

Störeffekte bei Immunoassays

Molekulare Ursachen und Methoden zur Verbesserung

S. Glögger¹, P. Rauch¹

Bei allen Arten von Immunoassays kann der Nachweis des Analyten, also die Bindung von Analyt und Antikörper, durch Störeffekte gestört werden. Dies sind unerwünschte Bindungen, die zu fehlerhaften Messungen führen. Hierzu zählen unspezifische Bindungen, Kreuzreaktivitäten, Matrixeffekte, HAMAs aber auch Substanzen wie Rheumafaktoren und Lipide. Was verbirgt sich hinter diesen regelmäßig auftretenden Effekten und gibt es Möglichkeiten, dies zu minimieren oder zu vermeiden?



© mikedray/Shutterstock

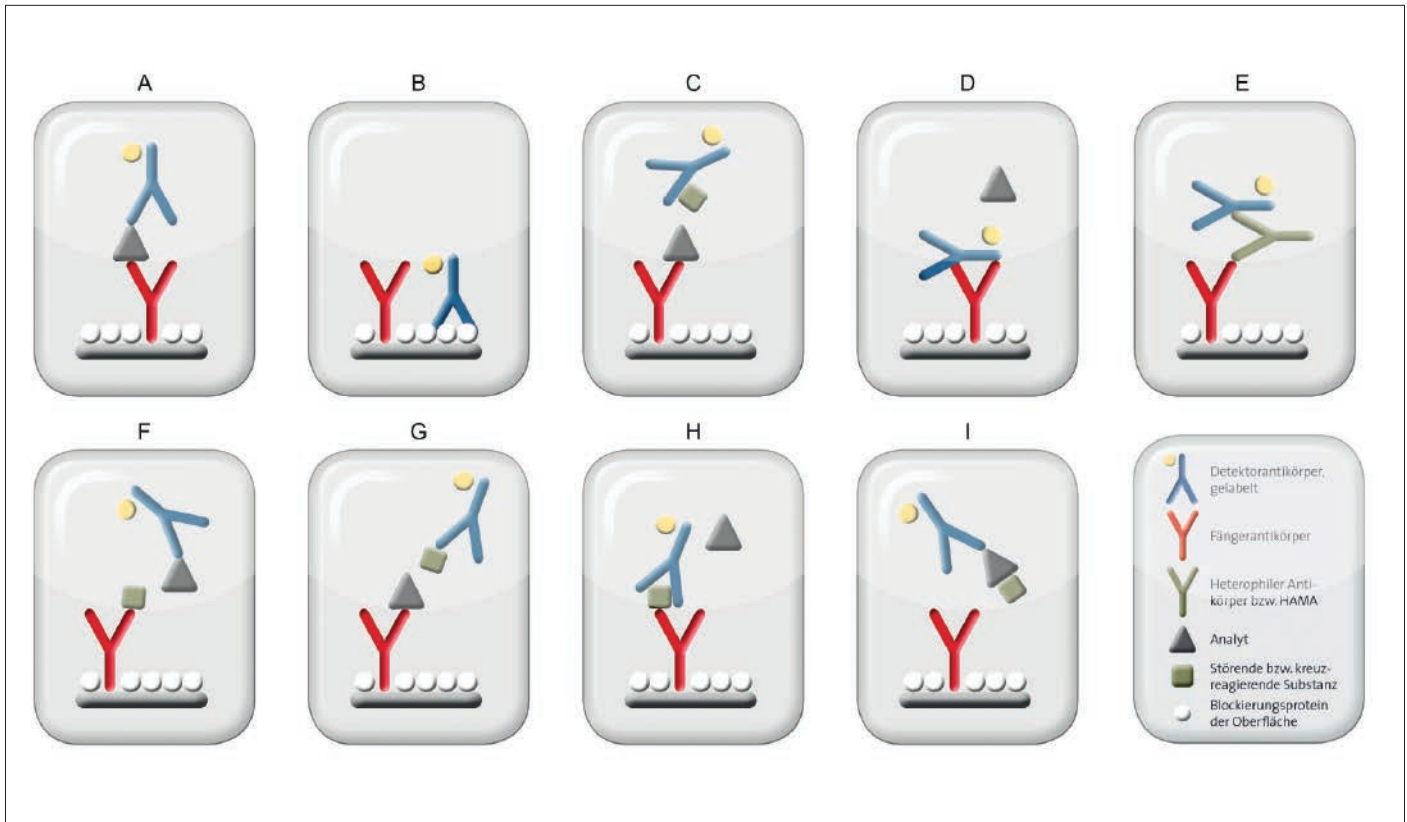


Abb.1: A: Idealer Assay. B: Unspezifische Bindung eines markierten Detektorantikörpers an eine blockierte Oberfläche. → falsch-positive Signale. C: Ein störendes Protein bindet an den Detektorantikörper und behindert sterisch die Bindung an den Analyten. → falsch-negative Signale. D: Der Fängerantikörper bindet den Detektorantikörper. → falsch-positive Signale. E: Eine Brückenbindung durch heterophile Antikörper bzw. HAMAs. → falsch-positive Signale. F: Kreuzreaktivität eines Störers mit dem Fängerantikörper. → falsch-negative Signale. G: Kreuzreaktivität eines Störers mit dem Detektorantikörper. → falsch-negative Signale. H: Kreuzreaktivität sowohl mit dem Fänger- als auch mit dem Detektorantikörper. → falsch-positive Signale. I: Maskierung des Analyten durch ein Protein der Probe. → falsch-negative Signale.

Wichtige Ursachen von Störeffekten

Immunoassay-Label und Assay Antikörper

Üblicherweise ist bei Immunoassays der Detektorantikörper – oder im Fall eines kompetitiven Assays der Analyt – mit einem Label (z.B. alkalische Phosphatase, Peroxidase, Fluoreszenzfarbstoff, radioaktive Isotope oder DNA) markiert. Bei Fluoreszenzfarbstoffen als Label besteht die Gefahr, dass die häufig hydrophoben Farbstoffe die Bindegenseigenschaften des Detektorantikörpers verändern, weil die Farbstoffe selbst unerwünschte Bindungen eingehen und die Löslichkeit des markierten Proteins herabsetzen. Zudem kann die Antigen-Antikörperbindung geschwächt werden [1]. Dies kann dazu führen, dass der gelabelte Antikörper verstärkt an Oberflächen (Abb. 1B), an Fremdprote-

ne der Realprobe (Abb. 1C) oder an den Fängerantikörper (Abb. 1D) bindet.

Kreuzreaktionen und unspezifische Bindungen

Eine Kreuzreaktion beschreibt die Bindung eines Antikörpers an andere Strukturen als den Zielanalyten (Abb. 1 F-H). Häufig kommt dieses bei strukturell oder sterisch ähnlichen Molekülen vor. Dies ist besonders kritisch bei kompetitiven Assays, in denen nur ein Antikörper eingesetzt wird [2, 3]. Bei diesen Assays sollte es immer Teil der Validierung sein, mögliche kreuzreagierende Substanzen zu identifizieren und deren Kreuzreaktivität experimentell zu quantifizieren [4]. Bei Realproben können die Antikörper auch an Abbauprodukte des Analyten oder an Proteine mit Sequenzähnlichkeiten binden. Nahe verwandt mit den Kreuz-

reaktivitäten sind die unspezifischen Bindungen. Hierbei erfolgt die Bindung an Substanzen, die entweder in weitaus höherer Konzentration als der Zielanalyt vorkommen (z.B. Albumine, Immunglobuline) oder an Oberflächen (z. B. ELISA wells, Western Blot Membranen) (Abb. 1 B+G).

Matrixeffekte

Als Matrixeffekte bezeichnet man die Summe der Störeffekte aller Komponenten, die in Proben vorkommen und die Bestimmung des Analyten verfälschen.

Störungen durch Chemikalien und Puffer

Durch pH-Wert der Probe, Salzstärke und Viskosität wird direkt die Bindung zwischen Analyt und Antikörper beeinflusst. Bei der Auswahl der Chemikalien für Diluents sollte also beachtet werden, ob bestimmte Substanzen

den Assay beeinflussen. Auch sollte bei der Verwendung einer Peroxidase als Label kein Natriumazid im Verdünnungspuffer enthalten sein, da dies durch Hemmung des Enzyms die Detektion verhindert.

Humane Anti-Animal-Antibodies (HAAA)

HAAAs sind wichtige Störer bei diagnostischen Immunoassays und bis zu 80% aller Patientenproben können – je nach Studie – HAAAs enthalten. Die Konzentrationen können hierbei im Bereich von einigen mg/ml liegen [5]. HAAAs werden als Immunantwort auf den Kontakt mit Immunglobulinen tierischen Ursprungs gebildet und können vom IgG-, IgA-, IgM- oder IgE-Typ sein. Humane Anti-Maus-Antikörper (HAMA) als bekannteste Vertreter dieser Gruppe bin-

den relativ spezifisch Maus-Antikörper. Sie stören deshalb immunologische Methoden, die mit Maus-Antikörpern arbeiten. Verantwortlich für deren Entstehung sind Antikörper-Medikamente, die aus monoklonalen Maus-Antikörpern oder deren Fragmenten bestehen. Auch der langjährige Umgang mit Haustieren sowie der Verzehr von rohem Fleisch führen zur Entstehung von HAAAs. Die HAAAs können entweder nur Antikörper bestimmter Spezies (z. B. Maus, Hund, Hamster, Kaninchen) binden oder artübergreifend verschiedene Antikörper mit unterschiedlichen Affinitäten erkennen und so Assays stören.

Heterophile Antikörper

Diese Antikörper können zusätzlich andere Antigene als das spezifische Antigen binden [6] und können ebenfalls vom IgG-, IgA-, IgM- oder IgE-Typ sein. Es sind sowohl Antikörper unbekannter immunologischer Entstehungsgeschichte als auch multispezifische Antikörper der frühen Immunantwort. Als störende Antikörper wirken sie ähnlich wie die oben beschriebenen HAAAs. Heterophile IgM-Antikörper beispielsweise kommen in Seren rheumatischer Patienten vor. Diese

„Rheumafaktoren“ binden an Fc-Abschnitte humaner Antikörper und auch artübergreifend an Fc-Abschnitte der im Assay verwendeten Antikörper. Daher verknüpfen rheumatische Seren Fänger- mit Detektorantikörpern mit der Folge von falsch-positiven Signalen (Abb. 1 E).

Endogene Bestandteile der Probe

Hierzu zählen natürlich vorkommende Proteine wie z.B. Albumine, Komplement, Lysozyme und Fibrinogen [3]. Niedermolekulare Analyte können an Albumin binden und somit die Zugänglichkeit des Antikörpers zum Analyten erschweren. Endogene Proteine können als Störer an die Assayantikörper binden (Abb. 1 C, F-H) oder den Zielanalyten für die Assayantikörper maskieren (Abb. 1 I). Häufiger Störfaktor sind stark lipidhaltige Proben, da manche Analyte gut fettlöslich sind bzw. die Antikörper-Analyt-Bindung durch Fette reduziert werden kann.

Vermeidung von Störeffekten

Mit heutigem Stand der Technik lassen sich solche Störungen minimieren. Voraussetzung ist eine gute Kenntnis der Störmechanismen und deren

unterschiedliche molekularen Ursachen, um somit die richtigen Optimierungsstrategien auszuwählen und einen zuverlässigen und robusten Assay zu erhalten. Folgende Möglichkeiten, die Gefahr von Störeffekten zu senken, bieten sich an: Durch eine Vorbehandlung der Proben mit Protein G oder Protein A (z.B. über Säulenchromatographie) können störende Antikörper entfernt werden. Eine andere Möglichkeit ist es, den Puffern hohe Konzentrationen an Immunglobulinen bzw. unspezifischen Seren zuzugeben (sogenannte HAMA-Blocker), um so heterophile Antikörper oder HAMAs abzufangen. Allen anderen Störungen kann damit aber nicht wirksam begegnet werden. Auch durch Verwendung von Fab- bzw. F(ab)₂-Fragmenten oder Antikörper-Chimären als Assay-Antikörper verringert sich die Wahrscheinlichkeit einer Störung durch heterophile oder Anti-Animal-Antibodies. Universeller einsetzbar auch ohne Untersuchung der molekularen Ursache der Störung sind spezielle Assay-Puffer, die gegen verschiedenste Störeffekte gleichzeitig wirksam sind, da sie nieder- und mittelaffine Bindungen unterdrücken und nur hochaffine Bindungen zulassen.

Fazit

Das Phänomen der Störeffekte bei Immunoassays ist so alt wie die Verwendung von Antikörpern für diagnostische und bioanalytische Zwecke. Im Laufe der Jahre konnten zahlreiche molekulare Ursachen und Störungsmechanismen aufgedeckt werden. Dies förderte die Entwicklung von Vermeidungsstrategien. So lassen sich heute viele Störeffekte verhindern bzw. minimieren und somit können fehlerhafte Messungen vermieden werden. Hierfür gibt es auch Lösungen, die unabhängig von der jeweiligen molekularen Ursache universell wirken.

Zugehörigkeit

¹Candor Bioscience GmbH, Wangen, Deutschland

KONTAKT |

Dr. Peter Rauch
Candor Bioscience GmbH
Wangen, Deutschland
p.rauch@candor-bioscience.de
www.candor-bioscience.de