
4 Labormethoden

4.1 Konventionelle Testverfahren

4.1.1 TSH-Bestimmung

Das aus einem Probenstanzling herausgelöste schilddrüsenstimulierende Hormon TSH wird in einem Immunoassay mit der direkten Sandwich-Technik bestimmt (Abbildung 6). Hierbei werden zwei (aus Mäusen gewonnene) Antikörper benutzt, die an zwei unterschiedliche Orte des TSH-Moleküls binden. Ein Antikörper trägt den detektierbaren Marker Europium, der zweite Antikörper ist am Reaktionsgefäß fixiert und dient zur Abtrennung der Immunkomplexe aus der Reaktionslösung. Nach Entfernen der überschüssigen freien Europium-markierten Antikörper wird mit einer zweiten Reaktionslösung das gebundene Europium aus den Immunkomplexen herausgelöst und als fluoreszierender Chelatkomplex nachgewiesen. Die gemessene Fluoreszenz verhält sich proportional zum TSH-Gehalt der Probe.

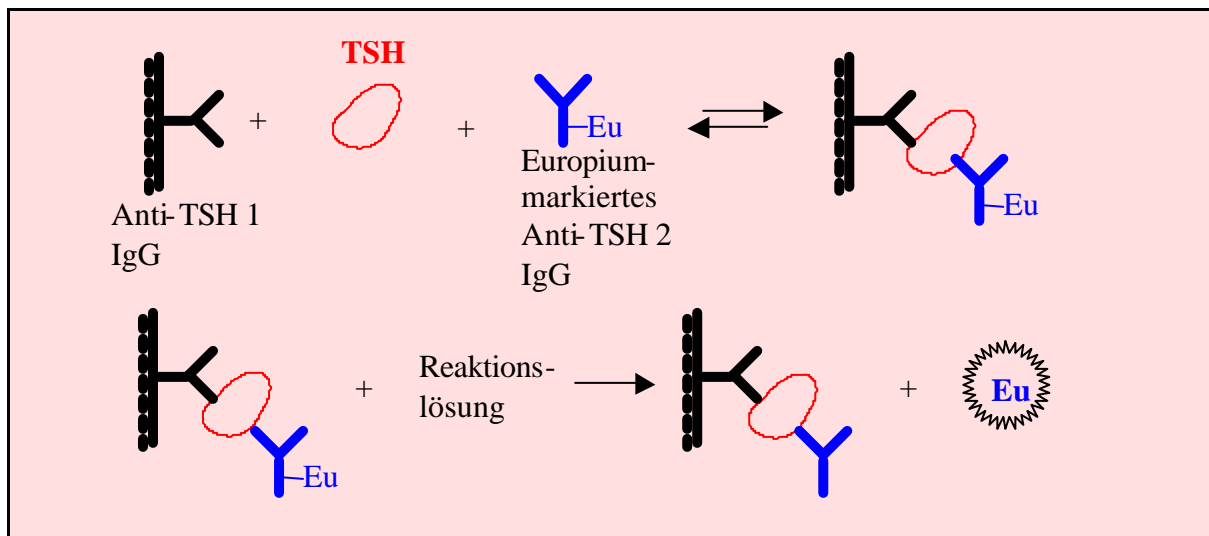


Abbildung 6 Prinzip der TSH-Bestimmung

Störfaktoren: EDTA kann durch Komplexbildung des Europiums zu falsch niedrigen Werten führen.

4.1.2 17 α -Hydroxy-Progesteron-Bestimmung

Das aus einem Probenstanzling herausgelöste 17 α -Hydroxy-Progesteron (17 α -OHP) wird in einem kompetitiven Immunoassay bestimmt (Abbildung 7). Hierbei konkurrieren das 17 α -OHP der Probe und zugesetztes Europium-markiertes 17 α -OHP um die begrenzte Anzahl spezifischer, aus Kaninchen gewonnener 17 α -OHP-Antikörper. Je mehr 17 α -OHP in der Probe vorhanden ist, desto weniger Europium-markiertes 17 α -OHP wird vom Antikörper gebunden. Die Abtrennung der Immunkomplexe erfolgt durch Bindung an einen zweiten, am Reaktionsgefäß fixierten Anti-Kaninchen-Antikörper und Entfernen der Reaktionslösung. Mit

einer zweiten Reaktionslösung werden Europiumionen aus den Immunkomplexen herausgelöst und als fluoreszierende Chelatkomplexe gebunden. Die gemessene Fluoreszenz verhält sich umgekehrt proportional zur 17α -OHP-Konzentration in der Probe.

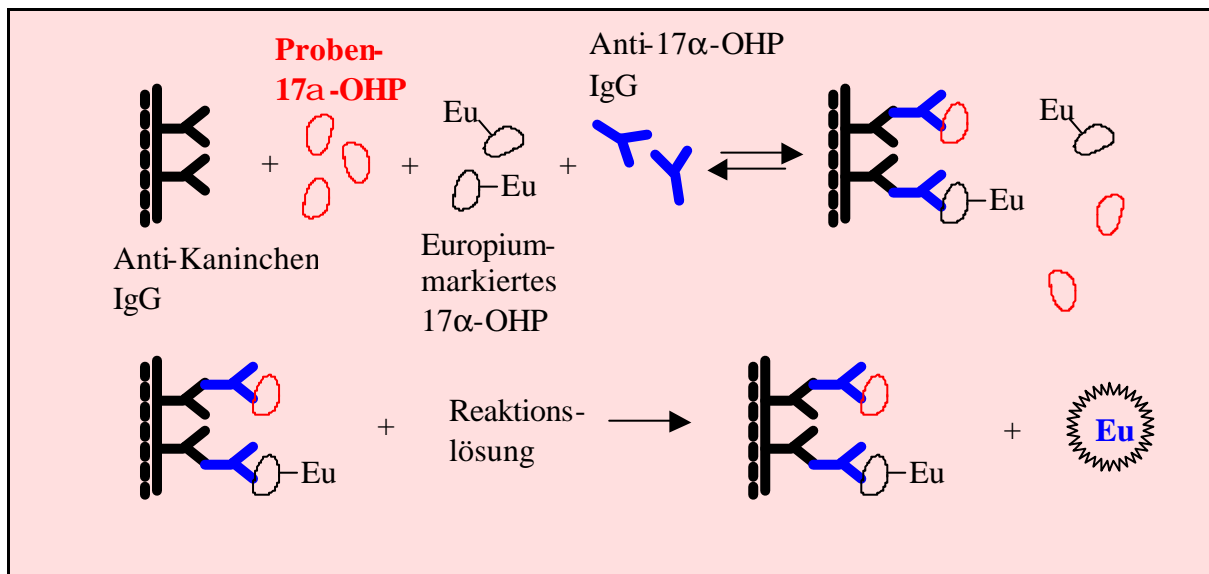


Abbildung 7 Prinzip der 17α -OHP-Bestimmung

Störfaktoren: Kreuzreaktionen mit anderen (insbesondere fetalen) Steroidhormonen können zu falsch hohen Werten führen (besonders bei Frühgeborenen). EDTA kann durch Komplexierung des Europiums zu falsch hohen Werten führen.

4.1.3 Gal-1-PUT-Aktivitätsbestimmung

Die Methode beruht auf dem Verfahren nach Beutler (Abbildung 8). Das zu messende Enzym Galaktose-1-Phosphat-Uridyl-Transferase (Gal-1-PUT) wird unter Hämolyse (mit Saponin) aus einem Stanzling der Trockenblutprobe herausgelöst. Dem Enzym wird als Substrat Galaktose-1-Phosphat (Gal-1-P) zusammen mit UDP-Glucose angeboten. Das entstehende Glucose-1-Phosphat wird durch das hämolysateigene Enzym Phosphoglucomutase in Glucose-6-Phosphat umgewandelt.

In der anschließenden Indikatorreaktion wird zugesetztes NADP^+ durch zwei hämolysateigene Dehydrogenasen in die reduzierte Form NADPH überführt. Das entstandene NADPH fluoresziert im langwelligen UV-Licht. Die Intensität der Fluoreszenz verhält sich proportional zur Gal-1-PUT-Aktivität der Probe.

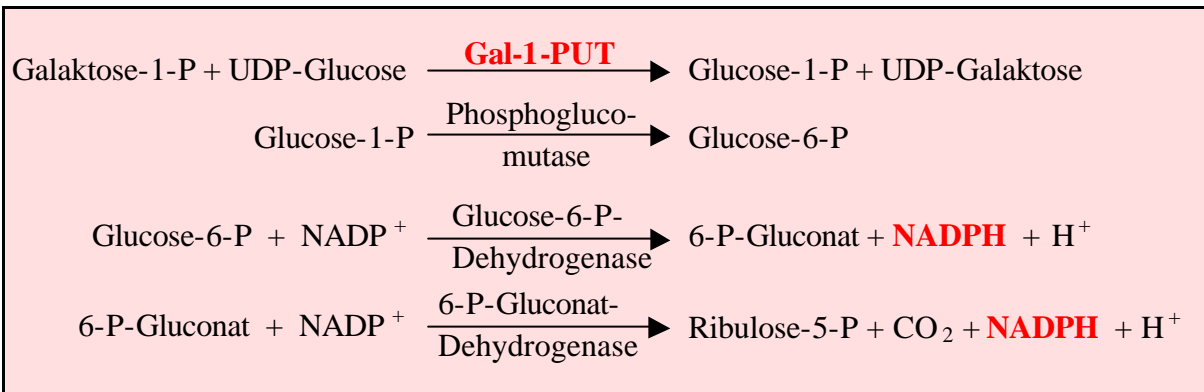


Abbildung 8 Prinzip der Gal-1-PUT-Aktivitätsbestimmung

Störfaktoren: Das Enzym Gal-1-PUT kann präanalytisch z.B. durch Hitze oder Alkohol inaktiviert werden. EDTA im Blut kann die Reaktion behindern.

4.1.4 Galaktose-Substrat-Messung

Im Galaktose-Substrat-Test wird Gesamtgalaktose, das heißt, die Summe aus Galaktose-1-Phosphat (Galaktose-1-P) und freier Galaktose, aus den Trockenblutproben bestimmt (Abbildung 9). Die Substanzen werden nach Denaturierung des Proteins aus einem Probenstanzling herausgelöst. Galaktose-1-P wird mittels alkalischer Phosphatase in freie Galaktose überführt. Die gesamte freie Galaktose wird unter Zusatz von NAD⁺ mit Galaktose-Dehydrogenase umgesetzt. Das bei dieser Umsetzung freiwerdende NADH (reduzierte Form des NAD⁺) führt in der anschließenden Indikatorreaktion das farblose Tetrazoliumsalz INT unter Einwirkung von Diaphorase in ein rot gefärbtes Formazan über. Die rote Färbung wird im Photometer bei einer Wellenlänge von 492 nm quantitativ erfasst. Die gemessene Färbung verhält sich proportional zum Galaktosegehalt der Probe.

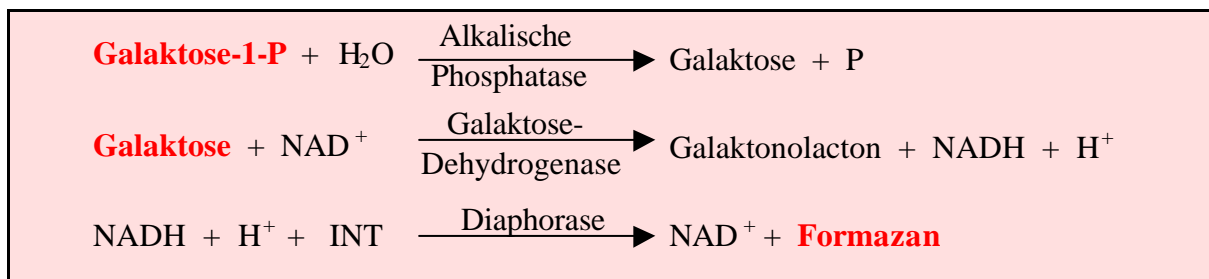


Abbildung 9 Prinzip der Galaktosemessung

Störfaktoren: EDTA im Blut kann die Reaktion behindern und zu falsch niedrigen Werten führen.

4.1.5 Biotinidase-Aktivitätsbestimmung

Der Biotinidase aus einem Blutstanzling wird als Substrat Biotinyl-p-Aminobenzoat angeboten (Abbildung 10). Bei der Inkubation (über Nacht, ca. 20 Stunden) entsteht 4-Aminobenzoessäure (4-ABA). Die enzymatische Reaktion wird mit Trichloressigsäure abgebrochen. Das entstandene 4-ABA wird durch die sog. Bratton-Marshall Reaktion nachgewiesen. Hierbei wird 4-ABA zunächst mit salpetriger Säure (HNO₂) diazotiert. Die diazotierte 4-ABA reagiert mit N-(1-Naphthyl)-ethylen-diamin zu einem rosa-violetten Farbstoff.

Dieser kann im Photometer bei einer Wellenlänge von 550 nm quantifiziert werden. Die gemessene Färbung verhält sich proportional zum Biotinidase-Gehalt der Probe.

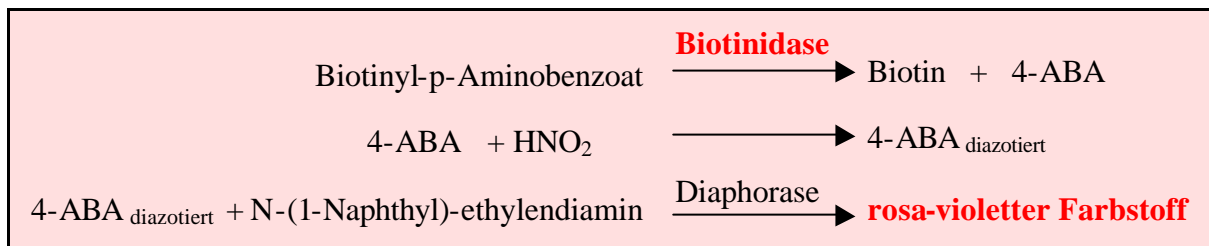


Abbildung 10 Prinzip der Biotinidase-Aktivitätsbestimmung

Störfaktoren: Biotinidase kann präanalytisch z.B. durch Hitze oder Alkohol inaktiviert werden. Bestimmte Arzneimittel (z.B. Penicilline, Vitamin K) im Blut können in der Bratton-Marshall Reaktion unspezifisch mitreagieren.

4.2 Tandem-Massenspektrometrie

Mit Hilfe der Massenspektrometrie werden die einzelnen Aminosäuren, freies Carnitin und die verschiedenen Acylcarnitine simultan quantifiziert.

Bei der Tandem-Massenspektrometrie handelt es sich um eine Weiterentwicklung der klassischen Sektorfeld-Massenspektrometrie, deren Trennprinzip darauf beruht, dass geladene Teilchen, die im Hochvakuum beschleunigt werden, durch ein elektromagnetisches Feld unterschiedlich stark abgelenkt werden. Die Ablenkung ist proportional zum Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z). Alternativ kann die Massenauftrennung auch durch ein Hochfrequenzfeld bewirkt werden, das durch vier konzentrisch parallel zueinander angeordnete Stabelektroden erzeugt wird (Quadrupoltechnik). In diesem Hochfrequenzfeld werden die Ionen massenabhängig in Schwingung versetzt. Abhängig vom angelegten Hochfrequenzfeld können nur Ionen einer bestimmten Masse passieren (Selektion). Das Problem der klassischen Massenspektrometrie beim Einsatz in der Bioanalytik besteht darin, dass chemisch unterschiedliche, aber massengleiche Teilchen simultan detektiert werden und ein gemeinsames Signal ergeben. Um die erforderliche Spezifität für quantitative Analysen zu gewinnen, ist daher eine Vortrennung nötig, die in der Regel durch ein vorgeschaltetes chromatographisches Verfahren erfolgt.

Bei der Tandem-Massenspektrometrie wird die erforderliche analytische Spezifität durch die Kombination zweier massenspektrometrischer Einheiten erreicht (Abbildung 11).

Die *erste Einheit (MS 1)* dient der Selektion einer definierten Masse. Die vorselektierten Moleküle gelangen anschließend in eine mit geringen Konzentrationen eines Inertgases (Stickstoff) gefüllte *Kollisionszelle*. Dort zerfallen sie aufgrund der Stoßenergie bei der Kollision mit den Gasmolekülen in spezifische Bruchstücke. Die entstandenen Ionenfragmente werden in der *zweiten analytischen Einheit (MS 2)* getrennt und anschließend detektiert. Durch die massenspezifische Selektion und den molekültypischen Zerfall entfällt die Notwendigkeit einer Vortrennung. Das Verfahren erlaubt daher einen hohen Probendurchsatz.

Beim Neugeborenen-Screening werden die Analyte nach Zugabe von internen Standards aus der Trockenblutprobe extrahiert und mit butanolischer Salzsäure in die korrespondierenden Butylester überführt. Diese werden direkt in das Gerät eingespritzt. In der *Ionenquelle* wird das Untersuchungsmaterial mit Hilfe einer Turbomolekularpumpe in die Gasphase überführt

und gleichzeitig mit Hilfe des sogenannten Elektrosprays schonend in massenspektrometrisch auftrennbare Ionen überführt (ESI-Technik). Die Zielanalyte werden anschließend in einer raschen Abfolge von Einzelexperimenten, die jeweils nur einige Millisekunden in Anspruch nehmen, quantifiziert. Dadurch entsteht das Aminosäure- bzw. Acylcarnitin-Profil in einem Zeitfenster von weniger als einer Minute.

Für die Beurteilung benutzt man neben den gemessenen absoluten Konzentrationen (bestimmt aus der relativen Signalintensität im Vergleich zum internen Standard) auch die Verhältnisse einzelner Metabolite zueinander.

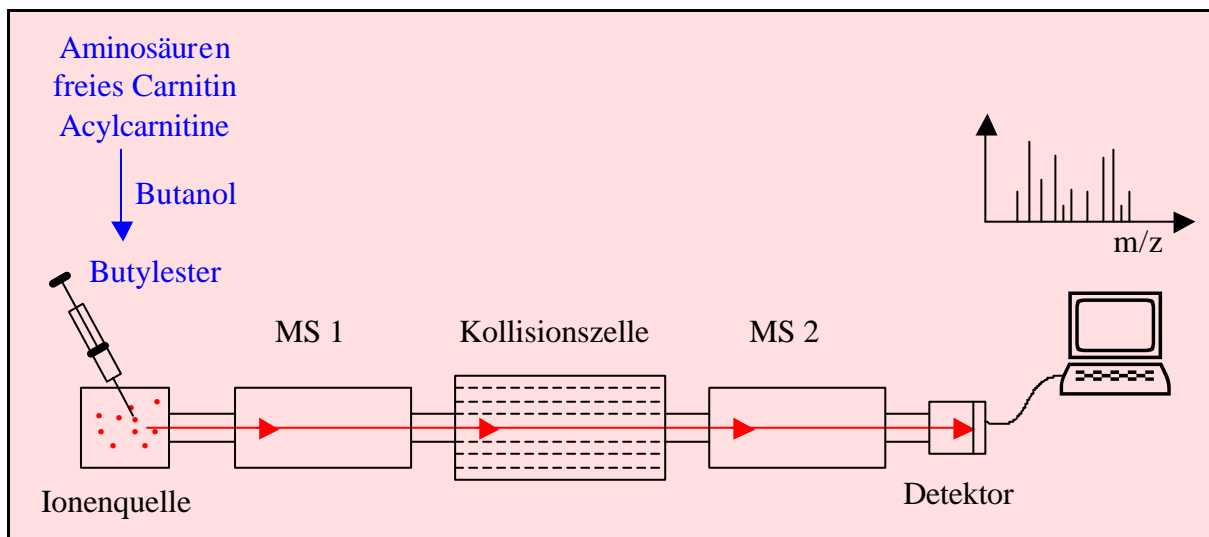


Abbildung 11 Prinzip der Tandem-Massenspektrometrie