

Enzymimmunoassay

Seit Vorstellung des ersten Radio-Immuno-Assay 1959 wurden, ausgehend vom Grundprinzip zahlreiche Variationen entwickelt. Allen EIA gemein ist die Antigen-Antikörperreaktion sowie die Koppelung mit einer enzymatisch verlaufenden Reaktion.

Ursprünglich wurden Antikörper mit Enzymen verbunden (markiert). Im weiteren Verlauf der technischen Entwicklung wurden auch Antigene mit Enzymen gekoppelt. Reagieren Antigen und Antikörper, so befindet sich an dem Ag-Ak-Komplex auch das zuvor gebundene Enzym (enzymmarkierter Ag-Ak-Komplex). Erhält das Enzym sein spezifisches Substrat, erzeugt es ein messbares Produkt. Dabei ändert sich entweder der Farbton oder das Enzym katalysiert unter Verwendung von NADH.



Einteilung der EIA

Zur Unterscheidung der anzutreffenden EIA eignen sich Konkurrenz und BF-Trennung (bound free). BF ist der Vermerk für einen Waschschritt. Bei Konkurrenzmethoden wird das Prinzip der Sättigungsanalyse genutzt. Homogene EIA benötigen keine BF-Trennung. Beim heterogenen Testprinzip ist der Waschschritt obligat. In der Praxis haben sich verschiedene Kombinationen aus Konkurrenz- und Nichtkonkurrenzmethoden sowie homogenes oder heterogenes als Testprinzip etabliert.

1. Kompetitive EIA

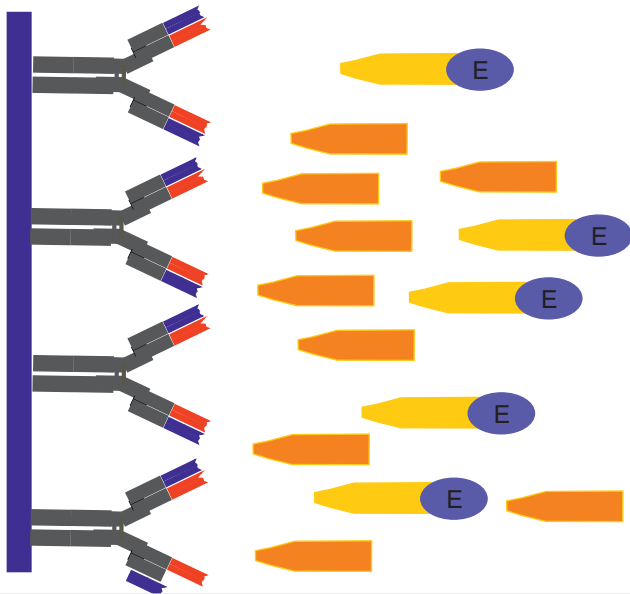
Das Prinzip beruht auf der Sättigungsanalyse. Es konkurrieren zwei Stoffe um die freie Bindungsstelle. Kompetitive EIA werden als Festphasenassay durchgeführt: Antikörper oder Antigen sind fest mit dem Reaktionsgefäß verankert und bieten ihre Bindungsstelle den Reaktionspartnern an. Um die Bindungsstelle konkurrieren der zu analysierende Stoff (Analyt) und der enzymmarkierte Stoff.

Je mehr vom zugegebenen markierten Stoff für die Sättigung benötigt wird, umso geringer ist die Menge des Analyten.

Enzymimmunoassay 2

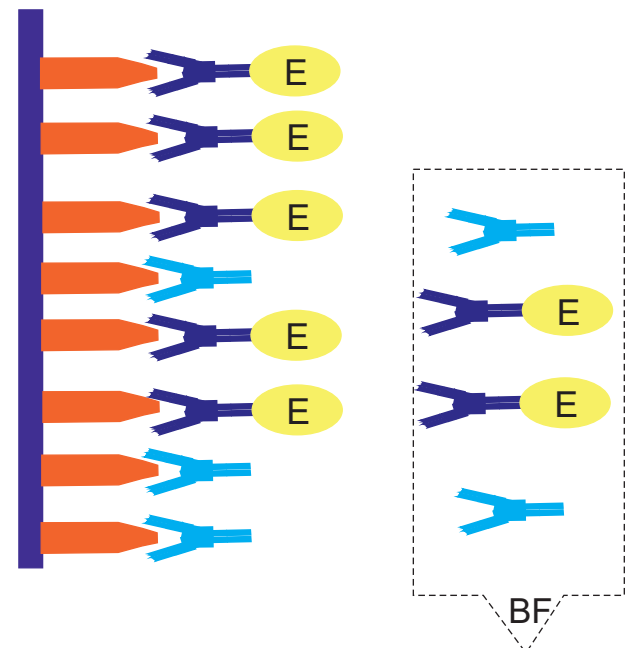
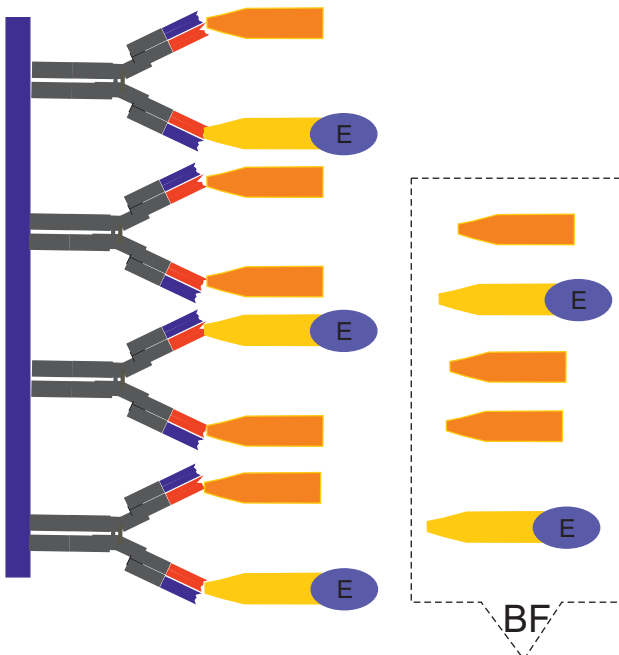
1.1 Ak-Festphasenassay

immobilisierte monoklonale Ak



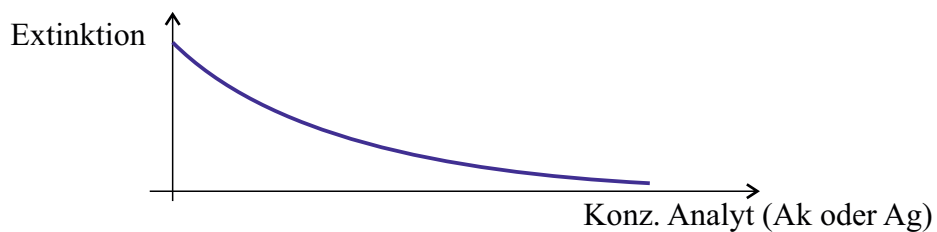
Ende der Reaktionszeit

Auswaschung der ungebundenen Reaktionspartner



Zugabe des Substrates für die enzymatische Reaktion

Das Messsignal ist um so stärker, je geringer die Konzentration des Analyten ist.



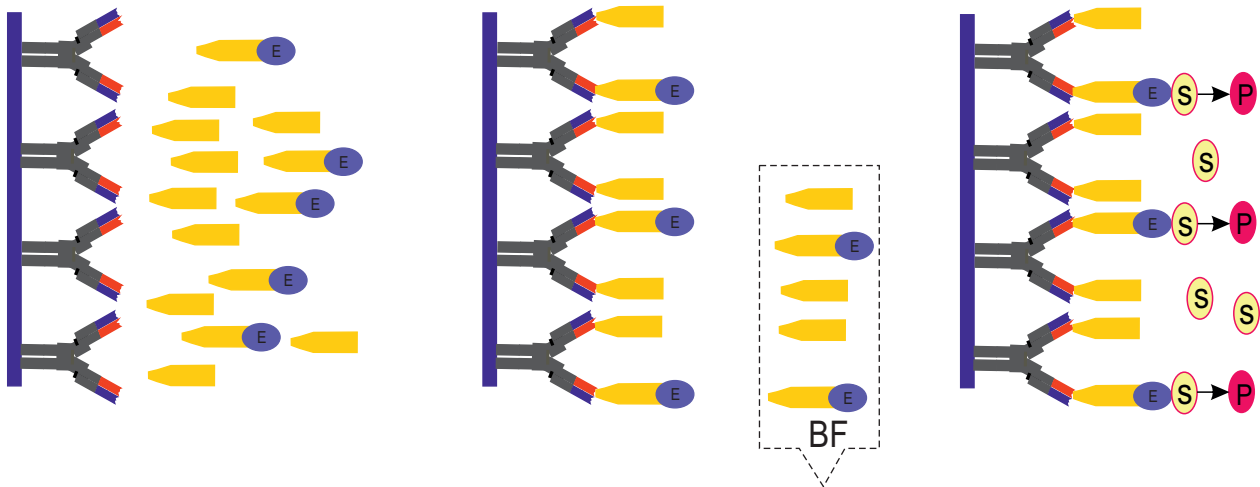
Enzymimmunoassay 3

Testprinzip

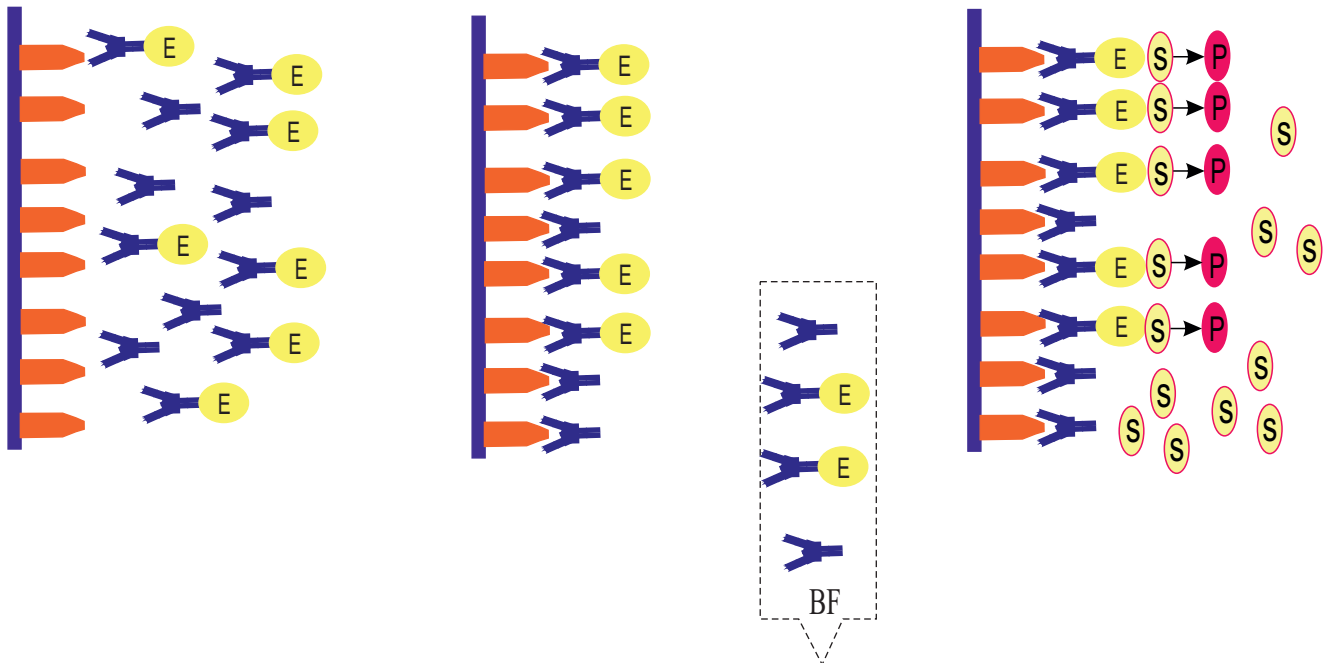
Bindungsreaktion (Affinitätsreaktion)

Auswaschen der Ungebundenen

Enzym-Substratreaktion



Um den gebundenen Antikörper konkurrieren beispielsweise die Proteine des Untersuchungsmaterials und die enzymmarkierten Proteine, welche zur Reaktion gegeben wurden. Die Konzentration der enzymmarkierten Proteine kann bekannt sein, muss aber nicht. Durch die Konkurrenz kommt es zu einer Proportionalität bei der Sättigung. Durch Vergleichsansätze wird die diagnostische Schnittstelle (cut off) bestimmt. Ist das gesuchte Protein in großer Zahl vorhanden, so können nur wenige enzymmarkierte Proteine binden und an der sich anschließenden Reaktion das Substrat umsetzen.



Um das gebundene Antigen konkurrieren die Antikörper aus dem Untersuchungsmaterial und die der Reaktion zugesetzten, mit Enzym markierten Antikörper. Ist die Konzentration im Untersuchungsmaterial gering, dann binden die markierten Antikörper in großer Zahl. Durch den Waschschrift werden alle nicht gebundenen Reaktionspartner entfernt. Je höher die Konzentration des Produktes (P), desto geringer ist die Konzentration des gesuchten Antikörpers.

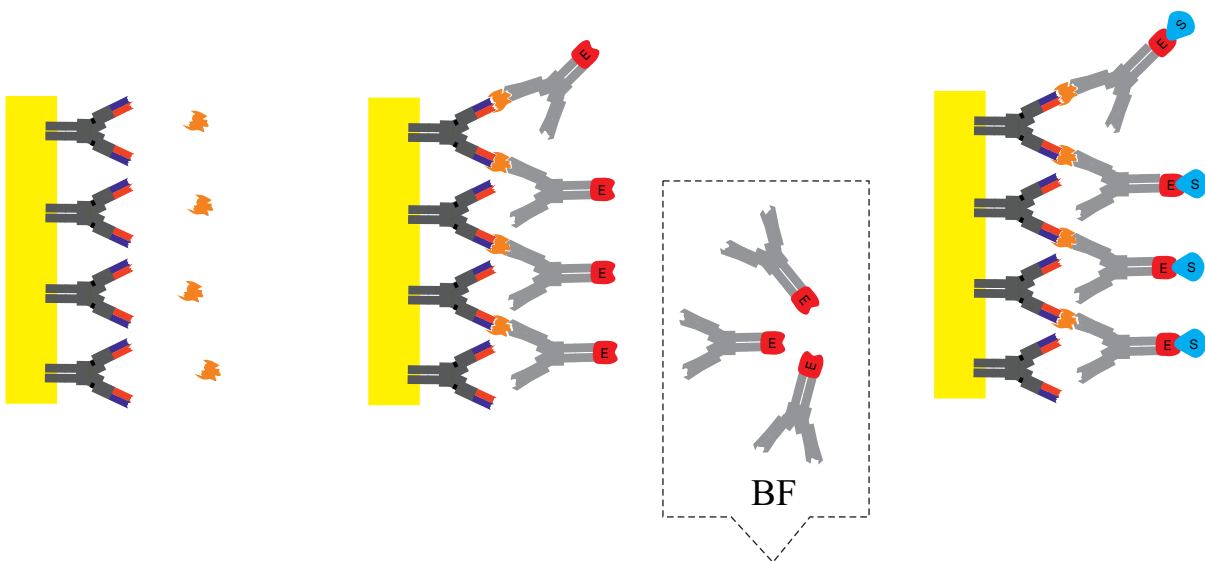
Enzymimmunoassay 4

2. Nichtkompetitive EIA

Zur Analyse wird ein Festphasenassay nach dem Sandwich-Prinzip verwendet. Der Analyt liegt in begrenzter Menge und der enzymmarkierte Reaktionspartner im Überschuss vor. Alle nicht an die feste Phase gebundenen Stoffe werden durch BF-Trennung entfernt. Der Test kann als direkter oder indirekter Sandwich stattfinden.

Direkter Sandwich

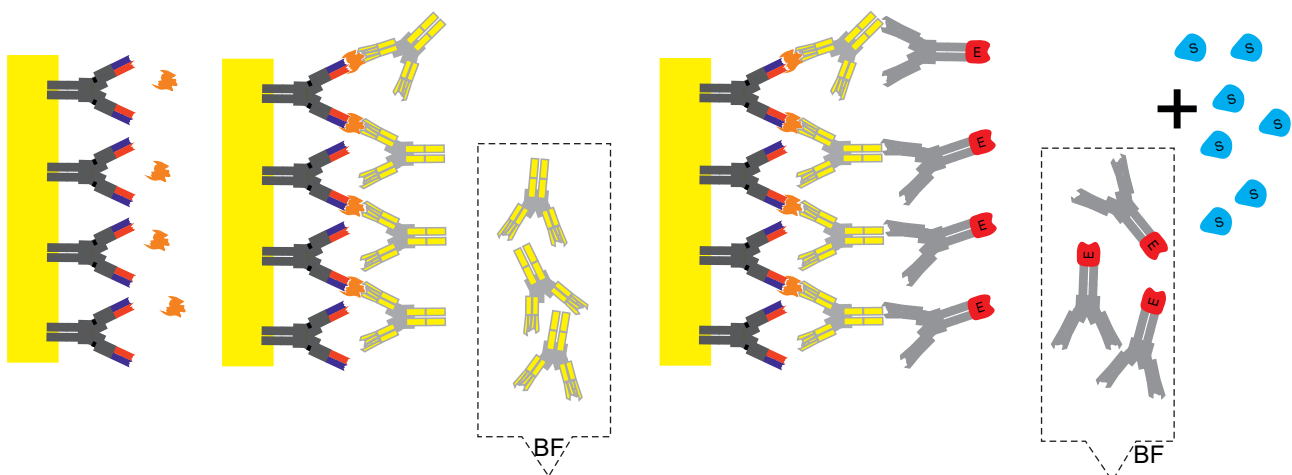
An die feste Phase gebundene Antikörper reagieren mit dem im Untersuchungsmaterial enthaltenen Analyten. Nach der Bindung des Analyten wird ein enzymmarkierter Antikörper zugegeben und anschließend die BF-Trennung durchgeführt. Durch Substratzugabe entsteht das ein Farbkomplex, der fotometrisch gemessen wird.



Theoretisch besteht die Möglichkeit, dass eine sehr hohe Analytkonzentration zur Sättigung der Festphasenantikörper führt. In diesem Fall wird der maximale Substratumsatz erzielt.

Indirekter Sandwich

Beim indirekten Sandwich kann der enzymmarkierte Antikörper nicht direkt mit dem gebundenen Antigen reagieren. Aus diesem Grund wird ein weiterer Antikörper (Hilfsantikörper) eingesetzt. Er stellt die Bindung mit dem enzymmarkierten Antikörper her. Der Hilfsantikörper erfordert eine weitere BF-Trennung.

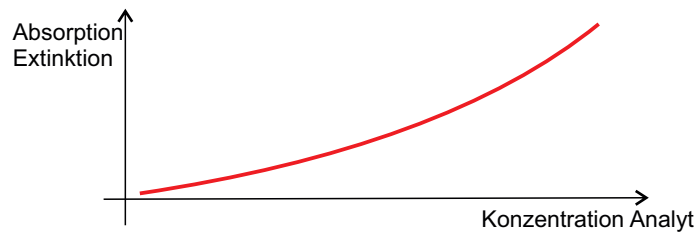


Hinweis: Nur das am Enzym gebundene Substrat wird zum Farbkomplex umgesetzt.

Enzymimmunoassay 5

Direkter und indirekter Sandwich finden Anwendung für Nachweis (ja/nein) sowie der Titerbestimmung in der Protein- und Virusdiagnostik.

Bei beiden Testprinzipien besteht eine direkte Proportionalität zwischen der Intensität des gebildeten Farbkomplexes und der Konzentration des Analyten.



Vorteile nichtkompetitiver EIA gegenüber kompetitiven EIA

Die Empfindlichkeit ist höher, weil alle Antikörperbindungsstellen dem Analyten zur Verfügung stehen.

Wegen der höheren Empfindlichkeit ist der Messbereich größer.

Die Testdauer ist kürzer, weil der Überschuss der Reaktionspartner größer ist.

Durch Verwendung von zwei Antikörpern ist die Spezifität höher.

Volumenfehler wirken sich durch die höhere Spezifität und Empfindlichkeit wenig störend aus.

3. Homogene EIA

Das Merkmal homogener EIA ist, dass es keine BF-Trennung gibt. Das Ausbleiben von Waschschritten ermöglicht einen hohen Grad an Automatisierung und verringert die Analysezeit. In der Praxis haben sich homogene EIA in der Analytik von Toxinen, Medikamenten und Drogen etabliert.

Homogene EIA können als Konkurrenzmethode aber auch nichtkompetitiv verlaufen. Häufiger ist jedoch die kompetitive Methode anzutreffen.

Beispiele für homogene EIA sind: **EMIT** enzym-multiplied-immunoassay-technique

SLEIA substrat-labelled-immunoassay

PGLIA prosthetic-group-labelled-immunoassay

EII enzyme-inhibitor-immunoassay

Enzymimmunoassay 6

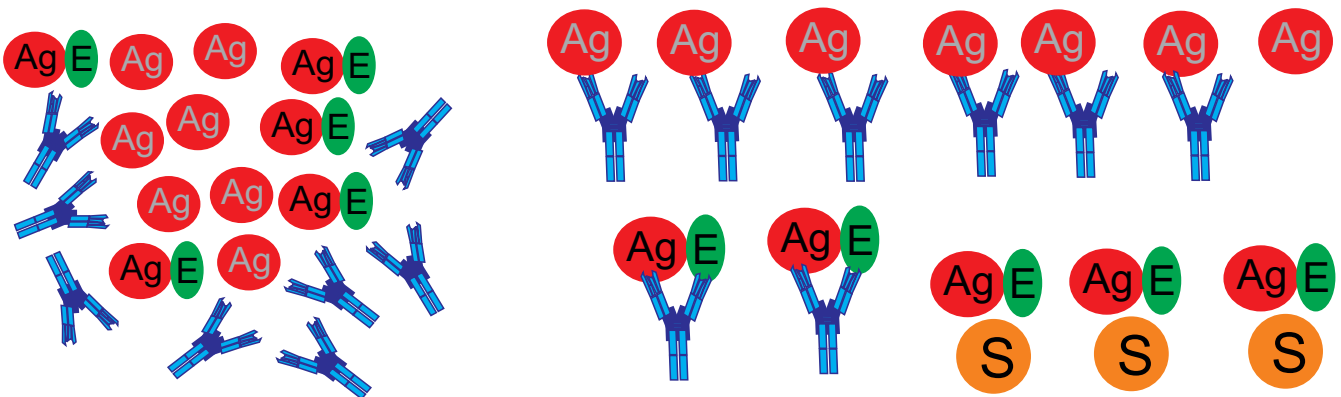
Homogene EIA

Unter homogenen EIAs werden alle technischen Varianten erfasst, bei denen eine BF-Trennung nicht notwendig ist. Das Einsparen der Waschschrirte ist nur dann möglich, wenn durch die Bindung zwischen Antigen und Antikörper das Messsignal verändert wird. Alle Reaktionspartner befinden sich homogen verteilt im Reaktionsgefäß und stören den Reaktionsverlauf nicht. Die verschiedenen Partner reagieren entsprechend ihrer Spezifität miteinander.

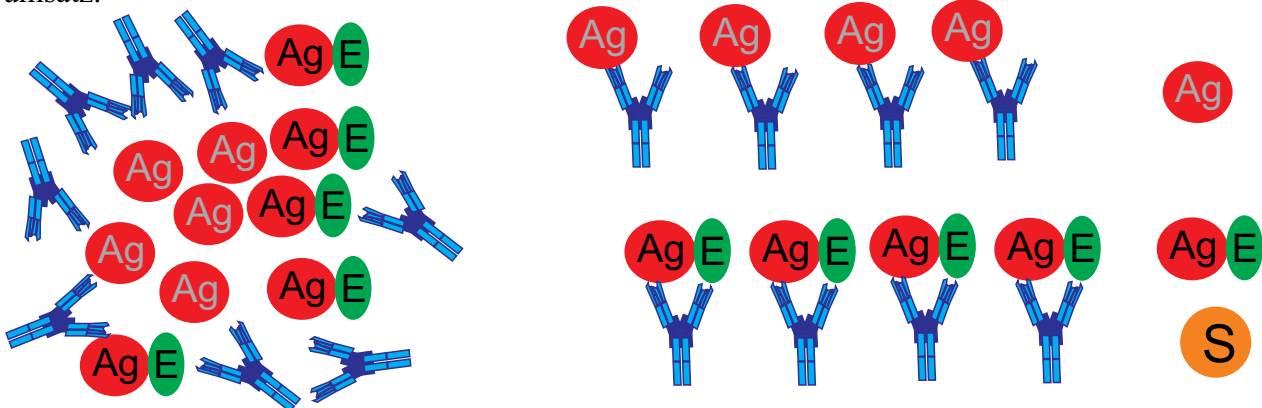
Die meisten homogenen EIAs verlaufen als Konkurrenzmethode und finden in der Toxikologie Anwendung. In der Praxis werden Medikamente und Drogen durch homogene EIAs analysiert, weil sich die Tests gut automatisieren lassen. Um den Antikörper konkurrieren beispielsweise das Medikament aus dem Untersuchungsmaterial und das zugegebene enzymmarkierte Medikament. Nachstehend werden ausgewählte Methoden dargelegt.

EMIT enzyme-multiplied-immunoassay-technique

Diese Technik findet eine breite Anwendung in der Diagnostik von Drogen und der Kontrolle von Medikamenten. Alle am Test beteiligten Stoffe liegen frei im Untersuchungsraum vor. Da keine feste Phase vorhanden ist, sind BF-Trennungen nicht nötig. Um den im Test wirkenden Antikörper konkurrieren der Analyt aus der Probe und der enzymmarkierte Analyt. Die Bindung des Antikörpers inaktiviert das Enzym und es kann das Substrat nicht umsetzen.



Sieben Analyten und fünf enzymmarkierte Analyten konkurrieren nach dem Prinzip der Sättigungsanalyse um acht Antikörper. Je höher die Anzahl der Analyten ist, desto intensiver ist der enzymatische Substratumsatz.

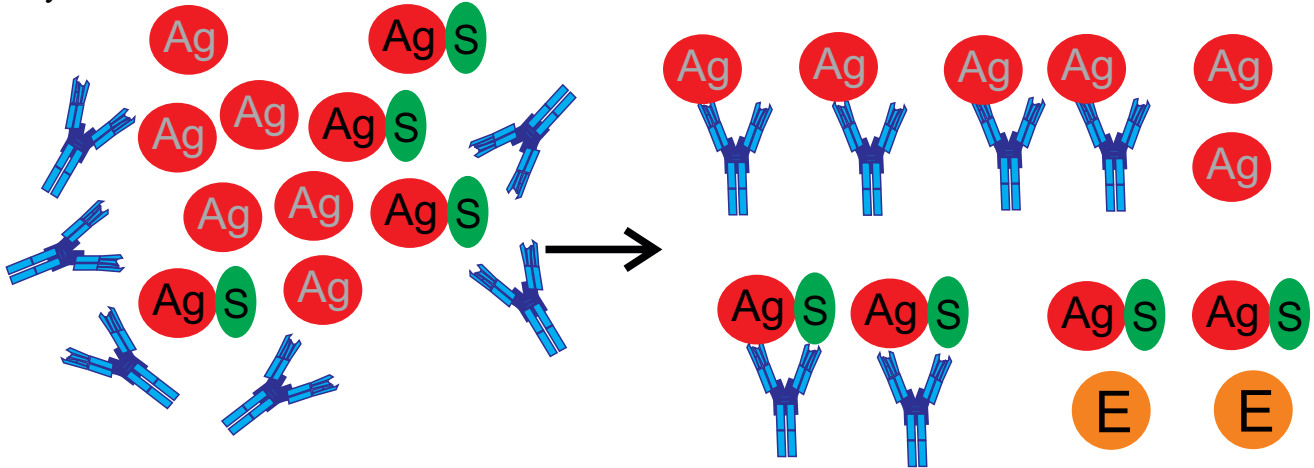


Fünf Analyten und fünf enzymmarkierte Analyten konkurrieren um acht Antikörper. Je geringer der Analyt (Medikament) in der Probe, desto geringer ist der enzymatische Substratumsatz.

Enzymimmunoassay 7

SLEIA substrat-labelled-immunoassay

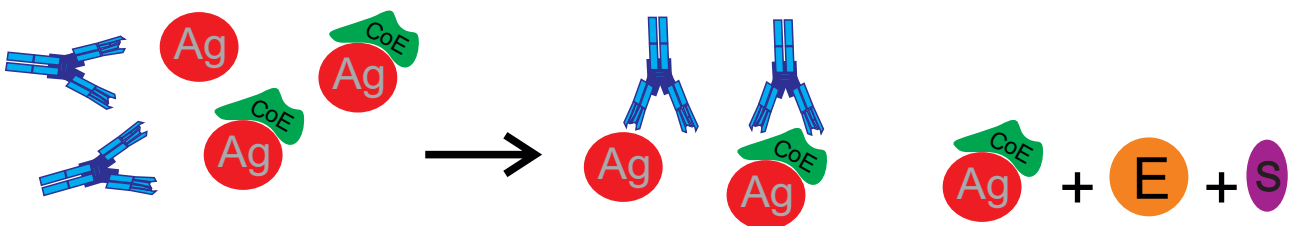
Diese Technik findet eine breite Anwendung in der Diagnostik von Drogen und der Kontrolle von Medikamenten. Alle am Test beteiligten Stoffe liegen frei im Untersuchungsraum vor. Da keine feste Phase vorhanden ist, sind BF-Trennungen nicht nötig. Um den Antikörper konkurrieren der Analyt aus der Probe und der substratmarkierte Analyt. Die Bindung des Antikörpers inaktiviert das Substrat und es kann vom Enzym nicht umgesetzt.



Sechs Analyten und vier substratmarkierte Analyten konkurrieren nach dem Prinzip der Sättigungsanalyse um sechs Antikörper. Es besteht eine direkte Proportionalität: Je höher die Anzahl der Analyten, desto intensiver ist der enzymatische Substratumsatz.

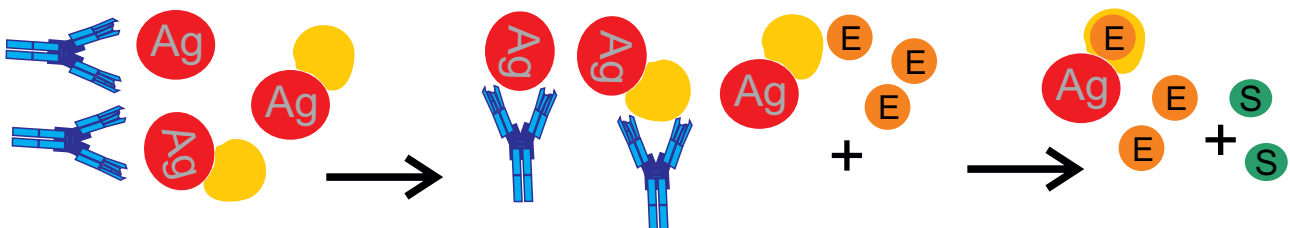
PGLIA prosthetik-group-labelled-immunoassay

Der Analyt der Probe und der zugesetzte Analyt konkurrieren um die Bindungsstelle des Antikörpers. Der zugesetzte Analyt enthält das für die enzymatische Reaktion benötigte Co-Enzym (prosthetische Gruppe). Durch Bindung mit dem Antikörper wird das Co-Enzym blockiert. Es besteht eine direkte Proportionalität zwischen der Konzentration des gesuchten Analyten der durch Enzymaktivität erzielten Extinktion.



EII enzyme-inhibitor-immunoassay

Der Analyt der Probe und der zugesetzte Analyt konkurrieren um die Bindungsstelle des Antikörpers. Der zugesetzte Analyt besitzt einen Inhibitor, der vom Antikörper blockiert wird. Es besteht eine indirekte Proportionalität zwischen der Konzentration des gesuchten Analyten und der enzymatisch erzeugten Extinktion. Ist das Untersuchungsmaterial frei an gesuchten Analyten, so werden die Fänger-moleküle blockiert und der Anteil des freien Enzyms ist hoch.



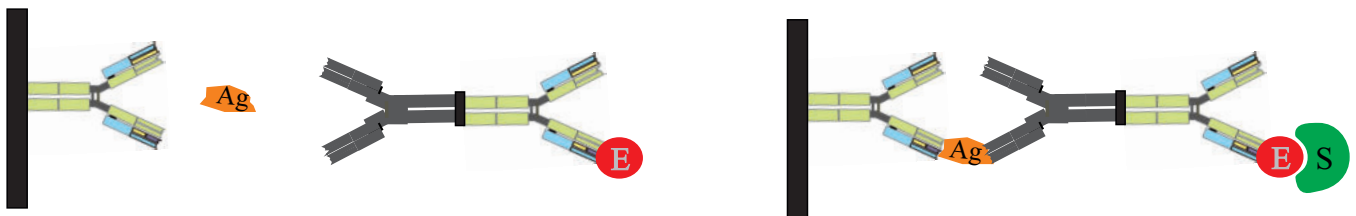
4. Heterogene EIA

Das Merkmal eines heterogenen EIA ist die BF-Trennung. Die bereits dargelegten Sandwich-Methoden gehören zu den heterogenen EIA. Die Chimärtechnik und die Verwendung bispezifischer Antikörper sind gleichfalls heterogene EIAs.

Als ELISA werden Festphasenassays bezeichnet, die der Antikörperbestimmung dienen. Unter den ELISAs gibt es verschiedene Techniken. Dazu gehören neben der Sandwichtechnik die Brückenantikörpertechnik und der kompetitive ELISA.

Chimärtechnik

Der Begriff des Mischwesens ist der griechischen Mythologie entlehnt und bezeichnet einen technisch erzeugten Verbund zweier verschiedener Antikörper über deren konstanten Enden. Es besteht eine enge Beziehung zum indirekten Sandwich. Die konstruierte Chimäre hilft eine BF-Trennung einzusparen, sodass nur nach Zugabe des Antigens und nach dem Binden der Chimäre BF-Trennungen erfolgen.



Bispezifischer Antikörper

Der bispezifische Antikörper wird aus zwei verschiedenen Antikörpern hergestellt. Eine schwere und leichte Kette stammen beispielsweise von einem Mausantikörper und die andere Hälfte von einem humanen Antikörper. Das technische Produkt verfügt über zwei verschiedene variable Enden und kann bispezifisch binden. Durch die Konstruktion wird der Test um eine BF-Trennung kurzer.



ELISA-Techniken

ELISA steht für enzyme-linked-immunosorbend-assay. Es sind Festphasenassays zur Antikörperdiagnostik. Das Antigen ist an eine feste Phase gebunden. Die BF-Trennung ist obligat. Zu den ELISA-Techniken gehören:

Sandwich-Technik

Kompetitiver ELISA

Brückenantikörper

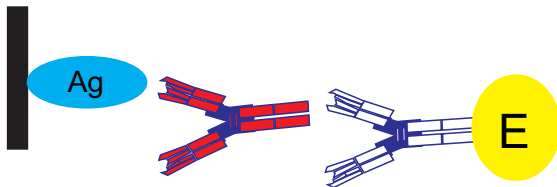
Wie bei den EIAs (Festphasenassays mit gebundenen Antikörpern zum Nachweis von Antigenen) gibt es bei den ELISAs die direkte und indirekte Variante.

Enzymimmunoassay 9

ELISA-Techniken

Sandwich-Technik (Antiglobulintest)

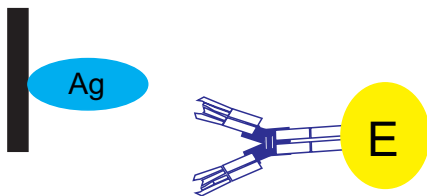
Gebundenes Antigen + gesuchter Antikörper + enzymmarkierter Antikörper (zwei BF-Trennungen).



Direkt proportional verlaufender Test.

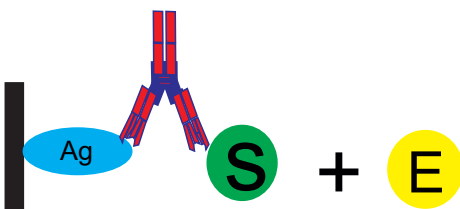
Kompetitiver ELISA

Gesuchter und enzymmarkierter Antikörper konkurrieren um das immobilisierte Antigen. Es ist nur eine BF-Trennung nötig, bei indirekt bestehender Proportionalität. Je stärker die Konzentration des gesuchten Antikörpers, desto geringer die Extinktion.



Brückenantikörper ELISA

Der gesuchte Antikörper bindet bivalent. Nach seiner Zugabe zum gebundenen Antigen erfolgt das Substrat mit anschließender BF-Trennung. Der Test verläuft direkt proportional.



Vor- und Nachteile homogener EIA zu heterogenen EIA

Vorteile: kurze Reaktionszeiten und hoher Probendurchsatz

Die automatisierte Analytik ist einfacher, weil die Waschschrte nicht nötig sind.

Nachteile: höhere Störanfälligkeit

- Störung durch endogene Enzyme wie Peroxidase und Katalase
- Störung durch inhibitorische Stoffe wie freies Hämoglobin oder Medikamente

geringere Empfindlichkeit

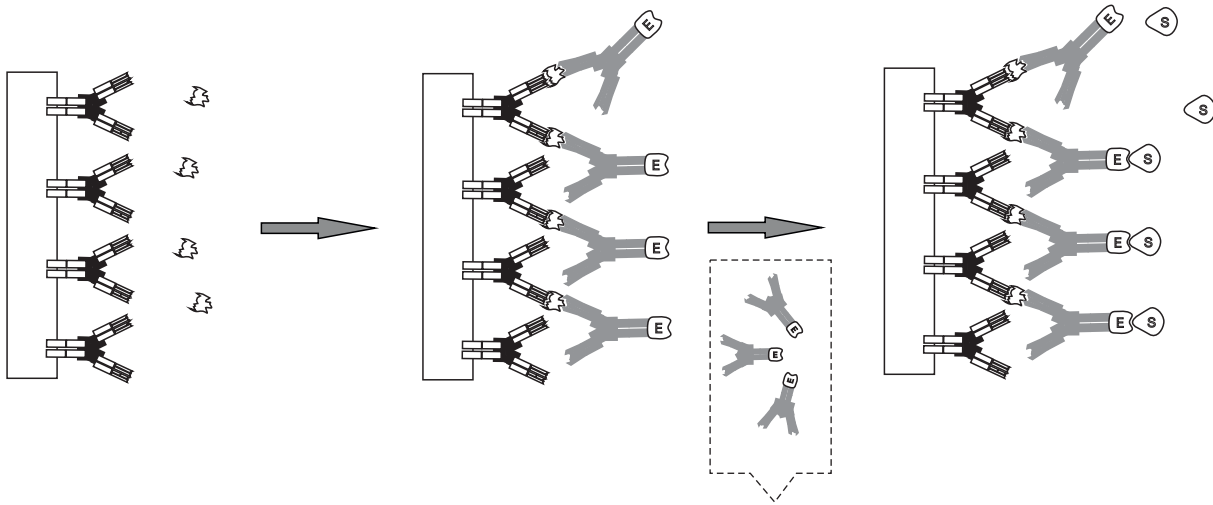
Die Minimierung der Störfaktoren erfordert stärkere Verdünnungen.

begrenzte Auswahl an Enzymen

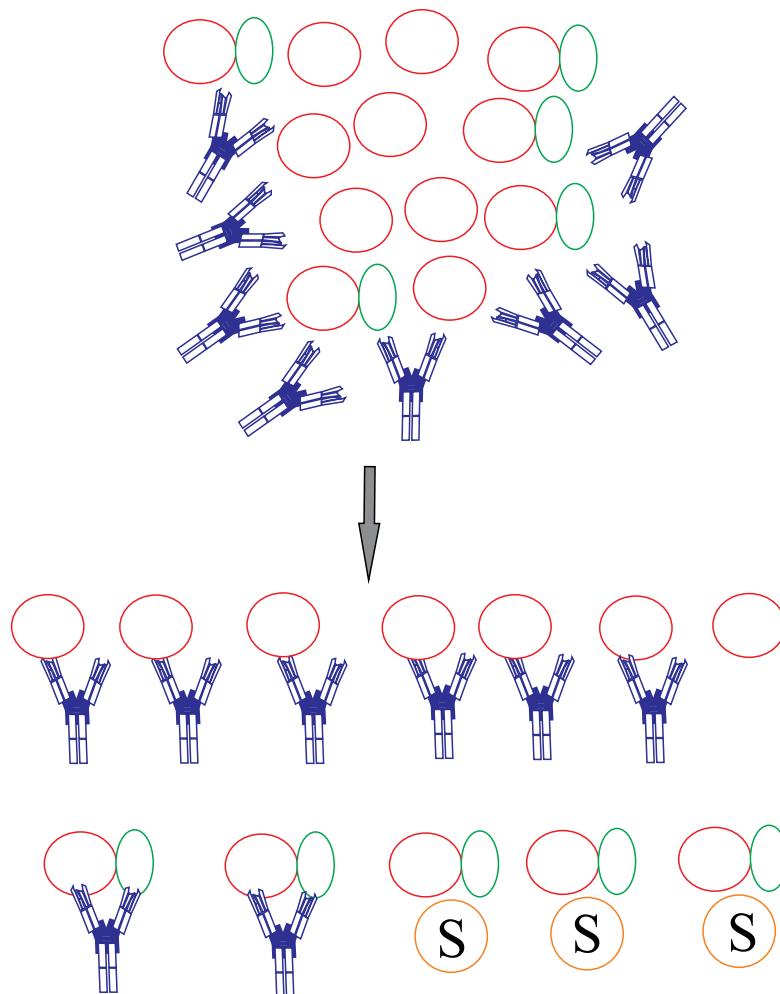
Es können nur Enzyme verwendet werden, die nicht im Untersuchungsmaterial enthalten sind.

Enzymimmunoassay 2

Was für ein EIA ist hier dargestellt? Ist es eine Konkurrenzsmethode? Welche Proportionalität besteht?



Was für ein EIA ist hier dargestellt? Ist es eine Konkurrenzsmethode? Welche Proportionalität besteht?



Enzymimmunoassay 2

Welcher EIA ist hier dargestellt? Besteht eine Konkurrenz? Welche Proportionalität besteht?

