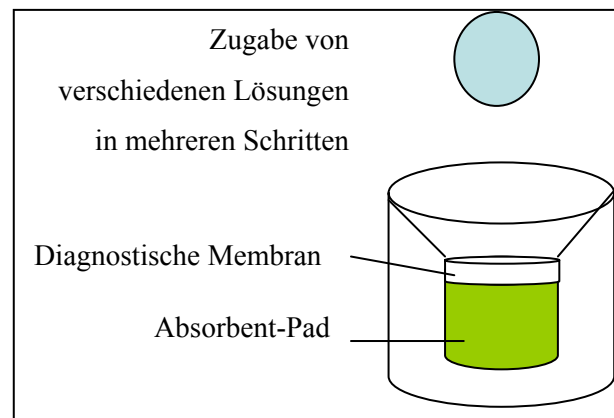


Abb. 3-8: Komponenten und Aufbau eines Flow-Through-Tests.

Ähnlich wie im Falle eines ELISA sind für einen Flow-Through-Test mehrere Versuchsschritte notwendig. So wird beispielsweise bei einem nicht-kompetitiven Test im ersten Schritt eine flüssige Probenlösung auf eine diagnostische Membran aufgetragen (Abb. 3-8). Die diagnostische Membran wurde zuvor mit einer bestimmten Menge eines spezifischen Antikörpers belegt. Wenn in der Probenflüssigkeit das Zielantigen (Analyt) enthalten ist, findet nun die erste immunologische Reaktion zwischen dem Analyten und dem immobilisierten Antikörper statt. Die Folge dieser Reaktion ist eine Aufkonzentrierung des Analyten innerhalb der diagnostischen Membran. Überschüssige Probenflüssigkeit und ungebundene Analytmoleküle werden in Filtrationsrichtung durch das Absorbent-Pad aufgenommen. Im zweiten Schritt wird eine Lösung aufgetragen, welche einen markierten Antikörper enthält.

Schritt wird eine Lösung aufgetragen, welche einen markierten Antikörper enthält. Dieser markierte Antikörper reagiert spezifisch mit einem anderen Epitop des Analyten als der immobilisierte Antikörper. Nach der Applikation des gelabelten Antikörpers fließen alle markierten Antikörper in Filtrationsrichtung durch die Membranmatrix in das Absorbent-Pad. Während dieser Filtration kommt es zur zweiten immunologischen Reaktion zwischen dem gelabelten Antikörper und dem innerhalb der diagnostischen Membran immobilisierten Analyten. Es resultiert eine Aufkonzentrierung des Labels innerhalb der Membranmatrix durch die Ausbildung eines Sandwich-Komplexes zwischen dem Analyten, dem immobilisierten und dem goldkonjugierten Antikörper. Um unspezifische Hintergrundfärbungen und somit falsch-positive Ergebnisse zu verhindern, wird innerhalb eines 3. Schrittes ein Waschpuffer aufgetragen. Überschüssige und ungebundene gelabelte Antikörper werden so aus der Membran in das Absorbent-Pad gewaschen. Ein positives Ergebnis kann anhand der Färbung des Testfeldes erkannt werden.

Auch bei Vorversuchen im Rahmen von anderen Forschungs- und Entwicklungsprojekten bietet dieses Format ideale Charakteristika. So können hier wichtige Parameter von Lateral-Flow-Assays getrennt voneinander untersucht werden. Beispielsweise ist es für einen Vergleich von verschiedenen Antikörpern möglich, die Eigenschaften in Bezug auf die Bindungsaffinität zur Membran, Kreuzreaktivitäten und Bindungsaffinitäten zum Analyten zu ermitteln. Zusätzlich können erste kinetische Untersuchungen erfolgen, die Auskunft über den optimalen pH-Wert, die Reaktionsgeschwindigkeit, die optimalen Konzentrationen der Reaktanden und die Güte der markierten Antikörper geben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird das Flow-Through-Testformat zur Untersuchung verschiedener Parameter genutzt. Die Ergebnisse werden in den folgenden Unterkapiteln zusammengefasst.

3.2.1 Entwicklung des *BoNT/D-Flow-Through-Assays 1*

In Anlehnung an den in Kapitel 2.2.5 beschriebenen immunochromatographischen Säulentest wird der Flow-Through-Assay 1 aufgebaut. Auch bei diesem Flow-Through-Test wird innerhalb einer Probenvorbereitung zwischen dem Analyten und einem monoklonalen Antikörper (Maus) sowie einem biotinylierten polyklonalen Antikörper (Ziege) ein Sandwich-Komplex ausgebildet. Diese Sandwich-Komplexe werden dann bei der Durchführung eines Flow-Through-Tests mittels eines

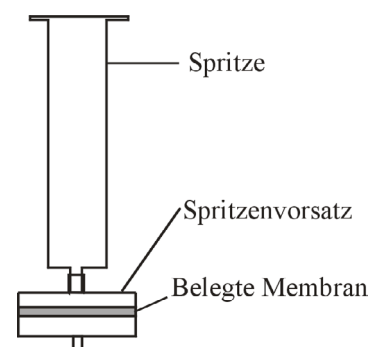


Abb. 3-9: Komponenten und Aufbau eines Flow-Through-Assays.

immobilisierten sekundären Antikörpers (Anti-Maus-IgG, Ziege) innerhalb eines Testfeldes immobilisiert. Durch einen weiteren Schritt wird an das Biotin des biotinylierten polyklonalen Antikörpers HRP-konjugiertes (horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase) Streptavidin gekoppelt. Der Farbnachweis des Toxin-Komplexes erfolgt aufgrund einer enzymatischen Reaktion der Meerrettichperoxidase mit einem Färbungsreagenz. In Abb. 3-9 ist der verwendete Flow-Through-Assay dargestellt, die Flow-Through-Assayherstellung ist in Kapitel 7.2.1 beschrieben.

Probenvorbereitung und Testdurchführung

Für eine Probenvorbereitung werden 500 μL eines mit verschiedenen BoNT/D-Konzentrationen versetzten 28 mM GP-Puffers (pH 6,2) auf folgende Antikörperkonzentrationen eingestellt:

0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ monoklonaler Antikörper (Maus)

0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ biotinylierter polyklonaler Antikörper (Ziege)

Die dotierten Probenpuffer werden über Nacht (12 h) bei 37°C auf einem Überkopfschüttler bei ständiger Drehbewegung auf niedrigster Stufe inkubiert. Unmittelbar vor der Flow-Trough-Testdurchführung werden die Flow-Through-Membranproben mittels eines 28 mM GP-Puffers (pH 6,2) benetzt, in Filtrationsvorsätze eingelegt und mit einer 1-ml-Spritze versehen (Abb. 3-9). Dann erfolgen mehrere Filtrationsschritte in der unten angegebenen Reihenfolge. Der sich anschließende Schritt erfolgt immer erst dann, wenn die jeweilige Lösung vollständig durchgelaufen ist. Die Durchtropfgeschwindigkeit beträgt pro Minute ca. 100 μL . Es handelt sich um eine Filtration über Schwerkraft.

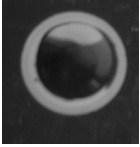
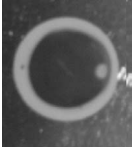

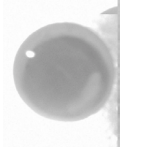
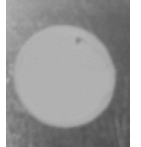
- Waschen mit 750 μL eines 28 mM GP-Puffers (pH 6,2)
- Zugabe des mit Toxin dotierten Probenpuffers (500 μL)
- 3 x Waschen mit jeweils 750 μL Caseinpuffer (pH 7,2)
- Zugabe von 500 μL einer HRP-konjugierten Streptavidinlösung
- 2 x Waschen mit jeweils 750 μL Caseinpuffer (pH 7,2)
- Waschen mit 750 μL dest. Wasser (sterilfiltriert)
- Zugabe von 500 μL BM-Blue (Farbstoff). Nach ca. 5 Minuten tritt bei den Proben die in Tab. 3-6 angegebene Färbung auf.

Tab. 3-6: Ergebnisse eines Flow-Through-Assays vor einem Waschschrift

50 ng/mL [BoNT/D]	5 ng/mL [BoNT/D]	500 pg/mL [BoNT/D]	50 pg/mL [BoNT/D]	Blindprobe
Sehr deutliche Blaufärbung	Deutliche Blaufärbung	Schwache Blaufärbung	Schwache Blaufärbung	Leichte Färbung

- Stoppen und Waschen durch zweimalige Zugabe von 750 μ L dest. Wasser
- Nach dem letzten Waschschrift werden die Membranen aus dem Filtrationsvorsatz herausgenommen und getrocknet. In Tab. 3-7 sind die Ergebnisse dargestellt.

Tab. 3-7: Ergebnisse des Flow-Through-Assays 1 nach Abschluss der Versuchsdurchführung und nach Einführung eines Waschschriftes.

50 ng/mL [BoNT/D]	5 ng/mL [BoNT/D]	500 pg/mL [BoNT/D]	50 pg/mL [BoNT/D]	Blindprobe
Sehr deutliche Blaufärbung	Deutliche Blau- färbung	Schwache Blau- färbung	Sehr schwache Blaufärbung	Keine Färbung
				

Die in Tab. 3-7 dargestellten Proben weisen alle eine ungleichmäßige Beleuchtung und einen ungleichmäßigen Hintergrund auf. Diese Phänomene werden durch das verwendete Aufnahmesystem hervorgerufen, so dass sich nicht die visuelle Beurteilung und die Qualität des Tests beeinflussen. Auffällig ist, dass die abgebildeten Membranen alle eine ungleichmäßige Färbung der Oberfläche (Testfeld) zeigen. Dieses kann auf einen ungleichmäßigen Probenfluss in Filtrationsrichtung hindeuten. Auf der Membranoberfläche verbleibende Luftblasen können dieses Phänomen hervorrufen, womit es sich um ein technisches Problem handeln würde. Die Farbintensität der Blaufärbung der Membranen nimmt entsprechend der Toxin-konzentration von sehr intensiv (50 ng/mL BoNT/D) bis sehr schwach (50 pg/mL BoNT/D) bzw. keine Färbung (Blindwert) ab. Damit ist ein semiquantitativer Nachweis von BoNT/D erbracht, da ab einer bestimmten Toxinkonzentration ein Farbsignal auftritt, dessen Intensität in dem betrachteten Konzentrationsbereich mit der Toxinkonzentration korreliert.

Fraglich ist, ob darüber hinaus eine quantitative Auswertung des Flow-Through-Tests mittels einer optischen Auswertung der Oberflächenfärbung vorgenommen werden kann. Aufgrund von technischen Problemen bei der Testdurchführung entsteht ein ungleichmäßiger Probenfluss durch die Membran. Die daraus resultierenden Unregelmäßigkeiten der Färbung

der Membranoberfläche (Tab. 3-7) haben einen signifikanten Einfluss auf eine optische Auswertung. So entfallen für eine optische Auswertung unreproduzierbar bis zu 30% der auszuwertenden Membranoberfläche. Der daraus resultierende Fehler führt nur zu qualitativen Aussagen über eine Toxinkonzentration.

3.2.2 Entwicklung des BoNT/D-Flow-Through-Assays 2

Nach einer erfolgreichen Übertragung des in Kapitel 2.2.5 beschriebenen immunochromatographischen Assays auf den Flow-Through-Assay 1, kann der Einfluss der Goldkonjugierung auf die Testperformance untersucht werden. Hierfür wird der biotinylierte polyklonale Antikörper (Ziege) durch einen goldkonjugierten polyklonalen Antikörper (Huhn) ersetzt. Da bei Format ein von vornherein farbiges Label eingesetzt wird, entfallen bei dieser Testdurchführung die Biotin-Streptavidin-Kopplung und der darauf folgende indirekte Färbeschritt mittels einer enzymatischen Reaktion.

Die verpackten gebrauchsfertigen Flow-Through-Membranen (Herstellung in Kapitel 7.2.1) werden unmittelbar vor ihrer Nutzung mittels eines GP-Puffers (28 mM, pH 6,2) benetzt, in Filtrationsvorsätze eingelegt und mit einer 1-ml-Spritze versehen (Abb. 3-9). Im Rahmen der Probenvorbereitung werden jeweils 500 μ L der in Tab. 3-8 angegebenen Probenpuffer angesetzt.

Tab. 3-8: Zur Optimierung des Flow-Through-Assays 2 untersuchte pH-Werte des Probenpuffers, verwendete Antikörperkonzentrationen und BoNT/D-Konzentrationen.

Probenpuffer	Für die Probenvorbereitung enthaltene Antikörper	Untersuchte BoNT/D-Konzentrationen
KhPhtH-Puffer ²² (40 mM, pH 5,2)	0,3 μ g/mL monoklonaler Antikörper (Maus)	50 ng/mL; 5 ng/mL; 0,5 ng/mL; 0 ng/mL
NaP-Puffer (40 mM, pH 6,2)		
NaP-Puffer (40 mM, pH 7,2)		
Borat-Puffer (40 mM, pH 8,2)	1,0 μ g/mL goldkonjugierter polyklonaler Antikörper (Huhn)	
Borat-Puffer (40 mM, pH 9,2)		

²² KhPhtH-Puffer: Kaliumhydrogenphthalat-Puffer

pH-Optimierung

Zunächst soll der optimale pH-Wert für die Ausbildung des Sandwichkomplexes ermittelt werden. Eine Inkubation bei 37°C auf einem Überkopfschüttler bei ständiger Drehbewegung auf niedrigster Stufe führt in einem ersten Ansatz zu einer Beschädigung des goldkonjugierten Antikörpers. Diese Beschädigung ist durch einen Farbwechsel der Goldkonjugatlösung von rot zu violett bis braun-violett und durch unspezifisches Bindungsverhalten zu erkennen (falsch-positive Ergebnisse). Um derartige Beschädigungen zu verhindern, werden die in Tab. 3-8 angegebenen dotierten Probenpuffer über Nacht bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert, was zu keiner Beschädigung des goldkonjugierten Antikörpers führt.

Unmittelbar vor der Flow-Trough-Testdurchführung werden die Membranproben mittels eines GP-Puffers (28 mM, pH 6,2) benetzt, in Filtrationsvorsätze eingelegt und mit einer 1-ml-Spritze versehen (Abb. 3-9). Dann werden mehrere Filtrationsschritte in der unten angegebenen Reihenfolge durchgeführt. Der sich anschließende Schritt erfolgt immer erst dann, wenn die jeweilige Lösung vollständig durchgelaufen ist. Die Durchtropfgeschwindigkeit bei dieser Filtration über Schwerkraft beträgt ca. 100 µL/Minute.

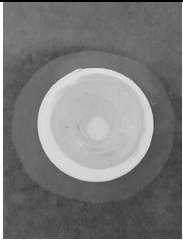
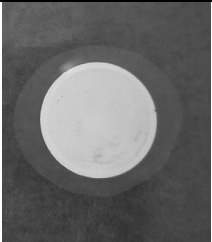
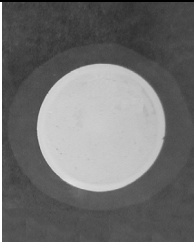
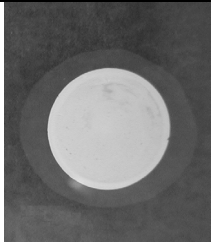
- Waschen mit 750 µL des zur Verdünnung genutzten Probenpuffers (Tab. 3-8)
- Zugabe der dotierten Testproben (jeweils 500µL)
- 3 x Waschen mit jeweils 750 µL des zur Verdünnung genutzten Probenpuffers (Tab. 3-8). In Tab. 3-9 und Tab. 3-10 sind die Ergebnisse dargestellt.

Tab. 3-9: Ergebnisse verschiedener pH-Werte des Probenpuffers auf die Testsensitivität des Flow-Through-Assay 2.

Probenpuffer	Sensitivität
40 mM KhPhtH-Puffer (pH 5,2)	Kein Signal
40 mM NaP-Puffer (pH 6,2)	Kein Signal
40 mM NaP-Puffer (pH 7,2)	50 ng/mL
40 mM Borat-Puffer (pH 8,2)	Kein Signal
40 mM Borat-Puffer (pH 9,2)	Kein Signal

Die Ergebnisse zeigen, dass der für die immunologische Bildung eines Sandwichkomplexes optimale pH-Wert bei 7,2 liegt, da bei keinem anderen pH-Wert ein Nachweis des Toxins gelingt. Die Nachweisgrenze bei einem pH-Wert von 7,2 beträgt 50 ng/mL und damit liegt die Sensitivität um den Faktor 1.000 unter der bei dem oben beschriebenen Flow-Through-Assay 1 mit einer indirekten enzymatischen Färbereaktion.

Tab. 3-10: Ergebnisse des Lateral-Flow-Assays 2 bei Verwendung eines Probenpuffers mit einem pH-Wert von 7,2.

50 ng/mL [BoNT/D]	5 ng/mL [BoNT/D]	500 pg/mL [BoNT/D]	Blindprobe
Sehr schwache Rotfärbung	Keine Färbung	Keine Färbung	Keine Färbung
			

Auch zeigt sich bei den in Tab. 3-10 abgebildeten Membranproben wieder eine ungleichmäßige Färbung der Oberfläche, welche eine quantitative optische Auswertung erschwert. Eine Variation der Inkubationszeit von 6, 8 und 18 Stunden sowie eine Variation der Durchtropfgeschwindigkeit von 100, 75, 50, 25 $\mu\text{L}/\text{Min}$. können die Sensitivität der in Tab. 3-9 dargestellten Ergebnisse nicht beeinflussen. Die Bildung des Sandwichkomplexes scheint innerhalb einer Probenvorbereitungszeit von 6 Stunden abgeschlossen zu sein, da mit dieser Inkubationszeit ein BoNT/D-Toxinnachweis möglich ist. Der Wegfall der Inkubation führt zu keinem positiven Signal in dem betrachteten Konzentrationsbereich.

3.2.3 Entwicklung des BoNT/D-Flow-Through-Assays 3

Ein weiterer Entwicklungsansatz ist die Verwendung einer Kombination eines goldkonjugierten monoklonalen Antikörpers (Maus) mit einem polyklonalen Antikörper (Huhn). Auch bei diesem Ansatz erfolgt der Nachweis des BoNT/D mittels der Bildung eines Sandwichkomplexes, diesmal durch eine Reaktion des polyklonalen Antikörpers (Huhn), des Toxins und des goldkonjugierten monoklonalen Antikörpers (Maus). Dieser mobile Sandwichkomplex wird mittels einer Antigen-Antikörperreaktion zwischen dem polyklonalen Antikörper (Huhn) und einem Anti-Huhn-IgY (Ziege) innerhalb der Testzone immobilisiert. Die Belegung der Membran erfolgt entsprechend der in Kapitel 7.2.3 beschriebenen Vorschrift. Zur Untersuchung des optimalen pH-Wertes werden jeweils 500 μL der in Tab. 2-1 angegebenen Testlösungen angesetzt.

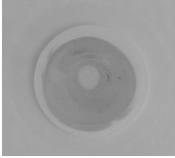
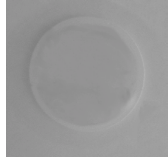


Die Probenpuffer werden mit Toxin dotiert und über Nacht bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert. Unmittelbar vor der Flow-Trough-Testdurchführung werden die Membranproben mittels eines GP-Puffers (28 mM, pH 6,2) benetzt, in Filtrationsvorsätze eingelegt und mit einer 1-ml-Spritze versehen (Abb. 3-9). Dann werden die Filtrationsschritte in der unten angegebenen Reihenfolge durchgeführt. Der sich anschließende Schritt erfolgt immer erst dann, wenn die jeweilige Lösung vollständig durchgelaufen ist. Die Durchtropfgeschwindigkeit bei dieser Filtration über Schwerkraft beträgt ca. 100µL/Minute.

- Waschen mit 750 µL des zur Verdünnung genutzten Probenpuffers (Tab. 3-10)
- Zugabe der dotierten Testproben (jeweils 500µL)
- 3 x Waschen mit jeweils 750 µL des zur Verdünnung genutzten Probenpuffers (Tab. 3-10). In Tab. 3-11 und Tab. 3-12 sind die Ergebnisse dargestellt.

Tab. 3-11: Einfluss verschiedener pH-Werte des Probenpuffers auf die Testsensitivität des Flow-Through-Assays 3.

Probenpuffer	Sensitivität
40 mM KhPhtH-Puffer (pH 5,2)	Kein Signal
40 mM NaP-Puffer (pH 6,2)	50 ng/mL
40 mM NaP- Puffer (pH 7,2)	Kein Signal
40 mM Borat-Puffer (pH 8,2)	Kein Signal
40 mM Borat-Puffer (pH 9,2)	Kein Signal

Tab. 3-12: Darstellung der Ergebnisse des Lateral-Flow-Assays 3 bei Verwendung eines Probenpuffers mit einem pH-Wert von 6,2.

50 ng/mL [BoNT/D]	5 ng/mL [BoNT/D]	500 pg/mL [BoNT/D]	Blindprobe
Schwache Rotfärbung	Keine Färbung	Keine Färbung	Keine Färbung
			

Werden die Ergebnisse zusammengefasst, so beträgt der für diese immunologische Reaktion optimale pH-Wert 6,2. Eine Änderung des pH-Wertes hat zur Folge, dass kein BoNT/D-Nachweis möglich ist. Bei einem pH-Wert von 6,2 wird hingegen eine Sensitivität

von 50 pg/mL erreicht. Diese Sensitivität ist um den Faktor 1.000 geringer als die Sensitivität des am Anfang dieses Kapitels beschriebenen Flow-Through-Assays 1. Entsprechend der beiden zuvor beschriebenen Flow-Through-Assays tritt auch bei diesem Assay eine ungleichmäßige Färbung der Oberfläche auf, welche eine optische Auswertung erschwert.

Ein Versuch durch verschiedene Inkubationszeiten von 6, 8 und 18 Stunden oder durch eine Herabsetzung der Durchtropfgeschwindigkeit auf 100, 75, 50 und 25 $\mu\text{L}/\text{Min.}$ auf die Sensitivität Einfluss zu nehmen, gelingt nicht. Die Sensitivität wird bei allen Variationen nicht beeinflusst. Ohne eine Probenvorbereitung hingegen ist in dem betrachteten Konzentrationsbereich kein Nachweis möglich.

3.3 Zusammenfassung

Zuerst wurden in diesem Kapitel folgende Anforderungen an einen Lateral-Flow-Test zum Nachweis von BoNT/D erarbeitet:

- Für einen typspezifischen immunologischen Nachweis des BoNT/D ist die Entwicklung eines Sandwich-Immunoassays notwendig, dessen Sensitivität zwischen 50-500 pg/mL liegt. Gegebenenfalls müssen Methoden zur Signalverstärkung etabliert und Versuchsdurchführungen standardisiert werden.
- Der Test muss eine einfache Handhabung mit reproduzierbaren Ergebnissen ermöglichen und die Testzeiten müssen vergleichsweise verkürzt sein.
- Der Test muss eine Möglichkeit der Quantifizierung der Testergebnisse besitzen.
- Das Testsignal muss mindestens 30 Minuten stabil sein und darf sich nicht verändern. Eine Veränderung der Testlinie beweist instabile und nicht reproduzierbare Bedingungen.
- Ein Stabilitätstest (3 Monate bei RT) muss zufrieden stellend verlaufen sein.

Ausgehend von den verfügbaren Antikörpern wurde ein „klassischer“ Lateral-Flow-Sandwichassay untersucht. Die Ergebnisse der Optimierungsversuche können wie folgt zusammengefasst werden:

- Bei keiner der betrachteten Reaktionsbedingungen ist ein BoNT/D-Nachweis möglich.
- Ein möglicher Optimierungsansatz ist bei diesem Assayformat nicht ersichtlich.

Zur Untersuchung des Einflusses eines Probenvorbereitungsschrittes und anderer Parameter, wird in der vorliegenden Arbeit ein Flow-Through-Testformat verwendet, das dem in Kapitel 2.2.5 beschriebenen immunochromatographischen Säulentest ähnelt. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Es wurden drei Flow-Through-Testformate entwickelt, mittels derer das BoNT/D semi-quantitativ nachgewiesen werden kann.
- Bei Verwendung einer enzymatischen Färbereaktion kann die angestrebte Nachweisgrenze von 50 pg/mL erreicht werden. Der Einsatz von goldkonjugierten Antikörpern führt bei den anderen beiden Flow-Through-Assays zu einer Herabsetzung der Testsensitivität um den Faktor 1.000.
- Eine Quantifizierung der Ergebnisse mit Hilfe einer optischen Auswertung ist bei allen drei Assays aufgrund von ungleichmäßigen Färbungen der Testzonen nicht sinnvoll.
- In weiterführenden Arbeiten könnten die durch Luftblasen hervorgerufenen Artefakte eventuell durch eine vorgeschaltete Verteilerschicht auf der Membran verhindert werden.
- Die Bildung eines mobilen Sandwich-Komplexes zwischen dem Toxin und zwei weiteren Antikörpern ist bei allen drei Assays spätestens nach 6 Stunden abgeschlossen.
- Wie zu erwarten hat der pH-Wert des Probenvorbereitungspuffers einen signifikanten Einfluss auf die Testsensitivität. Zukünftig werden daher zuerst optimale pH-Werte für ein Testformat ermittelt, bevor andere Parameter untersucht werden.
- Eine Inkubation bei 37°C auf einem Überkopfschüttler bei ständiger Drehbewegung auf niedrigster Stufe führt zur Beschädigung der goldkonjugierten Antikörper. Deshalb werden alle zukünftigen Inkubationen im Wasserbad durchgeführt.

Die in diesem Abschnitt gewonnenen Ergebnisse werden im nächsten Kapitel dazu genutzt, einen Lateral-Flow-Assay mit Probenvorbereitung zu entwickeln.

4 ERGEBNISSE DER LATERAL-FLOW-ASSAYS

Gemäß dem Infektionsschutzgesetz (ehem. Bundesseuchengesetz) sind Arbeiten mit dem *Clostridium-botulinum* und den Botulinum-Neurotoxinen in Laboratorien durchzuführen die der Sicherheitsstufe 2 entsprechen. Aus diesem Grund sind alle praktischen Arbeiten mit dem Botulinum-Neurotoxin Typ D in den L2-Laboratorien des „Instituts für angewandte Biotechnologie in den Tropen“ (Göttingen) erfolgt. Für jeden in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuch wird eine bei -80°C gelagerte Toxinprobe der Stammlösung frisch aufgetaut und nach Gebrauch verworfen.

Für die Entwicklung eines immunochromatographischen Assays zum Nachweis von BoNT/D, wurde in Kapitel 3.1.5 zunächst ein „klassischer“ Lateral-Flow-Ansatz im Sandwichformat gewählt. Bei diesem Format bildet sich zwischen dem Toxin, dem immobilisierten und dem goldkonjugierten Antikörper während der Testdurchführung ein Sandwichkomplex. In Anbetracht der verfügbaren Antikörper ergeben sich vier verschiedene Kombinationsmöglichkeiten, die bei verschiedenen pH-Werten und mit verschiedenen diagnostischen Membranen getestet wurden. Keine der betrachteten Reaktionsbedingungen ermöglicht einen BoNT/D-Nachweis.

Bei der Untersuchung der Effizienz einer Probenvorbereitung konnten drei Flow-Through-Tests erfolgreich entwickelt werden. Hier wird deutlich, dass die Bildung eines mobilen Sandwich-Komplexes zwischen dem Toxin und zwei weiteren Antikörpern innerhalb von 6 Stunden abgeschlossen ist. Diese Ergebnisse erhärten die Annahme, dass die Bildung eines Sandwichkomplexes bei allen untersuchten Lateral-Flow-Assays grundsätzlich stattfinden könnte, wenn hierfür genügend Reaktionszeit zur Verfügung stünde. Wie bereits in Kapitel 3.3 erläutert, wird in einem Lateral-Flow-Assay die Reaktionszeit der immunologischen Reaktion durch die Migrationszeit (laterale Fließgeschwindigkeit) der Membran determiniert. Benötigt diese Reaktion eine längere Reaktionszeit, so ist eventuell die Einführung einer Probenvorbereitung unumgänglich. Aufbauend auf Kapitel 3 und in Anlehnung an den immunochromatographischen Säulentest kann nun der folgende Ansatzpunkt zur Entwicklung eines Lateral-Flow-Assays untersucht werden.

Der in Abb. 4-1 dargestellte Reaktionsablauf mit Probenvorbereitung zeigt das Grundschema eines entsprechenden Testformates. Hier wird im Rahmen einer effektiven Probenvorbereitung sichergestellt, dass die zum Nachweis benötigte Bildung des Sandwichkomplexes zwischen einem goldkonjugierten Antikörper, dem Toxin und einem weiteren Antikörper

vollständig erfolgen kann. Nach Ausbildung der mobilen Sandwichkomplexe werden diese mittels eines Lateral-Flow-Assays nachgewiesen. Innerhalb der Testlinie des Lateral-Flow-Assays wird ein so genanntes „Capture-Reagenz“ („Fängerreagenz“) immobilisiert, welches gegen den Antikörper AK2 des mobilen Sandwichkomplexes gerichtet ist.

Daraus resultiert im Falle einer toxischen Probe ein positives Testergebnis, indem die goldgelabelten mobilen Sandwichkomplexe abgefangen werden, so dass sich eine Färbung der Testlinie ergibt. Der Vorteil der zusätzlichen Probenvorbereitung liegt darin begründet, dass die Bedingungen (pH-Wert, Reaktionszeit, etc.) optimal auf die jeweilige immunologische Reaktion angepasst werden können.

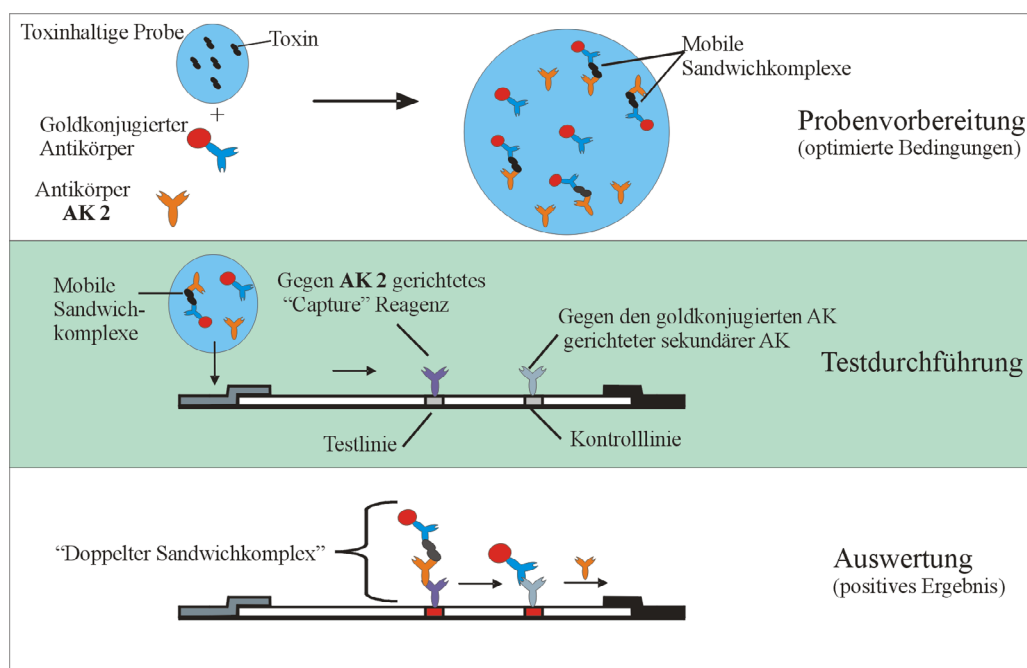


Abb. 4-1: Mögliches Lateral-Flow-Testformat mit separater Probenvorbereitung zum Nachweis von BoNT/D. Innerhalb der Probenvorbereitung kommt es zur Ausbildung eines „mobilen“ Sandwichkomplexes, der dann mittels eines Lateral-Flow-Assays nachgewiesen werden kann.

Berücksichtigt man die verfügbaren Antikörper, so ergeben sich die vier in Tab. 4-1 erläuterten Kombinationsmöglichkeiten. Diese vier Kombinationsmöglichkeiten werden in diesem Kapitel nacheinander näher untersucht, und im letzten Abschnitt mit Realproben getestet.

Tab. 4-1: Mögliche Kombinationen der in der vorliegenden Arbeit verfügbaren BoNT/D-AK zur Entwicklung eines LFD-Testformats mit separater Probenvorbereitung.

Nr.	Goldkonjugierter Antikörper (AK)	Antikörper AK 2	„Capture“ Reagenz Testlinie	Sekundärer AK Kontrolllinie
1	Polyklonaler AK (Huhn)	Monoklonaler AK (Maus)	Anti-Maus-IgG	Anti-Huhn-IgY
2	Monoklonaler AK (Maus)	Polyklonaler AK (Huhn)	Anti-Huhn-IgY	Anti-Maus-IgG
3	Monoklonaler AK (Maus)	Biotinylierter polyklonaler AK (Ziege)	Streptavidin	Anti-Maus-IgG
4	Polyklonaler AK (Huhn)	Biotinylierter polyklonaler AK (Ziege)	Streptavidin	Anti-Huhn-IgY

4.1 Lateral-Flow-Assay 1

Innerhalb der Probenvorbereitung der ersten Kombinationsmöglichkeit (Tab. 4-1) soll ein „mobiler Sandwichkomplex“ zwischen dem Analyten BoNT/D, einem goldkonjugierten polyklonalen Antikörper (Huhn) und einem monoklonalen Antikörper (Maus) gebildet werden. Damit ergibt sich der Aufbau des Lateral-Flow-Assays 1 in Abb. 4-2.

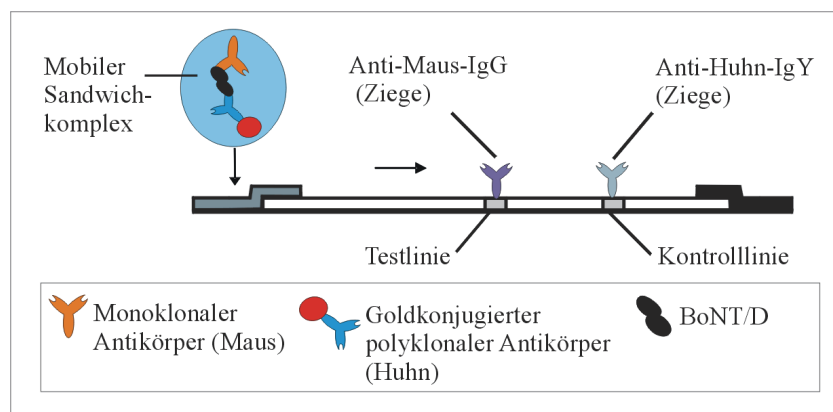


Abb. 4-2: Aufbau und Komponenten des Lateral-Flow-Assays 1.

Nach Bildung des mobilen Sandwichkomplexes wird die Probenlösung auf das mit Detergenzien vorbehandelte Release-Pad des Lateral-Flow-Assays appliziert. Zur Belegung des Release-Pads werden die Detergenzien BSA, Tween 20 und Saccharose eingesetzt. Sie werden durch die aufgetragene Probenlösung in Lösung gebracht und fließen mit der Probenlösung den Teststreifen entlang. Das BSA dient zur unspezifischen Blockierung der unbelegten Oberflächenplätze der diagnostischen Membran während des Probenflusses. Tween 20 beeinflusst die Migrationsgeschwindigkeit der Probenlösung, zusätzlich fungiert es als unспе-

zifisches Blockierungsreagenz für freie Oberflächenplätze der Membran, und es hat positive Auswirkungen auf den Probenfluss (beispielsweise: Beseitigung von Benetzungsproblemen der Test und Kontrolllinie, Beseitigung ungleichmäßiger Lauffronten, etc.) [Arista, 2002]. Saccharose wird verwendet, um die Löslichkeit des BSA über einen längeren Zeitraum zu erhalten und trägt damit zur Haltbarkeit des Testsystems bei [Whatman, 2002]. Um zusätzliche Einflussparameter zu minimieren, entspricht der Belegungspuffer dem verwendeten Probenpuffer (Tab. 4-3); ergänzt um 0,4 Gew.-% Tween 20 und 5 Gew. -% Saccharose.

Linienapplikation

Die Test- und Kontrolllinie werden mittels eines BioDot-Dispensersystems (BioDot XYZ, BioDot Ltd, Hantington, England) mit vier separat steuerbaren Dispensern (BioJet Quanti 3000) appliziert. Die verwendeten Applikationseinstellungen sind in Tab. 4-2 dargestellt. Der Auftrag der Testlinie erfolgt mit einer Anti-Maus-IgG Proteinlösung (Anti-Maus-IgG (Ziege), 1 mg/mL in 20 mM NaP-Puffer (pH 8,0), 150 mM NaCl). Die Applikation der Kontrolllinie wird mit einer Anti-Huhn-IgY Proteinlösung (Anti-Huhn-IgY (Ziege), 2,0 mg/mL applikationsfertige Lösung) vorgenommen. Die Applikationshöhe der Testlinie beträgt 1,5 cm von der Unterkante einer 30 cm langen und 2,5 cm hohen Diagnostikmembran.

Tab. 4-2: BioDot-Einstellungen für eine Testlinienapplikation.

Tröpfchenvolumen („ <i>drop</i> “)	20,83 [nL]
Vorschubgeschw. („ <i>speed</i> “)	50 [mm/ s]
Auftragsmenge („ <i>rate</i> “)	0,87 [μ L/ cm]
Öffnungszeit („ <i>on time</i> “)	0,20 [ms]

0,5 cm oberhalb der Testlinie wird die Kontrolllinie aufgetragen. Die Membranproben werden anschließend 30 Minuten bei 40 °C im Trockenschrank getrocknet und danach mit Trocknungsmitteln in Siegelrandbeutel aus Alu-Verbundfolie verpackt und bis zum Gebrauch bei Raumtemperatur gelagert.

Release-Pad-Vorbehandlung und Testherstellung

Für die Behandlung von 20 Release-Pads (2,5 cm breit, 25 cm lang) wird 1 L des jeweiligen Belegungspuffers frisch angesetzt. Der Belegungspuffer entspricht dem verwendeten Probenpuffer, ergänzt um 0,6 Gew.-% BSA, 0,4 Gew.-% Tween 20 und 5 Gew. -% Saccharose (siehe Tab. 4-3).

Tab. 4-3: Zur Optimierung des Lateral-Flow-Assays 1 untersuchte pH-Werte des Probenpuffers, des Release-Pad-Belegungspuffers und zusätzlich verwendete Komponenten des Belegungspuffers.

Probenpuffer	Für die Release-Pad-Vorbehandlung genutzter Belegungspuffer	Zusätzliche Komponenten des Belegungspuffers
KhPhtH-Puffer ²³ (40 mM, pH 5,2)	KhPhtH-Puffer (40 mM, pH 5,2)	0,6 Gew.-% BSA, 0,4 Gew.-% Tween 20, 5 Gew.-% Saccharose
NaP-Puffer (40 mM, pH 6,2)	NaP-Puffer (40 mM, pH 6,2)	
NaP-Puffer (40 mM, pH 7,2)	NaP-Puffer (40 mM, pH 7,2)	
Borat-Puffer (40 mM, pH 8,2)	Borat-Puffer (40 mM, pH 8,2)	
Borat-Puffer (40 mM, pH 9,2)	Borat-Puffer (40 mM, pH 9,2)	

Die unbehandelten Release-Pads werden in dem Belegungspuffer eingelegt, so dass sie vollständig mit Lösung bedeckt sind und 4 h bei RT geschüttelt. Anschließend werden die Pads flach auf einen Labortisch gelegt und bei Raumtemperatur zwei Stunden getrocknet. Danach folgt eine Trocknung für 30 Minuten bei 30 °C im Trockenschrank. Die vorbehandelten Release-Pads werden mit Trocknungsmitteln in Siegelrandbeutel aus Alu-Verbundfolie verpackt und bis zum Gebrauch bei RT gelagert. Die präparierten Membranproben, Absorbent-Pads und Release-Pads werden auf einer G&L-Unterstützung zusammengesetzt. Die so präparierten Dipstick-Karten werden mittels einer Schlagschere in 0,5 x 7,5 cm große Streifen geschnitten.

Einfluss des pH-Wertes

Im ersten Schritt wird der optimale pH-Wert für die Bildung des Sandwichkomplexes ermittelt. Alle in Tab. 4-3 aufgeführten Probenpuffer werden hierfür mit verschiedenen BoNT/D-Konzentrationen versetzt. Jeder Probenlösung werden danach der monoklonale Antikörper (Maus) und der goldkonjugierte polyklonale Antikörper (Huhn) zugegeben. Die Konzentrationen im Probenpuffer betragen 0,3 µg/mL im Falle des monoklonalen Antikörpers (Maus) und 1,0 µg/mL im Falle des goldkonjugierten polyklonalen Antikörpers (Huhn). Die Proben werden im Wasserbad bei 37°C für 12 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation werden 200 µL des jeweiligen Probenpuffers in eine Kammer einer Polystyrol-Mikrotest-Platte gegeben. Die trockenen Teststreifen werden mit dem Release-Pad voran in die gefüllte Kammer

²³ KhPhtH-Puffer: Kaliumhydrogenphthalat-Puffer

gestellt. Pro Konzentration werden drei verschiedene diagnostische Membranen mit unterschiedlichen Migrationsgeschwindigkeiten verwendet (Unisart CN 90, Unisart CN 140, Unisart CN 200).

Innerhalb dieser Versuchsreihe tritt bei allen Lateral-Flow-Assays eine unspezifische Hintergrundfärbung der Membran auf. Die gesamte diagnostische Membran erscheint leicht rosa, wobei sich die Farbverteilung als „wolkig“ beschreiben lässt. Diese Hintergrundfärbung ist nicht durch weitere Waschschriffe des Lateral-Flow-Assays zu beseitigen. Das Phänomen weist darauf hin, dass der goldkonjugierte Antikörper nicht genügend Mobilität innerhalb der Membranmatrix besitzt. In der Praxis sind solche Phänomene bekannt und sie werden u. a. durch den Einsatz eines weiteren Proteins im Probenpuffer beseitigt. Bei der Wiederholung des Versuchs werden daher die in Tab. 4-3 angegebenen Probenpuffer um die Komponente BSA ergänzt. Die BSA Konzentration im Probenpuffer beträgt 0,8 mg/mL. Tatsächlich wird durch die Zugabe von BSA mit einer Unisart CN 200 und bei einem pH-Wert von 7,2 ein Nachweis von BoNT/D möglich.

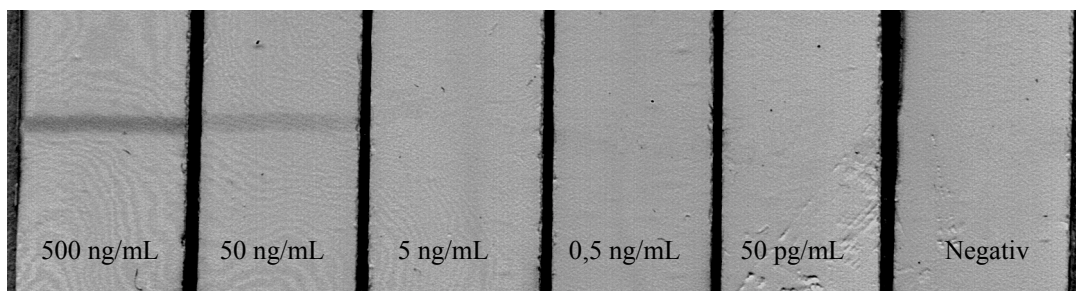


Abb. 4-3: Abbildung des mit verschiedenen BoNT/D Konzentrationen getesteten Lateral-Flow-Assays 1. Dargestellt sind die Ergebnisse mit einer Unisart CN 200 bei einem pH-Wert von 7,2.

In Abb. 4-3 sind die Testergebnisse einer Unisart CN 200 (Sartorius AG) dargestellt. Unter den getesteten Bedingungen tritt keine unspezifische Färbung der Membran auf. Alle anderen pH-Werte und getesteten diagnostischen Membranen erwiesen sich dagegen für einen BoNT/D-Nachweis als ungeeignet.

Die schlechte Aufnahmequalität von Abb. 4-3 kommt dadurch zustande, dass die Probenergebnisse zur sicheren Handhabung laminiert wurden, wodurch die erkennbaren Reflexionen (Newtonringe) bedingt werden. Zusätzlich ist die ungleichmäßige Beleuchtung der Aufnahme schon mit bloßem Auge zu erkennen. Zum anderen wurde für diese Aufnahmen eine digitale Kamera mit einer geringen Auflösung und einem nicht optimalen Objektiv verwendet. Dennoch ist anhand der abgebildeten Teststreifen deutlich zu erkennen, dass eine Konzentration von 50 ng/mL des BoNT/D nachweisbar ist. Falsch-positive Signale treten nicht

auf, wobei die Signalintensitäten der Testlinien eher schwach sind. Bei einer quantitativen Auswertung mittels der in Kapitel 7.3.3 etablierten Methode lag der mittlere relative Fehler bei 30 %. Eine quantitative Auswertung ist somit nicht möglich, da der Fehler gegen eine reproduzierbare Auswertung spricht.

Einfluss verschiedener diagnostischer Membranen

Nachdem eine effektive Probenvorbereitung ausgearbeitet wurde, können nun weitere diagnostische Membranen getestet werden. Abhängig vom Hersteller und Membrantyp haben diagnostische Membranen unterschiedliche Eigenschaften. Das liegt daran, dass zu ihrer Herstellung beispielsweise unterschiedliche Additive und Rohstoffe verwendet werden. Als Resultat kann sich eine Membran eines Herstellers für eine Applikation hervorragend eignen und eine Membran mit gleichen physikalischen Parametern eines anderen Herstellers jedoch nicht.

Um diesen Effekt näher zu untersuchen, werden verschiedene Membrantypen innerhalb der oben beschriebenen Teststreifenherstellung eingesetzt. Die Belegung des Release-Pads erfolgt mit einem 40 mM NaP-Puffer (0,6 Gew.-% BSA, 0,4 Gew.-% Tween 20, 5 Gew. -% Saccharose, pH 7,2). Innerhalb der Probenvorbereitung wird ein mit BoNT/D dotierter 40 mM NaP-Puffer (0,8 mg/mL BSA, pH 7,2) eingesetzt und die Proben 12 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Das Testvolumen beträgt 200 µL.

In Tab. 4-4 sind neben den Ergebnissen der Testdurchführungen auch die Migrationsgeschwindigkeiten und Porengrößen der diagnostischen Membranen angegeben. Die untersuchten Migrationszeiten liegen zwischen 68 und 240 Sek./40mm. Die Untersuchungen ergaben, dass 14 Membrantypen ungeeignet sind, so dass ein BoNT/D-Nachweis nur mit der Unisart CN 200 möglich ist. Diese Membran besitzt eine Migrationsgeschwindigkeit von 198 Sek./40 mm und eine Porengröße von 5 µm und liegt daher in einem sehr langsamen Migrationsbereich.

Tab. 4-4: Einfluss verschiedener diagnostischer Membranen auf die Testsensitivität des Lateral-Flow-Assays 1. Jede diagnostische Membran wurde mit verschiedenen BoNT/D-Konzentrationen bei dem optimalen pH 7,2 getestet.

Membran	Eigenschaften		Ergebnisse
	Porengröße: [μm]	Migrationsgeschw. [Sek./40 mm]	
PuraBind ASP	3	123	Kein Nachweis möglich
PuraBind AFP	5	116	Kein Nachweis möglich
PuraBind ARP	Porengröße: 8	93	Kein Nachweis möglich
FF 60/100	Keine Angabe	84	Kein Nachweis möglich
FF 85/100	Keine Angabe	152	Kein Nachweis möglich
FF 125/100	Keine Angabe	223	Kein Nachweis möglich
Predator Laminated	Keine Angabe	$\leq 240\text{Sek.}/20\text{mm}$	Kein Nachweis möglich, starke Hintergrundfärbung
Unisart CN 200	5	198	Sensitivität von 50 ng/mL (Abb. 4-3)
Unisart CN 14011301 Nicht unterstützt	8	152	Kein Nachweis möglich
Hi – Flow Plus HF07504	Keine Angabe	68	Kein Nachweis möglich
Hi – Flow Plus HF09004	Keine Angabe	75	Kein Nachweis möglich
Hi – Flow Plus HF13504	Keine Angabe	124	Kein Nachweis möglich

Einfluss verschiedener Goldkonjugatkonzentrationen

Im nächsten Schritt wird der Einfluss der Konzentration des goldkonjugierten Antikörpers auf die Testergebnisse untersucht. Dafür wird ein 40 mM NaP-Puffer (0,8 mg/mL BSA, 0,3 $\mu\text{g/mL}$ monoklonaler Anti-BoNT/D (Maus), pH 7,2) mit verschiedenen BoNT/D-Konzentrationen dotiert. Die dotierten Probenlösungen werden mit verschiedenen Konzentrationen des goldkonjugierten polyklonalen Antikörpers (Huhn) versetzt. Es werden Konzentrationen von 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6 und 2,0 $\mu\text{g/mL}$ untersucht. Alle Proben werden 12 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert; danach werden 200 μL des Probenpuffers in eine Kammer ei-

ner Polystyrol-Mikrotest-Platte gegeben. Die Proben werden mit einem Lateral-Flow-Test getestet, dessen Release-Pad mit einem 40 mM NaP-Puffer (0,6 Gew.-% BSA, 0,4 Gew.-% Tween 20, 5 Gew.-% Saccharose, pH 7,2) imprägniert wurde. Als Membran wird die Unisart CN 200 verwendet.

In Tab. 4-5 sind die Einflüsse verschiedener Goldkonjugatkonzentrationen auf die Sensitivität zusammengefasst. Auffällig ist, dass ab einer Goldkonjugatkonzentration von 1,2 µg/mL die Sensitivität um den Faktor 10 auf eine Nachweisgrenze von 5 ng/mL steigt. Eine Erhöhung der Goldkonjugatkonzentration scheint die Bildung des mobilen Sandwichkomplexes zu begünstigen, obwohl stöchiometrisch gesehen schon bei einer Goldkonjugatkonzentration von 0,8 µg/mL der goldkonjugierte

Antikörper im Überschuss vorliegt. Steigt die Goldkonjugatkonzentration über einen Schwellenwert von 2,0 µg/mL an, so treten falsch-positive Testsignale auf. Für die folgenden Versuche wird eine Goldkonjugatkonzentration von 1,2 µg/mL eingesetzt, da diese die kleinste Konzentration mit einer Nachweisgrenze von 5 ng/mL ist und somit das Testsystem nicht unnötig mit überschüssigen Chemikalien belastet wird. Auch bei diesen Versuchen wurden die Probenergebnisse laminiert, wodurch bei der digitalen Aufnahme Reflexionen auf der Oberfläche entstehen.

Untersuchung der Probenvorbereitungszeit

Ein 40 mM NaP-Puffer (0,8 mg/mL BSA, 0,3 µg/mL monoklonaler Anti-BoNT/D (Maus), 1,2 µg/mL goldkonjugierter polyklonaler Anti-BoNT/D (Huhn), pH 7,2) wird mit verschiedenen BoNT/D-Konzentrationen dotiert. Alle Proben werden für verschiedene Zeiträume bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Das Probenvolumen beträgt 200 µL. Das Release-Pad des Lateral-Flow-Tests wird mit einem 40 mM NaP-Puffer (0,6 Gew.-% BSA, 0,4 Gew.-% Tween 20, 5 Gew.-% Saccharose, pH 7,2) imprägniert. Als diagnostische Membran dient die Unisart CN 200. Nach 20 Minuten werden die Teststreifen aus der Probenlösung genommen und visuell begutachtet.

Tab. 4-5: Einfluss der Konzentration des Goldkonjugates im Probenpuffer auf die Testsensitivität des Lateral-Flow-Assays 1.

Goldkonjugat [µg/mL]	Sensitivität
0,8	50 ng/mL
1,0	50 ng/mL
1,2	5 ng/mL
1,4	5 ng/mL
1,6	5 ng/mL
2,0	Unspezifische falsch-positive Signale

Anhand der Ergebnisse in Tab. 4-6 lässt sich bestätigen, dass die Bildung des Sandwichkomplexes der zeitlich bestimmende Schritt ist. Es wird deutlich, dass die Bildung nach 4 h abgeschlossen ist, da ab dieser Inkubationszeit ein BoNT/D-Nachweis mit einer Sensitivität von 5 ng/mL möglich ist. Eine Reaktionszeit von 4 Stunden ist deutlich länger als die Zeit, die für eine Reaktion in den Lateral-Flow-Assays in Kapitel 3.1.5 zur Verfügung steht, womit das schlechte Ergebnis der „klassischen“ Lateral-Flow-Testformate nun erklärbar ist.

Tab. 4-6: Einfluss der Probenvorbereitungszeit auf die Testsensitivität des Lateral-Flow-Assays 1.

Zeit [h]	Sensitivität
0	Kein Nachweis
2	Kein Nachweis
4	5 ng/mL
6	5 ng/mL
12	5 ng/mL

Silberfixierung

Mit einer Sensitivität von 5 ng/mL ist der in diesem Kapitel entwickelte Lateral-Flow-Assay um den Faktor 1000 sensitiver als der kommerziell erhältliche BADDTM-Test von der Osborn Scientific Group. Dennoch ist die Sensitivität im Vergleich zum Toxinnachweis in der Maus um den Faktor 100 geringer. Zur Verstärkung der Signalintensität wird daher entsprechend den Ausführungen in Kapitel 3.1 und Kapitel 7.3.4 und in Anlehnung an die von Chandler (1999) beschriebene Methode eine Signalverstärkung mittels einer Silberverstärkung durchgeführt.

Die Probenvorbereitung, die Herstellung der Teststreifen und die Testdurchführung mit einer Probeninkubationszeit von 4 h erfolgen entsprechend der Beschreibung im Abschnitt „Untersuchung der Probenvorbereitungszeit“. Nach der Testdurchführung schließt sich ein Waschschritt mit 70 µL eines 40 mM NaP-Puffer (pH 7,2) an. 10 Minuten nach der Applikation des Waschpuffers wird das Release-Pad des Lateral-Flow-Tests abgeschnitten und in 100 µL einer Silberfixierungslösung gestellt. Die Silberfixierungslösung besteht aus einer 1:2 Mischung einer Silbersalzlösung und einer Entwicklerlösung (Silberverstärkungskit SELK15, British Biocell International Ltd.). In verschiedenen Zeitabständen werden die Teststreifen aus der Silberfixierungslösung herausgenommen und eine Minute mit einem Fön getrocknet. Die Menge der Silberfixierungslösung, die durch die Testlinie fließen kann, wird durch die Standzeit des Teststreifens in der Lösung bestimmt. Dementsprechend hat diese Standzeit einen signifikanten Einfluss auf die Signalverstärkung, was deutlich in Tab. 4-7 zu erkennen ist. So werden bei einer Testzeit von einer Minute die Signalintensitäten noch nicht verstärkt. Ein Verstärkungseffekt tritt erst ab einer Zeit von ca. 1,5 Minuten ein,

auch wenn er sehr schwach und visuell kaum erkennbar ist. Dennoch erhöht sich bei diesem schwachen Effekt die Nachweisgrenze immerhin von 5 ng/mL auf 0,5 ng/mL. Ab einer Silberfixierungszeit von 1,5 Minuten treten falsch-positive Signale auf. Diese sind auf den Mechanismus der Silberfixierung zurückzuführen. Die Silberionen der Silbersalzlösung sind positiv geladen. Die als Label verwendeten kolloidalen Goldpartikel weisen aufgrund des Zeta-Potenzials eine negative Oberflächenladung auf. Die positiv geladenen Silberionen werden durch diese negative Ladung angezogen und lagern sich an die immobilisierten Goldpartikel an. Unter Einwirkung von Licht und/oder eines Entwicklers werden die Silberionen –ähnlich wie im Falle der Photographie- zu elementarem Silber reduziert.

Tab. 4-7: Einfluss einer nachträglichen Silberfixierung auf die Testsensitivität des Lateral-Flow-Tests 1.

Einwirkzeit [Min.]	Sensitivität
1,0	5,00 ng/mL
1,5	0,50 ng/mL Falsch-positive Signale
2,0	0,05 ng/mL Falsch-positive Signale
2,5	0,50 ng/mL Falsch-positive Signale
3,0	Unspezifische Signale

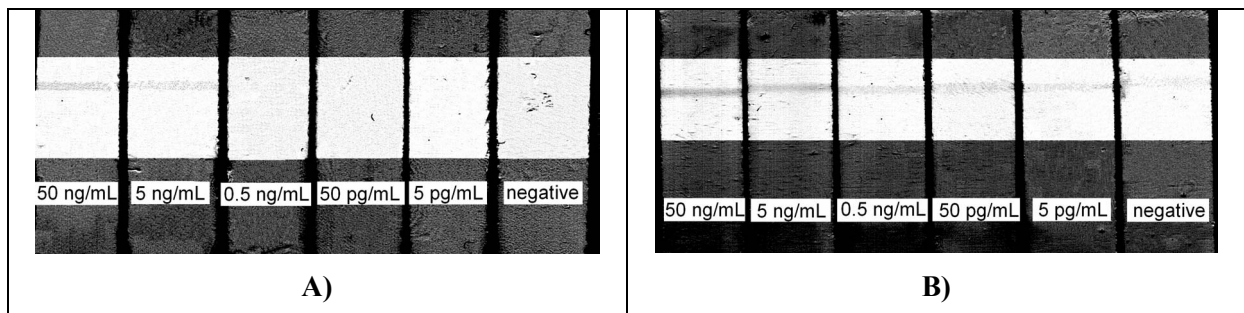


Abb. 4-4: A) Ergebnisse des Lateral-Flow-Assays 1 mit einer Sensitivität von 5 ng/mL. B) Ergebnisse nach einem nachträglichen Silberfixierungsschritt (Einwirkzeit: 2 Minuten) mit einer Sensitivität von 50 pg/mL.

Die Silberionen lagern sich allerdings nicht nur an geladene Goldpartikel, sondern auch an die immobilisierten Proteine an, welche aufgrund ihrer Struktur Bereiche mit einer partiellen negativen Ladung aufweisen. Durch diese unspezifische Anfärbung der immobilisierten Proteine entstehen falsch-positive Testlinien. Betrachtet man die Ergebnisse in Tab. 4-7 und Abb. 4-4 B) im Vergleich zu Abb. 4-4 A), so wird deutlich, dass die Testsensitivität nur auf Kosten einer vorteilhaften Ja/Nein-Antwort erhöht werden kann. Eine eindeutige Ja/Nein-Antwort über die Anwesenheit des Analyten ist jedoch ein Hauptvorteil eines Lateral-Flow-Testformates. Akzeptabel ist dieser Verlust bei diesem Beispiel dann, wenn es möglich ist, die falsch-positiven Signale mittels einer geeigneten optischen Auswertung sicher zu identifizieren. So kann die mangelnde Sensitivität im Vergleich zu dem Toxinnachweis in der

Maus erreicht werden, und man könnte trotzdem eine hinreichende Reproduzierbarkeit garantieren. Es muss für jeden Verwendungszweck entschieden werden, ob eine Ja/Nein-Antwort mit einer deutlich geringeren Testsensitivität oder eine höhere Testsensitivität mit dem Auftreten von unspezifischen Signalen gewählt wird. In der vorliegenden Arbeit ist es das Ziel eine alternative Methode zu dem Toxinnachweis in der Maus näher zu untersuchen, wobei die Testsensitivität eines der Hauptkriterien ist. Daher werden die falsch-positiven Signale zugunsten einer höheren Testsensitivität als Nachteil in Kauf genommen.

Zusammenfassung

Mittels des in diesem Kapitel entwickelten Lateral-Flow-Assays ist ein BoNT/D-Nachweis mit einer Sensitivität von 5 ng/mL möglich. Ein wichtiger Schritt für die Entwicklung ist die Einführung einer Probenvorbereitung bei 37 °C im Wasserbad. Verschiedene Parameter, wie der pH-Wert (7,2), die Probenvorbereitungszeit (4 h), die Konzentration des goldkonjugierten Antikörpers (1,2 µg/mL) und der Einfluss verschiedener Membranen konnten erfolgreich untersucht und optimiert werden. Etwas überraschend ist das Ergebnis, dass nur eine einzige diagnostische Membran (Unisart CN 200) einen Nachweis ermöglichte.

Die Sensitivität des Tests kann nachträglich mittels eines Silberfixierungsschrittes um den Faktor 100-1000 erhöht werden. Die resultierende Sensitivität des Tests von mindestens 50 pg/mL gelingt nur mit Generierung von falsch-positiven Ergebnissen und somit unter Verlust der spezifischen Ja/Nein-Antwort. Der Grund für das Auftreten der falsch-positiven Ergebnisse kann auf den Mechanismus der Silberfixierung zurückgeführt werden.

Die beschriebene Verpackung der Testkomponenten gewährleistet eine Lagerungsfähigkeit von ca. 3 Monaten. Ohne diese Verpackung wurden Lagerungseffekte wie hydrophobe Testlinien, zerstörte und immobilisierte Antikörper, nachlassende Signalintensitäten, auffällig hohe Färbung der Membran (durch den goldkonjugierten AK) und ungleichmäßiges Laufverhalten der lateralen Flüssigkeitsfront beobachtet. Auch musste die Aktivität des Silberverstärkungskits vor jedem Versuch bestimmt werden, da diese Reagenzien durch eine Lagerung an Aktivität verlieren. Hier hätte sich auf längere Sicht die Entwicklung eines Standards angeboten, mit dem dieser Aktivitätsverlust genauer bestimmt werden könnte.

4.2 Lateral-Flow-Assay 2

Bei der Testdurchführung dieses Assays wird ein „mobiler Sandwichkomplex“ zwischen dem Analyten BoNT/D, einem goldkonjugierten monoklonalen Antikörper (Maus) und

einem polyklonalen Antikörper (Huhn) gebildet. Damit ergibt sich der in Abb. 4-5 schematisch dargestellte Lateral-Flow-Assay.

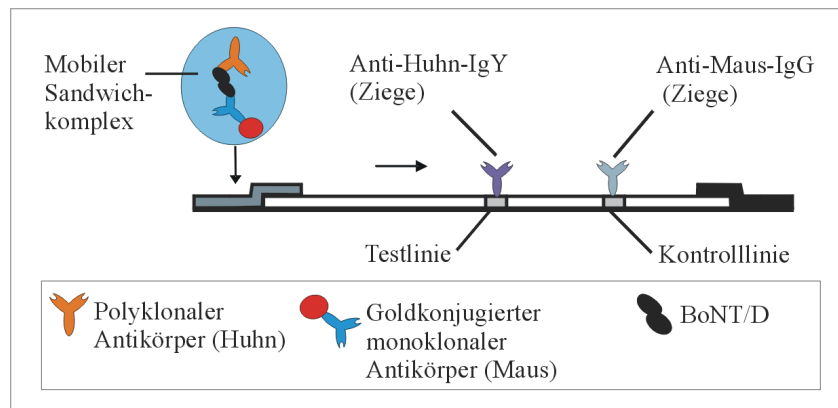


Abb. 4-5: Aufbau und Komponenten des Lateral-Flow-Assays 2.

Die Testlinien aller in diesem Kapitel verwendeten Lateral-Flow-Assays werden mit einer Anti-Huhn-IgY-Proteinlösung (Anti-Huhn-IgY (Ziege), 2 mg/mL, gebrauchsfertige Lösung) aufgetragen. Die Applikation der Kontrolllinie erfolgt mit einer Anti-Maus-IgG-Proteinlösung (Anti-Maus-IgG (Ziege), 1 mg/mL, 20 mM NaP-Puffer (pH 8,0), 150 mM NaCl). Die Applikationshöhe der Testlinie beträgt 1,5 cm von der Unterkante der Membran und 0,5 cm oberhalb dieser Testlinie wird die Kontrolllinie aufgetragen. Die Linienapplikation, die Release-Pad-Vorbehandlung und die Testherstellung des Lateral-Flow-Assays erfolgen entsprechend Kapitel 7.4.3.

Einfluss des pH-Wertes

Zunächst soll der optimale pH-Wert für den immunologischen Nachweis bestimmt werden. Dazu werden die in Tab. 4-8 dargestellten Bedingungen genutzt.

Tab. 4-8: Verwendete Parameter zur Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf den LFT 2.

Mit BoNT/D dotierter Probenpuffer	Antikörperkonz. im Probenpuffer	Probenvorbereitung des Probenpuffers	Testvolumen	Membran
Die in Tab. 4-3 aufgeführten Probenpuffer (pH-Bereich: 5,2-8,2)	Polyklon. AK (Huhn) 2,00 µg/mL Goldkonjugierter monoklon. AK (Maus) 0,35 µg/mL	Inkubation im Wasserbad bei 37°C für 4 h	50 µL	CN 90 CN 140 CN 11301

Größere Testvolumina als 50 μL und längere Inkubationszeit als 4 h führen zu konzentrationsunabhängigen und sehr intensiven Testsignalen, wodurch ein BoNT/D Nachweis unter nicht möglich ist. Je Konzentration werden drei verschiedene diagnostische Membranen mit unterschiedlichen Migrationsgeschwindigkeiten verwendet (Unisart CN 90, Unisart CN 140, Unisart 11301), wobei die Unisart 11301 die besten Ergebnisse liefert. Nach der Testdurchführung schließt sich eine optische Auswertung entsprechend der Methode aus Kapitel 7.3.3 an. Im Folgenden werden die Testergebnisse einer Unisart CN 11301 dargestellt. Abb. 4-6 zeigt die Signalintensität in Abhängigkeit von der Konzentration bei verschiedenen pH-Werten.

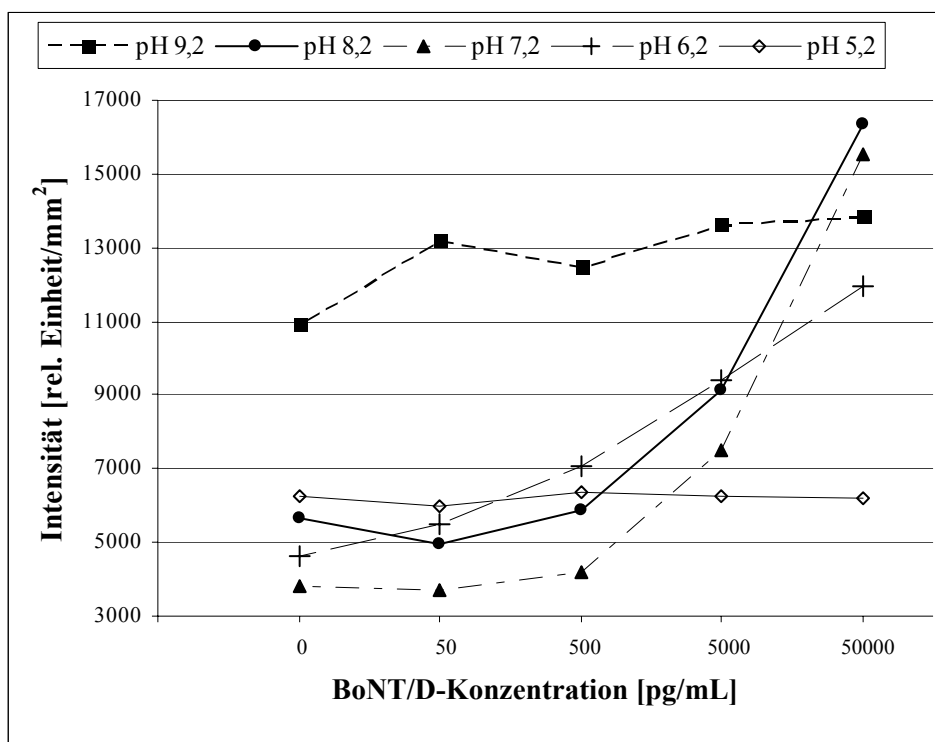


Abb. 4-6: Einfluss verschiedener pH-Werte auf die durchschnittliche Signalintensität der Testlinie des Lateral-Flow-Assays 2. Bei jeder Testreihe erfolgte die Probenvorbereitung und die Belegung des Release-Pads bei dem jeweils angegebenen pH-Wert.

Deutlich erkennbar ist, dass bei jedem der betrachteten pH-Werte die Blindprobe ein falsch-positives Signal des Tests bewirkt. Die Verwendung eines pH-Wertes von 5,2 bzw. von 9,2 führt zu konzentrationsunabhängigen unspezifischen Reaktionen und damit zu unspezifischen Testsignalen. Ein für die immunologische Reaktion günstigerer pH-Bereich liegt zwischen 6,2 und 8,2; bei den pH-Werten 7,2 und 8,2 beträgt die Sensitivität des Lateral-Flow-Assays 5 ng/mL.

Die geringste Konzentration kann bei einem pH-Wert von 6,2 nachgewiesen werden. Hier kann das positive Testsignal einer Toxinkonzentration von 50 pg/mL von dem falsch-positiven Signal der Blindprobe unterschieden werden. Wie für einen nicht kompetitiven Immunoassay zu erwarten, ergibt sich generell ein polynomischer Zusammenhang zwischen der Testsignalintensität und der Toxinkonzentration [Kapitel 7.3.3; Price, Newman, 1991; Wild 1994]. Es ist aus dem Graphen ersichtlich, dass die maximale Signalintensität des Lateral-Flow-Assays bei diesem pH-Wert außerhalb des betrachteten Konzentrationsbereiches liegt.

Bei der Testdurchführung des Toxinnachweises in der Maus kommt als Probenpuffer ein 28 mM Gelatine-Phosphatpuffer (GP-Puffer) mit einem pH-Wert von 6,0 zum Einsatz. Um möglichst nahe an der Testdurchführung des Toxinnachweises in der Maus zu sein, wird in den sich anschließenden Versuchen als Probenpuffer ein 28 mM GP-Puffer (pH 6,2) verwendet.

Unspezifische falsch-positive Signale sind eines der bekanntesten Entwicklungsprobleme von Lateral-Flow-Assays. Hervorgerufen werden können sie durch eine unspezifische Interaktion des goldgelabelten Antikörpers mit dem innerhalb der Testlinie immobilisierten Capture-Antikörper. Wird eine verdünnte Goldkonjugatlösung (40 mM NaP-Puffer, goldkonjugierter monoklonaler Antikörper (Maus) 0,35 µg/mL, pH 6,2) mit dem Lateral-Flow-Assay 2 getestet, ergeben sich wie in Abb. 4-6 bereits beobachtet falsch-positive Ergebnisse. Damit können die in diesen Versuchen auftretenden falsch-positiven Signale auf eine unspezifische Reaktion des goldkonjugierten Antikörpers mit dem immobilisierten Testlinienantikörper zurückgeführt werden. Neben der Untersuchung von verschiedenen pH-Werten bietet sich zur Beseitigung dieses Phänomens ein Zusatz des Antikörpers zu dem Testlinienapplikationspuffer an, der bei der Versuchsdurchführung als gelabelter Antikörper verwendet wird. Die Idee ist, dass hierdurch unspezifisch reagierende Testlinienantikörper abgesättigt werden, so dass die goldgelabelten monoklonalen Antikörper (Maus) innerhalb der Testlinie keinen Reaktionspartner finden. Das Ergebnis der Verwendung verschiedener Konzentrationen des monoklonalen Antikörpers (Maus) (0,5; 0,25; 0,1 mg/mL) in dem Linienapplikationspuffer ist, dass kein BoNT-Nachweis mehr gelingt. Über die Ursachen können an dieser Stelle nur Vermutungen angestellt werden. Ein Grund könnte jedoch sein, dass sämtliche innerhalb der Testzone immobilisierten Antikörper unspezifisch blockiert werden.

Untersuchung der Probenvorbereitungszeit

Zur Ermittlung der optimalen Probenvorbereitungszeit werden die in Tab. 4-9 dargestellten Bedingungen genutzt.

Tab. 4-9: Verwendete Parameter zur Untersuchung des Einflusses der Probenvorbereitungszeit auf den Lateral-Flow-Assay 2.

Mit BoNT/D dotierter Probenpuffer	Antikörperkonz. im Probenpuffer	Probenvorbereitung des Probenpuffers	Testvolumen	Membran
28 mM GP-Puffer (pH 6,2)	Polyklon. AK (Huhn) 2,00 µg/mL Goldkonjugierter monoklon. AK (Maus) 0,35 µg/mL	Inkubation im Wasserbad bei 37°C für verschiedene Zeiträume (0-16 h)	150 µL	CN 11301

Es wird ein Lateral-Flow-Test verwendet, dessen Release-Pad mit einem 40 mM NaP-Puffer (0,6 Gew.-% BSA, 0,4 Gew.-% Tween 20, 5 Gew.-% Saccharose, pH 7,2) imprägniert wird. Die Membran Unisart 11301 liefert die besten Ergebnisse, die in Abb. 4-7 und Abb. 4-8 dargestellt sind.

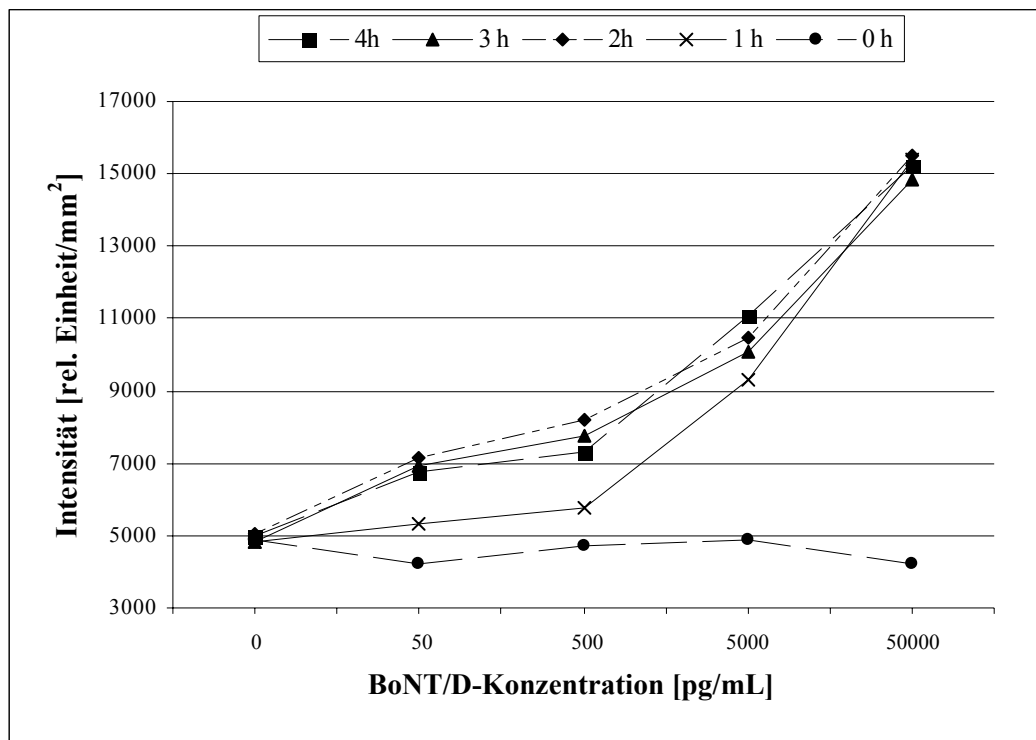


Abb. 4-7: Einfluss verschiedener Probenvorbereitungszeiten (0 - 4 h) auf die durchschnittliche Signalintensität der Testlinie des Lateral-Flow-Assays 2.

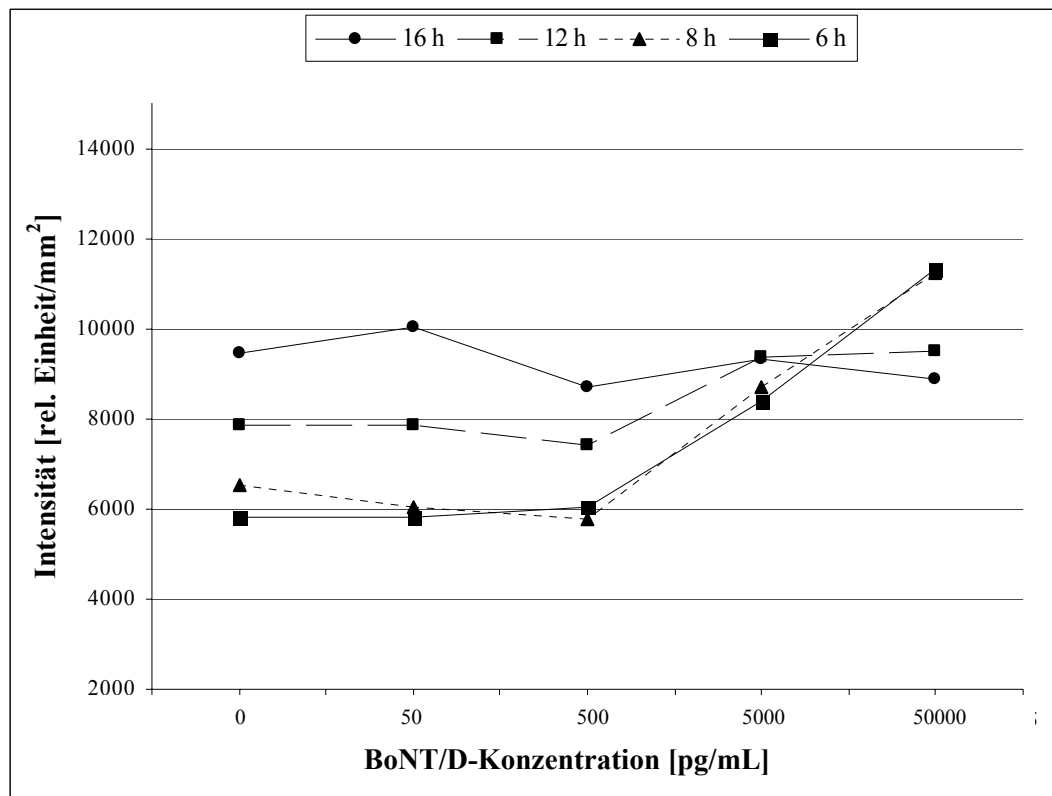


Abb. 4-8: Einfluss verschiedener Probenvorbereitungszeiten (6 - 16 h) auf die durchschnittliche Signalintensität der Testlinie des Lateral-Flow-Assays 2.

Auch bei diesen Bedingungen werden bei allen Inkubationszeiten falsch-positive Ergebnisse der Blindproben beobachtet. Entfällt die Inkubation (0 h) ist kein Nachweis von BoNT/D möglich, wohingegen die Bildung des mobilen Sandwichkomplexes bereits nach einer Inkubationszeit von einer Stunde schon teilweise erfolgt ist. Die Komplexbildung scheint jedoch noch nicht abgeschlossen zu sein, da nur eine vergleichsweise geringe Sensitivität von ca. 5 ng/mL erreicht wird.

Optimale Bedingungen liegen dagegen in einem Zeitrahmen von 2-4 Stunden vor. Die während dieser Zeit erhaltenen Ergebnisse weisen alle einen ähnlichen (polynomischen) Kurvenverlauf auf und die Sensitivität beträgt 50 pg/mL.

Ab einer Inkubationszeit von sechs Stunden nimmt die Intensität des falsch-positiven Signals der Blindprobe von einem Wert von ca. 5000 (1-4 h) über ca. 6000 (6 h) bis schließlich ca. 9000 [rel. Einheit/mm²] (16 h) zu. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass sich der goldkonjugierte Antikörper zersetzt, bzw. die Bindung zwischen dem Goldpartikel und dem Antikörper gelöst wird. Dadurch wird ein Oberflächenplatz des als Label verwendeten Goldpartikels frei und es hat somit die Möglichkeit unspezifisch zu reagieren. Dieses Phä-

nomen ist nicht unbekannt und es wird beispielsweise durch falsche Lagerung, zu lange Lagerung, falsche Reaktionsbedingungen (z.B.: pH-Wert, Additive und Temperatur) hervorgerufen. Durch die Zunahme des Hintergrundsignals mit zunehmender Inkubationszeit nimmt die Testsensitivität immer weiter ab, bis schließlich nach 16 Stunden ein BoNT/D-Nachweis nicht mehr möglich ist.

Die Probenvorbereitungszeit beträgt in den folgenden Versuchen 3 Stunden, da mit dieser Inkubationszeit die geringste Analytkonzentration nachweisbar ist und die Signalintensität der Blindprobe am geringsten ist.

Einfluss verschiedener Goldkonjugatkonzentrationen

Zur Ermittlung der optimalen Goldkonjugatkonzentration werden die in Tab. 4-10 dargestellten Bedingungen genutzt. Das Release-Pad der Lateral-Flow-Tests wird mit einem 40 mM NaP-Puffer (0,6 Gew.-% BSA, 0,4 Gew.-% Tween 20, 5 Gew.-% Saccharose, pH 7,2) imprägniert.

Tab. 4-10: Verwendete Parameter zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Goldkonjugatkonzentrationen auf den Lateral-Flow-Assay 2.

Mit BoNT/D dotierter Probenpuffer	Antikörperkonz. im Probenpuffer	Probenvorbereitung des Probenpuffers	Testvolumen	Membran
28 mM GP-Puffer (pH 6,2)	Polyklon. AK (Huhn) 2,00 µg/mL Goldkonjugierter monoklon. AK (Maus) verschiedene Konz.	Inkubation im Wasserbad bei 37°C für 3 h	50 µL	CN 11301

Der Einfluss der Goldkonjugatkonzentration auf die Signalintensität der Testlinie ist in Abb. 4-9 dargestellt. Die Verwendung einer Goldkonjugatkonzentration von 0,10 µg/mL führt zu einer verminderten Nachweisgrenze von 5 ng/mL. Bei allen anderen hier betrachteten Konzentrationen ist der Nachweis von 50 pg/mL BoNT/D möglich. Jedoch nimmt die Intensität der falsch-positiven Signale von ca. 4900 [rel. Einheit/mm²] (0,10; 0,35; 0,50 µg/mL goldkonjugierter Antikörper) mit steigender Goldkonjugatkonzentration stetig zu, bis schließlich eine Intensität von 11500 [rel. Einheit/mm²] (0,75 µg/mL) erreicht wird. Mit Zunahme der Intensität des Hintergrundsignals nimmt der dynamische Bereich der jeweiligen Versuchsreihe ab. Als dynamischer Bereich ist der Bereich definiert, bei dem das System mit großen Sig-

nalintensitätsunterschieden auf geringste Veränderungen der Analytkonzentration reagiert. Der dynamische Bereich kann von Test zu Test variieren, da für jeden Analyten ein unterschiedliches Anforderungsprofil (Kapitel 3.1.4) aufgestellt werden muss. Im Falle eines BoNT/D-Nachweises ist ein dynamischer Bereich besonders im unteren Konzentrationsbereich wünschenswert, da gerade dort eine Aussage über die Toxizität der untersuchten Probe wichtig ist. Den größten dynamischen Bereich weist in den hier betrachteten Versuchsreihen die Versuchsreihe mit einer Goldkonjugatkonzentration von 0,35 $\mu\text{g/mL}$ auf.

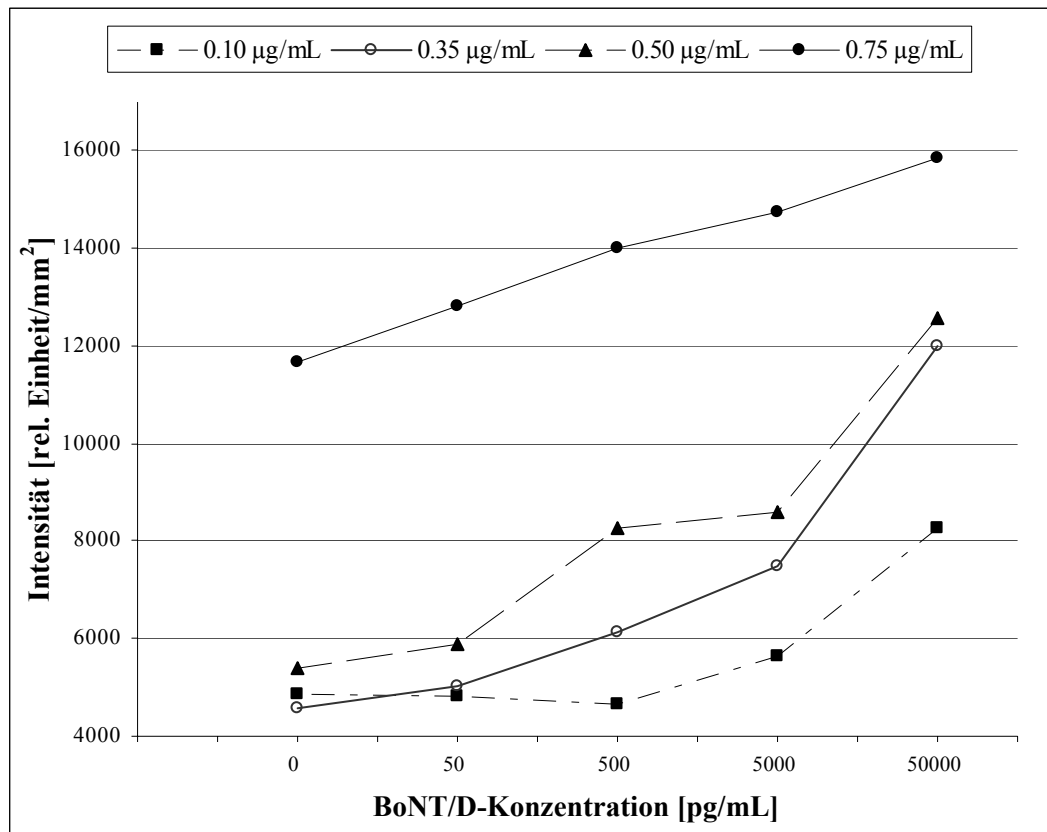


Abb. 4-9: Einfluss der Konzentration des goldkonjugierten Antikörpers im Probenpuffer (0,10 – 0,75 $\mu\text{g/mL}$) auf die durchschnittliche Signalintensität der Testlinie des Lateral-Flow-Assays 2.

Einfluss verschiedener Probenvolumina

Zur Ermittlung des optimalen Probenvolumens werden die in Tab. 4-11 dargestellten Bedingungen genutzt. Das Release-Pad der Lateral-Flow-Assays wird mit 40 mM NaP-Puffer (0,6 Gew.-% BSA, 0,4 Gew.-% Tween 20, 5 Gew.-% Saccharose, pH 7,2) imprägniert.

Tab. 4-11 Verwendete Parameter zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Probenvolumina auf den Lateral-Flow-Assay 2.

Mit BoNT/D dotierter Probenpuffer	Antikörperkonz. im Probenpuffer	Probenvorbereitung des Probenpuffers	Testvolumen	Membran
28 mM GP-Puffer (pH 6,2)	Polyklon. AK (Huhn) 2,00 µg/mL Goldkonjugierter monoklon. AK (Maus) 0,35 µg/mL	Inkubation im Wasserbad bei 37°C für 3 h	Wird variiert	CN 11301

In Abb. 4-10 ist erkennbar, dass mit zunehmenden Probenvolumen die Signalintensität der negativen Probe zunimmt. Mit einem Probenvolumen von 25 µL können alle mit Toxin dotierten Probenpuffer vom Blindwert unterschieden werden, jedoch liegen alle resultierenden Signalintensitäten der toxinhaltigen Proben konzentrationsunabhängig bei einem Wert von ca. 3450 [rel. Einheit/mm²]. Bei Verwendung eines Probenvolumens von 50, 75 bzw. von 100 µL ist ein BoNT/D-Nachweis mit einer Sensitivität von 50 pg/mL möglich. Ein Probenvolumen von 125 µL führt zu einer abnehmenden Testsensitivität auf ca. 5 ng/mL. Werden die Ergebnisse miteinander verglichen, so erscheint ein Probenvolumen von 50 µL am Besten für einen sensitiven, quantitativen Toxinnachweis geeignet. Mit diesem Probenvolumen ist eine Sensitivität von 50 pg/mL erreichbar. Die Signalintensität der Blindprobe ist hier im Vergleich zu größeren Probenvolumina geringer und ist somit am Besten von den toxinhaltigen Proben zu unterscheiden.

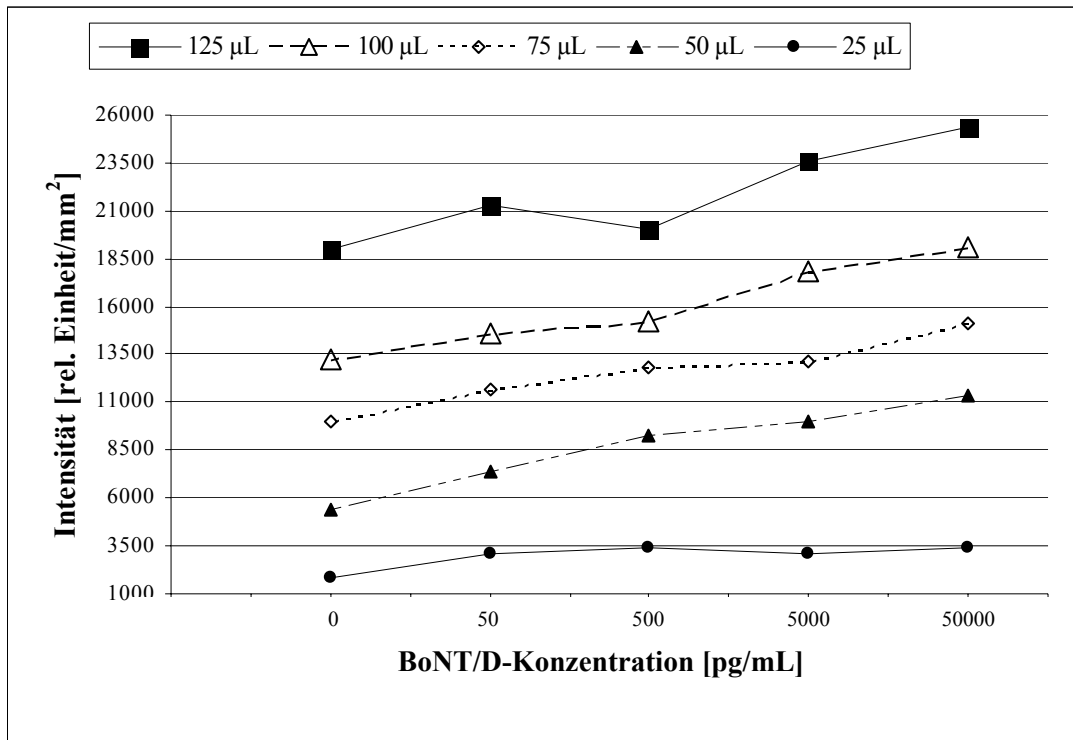


Abb. 4-10: Einfluss verschiedener Testvolumen (25 – 125 µL) auf die durchschnittliche Signalintensität des Lateral-Flow-Assays 2.

Werden diese Ergebnisse betrachtet, so wird deutlich, dass die Intensität des falsch-positiven Signals der Blindprobe ein determinierender Faktor für die Nachweisgrenze ist. Je größer die Intensität der Blindprobe ist desto geringer ist die Sensitivität des Lateral-Flow-Assays. Als Grund für die falsch-positiven Signale kann eine unspezifische Interaktion des goldgelabelten Antikörpers mit dem innerhalb der Testlinie immobilisierten Capture-Reagenz angenommen werden. Die Menge der goldgelabelten Antikörper, die durch die Testlinie fließen, kann durch zwei Faktoren beeinflusst werden:

- durch die Konzentration im Probenpuffer und
- durch das getestete Probenvolumen.

Es gibt für die Optimierung des Lateral-Flow-Assays neben der Signalintensität des falsch-positiven Signals auch noch andere kritische Faktoren, wie beispielsweise die Bildung des mobilen Sandwichkomplexes. Diese Gleichgewichtsreaktion ist ebenfalls von der Konzentration des goldkonjugierten Antikörpers abhängig, so dass sich eine veränderte Goldkonjugatkonzentration negativ auswirken könnte. Die Menge des goldkonjugierten Antikörpers, die für eine unspezifische Reaktion innerhalb der Testlinie zur Verfügung steht, kann dadurch bestimmt werden, dass vereinfachend angenommen wird, dass das gesamte Testvolumen (und nicht wie in der Realität nur ein Teil) durch die Testlinie fließt. Mit dieser Annahme lässt sich der Einfluss verschiedener Goldkonjugatkonzentrationen und der Einfluss des Testvolumens

wie in Tab. 4-12 vergleichen. Betrachtet man die dargestellten Ergebnisse unter diesem Aspekt, so ist der allgemeine Trend erkennbar, dass mit zunehmender Goldkonjugatmenge die Signalintensität der Blindprobe zunimmt. Bei einem Testvolumen von 25 μL scheint die Flüssigkeitsmenge nicht ausreichend zu sein, wodurch der Intensitätsabfall der Blindprobe erklärbar ist.

Tab. 4-12: Einfluss verschiedener Stoffmengen des goldkonjugierten Antikörpers auf die Nachweisgrenze und die Signalintensität des falsch-positiven Signals des Lateral-Flow-Assays 2.

Menge Goldkonjugat [ng]	Bedingung Goldkonjugatkonz = GK	Ergebnis
5 (Variation der Goldkonjugatkonz.)	Testvolumen: 50 μL GK: 0,10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [Abb. 4-9]	Intensität der Blindprobe: ca. 5000 [rel. Einheit/ mm^2]; Testsensitivität: 5 ng/mL
9 (Variation des Testvolumens)	Testvolumen: 25 μL GK: 0,35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [Abb. 4-10]	Intensität der Blindprobe: ca. 1500 [rel. Einheit/ mm^2]; Testsensitivität: 50 pg/mL
18 (Variation der Goldkonjugatkonz. und des Testvolumens)	Testvolumen: 50 μL GK: 0,35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [Abb. 4-9 und Abb. 4-10]	Intensität der Blindprobe: ca. 5000 [rel. Einheit/ mm^2]; Testsensitivität: 50 pg/mL
25 (Variation der Goldkonjugatkonz.)	Testvolumen: 50 μL GK: 0,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [Abb. 4-9]	Intensität der Blindprobe: ca. 5500 [rel. Einheit/ mm^2]; Testsensitivität: 50 pg/mL
26 (Variation des Testvolumens)	Testvolumen: 75 μL GK: 0,35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [Abb. 4-10]	Intensität der Blindprobe: ca. 9000 [rel. Einheit/ mm^2]; Testsensitivität: 50 pg/mL
35 (Variation des Testvolumens)	Testvolumen: 100 μL GK: 0,35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [Abb. 4-10]	Intensität der Blindprobe: ca. 12000 [rel. Einheit/ mm^2]; Testsensitivität: 50 pg/mL
37 (Variation der Goldkonjugatkonz.)	Testvolumen: 50 μL GK: 0,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [Abb. 4-9]	Intensität der Blindprobe: ca. 11500 [rel. Einheit/ mm^2]; Testsensitivität: 50 pg/mL
44 (Variation des Testvolumens)	Testvolumen: 125 μL GK: 0,35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [Abb. 4-10]	Intensität der Blindprobe: ca. 19000 [rel. Einheit/ mm^2]; Testsensitivität: 5 ng/mL

Überprüfung der Reproduzierbarkeit und Lagerungsfähigkeit

Nach der Optimierung einzelner Reaktionsbedingungen (pH-Wert, Probenvorbereitungszeit, Konzentration des Goldkonjugates und Probenvolumen), kann nun abschließend die Reproduzierbarkeit des Lateral-Flow-Assays 2 ermittelt werden. In Abb. 4-11 sind die verwendeten Testparameter zusammengefasst.

Tab. 4-13: Verwendete Parameter zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit und Lagerungsfähigkeit des Lateral-Flow-Assay 2.

Mit BoNT/D dotierter Probenpuffer	Antikörperkonz. im Probenpuffer	Probenvorbereitung des Probenpuffers	Testvolumen	Membran
28 mM GP-Puffer (pH 6,2)	Polyklon. AK (Huhn) 2,00 µg/mL Goldkonjugierter monoklon. AK (Maus) 0,35 µg/mL	Inkubation im Wasserbad bei 37°C für 3 h	50 µL	CN 11301

Das Release-Pad der verwendeten Lateral-Flow-Tests wird mit einem 40 mM NaP-Puffer (0,6 Gew.-% BSA, 0,4 Gew.-% Tween 20, 5 Gew.-% Saccharose, pH 7,2) imprägniert.

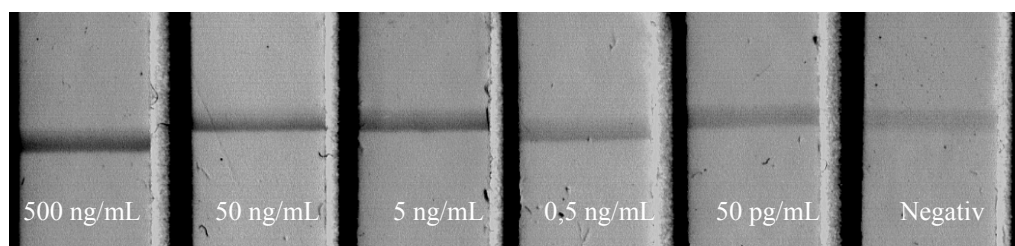


Abb. 4-11: Ergebnisse des Lateral-Flow-Assays 2 bei optimaler Testdurchführung. Die Abbildung zeigt den Einfluss verschiedener BoNT/D-Konzentrationen auf die Signalintensität der Testlinie.

Wie in Abb. 4-11 deutlich erkennbar, treten auch hier falsch-positive Testergebnisse der Blindprobe auf, die visuell nur schlecht von einer Toxinkonzentration von 50 pg/mL unterscheidbar sind. Zur besseren Differenzierung können in Abb. 4-12 die Ergebnisse einer optischen Auswertung entsprechend Kapitel 7.3.3 betrachtet werden. Jede Toxinprobe wird mittels einer Dreifachbestimmung analysiert.

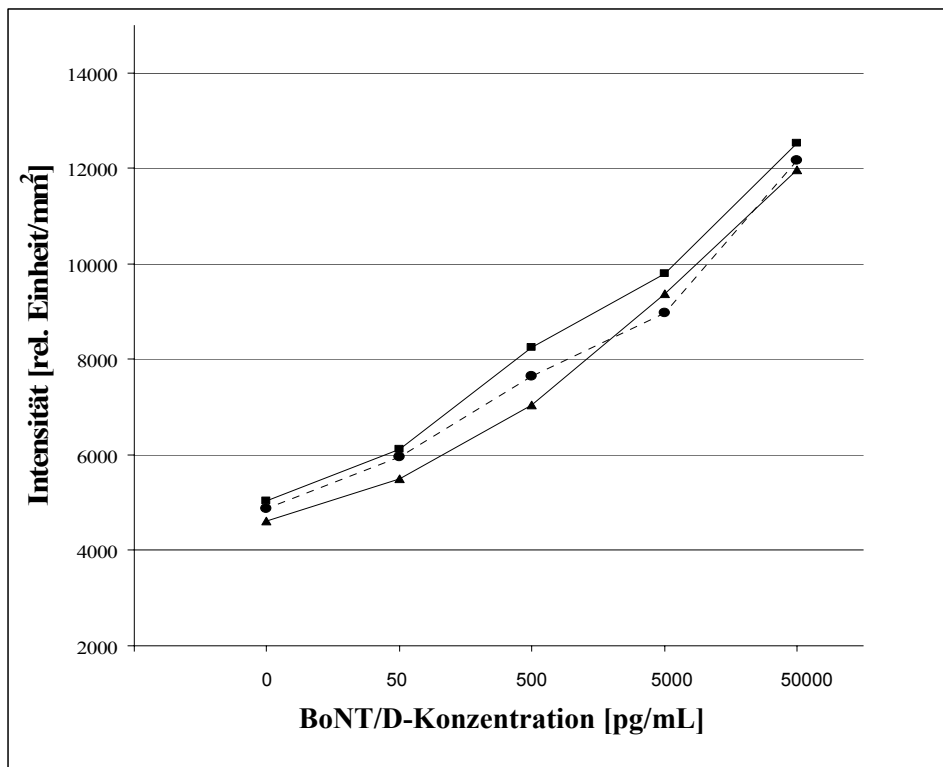


Abb. 4-12: Ergebnisse einer Dreifachbestimmung einer BoNT/D-Konzentrationsreihe mit Lateral-Flow-Assay 2.

Genauere Aussagen über die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse lassen sich mittels einer Fehlerrechnung treffen. Zufällige Fehler können das Messergebnis verfälschen, sie unterliegen wahrscheinlichkeitstheoretischen Gesetzen und lassen sich durch Häufung der Messung verkleinern. So ist bei n-maliger Messung einer Größe (X_i , $i=1$ bis n) der Bestwert \bar{X} gleich dem arithmetischen Mittel [Lenk, 1989].

$$\text{Gleichung 4-1: } \bar{X} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n X_i = \bar{X}$$

Im Vergleich zu anderen denkbaren Mittelwertbildungen zeichnet sich das arithmetische Mittel dadurch aus, dass die Summe der Quadrate der Abweichungen (w) vom Mittelwert \bar{X}

$$\text{Gleichung 4-2: } (w) = \sum_{i=1}^n (\bar{X} - X_i)^2$$

minimal ist. Damit beträgt der absolute Fehler bzw. der mittlere Fehler des arithmetischen Mittels ΔX .

$$\text{Gleichung 4-3: } \Delta X = \pm \sqrt{\frac{(w)}{n \cdot (n-1)}}$$

Angewendet auf die in Abb. 4-12 abgebildeten Testergebnisse ergeben sich die in Tab. 4-14 aufgeführten arithmetisch gemittelten Ergebnisse mit dem resultierenden Fehler des arithmetischen Mittels. Betrachtet man diese Werte, so ist eine Unterscheidung der toxinhaltigen Proben von dem Blindwert möglich. Die Quantifizierbarkeit der Toxin-konzentration fällt eher in einen semiquantitativen Bereich, da eine genauere Diskriminierung beispielsweise der Toxinkonzentrationen 50 pg/mL, 40 pg/mL bzw. 100 pg/mL aufgrund der Ergebnisse fraglich ist. Der Fehlerbereich der Ergebnisse führt zu Aussagen über einen breiteren Konzentrationsbereich. In dem vorliegenden Beispiel ist eine Unterscheidung der untersuchten Konzentrationen voneinander gut möglich. Für eine fundierte quantitative Auswertung müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die optische Auswertung weiter anzupassen und zu standardisieren. Es zeigt sich dennoch, dass der Lateral-Flow-Assay 2 einen semiquantitativen Nachweis mit einer Nachweisgrenze von 50 pg/mL ermöglicht.

Tab. 4-14: Arithmetisch gemittelte Ergebnisse mit absoluten Fehlern ΔX einer Dreifachbestimmung mit Lateral-Flow-Assay 2.

BoNT/D [pg/mL]	Intensität [rel. Einheit]	ΔX [rel. Einheit]
50000	12216	166
5000	9387	236
500	7610	316
50	5855	184
Blindwert	4841	124

In einem weiteren Schritt soll nun innerhalb eines dreimonatigen Lagerungstests die Stabilität des Lateral-Flow-Assays überprüft werden. Dafür werden die gebrauchsfertigen Tests mit Trocknungsmitteln in Siegelrandbeutel aus Alu-Verbundfolie verpackt und bis zum Gebrauch bei RT gelagert. Monatlich erfolgt eine Dreifachbestimmung einer BoNT/D-Konzentrationsreihe. Die Versuchsvorschrift entspricht hierbei der zu Beginn dieses Abschnitts beschriebenen „optimalen Versuchsdurchführung“. Aus den Ergebnissen der Dreifachbestimmung wird der arithmetische Mittelwert gebildet und dessen mittlerer Fehler als absoluter Wert bestimmt. Die Resultate des Lagerungstests sind in Abb. 4-13 dargestellt.

Folgende Ergebnisse werden deutlich:

- Über einen Lagerungszeitraum von 3 Monaten ist ein BoNT/D-Nachweis reproduzierbar möglich.
- Die Nachweisgrenze wird somit nicht durch die Lagerungszeit beeinflusst.
- Sämtliche betrachteten Testsignale bleiben auch nach der Lagerung über einen Zeitraum von einer halben Stunde stabil.
- Benetzungsprobleme, Hydrophobieeffekte und andere negative Erscheinungen sind nicht zu beobachten.

Des Weiteren ist zu erkennen, dass die Signalintensität der Negativprobe mit zunehmender Lagerungszeit leicht verstärkt wird. Zwei Effekte könnten hierfür verantwortlich sein:

- Der goldkonjugierte Antikörper könnte durch eine Lagerung beschädigt werden, wodurch beispielsweise falsch-positive Signale auftreten und/oder einer Änderung der Farbe zu beobachten ist. Eine Änderung der Farbe konnte nicht beobachtet werden und falsch-positive Signale treten nicht erst durch eine Lagerung auf. Des Weiteren ist unabhängig von der Lagerungszeit die Blindprobe immer von den toxischen Proben zu unterscheiden.
- Ein weiterer Effekt, der zur Verstärkung und/oder zum Auftreten eines falsch-positiven Testergebnisses beiträgt, könnten die Lagerungsbedingungen sein.

Welcher Effekt genau verantwortlich ist, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden.

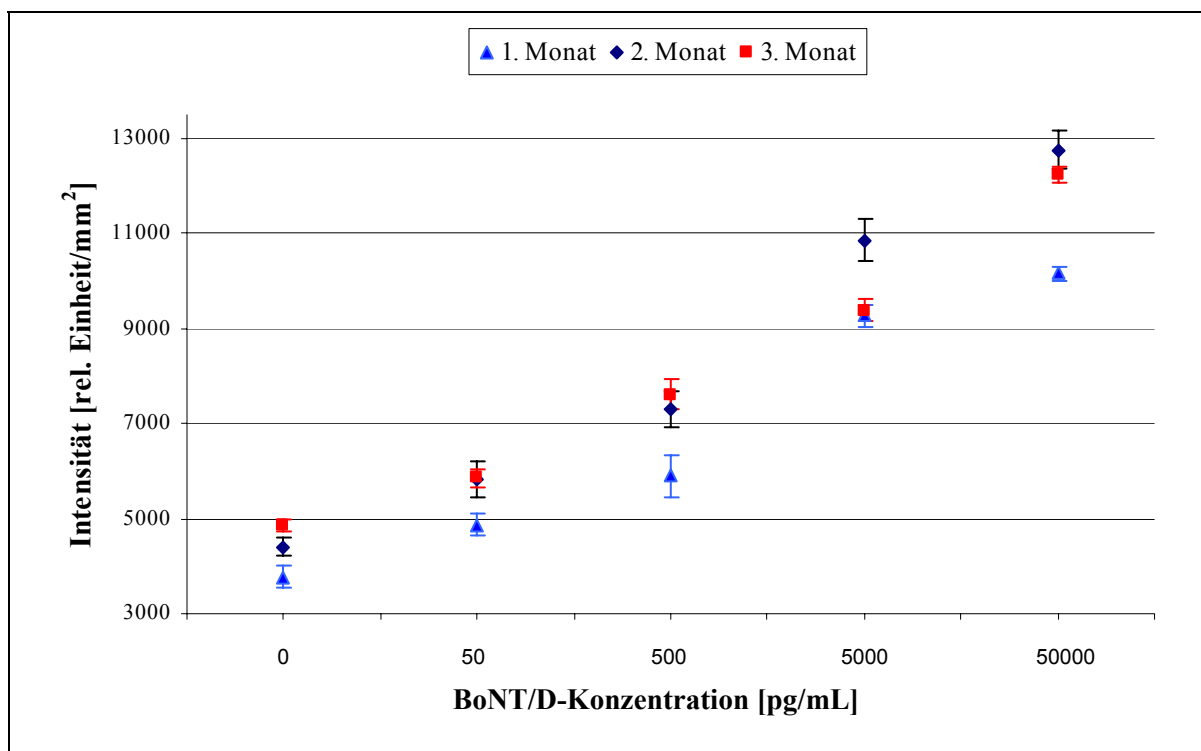


Abb. 4-13: Ergebnisse des Lagerungstests des Lateral-Flow-Assay 2. Über einen Zeitraum von 3 Monaten wurde monatlich eine BoNT/D-Konzentrationsreihe im Rahmen einer Dreifachbestimmung analysiert.

Zusammenfassung

- Der Lateral-Flow-Assay 2 kann zum Nachweis von BoNT/D genutzt werden. Die Testsignale sind mittels eines optischen Auswertungsverfahrens quantifizierbar.

- Ein Nachteil dieser Kombinationsmöglichkeit sind falsch-positive Signale, für die ein Zusammenhang zwischen der Signalintensität von Blindproben und der durch die Testlinie fließende Menge des goldkonjugierten Antikörpers festgestellt wurde. Eine Zunahme der Signalintensität der falsch-positiven bzw. dieses Hintergrundsignals führt zu einer Abnahme der Nachweisgrenze. Alle in diesem Kapitel betrachteten Variationen können die unspezifischen Signale nicht beseitigen.
- Mittels einer Dreifachbestimmung wird trotz dieser Einschränkung ein reproduzierbarer, semiquantitativer Nachweis von BoNT/D mit einer Nachweisgrenze von 50 pg/mL erreicht.
- Für eine quantitative Auswertung sind weiterführende Untersuchungen notwendig.
- Die Teststreifen besitzen eine Haltbarkeit von 3 Monaten, sofern sie richtig gelagert werden.
- Bei der Testdurchführung bleiben die Testsignale über einen Zeitraum von mindestens einer halben Stunde stabil.
- Eine Sensitivitätserhöhung mittels eines Silberfixierungsschrittes kann nicht erreicht werden.

4.3 Lateral-Flow-Assay 3

Bei der Entwicklung des Lateral-Flow-Assays 3 wird die Bildung eines mobilen Sandwichkomplexes zwischen dem Analyten BoNT/D, einem goldkonjugierten monoklonalen Antikörper (Maus) und einem biotinylierten polyklonalen Antikörper (Ziege) optimiert. Nach einer entsprechenden Probenvorbereitung erfolgt der Nachweis mit dem in Abb. 4-14 schematisch dargestellten Lateral-Flow-Assay.

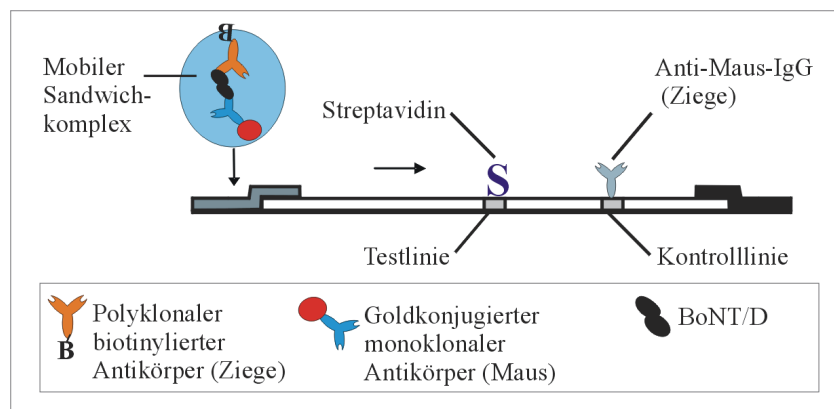


Abb. 4-14: Aufbau und Komponenten des Lateral-Flow-Assays 3.

Die Applikation der Testlinie erfolgt mit einer Streptavidinlösung (20 mM PBS-Puffer, 2 mg/mL Streptavidin, pH 8,0). Die Applikationshöhe der Testlinie beträgt 1,5 cm von der Unterkante der Membran. 0,5 cm oberhalb dieser Testlinie wird die Kontrolllinie mit einer Anti-Maus-IgG Proteinlösung (20 mM PBS-Puffer, 1 mg/mL Anti-Maus-IgG (Ziege), pH 8,0) aufgetragen.

Der mobile Sandwichkomplex wird in diesem Assay über eine Streptavidin-Biotin-Kopplung immobilisiert. Die Kopplung findet zwischen dem Biotin des biotinylierten polyklonalen Antikörpers (Ziege) und dem innerhalb der Testzone immobilisierten Streptavidin statt. Die Linienapplikation, die Release-Pad-Vorbehandlung und Testherstellung des Lateral-Flow-Assays ist in Kapitel 7.4.4 beschrieben.

Einfluss des pH-Wertes

Zur Bestimmung des optimalen pH-Wertes für die Probenvorbereitung werden die in Tab. 4-15 angegebenen Bedingungen genutzt.

Tab. 4-15: Verwendete Parameter zur Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf den Lateral-Flow-Assay 3.

Mit BoNT/D dotierter Probenpuffer	Antikörperkonz. im Probenpuffer	Probenvorbereitung des Probenpuffers	Testvolumen	Membran
Alle in Tab. 4-3 aufgeführten Probenpuffer (pH-Bereich: 5,2-8,2).	Biotinylierter polyklon. AK; 0,30 µg/mL Goldkonjugierter monoklon. AK (Maus) 0,35 µg/mL	Inkubation im Wasserbad bei 37°C für 12 h	100 µL	CN 90 CN 140 CN 11301

Die verwendete optische Auswertung ist in Kapitel 7.3.3 dargestellt. Die Präparation der Teststreifen erfolgt wie in Kapitel 4.1 beschrieben. Die Unisart 11301 liefert die besten Ergebnisse, daher werden in Abb. 4-15 nur die Testergebnisse einer Unisart 11301 dargestellt.

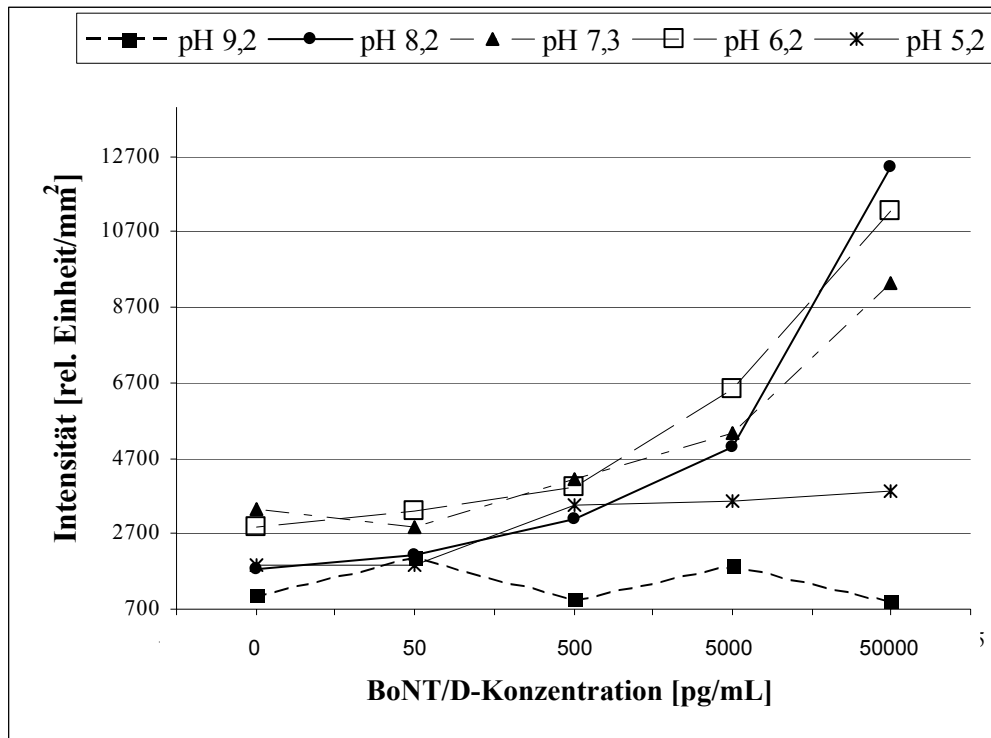


Abb. 4-15: Einfluss verschiedener pH-Werte auf die durchschnittliche Signalintensität der Testlinie des Lateral-Flow-Assays 3. Bei jeder Testreihe erfolgte die Probenvorbereitung und die Belegung des Release-Pads bei dem jeweils angegebenen pH-Wert.

Auch der Lateral-Flow-Assay 3 liefert wie der Assay 2 bei allen hier betrachteten Bedingungen falsch-positive Signale. Verglichen mit den Ergebnissen in Kapitel 4.2 liegen die Testlinienintensitäten in Abb. 4-15 insgesamt auf einem niedrigeren Niveau. Ein pH-Wert von 9,2 führt zu einer unspezifischen immunologischen Reaktion. Es treten konzentrationsunabhängige Testergebnisse auf, womit ein quantitativer BoNT/D-Nachweis bei diesem pH-Wert nicht möglich ist. Werden die Ergebnisse der anderen pH-Werten miteinander verglichen, so ergibt sich ein überraschender Trend. In der Darstellung gibt es zwei pH-Werte, nämlich 8,2 und 6,2, die für die immunologische Reaktion optimale Voraussetzungen bieten. Hier ist ein BoNT-Nachweis mit einer Sensitivität von 50 pg/mL möglich. Ein pH-Wert von 8,2 führt zu einem größeren dynamischen Nachweisbereich, der zwischen einer Intensität [rel. Einheit/mm²] von 1300 für die Blindprobe und einer Intensität von ca. 12700 im Falle einer Toxinkonzentration von 50 ng/mL liegt. Hingegen bewirkt ein pH-Wert von 6,2 einen engeren dynamischen Nachweisbereich. Eine Verringerung der Testsensitivität auf eine Nachweisgrenze von 500 pg/mL wird überraschender Weise durch den dazwischen liegenden pH-Wert von 7,2 bedingt. Erklärbar ist ein solches Phänomen beispielsweise durch zwei sich überschneidende Effekte. In der Abbildung ist zu erkennen, dass ein pH-Wert von 6,2 und 7,3 im Vergleich zu allen anderen pH-Werten eine sehr hohe Signalintensität des falsch-positiven Signals besitzen. Das intensivste falsch-positive Signal kann bei einem pH-Wert von 7,3 beo-

bachtet werden. Bei anderen betrachteten pH-Werten liegen die Signalintensitäten der Blindprobe niedriger. Damit überschneiden sich anscheinend bei den betrachteten Reaktionsbedingungen zwei Trends. Zum einen gibt es für die Bildung des mobilen Sandwichkomplexes einen optimalen pH-Bereich von 6,2-9,2. Dieses ist beispielsweise an den Signalintensitäten der höchsten getesteten BoNT/D-Konzentration erkennbar. Zum anderen ist die Intensität von unspezifischen Testsignalen bei einem pH-Wert von 7,3 am stärksten. Das Resultat dieser für den Toxinnachweis gegenläufigen Trends könnte sein, dass ein pH-Wert von 7,3 sich negativ auswirkt, wohingegen die beiden pH-Werte 6,2 und 8,2 höhere Nachweisgrenzen bedingen. Ein pH-Wert von 5,2 führt zu einer Testsensitivität von 0,5 ng/mL.

Im vorliegenden Abschnitt konnten für die Nachweisreaktion zwei optimale pH-Werte (6,2 und 8,2) ermittelt werden. Um möglichst nahe an der Durchführung des Toxinnachweises in der Maus zu bleiben, werden die folgenden Versuche vorerst bei einem pH-Wert von 6,2 durchgeführt und es wird ein GP-Puffer (pH 6,2) verwendet.

Untersuchung der Probenvorbereitungszeit

Zur Untersuchung der Inkubationszeit werden die in Tab. 4-16 dargestellten Bedingungen genutzt.

Tab. 4-16: Verwendete Parameter zur Untersuchung des Einflusses der Probenvorbereitungszeit auf den Lateral-Flow-Assay 3.

Mit BoNT/D dotierter Probenpuffer	Antikörperkonz. im Probenpuffer	Probenvorbereitung des Probenpuffers	Testvolumen	Membran
40 mM NaP-Puffer (pH 6,2)	Biotinylierter polyklon. AK; 0,30 µg/mL Goldkonjugierter monoklon. AK (Maus) 0,35 µg/mL	Inkubation im Wasserbad bei 37°C für verschiedene Zeiträume	100 µL	CN 11301

Es wird ein LFD verwendet, dessen Release-Pad mit einem 40 mM NaP-Puffer (0,6 Gew.-% BSA, 0,4 Gew.-% Tween 20, 5 Gew.-% Saccharose, pH 6,2) imprägniert wurde. Die Ergebnisse sind in Abb. 4-16 und in Abb. 4-17 dargestellt.

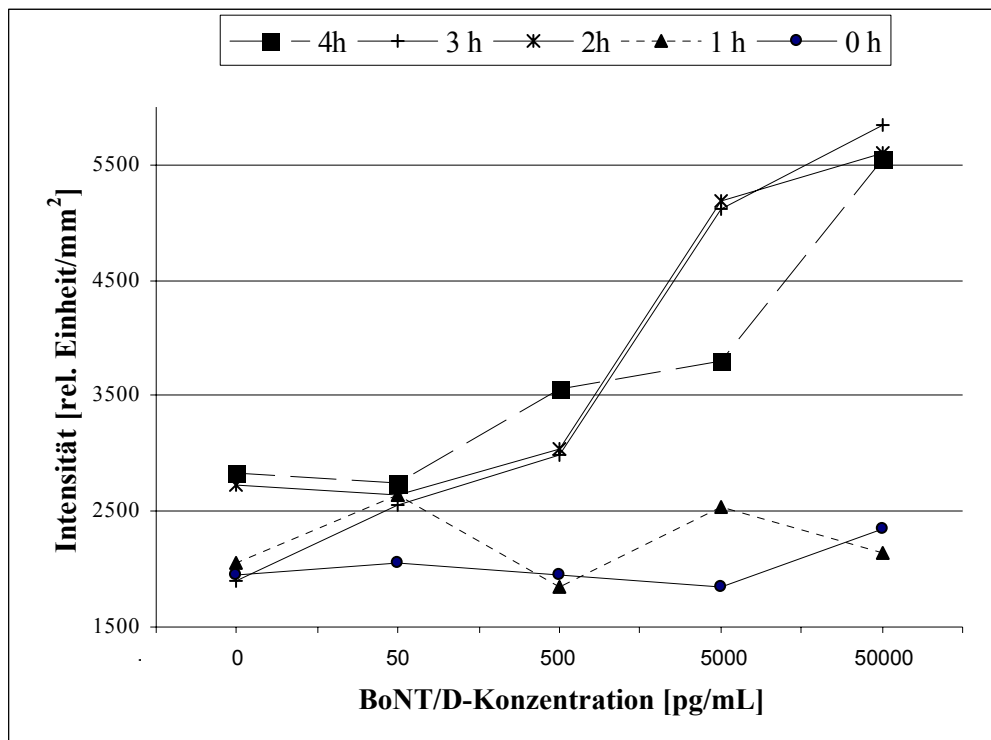


Abb. 4-16: Einfluss verschiedener Probenvorbereitungszeiten (0 - 4 h) auf die durchschnittliche Signalintensität der Testlinie des Lateral-Flow-Assays 3.

Die dargestellten Ergebnisse gliedern sich in vier Gruppen. In Gruppe eins befinden sich alle Probenvorbereitungen, bei denen sich während der Inkubation keine bzw. kaum mobile Sandwichkomplexe für den immunologischen Nachweis gebildet haben (0-1 Stunde). In der zweiten Gruppe haben sich für einen Toxinnachweis bereits mobile Sandwichkomplexe gebildet. In diesem Zeitraum von 2–6 Stunden kann eine Nachweissensitivität von 500 pg/mL erreicht werden. Dennoch steht zur vollständigen Komplexbildung anscheinend nicht genügend Zeit zur Verfügung, so dass die maximale Sensitivität nicht erreicht wird.

Abgeschlossen scheint die Bildung der mobilen Sandwichkomplexe bei einer Inkubationszeit von 12 h zu sein, welche eine Sensitivität von 50 pg/mL ermöglicht. Dieses Ergebnis stellt die Gruppe 3 dar.

Bei einer Verlängerung der Inkubationszeit kommt es schließlich zu einer Verminderung der Testsensitivität und in Gruppe vier ist mit einer Probenvorbereitungszeit von 16 Stunden eine Nachweisgrenze von nur ca. 50 ng/mL erreichbar. Aufgrund der in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse werden alle zukünftigen Versuchsreihen mit einer Probenvorbereitungszeit von 12 h bei 37 °C im Wasserbad durchgeführt.

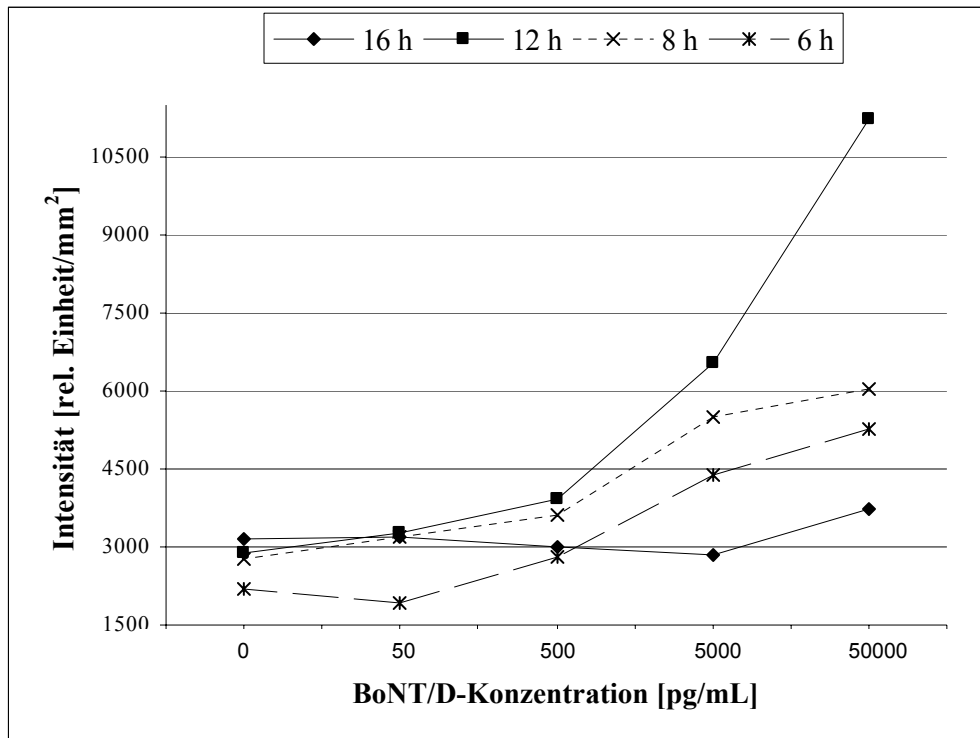


Abb. 4-17: Einfluss verschiedener Probenvorbereitungszeiten (6 - 16 h) auf die durchschnittliche Signalintensität der Testlinie des Lateral-Flow-Assays 3.

Einfluss verschiedener Goldkonjugatkonzentrationen

Zur Bestimmung der optimalen Goldkonjugatkonzentration werden die in Tab. 4-17 angegebenen Bedingungen genutzt. Das Release-Pad der getesteten Lateral-Flow-Tests wird mit 40 mM NaP-Puffer (0,6 Gew.-% BSA, 0,4 Gew.-% Tween 20, 5 Gew.-% Saccharose, pH 7,2) imprägniert. Trägt man die Linienintensität gegen die Konzentration auf, ergibt sich Abb. 4-18.

Tab. 4-17: Verwendete Parameter zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Goldkonjugatkonzentrationen auf den Lateral-Flow-Assay 3.

Mit BoNT/D dotierter Probenpuffer	Antikörperkonz. im Probenpuffer	Probenvorbereitung des Probenpuffers	Testvolumen	Membran
28 mM GP-Puffer (pH 6,2)	Biotinylierter polyklon. AK, 0,30 µg/mL Goldkonjugierte monoklon. AK (Maus) Versch. Konz.	Inkubation im Wasserbad bei 37°C für 12 h	100 µL	CN 11301

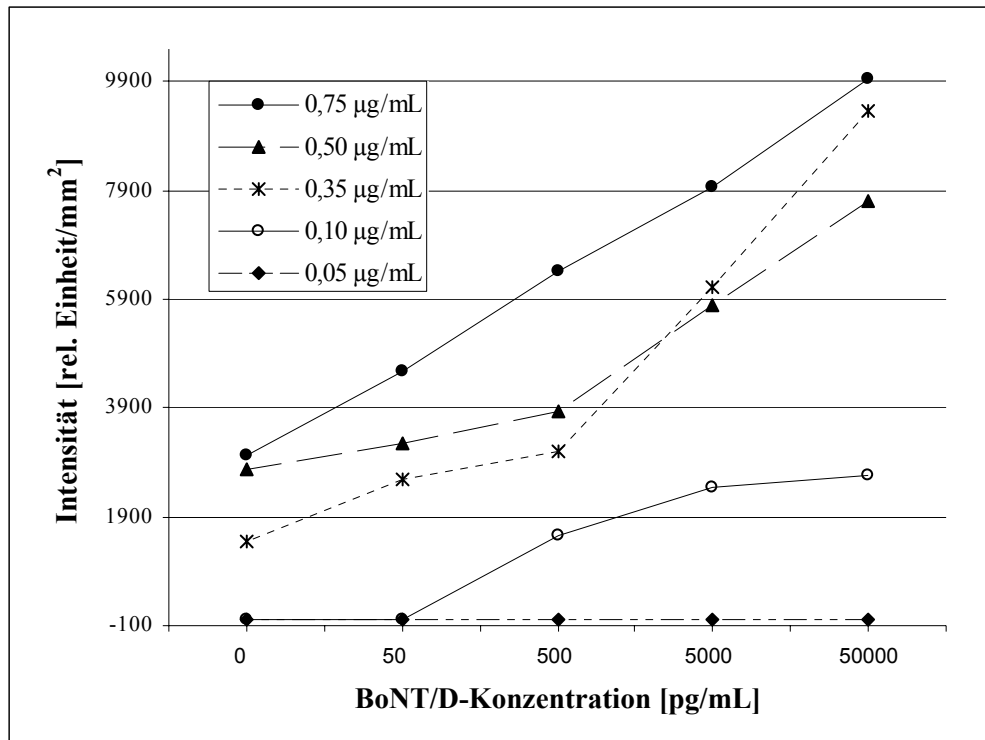


Abb. 4-18: Einfluss verschiedener Konzentrationen des goldkonjugierten Antikörpers im Probenpuffer (0,05 – 0,75 µg/mL) auf die durchschnittliche Signalintensität der Testlinie des Lateral-Flow-Assays 3.

Wird eine Goldkonjugatkonzentration von 0,05 µg/mL verwendet, so ist kein Toxinachweis in dem betrachteten Toxinkonzentrationsbereich möglich. Eine Goldkonjugatkonzentration von 0,10 µg/mL führt dagegen zu einer Sensitivität von 500 pg/mL, wobei keine falsch-positiven Signale beobachtet werden. Damit sind zum ersten Mal Versuchsbedingungen ermittelt worden, bei denen eine unspezifische Reaktion zwischen dem goldkonjugierten Antikörper und dem immobilisierten Streptavidin unterbunden wird.

Die Nachweisgrenze aller anderen betrachteten Goldkonjugatkonzentrationen in Abb. 4-18 beträgt ca. 50 pg/mL. Unter Berücksichtigung der hier vorliegenden Ergebnisse könnte in einer weiteren Versuchsreihe eine effiziente Einstellung der optimalen Goldkonjugatkonzentration in einem Bereich von 0,1–0,35 µg/mL vorgenommen werden. Außer bei Goldkonjugatkonzentrationen von 0,05 und 0,10 µg/mL treten bei den hier betrachteten Versuchsreihen immer falsch-positive Signale auf. So wird deutlich, dass die Konzentration des goldkonjugierten Antikörpers einen signifikanten Einfluss auf die resultierende Testlinienintensität und auf das Auftreten von falsch-positiven Signalen hat.

Zusätzlich ist der allgemeine Trend zu erkennen, dass die Intensität der Blindprobe mit zunehmender Goldkonjugatkonzentration ebenfalls zunimmt. Um den Einfluss des Probenvo-

lumens auf die Signalintensitäten effektiv untersuchen zu können, wird in dem folgenden Abschnitt eine Goldkonjugatkonzentration von 0,75 µg/mL verwendet.

Einfluss verschiedener Probenvolumina

Zur Bestimmung des optimalen Probenvolumens werden die in Tab. 4-17 angegebenen Bedingungen genutzt. Das Release-Pad der Lateral-Flow-Assays wird mit einem 40 mM NaP-Puffer (0,6 Gew.-% BSA, 0,4 Gew.-% Tween 20, 5 Gew.-% Saccharose, pH 7,2) imprägniert. Die Ergebnisse sind in Abb. 4-19 dargestellt.

Tab. 4-18: Verwendete Parameter zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Probenvolumina auf den Lateral-Flow-Assay 3.

Mit BoNT/D dotierter Probenpuffer	Antikörperkonz. im Probenpuffer	Probenvorbereitung des Probenpuffers	Testvolumen	Membran
28 mM GP-Puffer (pH 6,2)	Biotinylierter polyklon. AK; 0,30 µg/mL Goldkonjugierter monoklon. AK (Maus) 0,75 µg/mL	Inkubation im Wasserbad bei 37°C für 12 h	Wird variiert	CN 11301

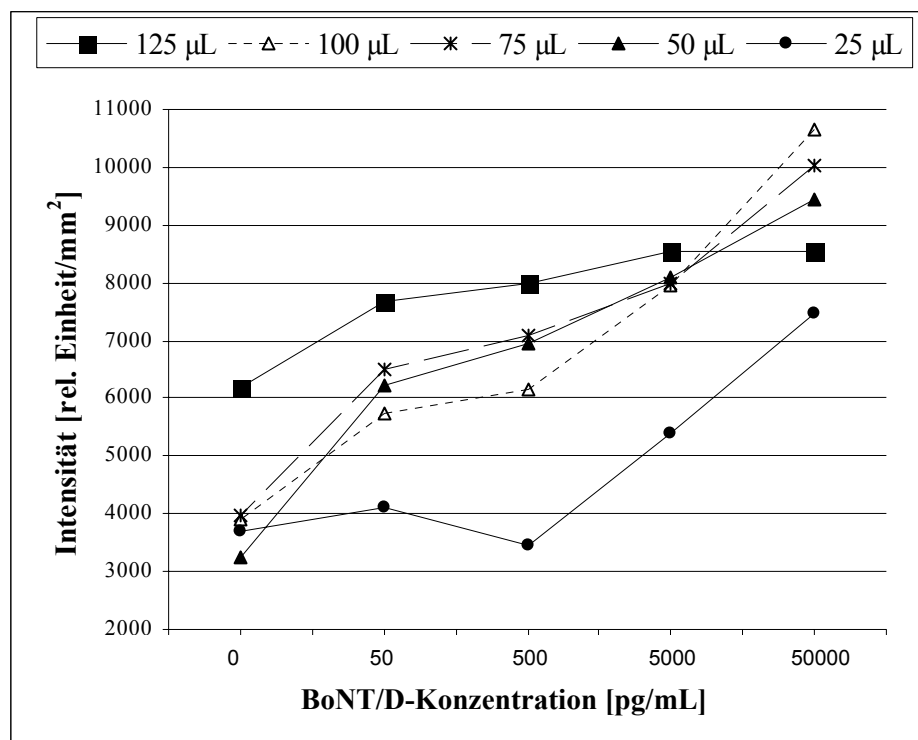


Abb. 4-19: Einfluss verschiedener Testvolumen (25 – 125 µL) auf die durchschnittliche Signalintensität der Testlinie des Lateral-Flow-Assays 3.

Innerhalb der hier betrachteten Versuchsbedingungen werden immer falsch-positive Ergebnisse der Blindprobe beobachtet. Vergleicht man die verschiedenen Versuchsbedingungen, so ist zu erkennen, dass eine Vergrößerung des Probenvolumens eine Erhöhung der Signalintensität des falsch-positiven Signals bedingt. Ein Probenvolumen von 25 μL führt zur geringsten Sensitivität von 5 ng/mL. Eine Erhöhung des Probenvolumens auf 50 μL - 125 μL führt zu einer Erhöhung der Sensitivität, so dass eine Nachweisgrenze von 50 pg/mL erreicht werden kann. Der größte dynamische Bereich kann bei einem Probenvolumen von 100 μL festgestellt werden; daher beträgt daher das Probenvolumen in den folgenden Versuchen 100 μL . Entsprechend Kapitel 4.2 können die Ergebnisse verschiedener Probenvolumina mit denen von verschiedenen Goldkonjugatkonzentrationen gegenübergestellt werden:

Tab. 4-19: Einfluss verschiedener Stoffmengen des goldkonjugierten Antikörpers auf die Nachweisgrenze und die Signalintensität des falsch-positiven Signals des Lateral-Flow-Assays 3.

Menge Goldkonjugat [ng]	Bedingung Goldkonjugatkonz. = GK	Ergebnis
5 (Variation der Goldkonjugatkonz.)	Testvolumen: 100 μL GK: 0,05 $\mu\text{g/mL}$ (Abb. 4-18)	Intensität der Blindprobe: Kein BoNT-Nachweis möglich; Testsensitivität: Kein BoNT-Nachweis möglich
10 (Variation der Goldkonjugatkonz.)	Testvolumen: 100 μL GK: 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (Abb. 4-18)	Intensität der Blindprobe: Kein Signal; Testsensitivität: 500 pg/mL
18 (Variation des Testvolumens)	Testvolumen: 25 μL GK: 0,75 $\mu\text{g/mL}$ (Abb. 4-19)	Intensität der Blindprobe: ca. 3000 [rel. Einheit/ mm^2]; Testsensitivität: 5 ng/mL.
35 (Variation der Goldkonjugatkonz.)	Testvolumen: 100 μL GK: 0,35 $\mu\text{g/mL}$ (Abb. 4-18)	Intensität der Blindprobe: ca. 1700 [rel. Einheit/ mm^2]; Testsensitivität: 50 pg/mL.
38 (Variation des Testvolumens)	Testvolumen: 50 μL GK: 0,75 $\mu\text{g/mL}$ (Abb. 4-19)	Intensität der Blindprobe: ca. 3800 [rel. Einheit/ mm^2]; Testsensitivität: 50 pg/mL.
50 (Variation der Goldkonjugatkonz.)	Testvolumen: 100 μL GK: 0,50 $\mu\text{g/mL}$ (Abb. 4-18)	Intensität der Blindprobe: ca. 3000 [rel. Einheit/ mm^2]; Testsensitivität: 50 pg/mL.

Fortsetzung der Tab. 4-19: Einfluss verschiedener Stoffmengen des goldkonjugierten Antikörpers auf die Nachweisgrenze und die Signalintensität des falsch-positiven Signals des Lateral-Flow-Assays 3.

Menge Goldkonjugat [ng]	Bedingung Goldkonjugatkonz. = GK	Ergebnis
56 (Variation des Testvolumens)	Testvolumen: 75 µL GK: 0,75 µg/mL (Abb. 4-19)	Intensität der Blindprobe: ca. 4000 [rel. Einheit/mm ²]; Testsensitivität: 50 pg/mL.
75 (Variation der Goldkonjugatkonz. und des Testvolumens)	Testvolumen: 100 µL GK: 0,75 µg/mL (Abb. 4-18 und Abb. 4-19)	Intensität der Blindprobe: ca. 3500 (Abb. 4-18) bzw. 3800 (Abb. 4-19) [rel. Einheit/mm ²]; Testsensitivität: 50 pg/mL.
94 (Variation des Testvolumens)	Testvolumen: 125 µL GK: 0,75 µg/mL (Abb. 4-19)	Intensität der Blindprobe: ca. 6000 [rel. Einheit/mm ²]; Testsensitivität: 50 pg /mL.

Bei Betrachtung der Ergebnisse in Tab. 4-19 wird deutlich, dass die Signalintensität des falsch-positiven Signals nur schwach von der Gesamtmenge des durch die Testlinie geflossenen Goldkonjugates abhängt. Vielmehr scheint die Konzentration im Probenpuffer einen deutlich stärkeren Einfluss zu haben

Überprüfung der Reproduzierbarkeit und Lagerungsfähigkeit

Die Reproduzierbarkeit des Lateral-Flow-Assays wird mit der in Tab. 4-20 angegebenen Testdurchführung untersucht.

Tab. 4-20: Verwendete Parameter zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit und Lagerungsfähigkeit des Lateral-Flow-Assay 3.

Mit BoNT/D dotierter Probenpuffer	Antikörperkonz. im Probenpuffer	Probenvorbereitung des Probenpuffers	Testvolumen	Membran
28 mM GP-Puffer (pH 6,2)	Biotinylierter polyklon. AK; 0,30 µg/mL Goldkonjugierter monoklon. AK (Maus) 0,35 µg/mL	Inkubation im Wasserbad bei 37°C für 12 h	100 µL	CN 11301

Die Release-Pads des Lateral-Flow-Tests werden mit einem 40 mM NaP-Puffer (0,6 Gew.-% BSA, 0,4 Gew.-% Tween 20, 5 Gew.-% Saccharose, pH 7,2) imprägniert. Die gebrauchsfertigen Lateral-Flow-Tests werden mit Trocknungsmitteln in Siegelrandbeutel aus Alu-Verbundfolie verpackt und bis zum Gebrauch bei RT gelagert. Exemplarisch sind die Ergebnisse einer Versuchsreihe bei einem pH-Wert von 6,2 in Abb. 4-20 dargestellt.

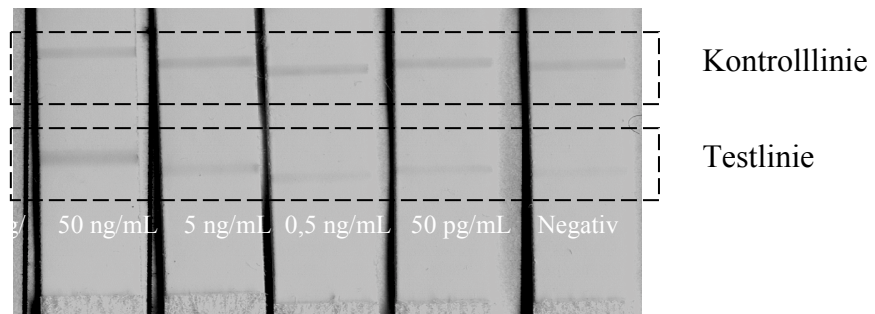


Abb. 4-20: Ergebnisse des Lateral-Flow-Assays 3 bei optimaler Testdurchführung (pH 6,2). Die Abbildung zeigt den Einfluss verschiedener BoNT/D-Konzentrationen auf die Signalintensität.

Zur Betrachtung der Reproduzierbarkeit wird eine Dreifachbestimmung einer Probenlösung durchgeführt und die Testlinienintensitäten optisch ausgewertet. Das arithmetische Mittel der Linienintensitäten und der mittlere Fehler des arithmetischen Mittels ΔX wird entsprechend Kapitel 4.2 bestimmt. Trägt man die arithmetisch gemittelten Linienintensitäten mit dem jeweiligen mittleren Fehler des arithmetischen Mittels ΔX gegen die Konzentration auf, so ergibt sich Abb. 4-21. Mit den dargestellten Ergebnissen ist ein BoNT/D-Toxin nachweis mit einer Sensitivität von ca. 50 pg/mL möglich.

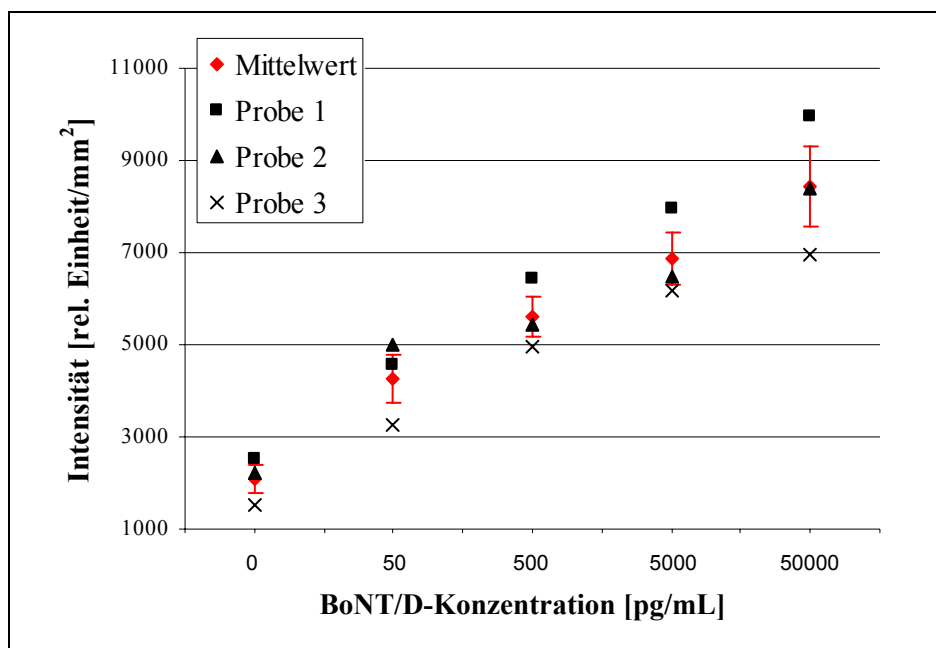


Abb. 4-21: Ergebnisse einer Dreifachbestimmung einer BoNT/D-Konzentrationsreihe mit Lateral-Flow-Assay 3.

Zusammenfassung

Der in diesem Kapitel entwickelte Lateral-Flow-Assay 3 besitzt eine Nachweisgrenze von ca. 50 pg/mL. Ähnlich wie im Fall des Lateral-Flow-Assays 2 werden auch bei diesem Test falsch-positive Ergebnisse beobachtet. Als eine Ursache der falsch-positiven Signale kann eine unspezifische Reaktion zwischen dem goldkonjugierten Antikörper und dem innerhalb der Testlinie immobilisierten Streptavidin angesehen werden. Die Ergebnisse im Abschnitt „*Einfluss verschiedener Goldkonjugatkonzentrationen*“ zeigen, dass die Intensität des falsch-positiven Testsignals von der Konzentration des goldkonjugierten Antikörpers in dem Probenpuffer abhängt. Hier werden auch Bedingungen gefunden, bei denen kein falsch-positives Signal auftritt. Damit kann im Gegensatz zu den Ergebnissen des Assays 3 (Kapitel 4.2) das Hintergrundsignal beseitigt werden; jedoch nur auf Kosten der Sensitivität. So beträgt beispielsweise bei Verwendung einer Goldkonjugatkonzentration von 0,10 µg/mL die Nachweisgrenze 0,5 ng/mL, ohne dass es zu unspezifischen Signalen kommt. Ein Vergleich der Ergebnisse verschiedener Goldkonjugatkonzentrationen mit den Ergebnissen von verschiedenen Testvolumen zeigt, dass die Intensität des Signals der Blindprobe von der Konzentration des goldkonjugierten Antikörpers in dem Probenpuffer abhängig ist. Die Sensitivität des Lateral-Flow-Assays 3 kann nicht mit den in Kapitel 7.3.4 beschriebenen Bedingungen für einen Silberfixierungsschritt verstärkt werden.

Die vorliegenden Ergebnisse bieten eine gute Grundlage für weitere Optimierungsschritte, die mit Realproben durchgeführt werden. So sollte beispielsweise der geeignetere der beiden für die Testdurchführung optimalen pH-Werte (6,2 und 8,2) bestimmt werden. Des Weiteren können Untersuchungen der Goldkonjugatkonzentrationen in einem Bereich von 0,10 - 0,35 µg/mL erfolgen.

4.4 Lateral-Flow-Assay 4

In der letzten Kombinationsmöglichkeit wird ein „mobiler Sandwichkomplex“ zwischen dem Analyten BoNT/D, einem goldkonjugierten polyklonalen Antikörper (Huhn) und einem biotinylierten polyklonalen Antikörper (Ziege) gebildet. Der schematische Aufbau des Lateral-Flow-Assays ist in Abb. 4-22 dargestellt. Die Testlinie wird mit einer 2 mg/mL Streptavidinlösung (20 mM NaP-Puffer (pH 8,0), 150 mM NaCl) appliziert. Die Applikationshöhe der Testlinie beträgt 1,5 cm von der Unterkante der Membran. 0,5 cm oberhalb dieser Testlinie wird die Kontrolllinie aufgetragen. Die Applikation der Kontrolllinie erfolgt mit einer 2 mg/mL Anti-Huhn-IgY Proteinlösung (Anti-Huhn-IgY (Ziege), applikationsfertige Lösung). Die Linienapplikation, die Release-Pad-Vorbehandlung und die Testherstellung erfolgen abhängig von dem untersuchten pH-Wert entsprechend Kapitel 7.4.5.

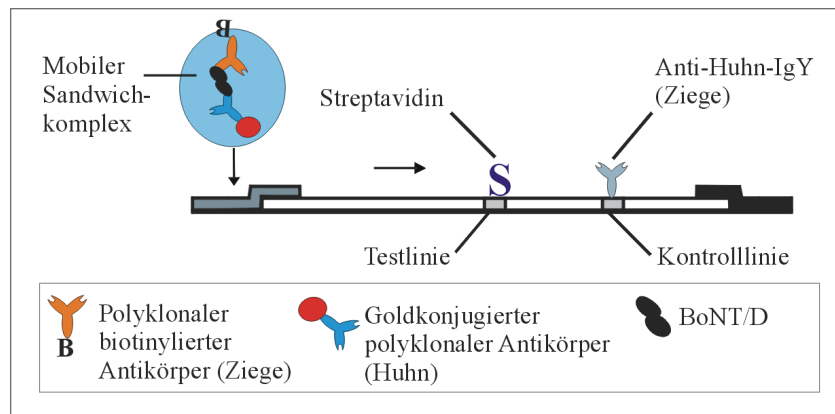


Abb. 4-22: Aufbau und Komponenten des Lateral-Flow-Assays 4.

Zur Bestimmung des optimalen pH-Wertes der immunologischen Bildung des Sandwichkomplexes werden gemäß der bisherigen Vorgehensweise die in Tab. 4-3 angegebenen Probenpuffer mit verschiedenen Toxinkonzentrationen dotiert (pH-Bereich: 5,2 - 8,2).

Anschließend werden zu den Probelösungen die Antikörper gegeben, so dass der biotinylierte polyklonale Antikörper (Ziege) in einer Konzentration von 0,3 µg/mL und der goldkonjugierte polyklonale Antikörper (Huhn) in einer Konzentration von 2,0 µg/mL vorliegen.

Die Proben werden im Wasserbad bei 37°C inkubiert und nach einer Inkubationszeit von 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16 Stunden getestet. Die in Kapitel 4.1 beschriebene Release-Pad-Imprägnierung des Lateral-Flow-Tests wird derart angepasst, dass der als Probenpuffer verwendete Puffer auch zur Release-Pad-Vorbehandlung genutzt wird, ergänzt um die in Tab. 4-3 angeführten Reagenzien.

Je Versuchsreihe werden verschiedene Membranen mit unterschiedlichen Migrationsgeschwindigkeiten verwendet (Unisart CN 90, Unisart CN 140 und Unisart 11301). Das Probenvolumen wird variiert und beträgt 50, 100, 150 und 200 µL. Um den Einfluss der diagnostischen Membran zu untersuchen, werden die oben beschriebenen Versuche mit weiteren Membrantypen wiederholt. Die Ergebnisse sind in Tab. 4-21 aufgeführt.

Tab. 4-21: Einfluss verschiedener diagnostischer Membranen auf die Testsensitivität des LFA 4.

Membran	Eigenschaften		Ergebnisse
	Porengröße: [µm]	Migrationsgeschw. [Sek./40 mm]	
PuraBind ASP	3	123	Kein Nachweis möglich
PuraBind AFP	5	116	Kein Nachweis möglich
PuraBind ARP	Porengröße: 8	93	Kein Nachweis möglich
FF 60/100	Keine Angabe	84	Kein Nachweis möglich
FF 85/100	Keine Angabe	152	Kein Nachweis möglich
FF 125/100	Keine Angabe	223	Kein Nachweis möglich
Predator Laminated	Keine Angabe	≤ 240Sek./ 20mm	Kein Nachweis möglich, starke Hintergrundfärbung
Unisart CN 200	5	198	Kein Nachweis möglich
Unisart CN 140 11301	8	152	Kein Nachweis möglich
Hi – Flow Plus HF07504	Keine Angabe	68	Kein Nachweis möglich
Hi – Flow Plus HF09004	Keine Angabe	75	Kein Nachweis möglich
Hi – Flow Plus HF13504	Keine Angabe	124	Kein Nachweis möglich

Zusammenfassung

Keine der hier betrachteten Versuchsbedingungen ermöglicht einen BoNT/D-Nachweis mit dem Lateral-Flow-Assay 4. Es treten bei einem getesteten Probenvolumen von 150 und 200 µL lediglich konzentrationsunabhängige, unspezifische Signale auf, die zu immer gleich intensiven Testsignalen führen. Des Weiteren kann auch durch die betrachteten Variationen des pH-Wertes, der Probeninkubationszeiten, des Probenvolumens und des Einsatzes von 14 diagnostischen Membranen kein BoNT/D-Nachweis optimiert werden.

Der Grund hierfür könnte sein, dass die Bildung eines mobilen Sandwichkomplexes zwischen dem Analyten BoNT/D, einem goldkonjugierten polyklonalen Antikörper (Huhn) und einem biotinylierten polyklonalen Antikörper (Ziege) aufgrund unbekannter Interaktionen gehemmt wird.

4.5 Zusammenfassung

Aufbauend auf den Ergebnissen in Kapitel 3.1 und Kapitel 3.2 werden in diesem Kapitel verschiedene Lateral-Flow-Assays mit einem separaten Probenvorbereitungsschritt untersucht (Abb. 4-1). Ausgehend von den verfügbaren Antikörpern ergeben sich vier verschiedene Kombinationsmöglichkeiten der Antikörper für einen Lateral-Flow-Assay, wobei nur drei Kombinationsmöglichkeiten einen BoNT/D-Nachweis ermöglichen. Für jeden dieser drei Lateral-Flow-Assays kann die Probenvorbereitung, Testdurchführung und Auswertung optimiert werden. Dafür wurden verschiedene Parameter untersucht, wie der pH-Wert, die Probenvorbereitungszeit, die Konzentration des goldkonjugierten Antikörpers, das applizierte Probenvolumen, die Silberfixierung, die Testreproduzierbarkeit und Lagerungsfähigkeit. Mittels eines hierfür angepassten optischen Auswertungssystems können die subjektiven Ergebnisse der visuellen Begutachtung in vergleichbare, reproduzierbare und aussagekräftige Daten überführt werden. Im Folgenden werden die erarbeiteten Ergebnisse tabellarisch zusammengefasst und verglichen. Die Arbeitsvorschriften zur Herstellung der hier beschriebenen funktionsfähigen drei Lateral-Flow-Assays sind im Anhang im Kapitel 7.4 aufgeführt.

Die optimierten Reaktionsbedingungen des Lateral-Flow-Assays 1 sind in Tab. 4-22 zusammengefasst. Eine optische Auswertung der Testergebnisse konnte nicht erfolgen, da das Auswertungssystem noch nicht bereitstand. Überraschend ist hier, dass nur eine einzige Membran einen BoNT/D-Nachweis ermöglicht. Mittels Silberfixierung gelingt eine Sensitivitätserhöhung um den Faktor 100, jedoch nur unter Generierung eines falsch-positiven Signals. Gerade wegen des auftretenden falsch-positiven Signals der Blindprobe würde sich eine optische Auswertung anbieten, um eine gute Differenzierungsmöglichkeit zu toxischen Proben zu etablieren.

Tab. 4-22: Zusammenfassung des Testaufbaus und einiger optimierter Reaktionsbedingungen des Lateral-Flow-Assays 1.

Testaufbau					
Nr.	Goldkonjugierter Antikörper (AK)	Antikörper AK 2	„Capture“-Reagenz Testlinie	Sekundärer AK Kontrolllinie	
1	Polyklonaler AK (Huhn)	Monoklonaler AK (Maus)	Anti-Maus-IgG	Anti-Huhn-IgY	
Optimierte Bedingungen					
pH-Wert Probenpuffer	Inkubationszeit [bei 37°C]	Probenvolumen	Sensitivität	Sensitivität nach Silberfixierung	Testzeit
7,2	4 h	100 µL	5 ng/mL	50 pg/mL	4 h 50 Min.

Auffällig bei den Ergebnissen des Lateral-Flow-Assays 2 (Tab. 4-23) ist, dass immer falsch-positive Signale auftreten. Obwohl gezeigt wird, dass dieses Phänomen nicht auf Lagerungseffekte zurückzuführen ist und dass die Signalintensität des falsch-positiven Signals von der Stoffmenge des durch die Testzone fließenden Goldkonjugates abhängt, bedeutet dieses Hintergrundsignal eine Einschränkung im Vergleich zu vielen herkömmlichen Lateral-Flow-Assays mit einer klassischen Ja/Nein-Antwort.

Es ist jedoch möglich diesen Nachteil durch eine optische Auswertung auszugleichen, so dass eine Differenzierung des falsch-positiven Signals von dem einer toxinhaltigen Probe mit einer BoNT/D Konzentration von 50 pg/mL möglich ist. Mittels eines Silberfixierungsschrittes kann die Sensitivität des Assays nicht erhöht werden, da aufgrund des relativ hohen Hintergrundsignals lediglich die Signalintensitäten verstärkt werden, ohne dass dieses zu einer Erhöhung der Sensitivität führt.

Tab. 4-23: Zusammenfassung des Testaufbaus und einiger optimierter Reaktionsbedingungen des Lateral-Flow-Assays 2.

Testaufbau					
Nr.	Goldkonjugierter Antikörper (AK)	Antikörper AK 2	„Capture“-Reagenz Testlinie	Sekundärer AK Kontrolllinie	
2	Monoklonaler AK (Maus)	Polyklonaler AK (Huhn)	Anti-Huhn-IgY	Anti-Maus-IgG	
Optimierte Bedingungen					
pH-Wert Probenpuffer	Inkubationszeit [bei 37°C]	Probenvolumen	Sensitivität	Sensitivität nach Silberfixierung	Testzeit
6,2	3 h	50 µL	50 pg/mL	/	3 h 30 Min.

Ähnlich wie im Fall des Lateral-Flow-Assays 2 treten auch bei Lateral-Flow-Assay 3 (Tab. 4-24) falsch-positive Ergebnisse der Blindprobe auf. Die Untersuchungen zeigen, dass die Intensität des falsch-positiven Signals von der Konzentration des goldkonjugierten Antikörpers in der Probenlösung abhängig ist.

So können in Kapitel 4.3 die falsch-positiven Signale im Gegensatz zu den Ergebnissen im Kapitel 4.2 auf Kosten der Sensitivität beseitigt werden. Aber durch den Einsatz geringerer Goldkonjugatkonzentrationen von beispielsweise 0,5 ng/mL wird die Nachweisgrenze auf 500 pg/mL herabgesetzt. Weitere Optimierungen erfolgen im nächsten Schritt anhand von dotierten Realproben. Die Testsensitivität kann mittels eines Silberfixierungsschrittes nicht verstärkt werden.

Tab. 4-24: Zusammenfassung des Testaufbaus und einiger optimierter Reaktionsbedingungen des Lateral-Flow-Assays 3.

Testaufbau					
Nr.	Goldkonjugierter Antikörper (AK)	Antikörper AK 2	„Capture“-Reagenz Testlinie	Sekundärer AK Kontrolllinie	
3	Monoklonaler AK (Maus)	Biotinylierter polyklonaler AK	Streptavidin	Anti-Maus-IgG	
Optimierte Bedingungen					
pH-Wert Probenpuffer	Inkubationszeit [bei 37°C]	Probenvolumen	Sensitivität	Sensitivität nach Silberfixierung	Testzeit
8,2 + 6,2	12 h	100 µL	50 pg/mL	/	13 h 30 Min.

Ein BoNT/D-Nachweis ist mittels des Lateral-Flow-Systems 4 (Tab. 4-25) nicht möglich. Weder durch Variation des pH-Wertes, der Probeninkubationszeit, des Probenvolumens noch durch den Einsatz von 14 diagnostischen Membranen kann das System derart optimiert werden, dass ein BoNT/D-Nachweis gelingt.

Tab. 4-25: Zusammenfassung des Testaufbaus und einiger optimierter Reaktionsbedingungen des Lateral-Flow-Assays 4.

Testaufbau					
Nr.	Goldkonjugierter Antikörper (AK)	Antikörper AK 2	„Capture“-Reagenz Testlinie	Sekundärer AK Kontrolllinie	
4	Polyklonaler AK (Huhn)	Biotinylierter polyklonaler AK	Streptavidin	Anti-Huhn-IgY	
Optimierte Bedingungen					
pH-Wert Probenpuffer	Inkubationszeit [bei 37°C]	Probenvolumen	Sensitivität	Sensitivität nach Silberfixierung	Testzeit
Kein BoNT-Nachweis möglich					

Nachdem die Entwicklung der Lateral-Flow-Assays abgeschlossen ist, kann im nächsten Schritt der Einfluss von realen Proben getestet werden.

4.6 Ergebnisse dotierter Realproben (Kotproben)

In den vorherigen Kapiteln wird die Entwicklung von drei Lateral-Flow-Assays dargestellt, mittels derer ein BoNT/D Nachweis mit einer Sensitivität von 50 pg/mL möglich ist. Während der praktischen Versuche der vorliegenden Arbeit wurde die Produktion der einzigen funktionierenden Membran des Lateral-Flow-Assays 1 eingestellt. Daher werden aus Materialmangel an dieser Stelle nur die Assays 2 und 3 getestet. Im ersten Schritt werden in diesem Kapitel Pferdekotproben mit verschiedenen BoNT/D-Konzentrationen dotiert, deren tat-

sächliche Toxinkonzentration mit einem Toxinnachweis in der Maus überprüft und abschließend die Ergebnisse des Lateral-Flow-Assays 2 und 3 beschrieben.

Dotieren der Proben

Als Probenmatrix für Realproben werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit dotierte Pferdekotproben genutzt. Zur Bestimmung des Feuchtigkeitsgehaltes werden die Kotproben zuerst gewogen und nach einer Trocknung bei 120°C für 12 Stunden in einem Trockenschrank wird der Trockenverlust bestimmt. Dieser entspricht dem Wasseranteil bzw. dem Feuchtigkeitsgehalt der Proben. Nach der Trocknung wird der Trockenrückstand mittels einer Kugelmühle (5000 RPM, Pulverisette 6, Fa. Fritsch) pulverisiert. Zur Dotierung der Realproben wird bidestilliertes Wasser mit verschiedenen Mengen an BoNT/D versetzt. Die Konzentrationen dieser Wasserproben werden so gewählt, dass die Kotproben nach der Wiederherstellung ihres Feuchtigkeitsgehaltes eine BoNT/D-Konzentration von 0, 100 und 1000 pg/mL haben. Entsprechend des jeweiligen Trockenverlustes wird den pulverisierten Kotproben das mit Toxin dotierte bidestillierte Wasser zugegeben und in einer Petrischale gut vermischt. Die Realproben werden in 2 mL Eppendorfcaps abgefüllt und bei -80°C gelagert.

Herstellung des Probenextrakts

Für die Analyse werden die bei -80°C gelagerten dotierten Kotproben frisch aufgetaut. Pro Toxinkonzentration werden 5 g der jeweiligen Probe mit 5 mL eines 28 mM GP-Puffers (pH 6,2) versetzt und gut durchgeschüttelt. Es schließt sich eine Lagerung im Kühlschrank über Nacht bei 5-8°C an. Der Überstand wird abpipettiert und 5 Minuten bei 5000 RPM zentrifugiert. Der Überstand wird isoliert und in den folgenden Nachweisen weiterverwendet. Die Extrakte der dotierten Kotproben weisen durch die Zugabe des 28 mM GP-Puffers eine Toxinkonzentration von 0, 50 und 500 pg/mL auf. Eine Benennung der Probenextrakte erfolgt entsprechend ihrer BoNT/D-Konzentration als „Extrakt 0“ (0 pg/mL), „Extrakt 50“ (50 pg/mL) und „Extrakt 500“ (500 pg/mL).

Toxinnachweis in der Maus

Die Durchführung des Toxinnachweises in der Maus entspricht der Versuchsbeschreibung in Kapitel 2.2.2. Für die Testdurchführung werden die Probenextrakte der dotierten Kotproben genutzt. Zur Bestätigung der Toxinkonzentration werden zusätzliche Verdünnungen der Probenextrakte hergestellt und getestet. So wird die Probe „Extrakt 500“ mit 28 mM GP-Puffer (pH 6,2) 1:10 und 1:100 verdünnt. Auch die Probe „Extrakt 50“ wird zusätzlich 1:10 mit 28 mM GP-Puffer (pH 6,2) verdünnt. Gemäß dem Injektionsplan in Tab. 4-26 werden den Mäusen jeweils 0,5 mL der Lösung intraperitoneal injiziert. Nach der Injektion werden die

Mäuse innerhalb der ersten 8 Stunden alle zwei Stunden, danach zweimal täglich kontrolliert. Eine Beobachtung der Tiere findet über einen Zeitraum von vier Tagen statt.

Tab. 4-26: Injektionsplan: Überprüfung der BoNT/-Konzentration von dotierten Kotproben mittels eines Toxinnachweises in der Maus.

Tiere	Probe	Toxinkonzentration [pg/mL]	Symptome	Tod
1 und 2	„Extrakt 500“	[500 pg/mL]	Nach 8 h leichte Wespentaille	20 h
3 und 4	„Extrakt 500“ 1:10 verdünnt	[50 pg/mL]	Nach 8 h leichte Wespentaille	32 h
5 und 6	„Extrakt 500“; 1:100 verdünnt	[5 pg/mL]	Nach 20 h leichte Wespentaille	-
7 und 8	„Extrakt 50“	[50 pg/mL]	Nach 20 h leichte Wespentaille	20 h
9 und 10	„Extrakt 50“ 1:10 verdünnt [5 pg/mL]	[5 pg/mL]	Keine	-
11 und 12	„Extrakt 0“ [0 pg/mL]	[0 pg/mL]	Keine	-

In Tab. 4-26 sind die Ergebnisse der Probenextrakte und deren Verdünnungen dargestellt. Eine letale intraperitoneale BoNT/D Dosis einer Labormaus beträgt ca. 25 pg/Maus. Die Konzentration der Probe „Extrakt 500“ (500 pg/mL) wird bestätigt, da auch deren 1:10 Verdünnung eine toxische Wirkung hat, nicht aber die 1:100 Verdünnung. Auch die unverdünnte Probe „Extrakt 50“ zeigt eine toxische Wirkung; ihre 1:10 Verdünnung jedoch nicht mehr, wodurch eine Konzentration von 50 pg/mL bestätigt wird. Die Blindprobe („Extrakt 0“) hat keine toxische Wirkung. Mit diesen Ergebnissen kann der jeweilige Toxingehalt der dotierten Kotproben bestätigt werden.

Lateral-Flow-Assay 2

Die Präparation der Teststreifen erfolgt entsprechend der Arbeitsvorschrift in Kapitel 7.4.3. Die verpackten, gebrauchsfertigen Lateral-Flow-Tests werden erst kurz vor Gebrauch ausgepackt. Den Probenextrakten werden der goldkonjugierte monoklonale Anti-BoNT/D und der polyklonale Anti-BoNT/D (Huhn) zugegeben. Nach dieser Zugabe beträgt im Probenpuffer die Konzentration des polyklonalen Anti-BoNT/D (Huhn) 2,00 µg/mL und

die Konzentration des goldkonjugierten monoklonalen Anti-BoNT/D (Maus) 0,35 µg/mL. Es schließt sich eine Inkubation im Wasserbad bei 37 °C für 3 Stunden an und das getestete Probenvolumen beträgt 50 µL.

Pro Toxinkonzentration wird eine Dreifachbestimmung des jeweiligen Probenextraktes durchgeführt. Aufgrund der stark dunklen Färbung der Kotextrakte weisen die Membranen der Lateral-Flow-Tests ebenfalls eine starke Verfärbung auf, welche mittels eines zusätzlichen Waschschrattes beseitigt werden kann. Zur Durchführung dieses Waschschrattes wird jeweils das Release-Pad abgeschnitten und der Teststreifen für 10 Minuten in 200 µL eines 28 mM GP-Puffers (pH 6,2) gestellt. Nach dieser Prozedur ist die Hintergrundfärbung der diagnostischen Membran größtenteils beseitigt. Die Ergebnisse der Versuche sind in Abb. 4-23 dargestellt.

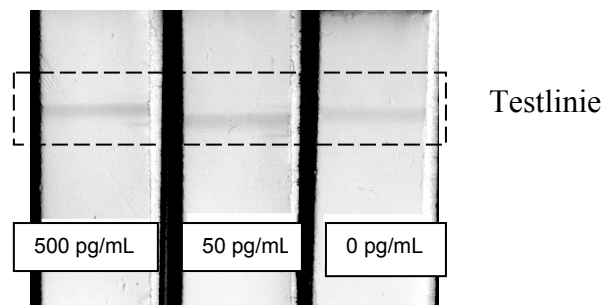


Abb. 4-23: Ergebnisse des Lateral-Flow-Assays 2 bei Verwendung von mit verschiedenen BoNT/D-Konzentrationen dotierten Pferdekotproben.

Die Ergebnisse zeigen wie schon in Kapitel 4.2 beschrieben, dass falsch-positive Signale auftreten. Dennoch kann die Testlinienintensität der Blindprobe visuell als weniger intensiv erkannt werden als die Testlinienintensitäten der BoNT/D-Konzentrationen 500 pg/mL und 50 pg/mL. Eine Unterscheidung der Linienintensitäten der BoNT/D-Konzentrationen 500 pg/mL und 50 pg/mL ist visuell nicht möglich. Zur Quantifizierung werden die Proben entsprechend Kapitel 7.3.3 optisch ausgewertet. In Abb. 4-24 sind die Ergebnisse der Dreifachbestimmung mit den arithmetisch gemittelten Werten und deren mittleren relativen Fehler dargestellt.

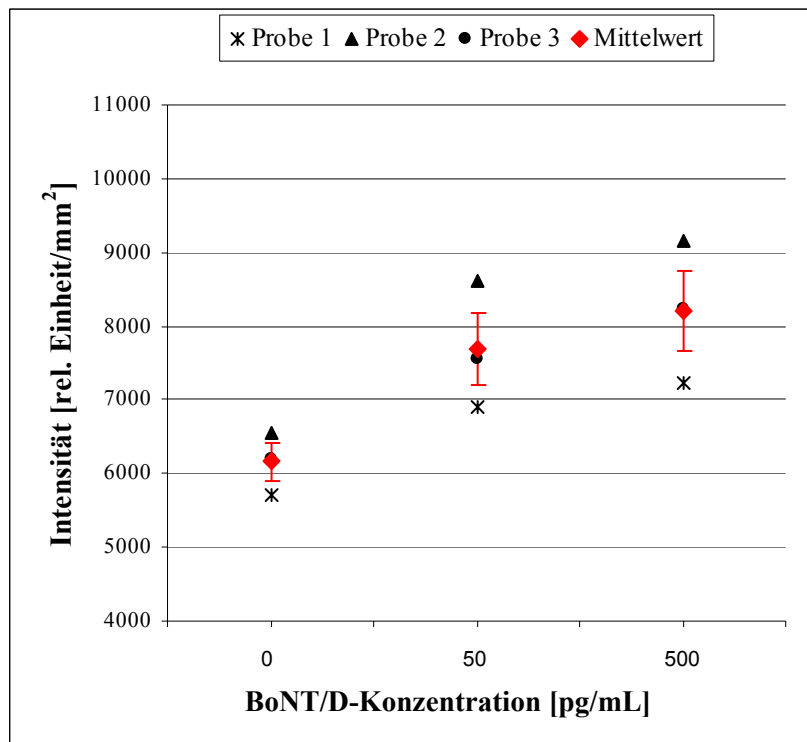


Abb. 4-24: Ergebnisse einer Dreifachbestimmung von mit verschiedenen BoNT/D-Konzentrationen dotierten Pferdekotproben mit Lateral-Flow-Assay 2.

Deutlich wird, dass die Ergebnisse den visuellen Eindruck gut bestätigen. Sowohl die Einzelergebnisse als auch der Fehlerbereich des arithmetischen Mittelwertes lassen eine Diskriminierung der Blindprobe von einer BoNT/D-Konzentration von 500 bzw. 50 pg/mL zu. Schwieriger ist die Unterscheidung zwischen einer Konzentration von 50 pg/mL und 500 pg/mL. Die Fehlerbereiche dieser beiden Konzentrationen überschneiden sich so stark, dass eine Unterscheidung nicht möglich ist. Auffällig ist, dass die Signalintensitäten der Blindproben mit ca. 6000 [rel. Einheit/mm²] im Vergleich zu den Untersuchungen in Kapitel 4.2 sehr hoch liegen. Eine Begründung hierfür könnte in dem tatsächlich getesteten Probenvolumen liegen. Werden 50 μ L Probenflüssigkeit auf den Teststreifen aufgetragen, so fließt nur ein bestimmter Volumenteil durch die Testzone. Der restliche Anteil des Probenvolumens wird nach der Testdurchführung im Release-Pad oder unterhalb der Testlinie in der Membranmatrix verbleiben. Dieser Teil des Probenvolumens trägt somit nicht zum Nachweis bei. Bei den in diesem Kapitel betrachteten Versuchen beträgt das getestete Probenvolumen auch 50 μ L, jedoch fließen durch die Einführung eines Waschschruttes die gesamten 50 μ L durch die Testzone. In Kapitel 4.2 wurde bereits der negative Einfluss zu hoher Probenvolumina festgestellt (Abb. 4-19). Unter Berücksichtigung des Waschschruttes ist es nicht verwunderlich, dass die in Abb. 4-24 dargestellten Ergebnisse eher den Ergebnissen mit einem Probenvolumen von 125 μ L ähneln, obwohl das getestete Probenvolumen 50 μ L beträgt. In

Abb. 4-10 führt ein Probenvolumen von 125 μL nicht nur zu einer höheren Testintensität der Blindprobe, sondern zusätzlich zu einem Kurvenverlauf mit einem engen dynamischen Bereich. Somit ist zwar eine Diskriminierung der Blindprobe von einer toxischen Probe in einem Konzentrationsbereich von 50 pg/mL -50 ng/mL möglich, aber eine nähere Konzentrationsbestimmung entfällt.

Lateral-Flow-Assay 3

Die Untersuchungen des Lateral-Flow-Assays 3 in Kapitel 4.3 ergeben, dass zwei pH-Werte (6,2 und 8,2) einen BoNT-Nachweis mit einer Sensitivität von 50 pg/mL ermöglichen. Die folgenden Versuche werden bei beiden optimalen pH-Werten entsprechend Tab. 4-27 durchgeführt.

Tab. 4-27: Verwendete Reaktionsbedingungen des Lateral-Flow-Assays 3 bei der Untersuchung des Einflusses von Realproben.

Testdurchführung	pH 6,2	pH 8,2
Herstellung des Probenextrakts	5 g der jeweiligen dotierten Probe werden mit 5 mL eines 28 mM GP-Puffers (pH 6,2) versetzt und durchgeschüttelt.	5 g der jeweiligen Probe werden mit 5 mL eines 40 mM Borat-Puffers (pH 8,2) versetzt und durchgeschüttelt.
Lagerung im Kühlschrank über Nacht bei 5-8°C. Der Überstand wird abpipettiert und 5 Minuten bei 5000 RPM zentrifugiert. Der Überstand wird isoliert und weiterverwendet.		
Probenvorbereitung	Die Konzentration des goldkonjugierten monoklonalen Anti-BoNT/D (Maus) beträgt 0,35 $\mu\text{g/mL}$; die Konzentration des biotinylierten polyklonalen Anti-BoNT/D (Ziege) beträgt 0,30 $\mu\text{g/mL}$.	
Inkubation	im Wasserbad bei 37°C für 12 Stunden	
Teststreifenherstellung	entsprechend Kapitel 7.4.4	
Probenvolumen	100 μL	

Die gebrauchsfertigen Lateral-Flow-Tests werden erst kurz vor Gebrauch ihrer Verpackung entnommen. Die Ergebnisse sind in Abb. 4-25 dargestellt.

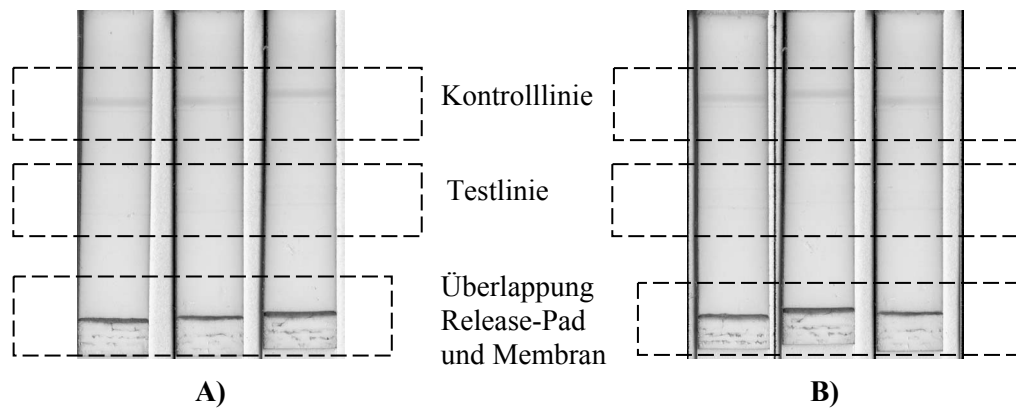


Abb. 4-25: Ergebnisse des Lateral-Flow-Assays 3 bei Analyse dotierter Pferdekotproben. Der pH-Wert des Probenvorbereitungspuffers beträgt A) 6,2 bzw. B) 8,2.

Es ist anhand der abgebildeten Lateral-Flow-Teststreifen deutlich erkennbar, dass innerhalb der Überlappungszone des Release-Pads mit der diagnostischen Membran der goldkonjugierte Antikörper aufkonzentriert ist. Es sieht so aus, als ob der goldkonjugierte Antikörper innerhalb dieser Zone auf der Membran ausfällt. Auch mit Hilfe der Durchführung diverser Waschschriffe bei verschiedensten pH-Werten, ist eine Mobilität des Goldkonjugates nicht zu erreichen. Die auf den Bildern sichtbaren Kontrolllinien erscheinen erst nach ca. 20 Minuten. Die sehr schwachen Linienintensitäten der Kontrolllinien deuten darauf hin, dass nur ein geringer Bruchteil des goldkonjugierten Antikörpers die Kontrollzone passiert. Ein BoNT/D-Nachweis ist bei keiner der betrachteten Konzentrationen möglich. Über die Gründe dieses Phänomens können an dieser Stelle nur Vermutungen angestellt werden. Ein Grund könnte sein, dass eine in der Realprobe enthaltene Verbindung durch eine Komplexbildung die Mobilität des goldkonjugierten Antikörpers herabsetzt.

Zusammenfassung

Lateral-Flow-Assay 2

- Nach Einführung eines zusätzlichen Waschschriffes lassen sowohl die Einzelergebnisse als auch der Fehlerbereich des arithmetischen Mittelwertes eine reproduzierbare Diskriminierung der Blindprobe von einer BoNT/D-Konzentration von 500 bzw. 50 pg/mL zu. Der Test hat somit eine Sensitivität von 50 pg/mL.
- Schwieriger ist die Unterscheidung zwischen einer Konzentration von 50 pg/mL und 500 pg/mL. Eine Begründung könnte in dem tatsächlich getesteten Probenvolumen liegen.

Lateral-Flow-Assay 3

- Mittels dieses Assays ist kein BoNT/D-Nachweis bei Verwendung von Pferdekotproben möglich, da der goldkonjugierte Antikörper bei der Testdurchführung in der Membranmatrix nicht mobil genug ist.

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die von den Bakterien der Gattung *Clostridium* (*C.*) gebildeten Toxine gehören zu den giftigsten natürlichen Substanzen und stellen in Anbetracht ihres Wirkungsgrades hohe Anforderungen an die Sensitivität der Nachweismethoden. Erfüllt werden diese Anforderungen durch einen einzigen anerkannten und validierten Standardnachweis, dem Toxinnachweis in der Maus. Dieser validierte Tierversuch ist in der Bundesrepublik Deutschland als Nachweismethode von Botulinum-Neurotoxinen in Lebensmitteln gesetzlich vorgeschrieben [§ 35 LMBG]. Auch zur Qualifizierung von BoNT-Antitoxin und –Impfstoff für Tiere ist er bindend [DIN-Norm 10102; Deutsches Arzneibuch, 1991]. Der Toxinnachweis in der Maus verursacht jedoch einen hohen Leidensdruck der Tiere und ist für einen klinischen Einsatz nur bedingt geeignet, so dauert der Test beispielsweise 12-72 h.

Das Ziel dieser Arbeit ist es daher anhand des Botulinum-Neurotoxin Typs D das Lateral-Flow-Testformat als alternative *In-vitro*-Methode näher zu untersuchen. Die letale interperitoriale Dosis (Maus) dieses BoNT Typs liegt bei 50 pg/mL [Smith und Sugiyama, 1988]. Ausgehend von den spezifischen Anforderungen des Analyten BoNT/D zum einen und eines Lateral-Flow-Assays zum anderen wird in der vorliegenden Arbeit ein erstes Anforderungsprofil erarbeitet, um notwendige Testeigenschaften näher zu definieren. Mittels dieses Anforderungsprofils können Entwicklungsziele und Testeigenschaften identifiziert werden, deren Erfüllung weitergehende Lateral-Flow-Testentwicklungen sinnvoll erscheinen lassen.

Diese grundlegenden Eigenschaften umfassen beispielsweise den Aufbau eines immunologischen Sandwichassays der eine Sensitivität von 50-500 pg/mL besitzt. Des Weiteren soll der Test eine einfachere und schnellere Testdurchführung als der Toxinnachweis in der Maus bieten und grundlegende Anforderungen an die Reproduzierbarkeit und Stabilität erfüllen. Da Lateral-Flow-Testformate per se keine Quantifizierungsmöglichkeit der Testergebnisse bieten, wird die Verwendung eines optischen Auswertungsverfahrens dargestellt, dessen Auswertungsbedingungen standardisiert sind.

Im Rahmen eines ersten Ansatzes wird ein "klassischer LFD" ohne eine spezielle Probenvorbereitung untersucht, der jedoch keinen BoNT/D-Nachweis ermöglicht. Es bot sich in einem weiteren Ansatz an, die vom Institut für Tropentierhygiene zur Verfügung gestellten Antikörper und den Einfluss einer optimierten Probenvorbereitung innerhalb von Flow-Through-Testformaten näher zu untersuchen. In Anlehnung an den beschriebenen und bereits am Institut für Tropentierhygiene etablierten „Immunochromatographischen Säulentest“ werden drei verschiedene Flow-Through-Testformate mit einer separaten Probenvorbereitung

entwickelt, mittels derer das BoNT/D semiquantitativ nachgewiesen werden kann. Ein Assay der eine enzymatische Färbungsreaktion zur Detektierung verwendet, kann die Sensitivität des Toxinnachweises in der Maus von 50 pg/mL bei einer Testzeit von 13 Stunden erreichen. Eine Quantifizierung der Ergebnisse mittels einer optischen Auswertung ist aufgrund der schlechten Testreproduzierbarkeit nicht möglich. Zwei weitere Flow-Through-Assays, die einen goldkonjugierten Antikörper verwenden, erreichen jeweils eine geringere Sensitivität von 50 ng/mL.

Aufbauend auf den in Flow-Through-Tests gewonnenen Erkenntnissen über die Signifikanz einer angepassten Probenvorbereitung werden die Ergebnisse eines Lateral-Flow-Assay im Sandwichformat mit separater Probenvorbereitungszeit beschrieben. Der Testablauf dieses Lateral-Flow-Testformates beinhaltet eine effektive Probenvorbereitung, die sicherstellt, dass die Bildung eines „mobilen Sandwichkomplexes“ vollständig erfolgt. Der „mobile Sandwichkomplex“ wird in einem zweiten Schritt während der Lateral-Flow-Testdurchführung innerhalb einer Testlinie immobilisiert. Ausgehend von den verfügbaren Antikörpern ergeben sich für dieses Testformat vier verschiedene Kombinationsmöglichkeiten. Die Optimierungsversuche jeder Kombinationsmöglichkeit umfasst beispielsweise die Untersuchung der Probenvorbereitungszeit, der Reproduzierbarkeit und der Quantifizierbarkeit der Testergebnisse. Bei der Verwendung von drei Kombinationsmöglichkeiten in Lateral-Flow-Assays ist ein BoNT/D-Nachweis unter Verwendung der standardisierten Arbeitsvorschriften mit einer Sensitivität von 50 pg/mL möglich. Eine Kombinationsmöglichkeit führt bei Verwendung der betrachteten Reaktionsbedingungen zu keiner Detektionsmöglichkeit.

Ein Vergleich der drei zum BoNT/D verwendbaren Lateral-Flow-Assays mit dem Anforderungsprofil ist in Tab. 5-1 dargestellt. Die Übersicht verdeutlicht, dass der Lateral-Flow-Assay 2 fast alle Punkte des in dieser Arbeit festgelegten Anforderungsprofils erfüllt. Auch bei der Verwendung von dotierten Realproben wird eine Sensitivität von 50 pg/mL erreicht. Auffällig ist bei den Entwicklungsergebnissen, dass bei allen untersuchten Reaktionsbedingungen falsch-positive Signale auftreten. Diese sind vermutlich auf unspezifische Reaktionen zwischen dem goldkonjugierten Antikörper und dem innerhalb der Testlinie immobilisierten Antikörper zurückzuführen. Auch kann ein Zusammenhang zwischen der Stoffmenge des durch die Testzone fließenden goldkonjugierten Antikörpers und der Signalintensität des Signals der Blindprobe festgestellt werden. Mittels der etablierten optischen Auswertung ist eine Diskriminierung einer Blindprobe von einer 50 pg/mL Toxin enthaltenen Probe möglich, sofern eine Dreifachbestimmung erfolgt.

Tab. 5-1: Eigenschaften der entwickelten Lateral-Flow-Assays 1, 2 und 3 und Vergleich mit dem Anforderungsprofil

Anforderungsprofil	Assay 1	Assay 2	Assay 3
Lateral-Flow-Testformat im Sandwichformat	✓	✓	✓
Sensitivität von 50 - 500 pg/mL	Mit Silberfixierung 50 pg/mL	50 pg/mL	50 pg/mL
Ggf. Verwendung von Methoden zur Signalverstärkung	Silberfixierung	Nicht notwendig	Nicht notwendig
Möglichkeit einer Sensitivitätserhöhung durch einen Silberfixierungsschritt	Ja (Faktor 100)	Nein	Nein
„Vereinfachte“ Testhandhabung mit verkürzten Testzeiten	✓	✓	✓
Testzeit	4 h 50 Min. Inkl. Silberfixierung	3 h 30 Min.	13 h 30 Min.
Stabilität des Testergebnisses für 30 Minuten	Nicht nach der Silberfixierung	✓	✓
Ergebnisse des Stabilitätstest (3 Monate bei RT)	Aus Materialmangel nicht möglich	✓	Aufgrund des Ergebnisses der Realproben nicht getestet
Keine falsch-positiven Ergebnisse	✓ (Nach Silberfixierung treten falsch-positive Ergebnisse auf)	Nicht erfüllt (Mittels optischer Auswertung sind die Blindproben von toxinhaltigen Proben unterscheidbar)	Nicht erfüllt (Mittels optischer Auswertung sind die Blindproben von toxinhaltigen Proben unterscheidbar)
Sensitivität bei Realproben	Aus Materialmangel nicht möglich	50 pg/mL	Kein Nachweis möglich

Die Ergebnisse des Lateral-Flow-Assay 3 zeigen ebenfalls eine gute Übereinstimmung mit dem Anforderungsprofil, obwohl die Testzeit von 13,5 Stunden vergleichsweise lang ist. Zusätzlich führt die Verwendung eines biotinylierten Antikörpers zu Interaktionen mit der getesteten Realprobenmatrix, wodurch zumindest der goldkonjugierte Antikörper in der Membranmatrix nicht mobil genug zu sein scheint. Daher scheint sich eine Biotin-Streptavidin-Kopplung zur Immobilisierung des mobilen Sandwichkomplexes nicht

anzubieten. Zukünftig sollte überprüft werden, ob dieses Phänomen bei anderen Realproben ebenfalls auftritt, um gegebenenfalls eine passende Matrix für diesen Assay zu finden. Wie schon bei dem Lateral-Flow-Assay 2 beobachtet, traten auch bei diesem Assay falsch-positive Signale auf, die auf unspezifische Reaktionen zwischen dem goldkonjugierten Antikörpern und dem innerhalb der Testlinie immobilisierten Antikörpern zurückgeführt werden können. Auch kann ein Zusammenhang zwischen der Konzentration des goldkonjugierten Antikörpers in dem Probenpuffer und der Signalintensität des Signals der Blindprobe festgestellt werden. Daher kann durch die Verwendung von vergleichsweise niedrigeren Goldkonjugatkonzentrationen dieses falsch-positive Signal beseitigen werden. Die Herabsetzung der Konzentration des goldkonjugierten Antikörpers führt jedoch ebenfalls zu einer Herabsetzung der Testsensitivität von 50 pg/mL auf 500 pg/mL. Somit besteht an dieser Stelle noch Optimierungsbedarf, wenn eine passende Probenmatrix gefunden werden sollte.

Bedauerlich für den Lateral-Flow-Assay 1 ist, dass die Produktion der einzigen funktionierenden Membran inzwischen eingestellt wurde, da in der vorliegenden Arbeit nur diese diagnostische Membran erfolgreich eingesetzt werden kann. Die Entwicklung und Verbesserung der bestehenden diagnostischen Membranen wird von den Herstellern kontinuierlich vorangetrieben, so dass immer engere Spezifikationen der Materialien und neue Membrantypen zugänglich werden. Daher würde sich eine Untersuchung anderer diagnostischer Membranen zu einem späteren Zeitpunkt anbieten. Interessant an diesem Assay ist, dass er in einem weiteren separaten Schritt eine chemische Signalverstärkung verwendet, mit der die Testsensitivität um den Faktor 100 erhöht werden kann. Die Einführung der Silberverstärkung hat jedoch die Generierung eines falsch-positiven Signals der Blindproben zur Folge. Das Auftreten dieser falsch-positiven Signale kann auf den Mechanismus der Silberfixierung zurückgeführt werden.

Werden die Ergebnisse der drei verwendbaren Lateral-Flow-Assays mit dem kommerziell erhältlichen BADDTM Test von der Osborn Scientific Group verglichen, so lassen sich folgende Vor- und Nachteile feststellen. Die Vorteile des BADDTM Test liegen in seiner Testzeit von 15 Minuten und es treten innerhalb der angegebenen Testzeit keine falsch-positiven Signale auf. Die Einschränkungen sind, dass die Sensitivität von 5 µg/mL sehr gering ist und nicht den Sensitivitätsanforderungen des Analyten entspricht. Zusätzlich weist die vom Hersteller angegebene Testzeit auf instabile Testbedingungen hin, da nach 15 Minuten anscheinend falsch-positive Signale auftreten können bzw. aufgetreten sind.

Werden die Ergebnisse zusammengefasst so wird deutlich, dass die hier entwickelten Lateral-Flow-Assays eine mögliche Alternative zum Toxinnachweis in der Maus zum

Nachweis von BoNT darstellen. Natürlich lässt sich mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen der Toxinnachweis in der Maus nicht ersetzen, zumal nur eine Realprobenmatrix erfolgreich getestet wird. Diese sehr umfangreiche Aufgabe kann aber auch nicht als das Ziel dieser Arbeit verstanden werden, zumal in dem zeitlichen Rahmen nur eine begrenzte Anzahl von Proben untersucht werden kann. Dennoch, die Erfüllung des erarbeiteten Anforderungsprofils bietet eine solide Grundlage für weiterführende Untersuchungen mit diesem Testformat. Um den Toxinnachweis in der Maus durch eine *In-vitro*-Methode ablösen zu können, ist es zunächst notwendig, weitere Realproben zu untersuchen. Danach könnte die vorgeschlagene Methodik in mehreren, unabhängigen Laboratorien überprüft werden, wofür sich ein weiterführendes Projekt anbietet.

6 LITERATUR

Abbott Diagnostics

Answers to Frequently Asked Questions about hCG-Testing
Educational Services

Abbott Park, IL in (Braunstein GD., HCG-Testing: Volume II.) Monograph (1991), 97-9325.

Alfthan, H.; Stenman, U.

Pathophysiological importance of various molecular forms of hCG
Mol Cell Endocrinol (1996), **125** (1-2), 107-120.

Arista Biologicals 2002

Theory and practice of rapid diagnostic tests
Workshop
Göttingen (2002)

Arnon, S.; Schechter, R.; Inglesby, T. V.; Henderson, D. A.; Bartlett, J. G.; Ascher, M. S.; Eitzen, E.; Fine, A. D.; Hauer, J.; Layton, M.; Lillibridge, S.; Osterholm, M. T.; O'Toole, T.; Parker, G.; Perl, T. M.; Russel, P. K.; Swerdlow, D. L.; Tonat, K.

Botulinum Toxin as a Biological Weapon
Medical and Public Health Management
JAMA (2001), **285**, (8), 1059-1070.

Ashton, A. C.; Crowther, J. S.; Dolly, J. O.

A sensitive and useful radioimmunoassay for neurotoxin and its haemagglutinin complex from *Clostridium botulinum*
Toxicon (1985), **23**, 235-246.

Bedford, M. A.

Short Guide for Developing Immunochromatographic Test Strips
Millipore Corp. (1998)

Beer, H. H.; Jallerat, E.; Pflanz, K.; Klewitz, T. M.

Qualification of cellulose nitrate membranes for lateral-flow assays

IVD Technology Magazine (2002)

<http://www.devicelink.com/ivdt/archive/02/01/002.html>

Birken, S.; Maydelman, Y.; Gawinowicz, M.; Pound, A., Liu, Y.; Hartree, A.

Isolation and characterization of human pituitary chorionic gonadotropin

Endocrinology (1996), **137**, 1402-1411.

Birnbaum, S.; Uden, C.; Magusson, C. G. M.; Nilsson, S.

Latex-based thin layer immunoaffinity chromatography for quantitation of protein analytes

Anal. Biochem. (1992), **206**, 168-171.

Black, J. D.; Dolly, J. O.

Interaction of 125 I β -labeled botulinum neurotoxins with nerve terminals. II. Autoradiographic evidence for its uptake into motor nerves by acceptor-mediated endocytosis

J. Cell Biol. (1986), **103**, 535-544.

Blasi, J.; Chapman, E. R.; Link, E.; Bintz, T.; Yamasaki, S.; De Camilli, P.; Südhof, T. C.; Niemann, H.; Jahn, R.

Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25

Nature (1993), **365**, 160-163.

Brin, M. F.; Binder, W.; Blitzer, A.; Schenrock, L.; Pogoda, J. M.

Botulinum Toxin Type A Botox for Pain and Headache

Scientific and Therapeutic Aspects of Botulinum Toxin

Edited by Brin, M.F.; Jankovic, J.; Hallet, M.

Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2002), 233-250.

Broda, D. M.; Boerema, J. A.; Bell, R. G.

A PCR survey of psychrotrophic Clostridium botulinum-like isolates for the presence of BoNT genes.

Lett. Appl. Microbiol. (1998) **27**, 219-223.

Bundesanzeiger

JG 47, Nr 159a, v. 24.08.1995

5. Auflage, (1995)

Butler, J. E.

Immunochemistry of Solid-Phase Immunoassay

CRC Press Inc (2000)

Cato, E. P.; George, W. L.; Finegold, S. M.

Genus Clostridium

In: Sneath, P.H.A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., and Holt, J. G. (eds.) *Bergey's Manual for Systematic Bacteriology*, Vol.2.

Williams and Wilkins, Baltimore, MD, USA (1986), 1141-1200.

Centers for Disease Control

Clostridium botulinum monovalent and polyvalent antitoxins

U. S. Department of Health, Education, and Welfare, CDC, Atlanta, Georgia, USA (1987)

Centers for Disease Control and Prevention

Botulism in the United States (1899-1996)

Handbook for Epidemiologists, Clinicians, and Laboratory Workers

U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, Georgia, USA (1998)

Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

Biological Diseases/Agents Listing [on-line]

Atlanta (15.01.2003)

<<http://www.bt.cdc.gov/Agent/Agentlist.asp>> [cited 04.02.03].

Chandler, J. A.

Assay device and method

British Biocell International Ltd., European patent application 96/901447.1. (1996)

Chandler, J.; Robinson, N.; Whiting, K.

Handling false signals in gold-based rapid tests

IVD Technology Magazine March (2001)

<http://www.devicelink.com/ivdt/archive/01/03/010.html>

Cole, L.

Immunoassay of hCG, its Free Subunits and Metabolites

Clin. Chem. (1997) 43, 2233-2243.

Cole, L.; Kohorn, E., Kim, G.

Detecting and monitoring trophoblast disease: New perspectives in measuring hCG levels

J. Reprod. Med. (1994), 39,193-200.

Corstjens, P.; Zuiderwijk, M.; Brink, A.; Li, S.; Feindt, H.; Niedbala, R. S.; Tanke, H.

Use of Up-Converting Phosphor Reporters in Lateral-Flow-Assays to Detect Specific Nucleic Acid Sequences: A Rapid, Sensitive DNA Test to Identify Human Papillomavirus Type 16 Infection

Clin. Chem. (2001), 47, (10) 1885-1893.

Corstjens, P.; Zuiderwijk, M.; Nilsson, M.; Feindt, H.; Niedbala, R.S.; Tanke, H. J.

Lateral-flow and up-converting phosphor reporters to detect single-stranded nucleic acids in a sandwich-hybridization assay

Anal. Biochem. (2003), 312, 191-200.

DasGupta, B. R.; Sugiyama, H.

A common subunit structure in Clostridium botulinum type A, B, and E toxins

Biochem. Biophys. Res. Commun. (1972), 48, 108-112.

Deshpande, S. S.

Enzyme Immunoassays: From Concept To Product Development

Chapman and Hall, International Thomson Publishing (1996)

Dezfulian, M.; Bartlett, J. G.

Detection of Clostridium botulinum type A toxin by enzyme-linked immunosorbent assay with antibodies produced in immunologically tolerant animals

J. Clin. Microbiol. (1984), 19, 645-648.

Doellgast, G. J.; Triscott, M. X.; Beard, G. A.; Bottoms, J. D.; Cheng, T.; Roh, B. H.; Roman, M. G.; Hall, P. A.; Brown, J. E.

Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Clostridium botulinum neurotoxins A, B, and E using signal amplification via enzyme-linked coagulation assay

J. Clin. Microbiol. (1993), **31**, 2402-2409.

Dowell, V. R., J. R.; Hawkins, T. M.

Laboratory methods in anaerobe bacteriologie

Center for Disease Control, Atlanta, USA (1974)

Duff, J. T.; Wright, G. G.; Yarinsky, A.

Activation of Clostridium botulinum type E toxin by trypsin

J. Bacteriol. (1956), **72**, 455-460.

Ekong, T.

Immunological detection of botulinum neurotoxins

Anaerobe (2000), **6**, 125-127.

Ekong, T. A. N.; Feavers, I. M.; Sesardic, D.

Recombinant SNAP-25 is an effective substrate for Clostridium botulinum type A toxin endopeptidase activity in vitro

Microbiol. (1997), **143**, 3337-3347.

Ekong, T. A. N.; McLellan, K.; Sesardic, D.

Immunological detection of Clostridium botulinum toxin type A in therapeutic preparations

J. Immunol. Methods (1995), **180**, 181-191.

Ekong, T.; Austin, J. W.; Smith, J. P.; Dufresne, I.; Brett, M.

Evaluation of the use of endopeptidase assay for the detection of BoNT E in trout fillets inoculated with Clostridium botulinum type E

Proceedings of the 1999 Meeting of Interagency Botulism Research Coordinating Committee, Orlando, FL, USA (1999), 36.

Elliott, M.; Kardana, A.; Lustbader, J.; Cole, L.

Carbohydrate and peptide structure of the alpha- and beta-subunits of hCG from normal and aberrant pregnancy and choriocarcinoma

Endocrine (1997), **7**, 15-32.

Ferreira, J. L.; Eliasberg, S. J.; Harrison, M. A.; Edmonds, P.

Detection of preformed type A botulinum toxin in harsh brown potatoes by using the mouse bioassay and a modified ELISA test

J. AOAC Int. (2001), **84**, 1460-1464.

Ferreira, J. L.; Hamdy, M. K.; Zapatka, F. A.; Hebert, W. O.

Immunodiffusion method for detection of type A Clostridium botulinum

Appl. Environ. Microbiol. (1981), **42**, 1057-1061.

Ferreira, J. L.; Maslanka, S.; Johnson, E. A.; Goodnough, M.

Detection of botulinum neurotoxins A, B, E, and F by amplified enzyme-linked immunosorbent assay: collaborative study

J. AOAC Int. (2003), **86**, 314-331.

Förger

die Welt.de,

online im Internet: www.welt.de/daten/2000/05/09/0509ws166791.htx [05.03.2002]

Neue Züricher Zeitung online

online im Internet: <http://www.nzz.ch/dossiers/2001/b-waffen/2002.01.05-al-article7SC7Z.html> [05.03.2002]

Fujinaga, Y.; Inoue, K.; Nomura, T.; Sasaki, J.; Marvaud, J.; Popoff, M. R.; Kozaki, S.; Oguma, K.

Identification and characterization of functional subunits of Clostridium botulinum type A progenitor toxin involved in binding to intestinal microvilli and erythrocytes

FEBS Lett. (2000), **467**, 179-183.

Fujinaga, Y.; Inoue, K.; Watanabe, S.; Yokota, K.; Hirai, Y.; Nagamachi, E.; Oguma, K.

The haemagglutinin of Clostridium botulinum type C progenitor toxin plays an essential role in binding of toxin to the epithelial cells of guinea pig small intestine, leading to the efficient

absorption of the toxin

Microbiol. (1997), **143**, 3841-3847.

Gimenez, D. F; Ciccarelli, A. S.*Another type of Clostridium botulinum*

Zentralbl. Bakt. I, Abt. Orig. A (1970), 215, 215.

Greenfield, R. A.; Brown, B. R.; Hutchins, J. B.; Jandolo, J. J.; Jackson, R.; Slater, L. N.; Bronze, M. S.*Microbiological, Biological, and Chemical Weapons of Warfare and Terrorism*

Am. J. Med. Sci. (2002), **323** (6), 326-340.

Gruesser, O.J.*Die ersten systematischen Beschreibungen und tierexperimentellen Untersuchungen des Botulismus*

Sudhoffs Archiv (1986), **70**, (2), 167-187.

Hallis, B.; James, B. A. F.; Shone, C. C.*Development of Novel Assays for Botulinum Type A and B Neurotoxins Based on Their Endopeptidase Activities*

J. Clin. Microbiol. (1996), **34**, (8), 1934-1938.

Hatheway, C. L.*Clostridium botulinum and other clostridia that produce botulinum neurotoxin*

In: Hauschild, A. H. W and Dodds K.L. (eds.) *Clostridium botulinum*. Ecology and Control in Foods.

Marcel Dekker, New York, USA (1993), 3-20.

Haye, S.*Use of ganglioside affinity filters to identify toxigenic strains of Clostridium botulinum Types C and D*

Infect. Immu. (1979), **26**, 150-156.

Holdeman, L. V.; Cato E. P.; Moore E. C.

Anerobe laboratory manual – forth edition

Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, USA (1977)

Horton, J. K.; Swinburne, S.; O’Sullivan, M. J.

A novel rapid, single-step immunochromatographic procedure for the detection of mouse immunoglobulin.

J. Immunol. Methods (1991), **140**, 131-134.

Inoue, K.; Fujinaga, Y.; Honke, K.; Arimitsu, H.; Mahmut, N.; Sakaguchi, Y.; Ohyama, T.; Watanabe, T.; Inoue, K.; Oguma, K.

Clostridium botulinum type A haemagglutinin-positive progenitor toxin (HA⁺-PTX) binds to oligosaccharides containing Gal β 1-4GlcNAc through one subcomponent of haemagglutinin (HAI)

Microbiol. (2001), **147**, 811-819.

Ishikawa, E.

Ultrasensitive and Rapid Enzyme Immunoassay

Laboratory Techniques in Biochemistry and Molekular Biology, Amsterdam, The Netherlands,

Elsevier (1993)

Jankovic, J.; Brin, M. F.

Botulinum Toxins: historical perspective and potential new indications

Muscle Nerve Suppl. (1997), **6**, 129-145.

Jefferis, R.; Deverill, I.

The antigen antibody reaction

Principles and Practice of Immunoassay

Price, C. P., Newman, D. J., Macmillan Publishers, Basingstoke (UK) (1991)

Johnson, H. M.; Brenner, K.; Angelotti, R.; Hall, H. E.

Serological studies of types A, B and E botulinum toxins by passive haemagglutination and bentonite fluctuation

J. Bacteriol. (1996), **91**, 964-974.

Johnson, J. L.; Francis, B.

The taxonomy of clostridia. Ribosomal homologies among the species.

J. Gen. Microbiol. (1975), **88**, 229-244.

Jones, K. D.

Troubleshooting protein binding in nitrocellulose membranes

Part 1: Principles

IVD Technology Magazine March (1999)a, **5**, (2), 32-41.

<http://www.devicelink.com/ivdt/archive/99/03/009.html>.

Jones, K. D.

Troubleshooting protein binding in nitrocellulose membranes: Part 2: Common Problems

IVD Technology Magazine May (1999)b, **5** (3), 26-35.

<http://www.devicelink.com/ivdt/archive/99/05/002.html>

Kautter, D. A ; Solomon, H. M.

Collaborative study of a method for the detection of Clostridium botulinum and its toxins on foods

J. AOAC (1977), **60**, 541-545.

Kitamura, M.; Sakaguchi, S.; Sakaguchi, G.

Purification and some properties of Clostridium botulinum type E toxin

(1968)

Klewitz, T.

Proteinbindung an Diagnostikmembranen

Diplomarbeit, Universität Hannover (2000)

LaBorde, Ronald T. ; O'Farrell, Brendan

Paramagnetic-particle detection in lateral-flow assays

Paramagnetic labeling offers an alternative method for analyte detection.

IVD Technology April (2002)

<http://www.devicelink.com/ivdt/archive/02/04/001.html>

Lamanna, C.

The most poisonous poison. What do we know about the toxin of botulism? What are the problems to be solved?

Science (1959), **130**, 763-772.

Lee, W. H.; Riemann, H.

The genetic relatedness of proteolytic Clostridium botulinum strains

J. Gen. Microbiol. (1970)b, **64**, 85-90.

Lenk, R.

Brockhaus Physik Band 1

VEB F.A. Brockhaus Verlag Leipzig (1989), 282.

Lönnberg, M.; Carlsson J.

Quantitative Detection in the Attomole Range for Immunochromatographic Tests by Means of a Flatbed Scanner

Analalytical Biochemistry (2001), **293**, 224–231.

Mitamura, H.; Kameyama, K.; Ando, Y.

Experimental toxicoinfection in infant mice challenged with spores of Clostridium botulinum type E

Jpn. J. Med. Sci. Biol. (1982), **35**, 239-242.

Miyai, K.

Classifikation of immunoassay, Principles and Practice of Immunoassays

Macmillan Publishers Ltd (1991)

Montecucco, C.; Schiavo, G.

Tetanus and botulinum neurotoxins: a new family of metalloproteases
Trends

Biochem. Sci. (1993), **18**, 324-327.

Montecucco, C.; Schiavo, G.

Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins

Mol. Microbiol. (1994), **13**, 1-8.

Moore, A. P.

Botulinum Toxin Type A in the Treatment of Spasticity

Scientific and Therapeutic Aspects of Botulinum Toxin

Edited by Brin, M.F.; Jankovic, J.; Hallet, M.

Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2002), 223-232.

Moore, A.P.

Handbook of botulinum Toxin

Blackwell Science, Oxford(1995)

Müller-Bardorff, M.; Rauscher, T.; Kampmann, M.; Schoolmann, S.; Laufenberg, F.; Mangold, D.; Zerbrack, R.; Remppis, A.; Katus, H. A.

Quantitative bedside assay for cardiac troponin T: A complementary method to centralized laboratory testing.

Clin. Chem. (1999), **45**, (7), 1002-1008.

Nishiki, T.; Tokuyama, Y.; Kamata, Y.; Nemoto, Y.; Yoshida, A.; Sato, K.; Sekiguchi, M.; Takahashi, M.; Kozaki, S.

The high-affinity binding of Clostridium botulinum type B neurotoxin to synaptotagmin II associated with gangliosides

GT1b/GD1a. FEBS Lett. (1996), **378**, 253-257.

Nordic Committee on Food Analysis

Botulinum toxin. Detection in foods, blood and other test materials. Method no. 79, 2nd ed.

Nordic Committee on Food Analysis, Espoo, Finland (1991)a

Nordic Committee on Food Analysis

Clostridium botulinum. Detection in foods and other test materials. Method no. 80, 2nd ed.

Nordic Committee on Food Analysis, Espoo, Finland (1991)b

Notermans, S.; Dufrenne J.; Kozaki, S.

The relation between toxicity and toxin –related-antigen contents of Clostridium botulinum

types C and D cultures as determined by mouse bioassay and ELISA

Jpn J. Med. Sci. Biol. (1982), **35**, 203-211.

Notermans, S.; Dufrenne, J.; van Schothorst, M.

Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Clostridium botulinum toxin type A

Jpn. J. Med. Sci. Biol. (1978), **31**, 81-85.

O'Beirne, A.; Cooper, H.R.

Heterogeneous enzyme Immunoassay

J. Histochem. Cytochem (1979), **27**, 1148-1162

Official Analytical Chemists

Journal of the A.O.A.C. (1977), **60**, 490-492

Oguma, K.; Fujinaga, Y.; Inoue, K.

Structure and function of Clostridium botulinum toxins

Microbiol. Immunol. (1995), **39**, 161-168.

Oguma, K.; Fujinaga, Y.; Inoue, K.

Clostridium botulinum toxin

J. Toxicol. (1997), **16**, 253-266.

PDB Funding

Protein Data Bank

<http://www.rcsb.org/pdb/cgi/explore.cgi?job=graphics;pdbId=3BTA;page=20;pid=27224952538608&opt=show&size=500>

Poli, M. A.; Rivera, V. R.; Neal, D.

Development of sensitive colorimetric capture ELISAs for Clostridium botulinum neurotoxin serotypes E and F

Toxicon (2002), **40**, 797-802.

Potter, M. D.; Meng, J.; Kimsey, P.

An ELISA for detection of botulinum toxin types A, B, and E in inoculated food samples

J. Food Protect. (1993), **56**, 856-861.

Price, C. P.; Newman, D. J.

Principles and Practice of Immunoassay – second edition

Macmillan Reference Ltd., London (1997)

Price, C. P.; Thorpe, G. H. G.; Hall, J.; Bunce, R. A.

Principles and Practice of Immunoassay – second edition

Price, C. P.; Newman, D. J. (Eds.), Macmillan, London (1997), 580–603.

Rodriguez, A.; Dezfulian, M.

Rapid identification of Clostridium botulinum and botulinum toxin in food

Folia Microbiol. (1997), **42**, 149-151.

Roman, M. G.; Humber, J. Y.; Hall, P. A.; Reddy, N. R.; Solomon, H. M.; Triscott, M.

X.; Beard, G. A.; Bottoms, J. D.; Cheng, T.; Doellgast, G. J.

Amplified immunoassay ELISA-ELCA for measuring Clostridium botulinum type E neurotoxin in fish fillets

J. Food Protect. (1994) **57**, 985-990.

Sartorius AG

Pflanz K., Jallerat E., Beer H., Klewitz T.

„Verfahren, Vorrichtung und Membran zur Verstärkung eines Signals“

DE 102 22 979 A1, 2003

Schantz, E. J.; Kautter, D. A.

Microbiological Methods

Standardized Assay for Clostridium botulinum Toxins

Journal of the AOAC (1978), **61**, (1), 96-99.

Schantz, E. J.; Johnson, E. A.

Properties and Use of Botulinum Toxin and Other Microbial Neurotoxins in Medicine

Microbiol. Rev. (1992), **56**, (1), 80-99.

Schiavo, G.; Benfenati, F.; Poulain, B.; Rossetto, O.; de Leureto, P. P.; DasGupta, B.

R.; Montecucco, C.

Tetanus and botulinum-B neurotoxins block transmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin

Nature (1992), **359**, 832-835.

Schiavo, G.; Satucci, A.; DasGupta, B. R., Mehta, P. P.; Jontes, J.; Benfenati, F.; Wilson, C. W.; Montecucco, C.

Botulinum neurotoxins serotypes A and E cleave SNAP-25 at distinct COOH-terminal peptide bonds

FEBS Lett. (1993), **335**, 99-103.

Schiavo, G.; Shone, C. C.; Bennett, M. K.; Scheller, R. H.; Montecucco, C.

Botulinum neurotoxin C cleaves a single Lys-Ala bond within the carboxy terminal region of syntaxins

J. Biol. Chem. (1995), **270**, 10566-10570.

Scott, A. B.

*The Role of Botulinum Toxin Type A in the Management of Strabismus
Scientific and Therapeutic Aspects of Botulinum Toxin*

Edited by Brin, M.F.; Jankovic, J.; Hallet, M.

Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2002), 189-195.

Sesardic, D.; McLellan, K.; Ekong, T. A. N.; Gaines Das, R.

Refinement and validation of an alternative bioassay for potency testing of therapeutic botulinum type A toxin

Pharmacol. Toxicol. (1996), **78**, 283-288.

Shone, C. C.; Wilton-Smith, P.; Appleton, N.; Hambleton, P.; Modi, N.; Gatley, S.; Melling, J.

Monoclonal antibody-based immunoassay for type A Clostridium botulinum toxin is comparable to the mouse bioassay

Appl. Environ. Microbiol. (1985), **50**, 63-67.

Shyu, R.-H.; Shyu, H.-F.; Liu, H.-W.; Tang, S.-S.

Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of ricin
Toxicon (2002), **40**, 255-258.

Smith L. D. S.; Sugiyama, H.

Botulism, The Organism, Its Toxins, the Disease

Cultural and serological characteristics

Charles C. Thomas, Springfield, USA (1988), 23-37.

Solberg, M.; Post, L. S.; Furgang, D.; Graham, C.

Bovine serum eliminates rapid non-specific toxic reactions during bioassay of stored fish for Clostridium botulinum toxin

Appl. Environ. Microbiol. (1985), **49**, 644-649.

Stephenson, J.

RAMP: A quantitative immunoassay platform takes shape

IVD Technology Magazine July (1998)

<http://www.devicelink.com/ivdt/archive/98/07/010.html>

Stückmann, H.

Entwicklung eines immunochemischen Dipsticksensors

Diplomarbeit, Universität Hannover (2002)

Suen, J. C.; Hatheway, C. L.; Steigerwalt, A. G.; Brenner, D. J.

Clostridium argentinense, sp. nov: A genetically homogenous group composed of all strains of Clostridium botulinum type G and some nontoxigenic strains previously identified as Clostridium subterminale or Clostridium hastiforme

Int. J. Syst. Bacteriol. (1988), **38**, 375.

Sugii, S.; Ohishi, I.; Sakaguchi, G.

Correlation between oral toxicity and in vitro stability of Clostridium botulinum type A and B toxins of different molecular sizes

Infect. Immun. (1977), **16**, 910-914.

Sugii, S.; Sakaguchi, G.

Molecular construction of Clostridium botulinum type A toxins

Infect. Immun. (1975), **12**, 1262-1270.

Thomas, R. J.

Detection of Clostridium botulinum types C and D toxin by ELISA

Aust. vet. J. (1991), **68**, 111-113.

Tijssen, P.

Practice and Theorie of Immunoassays

Laboratory Techniques in Biochemistry and Molekular Biology - 8th edition

Amsterdam, The Netherlands, Elsevier (1993)

Tisone, T. C.; Rodriguez, M.; Queeney, P.

Image analysis for rapid-flow diagnostics

IVD Technology Magazine Sep (1999)

<http://www.devicelink.com/ivdt/archive/99/09/010.html>, 08.07.02.

Tucker, J. B.

Toxic Terror: Assessing the Terrorist Use of Chemical and Biological Weapons

Mass, MIT Press, Cambridge (2000)

Van Amerongen, A.; van Loon, D.; Berendsen, L. B. J. M.; Wichers, H. J.

Quantitative computer image Analysis of a humen chorionic gonatotropin colloidal carbon dipstik assay

Clin. Chim. Acta (1994), **229**, 67-75.

Vermilyea, B. L.; Walker, H. W.; Ayres, J. C.

Detection of botulinal toxins by immunodiffusion

Appl. Microbiol. (1968), **16**, 21-24.

Weiss, A.

Concurrent engineering for lateral-flow diagnostics

IVD Technology Magazin Nov/Dec (1999), **5**, (7) 48-57.

<http://www.devicelink.com/ivdt/archive/99/12/009.html>

Whatman

International Diagnostics Support Conference

Whatman International, München (2002)

Wictome, M.; Newton, K. A.; Jameson, K.; Dunnigan, P.; Clarke, S.; Gaze, J.; Tauk, A.; Foster, K. A.; Shone, C. C.

Development of in vitro assays for the detection of botulinum toxins in foods

FEMS Immunol. Med. Microbiol. (1999)a, **24**, 319-323.

Wictome, M.; Newton, K. A.; Jameson, K.; Hallis, B.; Dunnigan, P.; Mackay, E.; Clarke, S.; Taylor, R.; Gaze, J.; Foster, K. A.; Shone, C. C.

Development of an in vitro assay for Clostridium botulinum type B neurotoxin in foods that is more sensitive than the mouse bioassay

Appl. Environ. Microbiol. (1999)b, **65**, 3787-3792.

Wild, D.

The Immunoassay Handbook

The Macmillan Press LTD, England (1994)

Wild, D.; Davies, C.

Components in the immunoassay Handbook

(Wild, D., Eds), Macmillan, England (1994), 49–80.

Wu, J.; Riemann, H.; Lee, W. H.

Thermal stability of the deoxyribonucleic acid hybrids between the proteolytic strains of Clostridium botulinum and Clostridium sporogenes

Can. J. Microbiol. (1972), **18**, 97-99.

Yokosawa, N.; Tsuzuki K.; Syuto, B.; Oguma, K.

Activation of Clostridium botulinum type E purified by two different procedures

J. Gen. Microbiol. (1986), **132**, 1981-1988.

Gesetze:

Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (LMBG)

Vom 15. Aug. 1974

Bundesgesetzbl. T. I. 1974, S. 1945

Nachweis von Clostridium Botulinum und Botulinum-Toxin in Fleisch- und Fleischerzeugnissen.

Anlage zum Untersuchungsverfahren Botulismus

Gemäß § 35 LMBG: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren L 06.00-26-(Anlage I).

Patente

Abe, Y.; Hochito, K.; Ikeno, Y.; Miyamoto, T.; Satake, J.; Shimoshiro, N.;

Takamatsu, A.

Apparatus for the detection of food-poisoning and other pathogenic bacteria - by collection, culture of the bacteria in a colour-reacting medium, and sterilisation before disposal

WO 9820107 A1 19980514, Patent Cooperation Treaty (PCT) patent application, SRL Inc.; SRL KK (1998)

Ames, W.; Carayannopolous, L.; Lewis, M. E.; Parks, J. M.

Diagnostic test strips for chemical Analysis of Sample

WO 2000033074 A1 20000608, Patent Cooperation Treaty (PCT) patent application, Abbott Lab (2000)

Aoki, K. R.; Spanoyannis, A. F.

Immunoassay for antibodies to botulinum toxin – uses electrophoretically separated and blotted toxin proteins

US 5731161 A 19980324, US patent application, Allergan Inc. (1998)

Aoki, K. R.; Spanoyannis, A. F.

Detection of neutralizing antibodies to botulinum toxin US 6136551 A 20001024, US patent application, Allergan Inc. (2001)

Ashihara, Y.; Miyazaki, M.; Sugiyama, M.

Colour developing method for enzyme immunoassays

GB 2326712 A 19981230, Great Britain patent application, FUJIREBIO Inc. (1998)

Barrantes, D. M.; McVicker, J. K.; Rouse, G. C.

Determining if the concentration of immunoglobulin G (IgG) antibodies in a biological fluid of mammal by exposing the sample to dehydrated IgG complexing agent and labeling agent immobilized on a protein binding membrane

US 6245577 B1 20010612, US patent application, Midland Bioproducts Corp. (2001)

Brooks, D. E.; Harris, P. C.; Olal, A. D.; Richards, B. G.; Xie, Z. C.

Immunoassays that compensate for non-specific binding of assay components for accurate detection of myoglobin in blood samples

WO 2001050129 A2 20010712, Patent Cooperation Treaty (PCT) patent application, Response Biomedical Corp. (2001)

Burans, J. P.; Eldefrawi, M. E.; Emanuel, P. A.; Valdes, J. J.

Detection of botulinium toxin

US 5932449 A 19990803, US patent application, US Sec. of army (1999)

Carlsson, J.; Loennberg, M.

Determination of at least two analytes in aqueous sample by providing flow matrix containing separation and detection zones and eluting separated analytes in transverse direction to migrate to the detection zone

WO 2001011363 A1 20010215, Patent Cooperation Treaty (PCT) patent application, Pharmacia Diagnostics AB (2001)a

Carlsson, J.; Loennberg, M.,

Chromatographic assay method for determining components, e.g. biomolecules in complex mixtures, utilizes membrane type flow matrix attached to a liquid-impervious backing, having part(s) containing ion-exchange functions

WO 2001011355 A1 20010215, Patent Cooperation Treaty (PCT) patent application, Pharmacia Diagnostics AB (2001)b

Case, G. D.; Worley, J. F.

Thin membrane sensor with biochemical switch - used for detection and monitoring of con-

tamination, pollution, personnel exposure, food spoilage, etc.

WO 9310212 A1 19930527, Patent Cooperation Treaty (PCT) patent application (1993)

Chambers, G. R.; Fathallah, M. A.

An apparatus suitable for obtaining a sample of blood for analysis in a diagnostic test

WO 2001091634 A2 20011206, Patent Cooperation Treaty (PCT) patent application, Abbott Lab (2001)

Chandler, H. M.; Fitzgerald, D.; Lapointe, L.

Chromatographic assay device used for detecting analyte e.g. hormone, has opposable components which contact to cause applicator to contact with sample application zone, and absorber to contact with second end of chromatographic medium.

WO 2002001229 A1 20020103, Patent Cooperation Treaty (PCT) patent application, Beckman Coulter Inc. (2002)

Chandler, J.

Assay device and Method

969014477.1., European patent application, British Biocell International (1999)

Chang, C. D.; Joseph, M. K.; Kaplan, M. J.

Labels for use in immunoassays - comprise colloidal particle having specific binding member attached via spacer arm

WO 9734150 A1 19970918, Patent Cooperation Treaty (PCT) patent application, Abbott Lab. (1997)

Cheng, S.; Cunningham, H. B.; Fan, E.; Huang, C.; Willrodt, M. J.; WU, M.

Determining the presence of Streptococcus group A antigen - using a one-step lateral flow immunochromatographic device

WO 9905524 A1 19990204, Patent Cooperation Treaty (PCT) patent application, Wyntek Diagnostics Inc. (1999)

Chowdhury, M. A.; He Y.; McClintock, J.

A new detection device for detecting analyte from liquid sample, especially useful for detecting infections from botulism or E. coli 0157

WO 9945396 A1 19990910, Patent Cooperation Treaty (PCT) patent application, Universal

Halh-Watch Inc.

Cullmann, G.; Haindl, E.; Heppner, P.; Mueller, H.; Reiter, C.; Ringeis, A.; Haindl, E.

Detecting infections by acid-resistant microorganisms, particularly for diagnosing Helicobacter pylori, comprises an immunoassay on a fecal sample

WO 2001027613 A2 20010419, Patent Cooperation Treaty (PCT) patent application, Connex GES Optimierung von Forschung & Entwicklung (2001)

Cunningham, D. D.; Henning, T. P.; Hiltibran, R. G.; Shain, E.B.; Tarkowski, B. J.; Young, D. F.

Interstitial fluid diagnostic test for glucose

WO 9927852 A1 19990610, Patent Cooperation Treaty (PCT) patent application, Abbott Lab

Cunningham, H. B.; Fan, E.; Huang, C.; Rehg, L.; Willrodt, M. J.

Immunochromatographic assay device including two mobile, labelled indicator reagents - with different flow characteristics, provides increased sensitivity range without increased clearance times or false positive results.

WO 9822800 A1 19980528, Patent Cooperation Treaty (PCT) patent application, Wyntek Diagnostics Inc.(1998)

Dinello, R. K.; Polito, A. J.; Sierra, G. H.; Thayer, R. M.

Sample analyte evaluating test strip, used in lateral flow assays to measure analytes in a sample, assaying for human diseases such as infectious diseases, or cancer.

WO 2000031538 A1 20000602, Patent Cooperation Treaty (PCT) patent application, praxys biosystems Inc. (2000)

Duan, F.; Hartmann, J. X.

Lateral flow immunoassay device for identifying presence of tissue from particular species of billfish in test sample, comprises substrate onto which billfish specific antigen-containing sample is immobilized.

WO 2002042416 A2 20020530, Patent Cooperation Treaty (PCT) patent application, UniV Florida Atlantic (2002)

Feistel, C.

Magnetic chromatography for bioassay, by applying magnetic field, such that suspended magnetic particles of reaction mixture that laterally cross chromatographic medium are captured, and analysing captured particles.

WO 2001029559 A1 20010426, Patent Cooperation Treaty (PCT) patent application, Wave-sense LLC (2001)

Ford, G. M.; Hubscher, T. T.; Ruppenthal, T. M.

Lateral flow immunoassay device for detecting analytes such as bacteria, viruses and allergens in humans and animals in which different classes of antibody can be distinguished in one test.

WO 2002056017 A1 20020718, Patent Cooperation Treaty (PCT) patent application, Dexall Biomedical Labs Inc. (2002)

Hajizadeh, K.; Wijesuriya, D.

Immunochromatographic assay strip, useful e.g. for determining disease markers in blood, has a sample application zone made of hydrophobic, non-porous material

EP 1046913 A2 20001025, European patent application, Bayer Corp. (2000)

Hallis, B.; James, B. A. F.; Quinn, C. P.; Shone, C. C.

Assay for botulinum or tetanus toxin - by combining test cpd. with substrate which is cleaved by the toxin, and antibody specific for the cleaved but not uncleaved substrate.

WO 9533850 A1 19951214, Patent Cooperation Treaty (PCT) patent application, Camr Cent Applied Microbiology & Res; (MICR-N) Microbiological (1995)

Harris, P. C.; Richards, B. G.

Quantitatively measuring the amount of an analyte of interest in a fluid sample

2002077646 A1 20021003, Patent Cooperation Treaty (PCT) patent application, Response Biomedical Corp. (2002)

Jones, M. H.

Assaying for analytes of interest using an electrochemical process

EP 962773 A1 19991208, European patent application (1999)

Kitawaki, F.; Nadaoka, M.; Takahashi, M.; Tanaka, H.

One-step immunochromatographic biosensors for direct determination of substances e.g. in urine, blood, food and soil, applicable in point-of-care diagnosis, field operation and for home use.

WO 2001090754 A1 20011129, Patent Cooperation Treaty (PCT) patent application, Matsushita Electric IND CO LTD (2001)

Kroll, W.; Stave, J. W.; Teaney, G. B.

New assay device for the detection of analytes such as environmental contaminants, agricultural product, industrial chemicals, water treatment polymers, drugs and analytes of viruses, bacteria, fungi, parasites, plants and animals.

WO 9946591 A2 19990916, Patent Cooperation Treaty (PCT) patent application, Bayer AG Strategic Diagnostics Inc. (1999)

Laborde, R. T.

Lateral flow assay device for quantitative detection of target analytes in a sample, includes removable test strip having superparamagnetic particles as the labels for analytes.

WO 2001071344 A2 20010927, European patent application, Quantum Design Inc. (2001)

Lee, J.P.

Even fluid front for liquid Sample on Test Strip Device

US 6.372.514 B1, US patent application, Syntron Bioresearch Inc., (2002)

Marsen, S.

Blunt cannula assembly useful for blood plasma analysis

EP1245943 A2 20021002, European patent application, Becton Dickison & Co (2002)

May, K.; Prior, M. E.; Richards, I.

Immunoassay and device therefore

EP 0291194 B1, European patent application, Unilever N.V. (1987)

Medel-Hartvig, I.; Odelstad, L.

Determining high concentration of analyte in a sample using a receptor which specifically binds to the analyte to form analyte/receptor complex, and detecting the complex

WO 2002031503 A1 20020418, Patent Cooperation Treaty (PCT) patent application, Pharmacia Diagnostics AB (2002)

Metzger, C.; Terletskaia-Ladwig, E.

Immunoassay for enteroviral antigens useful for diagnosis, comprises binding the antigens to one or more immobilized capture antibodies directed against enterovirus group-specific determinants.

DE 19846271 A1 20000413, German patent application, Viragen Virus-Antigene GmbH (2000)

Miller, J. K.

Diagnosis of equine toxicoinfectious clostridiosis - by detecting an antibody to a C. botulinum antigen or phenotype or to a clostridial toxin.

WO 9625669 A1 19960822, Patent Cooperation Treaty (PCT) patent application, Biotrix INT LTD, Microbiological RES Authority (1996)

Miyazaki, J.; Oka, M.; Shigetou, N.

Immunochromatography assay devices - with improvements such as zone containing surfactant, ammonium salt and/or buffer.

EP 903584 A1 19990324, European patent application, Matsushita Electric IND CO LTD (1999)

Mortensen, R. B.; Tom, H. K.

Assay with improved dose response curve - using bound anti-analyte, and free anti-analyte which binds analyte upto threshold concentration, especially useful with lateral flow membrane assay systems.

WO 9317338 A1 19930902, Patent Cooperation Treaty (PCT) patent application, Quidel Corp. (1993)

Muscat, A.; Fedosov, Y.; Khomiakov, O.; Kruchinin, M.; Roe, D. C.

New disposable article comprising a biosensor for detection of specific target biological analytes in bodily waste

WO 2000000233 A1 20000106, Patent Cooperation Treaty (PCT) patent application, Ppocster & Gamble Co (2000)

Okumura, Y.

Analyzing specimens with use of specific bonds

WO 2002071069 A1 20020912, Patent Cooperation Treaty (PCT) patent application, Asahi Biru Yakuhin KK, (ASAH-N) Asahi Beer Pharm CO LTD (2002)

Song, X.; Swanson, B. I.

Biosensor for the detection of multivalent target molecules, especially protein toxins e.g. botulinum and cholera comprising fluid membrane and fluorescently labeled recognition molecules.

WO 9967640 A1 19991229, Patent Cooperation Treaty (PCT) patent application, Univ California

Sun, M.; Hill, C.

Lateral Flow Test Device

US 6.372.516 B1, US patent application, Sun Biomeical Laboratories, Inc. (2002)

Yongsheng, H. E., Mc Clintock, J. A., Chowdhur, M. A.

Chemiluminescence detection devices

WO 99.45396, Patent Cooperation Treaty (PCT) patent application, Universal Healthwatch Inc. (1999)

7 ANHANG

7.1 Arbeitsvorschriften der immunologischen Referenzmethoden

7.1.1 *Immunochromatographischer Säulentest*

Probenvorbereitung:

Für die Probenvorbereitung werden 500 µL einer flüssigen Toxinprobe (mit BoNT/D versetzter GP-Puffer (pH 6,2)) auf folgende Antikörperkonzentrationen eingestellt:

0,3 µg/mL monoklonaler BoNT/D-Antikörper (Maus)

0,2 µg/mL biotinylierter polyklonaler BoNT/D-Antikörper (Ziege)

Diese Testlösungen werden über Nacht bei 37°C auf einem Überkopfschüttler bei ständiger Drehbewegung auf niedrigster Stufe inkubiert.

Testdurchführung

Vor Testbeginn wird der in den Testsäulen überstehende PBS-Puffer abgelassen. Danach werden die unten aufgeführten Lösungen in der angegebenen Reihenfolge auf die Säule gegeben. Jede Lösung muss vollständig durchlaufen; erst dann schließt sich der nächste Schritt an.

- 1) 750 µL Caseinpuffer (pH 7,2)
- 2) 500 µL der vorbereiteten Toxinprobe
- 3) dreimaliges Waschen mit jeweils 750 µL Caseinpuffer (pH 7,2)
- 4) 500 µL HRP-konjugiertes Streptavidin (in Verdünnungspuffer 1:1000 verdünnt)
- 5) zweimaliges Waschen mit jeweils 750 µL Caseinpuffer (pH 7,2)
- 6) 750 µL dest. H₂O
- 7) 100 µL Färbungsreagenz „BM-Blue“
- 8) 750 µL H₂O
- 9) Mit 300 µL einer Stopplösung wird die zeitabhängige Färbung gestoppt und in eine Mikrotiterplatte überführt.

7.1.2 *Dynabead-Test*

Probenvorbereitung

700 µL einer mit Botulinum-Toxin Typ D dotierten Probenflüssigkeit (GP-Puffer (pH 6,2)) werden für die Probenvorbereitung auf folgende Antikörperkonzentrationen eingestellt:

- 0,3 µg/mL monoklonaler BoNT/D-Antikörper (Maus)
- 0,1 µg/mL biotinylierter polyklonaler Antikörper (Ziege)

Die dotierten Probenflüssigkeiten werden über Nacht bei 37°C auf einem Überkopfschüttler bei ständiger Drehbewegung auf niedrigster Stufe inkubiert. Am nächsten Tag wird zu der präparierten Probe eine Magnetic-Bead-Lösung (angegebene chargenabhängige Konzentration in 700µL Caseinpuffer (pH 7,2)) zugegeben. Die Probelösungen werden nach der Zugabe eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Überkopfschüttler bei ständiger Drehbewegung auf niedrigster Stufe inkubiert.

Optimale Testdurchführung

Die vorbehandelten und mit Dynabeads versetzten Proben werden in 1,5 mL Reaktionsgefäße (Eppendorf AG, Hamburg) überführt und in einem **Magnetic Particle Concentrator** (MCP) eingespannt. 30–60 Sek. später, nachdem alle magnetischen Dynabead-Partikel mittels der Magneten des MCP am Gefäßboden aufkonzentriert wurden, wird die überstehende Flüssigkeit abpipettiert und verworfen. Danach werden die Dynabeads mit 1 mL Caseinpuffer (pH 7,2) gewaschen. Anschließend werden die Magneten aus dem MCP entfernt und die Dynabeads in 200 µL Caseinpuffer (pH 7,2) in BSA blockierte Top Yield Module überführt. Für den sich anschließenden Waschschrift werden die Top Yield Module wieder auf den MCP gesetzt. 30-60 Sek. später, nachdem alle magnetischen Dynabead-Partikel mittels der Magneten des MCP am Gefäßboden aufkonzentriert wurden, wird der Überstand abpipettiert und verworfen. Das Modul wird erneut vom MCP genommen, um die Dynabeads in 200 µL Caseinpuffer (pH 7,2) aufzuschwemmen. Die Top Yield Module werden daraufhin wieder auf den MCP gesetzt und wie zuvor beschrieben gewaschen. Dieser Waschschrift ist insgesamt viermal durchzuführen. Zu den gewaschenen Dynabeads werden 200 µL einer in Verdünnungspuffer 1:10000 verdünnten HRP-konjugierten Streptavidinlösung gegeben. Die Top Yield Module werden anschließend mit einem Heat Sealing Film (Eppendorf AG, Hamburg) verschlossen und eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) auf einem Rütteltisch inkubiert.

Es wird eine Substratlösung hergestellt, indem eine TMB-Tablette in 1 mL DMSO gelöst wird. Zu dieser Lösung werden weitere 9 mL eines Verdünnungspuffers und 500 µL einer 30 % -igen Wasserstoffperoxidlösung gegeben. Für den nun folgenden Waschschrift werden die Top Yield Module auf einen MCP gesetzt. 30-60 Sek. später, nachdem alle magnetischen Dynabead-Partikel erneut mittels der Magneten des MCP am Gefäßboden aufkonzentriert wurden, wird der Überstand abpipettiert und verworfen. Das Modul wird nun für die Zugabe von 200 µL Caseinpuffer (pH 7,2) vom Magneten genommen. Dieser Waschschrift ist insgesamt dreimal durchzuführen. Es schließt sich ein Waschschrift mit 200 µL Verdünnungspuffer

an. Für den folgenden zeitabhängigen Färbungsschritt werden 200 μL der oben frisch angesetzten Substratlösung zu den Dynabeads gegeben und 10 Minuten auf einen Rütteltisch bei Raumtemperatur inkubiert.

7.2 Arbeitsvorschriften der entwickelten Flow-Through-Tests

7.2.1 Flow-Through-Test 1

Testherstellung

Zur Flow-Through-Testherstellung wird eine ausgestanzte, kreisförmige Probe (Durchmesser 13 mm) einer diagnostischen Membran (Unisart, CN 11301) mit einer Pinzette in eine leere Petrischale gegeben. Die Membranprobe wird mittels einer 200 μL Pipette (Typ Reference, Eppendorf, Köln) mit 200 μL eines Belegungspuffers (1 mg/mL Anti-Maus-IgG, 50 mM NaP-Puffer, pH 7) benetzt. Nach der Zugabe von 1 mL 50 mM Phosphatpuffer (pH 7) erfolgt eine Inkubation bei RT auf einem Laborschüttler auf niedriger Stufe über Nacht. Nach Abschluss der Inkubation wird die Membran mit einer Pinzette aus der Schale genommen und in eine saubere Petrischale umgesetzt. Es schließt sich eine 4 stündige Trocknung bei Raumtemperatur und eine weitere 4 stündige Trocknung bei 37°C in einem Trockenschrank an. Um unspezifische Bindungen herabzusetzen, erfolgt anschließend ein Blockierungsschritt. Dabei wird die Membran mit 3 mL Gammaglobulinlösung (Rinderserum–Gammaglobulin, 10 mg/mL in 50 mM NaP-Puffer (pH 7)) benetzt. Die Probe wird drei Stunden bei 25°C inkubiert; die überstehende Lösung wird verworfen. Im Rahmen eines Waschschrilles werden 15 mL eines 50 mM Phosphatpuffers (pH 7) zugegeben und 15 Minuten geschüttelt. Dieser Vorgang wiederholt sich noch zweimal. Danach werden die Proben mit einer Pinzette aus den Petrischalen entnommen, mit Kleenextüchern trockengetupft und in saubere Petrischalen umgesetzt. Die Trocknung erfolgt bei RT über Nacht. Die gebrauchsfertigen Membranen werden mit Trocknungsmitteln in Siegelrandbeutel aus Alu-Verbundfolie verpackt und bei RT gelagert.

Probenvorbereitung

Für die Probenvorbereitung werden 500 μL eines mit verschiedenen BoNT/D-Konzentrationen versetzten 28 mM GP-Puffers (pH 6,2) auf folgende Antikörperkonzentrationen eingestellt:

0,3 $\mu\text{g/mL}$ monoklonaler Antikörper (Maus)

0,2 $\mu\text{g/mL}$ biotinylierter polyklonaler Antikörper (Ziege)

Die dotierten Probenpuffer werden über Nacht (12 h) bei 37°C auf einem Überkopfschüttler bei ständiger Drehbewegung auf niedrigster Stufe inkubiert.

Optimale Testdurchführung

Unmittelbar vor der Flow-Trough-Testdurchführung werden die Flow-Through-Membranproben mittels eines 28 mM GP-Puffers (pH 6,2) benetzt, in Filtrationsvorsätze eingelegt und mit einer 1-ml-Spritze versehen (Abb. 3-9). Dann erfolgen mehrere Filtrations-schritte in der unten angegebenen Reihenfolge. Der sich anschließende Schritt erfolgt immer erst dann, wenn die jeweilige Lösung vollständig durchgelaufen ist. Die Durchtropfgeschwindigkeit beträgt pro Minute ca. 100 μL . Es handelt sich um eine Filtration über Schwerkraft.

- Waschen mit 750 μL eines 28 mM GP-Puffers (pH 6,2)
- Zugabe des mit Toxin dotierten Probenpuffers (500 μL)
- 3 x Waschen mit jeweils 750 μL Caseinpuffer (pH 7,2)
- Zugabe von 500 μL einer HRP-konjugierten Streptavidinlösung
- 2 x Waschen mit jeweils 750 μL Caseinpuffer (pH 7,2)
- Waschen mit 750 μL dest. Wasser (sterilfiltriert)
- Zugabe von 500 μL BM-Blue (Farbstoff)
- Stoppen und Waschen durch zweimalige Zugabe von 750 μL dest. Wasser
- nach dem letzten Waschschritt werden die Membranen aus dem Filtrationsvorsatz herausgenommen und getrocknet. Die Ergebnisse sind visuell ablesbar.

7.2.2 Flow-Through-Test 2

Testherstellung

Die Testherstellung erfolgt entsprechend Kapitel 7.2.1.

Probenvorbereitung

Für die Probenvorbereitung werden 500 μL eines mit verschiedenen BoNT/D-Konzentrationen versetzten 40 mM NaP-Puffers (pH 7,2) auf folgende Antikörperkonzentrationen eingestellt:

0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ monoklonaler Antikörper (Maus)

1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ goldkonjugierter polyklonaler Antikörper (Huhn)

Die dotierten Probenpuffer werden für 6 Stunden bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert.

Optimale Testdurchführung

Unmittelbar vor der Flow-Trough-Testdurchführung werden die Membranproben mittels eines 40 mM NaP-Puffers (pH 7,2) benetzt, in Filtrationsvorsätze eingelegt und mit einer 1-ml-Spritze versehen. Dann werden mehrere Filtrationsschritte in der unten angegebenen

Reihenfolge durchgeführt. Der sich anschließende Schritt erfolgt immer erst dann, wenn die jeweilige Lösung vollständig durchgelaufen ist. Die Durchtropfgeschwindigkeit bei dieser Filtration über Schwerkraft beträgt ca. 100 $\mu\text{L}/\text{Minute}$.

- Mit 750 μL eines 40 mM NaP-Puffers (pH 7,2) waschen
- Zugabe der dotierten Testproben (jeweils 500 μL)
- 3 x mit jeweils 750 μL eines 40 mM NaP-Puffers (pH 7,2) waschen.

7.2.3 *Flow-Through-Test 3*

Testherstellung

Die Testherstellung erfolgt entsprechend Kapitel 7.2.1, mit der Ausnahme, dass als Belegungspuffer ein 50 mM PBS-Puffer (pH 7) verwendet wird, der 1 mg/mL Anti-Huhn-IgG (Ziege) enthält.

Probenvorbereitung

Für die Probenvorbereitung werden 500 μL eines mit verschiedenen BoNT/D-Konzentrationen versetzten 40 mM NaP-Puffers (pH 6,2) auf folgende Antikörperkonzentrationen eingestellt:

- 2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ polyklonaler Antikörper (Huhn)
- 0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ goldkonjugierter monoklonaler Antikörper (Maus)

Die dotierten Probenpuffer werden für 6 Stunden bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert.

Optimale Testdurchführung

Unmittelbar vor der Flow-Trough-Testdurchführung werden die Membranproben mittels eines GP-Puffers (28 mM, pH 6,2) benetzt, in Filtrationsvorsätze eingelegt und mit einer 1-ml-Spritze versehen. Dann werden die Filtrationsschritte in der unten angegebenen Reihenfolge durchgeführt. Der sich anschließende Schritt erfolgt immer erst dann, wenn die jeweilige Lösung vollständig durchgelaufen ist. Die Durchtropfgeschwindigkeit bei dieser Filtration über Schwerkraft beträgt ca. 50 $\mu\text{L}/\text{Minute}$.

- Mit 750 μL eines 40 mM NaP-Puffers (pH 6,2) waschen
- Zugabe der dotierten Testproben (jeweils 500 μL)
- 3 x mit jeweils 750 μL eines 40 mM NaP-Puffers (pH 6,2) waschen.

7.3 Ergebnisse des entwickelten Schwangerschaftstests

Ein Lateral-Flow-Schwangerschaftstest ist ein vergleichsweise kostengünstiges Modellsystem zur Entwicklung eines Lateral-Flow-Tests. Es bietet als Referenzsystem ideale Möglichkeiten, kostengünstig grundlegende Erfahrungen mit dem Lateral-Flow-Testformat zu sammeln. So besteht eine große Auswahlmöglichkeit an verschiedenen monoklonalen und polyklonalen Anti-Alpha-hCG-Antikörpern und an ebenso vielen monoklonalen und polyklonalen Anti-Beta-hCG-Antikörpern. Auch werden von verschiedensten Anbietern vollständige Produktionskits angeboten, die von der Membran über die Antikörper bis hin zu dem Verpackungsmaterial der gebrauchsfertigen Teststreifen alles enthalten, was für die schnelle Entwicklung eines funktionstüchtigen Tests benötigt wird. In der vorliegenden Arbeit wird ein Schwangerschaftstest hauptsächlich aus drei Gründen aufgebaut:

- Für die Entwicklung einer optischen Auswertung soll ein reproduzierbarer Lateral-Flow-Test verwendet werden, für dessen Entwicklung eine große Auswahl an Antikörpern zur Verfügung steht.
- Erste Versuche der Testsignalverstärkung mittels Silberfixierung sollen anhand eines kostengünstigen Testformates erfolgen.
- Die Reproduzierbarkeit des Tests soll nicht zusätzlich durch eine Probenvorbereitung beeinflusst werden.

7.3.1 Arbeitsvorschrift zur Herstellung von Schwangerschaftstests

Release-Pad-Vorbehandlung

Für die Behandlung von 20 Release-Pads (25 cm lang) wird 1 L eines Belegungspuffers (0,6 Gew.-% BSA, 0,4 Gew.-% Tween 20 in 100 mM NaP-Puffer (pH 8,0), 150 mM NaCl) frisch angesetzt. Die unbehandelten Release-Pads werden zum Belegungspuffer zugegeben und 4 h bei RT geschüttelt. Die Pads werden anschließend auf einen Labortisch gelegt und bei RT 2 h getrocknet. Danach folgt eine Trocknung bei 30°C für 30 Minuten im Trockenschrank. Die Release-Pads werden mit Trocknungsmitteln in Siegelrandbeutel aus Alu-Verbundfolie verpackt und bis zum Gebrauch bei RT gelagert.

Linienapplikation:

Die Benutzung und Programmierung des BioDot-Dispensersystems (BioDot XYZ, BioDot Ltd., Hantington, England) mit vier separat aussteuerbaren BioJet Quanti 3000 Dispensern erfolgen gemäß zugehörigem Handbuch. Die Vorbereitung des Gerätes, Beladung der

Pumpen, Steuerung der Pumpen und des Applikationsmodus sowie die Reinigung ist in der „Anleitung für den BioDot“ beschrieben. Es werden für die Applikation der Testlinie, und der Kontrolllinie die in Tab. 7-1 angegebenen Einstellungen benutzt.

Für die Testlinie wird die Applikation mit einer Anti-Alpha-hCG-Proteinlösung (Maus-IgG, 1 mg/mL in 10 mM NaP-Puffer pH (8,0), 150 mM NaCl) durchgeführt. Die Testlinie wird in einem Abstand von 1,0 cm von der Unterkante der Membran aufgetragen. Die Applikation der Kontrolllinie erfolgt 0,7 cm oberhalb der Testlinie mit einer Anti-Maus-IgG Proteinlösung (Ziege) (1 mg/mL in 0,15 M NaCl). Unregelmäßige Linienerscheinungen, die auf das Applikationssystem zurückzuführen sind (Spritzer auf der Membran, Tropfenbildung an dem Piezo-Ventil, etc.) werden markiert und später herausgeschnitten. Anschließend wird eine Trocknung für 30 Minuten der Membranproben bei 40 °C im Trockenschrank vorgenommen. Die Membranen werden danach mit Trocknungsmitteln in Siegelrandbeutel aus Alu-Verbundfolie verpackt und bei RT gelagert.

Tab. 7-1 Linienapplikation

Dispensionsform („ <i>task</i> “)	Linie („ <i>line</i> “)
Einzeltröpfchenvolumen („ <i>drop</i> “)	20,83 [nl]
Vorschubgeschwindigkeit („ <i>speed</i> “)	50 [mm/s]
Beschleunigung („ <i>ACC</i> “)	1000 [mm/s ²]
Auftragsmenge („ <i>rate</i> “)	0,87 [µL/cm]
Linienlänge („ <i>length</i> “)	200 [mm]
Abstand der Einzeltröpfchen („ <i>pitch</i> “)	0,24 [mm]
Öffnungszeit des Dosierventils („ <i>on time</i> “)	0,20 [ms]

Herstellung von Teststreifen

Die vorbereiteten Membranproben und Release-Pads werden nun auf einer G&L Unterstützung zusammengefügt. Eine Seite der G&L-Karte ist mit Klebstoff vorbehandelt. Dabei ist darauf zu achten, dass das Release-Pad den Membranstreifen um 1-2 mm überlappt, damit später der Probenfluss von dem Release-Pad zur Membran gewährleistet ist. Im letzten Schritt wird das Absorbent-Pad im oberen Drittel der Karte so aufgeklebt, dass auch hier das Absorbent-Pad ca. 1-2 mm die Membran überlappt. Die so präparierten Dipstick-Karten werden nun mittels einer Schlagschere in 0,5 x 7,5 cm große Streifen geschnitten. Die gebrauchsfertigen Teststreifen werden mit Trocknungsmitteln in Siegelrandbeutel aus Alu-Verbundfolie verpackt und bis zum Gebrauch bei RT gelagert.

Testdurchführung

Mittels einer 0-10 µL Eppendorf-Pipette werden 2,2 µL einer Anti-Beta-hCG-Goldkonjugatlösung (OD 10) auf das Release-Pad eines gebrauchsfertigen Teststreifens ge-

ben. Dieses entspricht einem Auftragevolumen von 4,8 $\mu\text{L}/\text{cm}$. Es folgt eine Trocknung für 20 Minuten bei RT. 200 μL der jeweiligen hCG-Testkonzentration (mit verschiedenen hCG-Konzentrationen dotierter interner Probenpuffer der Sartorius AG, pH 8,0) werden in eine Kammer einer Polystyrol-Mikrotest-Platte gegeben. Die trockenen Teststreifen werden mit dem Sample-Pad voran in die gefüllte Kammer gestellt. Das laterale Benetzungsverhalten, die Zeit bis zur vollständigen Entfärbung der Membran und die resultierenden Signalintensitäten der jeweiligen hCG-Konzentration werden visuell bewertet und notiert. Nach insgesamt fünf Minuten werden die Dipstickstreifen aus den Kammern der Polystyrol-Mikrotest-Platte herausgenommen und bei RT gelagert. Eine halbe Stunde nach der Testdurchführung wird die Signalstabilität überprüft.

7.3.2 Optische Auswertung von Lateral-Flow-Assays

Die Herstellung und Testdurchführung des zur optischen Auswertung verwendeten Schwangerschaftstest ist in dem vorangegangenen Kapitel 7.3.1 beschrieben. Nach der Applikation der Testlösung ist das Testsignal bei allen positiven Proben innerhalb von 2 Minuten erkennbar. Die durch den goldkonjugierten Antikörper bedingte rote Verfärbung der diagnostischen Membran ist innerhalb von 6 Minuten nicht mehr vorhanden. Das Testsignal ist für den Laien nach ca. 6 Minuten ablesbar. 30 Minuten nach der Probenapplikation sind die Signalintensitäten der Testlinien stabil und unverändert. Bei dem Testverlauf treten keine Benetzungsprobleme der Test- oder Kontrolllinie auf. Sämtliches auf dem Release-Pad enthaltendes Goldkonjugat wird während der Testdurchführung wieder ausgewaschen.

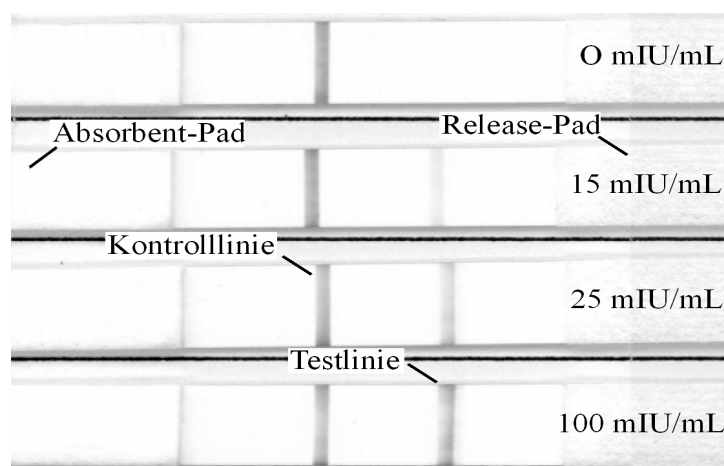


Abb. 7-1: Ergebnisse eines in der vorliegenden Arbeit entwickelten Schwangerschaftstests. Die Abbildung zeigt den Einfluss verschiedener Analytkonzentrationen auf die Signalintensität der Testlinie.

Die in Abb. 7-1 dargestellten Ergebnisse einer Membran Unisart CN 90 (Sartorius AG) zeigen, dass die für eine Produktreihe geforderte Testsensitivität von 25 mIU/mL erreicht wird (vgl. Kapitel 3.1.4). Ein falsch-positives Signal tritt nicht auf. In dem betrachteten Konzentrationsbereich korrelieren die Signalintensitäten der Testlinien mit der getesteten hCG-Konzentration.

Im Folgenden sollen die Ergebnisse einer optischen Auswertung zweier hCG-Konzentrationen durch ein Matest-System näher betrachtet werden. Die in Abb. 7-2 dargestellten Auswertungsfenster beinhalten eine Abbildung des analysierten Teststreifens und einen Graphen mit dem densitometrischen Profil (entlang der X-Achse). Deutlich sind die Peaks der Test- und Kontrolllinie zu erkennen, deren Fläche der jeweiligen Gesamtlinienintensität der Test- bzw. Kontrolllinie entsprechen. Der Intensitätsunterschied der Testlinie der Probe mit 15 mIU/mL im Vergleich zu der Probe mit 25 mIU/mL ist durch die unterschiedlichen Peakflächen deutlich zu erkennen. Damit entsprechen die Auswertungsergebnisse den visuell gewonnenen Eindrücken. Betrachtet man in Abb. 7-2 die Peakbreiten, so fällt auf, dass mit zunehmender Analytkonzentration neben der Signalintensität auch die Linienbreiten zunehmen. Bei einer Analytkonzentration von 15 mIU/mL beträgt die Linienbreite 1,14 mm, wohingegen bei einer Konzentration von 25 mIU/mL eine Linienbreite von 1,56 mm vorliegt.

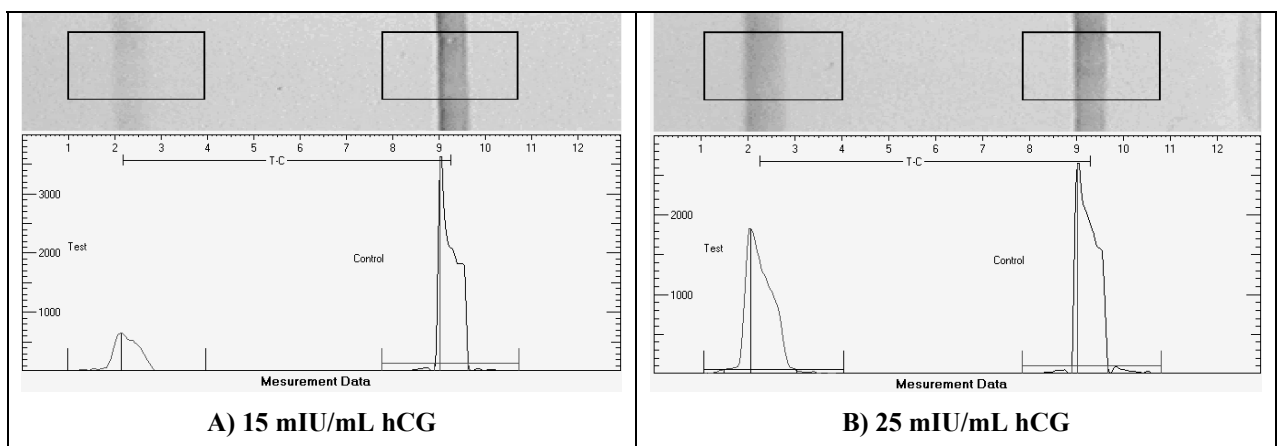


Abb. 7-2: Zwei Ergebnisfenster des Matest-Auswertungssystems zur Analyse von Lateral-Flow-Assays. Im oberen Bildteil des jeweiligen Ergebnisfensters ist der analysierte Teststreifen dargestellt, dessen Densitogramm im unteren Teil des Ergebnisfensters gezeigt wird. In Bild A) ist das Ergebnis eines Teststreifens dargestellt, der mit einer hCG-Konzentration von 15 mIU/mL getestet wurde. In Abbildung B) ist das Ergebnis einer hCG-Konzentration von 25 mIU/mL abgebildet.

In der vorliegenden Arbeit wird ein vergleichsweise flexibleres und anpassungsfähigeres Auswertungssystem als das Matest-System verwendet, das insbesondere eine gleichmäßi-

ge und reproduzierbare Beleuchtung der Teststreifen garantieren soll. Dazu wird eine ähnliche Kombination aus einem Bildauswertungsprogramm und einem digitalem Aufnahmegerät verwendet, wie sie von Stückmann (2002) beschrieben wird. Stückmann (2002) beschreibt eine optische Auswertung, bei der ein immer gleich großer Bildausschnitt ($6,5\text{--}7\text{ mm}^2$) aus dem Bereich der Testlinie ausgewertet wird. Von diesem Testlinienausschnitt wird zunächst der mittlere Gesamtgrauwert bestimmt, um anschließend den mittleren Grauwert eines Referenzbereiches abziehen zu können. In der vorliegenden Arbeit wird eine Kombination aus einem Scanner (Perfection 1240U, Epson) und einem an die verwendeten Teststreifen angepasste Version des von Stückmann beschriebenen Optimas 6.5[®]-Makros (Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, USA, Kapitel 7.9) verwendet. Die Ergebnisse dieser in Kapitel 7.3.3 dargestellten Auswertung sind in Abb. 7-3 zusammengefasst. Niedrige Analytkonzentrationen resultieren in geringeren Testlinienintensitäten, wohingegen hohe Analytkonzentrationen zu hohen Testlinienintensitäten führen.

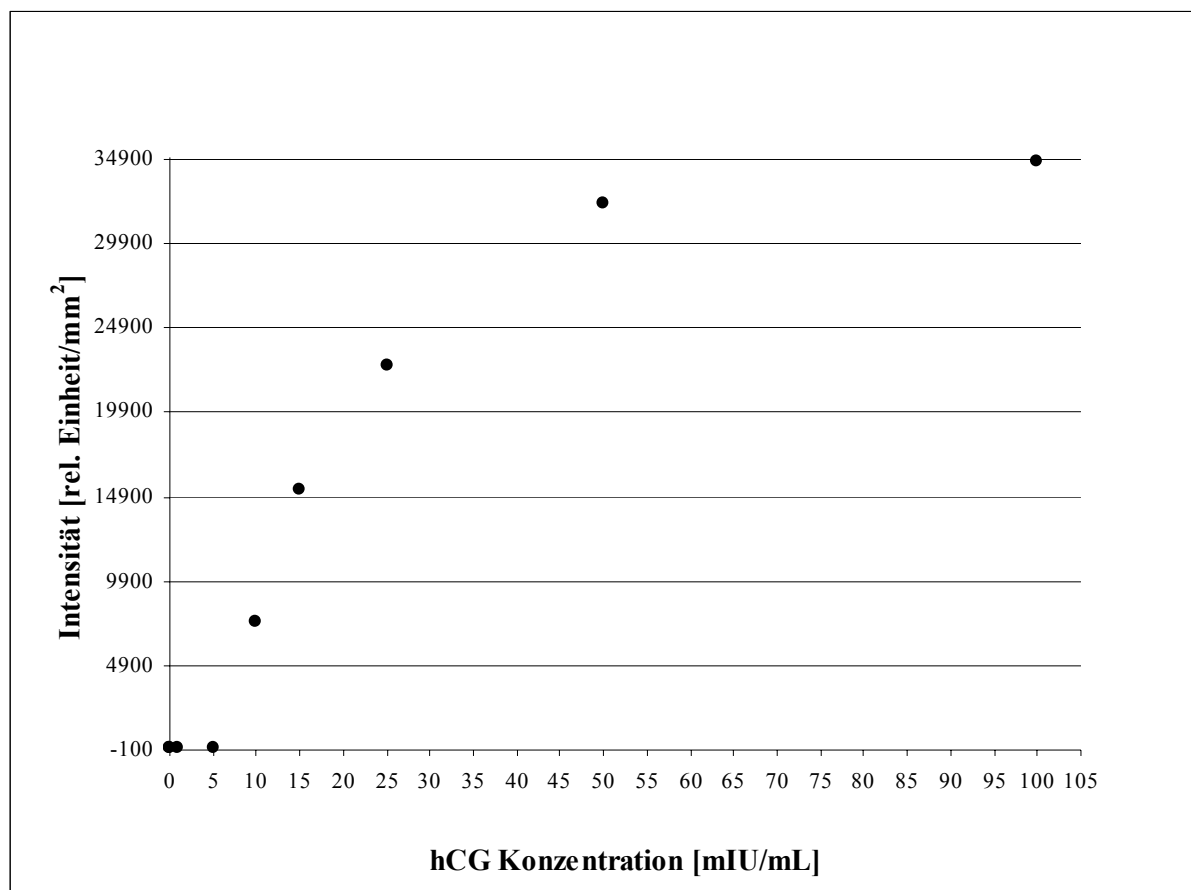


Abb. 7-3: Ergebnisse der optischen Auswertung einer hCG-Konzentrationsreihe mittels des in der vorliegenden Arbeit entwickelten Auswertungssystems. Dargestellt ist die Abhängigkeit der durchschnittlichen Testlinienintensität [rel. Einheit/mm²] eines Lateral-Flow-Schwangerschaftstests von der hCG-Konzentration.

Der resultierende Gesamtverlauf der Kalibrationskurve ist ein polynomischer, wie es für einen nicht-kompetitiven Immunoassay entsprechend der Literatur zu erwarten ist [Price, Newman, 1991; Wild 1994]. In bestimmten Konzentrationsbereichen kann in dem Graphen eine nahezu lineare Abhängigkeit der Signalintensität von der Analytkonzentration erkannt werden. Abhängig vom Testverfahren und -system sind in der Literatur zusätzlich andere Signalintensitätsabhängigkeiten (z.B. hyperbolische) beschrieben. Die Abhängigkeit der Testlinienintensität von der Analytkonzentration ist vor allem von den Eigenschaften der Immunreaktion (Reaktionsmechanismen, Kinetik etc.) abhängig [Price, Newman, 1991; Wild 1994]. Durch Mehrfachmessungen derselben Aufnahmen wurde ein mittlerer relativer Fehler dieses Auswertungsverfahrens von weniger als 3% bezogen auf die Intensitätswerte ermittelt.

7.3.3 Arbeitsvorschrift zur optischen Auswertung von LFD

Für eine optische Auswertung werden die auszuwertenden Teststreifen mittels eines Scanners (Perfection 1240U, Epson) mit einer Auflösung von 720 dpi und einer Farbtiefe von 8 bit (Graustufen) eingescannt. Zur Auswertung der digitalen Aufnahmen wird das Bildauswertungsprogramm Optimas 6.5[®] (Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, USA) verwendet. Das Programm bietet verschiedenste Filter und Routinen zur Bearbeitung und Auswertung digitaler Bilder bis zu einer Farbtiefe von 24 bit. Eine systemeigene Programmiersprache ermöglicht die Verknüpfung und Optimierung von Auswertungsroutinen zur halbautomatischen Bildauswertung. Für die Auswertung der Testlinienintensität wird das von Stückmann (2002) entwickelte und an die aktuellen Teststreifen angepasste Makro verwendet (Kapitel 7.9).

7.3.4 Silberfixierung als Methode der Signalverstärkung

Verschiedenste Möglichkeiten zur Signalverstärkung bzw. Sensitivitätserhöhung von Lateral-Flow-Assays sind in der Literatur beschrieben worden (vgl. Kapitel 3.1). Für die vorliegende Arbeit bietet sich eine Signalverstärkung mittels Silberfixierung an, da hierfür keine speziellen Labelreagenzien bzw. Auslesegeräte benötigt werden.

Mit dieser indirekten Signalverstärkungsmethode werden Nachweisgrenzen im pg/mL erreichbar [Chandler, 1996; Shyu et al., 2002]. Der Einfluss der Silberfixierung auf die Signalintensität wird im Folgenden anhand eines Schwangerschaftstests überprüft. Die Herstellung und Durchführung eines Schwangerschaftstests erfolgt entsprechend Kapitel 7.3.1. In Abb. 7-4 ist das Ergebnis eines Schwangerschaftstests ohne Silberfixierung abgebildet, dessen Sensitivität 10 mIU/mL beträgt. 5 mIU/mL führen zu keinem positiven Signal, womit das An-

forderungsprofil bezüglich der Sensitivität erfüllt wird. Die Linienintensitäten der Testlinien korrelieren gut mit den getesteten Analytkonzentrationen.

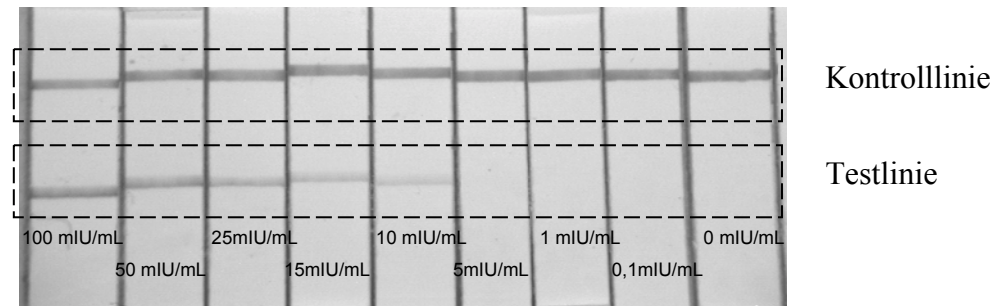


Abb. 7-4: Ergebnisse eines Schwangerschaftstests. Die Abbildung zeigt den Einfluss verschiedener hCG-Konzentrationen auf die Signalintensität der Testlinie. Der hier abgebildete Test hat eine Sensitivität von 10 mIU/mL.

In einem ersten Ansatz wird nun versucht, die Signalintensität des Schwangerschaftstests mittels einer Silberfixierung zu erhöhen. Zunächst wird die Silberfixierung in einem separaten Schritt durchgeführt. Als Silberfixierungsreagenzien wird ein Silberverstärkungskit (British Biocell International Ltd., SELK15) verwendet, welches aus einer Silbersalzlösung und einem Entwickler besteht. Zunächst wird ein Schwangerschaftstest entsprechend Kapitel 7.3.1 durchgeführt. Sieben Minuten nach der Applikation der Testlösung wird der Teststreifen aus der Probenlösung herausgenommen, das Release-Pad erneuert und in 100 μ L einer 1:1 Mischung einer Silbersalzlösung und eines Entwicklers (British Biocell International Ltd., SELK15) gestellt. Der Teststreifen wird nach verschiedenen Einwirkungszeiten wieder aus der Lösung herausgenommen und eine Minute mittels eines Föns getrocknet. Zur Ermittlung des Verstärkungsfaktors und des Einflusses der Einwirkungszeit der Silberfixierungslösung (1:1 Mischung der Verstärker- und Entwicklerlösung) wird eine optische Auswertung durchgeführt (siehe Kapitel 7.3.3).

Deutlich ist in Abb. 7-5 zu erkennen, dass eine Variation der Einwirkungszeit der Silberfixierungslösung einen signifikanten Einfluss auf die resultierenden Signalintensitäten hat. Die optimalen Bedingungen in der vorliegenden Versuchsreihe werden mit einer Einwirkungszeit von 2 Minuten erreicht. Hier kann eine durchschnittliche Signalverstärkung um einen Faktor von 5 im Vergleich zu der unbehandelten Probe verzeichnet werden. Eine Herabsetzung der Einwirkungszeit auf 1,5 bzw. 1 Minute führt zu keinen bzw. nur sehr geringen Verstärkungseffekten. Eine Erhöhung der Einwirkungszeit auf 2,5 bzw. 3 Minuten bewirkt das Auftreten von falsch-positiven Signalen.

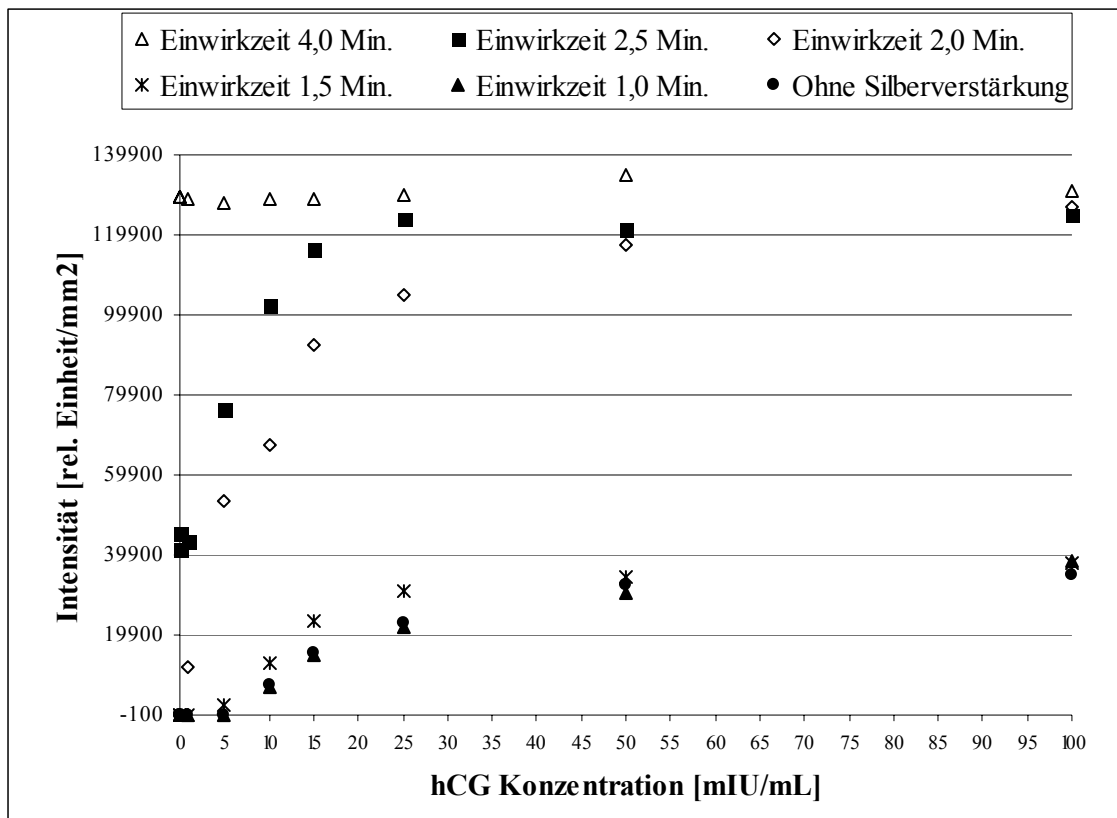


Abb. 7-5: Verstärkung der Testintensität eines Schwangerschaftstests mittels einer Silberfixierung. Bei jeder der hier dargestellten Testreihen handelt es sich um mit verschiedenen hCG-Konzentrationen getestete Schwangerschaftstests, deren Signalintensität mittels einer Silberfixierungslösung mit verschiedenen Einwirkzeiten nachbehandelt werden.

Die Ergebnisse einer Silberverstärkung mit einer Einwirkzeit von 2 Minuten werden in der folgenden Abb. 7-6 dargestellt. Deutlich sind die positiven Testergebnisse bei einer Konzentration von 5 mIU/mL und 1 mIU/mL zu erkennen; auch treten hier keine falsch-positiven Signale auf.

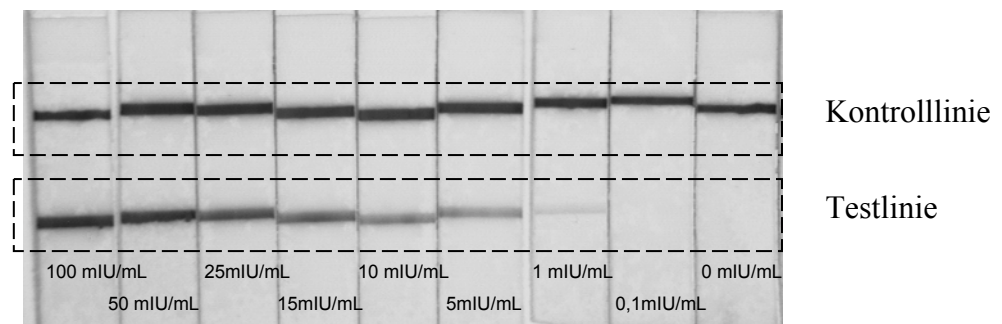


Abb. 7-6: Ergebnisse eines Schwangerschaftstests dessen Signalintensität mittels einer Silberverstärkung erhöht werden. Im Vergleich zu Abb. 7-4 zeigt dieser Test mit einer Einwirkzeit des Silberverstärkungsreagenzes von 2 Minuten eine Sensitivität von 1 mIU/mL.

Nach diesen Ergebnissen soll nun versucht werden, die Silberfixierung nicht in einem separaten Schritt durchzuführen, sondern in dem Test zu integrieren. Die für die Silberfixierung benötigten Reagenzien sind auch im getrockneten Zustand stabil. Daher bietet es sich entsprechend dem Ansatz von Chandler (1996) an, diese Reagenzien in einem Lateral-Flow-Test zu integrieren. Es müssen keine zusätzlichen Applikationsschritte durchgeführt werden. In Abb. 7-7 ist ein solches Testformat schematisch abgebildet. Als Silberfixierungsreagenzien wird ein Silberverstärkungskit (British Biocell International Ltd., SELK15) verwendet, welches aus einer Silbersalzlösung und einem Entwickler besteht. Vor Testbeginn werden sowohl der Entwickler, als auch die Silbersalzlösung 1:1 mit einer wässrigen Gelatinelösung (20g/L Gelatine in Wasser dest.) verdünnt. Die Gelatine führt während der Lateral-Flow-Testdurchführung zu einer zeitverzögerten Freisetzung der Silberfixierungsreagenzien. Eine Interaktion mit den goldkonjugierten Antikörpern soll damit möglichst verhindert werden. Die Herstellung eines Schwangerschaftstests mit integrierter Silberfixierung erfolgt entsprechend Kapitel 7.3.1 mit der Ausnahme, dass zusätzlich ein Silbersalz-Pad hergestellt wird. Die Präparation des Silbersalz-Pads erfolgt durch die Applikation von 7 $\mu\text{L}/\text{cm}$ der mit Gelatinelösung verdünnten Silbersalzlösung auf ein vorbehandeltes Release-Pad. Die so präparierten Pads werden 30 Minuten bei RT getrocknet. Anschließend werden die Silbersalz-Pads entsprechend Abb. 7-7 mit den anderen Testkomponenten kombiniert und auf eine G&L-Unterstützung geklebt. Mittels einer 0-10 μL Eppendorf-Pipette werden 2,2 μL einer Anti-Beta-hCG-Goldkonjugatlösung (OD 10) auf das Release-Pad eines gebrauchsfertigen Teststreifens gegeben. Dieses entspricht einem Auftragevolumen von 4,8 $\mu\text{L}/\text{cm}$. Es folgt eine Trocknung für 20 Minuten bei RT. 200 μL der jeweiligen hCG-Testkonzentration (mit verschiedenen hCG-Konzentrationen dotierter interner Probenpuffer der Sartorius AG, pH 8,0) werden in eine Kammer einer Polystyrol-Mikrotest-Platte gegeben. Die trockenen Teststreifen werden mit dem Sample-Pad voran in die gefüllte Kammer gestellt. Die Ergebnisse sind in Abb. 7-8 dargestellt. Auffällig ist, dass unabhängig von der hCG-Konzentration alle Teststreifen die gleiche Signalintensität aufweisen, womit ein falsch-positives Signal beobachtet wird. Diese unspezifischen Testergebnisse können auf eine Interaktion der Silbersalze mit dem goldkonjugierten Antikörper zurückgeführt werden. Auch eine zeitverzögerte Freisetzung des

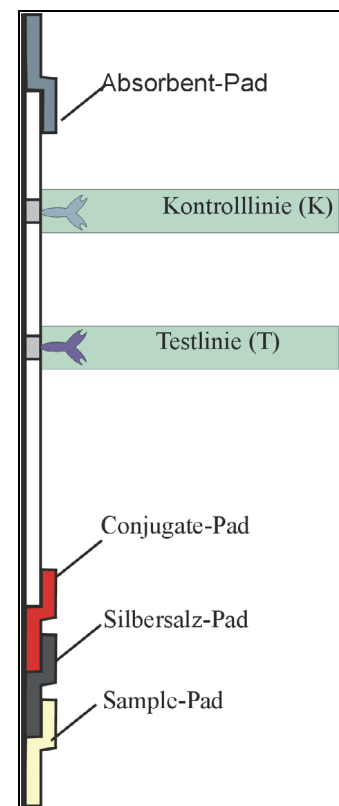


Abb. 7-7: Lateral-Flow-Test mit integrierter Signalverstärkung.

Silbersalzes konnte diese Interaktion nicht unterbinden. Eine Integration der Silberfixierung in den Schwangerschaftstest ist folglich nicht möglich.

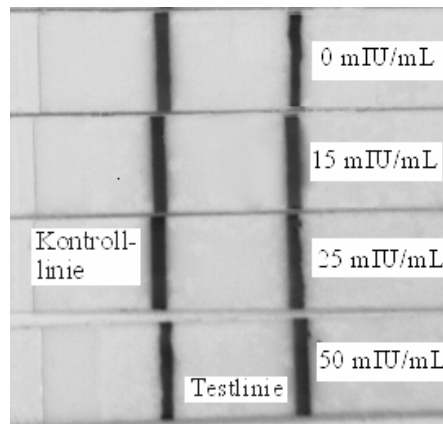


Abb. 7-8: Ergebnisse eines Schwangerschaftstests bei dem die Reagenzien zur Silberverstärkung im Lateral-Flow-Test integriert sind. Das Resultat sind falsch-positive Testsignale.

In den folgenden Versuchen wird aufgrund dieser Ergebnisse die Silberfixierung innerhalb eines separaten Schrittes durchgeführt. Dadurch wird die spezifische immunologische Reaktion des goldkonjugierten Antikörpers durch die Anwesenheit der Silberfixierungsreagenzien nicht gestört.

7.3.5 Zusammenfassung

- Unter Verwendung eines Schwangerschaftstests als Referenzsystem kann eine optische Auswertung standardisiert und etabliert werden. Durch Mehrfachmessungen derselben Aufnahmen wird ein mittlerer relativer Fehler dieses Auswertungsverfahrens von 2% ermittelt. Für das gesamte Testsystem (Teststreifen und Auswertungsverfahren) kann auf Basis von 10 parallel durchgeführten Tests ein mittlerer relativer Fehler von 3 % festgestellt werden.
- Das entwickelte Testformat mit integrierter Silberverstärkung führt zu unspezifischen Interaktionen zwischen dem Goldkonjugat und dem gelösten Silbersalz, so dass unspezifische falsch-positive Signale auftreten.
- Eine Silberfixierung in einem separaten Schritt führt hingegen zu reproduzierbaren Ergebnissen. Die Signalintensitäten können mit diesem Testformat reproduzierbar um einen Faktor von ca. 5 verstärkt werden.

7.4 Arbeitsvorschriften der entwickelten BoNT/D-Lateral-Flow-Assays

7.4.1 "Klassischer" Lateral-Flow-Assay (ohne Probenvorbereitung)

Linienapplikation

Die Test- und Kontrolllinie werden mittels eines BioDot-Dispensersystems (BioDot XYZ, BioDot Ltd., Hantington, England) mit vier separat aussteuerbaren BioJet Quanti 3000 Dispensern appliziert. Der Linienauftrag der Testlinie erfolgt in einem Abstand von 1,0 cm von der Unterkante einer 2,5 cm breiten und 30 cm langen Diagnostikmembran. 0,7 cm oberhalb dieser Testlinie wird die Kontrolllinie aufgetragen. Der Applikationspuffer ist in allen in Tab. 3-5 angeführten Kombinationsmöglichkeiten ein 20 mM PBS-Puffer (pH 8,0). Die Konzentration des Kontrolllinienantikörpers und des Testlinienantikörpers beträgt jeweils 1mg/mL. Alle Einstellungen des BioDot-Dispensers können der Tab. 7-1 entnommen werden. Die Membranproben werden anschließend 30 Minuten bei 40 °C im Trockenschrank getrocknet. Die Membranen werden nach der Linienapplikation mit Trocknungsmitteln in Siegelrandbeutel aus Alu-Verbundfolie verpackt und bis zum Gebrauch bei RT gelagert.

Tab. 7-2: Linienapplikation

Tröpfchenvolumen („drop“)	20,83 [nl]
Vorschubgeschw. („speed“)	50 [mm/s]
Auftragsmenge („rate“)	0,87 [μ L/cm]
Öffnungszeit („on time“)	0,20 [ms]

Release-Pad-Vorbehandlung/ Teststreifenherstellung/ Testdurchführung

Mit diesem Testformat gelingt kein BoNT/D-Nachweis; es können keine optimalen Bedingungen gefunden werden. Die untersuchten Reaktionsparameter sind in Kapitel 3.1.5 dargestellt.

7.4.2 Lateral-Flow-Assay 1 (mit separater Probenvorbereitung)

Linienapplikation

Die Vorbereitung der Linienapplikation mit dem BioDot-Dispensersystem erfolgt entsprechend der Vorschrift in Kapitel 7.3.1. Es werden sowohl für die Applikation der Testlinie, als auch der Kontrolllinie die in Tab. 7-3 angegebenen Einstellungen benutzt.

Der Auftrag der Testlinie erfolgt mit einer Anti-Maus-IgG Proteinlösung (Anti-

Tab. 7-3: Einstellungen der Linienapplikation

Dispensionsform („task“)	Linie
Volumen („drop“)	20,83 [nl]
Vorschubgeschw. („speed“)	50 [mm/s]
Auftragsmenge („rate“)	0,87 [μ L/cm]
Linienlänge („length“)	200 [mm]
Abstand („pitch“)	0,24 [mm]
Öffnungszeit („on time“)	0,20 [ms]

Maus-IgG (Ziege), 1 mg/mL in 20 mM PBS-Puffer, pH 8,0) auf eine Unisart CN 200. Die Applikation der Kontrolllinie erfolgt mit einer Anti-Huhn-IgY Proteinlösung (Anti-Huhn-IgY (Ziege), 2 mg/mL applikationsfertige Lösung). Die Applikationshöhe der Testlinie beträgt 1,5 cm von der Unterkante der Membran. 0,5 cm oberhalb dieser Testlinie wird die Kontrolllinie aufgetragen. Die Membranproben werden anschließend 30 Minuten bei 40°C im Trockenschrank getrocknet. Die Membranen werden mit Trocknungsmitteln in Siegelrandbeutel aus Alu-Verbundfolie verpackt und bis zum Gebrauch bei RT gelagert.

Teststreifenherstellung

Für die Behandlung von 20 Release-Pads (25 cm lang) wird 1 L eines 40 mM NaP-Puffers (pH 7,2) frisch angesetzt, der zusätzlich 0,6 Gew.-% BSA, 0,4 Gew.-% Tween 20 und 5 Gew.-% Saccharose enthält. Die unbehandelten Release-Pads werden in dem Belegungspuffer eingelegt und 4 h bei RT geschüttelt. Die Pads werden anschließend auf einen Labortisch gelegt und bei Raumtemperatur zwei Stunden getrocknet; es schließt sich eine Trocknung bei 30°C für 30 Minuten im Trockenschrank an. Die präparierten Membranproben, Absorbent-Pads und Release-Pads werden auf einer G&L Unterstützung zusammengefügt. Diese Dipstick-Karten werden nun mittels einer Schlagschere in 0,5 x 7,5 cm große Streifen geschnitten. Die Teststreifen werden mit Trocknungsmitteln in Siegelrandbeutel aus Alu-Verbundfolie verpackt und bis zum Gebrauch bei RT gelagert.

Optimale Testdurchführung

Für die Probenvorbereitung wird ein 40 mM NaP-Puffer (0,8 mg/mL BSA, pH 7,2) mit verschiedenen BoNT/D-Konzentrationen dotiert. Jeder Probenlösung werden danach der monoklonale Antikörper (Maus) und der goldkonjugierte polyklonale Antikörper (Huhn) zugegeben. Die Konzentrationen im Probenpuffer betragen 0,3 µg/mL im Falle des monoklonalen Antikörpers (Maus) und 1,2 µg/mL im Falle des goldkonjugierten polyklonalen Antikörpers (Huhn). Die Proben werden im Wasserbad bei 37°C für 4 Stunden inkubiert. 200 µL des jeweiligen Probenpuffers werden in eine Kammer einer Polystyrol-Mikrotest-Platte gegeben und die gebrauchsfertigen Teststreifen hineingestellt. Als diagnostische Membran dient die Unisart CN 200. Nach 20 Minuten werden die Teststreifen aus der Probenlösung genommen und visuell begutachtet.

Silberfixierung

Es schließt sich ein Waschschritt mit 70 µL eines 40 mM NaP-Puffers (pH 7,2) an. 10 Minuten nach der Applikation des Waschpuffers wird das Release-Pad des Lateral-Flow-Tests abgeschnitten und in 100 µL einer Silberfixierungslösung gestellt. Die Silberfixierungslösung besteht aus einer 1:2 Mischung einer Silbersalzlösung und einer Entwicklerlösung

(Silberverstärkungskit SELK15, British Biocell International Ltd.). Nach 2 Minuten werden die Teststreifen aus der Entwicklerlösung genommen, eine Minute mittels eines Föns getrocknet und anschließend visuell begutachtet.

7.4.3 Lateral-Flow-Assay 2 (mit separater Probenvorbereitung)

Linienapplikation

Die Testlinien aller in diesem Kapitel verwendeten Lateral-Flow-Assays werden mit einer Anti-Huhn-IgY-Proteinlösung (Anti-Huhn-IgY (Ziege), 2 mg/mL, gebrauchsfertige Lösung) aufgetragen. Die Applikation der Kontrolllinie erfolgt mit einer Anti-Maus-IgG-Proteinlösung (Anti-Maus-IgG (Ziege), 1 mg/mL, 20 mM NaP-Puffer (pH 8,0), 150 mM NaCl). Die Applikationshöhe der Testlinie beträgt 1,5 cm von der Unterkante der Membran und 0,5 cm oberhalb dieser Testlinie wird die Kontrolllinie aufgetragen. Die verwendeten Parameter bei der Linienapplikation entsprechen denen in Kapitel 7.3.1. Als diagnostische Membran dient die Unisart CN 11301.

Teststreifenherstellung

Für die Behandlung von 20 Release-Pads (25 cm lang) wird 1 L eines 40 mM NaP-Puffers (0,6 Gew.-% BSA, 0,4 Gew.-% Tween 20, 5 Gew.-% Saccharose, pH 7,2) frisch angesetzt. Die unbehandelten Release-Pads werden in dem Belegungspuffer eingelegt und 4 h bei RT geschüttelt. Die Pads werden anschließend auf einen Labortisch gelegt und bei Raumtemperatur zwei Stunden getrocknet; es schließt sich eine Trocknung bei 30°C für 30 Minuten im Trockenschrank an. Die präparierten Membranproben, Absorbent-Pads und Release-Pads werden auf einer G&L Unterstützung zusammengefügt. Diese Dipstick-Karten werden nun mittels einer Schlagschere in 0,5 x 7,5 cm große Streifen geschnitten. Die Teststreifen werden mit Trocknungsmitteln in Siegelrandbeutel aus Alu-Verbundfolie verpackt und bis zum Gebrauch bei RT gelagert.

Optimale Testdurchführung

Für die Probenvorbereitung wird ein 28 mM GP-Puffer (pH 6,2) mit verschiedenen BoNT/D-Konzentrationen dotiert. Jeder Probenlösung werden danach der polyklonale Antikörper (Huhn) und der goldkonjugierte monoklonale Antikörper (Maus) zugegeben. Die Konzentrationen im Probenpuffer betragen 2,00 µg/mL im Falle des polyklonalen Antikörpers (Huhn) und 0,35 µg/mL im Falle des goldkonjugierten monoklonalen Antikörpers (Maus). Die Proben werden im Wasserbad bei 37°C für 3 Stunden inkubiert. 50 µL des jeweiligen Probenpuffers werden in eine Kammer einer Polystyrol-Mikrotest-Platte gegeben und die gebrauchsfertigen Teststreifen hineingestellt. Nach ca. 10 Minuten ist das Ergebnis erkennbar.

7.4.4 Lateral-Flow-Assay 3 (mit separater Probenvorbereitung)

Linienapplikation

Die Applikation der Testlinie erfolgt mit einer Streptavidinlösung (20 mM PBS-Puffer, 2 mg/mL Streptavidin, pH 8,0). Die Applikationshöhe der Testlinie beträgt 1,5 cm von der Unterkante der Membran. 0,5 cm oberhalb dieser Testlinie wird die Kontrolllinie mit einer Anti-Maus-IgG Proteinlösung (20 mM PBS-Puffer, 1 mg/mL Anti-Maus-IgG (Ziege), pH 8,0) aufgetragen. Die verwendeten Parameter bei der Linienapplikation entsprechen denen in Kapitel 7.3.1. Als diagnostische Membran dient die Unisart CN 11301.

Teststreifenherstellung

Für die Behandlung von 20 Release-Pads (25 cm lang) wird 1 L eines 40 mM NaP-Puffers (0,6 Gew.-% BSA, 0,4 Gew.-% Tween 20, 5 Gew.-% Saccharose, pH 7,2) frisch angesetzt. Die unbehandelten Release-Pads werden in dem Belegungspuffer eingelegt und 4 h bei RT geschüttelt. Die Pads werden anschließend auf einen Labortisch gelegt und bei Raumtemperatur zwei Stunden getrocknet; es schließt sich eine Trocknung bei 30°C für 30 Minuten im Trockenschrank an. Die präparierten Membranproben, Absorbent-Pads und Release-Pads werden auf einer G&L Unterstüzung zusammengefügt. Diese Dipstick-Karten werden nun mittels einer Schlagschere in 0,5 x 7,5 cm große Streifen geschnitten. Die Teststreifen werden mit Trocknungsmitteln in Siegelrandbeutel aus Alu-Verbundfolie verpackt und bis zum Gebrauch bei RT gelagert.

Optimale Testdurchführung

Für die Probenvorbereitung wird ein 28 mM GP-Puffer (pH 6,2) mit verschiedenen BoNT/D-Konzentrationen dotiert. Jeder Probenlösung werden danach der biotinylierte polyklonale Antikörper und der goldkonjugierte monoklonale Antikörper zugegeben. Die Konzentrationen im Probenpuffer betragen 0,30 µg/mL im Falle des biotinylierten polyklonalen Antikörpers und 0,35 µg/mL im Falle des goldkonjugierten monoklonalen Antikörpers (Maus). Die Proben werden im Wasserbad bei 37°C für 12 Stunden inkubiert. 100 µL des jeweiligen Probenpuffers werden in eine Kammer einer Polystyrol-Mikrotest-Platte gegeben und die gebrauchsfertigen Teststreifen hineingestellt. Nach ca. 12 Minuten ist das Ergebnis erkennbar.

7.4.5 Lateral-Flow-Assay 4 (mit separater Probenvorbereitung)

Linienapplikation

Die Vorbereitung und verwendeten Parameter der Linienapplikation mit dem BioDot-Dispensersystem erfolgt entsprechend der Vorschrift in Kapitel 7.3.1. Die Testlinie wird mit

einer 2 mg/mL Streptavidinlösung (20 mM NaP-Puffer (pH 8,0), 150 mM NaCl) appliziert. Die Applikationshöhe der Testlinie beträgt 1,5 cm von der Unterkante der Membran. 0,5 cm oberhalb dieser Testlinie wird die Kontrolllinie aufgetragen. Die Applikation der Kontrolllinie erfolgt mit einer 2 mg/mL Anti-Huhn-IgY Proteinlösung (Anti-Huhn-IgY (Ziege), applikationsfertige Lösung).

Release-Pad-Vorbehandlung/ Teststreifenherstellung/ Testdurchführung

Mit diesem Testformat gelingt kein BoNT/D-Nachweis, es können keine optimalen Bedingungen gefunden werden. Die untersuchten Reaktionsparameter sind in Kapitel 4.4 dargestellt.

7.5 Verwendete Chemikalien

Dank der freundlichen Unterstützung des Instituts für angewandte Biotechnologie in den Tropen (an der Universität Göttingen) standen für die Entwicklung eines BoNT/D-Lateral-Flow-Tests folgende Antigene und Toxinantikörper zur Verfügung:

Monoklonaler BoNT/D-Antikörper (Maus) (monoklonaler Antikörper (Maus)) gegen determinante Gruppen der S-Kette gerichtet.

Polyklonaler BoNT/D-Antikörper (Huhn) (polyklonaler Antikörper (Huhn)) gegen determinante Gruppen der S- und L-Kette gerichtet.

Biotinylierter polyklonaler BoNT/D-Antikörper (Ziege) (biotinylierter polyklonaler Antikörper (Ziege)) gegen determinante Gruppen der S- und L-Kette gerichtet.

Botulinum-Neurotoxin Typ D, Stammlösung (aus Kulturüberstand), Konzentration 5 µg/mL

Goldkonjugate

Die Goldkonjugierungen des monoklonalen Antikörpers (Maus) und des polyklonalen Antikörpers (Huhn) wurden von der Firma Alchemy Labs (Dundee, Vereinigtes Königreich) durchgeführt.

Goldkonjugierter monoklonaler BoNT/D-Antikörper (Maus), gebrauchsfertige Lösung, Konzentration ca. 30 µg/mL in 20 mM Borat-Puffer (pH 8,0) + 10% (w/v) Saccharose, optische Dichte 9,4 bei 530 nm. Die durchschnittliche Goldpartikelgröße beträgt 40 nm.

Goldkonjugierter polyklonaler BoNT/D-Antikörper (Huhn), gebrauchsfertige Lösung, Konzentration ca. 30 µg/mL in 20 mM Borat-Puffer (pH 8,0) + 10% (w/v) Saccharose, optische Dichte 9,9 bei 530 nm. Die durchschnittliche Goldpartikelgröße beträgt 40 nm.

Weitere Materialien

Absorbent-Pads , 17 Chr cellulose paper wicks (16 x 2.7 cm)	Whatman International Ltd.
Anti-Huhn-IgY (Kaninchen) (whole molecule)	Sigma (C 1161)
Anti-Alpha-human Chorionic Gonadotropin (Ziege)	Medix Biochemica (5009)
Anti-Beta-human Chorionic Gonadotropin , goldkonjugiert, OD: 10 gebrauchsfertige Lösung	Alchemy Labs
Anti-Maus-IgG (Ziege)	Sigma (M8642)
BADD™ Botulinum-Toxin-Test , (BOT-E500-4)	Osborn Scientific Group (USA)
Blockierungsreagenz ,	Institut für angewandte Biotechnologie in den Tropen (IBT)
BM-Blue (POD Substrate precipitating), Färbungsreagenz	Roche
Borax-Decahydrat	Sigma (B9876)
BSA ,	Serva (11930)
Bovines Serum Albumin (albumin bovine fraction V, pH 7,0)	
Calciumchlorid-Dihydrat (>99,5%)	Fluka
Caseinpuffer (pH 7,2)	IBT
di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat (>95%)	Merck KGaA
Dimethylsulfoxid (99,5 %) (DMSO)	Sigma
di-Natriumhydrogenphosphat (>99%)	Sigma (S 0876)
Dynabead-Lösung	IBT
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf
Filtrationsvorsatz 13mm	Sartorius AG (Best.Nr. 16514)
G&L-Unterstützung (30 x 7.5 cm), 0.015" white/matte calendered vinyl with GL-187 acrylic pressure sensitive adhesive laminated to one side and supported with A74 LB.Poly.Coated silicone release liner	G&L Precision Die Cutting, Niederlande
Gelatine	Sigma (G 2500)
HRP-konjugiertes Streptavidin ,	IBT
human Chorionic Gonadotropin (pH 7.2)	Sigma (CG10)
Kaliumchlorid (99%)	Sigma
Kaliumdihydrogenphosphat (>99,5%)	Merck

Kaliumhydrogenphthalat	Sigma (P6758)
Magnesiumchlorid (>98%)	Sigma
Natriumazid (>99,5%)	Sigma
Natriumchlorid (>99,5%)	Sigma
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Sigma (S 9638)
Natriumhydrogencarbonat (>99,5%)	Riedel-de Haën
Natriumhydroxid	Sigma (S 8045)
PETG Nährmedienflaschen, steril	Fa. Roth
Polyethylen-Fritten	IBT
Polystyrol-Mikrotest-Platten, F-Profil	Fa. Roth
Release-Pad, Glassfaserrollen	Reemay Ltd. (Reemay 2040)
Saccharose	Sigma (S 9378)
Salzsäure (36 – 38%)	Sigma (H 7020)
Siegelrandbeutel aus Alu-Verbundfolie 3-seitig gesiegelt 15/15/12/75 µm	Gruber Folien (Straubing)
Silberverstärkungskit, Silver enhancer reagent kit	British Biocell Interna- tional Ltd. (UK) (SELK15)
Stopplösung	IBT
Streptavidin	Sigma (S 4762)
Testsäulen und deren Komponenten, Polyethylen-Fritten	IBT
Thimerosal®, Ethylmercurithiosalicylsäure, Natriumsalz, >98%	Sigma
TMB Tablette, (3, 3', 5, 5' Tetramethylbenzidine Tablets)	Sigma (T5525)
tri-Kaliumphosphat-Trihydrat (>99,5%)	Merck
Tris, (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan zur Analyse	Merck (1.08382.05)
Trocknungsmittel, Trockenkissen, Feuchtigkeitsanzeiger nach DIN 55473	TROPACK GmbH
Tween 20®, Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat	Sigma
Verdünnungspuffer	IBT
Wasserstoffperoxidlösung (30 % -ig)	Sigma (H 1009)
hCG-Testkonzentration (mit verschiedenen hCG- Konzentrationen dotierter Probenpuffer der Sartorius AG, pH 8,0)	Sartorius AG

7.6 Verwendete Membranen

Tab. 7-4: Verwendete Diagnostische Membranen

Membran	Eigenschaften	Hersteller
PuraBind ASP	Porengröße: 3 µm Migrationsgeschw.: 123 Sek./40mm	Whatman International Ltd.
PuraBind AFP	Porengröße: 5 µm Migrationsgeschw.: 116 Sek./40mm	Whatman International Ltd.
PuraBind ARP	Porengröße: 8 µm Migrationsgeschw.: 93 Sek./40mm	Whatman International Ltd.
FF 60/100	Porengröße: keine Angabe Migrationsgeschw.: 84 Sek./40mm	Schleicher & Schuell
FF 85/100	Porengröße: keine Angabe Migrationsgeschw.: 152 Sek./40mm	Schleicher & Schuell
FF 125/100	Porengröße: keine Angabe Migrationsgeschw.: 223/40mm	Schleicher & Schuell
Predator Laminated	Porengröße: keine Angabe Migrationsgeschw. ≤ 240Sek./20mm	Pall
Unisart CN 200	Porengröße: 5 µm Migrationsgeschw.: 198 Sek./40mm	Sartorius AG
Unisart CN 11301 nicht unterstützt	Porengröße: 8 µm Migrationsgeschw.: 152 Sek./40mm	Sartorius AG
Unisart CN 140	Porengröße: 8 µm Migrationsgeschw.: 133 Sek./40mm	Sartorius AG
Unisart CN 90	Porengröße: 10 µm Migrationsgeschw.: 92 Sek./40mm	Sartorius AG
Hi – Flow Plus HF07504	Porengröße: keine Angabe Migrationsgeschw.: 68 Sek./40mm	Millipore
Hi – Flow Plus HF09004	Porengröße: keine Angabe Migrationsgeschw.: 75 Sek./40mm	Millipore
Hi – Flow Plus HF13504	Porengröße: keine Angabe Migrationsgeschw.: 124 Sek./40mm	Millipore

7.7 Verwendete Lösungen

Borat-Puffer (40 mM, pH 8,2)

zur Herstellung von Verdünnungsreihen und zur Vorbehandlung von Release-Pads

- 1,526 g Borax-Decahydrat
- + 80 mL entionisiertes Wasser
- mit HCl auf pH 8,2 einstellen

mit entionisiertem Wasser auf 100 mL auffüllen und pH-Wert überprüfen.

Borat-Puffer (40 mM, pH 9,2)

zur Herstellung von Verdünnungsreihen und zur Vorbehandlung von Release-Pads

- 1,526 g Borax-Decahydrat
- + 80 mL entionisiertes Wasser
- mit NaOH auf pH 9,2 einstellen

mit entionisiertem Wasser auf 100 mL auffüllen und pH-Wert überprüfen.

GP-Puffer (28 mM, pH 6,0)

zur Herstellung von Verdünnungsreihen beim Toxinnachweis in der Maus

- 2g Gelatine
- + 4g *di*-Natriumhydrogenphosphat
- + 1000 mL entionisiertes Wasser

Die Bestandteile werden unter leichtem Erwärmen in Wasser gelöst. Der pH-Wert ist auf 6,0 einzustellen.

GP-Puffer (28 mM, pH 6,2)

zur Herstellung von Verdünnungsreihen

- 2g Gelatine
- + 4g *di*-Natriumhydrogenphosphat
- + 1000 mL entionisiertes Wasser

Die Bestandteile werden unter leichtem Erwärmen in Wasser gelöst. Der pH-Wert ist auf 6,2 einzustellen.

KhPhtH-Puffer²⁴ (40 mM, pH 5,2)

zur Herstellung von Verdünnungsreihen und zur Vorbehandlung von Release-Pads

²⁴ Kaliumhydrogenphthalat-Puffer

0,818 g KhPhtH Kaliumhydrogenphthalat
+ 80 mL entionisiertes Wasser
mit NaOH auf pH 5,2 einstellen
mit entionisiertes Wasser auf 100 mL auffüllen und pH-Wert überprüfen.

NaP-Puffer (10 mM, pH 8,0) 150 mM NaCl**zur Linienapplikation und Release-Pad-Vorbehandlung**

Alkalische Lösung:

0,142 g *di*-Natriumhydrogenphosphat
+ 1,753 g Natriumchlorid
+ 50 mL entionisiertes Wasser

Saure Lösung:

0,140 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
+ 1,753 g Natriumchlorid
+ 50 mL entionisiertes Wasser

Der pH-Wert der alkalischen Lösung wird mit der sauren Lösung auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt und mit einem Volumenteil entionisiertem Wasser verdünnt.

NaP-Puffer (20 mM, pH 8,0) 150 mM NaCl**zur Linienapplikation und Release-Pad-Vorbehandlung**

Alkalische Lösung:

0,284 g *di*-Natriumhydrogenphosphat
+ 1,753 g Natriumchlorid
+ 50 mL entionisiertes Wasser

Saure Lösung:

0,280 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
+ 1,753 g Natriumchlorid
+ 50 mL entionisiertes Wasser

Der pH-Wert der alkalischen Lösung wird mit der sauren Lösung auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt und mit einem Volumenteil entionisiertem Wasser verdünnt.

NaP-Puffer (40 mM, pH 6,2)**zur Herstellung von Verdünnungsreihen und zur Vorbehandlung von Release-Pads**

Alkalische Lösung:

0,568 g *di*-Natriumhydrogenphosphat
+ 50 mL entionisiertes Wasser

Saure Lösung:

0,560 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
+ 50 mL entionisiertes Wasser

Der pH-Wert der alkalischen Lösung wird mit der sauren Lösung auf einen pH-Wert von 6,2 eingestellt und mit einem Volumenteil entionisiertem Wasser verdünnt.

NaP-Puffer (40 mM, pH 7,2)

zur Herstellung von Verdünnungsreihen und zur Vorbehandlung von Release-Pads

Alkalische Lösung:

0,568 g *di*-Natriumhydrogenphosphat
+ 50 mL entionisiertes Wasser

Saure Lösung:

0,560 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
+ 50 mL entionisiertes Wasser

Der pH-Wert der alkalischen Lösung wird mit der sauren Lösung auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt und mit einem Volumenteil entionisiertem Wasser verdünnt.

NaP-Puffer (50 mM, pH 7,0) 150 mM NaCl

zur Linienapplikation und Release-Pad-Vorbehandlung

Alkalische Lösung:

0,710 g *di*-Natriumhydrogenphosphat
+ 1,753 g Natriumchlorid
+ 50 mL entionisiertes Wasser

Saure Lösung:

0,700 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
+ 1,753 g Natriumchlorid
+ 50 mL entionisiertes Wasser

Der pH-Wert der alkalischen Lösung wird mit der sauren Lösung auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt und mit einem Volumenteil entionisiertem Wasser verdünnt.

NaP-Puffer (100 mM, pH 8,0) 150 mM NaCl

zur Linienapplikation und Release-Pad-Vorbehandlung

Alkalische Lösung:

1,420 g *di*-Natriumhydrogenphosphat
+ 1,753 g Natriumchlorid
+ 50 mL entionisiertes Wasser

Saure Lösung:

- 1,400 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
- + 1,753 g Natriumchlorid
- + 50 mL entionisiertes Wasser

Der pH-Wert der alkalischen Lösung wird mit der sauren Lösung auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt und mit einem Volumenteil entionisiertem Wasser verdünnt.

PBS-Puffer (10 mM, pH = 7,4 ± 0,2)

Vorbehandlung von Release-Pads und zur Linienapplikation

- 1,440 g *di*-Natriumphosphat
- + 0,240 g Kaliumdihydrogenphosphat
- + 8,000 g Natriumchlorid
- + 0,200 g Kaliumchlorid
- + 1000 mL *Aqua bidest*

7.8 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
BoNT	Botulinum-Neurotoxin
BoNT/D	Botulinum-Neurotoxin Typ D
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
<i>C. botulinum</i>	<i>Clostridium-botulinum</i>
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CN	Cellulosenitrat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpi	dots per inch
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
etc.	et cetera
evtl.	Eventuell
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
ggf	gegebenenfalls
HA	Hämagglutinin
hCG	Humanes Choriongonadotropin
HRP	horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
IBT	Institut für angewandte Biotechnologie in den Tropen

IgG	Immunoglobulin G
IgY	Immunoglobulin Y
IU	International Unit
IVD	<i>In vitro</i> -Diagnostik
KhPhtH-Puffer	Kaliumhydrogenphthalat-Puffer
KP-Puffer	Kaliumphosphat-Puffer
LFD	Lateral-Flow-Device
LH	luteinisierendes Hormon
L-Kette	Leiche Kette
MCP	Magnetic Particle Concentrator
Min.	Minute
NAP	Neurotoxin-assoziierte-Proteine
NaP-Puffer	Natriumphosphat-Puffer
NSF	<i>N</i> -ethylmaleimide-sensitive fusion protein
NTHNH	Non-toxic non heamagglutinin
OD	Optische Dichte
PHA	passive haemagglutination assay
rel.	relativ
RGB	Rot, Grün, Blau
RIA	Radioimmunoassay
RT	Raumtemperatur
S-Kette	Schwere Kette
SNAP-25	synaptosomal associated protein, 25 kDa
Tab.	Tabelle
TIFF	Tagged Image File Format
Tris	(Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
VAMP	vesicle-associated membrane protein
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

7.9 Optimas 6.5[®] Quellcode

/*Definition der verwendeten Variablen */

Delete();

REAL PixelGroesse = 0; /* Enthält die Kantenlänge eines Pixels. */

REAL PixelFlaeche = 0; /* Enthält die Fläche eines Pixels. */
XUnterKante; /* Enthält den X-Wert der Streifen-Unterkante. */
YUnterKante; /* Enthält den Y-Wert der Streifen-Unterkante. */
XOberKante; /* Enthält den X-Wert der Streifen-Oberkante. */
YOberKante; /* Enthält den Y-Wert der Streifen-Oberkante. */
XMittel; /* Enthält den mittleren X-Wert des Streifens. */
YMittel; /* Enthält den mittleren Y-Wert des Streifens. */
XOberKanteGes; /* Enthält den X-Wert der ROI-Oberkante. */
XUnterKanteGes; /* Enthält den X-Wert der ROI-Unterkante. */
YOberKanteGes; /* Enthält den Y-Wert der ROI-Oberkante. */
YUnterKanteGes; /* Enthält den Y-Wert der ROI-Unterkante. */
XOberKanteRef; /* Enthält den X-Wert der Referenzbereich-Oberkante. */
XUnterKanteRef; /* Enthält den X-Wert der Referenzbereich-Unterkante. */
YOberKanteRef; /* Enthält den Y-Wert der Referenzbereich-Oberkante. */
YUnterKanteRef; /* Enthält den Y-Wert der Referenzbereich-Unterkante. */
XOberKanteMess; /* Enthält den X-Wert der Messbereich-Oberkante. */
XUnterKanteMess; /* Enthält den X-Wert der Messbereich-Unterkante. */
YOberKanteMess; /* Enthält den Y-Wert der Messbereich-Oberkante. */
YUnterKanteMess; /* Enthält den X-Wert der Messbereich-Unterkante. */
REAL MeanGrayRef = 0; /* Enthält den mittleren Grauwert des Referenzbereichs. */
REAL MeanGraySDRef = 0; /* Enthält die Standardabweichung des mittleren Grauwertes des Referenzbereichs. */
REAL PixelZahlRef = 0; /* Enthält die Pixelanzahl des Referenzbereichs. */
REAL GrayGesMess = 0; /* Enthält den Gesamt-Grauwert des Messbereichs. */
REAL GrayWert = 0; /* Enthält den Gesamtgrauwert eines bestimmten Grauwerts im Messbereich. */
REAL PixelZahlHist = 0; /* Enthält die Pixelanzahl eines bestimmten Grauwerts im Messbereich. */
REAL PixelZahlHistGes = 0; /* Enthält die Gesamtpixelanzahl der ausgewerteten Pixel im Messbereich. */
REAL OberGrenze = 0; /* Enthält die Obergrenze für die FOR-Schleife. */
LONG iT = 0; /* Enthält die Zähl-Variable für die FOR-Schleife. */
REAL MeanGrayMess = 0; /* Enthält den mittleren Grauwert des Messbereichs. */
REAL MeanGraySDMess = 0; /* Enthält die Standardabweichung des mittleren Grauwertes des Messbereichs. */
REAL PixelZahlMess = 0; /* Enthält die Gesamtpixelanzahl des Messbereichs. */
REAL PixelZahlDiff = 0; /* Enthält die Differenz aus Gesamtpixelanzahl und ausgewerteter Gesamtpixelanzahl im Messbereich. */
REAL GrayGesMess = 0; /* Enthält den Gesamtgrauwert im Messbereich. */
REAL MessFlaeche = 0; /* Enthält die Größe der Messfläche in mm². */
REAL GrayGesRef = 0; /* Enthält den maximalen Gesamtgrauwert im Messbereich. */
REAL GrayDiff = 0; /* Enthält die Differenz aus maximalem Gesamtgrauwert und Gesamtgrauwert im Messbereich. */
REAL GrayMittPix = 0; /* Enthält den mittleren Grauwert pro Pixel. */
REAL GrayMittFlaeche = 0; /* Enthält den mittleren Grauwert pro Fläche in mm². */
CHAR MeanGrayRefText; /* Umwandlung des entsprechenden Wertes in eine CHAR-Variable. */
CHAR MeanGraySDRefText; /* Umwandlung des entsprechenden Wertes in eine CHAR-Variable. */
CHAR PixelZahlRefText; /* Umwandlung des entsprechenden Wertes in eine CHAR-Variable. */
CHAR MeanGrayMessText; /* Umwandlung des entsprechenden Wertes in eine CHAR-Variable. */
CHAR MeanGraySDMessText; /* Umwandlung des entsprechenden Wertes in eine CHAR-Variable. */
CHAR PixelZahlMessText; /* Umwandlung des entsprechenden Wertes in eine CHAR-Variable. */
CHAR MessFlaecheText; /* Umwandlung des entsprechenden Wertes in eine CHAR-Variable. */
CHAR GrayGesRefText; /* Umwandlung des entsprechenden Wertes in eine CHAR-Variable. */
CHAR GrayGesMessText; /* Umwandlung des entsprechenden Wertes in eine CHAR-Variable. */
CHAR GrayDiffText; /* Umwandlung des entsprechenden Wertes in eine CHAR-Variable. */

```

CHAR GrayMittPixText; /* Umwandlung des entsprechenden Wertes in eine CHAR-Variable. */
CHAR GrayMittFlaecheText; /* Umwandlung des entsprechenden Wertes in eine CHAR-Variable. */

ClearScreen(); /* Sämtliche Messpunkte/aktive Bereiche im Bild werden gelöscht. */

/* Vorgaben werden eingegeben und berechnet. */
PixelGroesse = Prompt("Bitte geben Sie die Pixelgröße in cm ein","REAL"); /* Kantenlänge eines Pixels auf Basis der Kalibrierung wird vom User eingegeben */
PixelGroesse = PixelGroesse * 10; /* Umrechnung der Kantenlänge in mm */
PixelFlaeche = PixelGroesse * PixelGroesse; /* Berechnung der Pixelfläche in mm^2. */

/* Es werden die Referenzpunkte markiert, die zur Bestimmung der ROI dienen. */
MacroMessage("Bitte markieren Sie die untere rechte Ecke des Teststreifens.");
SetExport(PtPoints,1,TRUE); /* Export-Bedingungen für 1. Datenpunkt auf "To DDE" */
CreatePoints(); /* User markiert 1. Datenpunkt */
Extract(); /* Daten des markierten Punktes werden ermittelt */

/* X- und Y-Wert des Datenpunktes wird an Variable übergeben */
XUnterKante = PtPoints[0];
YUnterKante = PtPoints[1];

ClearScreen(); /* Sämtliche Messpunkte/aktive Bereiche im Bild werden gelöscht. */

MacroMessage("Bitte markieren Sie die rechte obere Ecke des Teststreifens.");
SetExport(PtPoints,1,TRUE); /* Export-Bedingungen für 2. Datenpunkt auf "To DDE" */
CreatePoints(); /* User markiert 2. Datenpunkt */
Extract(); /* Daten des markierten Punktes werden ermittelt */

/* X- und Y-Wert des Datenpunktes wird an Variable übergeben */
XOberKante = PtPoints[0];
YOberKante = PtPoints[1];

/* Es wird die Mitte der Unterkante bestimmt */
XMittel = ((XOberKante + XUnterKante)/2);
YMittel = ((YOberKante + YUnterKante)/2);

ClearScreen(); /* Sämtliche Messpunkte/aktive Bereiche im Bild werden gelöscht. */

/*Die Region Of Interest wird festgelegt */
XOberKanteGes = XMittel -1.500;
XUnterKanteGes = XMittel;
YOberKanteGes = YMittel +0.180;
YUnterKanteGes = YMittel -0.180;
SelectROI (XOberKanteGes : YOberKanteGes :: XUnterKanteGes : YUnterKanteGes);

/* Der Referenzbereich für das Hintergrundsignal wird festgelegt in cm. */
XOberKanteRef = XMittel -0.650;
XUnterKanteRef = XMittel -0.350;
YOberKanteRef = YOberKanteGes;

```

```

YUnterKanteRef = YUnterKanteGes;

/* Wertaufnahme aus dem Referenzbereich */
AreaCNVFactors[9:10] = 0:255; /* Die Vorbedingungen für die Wertaufnahme werden festgelegt. */
SetExport(ArHistogramStats,1,TRUE); /* Export der Histogramm-Statistiken wird auf "DDE" gesetzt. */
SetExport(ArPixelCounts,1,TRUE); /* Export des Pixel-Zählers wird auf "DDE" gesetzt. */
CreateArea(XOberKanteRef : YOberKanteRef :: XUnterKanteRef : YOberKanteRef :: XUnterKanteRef : YUnterKanteRef ::
XOberKanteRef : YUnterKanteRef :: XOberKanteRef : YOberKanteRef,NULL,NULL,NULL,3); /* Referenzbereich wird
festgelegt. */
if (Prompt("Wollen Sie die Referenzfläche noch verschieben?",2))
    {
        MoveObject(); /* Auf User-Eingabe kann der Referenzbereich verschoben werden. */
    }

/* Daten werden aus dem Referenzbereich extrahiert und Variablen zugewiesen. */
Extract();
MeanGrayRef = ArHistogramStats[0];
MeanGraySDF = ArHistogramStats[1];
PixelZahlRef = ArPixelCounts[0];

ClearScreen(); /* Sämtliche Messpunkte/aktive Bereiche im Bild werden gelöscht. */

/* Der Messbereich um die Capture Line wird festgelegt in cm. */
XOberKanteMess = XMittel-1.300;
XUnterKanteMess = XMittel-1.350;
YOberKanteMess = YOberKanteGes;
YUnterKanteMess = YUnterKanteGes;

/* Wertaufnahme aus dem Referenzbereich */
SetExport(ArHistogramStats,1,TRUE); /* set "To DDE" */
SetExport(ArHistogram,1,TRUE); /* set "To DDE" */
SetExport(ArPixelCounts,1,TRUE); /* set "To DDE" */
CreateArea(XOberKanteMess : YOberKanteMess :: XUnterKanteMess : YOberKanteMess :: XUnterKanteMess : YUnter-
KanteMess :: XOberKanteMess : YUnterKanteMess :: XOberKanteMess : YOberKanteMess,NULL,NULL,NULL,3);
if (Prompt("Wollen Sie die Messfläche noch verschieben?",2))
    {MoveObject();}

/* Daten werden aus dem Messbereich extrahiert und Variablen zugewiesen. */
Extract();
OberGrenze = MeanGrayRef +1;
for( iT = 0; iT < OberGrenze; ++iT)
    {
        PixelZahlHist = ArHistogram[iT];
        GrayWert = ArHistogram[iT] * iT;
        PixelZahlHistGes = PixelZahlHistGes + PixelZahlHist;
        GrayGesMess = GrayGesMess + GrayWert;
        GrayWert = 0;
        PixelZahlHist = 0;
    }

```

```

MeanGrayMess = ArHistogramStats[0];
MeanGraySDMess = ArHistogramStats[1];
PixelZahlMess = ArPixelCounts[0];

/* Diverse Messwerte werden berechnet. */
PixelZahlDiff = PixelZahlMess - PixelZahlHistGes;
GrayGesMess = GrayGesMess + (PixelZahlDiff * MeanGrayRef);
MessFlaeche = PixelZahlMess * PixelFlaeche;
GrayGesRef = PixelZahlMess * MeanGrayRef;
GrayDiff = GrayGesRef - GrayGesMess;
GrayMittPix = GrayDiff / PixelZahlMess;
GrayMittFlaeche = GrayDiff / MessFlaeche;

/* Die Messwerte werden den Textvariablen zugewiesen. */
MeanGrayRefText = "Mittlerer Hintergrund:\t" : ToText(MeanGrayRef) : "\n";
MeanGraySDRefText = "SD:\t" : ToText(MeanGraySDRef) : "\n";
PixelGroesseText = "PixelGroesse in mm:\t" : ToText(PixelGroesse) : "\n";
PixelZahlRefText = "Pixelzahl, Referenflaeche:\t" : ToText(PixelZahlRef) : "\n";
MeanGrayMessText = "Mittlere Intensitaet, Messbereich:\t" : ToText(MeanGrayMess) : "\n";
MeanGraySDMessText = "SD:\t" : ToText(MeanGraySDMess) : "\n";
PixelZahlMessText = "Pixelzahl, Messbereich:\t" : ToText(PixelZahlMess) : "\n";
MessFlaecheText = "Flaeche, Messbereich:\t" : ToText(MessFlaeche) : "\n";
GrayGesRefText = "Maximaler Gesamtgrauwert, Messbereich:\t" : ToText(GrayGesRef) : "\n";
GrayGesMessText = "Ausgewerteter Gesamtgrauwert, Messbereich:\t" : ToText(GrayGesMess) : "\n";
GrayDiffText = "Differenz:\t" : ToText(GrayDiff) : "\n";
GrayMittPixText = "Intensitaet pro Pixel:\t" : ToText(GrayMittPix) : "\n";
GrayMittFlaecheText = "Intensitaet pro /mm^2:\t" : ToText(GrayMittFlaeche) : "\n";

/* Ein Daten-File wird erzeugt und die Messwerte hineingeschrieben. */
fh = OpenFile ("f:/Timo/streifen.txt", 0x0002);
PositionFile (fh, 0L, 2);
WriteFile (fh, MeanGrayRefText : MeanGraySDRefText : PixelGroesseText : PixelZahlRefText : MeanGrayMessText :
MeanGraySDMessText : PixelZahlMessText : GrayGesRefText : GrayGesMessText : GrayDiffText : MessFlaecheText :
GrayMittPixText : GrayMittFlaecheText);
CloseFile (fh);

/* Endabfrage */
if (Prompt("Wollen Sie noch einen Streifen auswerten?",2))
    {
        RunMacro("timo01a.mac");
    }
else
    {MacroMessage("Fertig.");}

```

LEBENS LAUF

Name	Timo M. Klewitz geboren am 01/09/1973 in Gifhorn
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

09/1980-07/1984	Grundschule III, Walsrode; Grundschule Burhave
09/1984-06/1986	Orientierungsstufe Tossens; OS Birkenstrasse, Hannover
08/1986-06/1993	Gymnasium Wilhelm-Raabe-Schule mit Abitur, Hannover

Zivildienst

11/1993-01/1995	Henriettenstiftung, Hannover
-----------------	------------------------------

Hochschulausbildung

10/1994-11/2000	Studium der Chemie (Diplom) an der Universität Hannover
10/1998-03/1999	Auslandstudium am Imperial College, London/UK
11/2000	Diplom Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie/Biotechnologie der Universität Hannover bei Prof. Dr. Thomas Scheper, Thema: <i>„Proteinbindung an Diagnostikmembranen“</i>

Dissertation

11/2000	Beginn der Promotion am Institut für Technische Chemie/Biotechnologie der Universität Hannover bei Prof. Dr. Thomas Scheper
---------	---

Beruflicher Werdegang

04/2004	Produktentwickler PAUL HARTMANN AG, Heidenheim
---------	---