

Bachelorabschlussarbeit

Weiterentwicklung und Optimierung des Präzisionsapplikators zur Herstellung des Immunblot-Assays EUROTIDE

vorgelegt von

Ekaterina Hoffmann

im Rahmen des Studiengangs

Biomedizintechnik

der Fachhochschule Lübeck

während einer Beschäftigung bei

EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck

EUROIMMUN



Erstprüfer: Prof. Dr. rer. nat. Dipl.-Chem. Tillmann Schmelter
Fachbereich Angewandte Naturwissenschaften
Fachhochschule Lübeck

Zweitprüferin: Linda Schönfeld, M. Sc. (Molecular Life Science)
Abteilung Blot-Techniken
EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG

Datum der Abgabe der Arbeit: 26.06.2015

Datum der mündlichen Prüfung: 30.06.2015

Zusammenfassung

Die EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG entwickelt, produziert und vertreibt zahlreiche immunologische Reagenzien zum Nachweis spezifischer Antikörper in Serum, Plasma oder Liquor von Patienten. Der Antikörpernachweis ist ein wesentlicher Bestandteil der Diagnose von Autoimmun- und Infektionserkrankungen sowie Allergien.

Das neu entwickelte EUROTIDE-System kann für die membranbasierte, vollautomatische und multiparametrische Antikörperanalyse unter Nutzung der anerkannten EUROLineScan-Auswertesoftware eingesetzt werden. Die Herstellung dieses miniaturisierten Immunblot-Assays erfordert das linienförmige Auftragen biochemisch charakterisierter Antigene mit Hilfe eines Präzisionsapplikators [PA] auf eine Blot-Membran. Die für diesen Zweck gewünschte Miniaturisierung erfordert im Vergleich zu herkömmlichen Systemen den Einsatz von Beschichtungskapillaren mit einem deutlich kleineren Innendurchmesser: Sechs Antigenlinien sollen eng nebeneinander aufgetragen werden, ohne dass sie ineinander verlaufen. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, die für Verunreinigungen anfälligen Kanäle frei von partikulären Ablagerungen zu halten.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die technische Weiterentwicklung der Kapillarhalterung sowie den neuartigen Einsatz von Filtrationseinheiten im Schlauchsystem zur Verhinderung von Ablagerungen während der Applikationsvorgänge mit dem PA.

Die platzsparende Montage von sechs Kapillaren erforderte die Konstruktion und Erprobung eines neuen Dispensierkopfes, der die dicht nebeneinander liegenden Antigenlinien exakt positioniert. Darüber hinaus sollte sichergestellt werden, dass sich die nebeneinander liegenden Kanäle nicht gegenseitig beeinflussen und die aufgetragenen Antigenlösungen nicht ineinander verlaufen. Final wurde eine Kapillarhalterung aus drei Bauteilen ausgewählt. In jedem Bauteil befinden sich jeweils zwei Kapillaren im Abstand von 2,4 mm voneinander. Zur Verwirklichung positionsgenau ausgerichteter Antigenlinien, war es erforderlich, die Vorbiegung der zur Applikation notwendigen Kunststoff-Kapillaren vor der Montage durch Tempern zu begradigen. Außerdem wurden die kapillarführenden Einheiten mit Einstellschrauben ausgestattet, die eine nachträgliche Korrektur des Abstandes zwischen den austretenden Kapillarspitzen ermöglichen. Durch diese Maßnahmen konnte das Auftragen sechs präzise positionierter Antigenlinien umgesetzt werden, die einen Abstand von 0,8 mm zueinander aufweisen.

Zur Verhinderung von Ablagerungen im PA wurden Filter eingesetzt. Deren Einfluss aufgrund unterschiedlicher Bauformen, Materialien, Materialstärken, Porengrößen, Totvolumina und Proteinadsorptionsraten auf die Qualität der applizierten Linien wurde exemplarisch mit ausgewählten Antigenlösungen in verschiedenen Verdünnungen untersucht. Als Maß für die Qualität und Reaktivität der Antigenlinien wurden Inkubationen mit positiven und negativen Patientenproben herangezogen.

Anhand von Probeschichtungen wurde ein Filtrationssystem, bestehend aus Vor- und Schutzfilter, validiert. Die Vorfiltration mit einem Spritzenfilter aus Polypropylen diente dabei der Prävention von Verunreinigungen im PA. Zusätzlich wurden Schutzfilter mit Edelstahl-Filterscheiben eingesetzt. Abschließend erfolgte die Verifizierung des ausgewählten Filtrationssystems auf Grundlage je eines hochrelevanten Beispielantigens aus der Infektionsserologie (Borrelien-Antigen VlsE) und aus der Autoantikörper-Serologie (SS-A: Sjögren-Syndrom-Antigen A). Die während dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse und Erkenntnisse bilden die Grundlage einer rationellen und effizienten Fertigung von Membranchips für EUROTIDE-basierte Immunblot-Assays.

Abstract

EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG develops, produces and distributes numerous immunological reagents for the detection of specific antibodies in patients' serum, plasma or CSF (cerebrospinal fluid). The determination of antibodies is an essential element in the diagnosis of autoimmune disorders, infectious diseases or allergies.

The newly developed EUROTIDE system can be applied for membrane-based, fully automated and multi-parametric antibody analysis by using the approved EUROLineScan evaluation software. The production of this miniaturized immunoblot assay requires linear application of biochemically characterized antigens by using a precision applicator [PA] on a blot membrane. The miniaturization which is necessary for this purpose requires the application of capillaries with a significantly smaller inner diameter than those from conventional systems: six antigen lines should be applied closely next to each other without blending. From this follows the necessity of keeping the channels, which are prone to pollute, free of particulate deposits.

The present thesis describes the technical enhancements of a capillary-operated exemption unit as well as the novel use of filtration units in a pipe system in order to avoid the formation of sediments during the application by PA.

The space-saving installation of six capillaries requires the construction and trial of a new exemption unit which positions the aligned antigen lines exactly. Moreover, it needs to be ensured that the closely spaced antigen lines do not interfere with one another so that the antigens do not blend. Finally, a capillary mount was chosen which contains three units with two capillaries each, spaced with gaps of 2.4 mm. For implementation of the precisely positioned antigen lines it was required to straighten the bent synthetic capillaries, which are needed for the application, by malleablizing of the materials before assembly. Furthermore, the capillary-leading units were provided with adjusting screws to enable supplementary corrections of the distance of the protruding capillary tips. By this procedure, the application of six precisely positioned antigen lines with gaps of 0.8 mm in a single application procedure could be achieved.

To prevent formation of sediments in the PA, filters were inserted. Their influence on the quality of the applied antigen lines due to different designs, materials, material strengths, pore sizes, dead volumes and protein absorption rates was investigated using selected antigen solutions in different dilutions. To rate the quality and reactivity of the antigen lines, positive and negative patient specimens were incubated.

By means of exemplary coatings, a filtration system consisting of pre-filter and protective filter was validated. The pre-filtration by a syringe filter made of polypropylene served to prevent impurities in the PA. In addition, protective filters with filter discs made of stainless steel were inserted. Finally, the selected filtration system was verified based on a highly-relevant example antigen from the areas of infection serology (*Borrelia* antigen VlsE) and autoantibody serology (Sjögren's syndrome antigen SS-A). The results obtained during this thesis constitute the basis of a rational and efficient production of the membrane chips for EUROTIDE immunoblot assays.