

## 1. Einführung

### 1.1 Einleitung

Antibiotika und andere Arzneimittel werden nicht nur in der Humanmedizin, sondern auch für veterinärmedizinische Zwecke eingesetzt. Besonderes Augenmerk ist hier auf die Verwendung von pharmakologisch wirksamen Substanzen in der Nutztierhaltung zu richten. Diese Substanzen können nach einer veterinärmedizinischen Behandlung in den aus diesen Tieren gewonnenen Lebensmitteln (Muskelfleisch, Organe, Eier, Milch) nachgewiesen werden, wobei die Höhe der Rückstände bei sachgemäßer Durchführung und Einhalten der Wartezeiten unterhalb der rechtlich vorgeschriebenen Höchstmengen liegen sollte. Penicilline gehören heute zu den am häufigsten in der Veterinärmedizin eingesetzten Antibiotika [1, 2].

Strategien zur Rückstandsanalytik von Antibiotika in tierischen Lebensmitteln können in zwei Phasen eingeteilt werden [2a]: In der ersten Phase („Screening“) werden aus der Masse der Proben diejenigen herausgefiltert, die Rückstände enthalten. In der zweiten Phase werden die rückstandshaltigen Proben nochmals zur Identifizierung und Quantifizierung der Rückstände untersucht. Die Aufteilung in zwei Phasen ist deshalb sinnvoll, weil die Identifizierung und Quantifizierung von Antibiotikarückständen nur mit aufwendigen und daher entsprechend kostspieligen Verfahren möglich ist, wogegen die Screening-Verfahren relativ schnell und kostengünstig durchzuführen sind.

Als Screening-Verfahren werden meist mikrobiologische Tests durchgeführt. Mit ihnen sind nur qualitative Aussagen möglich. Diese Verfahren beruhen darauf, daß Mikroorganismen durch Antibiotika in ihrem Wachstum gehemmt werden („Hemmstofftests“), deshalb können sie keine hohe Spezifität bieten [3]. Außerdem sind für einige Wirkstoffe Rezeptortests erhältlich, die gruppenspezifisch sind, d.h. mit ihnen ist die Aussage möglich, daß eine bestimmte Antibiotikagruppe, z.B. die der  $\beta$ -Lactame, anwesend ist.

Bei der Verwendung dieser Verfahren ist zu beachten, daß die nachzuweisenden Wirkstoffe mit genügend hoher Empfindlichkeit, d.h. mindestens in der Konzentration der gesetzlich vorgegebenen Höchstmenge erkannt werden. Fällt ein Screening-Test negativ aus, so ist davon auszugehen, daß sich in der Probe keinerlei oder nur minimale Mengen von denjenigen Hemmstoffen befinden, für die der Test empfindlich ist. Einige Wirkstoffe werden jedoch von derartigen Methoden garnicht oder nur mit zu hoher Nachweisgrenze erfaßt. Kann man jedoch Hemmstoffe nachweisen, so muß zur Unterscheidung der Einzelsubstanzen sowie zur Quantifizierung ein chemisch-physikalisches Verfahren durchgeführt werden.

Diese Verfahren sind in vielerlei Hinsicht aufwendig: Der Zeitbedarf pro Analyse ist hoch, entsprechend viel Arbeitskraft wird gebunden. Der aus dem Lebensmittel gewonnene Rohextrakt muß besonders aufgereinigt werden, dazu sind oft große Mengen organische Lösungsmittel erforderlich. Um reproduzierbare Ergebnisse im Spurenbereich zu erhalten, muß die Arbeitskraft gut eingearbeitet sein.

Als Ergänzung zu den unspezifischen mikrobiologischen Tests und Rezeptortests einerseits und den aufwendigen physikalisch-chemischen Methoden andererseits bieten sich Verfahren an, die zur

Probenvorbereitung eine immunologische Reaktion ausnutzen und mit einem physikalisch-chemischen Nachweisverfahren gekoppelt werden können. Die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung als hochspezifische Reaktion eignet sich in besonderer Weise zur Isolierung von Analyten aus einer Matrix, so daß die Gewinnung eines sauberen Extraktes zur anschließenden (flüssigkeits-) chromatographischen Analyse mit relativ geringem Aufwand möglich sein sollte. Durch Automatisierung eines solchen Verfahrens ist gerade im Spurenbereich eine hohe Reproduzierbarkeit im Vergleich zu rein manuellen Verfahren mit vielen Einzelschritten zu erwarten. Voraussetzung für die Realisierung eines solchen Verfahrens ist die Gewinnung geeigneter Antikörper, die zur Herstellung einer Immunaффinitätssäule an ein unlösliches Trägermaterial gebunden werden müssen.

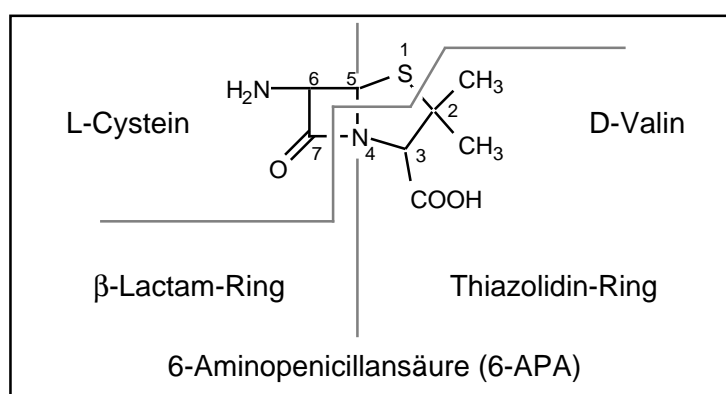
Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Verfahren entwickelt werden, das es erlaubt, mit Hilfe von immobilisierten Antikörpern immunaффinitätschromatographisch alle veterinärmedizinisch relevanten Penicilline zu isolieren und diese on-line mit einer HPLC oder off-line mit einem beliebigen physikalisch-chemischen Verfahren zu koppeln.

## 1.2 Eigenschaften der Penicilline

### 1.2.1 Chemisch-physikalische Eigenschaften der Penicilline

#### 1.2.1.1 Strukturen der Penicilline

Penicilline besitzen als Grundstruktur die 6-Aminopenicillansäure (6-APA). Sie kann als bicyclisches Dipeptid aus den Aminosäuren Cystein und Valin aufgefaßt werden, aus denen auch die Biosynthese erfolgt [4]. Man kann die Struktur auch als kondensiertes  $\beta$ -Lactam- und Thiazolidinringsystem sehen (Abb. 1-1). Die einzelnen Penicilline unterscheiden sich nur durch die Seitenkette an der Aminofunktion an C<sub>6</sub>.



**Abb. 1-1:** 6-Aminopenicillansäure und ihre Strukturelemente

Von den natürlichen Penicillinen hat nur das Benzylpenicillin Bedeutung erlangt. Es ist sowohl säure- als auch penicillinaseempfindlich und unwirksam gegen die meisten gramnegativen Keime. Um diese Nachteile zu umgehen, wurden semisynthetische Penicilline entwickelt [5]. Durch enzymatische Spaltung wird aus Benzylpenicillin 6-Aminopenicillansäure gewonnen. Nach Acylierung mit geeigneten Carbonsäuren oder Carbonsäurechloriden entstehen neue Penicilline. Auch die Zugabe von geeigneten Vorläufersubstanzen zu Penicillium-Kulturen führt zur Bildung von semisynthetischen Penicillinen.

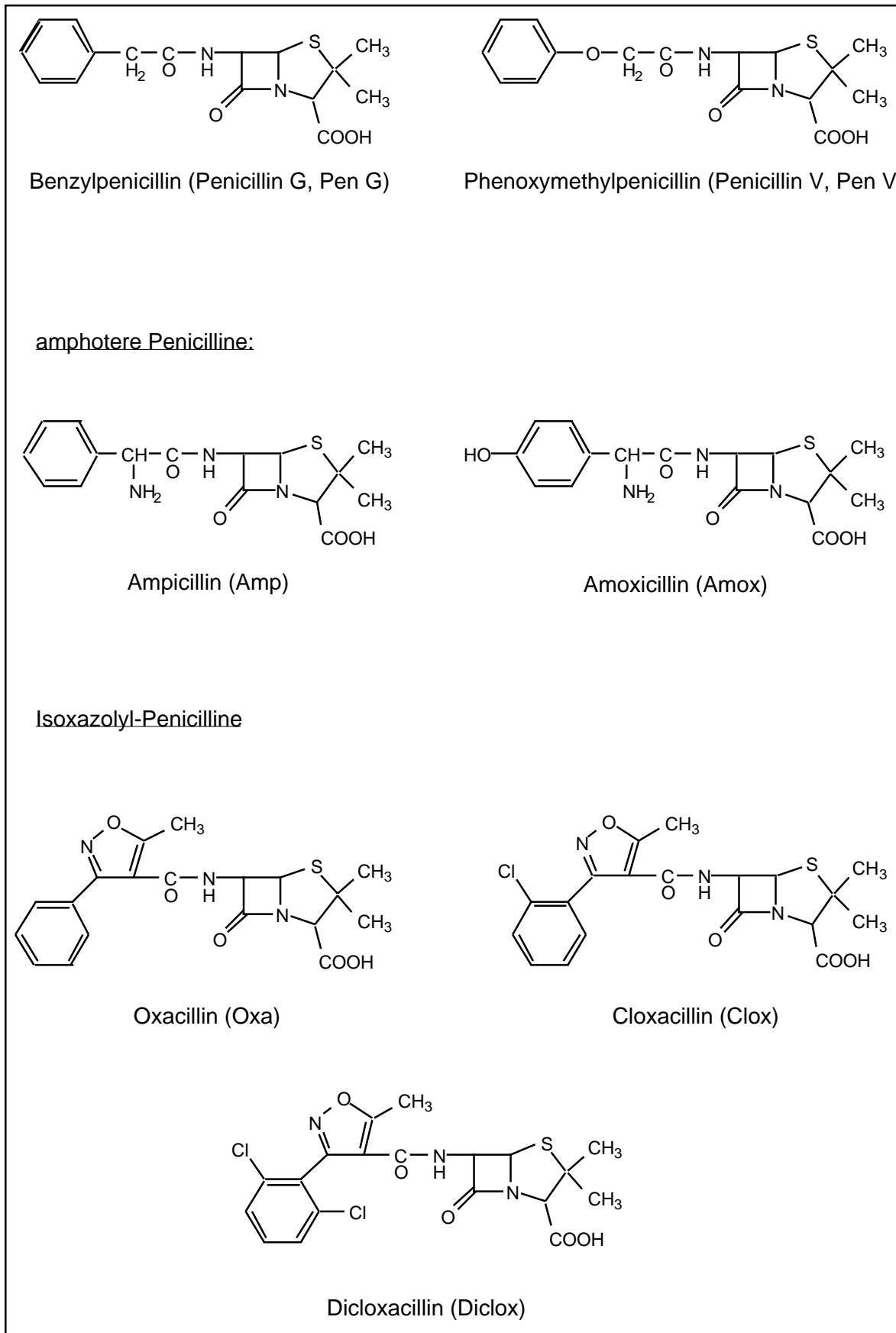
Abbildung 1-2 zeigt die Strukturen sowie die Namen der veterinärmedizinisch relevanten Penicilline.

#### 1.2.1.2 Chemisch-physikalische Daten

Die Carboxylfunktion der Penicilline hat eine Säurekonstante ( $pK_a$ ) von 2,6 - 2,8, die Aminofunktion der Seitenkette der amphoteren Penicilline (Ampicillin, Amoxicillin) hat einen  $pK_a$  von 7,0 - 7,4.

Die 6-Aminopenicillansäure zeigt keine nennenswerte UV-Absorption, die Absorption der Penicilline wird durch die aromatischen Seitenketten hervorgerufen [6, 7].

Penicilline sind mit Ausnahme von Amoxicillin und Ampicillin als freie Säuren nicht, als Kalium- und Natriumsalze dagegen gut wasserlöslich. Die Salze mit organischen Basen wie Procain und Benzathin



**Abb. 1-2:** Strukturen, Namen und Abkürzungen der veterinärmedizinisch relevanten Penicilline

sind nur schlecht wasserlöslich. Sie werden als „Depotpenicilline“ eingesetzt, die sich durch eine verzögerte Verteilung und Eliminierung im Organismus auszeichnen.

### 1.2.1.3 Reaktivität und Stabilität

Penicilline sind in kristalliner Form stabil, in Lösung erfolgt dagegen ein rascher Abbau durch Nucleophile und Elektrophile [8].

Das Stabilitätsmaximum in Lösung liegt zwischen pH 6 und 7, bei amphoteren Penicillinen zwischen pH 4 und 5 [6].

Das System aus  $\beta$ -Lactam und Thiazolidinring ist empfindlicher gegenüber Nucleophilen, Elektrophilen und Oxidationsmitteln als eine einfache  $\beta$ -Lactamstruktur, da der  $\beta$ -Lactamring durch die Kondensation mit dem Thiazolidinring aus seiner planaren Struktur gezwungen wird, so daß keine Acylamid-Resonanz mehr möglich ist. Der nucleophile Abbau beginnt mit der Öffnung des  $\beta$ -Lactamringes an C<sub>7</sub> [6] und der Bildung einer tetraedrischen Zwischenstufe. Elektronenziehende Substituenten an C<sub>6</sub> beschleunigen den Angriff.

Elektrophile greifen am  $\beta$ -Lactam-Stickstoff oder am Schwefel des Thiazolidinringes an. Nach der Öffnung des  $\beta$ -Lactamringes durch Protonen wird der Thiazolidinring geöffnet. Elektronenziehende Substituenten an C<sub>6</sub> hemmen den elektrophilen Angriff [6]. 6-APA ist sehr säurestabil [7].

Eine weitere Möglichkeit zur Inaktivierung von Penicillinen besteht in der Öffnung des  $\beta$ -Lactamringes durch  $\beta$ -Lactamasen (Penicillinasen). Diese Enzyme können von einigen Bakterien (z.B. Staphylokokken) gebildet werden, die dadurch penicillinresistent werden.

Tabelle 1-1 gibt eine Übersicht über die Stabilität verschiedener Penicilline gegen Penicillinase und Säure [6, 9].

**Tab. 1-1:** Stabilität von Penicillinen gegenüber Penicillinase und Säure [6, 9]

Penicillin	Säurestabilität	Penicillinase-stabilität	Wirkung gegen Gramnegative	Bemerkungen
Penicillin G	-	-	-	natürliches Penicillin
Penicillin V	+	-	-	
Amoxicillin	+	-	+	bessere Resorption als Amp
Ampicillin	+	-	+	
Oxacillin	+	+	-	
Cloxacillin	+	+	-	
Dicloxacillin	+	+	-	

## 1.2.2 Penicilline als Tierarzneimittel

### 1.2.2.1 Anwendung und Nutzen

Benzylpenicillin wird zu therapeutischen und prophylaktischen Zwecken eingesetzt. Hauptanwendungsgebiet ist die Behandlung von Mastitis (Euterentzündungen), Harnwegsinfektionen und Erkrankungen des Gastro-Intestinal-Traktes [2]. Der wirtschaftliche Wert einer prophylaktischen Behandlung ist beträchtlich: Mastitis-Infektionen verursachen einen Verlust von 11 % des finanziellen Gewinns, wobei der Hauptanteil (70 %) durch reduzierte Milchproduktion bedingt ist. Nicht verwertbare Milch nach Medikation, Kosten von Arzneimittel und Arzt und vorzeitige Auslese der infizierten Tiere verursachen weitere finanzielle Verluste, die sich durch eine prophylaktische Behandlung stark eindämmen lassen [10].

Wenn keine Penicillinallergie vorliegt, sind Penicilline bei Infektionen wegen der fehlenden Toxizität bei Tier und Mensch das Mittel der Wahl. Da Isoxazolympenicilline die Penicillinaseproduktion in Bakterien induzieren können, besteht jedoch Hospitalismusgefahr [5]. Mit gutem Erfolg werden Penicilline gegen Streptokokken-Mastitis eingesetzt. Gegen Staphylokokken-Mastitis sind Penicilline dagegen weniger gut geeignet, da einige Staphylokokken durch Penicillinaseproduktion resistent sind. Benzylpenicillin und Ampicillin finden Verwendung bei der Bekämpfung von Endometritis (Entzündung der Gebärmutterschleimhaut). Infektionen des Verdauungstraktes können gut mit Procain-Benzylpenicillin, Ampicillin oder Amoxicillin beseitigt werden [3, 10].

Durch Kombination eines penicillinase-labilen Breitspektrum-Penicillins (Ampicillin, Amoxicillin) mit einem penicillinase-stabilen Penicillin kann eine Addition der Wirkungsbereiche erzielt werden [5]. Bei Kombination mit Aminoglycosid-Antibiotika ist ein Synergismus gegen grampositive Keime zu beobachten [8].

### 1.2.2.4 Präparate

Neben Präparaten mit Einzelwirkstoffen sind auch viele Präparate mit Wirkstoffkombinationen im Handel. Penicilline werden u.a. kombiniert mit Aminoglycosid-Antibiotika, z.B. Dihydrostreptomycin. In dieser Arbeit soll ein Verfahren entwickelt werden, mit dem verschiedene Penicilline gleichzeitig erfaßt werden können. Daher sind besonders die Präparate interessant, die Kombinationen verschiedener Penicilline enthalten. Häufig ist die Kombination von Ampicillin und Cloxacillin zu finden, aber auch andere Kombinationen von amphoteren und Isoxazolympenicillinen werden verwendet, z.B. Ampicillin + Dicloxacillin und Ampicillin + Oxacillin [11].

## 1.2.4 Stabilität in Lebensmitteln

Unter normalen Kochbedingungen werden Penicilline teilweise bis komplett inaktiviert [12, 13], so daß sie keine antimikrobielle Wirkung mehr haben. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß sich auch Penicillin-Protein-Konjugate bilden [12]. Diese können als Immunogene wirken und so allergische

Reaktionen hervorrufen. Über den Abbau von Penicillinen durch Räuchern und Pökeln liegen keine Angaben vor. Bei der Herstellung von Rohwurst dürften die geringe Antibiotikarückstände keinen Einfluß haben.

### 1.2.5 Rückstände in Lebensmitteln

Bei nicht sachgerechter medizinischer Behandlung oder Nichtbeachten der Wartezeiten treten Arzneimittelrückstände in Lebensmitteln auf. In einer kanadischen Studie wird außerdem gezeigt, daß bei der Behandlung von Tieren mit Benzathin-Benzylpenicillin nach 30 bis 50 Tagen Wartezeit an den Einstichstellen Rückstände von mehr als dem 20-fachen des Grenzwertes für die USA und Kanada von 50 µg/kg auftreten. Die Rückstände in Leber, Niere und Muskel lagen dagegen unterhalb des Grenzwertes [14].

Penicillin-Rückstände in Lebensmitteln können sowohl gesundheitliche als auch wirtschaftliche Schäden verursachen.

Die Hauptnebenwirkung von Penicillinen ist die allergische Reaktion [8]. Meist wird sie durch Milch oder Milchprodukte hervorgerufen, es sind jedoch auch allergische Reaktionen nach dem Genuß von penicillinhaltigem Fleisch dokumentiert [15].

Die Möglichkeit der Bildung von resistenten Bakterienstämmen durch Penicillinrückstände sollte nicht vernachlässigt werden [8, 15]. Resistente Stämme erhalten durch die ständige Anwesenheit von Antibiotika einen Selektionsvorteil. Dieses führt dazu, daß zunächst behandelbare Infektionen nicht mehr mit den gewohnten Mitteln zu bekämpfen sind so so zu einer ernsthaften Gefährdung führen.

Der wirtschaftliche Schaden durch Penicillinrückstände tritt besonders bei der Weiterverarbeitung auf [16]. Vor allem die Verarbeitung von Milch wird durch Hemmstoffrückstände unmöglich, da die Starterkulturen für die Herstellung von Yoghurt, Käse und anderen Produkten nicht wachsen können. Der so entstandene wirtschaftliche Schaden betrug in den 60er Jahren in der Bundesrepublik 400 - 500 Mio. DM. Inzwischen wurde die Situation durch konsequente Kontrollen jedoch gebessert [16]. Die Daten der Schlachtier- und Fleischuntersuchung in der Bundesrepublik von 1987 wurden vom Statistischen Bundesamt ausgewertet. Demnach waren 11 % der Rückstandsuntersuchungen positiv. Davon wurden bei Schlachtieren 93,3 % als Antibiotika identifiziert, bei Fleischteilen enthielten 60,8 % der rückstandspositiven Proben Antibiotika [17]. Eine kanadische Studie zeigt, daß 1989 in mehr als der Hälfte der untersuchten Lebensmittelproben tierischer Herkunft Hemmstoffe nachgewiesen werden konnten. Davon wiederum die Hälfte wurden als Penicilline identifiziert [18].

### 1.3 Lebensmittelrechtliche Beurteilung von Penicillinrückständen

Nach einer Medikation von Nutztieren können Rückstände von Tierarzneimitteln in Lebensmitteln auftreten. Bei Nichteinhalten von Dosierungsangaben und Wartezeiten können diese oft in gesundheitlich bedenklicher Höhe oder oberhalb der gesetzlich festgesetzten Höchstmenge nachgewiesen werden. Außerdem sind Rückstände möglich durch die illegale Verwendung von Arzneimitteln zu Mastzwecken.

In Deutschland ist der Einsatz von Antibiotika bei Tieren, die der Lebensmittelgewinnung dienen, im Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände-Gesetz (LMBG) [19] in den Paragraphen 8 (Verbote zum Schutz der Gesundheit) und 15(2) (Stoffe mit pharmakologischer Wirkung), sowie in der darauf basierenden Verordnung über Stoffe mit pharmakologischer Wirkung [25] geregelt. Weitere Bestimmungen finden sich in der Fleischhygiene-Verordnung [21] (§ 5(2) und Anlage 1, Kapitel II: Schlachtier- und Fleischuntersuchung), der Milchverordnung [22] (§ 5(3) und Anlage 6: Anforderungen an die Behandlung der Milch im Be- und Verarbeitungsbetrieb) sowie der Milch-Güteverordnung [23]. Die Milchverordnung fordert nach der Hitzebehandlung keine nachweisbaren Antibiotika in der Milch. Die Milch-Güteverordnung schreibt in §2(3) monatlich 2 Untersuchungen der Anlieferungsmilch auf Hemmstoffe nach der Anlage sowie 2 Untersuchungen nach § 35 LMBG vor. Verwendet wird als Testkeim *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* sowie Penicillinase zur Feststellung von Penicillinen.

Die nationalen Regelungen in Europa werden zunehmend durch Verordnungen und Gesetze der EG abgelöst. Die EG-Verordnung (EG-VO) 675/92 [24], setzt für den europaweiten Verkehr mit Lebensmitteln konkrete Grenzwerte für Penicillinrückstände in Lebensmitteln fest (Tabelle 1-2):

**Tab. 1-2:** Höchstwerte für Penicilline in Lebensmitteln nach der EG-VO 675/92 [24]

Wirkstoff	Muskulatur, Leber, Niere, Fett (µg/kg)	Milch (µg/kg)
Benzylpenicillin	50	4
Ampicillin	50	4
Amoxicillin	50	4
Oxacillin	300	30
Cloxacillin	300	30
Dicloxacillin	300	30

## 1.4 Rückstandsanalytik der Penicilline

### 1.4.1 Strategien zur Rückstandsanalytik

Zur Rückstandsanalytik von Penicillinrückständen stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Lange Zeit wurde die Analytik durch mikrobiologische Hemmstofftests geprägt, die aufgrund ihrer MechanismennichtinderLagesind, zwischen verschiedenen Substanzen zu unterscheiden. Rezeptortests weisen oft eine Stoffgruppenspezifität auf, eine Aussage über Einzelsubstanzen ermöglichen sie aber ebensowenig wie die Hemmstofftests. Quantitative Aussagen sind mit allen derartigen Tests nicht oder nur begrenzt möglich.

Demgegenüber erlauben es chromatographische Methoden, Einzelsubstanzen zu unterscheiden und zu quantifizieren. In der Regel ist aber für jede Substanzklasse ein eigenes Verfahren nötig.

Damikrobiologische Tests nur unvollständige Informationen bieten und andererseits chromatographische Methoden sehr aufwendig sind, bietet sich die Kombination von mehreren Verfahren an. Mit mikrobiologischen Tests kann zunächst auf Rückstandsfreiheit geprüft werden. Bei rückstandspositiven Befunden kann durch ein spezifischeres Verfahren die Substanzklasse bestimmt werden. Im Anschluß daran folgt ein chromatographisches Verfahren zur genauen Identifizierung und Quantifizierung. So kann die Probenanzahl, die mit einem chromatographischen Verfahren untersucht werden muß, drastisch gesenkt werden.

Einen Überblick über die verschiedenen Methoden bietet die Literatur [2a, 15, 25, 26]

### 1.4.2 Qualitative Schnelltests

Bei den in der Literatur häufig als „Screening-Verfahren“ bezeichneten Testverfahren handelt es sich um schnelle, einfache und kostengünstige Verfahren zur Detektion von Hemmstoffen, wobei die erzielte Nachweisgrenze stark von Wirkstoff abhängt. Die meisten Screening-Verfahren beruhen auf mikrobiologischen Prinzipien. Die eingesetzten Mikroorganismen (z.B. *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, *Bacillus subtilis*) werden durch Antibiotikarückstände in der Probe im Wachstum gehemmt. Es ist in der Regel nicht möglich, anhand dieser Verfahren quantitative Aussagen zu machen oder den Wirkstoff zu bestimmen. Ein positives Ergebnis aus einem Screening-Verfahren muß daher durch ein chemisch-physikalisches Verfahren bestätigt und quantifiziert werden.

Außerdem werden immunologische und enzymatische Verfahren eingesetzt. Einige enzyme linked immunosorbent assays (ELISA) erlauben auch quantitative Aussagen.

Es sind verschiedene leistungsfähige Testsysteme für Lebensmittel im Handel, die teilweise für bestimmte Hemmstoffe oder Hemmstoffgruppen optimiert sind:

Der in die Amtliche Methodensammlung nach § 35 LMBG aufgenommene 3-Platten-Test verwendet als Testkeim *Bacillus subtilis*. Die drei Kulturplatten unterscheiden sich in ihrem pH-Wert. Der 3-Platten-Test wird auch als „Allgemeiner Hemmstofftest“ bezeichnet. Im 4-Platten-Test wird zusätzlich eine Kulturplatte mit dem Keim *Micrococcus luteus* zur besseren Erfassung der Aminoglycosid-Antibiotika eingesetzt [27]. Auf die Platten wird die zu untersuchende Probe oder ein Probenextrakt

gegeben. Die in der Probe enthaltenen Hemmstoffe diffundieren in die Agarschicht der Kulturplatten und hemmen die dort eingepfhten Keime im Wachstum.

Ebenfalls auf dem Prinzip der Agar-Diffusion beruhen der Delvo-Test [28] und der Brillantschwarz-Reduktionstest (BR-Test) [29]. Als Testkeim fungiert in beiden Fällen *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. Die im Testsystem enthaltenen Indikatoren (im BR-Test Brillantschwarz als Redoxindikator, im Delvo-Test ein pH-Indikator) reagieren auf die Anwesenheit von Stoffwechselprodukten des Testkeimes. Im Delvo-Test wurden falsch-positive Befunde durch Lactoferrin und Lysozym nachgewiesen [30]. Hier wird die Notwendigkeit der Bestätigung durch ein physikalisch-chemisches Verfahren deutlich. Der BR-Test wird von der Milchindustrie im großen Maßstab zur Prüfung der Anlieferungsmilch eingesetzt. Außerdem wurde er in die Methodensammlung nach § 35 LMBG aufgenommen. Mit demselben Testorganismus arbeitet der Blättchentest, der ebenfalls in dieser Methodensammlung enthalten ist. Bei diesem Test erlaubt das Ausmessen von Hemmhöfen eine quantitative Aussage über die Hemmstoffmenge. Er soll verwendet werden, um im BR-Test positive oder zweifelhafte Proben zu bestätigen.

Ein „Referenzverfahren zur Bestimmung von Antibiotika und Sulfonamiden“ ist sowohl im Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften [31] als auch in der Methodensammlung nach § 35 LMBG beschrieben. Das Verfahren erlaubt im ersten Schritt die Selektion von antibiotika- und sulfonamidhaltigen Proben, im zweiten Schritt kann eine Quantifizierung der Hemmstoffe vorgenommen werden. Es wird wiederum *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* als Testorganismus verwendet. Die Quantifizierung findet in einem ergänzenden Schritt wie beim Blättchentest durch Bestimmung der Hemmzonengröße statt.

Als Rezeptor-Test werden die Systeme CITE-Probe-Test und Charm-Test [32] bezeichnet. Durch den Einsatz von hemmstoffgruppenspezifischen Rezeptoren im Testsystem (z.B. Penicillin bindende Proteine) sind diese gruppenspezifisch.

Eines der wichtigsten immunologischen Verfahren ist der ELISA. Er ermöglicht in einigen Fällen quantitative Aussagen und kann, je nach verwendeten Antikörpern, eine Spezifität für eine bestimmte Substanz aufweisen. Dieses ist besonders vorteilhaft, wenn für eine Wirkstoffgruppe nicht ein Summengrenzwert festgelegt ist (z.B. für Tetracycline und Sulfonamide), sondern, wie bei den Penicillinen, die Höchstmengen für die Einzelwirkstoffe unterschiedlich sind [1].

Alle Schnelltests liefern einen relativ hohen Anteil an falschpositiven Proben. Er kann bis zu 80 % beim Delvo-Test, 44 % beim CITE-Probe-Test und 19 % beim Blättchentest betragen [33].

Für den Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika kann die Zuhilfenahme von Penicillinase sinnvoll sein: Ist eine Probe hemmstoffpositiv und nach der Behandlung mit Penicillinase hemmstoffnegativ, so handelt es sich bei dem Hemmstoff um ein  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum. In eigenen Versuchen wurde festgestellt, daß durch die in solchen Fällen eingesetzten hohen Penicillinasekonzentrationen auch die als penicillinasefest bezeichneten Isoxazolylpenicilline zerstört werden. Allerdings berichten Moats et al. [34], daß auch andere Hemmstoffe durch Penicillinase inaktiviert werden können. Der Einsatz von Penicillinase ist auch bei allen Verfahren der Methodensammlung nach § 35 LMBG vorgesehen.

Der Vorteil der Schnelltests liegt also darin, schnell und kostengünstig rückstandshaltige von rückstandsfreien Proben zu trennen, um die rückstandshaltigen anschließend mit einem aufwendigen chemisch-physikalischen Verfahren zu untersuchen. Durch die Verifizierung der hemmstoffpositiven Befunde können so falschpositive Testergebnisse erkannt werden.

### 1.4.3 Chemisch-physikalische Verfahren

#### 1.4.3.1 Probenvorbereitung: Extraktion und Extraktreinigung

Wie bereits zuvor erwähnt wurde, ist die Probenvorbereitung der zeit- und materialaufwendigste Arbeitsschritt der chromatographischen Verfahren. Sie beginnt mit der Homogenisierung des Lebensmittels. Darauf folgt die Extraktion und Deproteinierung. Diese wird durch Zugabe von Acetonitril [15, 25], Methanol [15, 25], Schwefelsäure/Natriumwolframat [30, 31], Dichlormethan [25, 37] oder Ultrafiltration [15, 25] bewirkt. Durch diesen Schritt werden an Proteine adsorbierte Wirkstoffe freigesetzt und der Analyse zugänglich gemacht sowie Emulsionsbildung vermieden [36].

Der so gewonnene Rohextrakt muß, bevor er chromatographisch analysiert werden kann, weiter gereinigt und konzentriert werden. Dazu werden in der Regel flüssig-flüssig-Verteilungen zwischen organischen Lösungsmitteln und wäßrigen Puffern unterschiedlichen pH-Wertes angewendet [25]. Außerdem sind Reinigungsschritte an Festphasen [25] sowie die HPLC-Fraktionierung [38] üblich. Die Festphasenextraktion kann an Ionenaustausch- [39], Diol- [39], basischem Aluminiumoxid [15] oder Umkehrphasenmaterial [35] stattfinden. Für die Isoxazolylpenicilline wurde eine automatisierte Festphasenextraktion an RP-18-Material beschrieben [40].

#### 1.4.3.2 Derivatisierung, Chromatographie und Detektion

Die chemisch-physikalischen Methoden umfassen dünnschichtchromatographische, gaschromatographische und flüssigchromatographische Verfahren.

1977 wurde die erste chromatographische Bestimmungsmethode für Penicillinrückstände veröffentlicht [12]. Sie beinhaltete die dünnschichtchromatographische Trennung von Benzylpenicillin und dessen Abbauprodukten in erhitztem Fleisch.

Zum Nachweis von sieben monobasischen Penicillinen in vom Tier stammenden Lebensmitteln wurde ein gaschromatographisches Verfahren entwickelt, das die mit Diazomethan methylierten Penicilline mit einem stickstoffselektiven oder massenselektiven Detektor erfaßt [39, 41]. Dieses Verfahren wurde inzwischen zur Aufnahme in die Methodensammlung nach § 35 LMBG validiert. Es kann in vereinfachter Form auch zur Bestimmung von Penicillinen in Milch verwendet werden [42].

Die HPLC ist das in der Penicillinanalytik bevorzugte Verfahren. Es wird vorzugsweise mit Umkehrphasen gearbeitet. Einige Arbeitsgruppen verwenden auch RP-18-Material in Verbindung mit

Ionenpaarreagenzien (z.B. [37]).

Penicilline können aufgrund ihrer UV-Absorption im Bereich von 210 - 230 nm detektiert werden. Dieser Wellenlängenbereich ist jedoch in der Regel durch Matrixsignale stark gestört, so daß an die Extraktreinigung höchste Ansprüche gestellt werden müssen. Außerdem ist die Detektionsempfindlichkeit nicht sehr hoch. Für quantitative Analysen sind mindestens 20 ng absolut erforderlich.

Eine Alternative stellt die Derivatisierung der Penicilline dar, die die Detektionswellenlänge in längerwellige, weniger störanfällige Bereiche verschiebt oder ein fluoreszierendes Derivat erzeugt [25]. Für Penicilline bieten sich verschiedene Derivatisierungsreaktionen an: Durch Derivatisierung mit 1,2,4-Triazol und Quecksilberchlorid entsteht ein Quecksilbermercaptid, das bei 325 nm detektiert werden kann [35].

Die Derivatisierung mit Brommethylmethoxycumarin ermöglicht die Fluoreszenzderivatisierung von Penicillinen bei einer Anregungswellenlänge von 320 nm und einer Detektionswellenlänge von 400 nm [43]. Ein anderes Verfahren zur Fluoreszenzderivatisierung verwendet Citronensäure und Formaldehyd. Die Detektion erfolgt bei 422 nm, die Anregung bei 346 nm [44]. Die Bestrahlung mit UV-Licht als Nachsäulenderivatisierung ermöglicht die elektrochemische Detektion [45], außerdem wird bei den Isoxazolylpenicillinen eine Verschiebung des Absorptionsmaximum nach 310 nm sowie eine Fluoreszenzaktivität induziert [46].

Diespektroskopische Bestätigung kann in der Flüssigchromatographie durch einen Diodenarraydetektor [46] oder durch Massenspektrometrie [47] erfolgen.

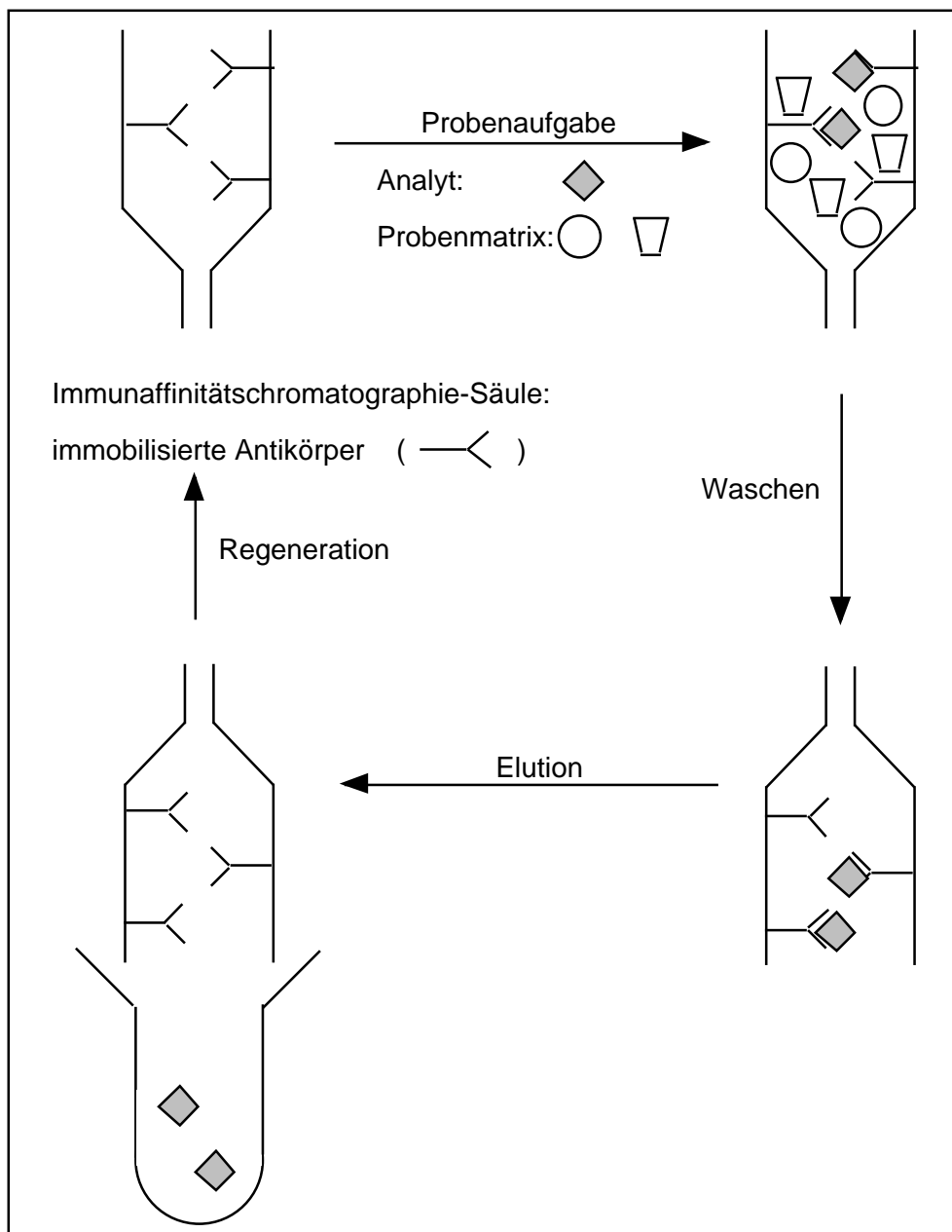
## 1.4.4 Immunaффinitätschromatographie

### 1.4.4.1 Prinzip der Immunaффinitätschromatographie

Die Immunaффinitätschromatographie (IAC) beruht auf der spezifischen und reversiblen Wechselwirkung zwischen Antikörper und Antigen. Zur Durchführung der Immunaффinitätschromatographie müssen die gegen den Zielanalyten gerichteten Antikörper an eine unlösliche Matrix immobilisiert und in eine Säule überführt werden [48]. Dabei ist es wichtig, daß zwischen Träger und Antikörper eine feste kovalente Bindung besteht, die die spezifische Bindungscharakteristik des Liganden nicht beeinflusst [49, 50]. Ist die Bindung nicht stabil, kommt es bei mehrfacher Verwendung von Immunaффinitäts-Chromatographiesäulen zum stetigen Verlust von Immunglobulinen und damit zur Verringerung der Säulenkapazität. Es wird häufig beobachtet, daß die Säulenkapazität während des ersten Gebrauchs sinkt, danach aber stabil bleibt [51].

Der Ablauf einer immunaффinitätschromatographischen Reinigung einer Substanz erfolgt in mehreren Schritten (Abb. 1-3):

1. Der Probenrohextrakt, der den Zielanalyten enthält, wird auf die Immunaффinitätschromatographiesäule aufgegeben.
2. In einem Waschschrift werden alle Probenbestandteile, die nicht von den Antikörpern gebunden werden, aus der Säule ausgewaschen.
3. Der von den Antikörpern gebundene Zielanalyt wird mit einem geeigneten Puffer eluiert und gesammelt.



**Abb. 1-3:** Prinzip der Immunaffinitätsreinigung von Rohextrakten

Die Waschschritte sowie die Elution sollten immer rückwärts erfolgen, um stark bindende und damit schwer eluierbare Probenanteile nicht auf der Säule zu sammeln [52], was allerdings in automatisierten Verfahren nicht immer möglich ist.

In vielen Fällen, so auch in dieser Arbeit, ist es erforderlich, nicht nur eine Substanz nachzuweisen, sondern möglichst alle Mitglieder einer Substanzfamilie. Wenn die nachzuweisenden Substanzen eine dem Immunsystem zugängliche gemeinsame Grundstruktur besitzen, kann man Antikörper erzeugen, die die Grundstruktur dieser Familie erkennen. Man verwendet dazu ein Immunogen, in dem das allen Analyten identische Epitop an einen Träger gekoppelt ist. Zu beachten ist dabei, daß die Antikörper eine genügend hohe Affinität für alle Analyten besitzt. Die Assoziationskonstante sollte zwischen  $10^3$  und  $10^8$  mol/l liegen [50]. Über gruppenspezifische Antikörper berichten Märtlbauer et al. [53]. Manchmal

gelingt es, durch geschickte Wahl der Elutionsbedingungen die Analyten getrennt zu eluieren. Oftmals ist es jedoch sinnvoll, die Immunaффinitätschromatographie zur Isolierung und Anreicherung der Analyten zu nutzen, die Identifizierung und Quantifizierung jedoch mit Hilfe eines physikalisch-chemischen Verfahrens vorzunehmen [54].

Andere Verfahren erlauben auch die Herstellung von Antiseren, die Antikörper gegen chemisch völlig verschiedenartige Analyten enthalten [55]:

Durch die Applikation von verschiedenen Immunogenen gleichzeitig produziert das Immunsystem des Versuchstieres entsprechend unterschiedliche Antikörper. Dieses ist auch zu erreichen, indem man verschiedene Haptene an ein Trägerprotein koppelt. Das Immunsystem erkennt die Haptene als verschiedene Epitope des Protein-Hapten-Konjugates.

Ist es nicht möglich, Antiseren zu gewinnen, mit denen alle Analyten erfaßt werden können, können auch Antikörper aus verschiedenen Seren auf einer Säule immobilisiert werden [56].

#### 1.4.4.2 Antikörper - Bildung und Struktur

Antikörper dienen als Bestandteil des Immunsystems zur Erkennung körperfremder Substanzen. Sie binden an diese, um sie dadurch zu markieren und zu größeren Einheiten zu vernetzen. Die so markierten Substanzen werden von anderen Zellen des Immunsystems, den Phagozyten, erkannt und vernichtet.

Antikörper werden vom Immunsystem als Immunantwort auf die Gegenwart eines Fremdkörpers (Antigens) gebildet. Als Antigen versteht man Substanzen, an die Antikörper binden können. Ein Immunogen ist dagegen eine Substanz, die eine Immunantwort, d.h. die Bildung von Antikörpern auslösen kann. Ein Hapten ist eine Substanz, an die Antikörper binden können, das jedoch keine Immunantwort auslöst. Ein Hapten ist daher ein Antigen, nicht jedoch ein Immunogen [57].

Immunogene müssen für den Wirtsorganismus als körperfremd erkannt werden, um den Abwehrmechanismus auszulösen. Die Immunogenität wird nicht durch das Molekül als Ganzes, sondern nur von Teilbereichen, den sog. Epitopen oder antigenen Determinanten hervorgerufen. Diese Bereiche werden von den Antikörpern erkannt. Ein Immunogen kann mehrere Epitope enthalten, die mit verschiedenen Antikörpern reagieren.

Die phylogenetische Verwandtschaft des Immunogens zum Wirtsorganismus hat entscheidenden Einfluß auf dessen Wirkung. Eine nahe Verwandtschaft hat eine geringe, aber spezifische Immunantwort zur Folge [57].

Antikörper befinden sich in der  $\gamma$ -Globulinfraktion des Blutserums von Säugern und Vögeln. Sie werden daher Immunglobuline genannt [58]. Alle Immunglobuline (Ig) haben die gleiche Grundstruktur, bestehend aus 4 Polypeptidketten, die durch Disulfidbrücken kovalent verbunden sind. Für die Antigen-Antikörper-Reaktion ist die Tertiärstruktur und damit die Primärstruktur des Antikörpers entscheidend.

Es gibt zwei Arten von Ketten, sogenannte schwere und leichte. Beide besitzen bezüglich ihrer Primärstruktur sowohl konstante als auch variable Regionen. Jedes Immunglobulinmolekül ist symmetrisch aufgebaut und besteht aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Ketten (Abb. 1-4). Schwere Ketten besitzen 3 konstante ( $c_{H1} - c_{H3}$ ) und eine variable ( $v_H$ ) Region, leichte Ketten

besitzen je eine konstante ( $c_L$ ) und eine variable ( $v_L$ ) Domäne. Die variablen Domänen bilden die Antigenbindungsstellen. Die vier Ketten bilden eine Y- bzw. T-artige Struktur.

Die Immunglobuline werden in Klassen eingeteilt. Bei Human-Immunglobulinen z.B. kennt man die 5 Klassen IgG, IgM, IgA, IgD und IgE. Sie unterscheiden sich durch die konstanten Regionen der schweren Kette sowie durch ihr Vorkommen als Mono- oder Polymere. So kommt IgA sowohl als Mono- als auch als Dimer vor, während IgM grundsätzlich als Pentamer vorliegt. Die unterschiedlichen Ketten werden entsprechend mit den griechischen Buchstaben  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  bezeichnet. Bei der  $\gamma$ -Kette sind 4, bei der  $\alpha$ -Kette 2 Variationen bekannt:  $\gamma 1 - \gamma 4$  sowie  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$ . Sie bestimmen die Unterklasse (Isotyp) der Immunglobuline (IgG1 - IgG4; IgA1, IgA2). Beim Kaninchen dagegen sind keine IgG-Unterklassen bekannt [57].

Jede Ig-Klasse hat ihren charakteristischen Kohlenhydratgehalt, IgG z.B. enthält 3 % Kohlenhydrate. Polymere Immunglobuline besitzen eine zusätzliche J-Kette. IgA wird teilweise in Körperflüssigkeiten,

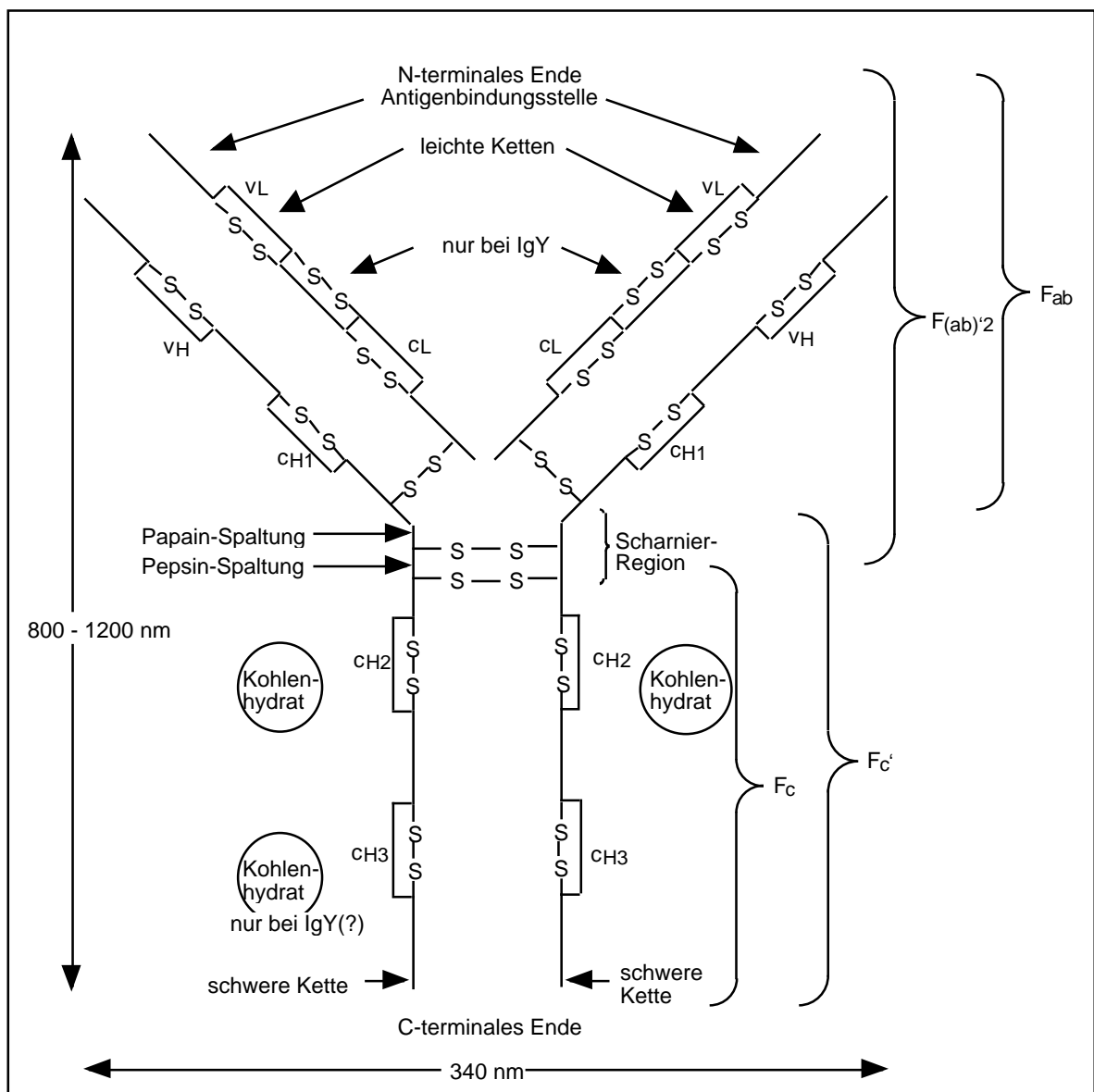


Abb. 1-4: Modell eines Immunglobulin G (IgG) bzw. -Y (IgY)

z.B. Speichel sekretiert. Für den Vorgang der Sekretion benötigt es eine Sekretionskomponente (SC) [57]. Bei den leichten Ketten sind  $\kappa$ - und  $\lambda$ -Ketten bekannt. Im Folgenden wird nur noch das wichtigste Immunglobulin, das IgG behandelt. Das im Laufe dieser Arbeit ebenfalls verwendete IgY aus Eidottern wird in Kapitel 1.5.3.2 beschrieben.

Im Humanserum findet man 1000 mg IgG/ 100 ml Serum [57], Harlow und Lane [59] geben 800 - 1600 mg/100 ml an. Sie machen 80 % der Globulinfraktion aus [57].

Die schwere Kette des IgG hat ein Molekulargewicht von 50.000 Da [57] bis 55.000 Da [62], die leichte Kette von 25.000 Da. Ein Immunglobulinmolekül hat damit eine molare Masse von 150 - 160.000 Da. Behandelt man Immunglobuline unter geeigneten Bedingungen mit Papain, so erhält man 2 antigenbindende Fragmente ( $F_{ab}$ ; Fragment, antigenbindend) und ein Fragment, das nicht an der Antigenbindung beteiligt ist. Dieses Fragment konnte in kristalliner Form dargestellt werden und wird daher als  $F_c$  (Fragment, kristallisierbar) bezeichnet. Es ist für verschiedene Funktionen, u.a. den placentalen Transfer von IgG verantwortlich [57]. Die flexible, enzymesensitive Region wird Scharnier-Region (hinge region) genannt.

Bei Behandlung mit Pepsin entsteht ein bivalentes antigenbindendes Fragment und ein nicht antigenbindendes Fragment, das etwas kleiner ist als jenes, das bei Papainbehandlung entsteht. Diese Fragmente werden als  $F(ab')_2$  und  $F_c'$  bezeichnet. Das  $F(ab')_2$ -Fragment kann durch Cystein in 2  $F_{ab}'$  gespalten werden, ohne die antigenbindenden Fragmente zu beschädigen [57, 59, 60].

#### 1.4.4.3 Anforderungen an das Trägermaterial

Ein idealer Träger für die Immunaффinitätschromatographie sollte eine poröse Struktur und damit eine große Oberfläche haben, leicht zu derivatisieren sein, eine hydrophile, aber ungeladene und inerte Oberfläche besitzen, keine unspezifische Adsorption zeigen sowie mechanisch, mikrobiologisch und chemisch stabil sein. Die Poren müssen so groß sein, daß sowohl Antikörper als auch Antigen in sie eindringen können [48, 50, 61, 62]. Diese Anforderungen sind gleichzeitig nicht optimal zu erfüllen, so daß ein geeigneter Kompromiß gefunden werden muß.

Als Träger werden verschiedene Materialien verwendet. Dazu gehören:

- Agarose wird am häufigsten eingesetzt. Quervernetzung führt zu einer höheren mechanischen Stabilität, die jedoch für die Hochdruck-IAC nicht ausreichend ist [48, 63].
- Polyacrylamid hat besonders gute chemische Eigenschaften: Es ist zwischen pH 2 und pH 10 stabil und tolerant gegen verdünnte organische Säuren. Die Poren von Polyacrylamid sind jedoch bei genügend hoher Quervernetzung, über die die Stabilität des Gels zu steuern ist, zu klein, um ein Eindringen von Antikörpern zu ermöglichen [48].
- Silica ist sehr druckstabil, eignet sich daher auch zu Hochdruckanwendungen. Problematisch ist jedoch, daß Silica zu irreversibler Adsorption und Denaturierung von Proteinen neigt, wenn es nicht durch Derivatisierung mit einer hydrophilen Oberfläche ausgestattet ist. Außerdem ist Silica empfindlich gegen hohe pH-Werte [48, 63].
- Auch Cellulose wird als Trägermaterial verwendet. Sie ist jedoch nicht porös und nicht einheitlich [48].

#### 1.4.4.4 Aktivierung des Trägermaterials

Zur Immobilisierung von Antikörpern sind mehrere Verfahren möglich und üblich. Wichtig ist bei allen Methoden, daß der für das jeweilige Immobilisierungsverfahren optimale Puffer und pH-Wert verwendet wird. Dabei ist auch zu berücksichtigen, daß die Reaktionsbedingungen nicht die Antikörper schädigen. Von der Kopplungsmethode hängt auch die Stabilität der resultierenden Bindung ab. Die ideale Kopplungs- und Aktivierungsreaktion erfüllt die folgenden Bedingungen [50]:

- Sie läuft schnell ab.
- Sie ermöglicht die Bildung einer stabilen, ungeladenen, kovalenten Bindung unter milden Reaktionsbedingungen.
- Verbleibende aktive Gruppen können durch hydrophile, ungeladene Gruppen einfach blockiert werden.
- Es werden billige, nicht toxische Reagenzien benötigt.
- Der Arbeitsaufwand ist gering.

Der Aktivierungsgrad des Trägers spielt in diesem Zusammenhang ebenfalls eine große Rolle. Ist die Anzahl der aktiven Gruppen an der Matrix zu hoch (dieses ist bei den meisten kommerziell erhältlichen Materialien der Fall [64]), werden zu viele Antikörper gebunden. Die Antigenbindungsstellen sind so durch die räumliche Nähe untereinander sterisch gehindert [51, 65, 66].

Außerdem werden die Antikörper an mehreren Stellen gleichzeitig gebunden („multi-site attachment“ oder „multi-point attachment“), so daß die Quartärstruktur verzerrt wird und die Aktivität der Antikörper sinkt [62, 64].

Die spezifische Aktivität der immobilisierten Antikörper sinkt also bei Erhöhung der Antikörperdichte und bei Erhöhung der Trägeraktivierung [50, 61, 62]. Dieses gilt allerdings nicht, wenn die Antikörperdichte unterhalb von 1 mg/ml Gel liegt [63, 65]. In diesem Fall ist die sterische Hinderung der Antigenbindungsstellen untereinander bedeutungslos.

Die Bindung der Antikörper an mehreren Stellen kann durch Verringerung der aktiven Gruppen des Trägers und durch die richtige Wahl von pH-Wert und Reaktionszeit verhindert werden [65].

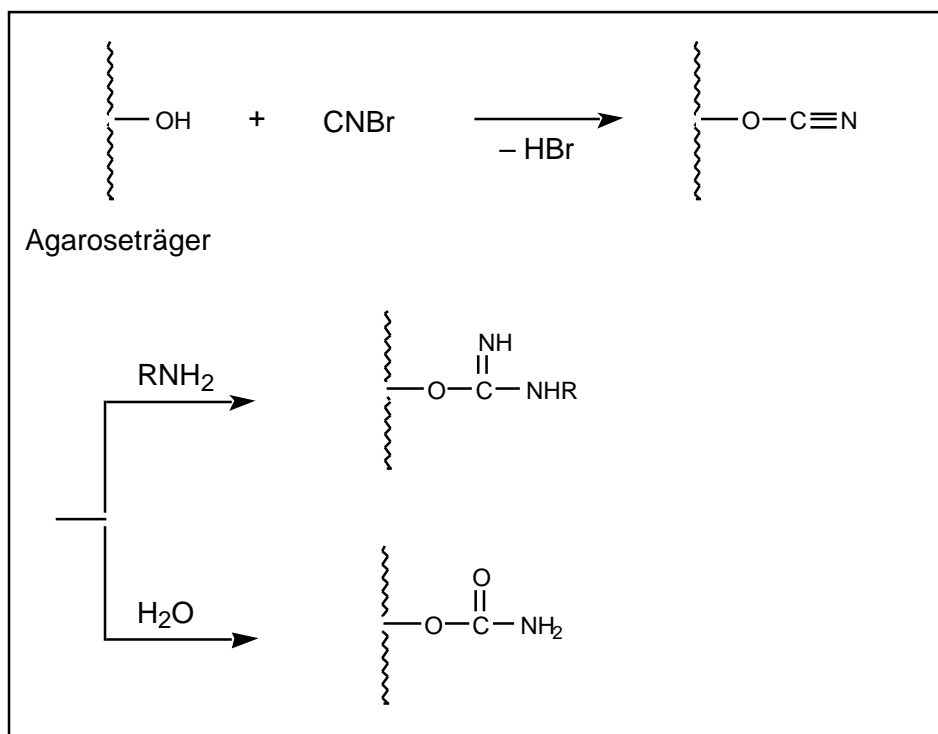
Ein wesentlicher Parameter zur Beurteilung der Antikörperdichte ist nicht die durchschnittliche Antikörperdichte, sondern die lokale Antikörperdichte. Findet die Kopplungsreaktion zu schnell im Verhältnis zur Diffusionsgeschwindigkeit der Antikörper in das Gel statt, so ist die Antikörperdichte an den Außenseiten der Gelpartikel hoch, während im Innern nur wenige Antikörper immobilisiert werden.

Die lokale Antikörperdichte ist so stellenweise hoch, die durchschnittliche Dichte jedoch niedriger. Die Bindungskapazität des Gels liegt aber aufgrund der sterischen Hinderung an den Orten hoher Antikörperdichten niedriger, als aufgrund der durchschnittlichen Antikörperdichte zu erwarten wäre [66].

#### 1.4.4.5 Ungerichtete Immobilisierung

Als aktive Gruppen des Antikörpers dienen Amino-, Sulfhydryl- oder Hydroxyfunktionen. Meistens werden die Antikörper über Aminofunktionen an einen Cyanbromid-, N-Hydroxysuccinimid (NHS)-, Carbonyldiimidazol (CDI)-, Toluolsulfonylchlorid- (Tresyl-) oder Oxiran-aktivierten Träger gebunden [62]. Die aktive Gruppe sollte in jedem Fall über einen Spacer an den Träger gebunden werden, um den daran zu koppelnden Antikörper auf Abstand zum Träger zu halten. Dadurch werden sterische Effekte vermindert [65]. Folgende Aktivierungsmechanismen werden eingesetzt:

- Die *Cyanbromid-Aktivierung* ist die mit Abstand am häufigsten eingesetzte Methode (Abb. 1-5). Sie hat jedoch den Nachteil, daß die entstehende Isoharnstoff-Bindung bei neutralem pH eine positive Ladung trägt und dadurch Ionenaustauscheffekte erzeugt, und daß sie relativ instabil besonders gegenüber Nucleophilen ist. Dieses führt zum Verlust von Antikörpern bei mehrfachem Gebrauch des Materials („ligand-leakage“) [48, 62, 63, 67, 68].
- Die *Aktivierung mit N-Hydroxysuccinimid (NHS)* ergibt eine stabile Amidbindung, die jedoch empfindlich gegenüber Alkali ist. Bei neutralem und saurem pH ist jedoch kein Ligandenverlust zu beobachten [48, 62, 67]. Die Reaktion der NHS-Gruppe mit der Aminofunktion läuft quantitativ ab [67].
- Aus der *Aktivierung mit Carbodiimid (CDI)* resultiert eine stabile, ungeladene Urethan-Bindung ohne Ligandenverlust [48, 62, 68].
- Die *Tresylgruppe* reagiert mit primären Aminen und Sulfhydrylgruppen und führt zu einer stabilen, sekundären Amin- oder Thioether-Bindung, jedoch ist auch hier wie bei der Cyanbromidaktivierung der Verlust von Antikörpern bei mehrfachem Gebrauch festzustellen [48, 62, 67]. Die Reaktions-

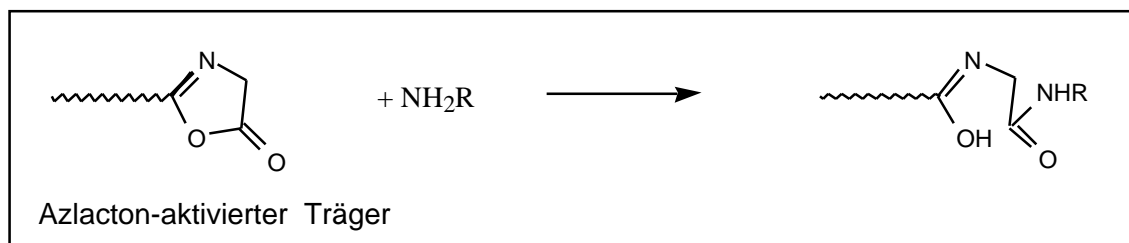


**Abb. 1-5:** Aktivierung von Agarose mit Cyanbromid und Immobilisierung von Proteinen

ausbeute bei der Immobilisierung ist nahezu quantitativ [67].

- Ein oxiranaktivierter Träger bindet an primäre Amino-, Sulfhydryl- und Hydroxylgruppen. Es entstehen stabile sekundäre Amine, Thioether und Ether.

- Aktivierung mit Azlacton (Abb. 1-6). Die aktive Gruppe reagiert vorwiegend mit primären Aminen, so daß eine Amidbindung entsteht. Außerdem ist die Reaktion mit Hydroxyl- und Sulfhydrylgruppen möglich.



**Abb. 1-6:** Immobilisierung von Proteinen an einer Azlacton-aktivierten Matrix

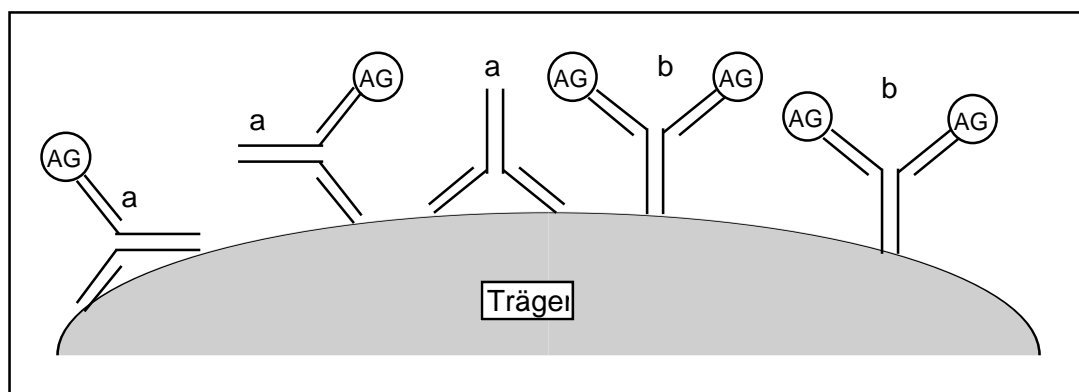
Diese Kopplungsmethoden haben zur Folge, daß die Antikörper in unterschiedlicher Orientierung zum Träger gebunden werden [62] („statistische“ oder „ungerichtete Kopplung“) und die meisten Antikörper ihre Fähigkeit zur Bindung des Antigens verlieren (Abb. 1-7 a). Ursache dafür kann sein [51, 62, 64, 65, 69]:

- Die Immobilisierung erfolgte an der Antigenbindungsstelle, die immer an den N-terminalen Enden des Proteins liegt. Da die terminalen Aminogruppen der Antigenbindungsstelle einen geringeren pK-Wert haben und daher reaktiver sind, ist eine Kopplung an dieser Stelle wahrscheinlicher als an anderen Aminogruppen [62].

- Eine Antigenbindungsstelle ist zur Matrix orientiert, so daß sie sterisch gehindert ist.

Durch die genannten Effekte können nur 1 - 30 % der theoretischen Antikörperaktivität nach der statistischen Kopplung genutzt werden [62, 64].

Tabelle 1-3 gibt eine Übersicht über die in der Literatur beschriebenen Anwendung der ungerichteten Immobilisierung von Antikörpern.



**Abb. 1-7:** Ungerichtete (a) und gerichtete (b) Immobilisierung von Antikörpern

**Tab. 1-3:** Exemplarische Übersicht über die ungerichtete Immobilisierung von Antikörpern in der Literatur (nicht vollständig)

<b>Aktivierung</b>	<b>Matrix</b>	<b>Analyt</b>	<b>Antikörper</b>	<b>Quelle</b>
CNBr	Agarose	Lysozym	Fragmente	[70]
		Lysozym	Fragmente	[71]
		Lysozym	monoklonal	[51]
		Cytokinine	polyklonal	[72]
		humane Plasmaproteine	monoklonal	[65]
		Diethylstilbestrol	polyklonal	[73]
		Aflatoxin M1	polyklonal	[74]
		Östrogene	polyklonal	[75]
Tresyl	Agarose	Clenbuterol	polyklonal	[76]
		19-Nortestosteron	polyklonal	[77]
		19-Nortestosteron	monoklonal	[78]
		19-Nortestosteron	polyklonal	[78]
		Virusproteine	monoklonal	[97]
		Penicillin G	polyklonal	[79]
Tresyl	Silica	Lysozym	Fragmente	[80]
		Lysozym	monoklonal	[80]
Tresyl	synthetisches Polymer	Prostaglandin F2a	polyklonal	[81]
NHS	Agarose	Cytokinine	polyklonal	[72, 82]
		Virusproteine	monoklonal	[67]
CDI	Agarose			[82]
		Lysozym	monoklonal	[51]
		Cytokinine	polyklonal	[72]
CDI	Silica			[83]
CDI	synthetisches Polymer	Lysozym	monoklonal	[51]
		Chloramphenicol	monoklonal	[68]
		Penicillin G	polyklonal	[79]
Oxiran	Agarose			[82]
Oxiran	Silica			[83]
		Albumin	polyklonal	[56]
		Transferrin	polyklonal	[52, 56]
Oxiran	synthetisches Polymer	Carboxypeptidase A	monoklonal	[63]
		Meerrettichperoxidase	monoklonal	[52, 63]
		Penicillin G	polyklonal	[83]
Aldehyd	Agarose	Cytokinine	polyklonal	[72]
		Humanserumalbumin	polyklonal	[84]
Aldehyd	Silica	Cytokinine	polyklonal	[72, 85]
		Cortisol	polyklonal	[86]

## 1.4.4.6 Gerichtete Immobilisierung

Um die Nachteile der genannten Kopplungsmethoden zu umgehen, besteht die Möglichkeit, eine gerichtete Immobilisierung durchzuführen. Dabei werden die Antikörper mit ihrem F<sub>c</sub>-Teil, der nicht an der Antigenbindung beteiligt ist, an den Träger gebunden (Abb. 1-7 b). Bei polyklonalen Antikörpern kann so die dreifache Kapazität gegenüber der statistischen Immobilisierung erreicht werden [64].

Auch für die gerichtete Kopplung gibt es verschiedene Methoden:

- Der F<sub>c</sub>-Teil vieler IgG-Unterklassen bindet an *Protein A*. Immobilisiert man Protein A an einen unlöslichen Träger, kann man daran die Antikörper binden. Durch Quervernetzung wird die Bindung stabilisiert [48, 87 - 89].

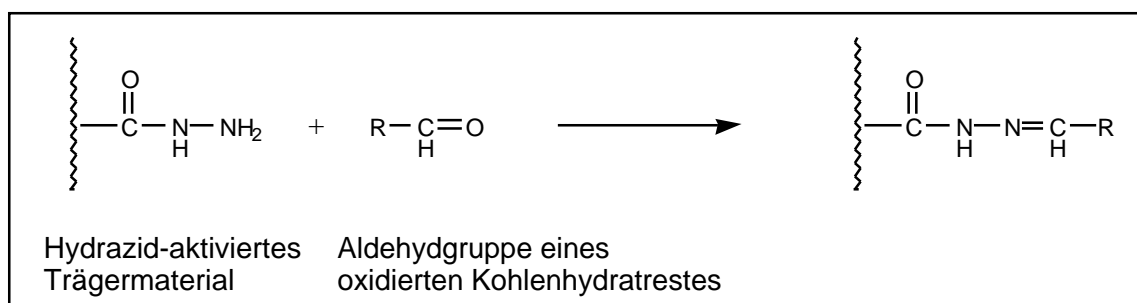
- Durch Spaltung mit den proteolytischen Enzymen Pepsin oder Papain kann man den F<sub>c</sub>-Teil der Immunglobuline abspalten. Die übrigbleibenden *F<sub>ab</sub>*- bzw. *F<sub>(ab)</sub>'<sub>2</sub>*-Fragmente behalten ihre volle Antigenbindekazität. An der Stelle, an der der F<sub>c</sub>-Teil abgespalten wurde, sind Sulfhydrylgruppen oder Disulfidbrücken lokalisiert, an denen man die F<sub>ab</sub>-Teile immobilisieren kann [69, 84].

- Der gebräuchlichste Weg für die gerichtete Immobilisierung von Antikörpern führt über den im F<sub>c</sub>-Teil lokalisierten *Kohlenhydratanteil* der Immunglobuline an einen Amino- oder *Hydrazid-aktivierten Träger*. Der F<sub>c</sub>-Teil ist nicht an der Antigenbindung beteiligt. Durch enzymatische Oxidation oder die Oxidation mit Natriummetaperiodat kann an dieser Stelle eine Aldehydgruppe generiert werden. Unter milden Reaktionsbedingungen wurde kein Aktivitätsverlust der Immunglobuline durch Oxidation von Aminosäuren beobachtet [90, 91]. Die Aldehydgruppe reagiert mit dem Träger (Abb. 1-8).

Ein Hydrazid-aktivierter Träger ist gegenüber einem mit Aminogruppen aktivierten Träger zu bevorzugen, da bei der Kopplung an ein primäres Amin eine instabile Schiff'sche Base entsteht, die zur Stabilisierung reduziert werden muß. Die Reduktion kann zum Aktivitätsverlust der Antikörper führen. Außerdem kommt es zu Konkurrenzreaktionen zwischen den Aminofunktionen der Matrix und denen der Antikörper selbst, so daß mit inter- und intramolekularer Vernetzung der Antikörper gerechnet werden muß. Auch dieses führt zum Aktivitätsverlust.

Immobilisiert man die oxidierten Antikörper an einen Hydrazid-aktivierten Träger, so kann man den pH-Wert des Kopplungspuffers senken, da der pK-Wert des Hydrazids bei 3 liegt (prim. Amin: 9 - 10). Um die Hydrazidgruppe in der reaktiven unprotonierten Form vorliegen zu haben, reicht daher ein pH-Wert von 4,5 - 5,5. Die primären Aminofunktionen sind unter diesen Bedingungen noch protoniert und damit nicht reaktiv.

Das entstehende Hydrazon ist stabil und bedarf keiner Reduktion [48, 62]. Die Reaktionsausbeute



**Abb. 1-8:** Immobilisierung von Proteinen über eine durch Oxidation eines Kohlenhydratrestes entstandene Aldehydgruppe

zwischen Hydrazid und Aldehyd beträgt ca. 80 % [67].

Die Vorteile der gerichteten Immobilisierung über den Kohlenhydratrest der Immunglobuline kommen nicht zum Tragen, wenn auch der Fab-Teil Kohlenhydrate enthält. Dieses ist bei einigen monoklonalen Antikörpern beobachtet worden [65].

Tabelle 1-4 gibt eine Übersicht über die Anwendungen für die gerichtete Immobilisierung von Antikörpern in der Literatur.

**Tab. 1-4:** Exemplarische Übersicht über die gerichtete Immobilisierung von Antikörpern in der Literatur (nicht vollständig)

<b>Aktivierung</b>	<b>Matrix</b>	<b>Analyt</b>	<b>Antikörper</b>	<b>Quelle</b>
Protein A	Controlled Pore Glass	Human-IgG	polyklonal	[88]
Protein A	Agarose	Adenosindeaminase	monoklonal	[87]
		Membranproteine	monoklonal	[89]
Malein- säureimid	Agarose	Maus-IgG	Fragmente	[69]
				[84]
Hydrazid	synthetisches Polymer	Human-IgG	polyklonal	[62]
		Maus-IgG	polyklonal	[62]
Hydrazid	Agarose	Humanplasmaproteine	monoklonal	[65]
		BSA	polyklonal	[84]
		Humanserumalbumin	polyklonal	[84]
		Virusproteine	monoklonal	[67]
		Human-IgG	polyklonal	[92]
		BSA	polyklonal	[64]
		BSA	polyklonal	[93]
		Human-IgG	polyklonal	[94]
		Maus-IgG	polyklonal	[69]
		Penicillin G	polyklonal	[79]
Hydrazid	Cellulose	Ovalbumin	polyklonal	[95]

## 1.5 Immunogensynthese

### 1.5.1 Immunogene zur Gewinnung von anti-Penicillin-Antikörpern

Penicilline sind mit einer relativen Molmasse von ungefähr 300 zu klein, um von einem Immunsystem erkannt zu werden und eine Immunantwort auszulösen. Andererseits können sie als Haptene von entsprechenden Antikörpern gebunden werden. Um Haptene mit immunogenen Eigenschaften auszustatten, koppelt man sie an Proteine oder andere Makromoleküle. Als Trägerprotein (in der Literatur häufig als „carrier“ bezeichnet) werden z.B. keyhole limpet hemocyanin (KLH, das Hämocyanin einer marinen Napfschnecke), bovines Serumalbumin (BSA) [57, 59], humanes Serumalbumin (HSA) [53] oder Ovalbumin (OVA) [96] eingesetzt. Bei einer direkten Verknüpfung von Hapten und Trägerprotein wird das Hapten vom Immunsystem nur schlecht erkannt. Daher wird oft zwischen Hapten und Protein ein Spacermolekül eingesetzt. Die Struktur des Hapten-Protein-Konjugates bestimmt, welches Epitop des Haptens nach außen gerichtet und für das Immunsystem zugänglich ist. Sie bestimmt daher die resultierende Spezifität der Antikörper.

Meistens wird von der Aufgabenstellung ein hochspezifischer Antikörper mit Spezifität für eine Verbindung und minimaler Kreuzreaktivität zu verwandten Substanzen verlangt. Will man jedoch strukturverwandte Metaboliten miterfassen oder eine Substanzfamilie analysieren, so wird ein Antikörper benötigt, der eine geringere Spezifität und eine stärkere Kreuzreaktivität zu strukturverwandten Substanzen besitzt [97].

In der Literatur werden verschiedene Konzepte für die Synthese von Immunogenen dargestellt, mit denen sich Antikörper gegen Penicilline gewinnen lassen. Eine klassische Methode ist die Kopplung von  $\beta$ -Lactamen bei leicht alkalischem pH-Wert [98, 99] oder bei leicht saurem pH-Wert [98] unter Ringöffnung an ein Trägerprotein. Damit wird ein Immunogen gebildet, das auch *in vivo* bei Penicillin-Applikation sowohl bei Mensch als auch bei Tier für die Ausbildung einer Penicillin-Allergie verantwortlich ist. Die antigene Determinante ist die Penicilloylgruppe [99].

Daher wird auch die Injektion von unverändertem Benzylpenicillin vorgenommen, um zu entsprechenden Antikörpern zu gelangen [100].

Jackman [96] band Benzylpenicillin über die Carboxylfunktion direkt ohne Spacer an die primären Aminofunktionen von Proteinen. Die entstandenen Antikörper besaßen daher eine hohe Spezifität gegen den Benzylrest.

Keppeler [101] nahm eine Azokupplung von derivatisiertem Benzylpenicillin an ein Protein vor. Hierbei sind jedoch die Diazotierung, die im stark sauren Bereich stattfinden muß, und die Azokupplung im Alkalischen wegen der unzureichenden Stabilität der Penicilline kritische Punkte.

Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung eines Penicillin-Immunogens ist die Kopplung der Aminofunktion des Ampicillins an die Sulfhydrylgruppe des Trägerproteins mittels eines bifunktionellen Spacers, der einen NHS-Ester sowie Maleinsäureimid als funktionelle Gruppen trägt [102].

Berger [79] erhielt ein Benzylpenicillin-Immunogen, indem er Benzylpenicillin mit der Carboxylfunktion über das heterobifunktionelle Reagens N-Hydroxysuccinimidyl-4-Azidobenzoat mit Hilfe einer UV-induzierten Reaktion an KLH band.

Märtlbauer et al. koppelten Cloxacillin mit der Carboxylfunktion an humanes Serumalbumin und erhielten Antikörper mit Reaktivität gegen die Isoxazoly]penicilline [53].

### 1.5.2 Methoden zur Kopplung von Haptenen an Trägerproteine

Meistens wird ein Hapten an die Carboxyl- oder Aminofunktionen des Trägerproteins gebunden. Die Bindung an Kohlenhydratreste oder die Bildung von Disulfidbrücken ist ebenso denkbar. Typischerweise wird ein Hapten so modifiziert, daß es eine Carboxylfunktion trägt, die an eine Aminogruppe des Proteins gebunden werden kann [97].

Die erforderliche Bindung an die primären Aminofunktionen des Trägerproteins ist über verschiedene Methoden zu knüpfen:

- Durch die Reaktion mit einer Carbonsäure entsteht eine Amidbindung. Die Reaktion kann mit *N-Hydroxysuccinimid (NHS)/Carbodiimid (CDI)* beschleunigt werden. Der resultierende NHS-Ester ist stabil und kann vor der Kopplung mit dem Protein aufgereinigt werden [97].

Eine alleinige Katalyse mit CDI [106] ergibt nur Ausbeuten von durchschnittlich 20% [61]. CDI ist einfach in der Handhabung, jedoch sind die Intermediate instabil und müssen sofort weiterverarbeitet werden [97].

- Auch die Methode über das *gemischte Anhydrid* ist möglich [57]. Das gemischte Anhydrid ist ebenso instabil und wird in der Regel sofort weiterverwendet [97].

- Eine Zweischnittreaktion ist der Weg über das *Säurechlorid*. Hier muß zunächst das Säurechlorid synthetisiert, isoliert und analysiert werden, bevor es mit dem Amin umgesetzt wird.

- Soll eine Bindung zwischen zwei Aminofunktionen erzeugt werden, kommt die Diazotierung mit anschließender *Azokupplung* in Frage. Dazu muß der Spacer einen aromatischen Rest besitzen [57, 103]. Die Reaktionsbedingungen (stark sauer bei der Diazotierung, alkalisch bei der Azokupplung) sind jedoch nicht für  $\beta$ -Lactame geeignet.

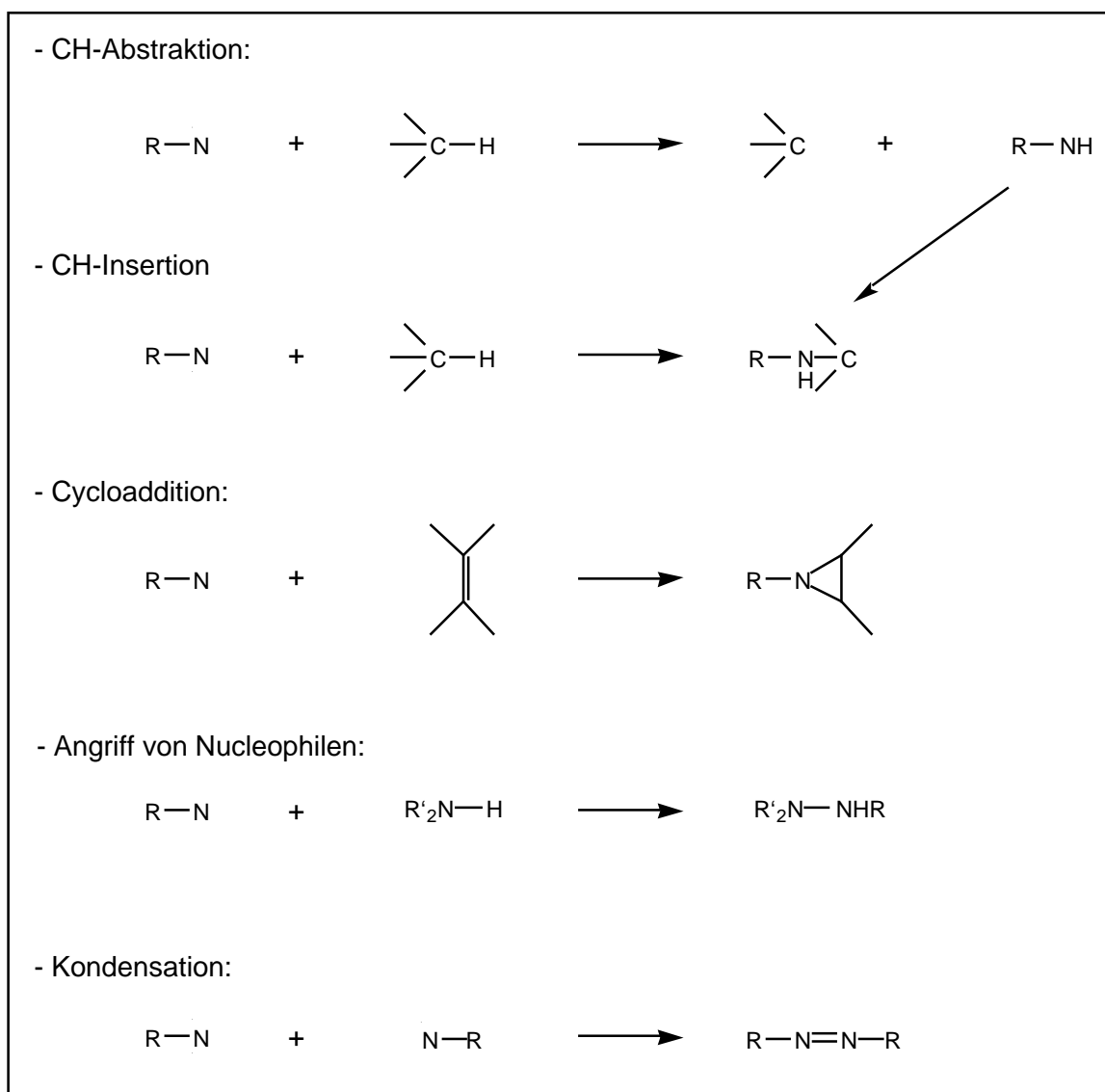
- Auch an sulfhydrylgruppenhaltige Spacer kann gekoppelt werden. Dazu werden heterobifunktionelle Reagenzien mit *NHS-Estern und Maleinsäureimid* als funktionelle Gruppen verwendet [57].

- Eine unspezifische Reaktion ist die Reaktion von einem *Nitren* mit einem Protein. Als Nitrenbildner wird ein Arylazid verwendet, das bei UV-Bestrahlung Stickstoff eliminiert [104 - 107]. Nitrene haben eine Lebensdauer im Bereich von  $10^{-4}$  Sekunden [107, 108] und zeigen die in Abbildung 1-9 skizzierten Reaktionen [103, 107 - 109].

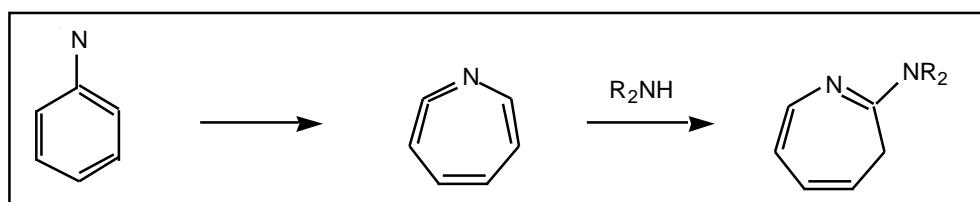
Die CH-Insertion findet nur bei stark elektroaffinen Substituenten am Arylnitren statt [110].

Die Aktivierungsenergie der Nitrenreaktionen ist sehr gering, man kann daher auch bei niedrigen Temperaturen arbeiten [107].

Heute geht man davon aus, daß sich das entstehende Singulett-Arylnitren rasch zu einem reaktionschwächeren, sehr elektrophilen Intermediat (Azacycloheptatetraen) umlagert, das anschließend mit Aminen reagiert [106, 108, 110] (Abb. 1-10):



**Abb. 1-9:** Mögliche Reaktionen von Nitrenen [107]



**Abb. 1-10:** Reaktion von Singulett-Arylnitrenen über ein elektrophiles Intermediat

Das elektrophile Intermediat reagiert nicht unter CH-Insertion [106]. Ist kein Amin als Reaktionspartner für das Nitren vorhanden, so entsteht Anilin [111].

Die Hauptreaktion ist der nucleophile Angriff durch primäre Amine.

### 1.5.3 Antikörperquellen

#### 1.5.3.1 Antikörper aus Säugetieren

Säugetiere wie Mäuse, Ratten, Kaninchen, Ziege oder Pferd werden im allgemeinen zur Gewinnung von Antikörpern herangezogen. Während Mäuse und Ratten nur geeignet sind, wenn geringe Mengen der Antikörper benötigt werden, ist die aus den größeren Tieren erhaltene Antiserumausbeute normalerweise genügend groß. Bei der Auswahl der Tiere ist ein Kompromiß zu finden zwischen Größe der Tiere, mit der der Aufwand für Haltung und Pflege der Tiere steigt, und der zur Verfügung stehenden Antiserummenge, die mit der Größe der Tiere steigt. Daher werden in den meisten Fällen Kaninchen als Antikörperquelle gewählt, da der Haltungs- und Pflegeaufwand in einem angemessenen Verhältnis zur verfügbaren Antiserummenge steht [59].

#### 1.5.3.2 Aviäre Antikörper

Wie bei Säugern ist auch bei Vögeln eine „Leihimmunität“ oder „passive Immunität“ der Jungtiere bekannt: Während der Embryonalentwicklung und für eine bestimmte Zeit nach der Geburt ist das Immunsystem des Jungtieres noch nicht voll funktionsfähig. Für diese Zeit muß das Tier vor Infektionen geschützt werden, indem es von der Mutter Antikörper erhält [112, 113].

Während bei Säugern die Mutter Antikörper über den Blutkreislauf über die Plazenta sowie über die Milch an die Nachkommen weitergibt, werden bei Vögeln die Immunglobuline im Dotter angereichert. Dabei findet eine Aufkonzentrierung von IgY statt: Im Serum findet man ein Verhältnis von IgY : IgM : IgA = 6 : 1,3 : 0,6 mg/ml vor, im Dotter liegt es bei 25 : < 0,03 : < 0,03 mg/ml [112]. Im Eiklar dagegen ist kein IgY nachzuweisen [114]. Eine vergleichbare Selektivität ist auch beim Säuger zu beobachten: Über die Plazentaschranke wird nur IgG transferiert [60].

IgY ist die von Leslie und Clem [115] eingeführte Bezeichnung für die im Dotter wichtigste Immunglobulinklasse (Y für yolk = Dotter). IgY wird wie IgG beim Säuger im Verlauf der Immunreaktion erst in der Sekundärantwort gebildet [57].

Ein Vorteil aviärer Antikörper gegenüber Antikörpern aus Säugern sind die wesentlich höheren Mengen, die im gleichen Zeitraum gewonnen werden können. Schade und Hlinak [112] geben an, daß aus Eidotter die 18-fache Menge an spezifischen Antikörpern verglichen mit Kaninchenserum gewonnen werden können.

Da keine Blutentnahmen notwendig sind, werden die Tiere physisch und psychisch nicht so stark belastet, außerdem ist kein speziell geschultes Personal erforderlich. Dieses ist auch ein Aspekt des Tierschutzes, dem eine immer größere Bedeutung zugemessen wird [112, 116, 117].

In der Struktur und den Eigenschaften gibt es einige Abweichungen zwischen IgG von Säugern und IgY aus Eidotter.

Frühere Ansicht war, daß IgY ein Vorläufer des Säuger-IgA war. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, daß das Säuger-IgE mit dem IgY der Vögel verwandt ist [118]. Beide Antikörperklassen besitzen in der schweren Kette vier konstante und eine variable Domäne. Sowohl IgA als auch IgG hat im Vergleich dazu nur 3 konstante und eine variable Domäne [57, 113, 118]. Die schweren Ketten des

IgY sind daher schwerer als die von IgG [118, 119]. Die leichten Ketten sind vom I-Typ [57].

Als dreidimensionale Struktur wurde eine T-Form sowie eine Y-Form (ähnlich IgG) vorgeschlagen [120]. Die höhere Masse des IgY-Moleküls ist in der Nähe der Scharnier-Region lokalisiert. Dadurch ist die Flexibilität in der Scharnier-Region beim IgY geringer [120, 121]. Bei van Regenmortel [113] findet man, daß IgY keine Scharnier-Region besitzt.

IgY bindet im Gegensatz zu IgG weder an Protein A [50, 57, 112, 113, 122] noch an Protein G [50, 120]. In Tabelle 1-5 sind die strukturellen Unterschiede zwischen IgY und IgG zusammengefaßt.

IgY-Antikörper sind gegenüber Hitze und Säure etwas instabiler als Säuger-IgG:

Bei 30 Minuten bei 70 °C verliert IgY 50 %, bei 10 Minuten bei 80 °C bereits 90 % seiner Aktivität, während IgG noch stabil ist [119].

**Tab. 1-5:** Unterschiede zwischen Immunglobulin G und Immunglobulin Y

	<b>IgY</b>	<b>Quelle</b>	<b>IgG</b>	<b>Quelle</b>
Extinktionskoeffizient (280 nm, 1 %, in 0,3 M KCl)	13,2	[115]	15,2	[115]
Kohlenhydratanteil	2,2 %	[115]	0,8 %	[115]
	5 - 8 %	[57]	3 %	[57]
Molgewicht	160.000	[123]	160.000	[59]
	165.000	[124]	150.000	[75]
	170.000	[57, 115]		
	180.000	[125]		
	163 - 206.000	[126]		
Molgewicht (leichte Kette)	22.000	[115]	20 - 25.000	[57]
	30.000	[125]	25.000	[59]
Molgewicht (schwere Kette)	67.500	[115]	50.000	[57]
	67.000	[57, 113, 125]	55.000	[59]
konst. Domänen (schwere Kette)	4	[57, 113, 118]	3	[57, 113, 118]
pI	5,2 - 5,7	[126]	5,8 - 7,3	[58]
			6 - 8	[138]

Shimizu et al. [121] ermittelten Aktivitätsverluste von IgY nach 15 Minuten bei 70 °C, bei IgG erst bei 15 min bei 75 - 80 °C.

Unterhalb pH 4 verliert IgY 60 % seiner Aktivität, IgG nur 10 % [119].

Die Stabilität im Alkalischen ist bei beiden Antikörperklassen vergleichbar [121].

Die Lagerdauer ist jedoch weder bei IgY noch bei IgG problematisch. Larsson et al. geben eine Haltbarkeit von IgY von 10 Jahren bei 4 °C, von 6 Monaten bei Raumtemperatur und einem Monat bei 37 °C und von affinitätsgereinigten IgY von mindestens 5 Jahren bei 4 °C an. In welcher Form die Antikörper vorlagen (gefriergetrocknet oder in Lösung), wird jedoch nicht angegeben [122].

Die Stabilitätsunterschiede werden mit den Strukturunterschieden erklärt: IgG enthält im Gegensatz zu

IgY eine zusätzliche Disulfidbrücke zwischen der variablen und der konstanten Domäne der leichten Kette. Außerdem ist die  $\beta$ -Faltblattstruktur in der Scharnier-Region bei IgY nur 30 Aminosäuren groß, während sie bei IgG 215 - 229 Aminosäuren enthält. Dieses macht IgY in der Scharnierregion unflexibler und wahrscheinlich auch unstabiler [121].

## 1.6 Immunisierung der Versuchstiere

Kaninchen können mit Hapten-Protein-Konjugaten subcutan, intradermal und intravenös immunisiert werden. Meistens wird die subcutane Applikationsroute gewählt, da diese am unkompliziertesten ist. Als Adjuvans wird normalerweise Freundsches Adjuvans verwendet. Die Immunogenmenge sollte zwischen 50 und 1000  $\mu\text{g}$  liegen. Die erste Folgeimmunisierung erfolgt am besten nach 2 - 3 Wochen, die weiteren Injektionen jedoch alle 4 - 6 Wochen. Wird früher immunisiert, wird das injizierte Immunogen teilweise von den gerade gebildeten und in hoher Konzentration im Blut zirkulierenden Antikörpern komplexiert [59].

Hühner zeigen starke individuelle Unterschiede in der Reaktion, man sollte daher mindestens 5 Hühner immunisieren [127].

In der Literatur findet man unterschiedliche Angaben zur Immunisierung von Hühnern. Die Antikörperbildung soll abhängig sein von der Größe des Antigens; Antigene mit einem Molekulargewicht von unter 150.000 Da rufen einen geringeren Antikörpertiter hervor [128]. Allein aus diesem Grunde scheint es nicht sinnvoll, ein 6-APA-OVA-Konjugat als Immunogen zu verwenden, da Ovalbumin ein Molekulargewicht von nur rund 45.000 Da besitzt. Der Antikörpertiter ist nicht konstant über eine länger Zeit, sondern unterliegt einem „Biorhythmus“ [129].

Meistens wird in den Pectoralmuskel injiziert. Andere Injektionsarten werden praktiziert, sollen jedoch keinen Vorteil haben [112]. Die Antigenmengen variieren von wenigen  $\mu\text{g}$  bis zu mehreren mg. Als Antigene werden Bakterien, Viren, Parasiten, Proteine und Peptide eingesetzt [129].

Als Adjuvans dient in den meisten Fällen Freundsches Adjuvans. Das komplette Freundsches Adjuvans (FCA), das meistens zur 1. Injektion verwendet wird, soll nach Kühlmann et al. [117] und Schade und Hlinak [112] für einen über lange Zeit stabilen Titer sorgen. Die durch FCA verursachten Nebenwirkungen sind bei Legehennen nach Literaturangaben schwach im Vergleich zu Säugetieren [112, 129]. Andererseits berichten Erhard et al. [130] von ausgedehnten Entzündungen und Granulomen an den Injektionsstellen.

Neuerdings werden auch Versuche mit synthetischen Lipoproteiden als Adjuvantien beschrieben [130, 131]. Diese stellten sich als äußerst wirksam und frei von Nebenwirkungen heraus.

## 1.7 Charakterisierung polyklonaler Antikörper

Antiseren können durch drei Größen beschrieben werden: den Titer, die Spezifität sowie die Assoziationskonstante.

Der *Titer* beinhaltet sowohl die im Antiserum enthaltene Menge an spezifischen Antikörpern als auch

die Affinität der Antikörper zum Antigen bzw. Hapten. Er ist als optimale Verdünnung des Antiserums für einen Immunoassay definiert und stellt die Verdünnung dar, bei der 50 % des markierten Antigens im System gebunden werden [132]. Die Bestimmung erfolgt durch die Zugabe von konstanten Mengen markierten Antigens zu verschiedenen Verdünnungsstufen des Antiserums. Durch Auftragen des gebundenen Anteils gegen die Antiserumverdünnung in halblogarithmischer Darstellung bestimmt man die Verdünnung, die 50 % des Antigens bindet.

Diese Definition macht jedoch dadurch, daß als Bezugsgröße die angebotene Haptenmenge gewählt wird, den Titer von der Menge Hapten abhängig, die im Assay eingesetzt wird. Der Titer eines Antiserums stellt also nur bedingt ein Qualitätsmerkmal dar.

Pepper [133], van de Water [134] und de Villiers [135] umgehen diesen Nachteil, indem sie als Titer die Serumverdünnung definieren, die 50 % des maximal gebundenen Haptens bindet.

Allgemein ist der Titer abhängig von der Meßmethode. Ein Antiserum hat im Radioimmunoassay (RIA) einen anderen Titer als im Enzymimmunoassay (EIA) [97].

Die *Affinität* beschreibt die Bindungsstärke zwischen Antigen und Antikörper, die aus dem Massenwirkungsgesetz abgeleitet werden kann. Sie wird als Assoziations- bzw. Dissoziationskonstante ausgedrückt. Für polyklonale Seren finden sich schwerpunktmäßig Dissoziationskonstanten von  $10^{-8}$  bis  $10^{-6}$  mol/l angegeben [50], jedoch sind auch geringere Dissoziationskonstanten bekannt (z.B.  $10^{-10}$  mol/l für anti-Chloramphenicol-Antiseren [137]).

Die Bestimmung der Assoziationskonstante  $K_a$  hat Scatchard [138] für die Reaktion von kleinen Molekülen (Haptenen) mit Antikörpern mit Hilfe von Modellrechnungen beschrieben. In einem Assay werden steigende Mengen an markiertem Hapten einer konstanten Menge Antikörpern [AB] zugesetzt. Nach Gleichgewichtseinstellung werden gebundene Fraktion [B] und ungebundene Fraktion [F] getrennt und der Quotient ( $[B]/[F]$ ) gegen [B] in einem Diagramm aufgetragen (Scatchard-Plot). Es ergibt sich gemäß der von Scatchard hergeleiteten Gleichung:

$$[B]/[F] = K_a[AB] - K_a[B]$$

eine Gerade mit negativer Steigung, welche  $-K_a$  darstellt. Der x-Achsenabschnitt gibt die Anzahl der Antigenbindungsstellen [AB] wieder, der y-Achsenabschnitt stellt ( $K * [AB]$ ) dar.

Der Meßbereich sollte mindestens von 20 bis 75 % der Maximalbindung reichen. Für eine einheitliche Bindungsstelle sind 6 bis 10 Meßwerte ausreichend, für zwei Bindungsstellen sind 15 bis 20 Werte erforderlich. Drei verschiedene Bindungsstellen sind maximal erfaßbar, dazu sind mindestens 30 Meßwerte nötig [139].

Scatchard hat u.a. einheitliche Bindungsstellen vorausgesetzt. Dieses ist jedoch nur bei monoklonalen Antikörpern der Fall. Für polyklonale Seren mit Antigenbindungsstellen, die verschieden sind hinsichtlich ihrer Spezifität sowie ihrer Affinität, erhält man aus dem Scatchard-Plot jedoch keine Geradenfunktion. Trägt man die Meßergebnisse von polyklonalen Seren in ein derartiges Diagramm ein, so erhält man eine Kurve, die sich über nichtlineare Regression auswerten läßt. Allerdings sind derartige Messungen mit einem hohen statistischen Fehler behaftet, da die Meßgrößen unterschiedliche

Fehlerverteilungen aufweisen, die nicht den Bedingungen der Regressionsmodelle entsprechen. Ein System mit heterogenen Antigenbindungsstellen ist jedoch unter Zuhilfenahme anderer Meßgrößen mathematisch beschreibbar, das Gleichungssystem ist aber nicht lösbar. Durch Reduzierung des Systems auf zwei verschiedene Antigenbindungsstellen kann man ein lösbares System erhalten. Dieses ist aber nur unter der Voraussetzung möglich, wenn Antikörper gegen niedermolekulare Haptene charakterisiert werden sollen und wenn außerdem die zu testenden Substanzen und die radioaktiv markierte Meßsubstanz die gleiche Affinität gegenüber der Antikörperpopulation besitzt [137]. Diese Voraussetzung ist jedoch in dieser Arbeit nicht erfüllt.

Die *Spezifität* sagt aus, wie genau die Antikörper zwischen dem Antigen bzw. Hapten und chemisch verwandten Verbindungen unterscheiden können. Ein Antikörper mit hoher Spezifität zeigt nur geringe oder keine Affinität zu Antigenen oder Haptenen, die eine ähnliche Struktur besitzen wie das Antigen, gegen das der Antikörper erzeugt wurde. Ist die Affinität zu strukturähnlichen Antigenen hoch, ist die Spezifität des Antiserums gering. Es werden die Affinitäten bzw. die Assoziationskonstanten zweier chemisch ähnlicher Verbindungen verglichen. Man erhält als Größe die relative Kreuzreaktivität.

Man unterscheidet verschiedene Arten der Kreuzreaktivität, die sich daraus ergeben, daß man monovalente und polyvalente Seren differenziert [57]. Monovalente Seren sind spezifisch für ein Epitop, hier handelt es sich meistens um monoklonale Antikörper. Polyvalente Seren sind polyklonale Seren oder Mischungen aus monoklonalen Antikörpern. Diese enthalten Antikörperpopulationen gegen mehrere Epitope eines Antigens.

Die „true crossreactivity“ liegt vor, wenn strukturverschiedene Determinanten von Antigenen mit verschiedenen Affinitäten um die einzige Population von Antigenbindungsstellen konkurrieren. Man findet sie also nur bei monovalenten Seren.

Konkurrieren verschiedene Liganden mit gleicher oder unterschiedlicher Affinität um eine von mehreren Antigenbindungsstellen, so spricht man von „shared reactivity“. Sie setzt sich aus mehreren echten Kreuzreaktivitäten zusammen. Dieses ist bei polyvalenten Seren der Fall.

Die Kreuzreaktivität von Antiseren kann durch die Konkurrenzreaktion eines markierten Antigens oder Haptens mit steigenden Konzentrationen eines Kompetitors gemessen werden [57].

In der Literatur werden polyklonale Seren meist nur durch die Angabe des Titers sowie der Spezifität charakterisiert. Wird  $K_a$  angegeben, wird nur in wenigen Fällen beschrieben, wie der Wert ermittelt wurde.

## 1.8 Isolierung von Antikörpern

### 1.8.1 Antikörper aus Kaninchenserum

Um Antikörper für die Immunaффinitätschromatographie verwenden zu können, müssen diese zunächst aus dem Serum isoliert und gereinigt werden. Die Immunglobulinkonzentration in den Serum betrug ungefähr 10 mg/ml, davon waren rund 2 % spezifisch.

Zur Isolierung von Antikörpern werden verschiedene Verfahren angewendet, die man in verschiedene

Gruppen trennen kann (Tab. 1-6).

Die in Tabelle 1-6 genannten Verfahren bieten größtenteils nur eine grobe Vorreinigung. Lediglich die Affinitätschromatographie an Protein A und an einer anti-Ig-Säule erlauben eine befriedigende Reinigung in einem Schritt. Bei Verwendung anderer Verfahren wird von Halow und Lane [59] sowie von Steward [58] empfohlen, mehrere Methoden zu kombinieren. Steward [58] schlägt die Ammoniumsulfatfällung als ersten Schritt vor, auf den entweder die Ionenaustauschchromatographie, die Gelfiltration, Elektrophorese oder die Gradientenultrazentrifugation folgen kann. Auch die Verbindung von Ammoniumsulfatfällung und Anionenaustauschchromatographie sowie die fraktionierende Präzipitation mit Caprylsäure und Ammoniumsulfat haben sich als gute Kombinationen erwiesen [59]. Farjam et al. [75] präzipitieren zunächst die nicht-IgG-Proteine mit Caprylsäure, um anschließend die polyklonalen Antikörper mit Ammoniumsulfat (50 % Sättigung) zu fällen.

Zur Isolierung von Kaninchen-IgG haben sich die Kombinationen Ammoniumsulfatfällung/Anionenaustauschchromatographie, Chromatographie an Hydroxylapatit/Ammoniumsulfatfällung [59].

### 1.8.2 Antikörper aus Eidotter

Die Isolierung und Reinigung von aviären Antikörpern muß anders vorgenommen werden als die Isolierung und Reinigung von Antikörpern aus Serum, da der Dotter zu ca. 30 % aus Lipoproteinen besteht, die mit den für Seren geeigneten Verfahren nicht abgetrennt werden.

Zu diesem Zweck wurden verschiedene Verfahren entwickelt, die sich hinsichtlich des Arbeitsaufwandes, der damit erreichten Ausbeute und Reinheit der Antikörper sowie den möglichen Aktivitätsverlust unterscheiden (Tab. 1-6).

Für die Isolierung von Immunglobulinen mit Hilfe von Kationenaustausch wurde eine Wiederfindungsrate von 34 % bei einer Reinheit von 60 % ermittelt [148].

Die Kombination HIC/Gelfiltration erreicht geringere Ausbeuten als die Fällung mit Polyethylenglykol nach Polson et al. [141] bei vergleichbarer Aktivität und Reinheit [149].

Mittels Dextransulfatfällung wurden 70 - 80 % Wiederfindung, mittels Wasserverdünnung mit Einfrier- und Auftauzyklus nur 50 - 70 % erreicht [142].

Die Verdünnungsmethode [116], die Polyethylenglykol-Fällung [141], die Dextransulfatfällung [142] sowie die Fällung mit Xanthan wurden von Akita und Nakai [150] vergleichend auf ihre Leistungsfähigkeit getestet. Dabei erreichte die Verdünnungsmethode die höchste Wiederfindung und die höchste Reinheit bei der geringsten Anzahl der Arbeitsschritte. Sie stellten außerdem fest, daß Polyethylenglykol besser die Antikörper präzipitiert als Ammoniumsulfat.