

7.1 Zusammenfassung

Penicilline gehören zu den in der Veterinärmedizin am stärksten eingesetzten Arzneimitteln. Sie werden vor allem zur Therapie und Prophylaxe von Euterentzündungen (Mastitis), bakteriellen Infektionen des Verdauungsapparates und der Harnwege verwendet. Werden Penicilline in der Tiermast zur Lebensmittelgewinnung eingesetzt, können Rückstände bei nicht sachgemäßer Verwendung und Nichteinhalten von Wartezeiten in den Lebensmitteln auftauchen. Der wirtschaftliche Schaden, der durch Antibiotikarückstände – besonders in Milch – durch Störung bei der Herstellung fermentierter Lebensmittel verursacht werden kann, ist beträchtlich. Vereinzelt wurden auch allergische Reaktionen durch den Verzehr von penicillinhaltigen Lebensmitteln beobachtet. In der Europäischen Gemeinschaft wurden deshalb Höchstwerte für Penicillinrückstände in Milch, Muskelfleisch, Leber und Niere festgelegt.

Antibiotikarückstände in Lebensmitteln werden durch mehrstufige Verfahren analysiert, wobei die erste Stufe durch mikrobiologische Verfahren („screening-tests“) abgedeckt wird. Diese lassen im Allgemeinen weder eine Aussage über die Einzelsubstanz noch die Art des Antibiotikums zu. Die Quantifizierung ist mit diesen Testebenenfalls nur eingeschränkt möglich. Daher ist bei rückstandshaltigen Proben eine Analyse mit einem geeigneten physikalisch-chemischen Verfahren notwendig. Erstsokan der Wirkstoff qualitativ und quantitativ ermittelt werden.

Die physikalisch-chemischen Verfahren erfordern sowohl bei gas- als auch bei flüssigchromatographischen Methoden viele verschiedene und aufwendige Arbeitsschritte: Nach der Proteinfällung und Extraktion der Analyten folgte eine zeit- und materialaufwendige Reinigung des Rohextraktes sowie die Anreicherung der Analyten. Vor der abschließenden Chromatographie wird in den meisten Fällen derivatisiert.

Ein relativ neues Verfahren zur Isolierung der Analyten aus der Probenmatrix ist die Immunaффinitätschromatographie. Dabei werden gegen den oder die Analyten spezifische Antikörper erzeugt, die an einen wasserunlöslichen Träger gebunden werden. Dassoerhaltene Chromatographiematerial wird in eine Säule gefüllt, auf die der Probenrohextrakt gegeben wird. Durch die Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen werden die Analyten an das Säulenmaterial gebunden und können in einem nächsten Schritt wieder eluiert werden. Zur anschließenden Anreicherung wird meistens die Festphasenextraktion eingesetzt.

Mit Hilfe der Immunaффinitätschromatographie wurden bisher u.a. Proteine, Hormone und Aflatoxine analysiert. Chloramphenicol ist das einzige Tierarzneimittel, das bisher mit Hilfe der Immunaффinitätschromatographie analysiert wurde. Allen Methoden ist gemeinsam, daß nur ein einzelner Analyt betrachtet wurde. Bei allen Analyten handelt es sich um Moleküle, mit denen hohe Antikörpertiter erzielt sind. Bei der Gewinnung von anti-Penicillin-Antikörpern wurden bisher mit verschiedenen Methoden nur geringe Titer erreicht.

Ziel dieser Arbeit war, ein Antiserum zu entwickeln, das für alle veterinärmedizinisch relevanten Penicilline spezifisch ist, um damit nach der Immobilisierung in einem Analysenlauf alle Penicilline zu isolieren und anschließend in einer direkt angekoppelten Festphasenextraktion automatisch anzureichern und mittels Hochdruckflüssigchromatographie zu analysieren und zu quantifizieren.

Zur Gewinnung der benötigten multispezifischen Antikörper mußte ein Konzept für die Gestaltung eines Immunogens aufgestellt werden. Vorgabe war, daß der β -Lactam-Ringerhalten bleiben sollte, außerdem müssen Penicilline an ein Trägermolekül gebunden werden, da sie alleine keine Immunantwort auslösen können. Sie werden daher als Haptene bezeichnet. Als Hapten wurde das Grundgerüst aller Penicilline, die 6-Aminopenicillansäure (6-APA) gewählt. Die einzelnen Penicilline unterscheiden sich durch die Substitution an der 6-Amino-Funktion. Mit der Aminofunktion wurde daher auch an das Trägerprotein gekoppelt. Dadurch wurde gewährleistet, daß der allen Penicilline gleiche Molekülteil, nämlich der Thiazolidin- und der β -Lactam-Ring, im Immunogen nach außen gerichtet wurde. Die Seitenketten der Penicilline sollten daher keinen Einfluß auf die Erkennbarkeit durch die resultierenden Antikörper haben.

Zwischen Hapten und Trägerprotein war ein Spacer einzusetzen, um das Hapten frei zugänglich für das Immunsystem zu plazieren. Als Spacer wurde 4-Azidobenzoesäure eingesetzt, die aus 4-Aminobenzoesäure durch Diazotierung und nucleophile Substitution mit Natriumazid hergestellt wurde. Nach Umsetzung mit

Oxalsäuredichlorid wurde mit dem entsprechenden Säurechlorid der 6-Aminopenicillansäure acyliert. Das synthetisierte Amid wurde in einem letzten Schritt an die Trägerproteine Ovalbumin (OVA) und Keyhole limpet hemocyanin (KLH) gebunden. Dazu wurde die Azidgruppe genutzt, aus der durch UV-Bestrahlung ein reaktives Nitrogen generiert werden kann, das unspezifisch mit den Trägerproteinen reagiert. Die mit dieser Methode erzielten Haptenkonzentrationen im Trägerprotein lagen zwischen 59 und 114 µg/mg.

Als Versuchstiere dienten drei Kaninchen und fünf Legehennen. Legehennen deponieren ihre Antikörper in hoher Konzentration im Eidotter, so daß hier Blutentnahmen entfallen. Die Kaninchen wurden mit 6-APA-KLH und 6-APA-OVA immunisiert, zur Immunisierung der Legehennen wurde nur das KLH-Immunogen verwendet.

Die Charakterisierung der Antikörper erfolgte bei den Kaninchenserum mittels RIA, bei den Dottern wurde ein ELISA verwendet, da der RIA nicht geeignet war.

Es konnten sowohl bei den Kaninchen als auch bei den Hennen multispezifische Antikörper gewonnen werden. Die Titerfaktoren waren jedoch nur gering (50 - 100 bei den Kaninchen, wobei das KLH-Immunogen den höchsten Titer erzeugte und 100-2000 bei den Legehennen). Die Kreuzreaktivität für die Penicilline Benzylpenicillin, Phenoxymethylpenicillin, Ampicillin, Amoxicillin, Oxacillin, Cloxacillin und Dicloxacillin waren hoch, Cephalexin sowie ein Derivat mit geöffnetem β -Lactamring wurde von den Antikörpern nicht erkannt.

Während die Kaninchen keine großen Unterschiede in ihrer individuellen Reaktion zeigten, waren die Unterschiede zwischen den fünf Hennen auffällig. Bei einem Huhn wurden zunächst 6-APA-spezifische Antikörper festgestellt, erst im Laufe der Immunisierungsperiode entwickelte sich die gewünschte Multispezifität, ein Huhn entwickelte keine befriedigende Multispezifität.

Die Isolierung der Antikörper erfolgte mittels Ammoniumsulfatfällung aus den Seren und mit Polyethylenglykolfällung aus den Dottern.

Die Herstellung von Immunitätschromatographiesäulen mit Hilfe der gewonnenen Kaninchenantikörper scheiterte an den niedrigen Titerfaktoren. Die erzielten Säulenkapazitäten waren gering (0-79 ng/ml Gel). Bei den Dotterantikörpern war aufgrund der hohen zur Verfügung stehenden Menge eine Affinitätsreinigung an einer Säule mit immobilisierter 6-APA möglich. Die Aktivität und Spezifität der Antikörper wurde durch die Affinitätschromatographie nicht beeinträchtigt.

Die Immobilisierung der gereinigten Antikörper gelang erst nach Blockierung der Antigenbindungsstelle mit Phenoxymethylpenicillin. Die erzielte Säulenkapazität war mit 2 µg/ml Gel ausreichend hoch. Die Haltbarkeit der Säule betrug aber nur wenige Tage, da die affinitätsgereinigten Antikörper sowohl in PBS als auch in immobilisierter Form bei 4 °C nicht stabil waren. Die nur mit Polyethylenglykol gefällten Antikörper waren unter diesen Bedingungen dagegen mehrere Wochen stabil.

Für die Lebensmitteluntersuchungen kam eine Affinitätssäule zum Einsatz, die uns freundlicherweise von Prof. E. Märtlbauer und Dr. E. Usleber, Universität München, zur Verfügung gestellt wurde. Die Antikörper waren durch Immunisierung von Kaninchen mit einem Cloxacillin-Humanserumalbumin-Konjugat gewonnen worden und an cyanbromidaktivierte Sepharose gebunden. Die Antikörper hatten Kreuzreaktivitäten zu Oxacillin und Dicloxacillin, so daß die folgenden Untersuchungen auf die drei Isoxazolylpenicilline beschränkt waren.

Die Affinitätssäule wurde in ein automatisiertes HPLC-System eingebunden, in dem nach der Affinitätsreinigung des Rohextraktes eine Festphasenextraktion sowie die Auftrennung, Identifizierung und Quantifizierung mittels HPLC und UV-Detektion bei 230 nm erfolgte. Zur Analyse von Rinderleberware eine photochemische Nachsäulenderivatisierung erforderlich, so daß bei 300 nm detektiert werden konnte.

Die Herstellung eines geeigneten Rohextraktes gelang bei der Milch mit Ultrafiltration bei einem Ausschlußvolumen von 30 kDa. Zum Einsatz kam 1 ml des Filtrates. Für Rindermuskel und Rinderleber wurde mit Acetonitril/Natriumchloridlösung (1+1) extrahiert. Es wurden 250 µl des Muskelextraktes oder 500 µl des Leberextraktes auf die Affinitätssäule gegeben.

Die Höchstmengenkonzentrationen (30 µg/kg Milch und 300 µg/kg Muskel oder Leber) konnten sicher erfaßt werden. Die Variationskoeffizienten für Cloxacillin lagen bei 9 % aus Milch, 1,5 % aus Muskel und 6,5 % aus Leber.

7.2 Abstract

Multispecific antibodies against penicillins were induced in three rabbits and five laying hens, using an immunogen with 6-aminopenicillanic acid as immunogenic epitope. The immunogen was synthesized by coupling 6-aminopenicillanic acid (6-APA) via the 6-amino group to keyhole limpet hemocyanin or ovalbumin as carrier proteins.

The antibodies showed high cross reactivities with benzylpenicillin, phenoxymethylpenicillin, ampicillin, amoxicillin, oxacillin, cloxacillin and dicloxacillin, while cephalixin or a penicilloyl derivative did not react.

The antibody titers were between 50 and 100 in rabbit serum after the 6th booster injection. In order to increase the titer, immunizing of the rabbits was stopped and resumed 7 weeks later. The antibody titer was not increased and surprisingly the cross reactivities to all penicillins but benzylpenicillin had disappeared.

In egg yolk the titer development was followed up over the whole immunizing period. Two animals (no. 15 and 19) showed a rapid increase of the titer to about 2000 at the beginning of the immunization period which was followed by slow decrease to values about 100 - 200. The other three hens (no. 57, 79 and 81) showed a constant titer on a low level of about 250.

The development of the specificity was screened with benzylpenicillin and ampicillin and was different between the animals, too. In the yolks of one animal the cross reactivities were low at the beginning (20 %) of the immunization period, increased at a later stage (250 %) and decreased at the end of the period to 100 % compared with 6-APA.

The obtained rabbit antibodies were immobilized after ammonium sulphate precipitation via the oxidized carbohydrates of the F_c region with the intention of using them for immunoaffinity chromatography. However, binding capacities of the immobilized antibodies were too low (< 25 ng/ml gel) for using the column for residue analysis of penicillins.

Immobilizing the yolk antibodies via the amino groups after isolation with affinity chromatography resulted in columns without binding capacity. On the other hand, columns with capacities of about 2 µg/ml gel could be obtained by an identical immobilization procedure with the only exception that the antigen binding sites were blocked by phenoxymethylpenicillin. As a drawback, the antibodies lost their activity within one week at + 4 °C. The immobilization of the polyethylene glycol precipitated antibodies resulted in columns which were too low in capacity (80 ng/ml gel).

The application of an immunoaffinity cleanup in penicillin residue analysis was tested with a column which had the following characteristics: Antibodies from rabbit serum, induced with a cloxacillin-human serum albumin conjugate, crossreactivities: 4 % for oxacillin and 62 % for dicloxacillin.

The immunoaffinity column was integrated in a HPLC system with an automated solid phase extraction. Detection was at 230 nm when analyzing milk and bovine muscle and at 300 nm after photochemical post-column derivatization when analyzing bovine liver.

The crude extracts were obtained by ultrafiltration of milk at a molecular weight cut off of 30,000 Da and by extraction of homogenized muscle and liver with a mixture of sodium chloride solution and acetonitrile in an ultrasonic bath.

30 µg/kg isoxazolylpenicillin in milk and 300 µg/kg in muscle and liver (corresponding to the EU-maximum residue level) could be analyzed with coefficients of variation of 9 % from milk, 1.5 % from muscle and 6.5 % from liver.