

**Untersuchungen von Niere und anderen Matrices auf  
β-Lactam-Antibiotika mittels rezeptorgestützten  
Chemilumineszenz-Tests**

Dem Fachbereich Mathematik und Naturwissenschaften  
der Bergischen Universität Wuppertal  
zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalis (Dr. rer. nat.)

vorgelegte

**Dissertation**

von

**Lena Wehe**

Wuppertal 2012

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von 2007 bis 2010 im Fachbereich Mathematik und Naturwissenschaften an der Bergischen Universität Wuppertal im Fachgebiet Lebensmittelchemie in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Petz angefertigt.

Die Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20130206-145313-0

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20130206-145313-0>]

## Abstract

Penicillins and cephalosporines, which belong to the group of  $\beta$ -lactam antibiotics, are, together with tetracyclines and macrolides, the most commonly used antibiotics for the therapy and prophylaxis of bacterial infections in food delivering animals. Therefore, maximum residue limits (MRL) exist in the EU relating to the antimicrobial properties of the  $\beta$ -lactams. In order to control the application and possible illegal use of  $\beta$ -lactams, screening methods are useful to get first results cheap and rapidly.

In this work, the application of chemiluminescence (CL) as an analytical tool for the detection of residues of  $\beta$ -lactam antibiotics in porcine kidney juice and other matrices was investigated.

The developed method is based on an indirect competitive microtiter plate assay that uses the penicillin-binding protein PBP 2x\* as receptor for  $\beta$ -lactam antibiotics. The PBP 2x\* were coated on a microtiter plate, and a digoxigenin labeled ampicillin (Dig-Ampi) was used to compete with free beta-lactams in the sample. In a next step, we added anti-digoxigenin F<sub>ab</sub> fragments (F<sub>ab</sub>) that were conjugated with horseradish peroxidase (HRP). These conjugated antibodies can bind to the digoxigenin-moiety of Dig-Ampi. In the last step, a CL based technique was used as detection system. Therefore the luminol oxidation catalyzed by HRP was used. The obtained signal was reversely related to the  $\beta$ -lactam concentration in the sample.

The assay format utilizing PBP 2x\* based on a previous work developed in our research group, but was modified with regard to a CL based technique. In the previously developed colorimetric assay format, an HRP catalyzed oxidation with tetramethylbenzidine as chromogen was used.

Experimental parameters of the CL assay, for example amount of PBP 2x\*, Dig-Ampi, F<sub>ab</sub>, luminol reagent volume, and measurement time were characterized and optimized for low consumption of the expensive assay compounds and for high sensitivity.

A variety of food matrices, mainly kidney, but also milk and muscle tissue, were investigated by the CL assay and the results were compared to the colorimetric assay format.

Matrix interferences from kidney juice could be minimized by a centrifugation and dilution step. A full factorial design was used to examine significant matrix interferences. For both assay formats, the parameter "texture" (comparison: kidney-muscle) showed a significant matrix effect to the measurement performance. Thus, a calibration in blank matrix is necessary. In contrast to the colorimetric assay, no significant matrix effect was detected for the parameter animal species (comparison: pork-beef), when using the CL assay.

The performance criteria limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), precision, repeatability, and working range were investigated for the determination in spiked kidney juice and milk. 20 porcine kidney samples were analyzed for precision of the assay formats.

Benzylpenicillin, ampicillin, cefquinom and ceftiofur (measured as desfuroylceftiofur, the active metabolite) were detected at concentrations below their respective MRL. LOD and LOQ were twofold lower for the CL assay than for the colorimetric assay. However, the increased sensitivity of the CL assay leads to a loss of precision and higher interference of matrix compounds. Nevertheless, the CL assay represents a good alternative to the colorimetric test system and is applicable for the screening of  $\beta$ -lactam residues in a variety of food matrices.

Based on the developed CL assay, a test system for single sample measurements was designed by using magnetic beads as surface to immobilize PBP 2\*. For this purpose, a commercial Charm II receptor test equipment was used. The experiments have shown that the CL assay format could not be transferred to this type of equipment. Significant interference of nonspecific interactions and difficulties in the separation technique were observed.

In conclusion, the experiments on kidney juice have shown that both microtiter plate assay formats (CL and colorimetric) are suitable for the semi-quantitative screening of  $\beta$ -lactams. An advantage of the CL assay over the colorimetric assay is the higher sensitivity.

## Dank

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. M. Petz, der mir das Thema zur weitgehend freien Durchführung überlassen hat und mir mit seiner motivierenden Art sowie mit seiner fachlichen Erfahrung und seiner Diskussionsbereitschaft stets zur Seite stand.

Herrn Prof. H. Hayen danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Frau Prof. R. Hakenbeck und Herrn Dr. P. Maurer, Universität Kaiserslautern, möchte ich herzlich für die Bereitstellung des Stammes zur Expression von PBP 2x\* und für die fachliche und experimentelle Unterstützung bei der Aufreinigung danken.

Ebenso möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. E. Müller-Seitz bedanken für ihre unermüdliche Diskussionsbereitschaft, den vielen wertvollen Ideen bei der Planung der Experimente und der sorgfältigen Durchsicht der Arbeit.

Herrn Prof. T. Hilberg und Herrn Dr. U. Wehmeier, Sportmedizin Universität Wuppertal, danke ich für die Nutzung des FLUOstar OPTIMA Mikrotiterplatten Readers und für die Möglichkeit der experimentellen Durchführung in ihrem Labor.

Beim Arbeitskreis von Herrn Prof. W. Reineke, Chemische Mikrobiologie, möchte ich mich für die fachliche und experimentelle Unterstützung bei der Herstellung des PBP 2x\* bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Kollegen für die gute Zusammenarbeit und der angenehmen Arbeitsatmosphäre, in der diese Arbeit entstanden ist, bedanken.

Frau Dr. U. Andree danke ich herzlich für ihre fachliche Unterstützung und die stets aufbauenden Worte.

Auch möchte ich Frau Y. Rockser herzlich für die Mithilfe bei den Nierenuntersuchungen danken. Sie hatte stets ein offenes Ohr für mich und hat es immer wieder geschafft, mich in Tiefphasen zu motivieren.

Schließlich möchte ich meinen Eltern und meiner Familie danken, die mir diesen Weg ermöglicht haben und stets hinter mir standen. Vielen Dank!

*Für Margret und Hermann*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>4</b>
<b>2</b>	<b><math>\beta</math>-Lactame (Penicilline und Cephalosporine)</b> .....	<b>6</b>
2.1	Charakteristika.....	6
2.2	Stabilität der $\beta$ -Lactame .....	9
2.3	Wirkungsmechanismus .....	13
2.4	Das Peptidoglycan .....	13
2.4.1	Das Rezeptorprotein: Penicillin-bindendes Protein (PBP).....	14
2.4.2	Eingriff der $\beta$ -Lactame in die Zellwandsynthese.....	19
2.5	Pharmakokinetik.....	23
2.6	Anwendungsbereich in der Veterinärmedizin .....	24
<b>3</b>	<b>Tierarzneimittel: Markt, Überwachungsprogramme, Rückstands- situation</b> .....	<b>26</b>
3.1	Tierarzneimittelmarkt .....	26
3.2	Tierarzneimittelüberwachung.....	28
3.2.1	Tierarzneimittelüberwachung auf EU-Ebene .....	28
3.2.2	Tierarzneimittelüberwachung in Deutschland.....	30
3.3	Aktuelle Rückstandssituation .....	35
<b>4</b>	<b>Analytik von <math>\beta</math>-Lactam-Antibiotika in Lebensmitteln - Stand der Forschung</b> .....	<b>38</b>
4.1	Mikrobiologische Testverfahren.....	39
4.2	Immuno- und Rezeptorassays .....	41
4.2.1	Enzymimmunoassay .....	41
4.2.2	Biosensorsysteme .....	43
4.2.3	Rezeptortests.....	45
4.3	Chemisch-physikalische Methoden.....	48
4.4	Lumineszenz als Werkzeug in der Rückstandsanalytik.....	50
4.4.1	Grundlagen der Lumineszenz .....	50
4.4.2	Das Prinzip der Luminoloxidation.....	55
4.4.3	Chemilumineszenz-Assays in der Rückstandsanalytik .....	59
4.5	Magnetpartikel als Werkzeug in der Analytik .....	60
<b>5</b>	<b>Zielsetzung</b> .....	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>64</b>
6.1	kolorimetrischer Mikrotiterplatten-Test nach Lamar.....	64
6.1.1	Testprinzip .....	64

6.1.2	Assay-Komponenten.....	66
6.1.3	Systematische Untersuchungen zur Detektionsreaktion .....	67
6.1.4	Matrixeinflüsse .....	74
6.2	Chemilumineszenz-Mikrotiterplatten-Test.....	95
6.2.1	Testprinzip .....	95
6.2.2	Entwicklung eines Chemilumineszenz-Assays .....	97
6.2.3	Matrixeinflüsse .....	115
6.3	Vergleich von kolorimetrischem – und Chemilumineszenz-Assay.....	140
6.4	Chemilumineszenz-Assay unter Verwendung des Charm II-Szintillationszählers .....	145
6.4.1	Testprinzip .....	145
6.4.2	Weitere Untersuchungen im Rahmen der Methodenentwicklung.....	148
6.4.3	Fazit der Untersuchungen .....	160
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>161</b>
<b>8</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>164</b>
<b>9</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>166</b>
9.1	Expression und Aufreinigung von PBP 2x* .....	166
9.1.1	Proteinexpression in <i>E. coli</i> .....	171
9.1.2	Aufreinigung des PBP 2x* .....	172
9.1.3	Quantifizierung der Proteine.....	174
9.1.4	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	175
9.1.5	Bestimmung der Bindekapazität des PBP 2x* mittels HPLC .....	180
9.2	Synthese und relative Konzentrationsbestimmung des Digoxigeninmarkierten Ampicillins (Dig-Ampi) .....	182
9.3	Analysen mittels des Mikrotiterplatten-Tests .....	185
9.3.1	Kolorimetrischer Mikrotiterplatten-Test .....	191
9.3.2	Chemilumineszenz-Mikrotiterplatten-Test.....	194
9.3.3	Analyse von $\beta$ -Lactamen in PBS-Puffer.....	196
9.3.4	Analyse von Milchproben.....	197
9.3.5	Analyse von Muskelfleisch- und Nierenproben .....	197
9.4	Chemilumineszenz-Test mittels Charm II-System.....	199
9.4.1	Chemilumineszenz-Versuche in homogener Lösung mittels Charm II-Detektion.....	201
9.4.2	Herstellung der Casein- und Anti-Dig-F <sub>ab</sub> -Fragmente-Magnetpartikel.....	203
9.4.3	Assaydurchführung mittels Anti-Dig-F <sub>ab</sub> -Fragment-Magnetpartikeln .....	206
9.4.4	Kopplung von PBP 2x* an Magnetpartikeln .....	208
9.4.5	Assaydurchführung mittels PBP 2x*-Magnetpartikeln .....	209
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>211</b>

<b>11</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>228</b>
<b>12</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>232</b>

# 1 Einleitung

Heutzutage werden Penicilline und Cephalosporine, die die Gruppe der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika bilden, umfangreich in der Veterinärmedizin zur Therapie und Prophylaxe bakterieller Infektionen bei Lebensmittel liefernden Tieren eingesetzt <sup>1</sup>. Insbesondere im Zuge der Massentierhaltung spielt die Prophylaxe bakterieller Infektionen eine immer größer werdende Rolle und fördert den mengenmäßigen Antibiotika-Einsatz. Die Anwendung von Antibiotika bei Lebensmittel liefernden Tieren führt zur Rückstandsbildung der verabreichten Wirkstoffe oder ihrer Metaboliten im tierischen Gewebe und in den entsprechenden Produkten (zum Beispiel Milch, Eier und Honig). Eine akute Gefahr für den Verbraucher geht vom Verzehr tierischer Produkte, die Antibiotika-Rückstände in geringen Mengen enthalten, nicht aus <sup>2</sup>. Als problematisch wird allerdings das allergene Potential der Wirkstoffgruppe gesehen <sup>3</sup>. Zusätzlich besteht bei einer wiederholten Aufnahme von Antibiotika die Gefahr der Resistenzbildung bei Krankheitserregern.

Zum Schutz des Verbrauchers existieren EU-weit gültige Regelungen, die unter anderem Anwendungsbeschränkungen, Rückstandshöchstmengen (MRL = maximum residue limit) und Wartezeiten reglementieren. Für  $\beta$ -Lactame sind in Abhängigkeit von ihrer antimikrobiellen Wirkung sehr unterschiedliche Rückstandshöchstmengen in essbaren Gewebe und anderen Produkten tierischen Ursprungs EU-einheitlich in der Verordnung Nr. 37/2010 festgesetzt <sup>4</sup>. In Hinblick auf den Verbraucherschutz ist eine systematische Kontrolle zur Einhaltung der festgelegten MRL notwendig. Ein effektives Überwachungswerkzeug stellt in Deutschland der risikoorientierte Nationale Rückstandskontrollplan (NRKP) dar. Dies ist ein von Bund und Ländern durchgeführtes Programm, das tierische Lebensmittel auf illegale Anwendungen von verbotenen oder nicht zugelassenen Stoffen bzw. den Einsatz zugelassener Tierarzneimittel überwacht <sup>5</sup>. Als Anreicherungsorgan ist die Niere bei der Durchführung des NRKP eine wichtige Matrix, um nicht sachgerechte Anwendungen von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika verfolgen zu können.

Zur Überwachung der Einhaltung der rechtlichen Vorgaben werden aufgrund des großen Probenumfangs in privaten und amtlichen Laboratorien Screening-

verfahren angewendet. Der Einsatz von Screening-Tests ist eine kostengünstige, analytische Strategie, um auf erster Analysenstufe und mit wenig Aufwand eine schnelle Aussage über das Vorhandensein von Rückständen in einer Probe zu erlangen.

Neben den wirkungsbezogenen non-target Tests, wie dem Hemmstofftest, ermöglicht ein familienpezifischer Screeningtest, wie ein rezeptorgestützter Mikrotiterplattentest oder ein immunchemisches Verfahren mit Antikörpern, die Erfassung einer Substanzklasse (zum Beispiel  $\beta$ -Lactam-Antibiotika).

Für den Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika wurden in den letzten Jahren vermehrt Penicillin-bindende Proteine (PBP) als spezifische Bindungspartner eingesetzt. PBP sind bakterielle Enzyme, die an der Zellwandsynthese beteiligt sind und einen Angriffspunkt für  $\beta$ -Lactam-Antibiotika darstellen. Sie sind in der Lage  $\beta$ -Lactam-Antibiotika spezifisch zu binden.

Die Detektion der Analyten kann durch den Einsatz von verschiedenen Detektionsarten, wie zum Beispiel UV, Fluoreszenz, Lumineszenz oder SPR (surface plasmon resonance), variieren und ermöglicht ein breites analytisches Tool zum Nachweis von Wirkstoffen.

Ziel dieser Arbeit war die Einsatzmöglichkeit der Chemilumineszenz für einen rezeptorgestützten Mikrotiterplatten-Test zum Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika in Lebensmitteln, schwerpunktmäßig in Niere, zu prüfen.

## 2 $\beta$ -Lactame (Penicilline und Cephalosporine)

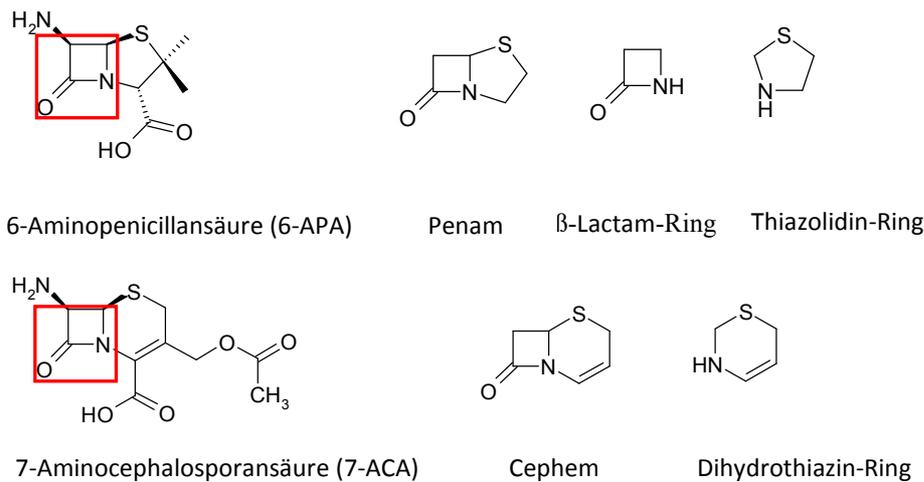
Mit der Entdeckung der antibakteriellen Wirkung des aus *Penicillium notatum* gewonnenen Naturstoffes durch Alexander Fleming <sup>6</sup> in 1929 und der späteren Charakterisierung von Chain *et al.* <sup>7</sup> wurde ein Meilenstein in der Medizin und Veterinärmedizin gesetzt. Über die Geschichte der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika wurde von Abraham *et al.* <sup>8</sup> in einem ausführlichen Review berichtet.

### 2.1 Charakteristika

Zu den  $\beta$ -Lactam-Antibiotika zählen zwei große Klassen: die Penicilline und die Cephalosporine. Beide Klassen besitzen einen  **$\beta$ -Lactam-Ring** als gemeinsames Strukturmerkmal. Dieser wurde 1945 als Strukturbestandteil des Benzylpenicillins röntgenspektroskopisch nachgewiesen <sup>9</sup>.

Mit Ausnahme einiger monocyclischer Verbindungen bestehen die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika aus einem bicyclischen Grundgerüst. Je nach Verbindungsklasse ist ein fünfgliedriger oder sechsgliedriger Ring an den  $\beta$ -Lactam-Ring ankondensiert.

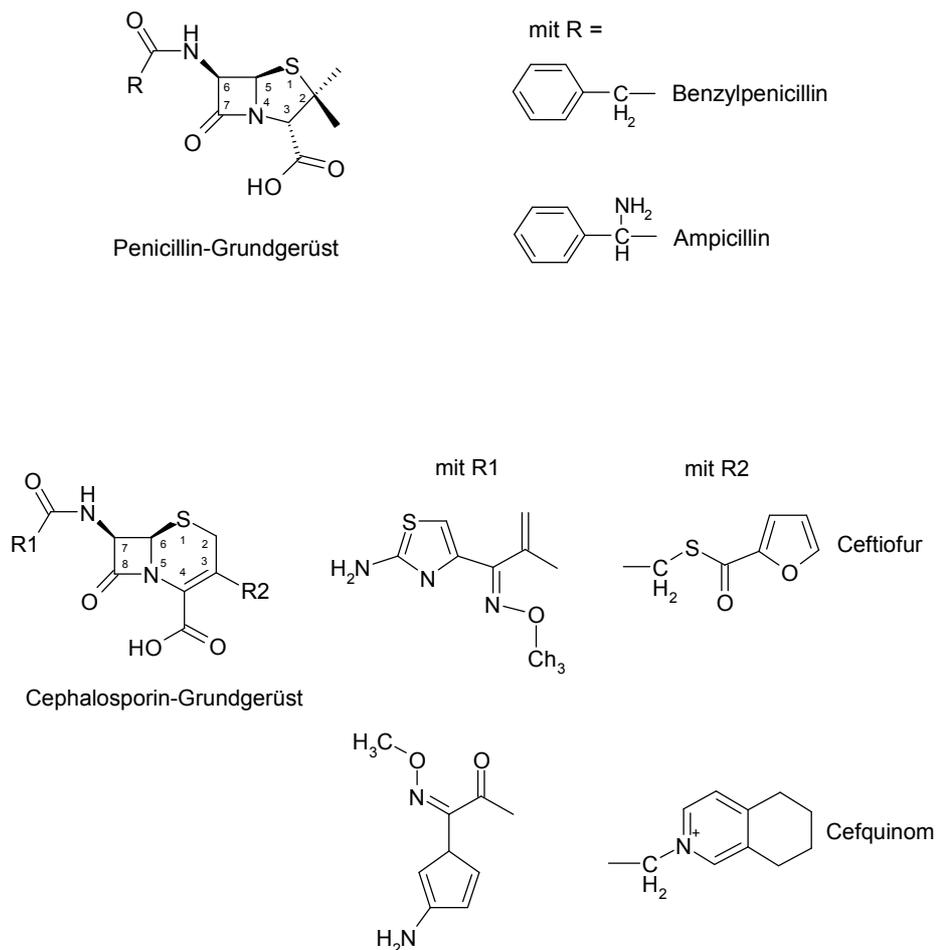
Penicilline sind Acylderivate der 6-Aminopenicillansäure (6-APA), einem bicyclischen Dipeptid aus Cystein und Valin. Der Grundkörper besteht aus dem reaktiven viergliedrigen  $\beta$ -Lactam-Ring, gekoppelt mit einem fünfgliedrigen Thiazolidinring. Dieses zusammengesetzte Ringsystem wird als Penam-Ring bezeichnet <sup>10</sup>. Der  $\beta$ -Lactam-Ring stellt hierbei die strukturelle Voraussetzung für die antibakterielle Aktivität <sup>11</sup> dar (siehe Abbildung 2.1).



**Abbildung 2.1: Strukturmerkmale der Penicilline und Cephalosporine;** das rote Quadrat kennzeichnet den  $\beta$ -Lactam-Ring als gemeinsames Strukturmerkmal

Insbesondere durch die verschiedenen Kondensationsprodukte zwischen einer Carbonsäure und der Aminogruppe in Position 6 der 6-APA können die Penicilline anhand ihrer Seitenketten unterschieden werden <sup>12</sup>. In Abbildung 2.1 sind die Strukturmerkmale der Penicilline und Cephalosporine dargestellt.

Statt des Thiazolidin-Rings ist in dem Grundgerüst der Cephalosporine ein Dihydrothiazin-Ring enthalten. Dieser bildet zusammen mit dem  $\beta$ -Lactam-Ring das Cephem. Cephalosporine können aus Benzylpenicillin oder Phenoxyethylpenicillin durch Ringerweiterung oder durch Modifikation der 7-Aminocephalosporansäure (7-ACA) semisynthetisch hergestellt werden <sup>13,14</sup>. Abbildung 2.2 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Penicilline und Cephalosporine.



**Abbildung 2.2: Grundstruktur der Penicilline (oben) und der Cephalosporine (unten) und der in dieser Arbeit verwendeten, veterinärmedizinisch relevanten  $\beta$ -Lactame**

Die am häufigsten verwendeten  $\beta$ -Lactam-Antibiotika werden semisynthetisch aus der 6-APA oder der 7-ACA gewonnen. Benzylpenicillin (Penicillin G), die 6-APA und das Phenoxyethylpenicillin (Penicillin V) sind natürlich vorkommende  $\beta$ -Lactame, die direkt aus *Penicillium chrysogenum* und *Penicillium notatum* extrahiert werden können <sup>15</sup>. Ein Überblick über die verschiedenen  $\beta$ -Lactame ist in <sup>16</sup> gegeben. In der EU sind nach der Verordnung (EU) Nr. 37/2010 <sup>4</sup> derzeit 16  $\beta$ -Lactame für verschiedene Tierarten zugelassen.

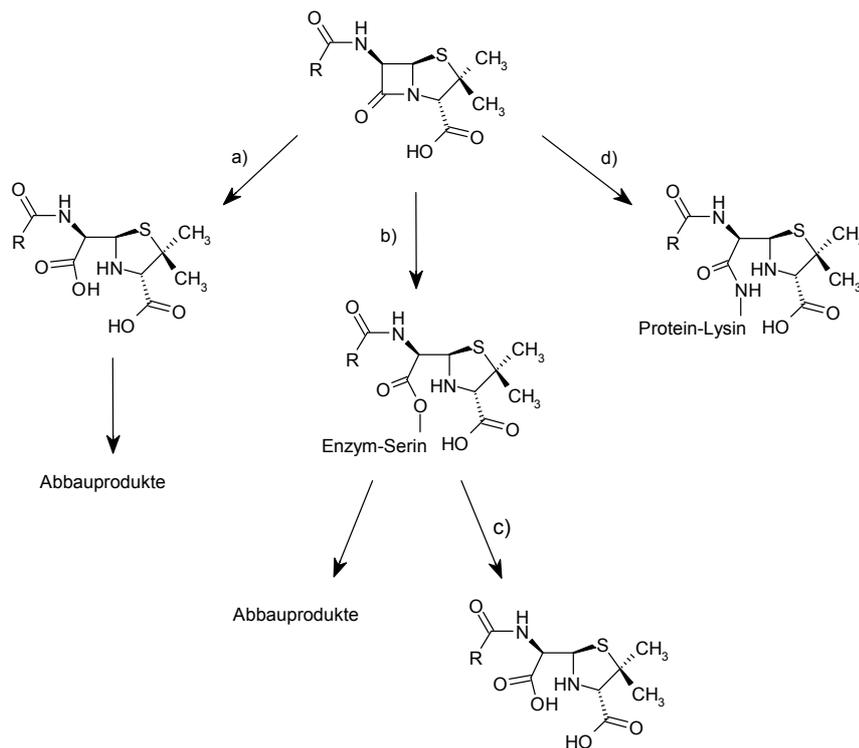
## 2.2 Stabilität der $\beta$ -Lactame

Penicilline sind in Form ihrer Alkali- oder Erdalkalisalze im trockenen Zustand stabil. In wässrigen Lösungen werden Penicilline relativ schnell abgebaut. Die Abbaurate hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie zum Beispiel dem pH-Wert, der Temperatur und der Seitenkette im Molekül. Auch bestimmte Puffersalze, Schwermetalle (z. B. Kupfer) oder organische Lösemittel können den Abbau des Penicillins beeinflussen <sup>17,18</sup>.

In wässrigen Lösungen zeigen monobasische Penicilline, wie zum Beispiel Benzylpenicillin, eine optimale Stabilität im Bereich von pH 6-7. Die Dissoziationskonstante (pKa) der Carboxylgruppe liegt bei 2,4-2,7. Bei den amphoteren Penicillinen, wie beispielsweise Ampicillin, liegt die Dissoziationskonstante (pKa) der Aminogruppe in wässriger Lösung bei 7,2-7,4. Das Stabilitätsmaximum in wässriger Lösung liegt bei pH 4-5 <sup>19</sup> niedriger als bei Benzylpenicillin. Dies hängt damit zusammen, dass der elektronenziehende Substituent (hier Aminofunktion) in  $\alpha$ -Position der Seitenkette einen stabilisierenden Effekt im sauren Medium bewirkt.

Bei  $\beta$ -Lactamen handelt es sich um Verbindungen, die eine erhöhte Reaktivität gegenüber Nucleophilen (z.B. Hydroxylionen, Aminen) aufweisen. Mit dem Abbau der  $\beta$ -Lactame geht in der Regel die Öffnung des viergliedrigen  $\beta$ -Lactam-Rings einher. Dieser Abbau kann unter sauren, neutralen oder basischen Bedingungen erfolgen <sup>20</sup>. Auch eine enzymatische Hydrolyse, zum Beispiel durch  $\beta$ -Lactamasen, führt zur Ring-Öffnung und im Folgenden dazu, dass die biologische Aktivität verloren geht.

Eine Übersicht über mögliche Reaktionen, die eine Öffnung des  $\beta$ -Lactam-Rings zur Folge haben, sind in Abbildung 2.3 dargestellt.



**Abbildung 2.3: Abbaureaktionen der Penicilline;** alle Reaktionswege haben die Öffnung des  $\beta$ -Lactam-Rings zur Folge; a) chemische Hydrolyse, b) enzymatische Reaktion, z.B. mit BPP, c) enzymatische Reaktion mit  $\beta$ -Lactamase führt zur Penicilloinsäure, d) Bindung an Proteine; modifiziert nach<sup>20</sup>

Der chemische Abbau der  $\beta$ -Lactame ist extrem pH-abhängig und kann sowohl durch nucleophilen Angriff als auch durch elektrophile Substitution erfolgen.

In Abbildung 2.4 ist die Abbaureaktion des Penicillins in alkalischer Lösung bzw. durch nucleophilen Angriff dargestellt. Anfänglich entsteht unter Ringöffnung die biologisch inaktive Penicilloinsäure. Ausgehend von dieser bilden sich in Abhängigkeit vom pH-Wert Penillosäure, Penamaldsäure, Penilloaldehyd, Penicillamin und Kohlendioxid.

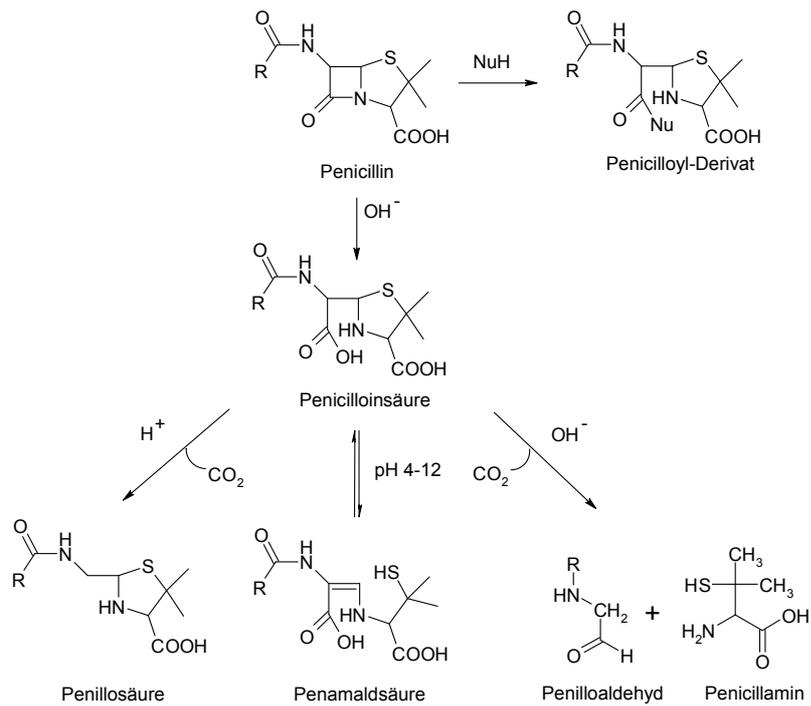


Abbildung 2.4: Abbau des  $\beta$ -Lactams durch nucleophile Reaktion <sup>12,19</sup>

Abbildung 2.5 zeigt anhand eines Penicillins den Abbau unter sauren Bedingungen (elektrophile Substitution).

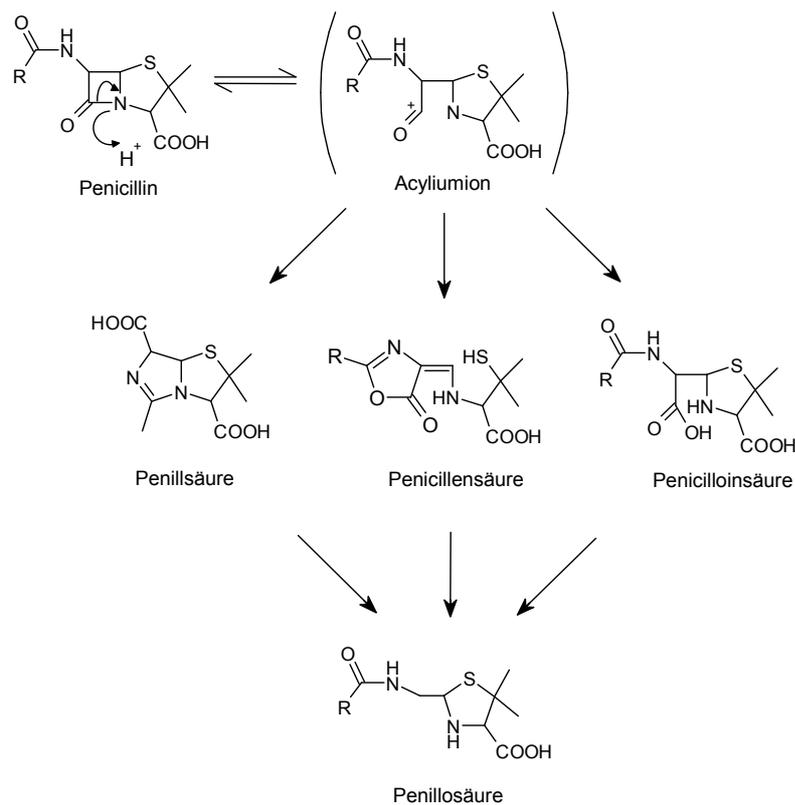


Abbildung 2.5: Abbau des  $\beta$ -Lactams durch elektrophile Substitution <sup>21</sup>

Durch Spaltung der C-N-Bindung im  $\beta$ -Lactam-Ring erfolgt die reversible Bildung eines positiv geladenen Acylium-Ions <sup>17</sup>. Das Acylium-Ion reagiert mit Wasser unter Bildung der Penicilloinsäure und nachfolgender Decarboxylierung zur Penillosäure. Unter Beteiligung der C-6-Acylamino-Seitenkette können letztlich Penillsäure, Penicillensäure, Penicilloinsäure und Penillosäure entstehen <sup>12,20</sup>.

Durch elektronenziehende Gruppen in der  $\alpha$ -Position der Seitenkette (wie z.B. in Phenoxyethylpenicillin) wird die Stabilität gegen Säuren verbessert <sup>10</sup>. Diese relativ säurestabilen Penicilline werden überwiegend oral appliziert <sup>11</sup>.

Cephalosporine reagieren im Wesentlichen ähnlich wie Penicilline. Unter basischen Bedingungen ist das Ausgangsabbauprodukt allerdings im Vergleich zur Penicilloinsäure in wässriger Lösung nicht stabil und reagiert direkt weiter <sup>19</sup>. Bedingt durch die geringere anionische Reaktivität des Stickstoffs im Dihydrothiazinring zeigen Cephalosporine, im Vergleich zu den Penicillinen eine höhere Stabilität gegenüber Säuren. Die chemische und enzymatische Modifikation der Cephalosporine hängt im Wesentlichen von der Art der C7-Seitenkette und

den Substituenten am C3-Atom ab<sup>22</sup>. Stellt der Substituent an der C3-Position eine gute Abgangsgruppe dar, wird in Gegenwart von Nucleophilen der Substituent abgespalten. Hierbei kommt es zur Spaltung der C-N-Bindung im  $\beta$ -Lactam-Ring<sup>23</sup>.

Zur detaillierten Betrachtung der Abbaureaktionen der Cephalosporine sei hier auf die einschlägige Literatur verwiesen<sup>17,19,22-24</sup>.

Die geringe Stabilität der  $\beta$ -Lactame in wässrigen Lösungen ist für die Rückstandsanalytik ein großes Problem. Auch die Lebensmittelmatrix kann beispielsweise durch Enzyme, pH-Wert oder vorhandene Metallionen den Abbau von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika beeinflussen. Dies ist insbesondere für die Lagerung der Proben vor einer Analyse von Bedeutung. Umfangreiche Lagerungsstudien von Penicillinen in Milch<sup>25,26</sup> und Fleisch<sup>27,28</sup> zeigten einen temperaturabhängigen Abbau der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika während der Lagerung.

### 2.3 Wirkungsmechanismus

Der Begriff „Pharmakodynamik“ fasst allgemein die Wirkung von Arzneimitteln auf den Organismus und die damit verbundenen Wirkmechanismen zusammen. Bei den meisten Arzneimitteln (so auch bei den  $\beta$ -Lactamen) findet ein rezeptorvermittelter Wirkungsmechanismus statt<sup>11</sup>.

Die Wirkung der  $\beta$ -Lactame beruht auf einem Eingriff in die bakterielle Zellwandsynthese. Hierbei wird das aktive Zentrum eines für die Zellwandsynthese essentiellen Enzyms durch  $\beta$ -Lactame blockiert.

Im Folgenden wird der prinzipielle Aufbau des Peptidoglucans, dem Angriffspunkt der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, kurz beschrieben.

### 2.4 Das Peptidoglucan

Das Peptidoglucan, auch Murein genannt, ist der Teil der bakteriellen Zellwand, der für die Stabilität und Flexibilität verantwortlich ist. Es schützt die Zelle vor äußeren, mechanischen Einflüssen und gegen den intrazellulären osmotischen Druck<sup>29</sup>.

Murein ist ein Polymer, in dem Polysaccharidstränge über kurze Peptidseitenketten miteinander verbunden sind. Als Polysaccharidbausteine dienen N-Acetylglucosamin und N-Acetyl-Muraminsäure, die  $\beta$  (1-4) glycosidisch verknüpft sind<sup>30</sup>.

Die Aminosäuresequenz der Pentapeptidketten kann je nach Organismus geringfügig variieren. So besteht die Peptidkette in *Streptococcus pneumoniae* (grampositive Kokken) zum Beispiel aus den Aminosäuren L-Alanin - D-Glutaminsäure - L-Lysin - D-Alanin - D-Alanin. In *E. coli* hingegen ist als Diaminosäure meso-Diaminopimelinsäure statt L-Lysin im Murein enthalten<sup>30</sup>. Der schematische Aufbau des Peptidoglucans für *S. pneumoniae* ist beispielhaft in Abbildung 2.7 dargestellt.

Die komplette Stabilität des Mureins wird erst durch die Quervernetzung der Peptidketten erhalten. Hierbei ist die Vernetzung artenspezifisch und kann über direkte Verknüpfung oder über kurze Interpeptidbrücken erfolgen. Bei der direkten Verknüpfung sind die Polysaccharidstränge über eine Amidbindung zwischen den Seitenketten verbunden. Die Amidbindung wird über die Diaminosäure (z.B. L-Lysin) eines Pentapeptids und der Carboxylgruppe eines terminalen D-Alanins eines weiteren Pentapeptids erhalten (siehe Abbildung 2.7)<sup>31</sup>. Dieses Polymernetz, auch „Mureinsacculus“ genannt, umschließt wie ein Fischernetz die komplette Cytoplasmamembran<sup>32</sup>. Für einen detaillierten Einblick in den Aufbau der bakteriellen Zellwand wird auf die einschlägige Literatur verwiesen<sup>30,32-34</sup>.

#### 2.4.1 Das Rezeptorprotein: Penicillin-bindendes Protein (PBP)

Penicillin-bindende Proteine, kurz PBP genannt, sind bakterielle, membrangebundene Proteine, die als spezieller Enzymsatz in Bakterien mit Mureingerüst assoziiert sind und eine wichtige Rolle bei der Steuerung der Mureinbiosynthese spielen. Sie besitzen die Fähigkeit,  $\beta$ -Lactame kovalent zu binden<sup>35</sup>.

Die PBPs katalysieren terminale Reaktionen der Murein-Biosynthese, wie die Verknüpfung der Pentapeptidketten mit den linearen Polysaccharidsträngen zu einem dreidimensionalen Mureinsacculus<sup>36</sup>. Bei diesen abschließenden Schritten

sind Glykosyltransferasen und D,D-Transpeptidasen (siehe unter Abschnitt 2.4.2.) involviert. PBPs besitzen je nach Typ eine Glycosyltransferase- und/oder D,D-Transpeptidase-Aktivität.

Die Anzahl der verschiedenen PBPs kann je nach Bakterienart zwischen 5-10 variieren, die in absteigender Reihenfolge ihres Molekulargewichts (z.B. PBP 1 = 100 kDa, PBP 2 = 80 kDa) nummeriert werden <sup>35</sup>. Bei ähnlichen Molekulargewichten der PBPs in einem Bakterium werden diese zusätzlich mit einem Buchstaben unterschieden (z.B. PBP 2b und PBP 2x). In *Streptococcus pneumoniae* sind zum Beispiel sechs verschiedene PBPs mit einem Molekulargewicht von 90 bis 43 kDa zu finden (PBP 1a, PBP 1b, PBP 2a, PBP 2b, PBP 2x und PBP 3) <sup>37</sup>.

PBPs werden nach ihrem Molekulargewicht in zwei Gruppen eingeteilt: PBPs mit hohem Molekulargewicht (*engl.* high molecular weight; hmw PBPs) und PBPs mit niedrigem Molekulargewicht (*engl.* low molecular weight; lmw PBPs). Zu den lmw PBPs wird das PBP3 (43 kDa) gezählt, das eine Carboxypeptidase-Aktivität aufweist <sup>38</sup>. Die hmw PBPs werden zusätzlich, je nach ihrer enzymatischen Aktivität, in Klasse A und Klasse B aufgeteilt. PBPs der Klasse A sind bifunktionelle Enzyme und besitzen eine D,D-Transpeptidase- und eine Glycosyltransferase-Aktivität (PBP1a, PBP1b und PBP2a). Bei Klasse B PBPs handelt es sich um Enzyme, die nur eine D,D-Transpeptidase-Aktivität besitzen (PBP 2x und PBP 2b) <sup>36,39-41</sup>.

PBPs sind Multidomänen-Proteine, die aus einer N- und C-terminalen Domäne und einer Penicillin-bindenden Transpeptidase-Domäne bestehen.

Diese Transpeptidase-Domäne besteht aus folgenden drei konservierten Aminosäuresequenzen (Motive): Serin-xx-Lysin (SxxK, Motiv 1, mit einem aktiven Serin), Serin-x-Asparagin (SxN, Motiv 2) und Lysin-Threonin-Glycin (KTG, Motiv 3), wobei x eine variable Aminosäure anzeigt. Diese drei Sequenzmotive stellen das aktive Zentrum des Enzyms dar und sind in den meisten PBPs vorhanden <sup>36,41</sup>. Durch Proteinfaltung bildet sich aus den in der Primärstruktur enthaltenden Sequenzmotiven die katalytische Domäne aus. Van der Linden *et al.* <sup>42</sup> zeigten anhand spezifischer Mutationen im aktiven Zentrum des PBP, dass der Serinrest in Motiv 1 die essentielle Komponente für die Interaktion mit  $\beta$ -Lactam-Antibiotika

darstellt. Nach Ghuysen <sup>36</sup> zählen PBPs zusammen mit den  $\beta$ -Lactamasen zu der Superfamilie der Acyl-Serin-Transferasen.

### Das Penicillin-bindende Protein PBP 2x\*

Pares *et al.*<sup>43</sup> beschreiben in ihren Arbeiten die 3-D-Struktur des membran-gebundenen PBP 2x in *Streptococcus pneumoniae*. Das PBP 2x ist mit einem Molekulargewicht von 82,3 kDa ein hmw PBP, das der Klasse B zugeteilt wird. Insgesamt ist es 750 Aminosäuren lang.

Die Penicillin-bindende Domäne (Transpeptidase Domäne) mit den drei, für PBP typischen, konservierten Motiven ist zwischen den Aminosäuren 289 und 609 angesiedelt. An die Transpeptidase Domäne schließt sich die C-terminale Domäne an, an deren Ende die 60 Aminosäuren lange PASTA-Domäne (PBP and Serine/Threonine kinase Associated)<sup>43</sup> lokalisiert ist. Die genaue Funktion dieser Domäne ist noch ungeklärt. Der schematische Aufbau des PBP 2x ist in Abbildung 2.6 dargestellt.

Der N-Terminus des Proteins (bis Aminosäure 265) besitzt die Form einer Zange und enthält einen kurzen Bereich aus hydrophoben Aminosäuren (AS 19-48), die sogenannte Membrandomäne. Diese Domäne verankert das Protein in der Cytoplasmamembran. Nach den Arbeiten von Laible *et al.*<sup>44</sup> wird durch Deletion dieses Bereiches ein lösliches PBP 2x-Derivat (im Folgenden PBP 2x\* bezeichnet) erhalten, das sich weiterhin durch seine komplette  $\beta$ -Lactam-Bindefähigkeit auszeichnet.

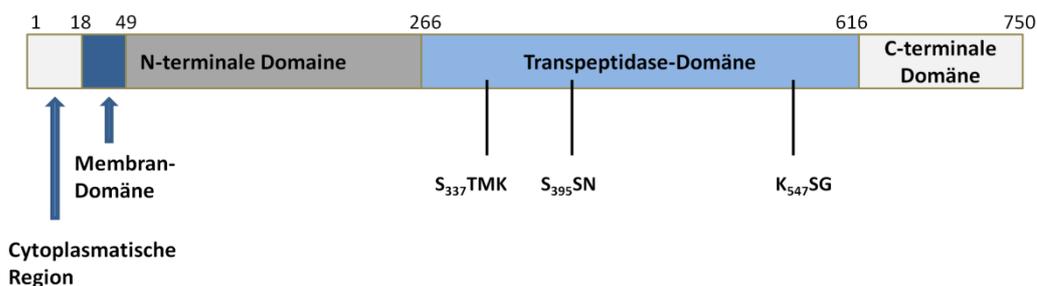


Abbildung 2.6: Schematischer Aufbau von PBP 2x; modifiziert nach <sup>45,46</sup>

Durch Markierung mit radioaktivem Penicillin oder Bocillin, einem fluoreszierenden Penicillin-Derivat, können PBPs visualisiert werden <sup>47</sup>.

Die Überexpression und Synthese des Rezeptorproteins PBP 2x\* wird in einem *E. coli* BL21-Stamm, der das Plasmid pGEX-tet-PBP 2x\* enthält, durchgeführt. Das Plasmid pGEX-tet-PBP 2x\* wurde von Dr. Shawn Rachid im Arbeitskreis von Frau Prof. Hakenbeck hergestellt. Das PBP 2x\*-Gen wurde aus dem Plasmid pCG31 mit Hilfe von PCR amplifiziert. pCG31 codiert das wasserlösliche PBP2x\*-Derivat, in dem das Transmembranpeptid (Aminosäuren 19-48) fehlt <sup>44</sup>.

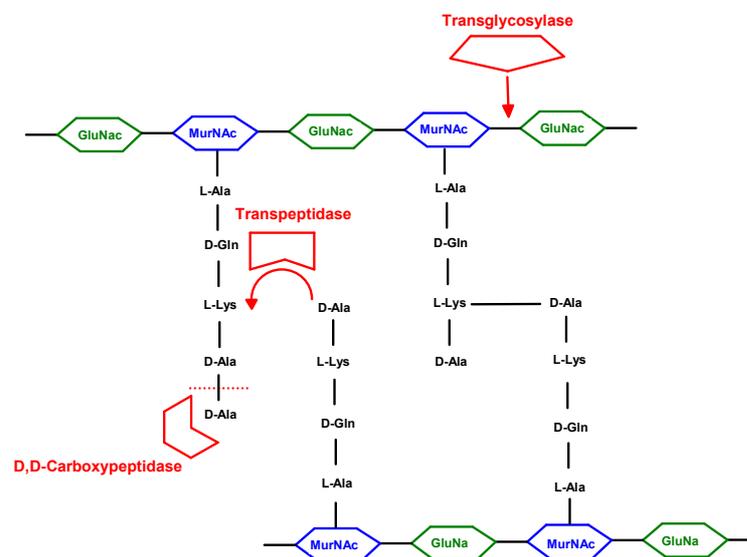
Der Vektor pGEX 6P 1 tet geht aus dem Ursprungsvektor pGEX 6P 1 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.) hervor. Dieser enthält ein  $\beta$ -Lactamase-Gen, so dass transformierte Klone mit Ampicillin selektiert werden können. Hierbei besteht jedoch das Risiko, dass sich bereits während der Expression Ampicillin-Konjugate bilden können und folglich bei der Aufreinigung auch entsprechende Konjugate erhalten werden, die keine  $\beta$ -Lactambindung mehr eingehen können.

Bei pGEX 6P 1 tet handelt es sich um einen Glutathion-S-Transferase (GST)-Genfusionsvektor mit einem synthetischen *tac*-Promotor für IPTG-induzierbare Expression von GST-Fusionsproteinen. Die Verwendung dieses Vektors ist in jedem *E. coli*-Stamm möglich, da ein internes lac I<sup>q</sup>-Repressorgen enthalten ist. pGEX 6P 1 tet enthält zusätzlich eine tet-Kassette, die eine Tetracyclin-Resistenz im Rezipienten-Stamm bewirkt.

Das Plasmid pGEX-tet-PBP 2x\* codiert das PBP 2x\*-GST-Fusionsprotein (GST; Glutathion-S-Transferase), wobei das GST-Protein an das Amino-Ende des PBP 2x\* fusioniert ist. Die GST-fusionierten Rezeptorproteine können durch Bindung an GSH-Sepharose gebunden werden. Die Abspaltung des GST von dem GST-Fusionsprotein kann mittels des Enzyms PreScission Protease (Amersham Biosciences, Freiburg) durchgeführt werden. Dieses spezifische Enzym erkennt eine acht Aminosäurenreste lange Erkennungssequenz (Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-Gly-Pro) zwischen GST und Protein. Die PreScission Protease, auch ein Fusionsprotein, spaltet das GST-Protein vom intakten Fusionsprotein ab und lässt sich selbst mittels eigenem GST-tag an die GSH-Sepharose binden. Nach affinitätschromatographischer Aufreinigung kann demzufolge das abgespaltene PBP 2x\* isoliert werden.

### 2.4.2 Eingriff der $\beta$ -Lactame in die Zellwandsynthese

Die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika greifen in die terminalen, enzymatischen Quervernetzungs-schritte der Zellwandsynthese ein. Diese terminalen Reaktionen finden auf der Außenseite der Cytoplasmamembran statt und gliedern sich in die Transglycosylierung von N-Acetylglucosamin (GlcNac) und N-Acetylmuraminsäure (MurNac), in die Carboxypeptidierung und in die Transpeptidierung. PBPs, die je nach ihrer Klasse unterschiedliche enzymatische Aktivität besitzen (siehe Abschnitt 2.4.1), katalysieren die einzelnen Reaktionsschritte. Ein schematischer Überblick über die von PBP katalysierten Reaktionen während der Mureinsynthese ist in Abbildung 2.7 dargestellt.



**Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Mureinstruktur und der von PBP katalysierten Reaktionen** (Angriffspunkte dargestellt in Rot): Transglycosylierung, Transpeptidierung und D,D-Carboxypeptidierung; MurNac = N-Acetylmuraminsäure; GlucNac = N-Acetylglucosamin; modifiziert nach<sup>48</sup>

Die Glycosyltransferasen bzw. Transglycosylasen katalysieren hierbei die Synthese der Polysaccharidstränge.

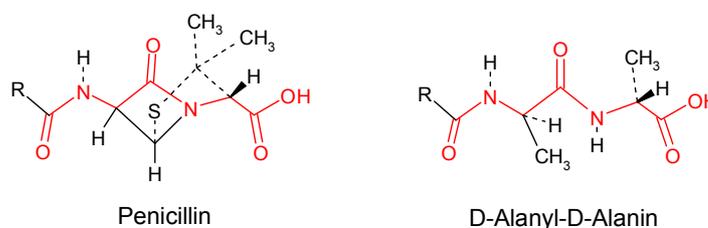
Für die Quervernetzung der Peptidketten sind D,D-Transpeptidasen verantwortlich. Die Vernetzung erfolgt hierbei über einen zweistufigen Mechanismus.

Die Transpeptidierung fordert eine terminale D-Alanyl-D-Alanin-Sequenz am Pentapeptid. Nur wenn diese Strukturvoraussetzung gegeben ist, wird in einem ersten Schritt durch die D,D-Transpeptidase-Aktivität das terminale D-Alanin abgespalten. Dabei erfolgt die Bildung einer Serin-Peptidyl-Esterbindung im aktiven Zentrum des Enzyms. Über einen nucleophilen Angriff einer Seitenaminogruppe eines weiteren Pentapeptids auf den Carbonyl-Kohlenstoff des Serinesters wird in einem zweiten Schritt eine Amidbindung gebildet. Da während der Transferreaktion eine D-Alanyl-D-Alanin Bindung gespalten wird, werden die beteiligten Enzyme als Transpeptidasen und nicht als Transferasen bezeichnet <sup>41</sup>.

Als Regelement für die Vernetzung dienen die D,-D-Carboxypeptidasen. Durch hydrolytische Abspaltung des terminalen D-Alanins einer D-Alanyl-D-Alanin-Sequenz ist die Transpeptidase nicht mehr in der Lage, eine Quervernetzung an der entsprechenden Peptidkette zu katalysieren <sup>41,48</sup>. Dementsprechend verhindert die D,D-Carboxypeptidase eine übermäßige Vernetzung der Zellwand. Ein zu hoher Vernetzungsgrad würde zu Verlusten in der Flexibilität der Zellwand führen.

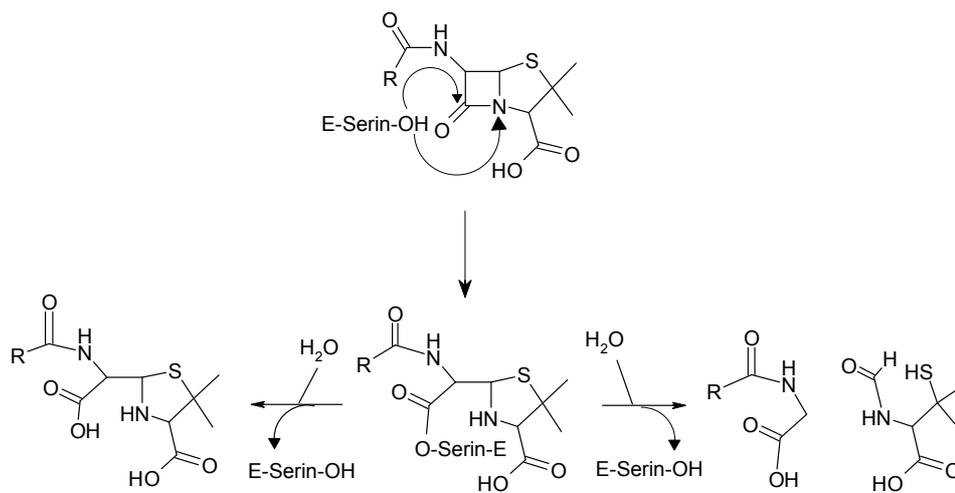
Das wesentliche Angriffsziel der  $\beta$ -Lactame sind die an der Transpeptidierung beteiligten Enzyme. Grund hierfür ist die Strukturanalogie der  $\beta$ -Lactame zum natürlichen Substrat D-Alanyl-D-Alanin <sup>49</sup>, die in Abbildung 2.8 schematisch veranschaulicht wird.

$\beta$ -Lactam-Antibiotika werden vom PBP kovalent über den Serinrest im aktiven Zentrum gebunden. Es kommt zur Bildung eines PBP-Penicilloyl-Komplexes, der keine enzymatische Aktivität mehr besitzt. Dies hat zur Folge, dass keine Quervernetzung zwischen den Peptidketten mehr stattfindet und es kommt letztlich auf Grund der Destabilisierung des Mureingerüsts zur Zellyse.



**Abbildung 2.8: Strukturelle Ähnlichkeit eines Penicillins (links) mit der Dipeptid-Struktur des D-Alanyl-D-Alanins (D-Ala-D-Ala) (rechts); nach <sup>10</sup>**

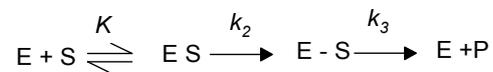
In Abbildung 2.9 ist die Inhibierung der D,D-Transpeptidasen durch  $\beta$ -Lactame veranschaulicht. Durch einen Angriff der OH-Gruppe des Serins im aktiven Zentrum des Enzyms auf den Carbonyl-Kohlenstoff der Amidbindung des  $\beta$ -Lactams kommt es, vergleichend zur Reaktion mit dem natürlichen Substrat, zur Bildung eines Penicilloyl- oder Cephalosporyl-Enzym-Konjugats. Der Carboxyl-Kohlenstoff des Serinesters kann durch ein Wasserstoffmolekül nucleophil angegriffen werden. Dies hat eine hydrolytische Spaltung des Serinesters zur Folge.



**Abbildung 2.9: Inhibierungsreaktion der D,D-Transpeptidasen durch  $\beta$ -Lactam-Antibiotika;** Durch Acylierung der Enzyme entsteht ein Penicilloyl-Enzym-Komplex. Aus diesem werden hydrolytisch Penicilloinsäure (links) oder die Spaltprodukte N-Acyl-Glycin-Derivate und N-Formyl-D-Penicillamin gebildet. <sup>35,50</sup>

Die Halbwertszeit der Penicilloyl- bzw. Cephalosporyl-Enzym-Konjugate kann je nach Enzym bis zu mehreren Tagen betragen. Aufgrund der Inhibierung der D,D-Transpeptidasen über einen längeren Zeitraum und die damit einhergehende Destabilisierung der Zellwand erfolgt letztlich die Zellyse <sup>51-53</sup>.

PBP interagiert mit  $\beta$ -Lactam-Antibiotika entsprechend des folgenden, dreistufigen Reaktionsmechanismus<sup>54,55</sup>. Die allgemeine Gleichung ist wie folgt:



**Allgemeine Gleichung für die enzymatische Reaktion von PBP mit  $\beta$ -Lactam-Antibiotika;**

E = PBP (aktives Enzym); S = Substrat ( $\beta$ -Lactam); ES = reversibler Komplex aus PBP und  $\beta$ -Lactam; E-S = PBP/ $\beta$ -Lactam-Konjugat (acyliertes Enzym); P = Abbauprodukte des  $\beta$ -Lactam-Antibiotikums; K = Dissoziationskonstante des Henri-Michaelis-Komplexes [ $\text{mol l}^{-1}$ ];  $k_2$  = Geschwindigkeitskonstante [ $\text{s}^{-1}$ ] für den Acylierungsschritt;  $k_3$  = Geschwindigkeitskonstante [ $\text{s}^{-1}$ ] für den Deacylierungsschritt

Die Bildung des reversiblen PBP/ $\beta$ -Lactam-Komplexes (ES) wird durch die Dissoziationskonstante K [ $\text{mol l}^{-1}$ ] beschrieben. Aus diesem Übergangskomplex bildet sich der Komplex (E-S), der Penicilloyl-Komplex, der hydrolytisch in das aktive Enzym und ein inaktives  $\beta$ -Lactamderivat gespalten werden kann. Der Parameter  $k_2/K$  formuliert die Effizienz des Acylierungsschrittes von PBP durch das  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum. Dies bedeutet, dass anhand der Konstante  $k_2/K$  [ $\text{l mol}^{-1} \text{s}^{-1}$ ] beschrieben werden kann, mit welcher Effizienz ein  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum in der Lage ist, ein PBP zu hemmen. Die Werte für  $k_2/K$  liegen typischerweise in einem Bereich von 200 – 100.000  $\text{l mol}^{-1} \text{s}^{-1}$ . Je nach den entsprechenden  $k_2/K$ -Werten variiert die Affinität unterschiedlicher PBP gegenüber verschiedenen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika<sup>56-59</sup>.

Ein PBP wird umso effizienter durch ein  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum gehemmt, je größer der  $k_2/K$ -Wert und je kleiner der  $k_3$ -Wert ist. Aufgrund der niedrigen  $k_3$ -Werte, die in einer Größenordnung von  $\leq 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  liegen, sind die PBP/ $\beta$ -Lactam-Konjugate (E-S) außerordentlich stabil<sup>60</sup>.

### Resistenzmechanismen

Bakterien haben eine Reihe von Mechanismen entwickelt, um gegen die Wirkung von Antibiotika resistent zu werden. Aufgrund der breiten Anwendung von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika existieren heutzutage eine Vielzahl resistenter pathogener

Bakterien, die ein großes therapeutisches Problem darstellen <sup>61-63</sup>. Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über die wichtigsten Resistenzmechanismen gegeben. Für einen detaillierten Einblick wird auf die Literatur verwiesen <sup>11,48,62,64,65</sup>.

Die wesentlichen Mechanismen beruhen auf der Produktion von  $\beta$ -Lactamasen und auf der Veränderung der Targetstruktur (PBP) <sup>11,64,65</sup>.

$\beta$ -Lactamasen sind hydrolytische Enzyme, sogenannte Acyl-Serin-Transferasen, die die Amidbindung im Molekül der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika spalten und infolgedessen die antibakterielle Wirkung der  $\beta$ -Lactame hemmen <sup>66</sup>.

Desweiteren kann auch eine Veränderung der Zielmoleküle (PBP), die z. B. durch Mutation entstanden ist, die Affinität gegenüber  $\beta$ -Lactam-Antibiotika herabsetzen. Dieser Resistenzmechanismus kommt überwiegend in gram-positiven Bakterien vor <sup>65</sup>.

Seltener kommt es zu einer strukturellen Modifikation der Zellwand bei gram-negativen Bakterien, wodurch die Durchlässigkeit von  $\beta$ -Lactamen verhindert wird. Beispiele hierfür sind die Expression mutierter Porine in der äußeren Membran oder eine zunehmende Expression von Efflux-Pumpen, die eine spezifische Ausschleusung der Antibiotika aus der Zelle bewirken <sup>67</sup>.

## 2.5 Pharmakokinetik

Die zeitabhängige Konzentration der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika im Organismus wird von verschiedenen Parametern beeinflusst, wie der Bioverfügbarkeit, dem Verteilungsvolumen und der Clearance (Eliminationsleistung).

Die Bioverfügbarkeit hängt hierbei von einer Reihe von Faktoren ab, die sowohl wirkstoff- als auch tierspezifisch sind. Wichtige Einflussgrößen stellen zum Beispiel die Löslichkeit, der Ionisationsgrad, das Molekulargewicht des Arzneistoffes, die pH-Verhältnisse im Organismus und die Oberfläche und Durchblutung des Magen-Darm-Traktes dar <sup>3</sup>.

Je nach Applikation unterliegen  $\beta$ -Lactame unterschiedlichen Prozessen im Organismus. So werden oral oder parental applizierte  $\beta$ -Lactame in unterschiedlichem

Maße an Plasmaproteine, wie Albumin oder  $\alpha$ -Glycoproteine, gebunden. Sie können gegebenenfalls hydrolytisch gespalten werden.

Die Elimination findet hauptsächlich durch glomeruläre Filtration und tubuläre Sezernierung in der Niere statt <sup>11</sup>.

## 2.6 Anwendungsbereich in der Veterinärmedizin

$\beta$ -Lactam-Antibiotika werden in der Veterinärmedizin vorwiegend zur Therapie, Prophylaxe und Metaphylaxe von Infektionskrankheiten eingesetzt <sup>3</sup>. Sie finden hauptsächlich Anwendung gegen Euterentzündungen (Mastitiden), bakterielle Diarrhöe, Klauenentzündungen, bakterielle Atmungserkrankungen und beim MMA-Syndrom (Mastitis, Metrits, Agalaktie).

Die in dieser Arbeit verwendeten  $\beta$ -Lactame sind Benzylpenicillin, Ampicillin, Cefquinom und Ceftiofur (als Desfuroylceftiofur). Das Wirkungsspektrum für Benzylpenicillin erfaßt hauptsächlich grampositive Erreger. Es wird vorwiegend intramammär durch direkte Injektion in den Euter gegen Euterentzündungen eingesetzt. Folglich wird dieser Wirkstoff mit der Milch ausgeschieden. Ampicillin wird hauptsächlich oral angewendet und zur Behandlung von Erkrankungen des Respirations-, Gastrointestinal- und Urogenitaltraktes, die durch grampositive und gramnegative Erreger hervorgerufen werden, eingesetzt. Ceftiofur wird nach der Verabreichung schnell in das entsprechende Desfuroylceftiofur, den aktiven Metaboliten, transformiert. Aus diesem Grund ist die gesetzliche Höchstmenge anhand des Metaboliten festgesetzt worden (siehe Tabelle 3.1). Es findet bei bakteriellen Atmungserkrankungen beim Schwein Anwendung. Cefquinom wird intramuskulär (Injektion in die Muskulatur) gegen bakterielle Infektionen der Lunge und Atemwege bei Rindern und Schweinen eingesetzt <sup>68</sup>. Rückstände dieser vier  $\beta$ -Lactame können in Niere und Muskel vorliegen.

Bei der Rückstandsbeurteilung spielen toxische Effekte keine Rolle, da kein Angriffspunkt im humanen Stoffwechsel vorliegt. Als problematisch bei der Bewertung von Rückständen in Lebensmitteln ist das allergene Potential zu sehen <sup>3</sup>. Zusätzlich kann bei übermäßigem Antibiotikaeinsatz durch unsachgemäßen Einsatz,

wie beispielsweise falsche Dosierung und Indikation, das Risiko der Resistenzbildung erhöht werden. Laut Schneidereit <sup>69</sup> stellt ein verantwortungsvoller Umgang mit Antibiotika und die konsequente Einhaltung von Antibiotikaleitlinien die bedeutendste Maßnahme zum Schutz vor Antibiotikaresistenzen dar. Hierbei ist besonders wichtig, dass Antibiotika nicht als Ersatz für unzureichende Stallhygiene eingesetzt werden. Antibiotika-Leitlinien sollen den Einsatz von antibakteriell wirksamen Stoffen auf das Notwendige limitieren.

### 3 Tierarzneimittel: Markt, Überwachungsprogramme, Rückstandssituation

Tierarzneimittel unterliegen nach § 2 (1) und (2) des Arzneimittelgesetzes (AMG) eindeutig dem Arzneimittelbegriff. Demnach sind es pharmakologisch wirksame Stoffe, die zur Prophylaxe, Metaphylaxe und Therapie eingesetzt werden<sup>3</sup>. Auch ist im AMG (§§ 56a und 58) die Anwendung von Tierarzneimitteln bei Tieren, die der Gewinnung von Lebensmitteln dienen, geregelt. Sie dürfen demnach nur angewendet werden, wenn sie für die entsprechende Tierart zugelassen sind.

Zur Überwachung wurde ein umfangreiches Netzwerk auf EU-, Bundes- und Länder-Ebene etabliert. Dieses Netzwerk umfasst verschiedene, koordinierte Kontrollprogramme (siehe hierzu 3.2.2). Auf internationaler Ebene existiert als wichtigste Regelung der Codex Alimentarius als internationale Norm. Diese wurde 1962 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) und der Welternährungsorganisation (FAO) mit dem Ziel erstellt, internationale Lebensmittelstandards zu entwickeln und dadurch den Welthandel mit Nahrungsmitteln zu erleichtern<sup>70</sup>.

#### 3.1 Tierarzneimittelmarkt

Europa trägt mit etwa 37 % zum Gesamtmarkt der Tierarzneimittel bei (siehe Abbildung 3.1). Im Vergleich zur humanpharmazeutischen Industrie handelt es sich bei den Tierarzneimitteln um einen kleinen Markt<sup>71</sup>.

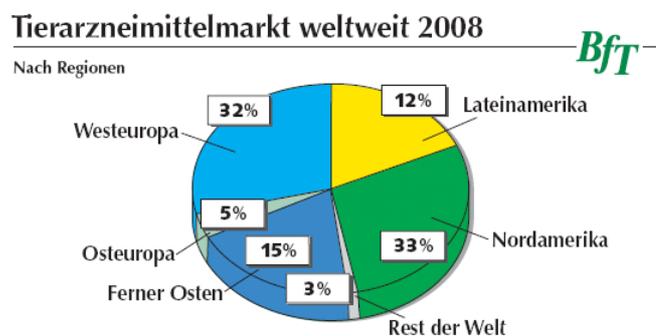
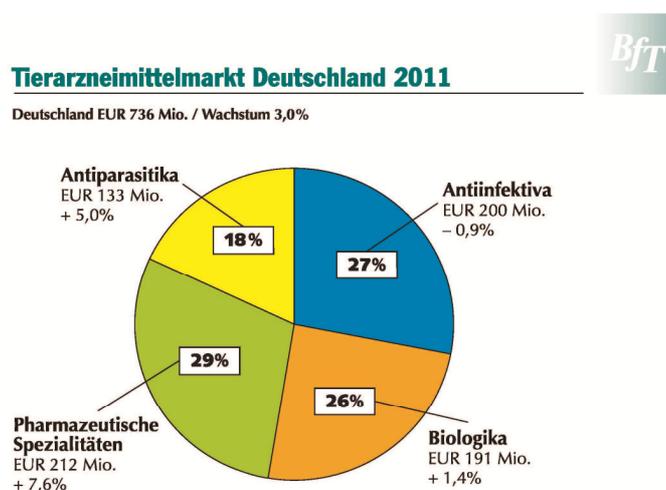


Abbildung 3.1: Weltweiter Tierarzneimittelmarkt (Umsätze): Aufteilung nach Regionen<sup>71</sup>

Der Tierarzneimittelmarkt in Deutschland verzeichnete 2011 ein Gesamtwachstum von 3,0 %<sup>72</sup>. Die  $\beta$ -Lactame gehören zur Gruppe der Antiinfektiva. Diese lassen sich in Antibiotika und Chemotherapeutika unterteilen. Antibiotika werden von Bakterien und Pilzen produziert, Chemotherapeutika synthetisch hergestellt.

Der Marktanteil der Antiinfektiva verringerte sich zum Vorjahr um 0,9%<sup>73</sup>. Ein Grund hierfür ist vermutlich die politische Diskussion in Bezug auf Massentierhaltung und Resistenzbildung. Nach dem Bundesverband für Tiergesundheit e.V. (BfT) belief sich der Umsatz dennoch auf 200 Mio EUR (siehe Abbildung 3.2).



**Abbildung 3.2: Umsatz der Tierarzneimittel für Nutz- und Hobbytiere in Deutschland 2010<sup>1</sup>**

Nach einer Abschätzung aus dem Jahr 2005 stammt etwa die Hälfte des Gesamtverbrauches an Tierarzneimitteln aus der Gruppe der Tetracycline, gefolgt von den  $\beta$ -Lactamen. Diese machten mit 199 Tonnen<sup>1</sup> etwa ein Viertel des Gesamtanteils aus<sup>74</sup>.

<sup>1</sup> Zahlen beruhen auf einer Schätzung der Verbrauchsmenge des Veterinärpanels der Gesellschaft für Konsumforschung (GfK) Nürnberg. Das Veterinärpanel basiert auf einer Stichprobenuntersuchung des Einkaufsverhaltens der niedergelassenen Tierärzte.

## 3.2 Tierarzneimittelüberwachung

Allgemeine Anforderungen des Lebensmittelrechts werden grundsätzlich durch die Verordnung (EG) Nr. 178/2002 festgesetzt <sup>75</sup>. Diese sogenannte Basis-Verordnung bildet den Rahmen für die Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit auf EU-Ebene.

### 3.2.1 Tierarzneimittelüberwachung auf EU-Ebene

Zum Schutz des Verbrauchers vor gesundheitlicher Beeinträchtigung wurden mit der Verordnung Nr. (EG) 470/2009 <sup>76</sup> gemeinschaftliche Regelungen und Verfahren zur Festsetzung von Rückstandshöchstmengen von pharmakologisch wirksamen Stoffen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs etabliert. Auf diese Verordnung stützt sich die Verordnung (EU) Nr. 37/2010 <sup>4</sup>. In deren Anhang sind in Tabelle 1 auf der Grundlage toxikologischer Bewertungen Rückstandshöchstmengen (MRL, maximum residue limits) für die zugelassenen pharmakologisch wirksamen Stoffe aufgeführt. In Tabelle 2 dieser Verordnung stehen die verbotenen Tierarzneimittel. Die festgesetzten Höchstmengen der in dieser Arbeit verwendeten  $\beta$ -Lactame sind im Folgendem in Tabelle 3.1 aufgeführt.

**Tabelle 3.1: Festgesetzte EU-Rückstandshöchstmengen der hier untersuchten  $\beta$ -Lactame in den entsprechenden Zielgeweben <sup>4</sup>**

Pharmakologisch wirksam(e) Stoff(e)	Markerrückstand	Tierart(en)	Rückstandshöchstmenge (MRL)	Zielgewebe
Ampicillin	Ampicillin	Alle zur Lebensmittelherzeugung genutzten Arten	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Muskel
			50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Niere
			4 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Milch
Benzylpenicillin	Benzylpenicillin	Alle zur Lebensmittelherzeugung genutzten Arten	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Muskel
			50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Niere
			4 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Milch
Cefquinom	Cefquinom	Rinder, Schweine	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Muskel
			200 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Niere
Ceftiofur	Desfuroylceftiofur	Alle zur Lebensmittelherzeugung genutzten Arten	1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Muskel
			6000 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Niere

Für den Welthandel sind neben den europäischen Höchstmengen vor allem die von der JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) vorgeschlagenen und von der WHO Codex Alimentarius Kommission verabschiedeten Codex-Höchstmengen zu berücksichtigen.

Die Verwendung von Tierarzneimitteln ist in der Europäischen Union einheitlich geregelt. Einzelne Abweichungen ergeben sich aus den nationalen Zulassungen von Tierarzneimitteln, die von den pharmazeutischen Unternehmen beantragt werden können. Es besteht ein harmonisiertes System in Hinblick auf die Zulassung von Tierarzneimitteln in der EU. Die Federführung obliegt der Europäischen Kommission, die nach Zuständigkeiten in Generaldirektionen aufgeteilt ist. Im Bereich der Tierarzneimittelüberwachung arbeitet die Kommission mit der Europäischen Arzneimittel-Agentur (The European Medicines Agency, EMA) <sup>77,78</sup> der entsprechenden Agentur der Gemeinschaft, zusammen. Für die optimale Überwachung von Tierarzneimittelrückständen in Lebensmitteln erstellt der wissen-

schaftliche Ausschuss für Tierarzneimittel der EMA Gutachten und erarbeitet wissenschaftliche Beurteilungen von Anträgen auf europäische Zulassung von Tierarzneimitteln (zentralisiertes Zulassungsverfahren). Die EMA arbeitet mit den nationalen Risikobewertungs- und Aufsichtseinrichtungen zusammen und stützt ihre wissenschaftliche Arbeit auf ca. 3000 Sachverständige <sup>79</sup>.

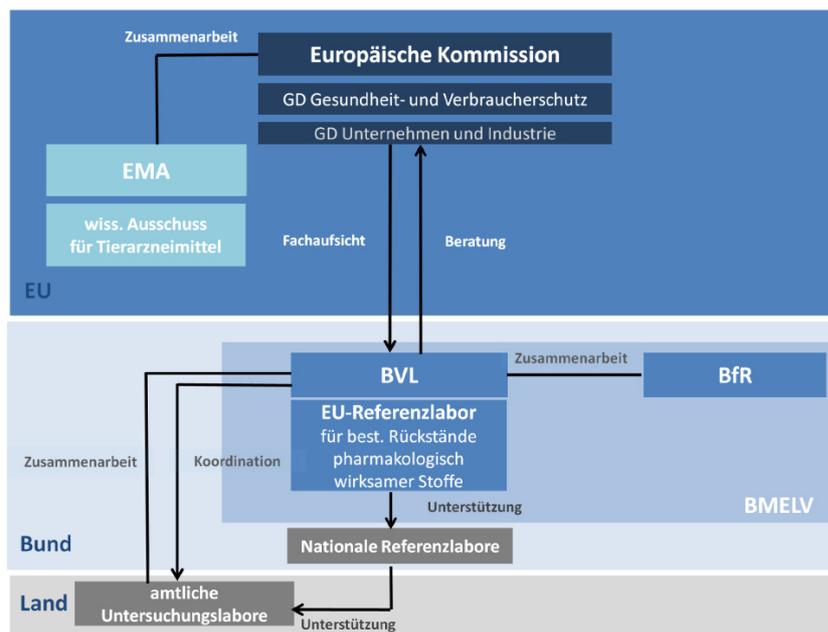
Um die einheitliche Überwachung von Tierarzneimitteln sicherzustellen, gibt es auf EU-Ebene ein umfassendes Netzwerk für die Rückstandskontrolle. 1986 wurden mit der Umsetzung der Richtlinie 86/469/EWG gemeinschaftliche (Community Reference Laboratories, CRLs) und nationale Referenzlaboratorien (National Reference Laboratories, NRLs) etabliert. Es gibt vier EU-Referenzlaboratorien, je eines in den Niederlanden, Frankreich, Deutschland und Italien, die unterschiedliche Aufgabengebiete haben und der fachlichen Aufsicht der Kommission unterstehen. Die Aufgaben der EU-Referenzlaboratorien umfassen zum Beispiel die Entwicklung und Validierung von Nachweismethoden, die Beratung der Europäischen Kommission und die Unterstützung der Nationalen Referenzlaboratorien <sup>80,81</sup>.

Alle Referenz- und amtlichen Untersuchungslaboratorien können die analytischen Methoden zur Untersuchung von Tierarzneimitteln frei wählen, müssen aber die Anforderungen der Kommissionsentscheidung 2002/657/EC erfüllen <sup>82</sup>.

### 3.2.2 Tierarzneimittelüberwachung in Deutschland

In Deutschland stellt sich die Tierarzneimittelüberwachung aufgrund der historischen Entwicklung und des föderalen Systems unübersichtlich dar. Die Durchführung der amtlichen Lebensmittelüberwachung, in der die Rückstandskontrolle der Tierarzneimittel integriert ist, obliegt den Bundesländern.

In Abbildung 3.3 ist ein Überblick über die Institutionen, die an der Überwachung der Tierarzneimittel beteiligt sind, dargestellt.



**Abbildung 3.3: Überblick über die beteiligten Institutionen bei der Tierarzneimittelüberwachung; modifiziert nach <sup>83</sup>**

Als oberste Stelle auf Bundesebene ist das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) tätig. In den Geschäftsbereich des BMELV fällt das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) und das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL). Das BfR ist für die Risikobewertung und Risikokommunikation zuständig, erarbeitet wissenschaftliche Gutachten und Stellungnahmen. Weiterhin dient es als Beratungsstelle für das BMELV und das BVL <sup>84</sup>.

Das BVL fungiert als koordinierendes Bindeglied zwischen den Bundesländern und der Europäischen Union und hat insofern eine unterstützende Funktion (siehe Abbildung 3.3).

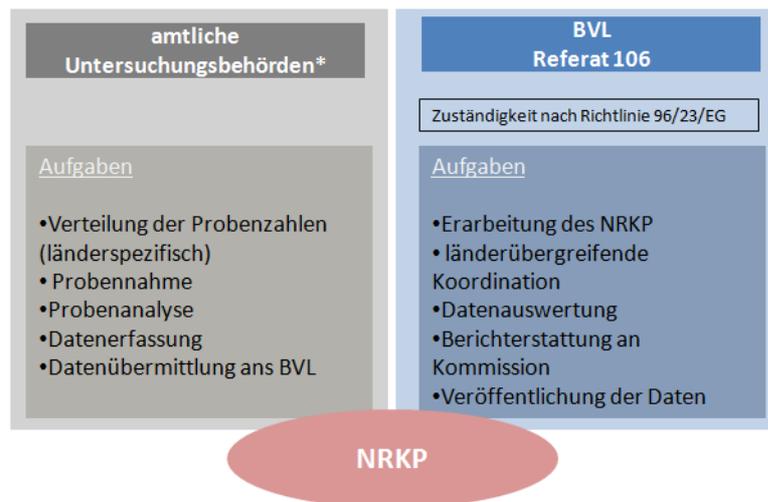
Als nationale Behörde ist das BVL für die Zulassung von Tierarzneimitteln zuständig und beurteilt im Rahmen des Zulassungsverfahrens die eingereichten Unterlagen. Diese müssen umfangreiche Daten zum Produkt enthalten, wie zum Beispiel die pharmazeutische Qualität, das Herstellungsverfahren, die Beschaffenheit, die

Stabilität, den Gehalt, die Reinheit. Die Wirksamkeit und Unbedenklichkeit des Tierarzneimittels muss durch ausführliche Studien durch den Antragssteller belegt werden <sup>84</sup>.

Die Hauptaufgabe des BVL ist die Entwicklung von Systemen zur Risikofrüherkennung. Insofern erarbeitet die Behörde zusammen mit den Ländern koordinierte Überwachungsprogramme, wie den Nationalen Rückstandskontrollplan (NRKP) (etwa 46.300 Proben/Jahr) und das Lebensmittelmonitoring (etwa 5.000 Proben/Jahr). Der NRKP stellt das umfangreichste durchgeführte Programm der Länder dar.

Das BVL erarbeitet jährlich mit den Bundesländern, dem BMELV und den Referenzlaboren den aktuellen NRKP und teilt diesen der Europäischen Kommission mit. Einen Überblick über die Aufgabenverteilung bei der Erstellung und Umsetzung des NRKP ist in Abbildung 3.4 gegeben.

Der NRKP ist ein koordiniertes Programm zwischen Bund und Ländern zur Überwachung von Lebensmitteln tierischer Herkunft in den verschiedenen Produktionsstufen <sup>5</sup>. Der Plan zielt auf die Aufdeckung von illegalen Anwendungen verbotener oder nicht zugelassener Stoffe ab und fungiert als Kontrollwerkzeug, um den vorschriftsmäßigen Einsatz von zugelassenen Tierarzneimitteln zu überwachen. Demzufolge erfolgt die Probennahme ziel- und risikoorientiert und bindet Kenntnisse über regionale und örtliche Gegebenheiten mit ein <sup>85</sup>. Zusätzlich ist die Rückverfolgbarkeit zum Erzeuger gewährleistet. Der Plan ist nicht auf die Erstellung von statistisch repräsentativen Daten ausgelegt.



**Abbildung 3.4: Aufgabenverteilung bei der Erstellung und Umsetzung des NRKP;** \*Oberste Landesbehörden, Landesuntersuchungsanstalten und amtliche Überwachung der Kreis- und Regierungsbezirke

Der Plan enthält konkrete Vorgaben, wie das Probenkontingent, die Auswahl der Tierart, die zu untersuchenden Matrices, das Stoffspektrum und die anzuwendende Methodik. Das Probenkontingent wird anhand der aktuellen Schlacht- und Produktionszahlen des Jahres festgesetzt.

Es wird jährlich jedes 250ste geschlachtete Rind, jedes 2000ste geschlachtete Schwein und je eine Probe von je 15.000 Tonnen Milch untersucht. Im Rahmen des NRKP werden auch die  $\beta$ -Lactame, nach der Richtlinie 96/23/EG des Rates <sup>86</sup> in der Gruppe B1 gelistet, in die Kontrolle mit einbezogen. Neben den Pflichtproben obliegt die weitere Verteilung der Proben den Bundesländern.

Auch die Probennahmen und die Analysen der Proben fallen in den Zuständigkeitsbereich der Länder (siehe Abbildung 3.4). Sie werden in der Regel von Vertretern der amtlichen Überwachung, wie Amtstierarzt oder amtliche Lebensmittelkontrolleure nach den gesetzlich geregelten Vorgaben durchgeführt.

Bei einer Untersuchung auf Tierarzneimittel werden vorab Screening-Methoden angewendet. Bei einem positiven Befund erfolgt anschließend die Absicherung und Quantifizierung mit einer Bestätigungsmethode (chemisch-physikalische Methode) <sup>5</sup>.

Als koordinierende Stelle sammelt das BVL die Untersuchungsergebnisse, übersendet die ausgewerteten, zusammengefassten Daten an die Europäische Kommission und veröffentlicht diese im Internet <sup>87</sup>. Die analytische Qualitätssicherung findet zum Beispiel durch Laborvergleichsuntersuchungen statt, die durch die Nationalen- und EU-Referenzlabore koordiniert werden.

Bestehende Vorgaben und Rahmenbedingungen seitens der EU für die Kontrollen zur Überwachung von lebensmittelliefernden Tieren und deren Produkten sind in der Richtlinie 96/23/EG des Rates <sup>86</sup> sowie der Entscheidung 97/747/EG der Kommission festgelegt <sup>88</sup>. Kriterien für die Stoffauswahl des NRKP sind unter anderem die Toxizität eines Stoffes, die Verfügbarkeit, die Wahrscheinlichkeit des Einsatzes und des Missbrauchs, das Rückstandsverhalten eines Stoffes, die positiven Rückstandsbefunden aus dem Vorjahr und die Verfügbarkeit einer analytischen Methode <sup>5</sup>.

Zusätzlich zum NRKP wurde seit 2004 ein Einfuhrüberwachungsplan (EÜP) in den einzelnen Mitgliedstaaten etabliert. Durch diesen Plan werden tierische Erzeugnisse aus Drittländern auf Rückstände von unerwünschten Stoffen kontrolliert. Es werden Kontrollen, wie Untersuchungen der Sendungen und Probennahmen an den Grenzkontrollstellen von Erzeugnissen tierischen Ursprungs aus Nicht-EU-Staaten durchgeführt. Ein Überblick über die aktuellen Ergebnisse des EÜP von 2010 befindet sich in <sup>89</sup>.

Die europäischen Regelungen für pharmakologisch wirksame Stoffe in Lebensmitteln sind im Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) in nationales Recht umgesetzt. Nach § 10 LFGB dürfen Lebensmittel tierischer Herkunft nur in den Verkehr gebracht werden, wenn die festgesetzte Höchstmengen nach der Verordnung (EU) Nr. 37/2010 nicht überschritten werden. Ferner dürfen keine verbotenen Stoffe enthalten sein. Weiterhin schreibt § 10 LFGB vor, dass vom Tier nur Lebensmittel gewonnen werden dürfen, wenn die festgesetzten Wartezeiten eingehalten worden sind.

Zusätzlich sind in Abschnitt 7 des LFGB (§ 38 bis § 49) Vorschriften zur Überwachung der gesetzlichen Regelungen des LFGB enthalten. In § 41 LFGB sind die Schritte aufgeführt, die von der zuständige Behörde im Fall von nicht rechtskon-

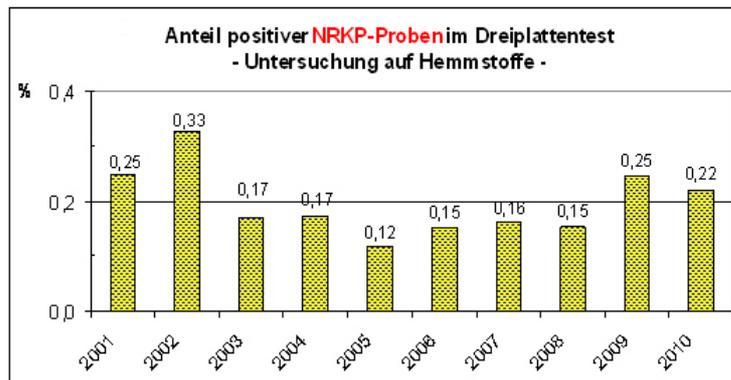
formen Nachweisen von Tierarzneimitteln im Erzeugerbetrieb durchzuführen sind.

Bei einer Überschreitung der Höchstmenge nach Anwendung von Tierarzneimitteln werden durch die örtlichen Kontrollstellen entsprechende Schritte im Herkunftsbetrieb durchgeführt. Diese Maßnahmen umfassen verstärkte Kontrollen, Überprüfung der Aufzeichnungen und der tierärztlichen Hausapotheke. Zudem können zusätzliche Probenahmen im Betrieb durchgeführt und gegebenenfalls Straf- oder Ordnungswidrigkeitsverfahren eingeleitet werden.

### 3.3 Aktuelle Rückstandssituation

Mit dem Rückstandskontrollplan wurde seit 1989 ein EU-weit einheitliches, systematisches Monitoring auf Tierarzneimittelrückstände eingeführt. Im Jahr 2009 wurden, ähnlich wie im Vorjahr, in Deutschland etwa 500.000 Untersuchungen an etwa 50.000 Proben von Tieren und deren tierischen Erzeugnissen durchgeführt, hiervon etwa 300.000 auf Tierarzneimittel. Im Rahmen der Untersuchung des NRKP 2010 wurden 15.602 Proben auf die Stoffgruppe B1 (Stoffe mit antibakterieller Wirkung) analysiert. Hiervon wurden 2010 für die gesamten untersuchten Tierarten bzw. Erzeugnisse 15 Positivbefunde (0,10 %) erhalten, ähnlich wie im Jahr 2009 (0,13 %).

Zusätzlich wurden etwa 264.000 Proben mit dem sogenannten Dreiplattentest (siehe unter 4.1) auf Hemmstoffe untersucht. Der Hemmstofftest stellt ein preiswertes, mikrobiologisches Screening-Verfahren zum Nachweis auf antibakteriell wirksame Stoffe dar. Im Rahmen der Hemmstofftest-Untersuchungen des NRKP 2010 lagen 0,22 % der Proben oberhalb der zulässigen Rückstandsgehalte (MRL) und waren somit im Vergleich zu den letzten Jahren etwas erhöht. Die Tendenz über einen Zeitraum von 10 Jahren zeigt dennoch eine rückläufige Entwicklung in Bezug auf positiv getestete Proben im Dreiplattentest (siehe Abbildung 3.5) <sup>90</sup>.



**Abbildung 3.5: Prozentualer Anteil an positiven Proben bei Untersuchungen auf Hemmstoffe im Dreiplattentest in den Jahren 2001 bis 2010.**

Die im Hemmstofftest positiv getesteten Proben wurden anschließend mit einer geeigneten Bestätigungsmethode identifiziert und quantifiziert. Im Jahr 2010 wurden insgesamt 664 hemmstoffpositive Proben aus der Fleischuntersuchung analysiert. Bei ca. 40 % der Proben wurden Rückstände von verbotenen Stoffen oder Rückstände oberhalb der gesetzlich festgesetzten Höchstmenge gefunden. Die am häufigsten gefundenen Rückstände stammten aus der Stoffgruppe der Tetracycline gefolgt von Chinolonen, Penicillinen und Aminoglycosiden.

Laut NRKP von 2009 lag in einer von 412 auf Penicillinrückstände untersuchten Proben (0,24 %) der Gehalt oberhalb der gesetzlich festgeschriebenen Höchstmenge. Die Höchstmengenüberschreitung wurde in einer untersuchten Schweinenierenprobe gefunden, wobei der zulässige Höchstgehalt von 50 µg/kg um das Fünffache überschritten war <sup>87</sup>.

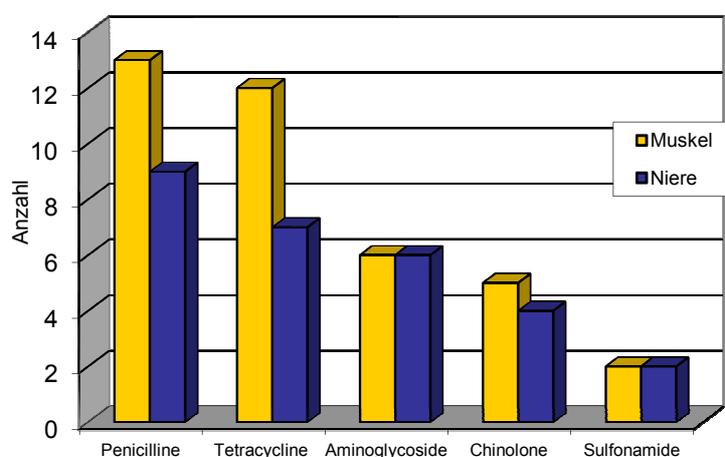
Die Rückstandsbelastungen mit  $\beta$ -Lactam-Antibiotika in Lebensmitteln sind in den Jahresberichten des BVL zu finden <sup>90</sup>.

Im Rahmen der Schlachtier- und Fleischuntersuchungen am Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt (CVUA) Karlsruhe wurden im Jahr 2009 verdächtige Proben gezielt auf Antibiotikarückstände untersucht. Es zeigte sich, dass von den 39 untersuchten Proben 20 Proben Antibiotikarückständen enthielten, das bedeutet, dass in über 50 % der auffälligen Proben Antibiotikarückstände nachgewiesen

wurden. Hierbei wurden von 6 untersuchten Nierenproben 3 positive Befunde (Höchstmengenüberschreitungen) für Benzylpenicillin erhalten <sup>91</sup>.

Im Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit wurden im Jahr 2009 gezielte Nachuntersuchungen positiver Hemmstoffbefunde auf Art und Menge vorhandener Antibiotika-Rückstände durchgeführt. Im Rahmen des NRKP wurden im Jahr 2009 in Bayern etwa 31000 Proben mittels des Dreiplattentests untersucht. Hierbei erwiesen sich 0,24 % der Muskel- und Nierenproben als auffällig. In Abbildung 3.6 sind die Höchstmengenüberschreitungen bezüglich der Stoffgruppenverteilung in Muskelfleisch und Niere dargestellt.

Es zeigt sich, dass die Penicilline, gefolgt von den Tetracyclinen, am häufigsten oberhalb der Höchstmenge nachgewiesen wurden <sup>92</sup>. Das erhöhte Auftreten der Penicilline im Muskelfleisch im Vergleich zur Niere hängt vermutlich mit der deutlich geringeren Höchstmenge für Muskelfleisch (50 µg/kg statt 6000 µg/kg) zusammen.



**Abbildung 3.6: Höchstmengenüberschreitungen – Stoffgruppenverteilung im Rahmen der Nachuntersuchung positiver Hemmstoffbefunde 2009 in Bayern <sup>92</sup>**

Die Rückstandsbelastung mit  $\beta$ -Lactamen in Lebensmitteln ist in den letzten Jahren gering. Dies ist vermutlich nicht zuletzt auf die erfolgreiche Kontrolle seitens der EU und der Länder zurückzuführen. Eine akute gesundheitliche Gefährdung für die Verbraucher ist nicht vorhanden <sup>2</sup>.

## 4 Analytik von $\beta$ -Lactam-Antibiotika in Lebensmitteln - Stand der Forschung

Für den Nachweis von Antibiotikarückständen in Lebensmitteln werden im ersten Schritt Screening-Verfahren angewendet.

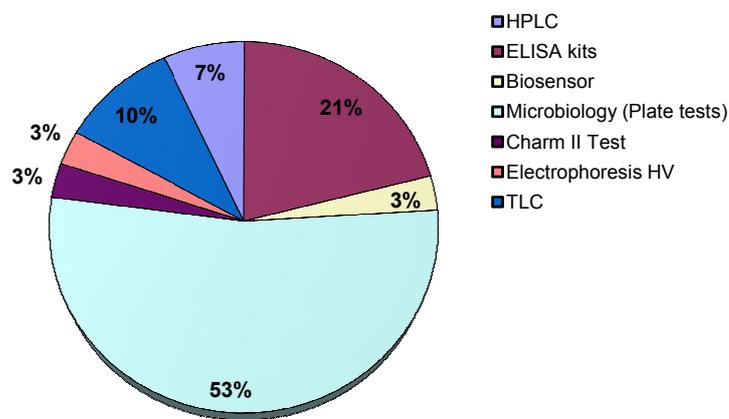
Sie sollen rückstandsfreie Proben „aussieben“, damit Analysen von großen Probenmengen, kostengünstiger und weniger arbeitsaufwändiger durchgeführt werden können. Die im Screening positiv getesteten Proben werden anschließend mittels apparativ aufwändiger Verfahren eindeutig identifiziert und quantifiziert. Seitens der Europäischen Union sind mit der Entscheidung 2002/657/EC allgemeine Definitionen, Anforderungen und Leistungskriterien für Screening-Methoden gemäß der Richtlinie 96/23/EG festgesetzt <sup>93</sup>.

Für  $\beta$ -Lactam-Antibiotika ist eine Vielzahl von Screening-Verfahren kommerziell erhältlich. Sie können in unspezifische und spezifische Screening-Tests unterteilt werden. Zu den unspezifischen Verfahren zählen die mikrobiologischen Hemmstofftests, die vielfach und effektiv bei der Untersuchung auf Penicilline eingesetzt werden. Das Testprinzip beruht hierbei auf Hemmung des Bakterienwachstums durch die vorhandenen Rückstände im Untersuchungsmaterial.

Spezifische Screening-Methoden hingegen nutzen charakteristische Strukturmerkmale als Zielobjekt und zeigen somit eine gewisse Spezifität gegenüber Einzelverbindungen oder Substanzklassen. Unter die spezifischen Screening-Methoden fallen immunochemische Verfahren, bei denen ein Antikörper als spezifische Bindungskomponente zum Zielmolekül eingesetzt wird. Den Immunoassays ähneln die Rezeptorprotein-Tests, die als Bindungskomponente an Stelle des Antikörpers ein Rezeptorprotein verwenden und deshalb separat von den immunochemischen Verfahren zu betrachten sind. Beiden Assayformaten liegt das Schlüssel-Schloss-Prinzip zugrunde. Die eingesetzte Bindungskomponente (Antikörper bzw. Rezeptorprotein) besitzt die Fähigkeit spezifische Strukturen des Moleküls (zum Beispiel den  $\beta$ -Lactam-Ring) zu erkennen. Diese Verfahren können auf Einzelverbindungen als spezifisches Zielmolekül oder ganze Substanzklassen bzw.

-familien ausgerichtet sein. Letztere Verfahren können selektiv identische Molekülbereiche erkennen und werden als klassen- oder familienpezifische Screening-Methoden bezeichnet.

In Abbildung 4.1 ist der prozentuale Anteil der in der EU angewandten Screening-Methoden zur Untersuchung von allgemein zugelassenen antimikrobiell wirksamen Stoffen dargestellt. Etwa ein Viertel der angewandten Tests für den Nachweis von Tierarzneimitteln in Fleisch wurde mittels ELISA (**enzyme linked immunosorbent assay**) durchgeführt (siehe 4.2.1).



**Abbildung 4.1: Eingesetzte Screening-Methoden zur Fleischuntersuchung**

Erhebung der EU durch die Referenzlaboratorien im Zeitraum 2000-2003 (Daten stammen von 15 Referenzlaboren) <sup>94</sup>

Im Folgenden wird ein Überblick über die gängigsten Screening-Methoden auf  $\beta$ -Lactam-Antibiotika gegeben. Schwerpunktmäßig wird auf die Untersuchung von  $\beta$ -Lactamen in den Matrices Niere, Fleisch und Milch eingegangen.

## 4.1 Mikrobiologische Testverfahren

Mikrobiologische Hemmstofftest waren die ersten Screening-Methoden, die zur Detektion von Antibiotikarückständen angewandt wurden. Sie sind in der Routineanalytik zum Nachweis von antimikrobiell wirksamen Stoffen immer noch weit verbreitet <sup>95</sup>. Hemmstofftests nutzen die Sensitivität bestimmter Mikroorganismen (Testkeime) gegenüber Antibiotika und anderen Hemmstoffen aus. Es werden

grundsätzlich zwei Testformate unterschieden: der Röhrentest und der (Multi-) Plattentest. Beide Testformate enthalten ein Nährmedium mit einem sensitiven Testkeim. Nach Zugabe der Probe erfolgt ein Inkubationsschritt bei vorgegebener Temperatur. Bei Anwesenheit von antibakteriellen Substanzen werden die Testkeime in ihrem Wachstum bzw. in ihrer Stoffwechselaktivität gehemmt.

Diese Hemmung kann zum einen über das Wachstum der Keime anhand der Trübung der Medien (Hemmhoftest) oder anhand der speziell gebildeten Stoffwechselprodukte detektiert werden. Die Stoffwechselprodukte sind Säuren oder Redoxäquivalente, die mit Hilfe von Farbindikatoren nachgewiesen werden.

Ein allgemeiner Hemmstofftest zum Nachweis von Antibiotikarückständen in Fleisch und Niere ist der Dreiplattentest. Es handelt sich hierbei um einen Agardiffusionstest. Der Test besteht aus drei Agarplatten mit *Bacillus subtilis* (BGA) als Testkeim. Es werden verschiedene pH-Werte und Zusätze (pH 6,0; pH 7,2 mit Trimethoprim, pH 8,2) in den Testmedien verwendet, um eine Empfindlichkeitssteigerung in Bezug auf verschiedene Wirkstoffgruppen zu erzielen <sup>96</sup>.

Der für Fleisch und Niere entwickelte Premi-Test ist ein Röhrentest und basiert auf Wachstumshemmung des Testkeimes *Bacillus stearothermophilus*. Bei der Abwesenheit von Hemmstoffen erfolgt durch die von den Mikroorganismen gebildete Säure ein Farbumschlag des Testmediums (Farbindikator: Bromkresolpurpur) von lila nach gelb <sup>97-99</sup>.

Als bekanntester Vertreter der Hemmstofftests zur Untersuchung auf antibakterielle Substanzen in Milch ist der Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT-Test) zu nennen. Als Testkeim wird *Geobacillus stearothermophilus* var. *Calidolactis* (C953) verwendet, der sehr sensitiv auf Penicilline reagiert. Die Testkeime wandeln den im Testmedium enthaltenen Redoxindikator (Brillantschwarz) durch Spaltung zweier Azoverbindungen in die gelbe Reduktionsstufe um. Sind Hemmstoffe vorhanden, erfolgt kein Farbumschlag von schwarzblau zu gelb. Den BRT-Test gibt es in unterschiedlichen Testformaten (Röhrchen, 96-well-Platten)<sup>100</sup>. Auf der Basis des gleichen Testprinzips sind für die Untersuchung von Milch eine Reihe Screening-Tests kommerziell erhältlich, wie zum Beispiel der Copan Milk Test <sup>101</sup> oder der Delvotest <sup>102,103</sup>.

Einen guten Überblick über die kommerziellen mikrobiologischen und immunochemischen Screening-Tests für Milch liefert die Zusammenstellung von J-M. Diserens *et al.* <sup>102</sup>.

Hemmstofftests zeichnen sich durch ihre einfache Handhabung, geringen Kostenaufwand und Robustheit aus. Als non-Target-Methode sind sie zwar in der Lage, ein weites Spektrum an Substanzklassen abzudecken, sie sind allerdings unspezifisch, da sie auf alle Stoffe reagieren, die das Wachstum von Mikroorganismen beeinflussen. Insofern kann bei einem positiven Befund keine Aussage über die vorhandene Substanzklasse gemacht werden. Hierfür werden spezifischere Immuno- oder Rezeptorassays benötigt.

## 4.2 Immuno- und Rezeptorassays

Je nach analytischer Fragestellung geben Immuno- und Rezeptortests über den Hemmstofftest hinaus weitere Informationen über die vorhandenen Antibiotikarückstände. Zudem lassen sie in der Regel eine semi-quantitative Aussage in Bezug auf den vorhandenen Rückstand zu.

Sind in einer Probe  $\beta$ -Lactam-Rückstände vorhanden, können der gebildete Antigen/Antikörper-Komplex bzw. das Analyt/Rezeptor-Konjugat im Folgenden durch verschiedenste Markierungen detektiert werden. Als Markierung können radioaktive Isotope (Radioimmunoassay, RIA), Enzyme (Enzymimmunoassay, EIA) oder fluoreszierende Substanzen eingesetzt werden <sup>104</sup>. Gängige Enzymimmunoassays für den Nachweis von  $\beta$ -Lactamen werden in der Regel in Form von Mikrotiterplattentests durchgeführt.

### 4.2.1 Enzymimmunoassay

Enzymimmunoassays werden je nach Testformat in „direkte oder indirekte“ und „kompetitive und nicht-kompetitive“ Assays eingeteilt. Der in dieser Arbeit entwickelte Chemilumineszenz-Rezeptorassay ähnelt im Arbeitsablauf einem indirekten kompetitiven ELISA. Aus diesem Grund wird hier nur auf das kompetitive Assayformat näher eingegangen. Für eine ausführliche, detaillierte Zusammenfas-

sung über Verfahrenstechniken und allgemeine Prinzipien von Enzymimmunoassays wird auf die einschlägige Literatur<sup>105-107</sup> verwiesen.

Beim ELISA werden als spezifische Bindungskomponente Antikörper eingesetzt, die mit dem entsprechenden Antigen eine Antigen/ Antikörper-Reaktion eingehen<sup>106</sup>.

Beim „kompetitiven ELISA“ konkurrieren freies und markiertes Antigen um eine limitierte Anzahl an vorhandenen Antikörperstellen. Das an den Antikörper gebundene, markierte Antigen wird durch einen Waschschrift vom nichtgebundenen Antigen getrennt und anschließend in einem zweiten Schritt (indirekt) über einen tierartenspezifischen, enzymmarkierten zusätzlichen Antikörper detektiert<sup>105</sup>. Das erhaltene Messsignal ist der in der Probe vorhandenen Antigenkonzentration umgekehrt proportional.

Antikörper besitzen je nach Art ihrer Gewinnung keine ausschließliche Spezifität gegenüber ihrer Zielverbindung, oftmals binden sie auch strukturell ähnliche Verbindungen (Kreuzreaktivität). Bei der Herstellung von Antikörpern gegen  $\beta$ -Lactame stellt die Empfindlichkeit des  $\beta$ -Lactam-Rings gegenüber Nucleophilen ein Problem dar<sup>12</sup>. Durch Öffnung des  $\beta$ -Lactam-Rings während der Immunisierung der Versuchstiere, werden Antikörper mit einer hohen Reaktivität gegenüber dem geöffnetem  $\beta$ -Lactam-Ring erhalten<sup>108,109</sup>. Vor einigen Jahren ist es einer Arbeitsgruppe allerdings gelungen penicillin-spezifische Antikörper zu gewinnen<sup>110-112</sup>. Strasser *et al.*<sup>112</sup> entwickelten einen sensitiven direkten ELISA für Penicilline in Milch. Die Cephalosporine können wegen der zu geringen Kreuzreaktivität damit nicht nachgewiesen werden.<sup>111</sup>.

Von der Fa. Randox ist seit 2006 der erste und derzeit einzige kommerziell erhältliche Enzymimmunoassay „Beta-Lactam-ELISA-Kit“ für Penicilline auf dem Markt. Es handelt sich hierbei um einen direkten kompetitiven ELISA, bei dem ein Antikörper als spezifische Bindungskomponente verwendet wird. Der Test erfasst alle in der EU zugelassenen Penicilline (Ampicillin, Amoxicillin, Benzylpenicillin, Cloxacillin, Dicloxacillin, Nafcillin, Oxacillin, Phenoxymethylpenicillin) und zusätzlich einige nicht-zugelassenen Penicilline<sup>113</sup>. Die zweite große Gruppe, die Cephalosporine, wird allerdings nicht erfasst. Das breite Untersuchungsspektrum

des kommerziellen Tests umfasst die Matrices Milch, essbares Gewebe (Muskel-  
fleisch und Niere), Blutserum und Urin. Dies ist ein nennenswerter Vorteil gegen-  
über den sogenannten Dipsticktests (siehe Abbildung 4.2) die nur für die Untersu-  
chung von Milch anwendbar sind.

Die in der EU festgesetzten Höchstmengen für  $\beta$ -Lactam-Antibiotika beziehen sich  
auf Verbindungen mit einem intakten  $\beta$ -Lactam-Ring, da nur diese eine antibakte-  
rielle Wirkung zeigen.

In jüngster Zeit wurden illegale  $\beta$ -Lactamase-Anwendungen durchgeführt, um  
Höchstmengenüberschreitungen von Benzylpenicillin in Milch zu verschleiern.  
Benzylpenicillin wird hierbei in die entsprechende Penicilloinsäure (BPA) über-  
führt.

BPA besitzt allerdings das Potential beim Menschen allergische Reaktionen her-  
vorzurufen. Zhang et al. <sup>114</sup> entwickelten aus diesem Grund einen direkten kompeti-  
tiven ELISA mit Antikörpern zum Nachweis von BPA.

#### 4.2.2 Biosensorsysteme

Eine weitere Möglichkeit des gruppenspezifischen Nachweises von  $\beta$ -Lactam-Anti-  
biotika bietet der Einsatz von Biosensoren. Sie bestehen aus einer biochemischen  
Erkennungskomponente – beispielsweise Antikörper, Nucleinsäuren, Enzyme,  
Rezeptorproteine oder Bakterienzellen– und einer physikalischen Umwandlungs-  
komponente, dem sogenannten „Transducer“. Dieser kann den biochemischen  
Bindungsvorgang (z. B. Antigen-Antikörper-Bindung) in ein elektrisches bzw. opti-  
sches Signal umwandeln und an eine elektronische Messeinheit weiterleiten <sup>115,116</sup>.  
Einen umfassenden Überblick über die Anwendung von Biosensoren in der Le-  
bensmittelanalytik geben Ricci *et al.* <sup>117</sup>. In Abhängigkeit von der Art des „Erken-  
nungssystems“ und der Art der Detektion werden verschiedene Typen von Bio-  
sensoren unterschieden. Häufig wird ein optisches Biosensor-Verfahren verwen-  
det, das als Messgrundlage die Oberflächenplasmonresonanz (**s**urface **p**lasmon  
**r**esonance, SPR) besitzt. Eine aktuelle Zusammenfassung über die neuesten An-

wendungen der SPR zur Untersuchung von Kontaminanten und Rückständen in Lebensmitteln findet sich in <sup>118</sup>.

Knecht *et al.* entwickelten 2004 einen Biosensor-Prototyp („Immunomat“) für den Nachweis von Antibiotika in Milch <sup>119</sup>. Es handelt sich hierbei um ein modifiziertes PASA-System (**p**arallel **a**ffinity **s**ensor **a**rray), das einen automatisierten Multi-Analyt-Immunoassay darstellt, mit dem ein paralleler Nachweis von 10 Antibiotika durchführbar ist. Kloth *et al.* entwickelten dieses System in Hinblick auf die Anwendbarkeit in der Routineanalytik weiter, bei dem ein regenerierbarer Biochip Verwendung findet. Mit dem neuentwickelten MCR 3-Chip-Reader ist eine parallele Analyse von 13 verschiedenen Antibiotika in Milch innerhalb von 6 Minuten möglich <sup>120,121</sup>. Die Messanordnung besteht im Wesentlichen aus einer lichtundurchlässigen Flusszelle, in die der Biochip positioniert ist und einer empfindlichen CCD-Kamera als Detektionseinheit.

Das Testprinzip beruht auf einem Chip-basierten indirekten kompetitiven ELISA mit anschließender Chemilumineszenz-Detektion. An der Chipoberfläche sind Antigene in Form von kleinen „Spots“ in horizontal angeordneten Parallelreihen immobilisiert. Diese immobilisierten Antigene konkurrieren gleichzeitig mit den Antigenen (Antibiotika) in der Milchprobe um zugeführte freie Antikörperbindungsstellen. Die Anzahl der abgefangenen Antikörper wird durch einen enzymmarkierten Sekundärantikörper über eine Peroxidase-katalysierte Luminoloxidation (siehe hierzu Abschnitt 4.4.2) gemessen. Das erhaltene Chemilumineszenz-Signal ist der vorhandenen Antigenkonzentration in der Milchprobe umgekehrt proportional.

In Hinblick auf die automatisierte Multi-Analyt-Detektion ( $\beta$ -Lactame, Sulfonamide, Aminoglycoside und Makrolide) stellt das entwickelte Biosensor-System für den Nachweis von Antibiotika in Milch eine zeitsparende Variante dar, mit der ein weites Spektrum an Antibiotika und eine große Anzahl an Proben untersucht werden können.

### 4.2.3 Rezeptortests

Aufgrund der Strukturanalogie der  $\beta$ -Lactame zu dem natürlichen Substrat der Penicillin-bindenden Proteine (PBP) und der daraus resultierenden Fähigkeit der PBP mit den  $\beta$ -Lactam-Antibiotika Konjugate zu bilden, werden diese zum Nachweis auf  $\beta$ -Lactam-Rückstände eingesetzt.

Eine Möglichkeit zum gruppenspezifischen Nachweis von  $\beta$ -Lactamen in verschiedenen Matrices stellt der von Stanley E. Charm im Jahr 1979 für die Analyse von Tierarzneimitteln in Milch entwickelte Rezeptor-Test <sup>122</sup> dar. Er deckt heutzutage aufgrund seiner Weiterentwicklungen ein breites Substanzspektrum – beispielsweise für  $\beta$ -Lactame, Aminoglycoside, Chloramphenicol, Macrolide, Sulfonamide und Tetracycline- in verschiedenen Matrices, wie Fleisch <sup>123</sup> oder Honig <sup>124</sup> ab. Je nach Substanzklasse sind unterschiedliche Test-Kits kommerziell erhältlich <sup>125</sup>.

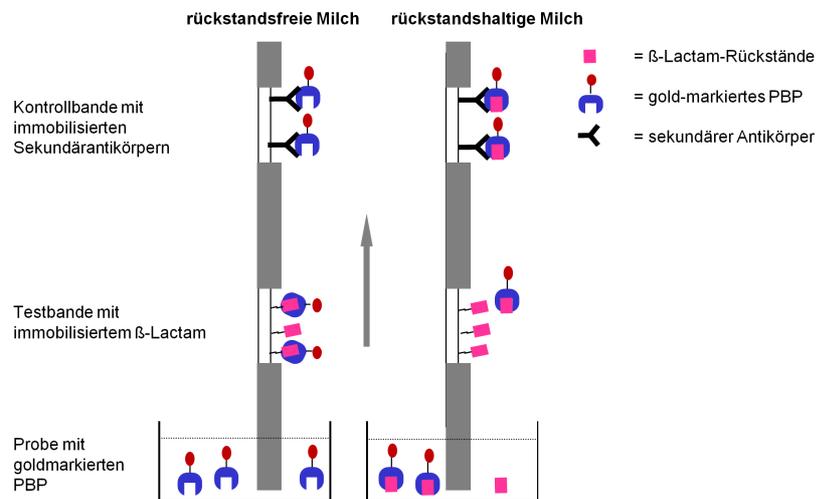
In Abhängigkeit von der Wirkstoffklasse werden als Bindungskomponente beim Charm II-Test Bakterienzellen bzw. Zellfragmente oder Antikörper eingesetzt. Das Testprinzip basiert auf einer Konkurrenzreaktion zwischen dem in der Probe befindlichen Antibiotikum und dem zugegebenen, radioaktiv-markierten (<sup>14</sup>C- bzw. <sup>3</sup>H) Antibiotikum („Tracer“) um die vorgegebenen Rezeptor-Bindungsstellen. Bei der Durchführung des Tests wird zuerst der bakterielle Rezeptor mit der zu untersuchenden Probe inkubiert. Die in der Probe vorhandenen Rückstände besetzen freie Bindungsplätze des Rezeptorproteins.

Nach Zugabe des radioaktiv-markierten Antibiotikums und einem zweiten Inkubationsschritt werden die freibleibenden vom noch verfügbaren Rezeptor ungebundenen Analyten durch einen Zentrifugationsschritt abgetrennt. Das Zellpellet (Tracer-Rezeptor-Komplex) wird nach Zugabe einer Szintillationsflüssigkeit mittels eines Szintillationszählers analysiert. Das Messsignal wird in Zählraten (Counts per minutes, CPM) erhalten. Bei einer rückstandsfreien Probe kann die maximale Menge Tracer an die Rezeptoren binden und demzufolge wird die maximale Zählrate erhalten. Mit zunehmender Rückstandskonzentration resultieren geringere Zählraten.

Da es sich bei dem Assayformat um einen Röhrchentest handelt, ist der Charm-Test für Einzeluntersuchungen gut geeignet. Große Probenserien, wie sie beim ELISA möglich sind, können nicht parallel bearbeitet werden.

Für den Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Rückständen in Milch ist eine Reihe von unterschiedlichen Produkten auf dem Markt, die PBP als spezifische Bindungskomponente verwenden. Die kommerziell erhältlichen, sogenannten Dipsticktests bzw. Lateral-Flow-Tests -  $\beta$ -Star-Test <sup>126</sup>, Charm ROSA-MRL-3 <sup>125</sup> und TwinsensorBT-Test <sup>127</sup>- basieren auf einem Indikatorstäbchentestprinzip. Hierbei werden bei allen drei aufgeführten Tests mit kolloidalem Gold markierte Rezeptorproteine verwendet. Aufgrund der Goldmarkierung zeigen die Bindungskomponenten eine leichte Rotfärbung und können visuell detektiert werden. Auf den Indikatorstäbchen finden die entsprechenden Reaktionen in der sogenannten „Test-“ und „Kontrollbande“ statt. Die auf den Stäbchen lokalisierte Testbande enthält immobilisierte  $\beta$ -Lactame, die Kontrollbande immobilisierte Sekundärantikörper. Diese Sekundärantikörper erkennen die spezifischen Rezeptorproteine und sind als rote Linie nach der Durchführung der Untersuchung zu erkennen. Der prinzipielle Aufbau ist schematisch in Abbildung 4.2 dargestellt. Die Milchprobe wird mit einer spezifischen Rezeptormenge einige Minuten inkubiert. Bei vorhandenen  $\beta$ -Lactam-Rückständen in der Probe besetzen diese die freien Bindungsstellen der Rezeptorproteine. Anschließend wird das Indikatorstäbchen in die Probe getaucht. Mittels Kapillarkraft wandert die Milchprobe nach oben zur Testzone, wobei störende Matrixbestandteile, speziell das Milchfett, durch das Filterpapier zurückgehalten werden. Da nun einige bzw. alle Bindungsstellen der Rezeptorproteine durch die  $\beta$ -Lactam-Rückstände in der Milch besetzt sind, können diese nicht mehr durch die an der Testzone immobilisierten  $\beta$ -Lactame zurückgehalten werden. Sind  $\beta$ -Lactame oberhalb der festgesetzten Höchstmenge in der Milchprobe vorhanden, so wird keine bzw. eine sehr schwache Testlinie erhalten. Liegen in der Probe keine  $\beta$ -Lactame vor, so werden die Rezeptorproteine auf den Indikatorstäbchen an der Testzone von den dort immobilisierten  $\beta$ -Lactamen gebunden und eine rote Bande wird sichtbar. Zur Kontrolle der Analyse dient ein an der Kontrollbande befindlicher Sekundärantikörper, der die Rezeptorproteine binden

kann. Somit wird eine rote Linie sichtbar. Bei einer rückstandshaltigen Probe ist die Testbande schwächer (bzw. farblos) gefärbt als die Kontrollbande.



**Abbildung 4.2: Schematisches Prinzip eines Dipsticktests;** links rückstandsfreie Milchprobe; rechts rückstandshaltige Milchprobe

Mittels  $\beta$ -Star-Test, Charm ROSA-MRL-3 und TwinsensorBT-Test sind Penicilline und Cephalosporine nachweisbar. Der Twinsensor BT-Test erfasst zusätzlich noch Tetracyclinrückstände. Weiterentwicklungen vom  $\beta$ -Star-Test und Charm ROSA-MRL-3-Test, sogenannte „Combo-Tests“ sind mittlerweile für den parallelen Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika und Tetracyclinen auf dem Markt. Alle Tests sind allerdings beschränkt auf den Nachweis von Antibiotikarückständen in Milch.

Im Jahr 2005 entwickelten Cacciatore et al. <sup>16,128</sup> einen SPR-Assay für den Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika in Milch. In diesem Assay dient das vorliegende Rezeptorprotein PBP 2x\* als spezifische Bindungskomponente (siehe 2.4.1.).

Auch der speziell für die Untersuchung von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika in Milch beschriebene Rezeptortest nach Lamar *et al.* <sup>129,130</sup> basiert auf der Verwendung von PBP 2x\* (Details siehe unter Abschnitt 6.1). Er besitzt gegenüber konventionellen ELISA-Tests, die auf der Grundlage von Antikörpern basieren wesentliche Vorteile. Der Rezeptortest erfasst sowohl Penicilline als auch Cephalosporine. Zudem besitzt PBP 2x\*, anders als viele Antikörper, keine Kreuzreaktivität gegenüber dem

geöffneten  $\beta$ -Lactam-Ring. Dies ist insofern relevant, da die Höchstmengenwerte nur  $\beta$ -Lactame mit intaktem Ring berücksichtigen. Nach der Entscheidung der Kommission 2002/657/EC<sup>93</sup> muss mittels eines Analysenverfahrens zwischen dem Analyten und eng verwandten Stoffen – zum Beispiel Metaboliten, Abbauprodukten und Isomeren – unterschieden werden können. Der kolorimetrische Test nach Lamar<sup>129</sup> zeichnet sich durch eine hohe Spezifität aus. Lamar überprüfte die Spezifität mit Hilfe des Antibiotikums Colistin und den Penicilloinsäuren von Ampicillin und Benzylpenicillin. Bedingt durch die kovalente Bindung des PBP 2x\* an  $\beta$ -Lactame werden vom Testsystem nur  $\beta$ -Lactam-Rückstände mit inaktivem (biologisch aktiven)  $\beta$ -Lactam-Ring erfasst.

### 4.3 Chemisch-physikalische Methoden

Nach den EU-Vorgaben muss bei einem positiven Rückstandsbefund eine substanzspezifische Bestätigungsmethode erfolgen, die eine eindeutige Identifizierung und Quantifizierung der Rückstände erlaubt<sup>93</sup>. Hierfür wird auf chemisch-physikalische Methoden mit chromatographischen Trennverfahren zurückgegriffen. Besonders attraktiv sind in diesem Zusammenhang „Multimethoden“, die alle Vertreter mehrerer Substanzklassen vollständig erfassen.

Seit Jahren dominiert die Flüssigkeitschromatographie (**H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatographie, HPLC) die Rückstandsanalytik bei Tierarzneimitteln, so auch bei der Identifizierung und Quantifizierung von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika in Lebensmitteln. Samandiou *et al.*<sup>131</sup> geben einen Überblick über die Analyse von Penicillinen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs mittels HPLC.

Als gängigste stationäre Phasen werden C<sub>8</sub>- oder C<sub>18</sub>-modifizierte Kieselgele eingesetzt<sup>132</sup>. Eine Ausnahme stellt die von Becker *et al.*<sup>133</sup> entwickelte Methode dar, bei der eine Phenylether-Phase Verwendung findet. Das Spektrum der beschriebenen Methoden reicht von flüssigkeitschromatographischen Verfahren mit UV-Detektion<sup>134,135</sup> bis hin zu Methoden, die zur Detektion massenspektrometrische Verfahren (LC-MS)<sup>136-138</sup> oder die Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)<sup>139-143</sup> verwenden.

Wegen Störungen durch die Lebensmittelmatrix erfolgt vor der Analyse in der Regel eine Probenvorbereitung (Clean-up), um den gewünschten Analyten aus der Matrix zu extrahieren und/oder eine Anreicherung des Analyten zu erreichen. Am häufigsten wird für die LC-MS-Untersuchung von Antibiotika-Rückständen in Lebensmitteln ein Clean-up mittels der Festphasenextraktion (Solid Phase Extraktion, SPE) durchgeführt. Einen guten Überblick über die Probenvorbereitung für die LC-MS zur Analyse von Antibiotika in Umwelt- und Lebensmittelproben geben Moreno-Bondi *et al.* <sup>132</sup>.

Heutzutage wird als substanzspezifische Analyse von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika in Milch, Muskel und Niere in der Regel die LC-MS/MS verwendet <sup>131</sup>.

In Hinblick auf die zukünftige Entwicklung von Multimethoden zeigt sich ein deutlicher Trend hin zum „Full-Scan-monitoring“ mittels massenspektrometrischen Methoden, wie der hochauflösenden Flugzeitmassenspektrometrie (MS-TOF, Time-of-Flight) oder der Detektion mittels der Orbitrap-Technologie <sup>132,144,145,146</sup>. Hiermit besteht die Möglichkeit einen Probenextrakt auf Target- und Non-Target-Analyten zu prüfen.

## 4.4 Lumineszenz als Werkzeug in der Rückstandsanalytik

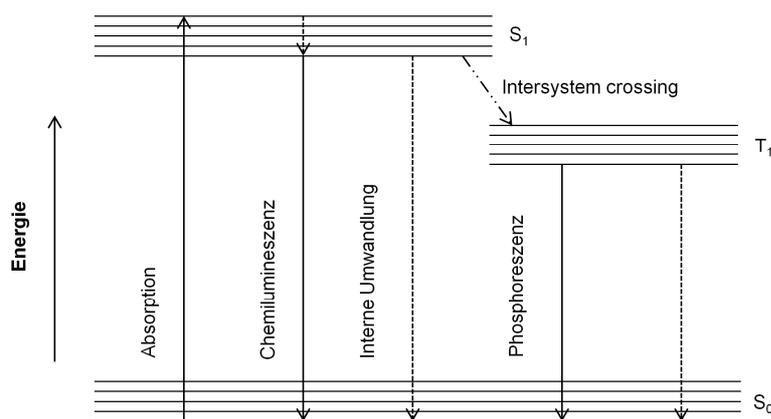
### 4.4.1 Grundlagen der Lumineszenz

Der Ausdruck „Lumineszenz“ (*lat.*: lumen = Licht) beschreibt das Phänomen des „kalten Leuchtens“. Es ist die Emission von Licht, das erzeugt wird, wenn eine Substanz aus einem angeregten Zustand in den Grundzustand zurückkehrt <sup>147</sup>. Zu den bekanntesten Vertretern, die natürliche Lumineszenz erzeugen, gehören das Glühwürmchen und die Feuerfliege.

Lumineszenz-Reaktionen können aufgrund ihrer Anregungsquelle in verschiedene Klassen eingeteilt werden. Demzufolge wird die Lumineszenz eingeteilt in Biolumineszenz (BL) (Lichtaussendung von lebenden Organismen), Chemilumineszenz (CL) (von einer chemischen Reaktion), Elektrochemilumineszenz (ECL) (von einer elektrochemischen Reaktion) und Photolumineszenz (PL) (Anregung durch UV, sichtbaren oder nahen Infrarot-Bereich) <sup>148</sup>. Unter den Begriff Photolumineszenz fallen Fluoreszenz und Phosphoreszenz. Das Präfix beschreibt die Anregungsquelle für die Aussendung der elektromagnetischen Strahlung. Im Folgenden wird für Chemilumineszenz aufgrund der Übersichtlichkeit die Abkürzung „CL“ verwendet.

Bei der CL-Reaktion wird ein chemisches Reaktionsprodukt in einen elektronisch angeregten Zustand überführt. Die angeregten Elektronen emittieren beim „Herunterfallen“ in den Grundzustand Licht <sup>149</sup>.

Abbildung 4.3 zeigt das Jablonski-Diagramm, in dem die einzelnen Energielevels und Elektronenübergänge während der Chemilumineszenz schematisch dargestellt sind. Für die einzelnen Zustände (S0, S1, T1) sind die zahlreichen Schwingungsenergieniveaus als Linien gezeichnet.



**Abbildung 4.3: Jablonski-Diagramm;** Energielevels und Übergänge modifiziert nach <sup>150</sup>;  
 $S_0$ : Singulett-Grundzustand;  $S_1$ : angeregter Singulettzustand;  $T_1$ : angeregter Triplettzustand

Eine Singulett-Singulett-Übergang ist im Vergleich zum Singulett-Triplett-Übergang wahrscheinlicher, da bei letzterem eine Änderung des Elektronenzustandes (Elektronenspins ungepaart) erfolgt.

Ein angeregtes Molekül kann durch verschiedene Mechanismen in den Grundzustand zurückkehren. Bei der Chemilumineszenz, Fluoreszenz und Phosphoreszenz geschieht dies durch Freisetzung von Photonen. Diese Prozesse konkurrieren mit den strahlungslosen intramolekularen Umwandlungsmechanismen (gestrichelte Pfeile, siehe Abbildung 4.3) <sup>151</sup>. Für eine genauere Betrachtung dieser Prozesse wird auf die einschlägige Literatur verwiesen <sup>146,151,152</sup>.

### Allgemeines Prinzip der Chemilumineszenzreaktion

Die Chemilumineszenz ist definiert als die Emission von elektromagnetischer Strahlung (normalerweise im sichtbaren oder nahen Infrarot-Bereich), die durch eine chemische Reaktion produziert wird.

Es existieren zwei Grundmechanismen, durch die CL erzeugt werden kann (siehe Abbildung 4.4)

- I. Die direkte CL-Reaktion
- II. Die indirekte CL-Reaktion

Bei der direkten CL-Reaktion reagieren zwei Reagenzien, im allgemeinen ein Substrat und ein Oxidant in der Anwesenheit von Cofaktoren, direkt und bilden ein Intermediat. Dieses Intermediat wird in einen elektronisch angeregten Zustand überführt. Durch Rückkehr der Elektronen in den Grundzustand wird anschließend Licht ausgesendet, d.h. die Energie wird in Form von Lichtquanten abgegeben. Diese Reaktion kann gegebenenfalls durch ein Enzym (z.B. Meerrettichperoxidase, HRP; *engl.* Horseradish Peroxidase) katalysiert werden. Dieses setzt die Aktivierungsenergie herab und führt somit zu einer hohen CL-Effizienz.

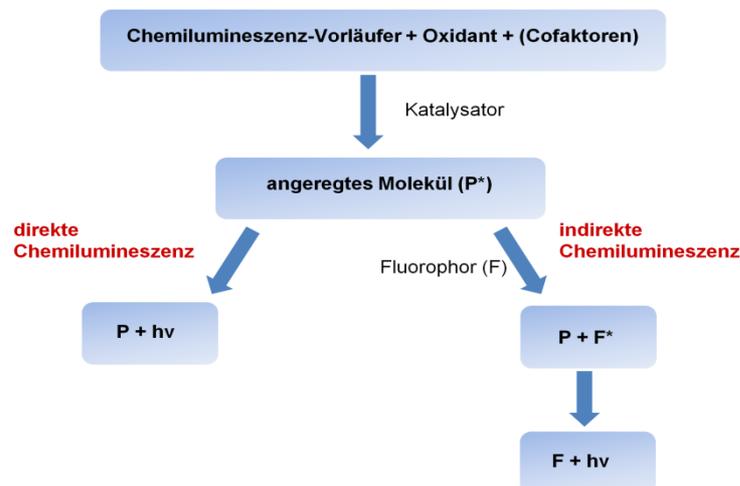


Abbildung 4.4: Verschiedene Typen der CL-Reaktion <sup>146</sup>

Die indirekte CL-Reaktion basiert auf einem Energietransfer des angeregten Zustandes auf ein Fluorophor, welches sich in ein angeregtes Molekül umwandelt. <sup>146</sup>

Die in dieser Arbeit verwendete Luminoloxidation (siehe unter Abschnitt 4.4.2) entspricht einem direkten CL-System.

Nach Garcia-Campana *et al.* <sup>146</sup> reagieren in einer CL-Reaktion des Typ I der Oxidant und Reduktant mit einer Geschwindigkeitskonstante  $k_r$ . Der angeregte Singulett-Zustand des gebildeten Produkts zerfällt mit einer Geschwindigkeitskonstante erster (oder pseudoerster) Ordnung.

Liegt die oxidierende Spezies im Überschuss vor und ist der Mischprozess nicht geschwindigkeitsbegrenzend, dann gilt:

$$I_{\text{CL}} = \phi_{\text{CL}} \cdot \left( \frac{-dL}{dt} \right) \quad \text{Gleichung 4-1}$$

mit  $I_{\text{CL}}$  = Chemilumineszenzintensität

$\phi_{\text{CL}}$  = Effizienz der Chemilumineszenzreaktion

$\left( \frac{-dL}{dt} \right)$  = Verbrauchsrate des Luminophors

daraus ergibt sich:

$$I_{\text{CL}} = \phi_{\text{CL}} \cdot k_r [L] \quad \text{Gleichung 4-2}$$

$L$  = Konzentration des Luminophors als Funktion der Zeit ( $L_0 \cdot e^{-k_r t}$ )

$k_r$  = Geschwindigkeitskonstante, um angeregten Zustand zu bilden

Aus Gleichung 3-2 folgt, dass die Intensität des CL-Signals direkt von der Konzentration des Luminophors abhängt.

Der Verbrauch des Luminophors (hier Luminol) ist wiederum abhängig von der Meerrettichperoxidase-Konzentration. Es ist somit möglich, die CL-Intensität nach einer definierten Zeitspanne zu messen und auf die Konzentration zu beziehen.

Die Effizienz einer CL-Reaktion ist als Quantenausbeute  $\Phi_{\text{CL}}$  definiert und kann vereinfacht ausgedrückt werden als der Anteil gebildeter angeregter Moleküle, die bei der Rückkehr in den Grundzustand Licht emittieren <sup>146,150</sup>. Da der Lichtemission eine chemische Reaktion vorausgeht, wird die Reaktionskinetik außer von der Eigenschaft und Konzentration des Vorläufers der emittierenden Substanz noch von zahlreichen weiteren Faktoren beeinflusst, hauptsächlich dem Katalysator, eventuell vorhandenen Metallionen, der Temperatur, dem pH-Wert und der Ionenstärke <sup>146</sup>.

Ein weiteres Merkmal der CL-Messung ist das einfache Messverfahren, das keine externe Lichtquelle benötigt. Die Strahlungsquelle ist in diesem Fall „die chemische Reaktion“. Das Messsystem eines einfachen Luminometers besteht aus einer lichtgeschützten Reaktionszelle und einem Photomultiplier als Detektor. Der De-

tektor kann entweder seitlich der Reaktionszelle („Side-on“ Anordnung) oder unterhalb der Zelle („end-on“ Anordnung) positioniert sein <sup>153</sup>. Es sind hocheffiziente und preisgünstige Luminometer sowie entsprechende Mikrotiterplatten-Reader kommerziell erhältlich <sup>154,155</sup>.

Das Fehlen von Lichtstreuung- oder Interferenzproblemen führt im Vergleich zu photochemischen Prozessen zu einem geringen Hintergrundrauschen. Ein Vorteil der Lumineszenz ist die hohe Empfindlichkeit und die damit verbundene niedrige Nachweisgrenze (Nachweisgrenzen liegen im ppb-Bereich (*engl.* parts per billion)). Im Vergleich zu anderen spektrometrischen Techniken ist die CL im allgemeinen  $10^5$  mal sensitiver als die Absorptionsspektrometrie und ca.  $10^3$  fach sensitiver als die Fluorimetrie <sup>146</sup>.

Zusätzlich ist es von Vorteil, dass die meisten Chemilumineszenz-Reagenzien und Konjugate über einen längeren Zeitraum stabil und im allgemeinen nicht toxisch sind <sup>150</sup>.

Rongen *et al.* <sup>150</sup> und Dodeigne *et al.* <sup>149</sup> geben einen detaillierten Überblick über verschiedene CL-Systeme und deren Anwendung in Immunoassays. Neben den Acylhydraziden, zu denen auch das Luminol gehört, gibt es CL-Systeme mit Acridiumestern, 1,2-Dioxetane und Peroxyoxalate.

Zur Verbindungsklasse der Dioxetane gehört 4-Methoxy-4-(3-phosphatphenyl)-spiro[1,2-dioxetan-3,2'-adamantan] Dinatriumsalz (AMPPD), das in Detektionstechniken mit alkalischer Phosphatase eingesetzt wird und bei der Untersuchung von DNA-Proben häufig Verwendung findet.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Luminoxidation eingesetzt.

#### 4.4.2 Das Prinzip der Luminoloxidation

In 1928 publizierte Albrecht <sup>156</sup> als Erster die Chemilumineszenz von Luminol (5-Aminophthalylhydrazid). Bei der Oxidation von Luminol mit Meerrettichperoxidase (HRP) in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid wird im wässrigen Medium blaues Licht emittiert. Auch andere Oxidationsmittel, wie Permanganat, Periodat und Hexacyanoferrat (III) oder Metallionen (z.B. Cu (II), Co (II)) finden Verwendung <sup>157</sup>.

Die Luminoloxidation findet als Detektionsmöglichkeit unter Verwendung von Antigen- oder Antikörpermarkierung mit Peroxidase-Enzymen verbreitet in Immunoassays Anwendung. Insbesondere die Peroxidase aus Meerrettich wird hierbei vielfach und effektiv als Katalysator in Immunoassays eingesetzt <sup>148</sup>.

Die enzymkatalysierte Chemilumineszenzreaktion folgt einem komplexen Mechanismus, der noch nicht vollständig geklärt ist. Es wird angenommen, dass die Reaktion mit Luminol in einem 2 stufigen Prozess erfolgt <sup>148,149</sup>. Der Prozess kann unterteilt werden in:

- die Bildung des Schlüssel-Intermediates Luminolhydroperoxid ( $\text{LOOH}^-$ )
- Abbau des Luminolhydroperoxids

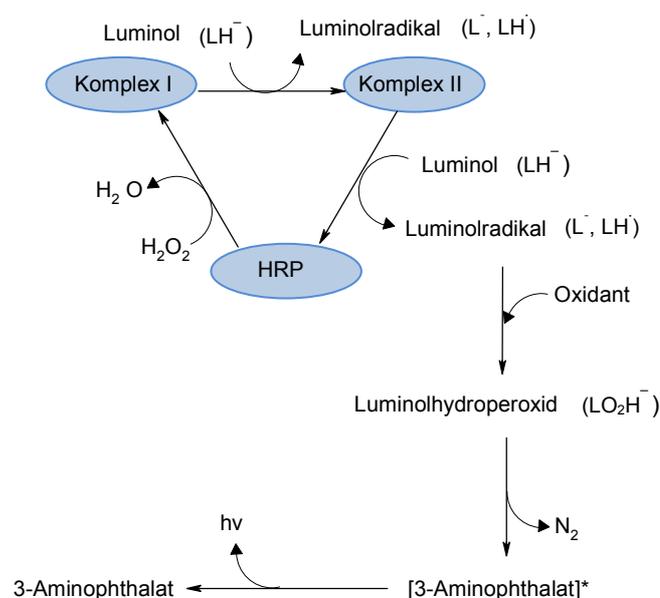


Abbildung 4.5: Reaktionsmechanismus der HRP-katalysierten Luminoloxidation <sup>148</sup>



**Abbildung 4.6: Strukturformeln der an der HRP-katalysierten Luminoloxidation beteiligten Verbindungen** <sup>148,158</sup>

In Abbildung 4.5 ist der HRP-katalysierte Reaktionsmechanismus schematisch dargestellt.

Im ersten Schritt wird HRP über eine Serie von enzymatischen Schritten bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und Luminol (LH<sup>-</sup>) in Zwischenkomplexe (Komplex I und Komplex II) umgewandelt. Das bedeutet, HRP reagiert mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zur oxidierten Form (HRP I) und anschließend mit dem Luminolanion (LH<sup>-</sup>) zu der halb-reduzierten Form des Enzyms (HRP II) und dem Luminolradikal (LH<sup>•</sup>, L<sup>-</sup>). Das Enzym kehrt in die reduzierte Form (HRP) durch die Reaktion mit einem zweiten Luminolmolekül zurück <sup>148,159</sup>.

Die produzierten Luminolradikale gehen in einen komplexen chemischen Mechanismus ein und erzeugen schließlich Luminolhydroperoxide (LO<sub>2</sub>H<sup>-</sup>), die Vorläufer der Lichtemission (angeregtes 3-Aminophthalation) <sup>148</sup>. Die Reaktion des Luminols mit dem Komplex I ist ca. 100-fach schneller als die Reaktion mit Komplex II <sup>160</sup>.

Der erste Schritt (bis zum Luminolhydroperoxid) ist abhängig von den exakten Bedingungen, wie zum Beispiel der Konzentration des Oxidanten, der Eigenschaft des Oxidanten, dem Enzym-Wasserstoffperoxid-Verhältnis, Puffer und pH-Wert <sup>149</sup>. Im Gegensatz dazu ist der Abbau der Luminolhydroperoxide (LO<sub>2</sub>H<sup>-</sup>) nur vom pH-Wert des Systems abhängig <sup>159</sup>.

Für die peroxidase-katalysierte Luminolreaktion stehen eine Reihe Verstärker zur Verfügung. Einige wichtige sind hierbei 6-Hydroxybenzothiazole (synthetisches Luciferin) und p-substituierte Phenole (z.B. p-Iodophenol (PIP)). Der effizienteste Verstärker für die Luminoloxidation ist PIP <sup>150,161</sup>. Die verstärkte CL-Reaktion, auch

ECL genannt, (*engl.* enhanced chemiluminescence) zeigt eine hohe Intensität und eine anhaltende, stabile Lichtemission <sup>162</sup>.

Die Verstärkung ist pH-abhängig mit einem signifikanten Anstieg der Lichtemission bei pH 7.0 bis 9.5. Das Optimum liegt bei einem pH-Wert um ca. 8.5.

Die Verstärkung der Lichtemission ist zusätzlich abhängig von der Verstärkerkonzentration. Bei PIP steigt die Lichtintensität bis zu einer optimalen PIP-Konzentration (0,41 mmol/L), eine höhere Verstärkerkonzentration führt zur Abnahme der Lichtintensität <sup>163</sup>. Es wird angenommen, dass sich bei der phenolverstärkten Reaktion zuerst Phenoxyradikale bilden und anschließend Luminolradikale. Die Phenoxyradikale dienen als Elektronentransfer-Vermittler und erhöhen somit die Effizienz der Luminolradikalbildung <sup>150,160</sup>.

Während der katalysierten Luminolreaktion wird eine zeitabhängige Inaktivierung der HRP angenommen. Aufgrund des Wasserstoffperoxid-Überschusses wird eine Serie von hoch reaktiven Radikal-Intermediaten gebildet. Diese können die prosthetische Gruppe des Enzyms modifizieren, wobei diese Aktivität verliert <sup>161,164</sup>.

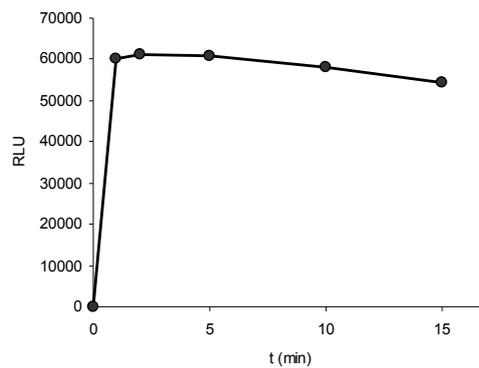


Abbildung 4.7: Abfall der Lichtintensität über einen Zeitraum von 15 min in einem Luminol/p-Idophenol CL-Assay <sup>165</sup>

Der typische Zeitverlauf einer ECL-Reaktion beinhaltet einen schnellen Anstieg in der Signalintensität innerhalb der ersten 60 s. Anschließend wird eine relativ stabile Intensität über mehrere Minuten erhalten, die in einem letzten Schritt langsam abfällt (siehe Abbildung 4.7). Dieses Reaktionsprofil wird auch als Glow-Typ bezeichnet <sup>166</sup>.

Nicht alle Isoenzyme der HRP besitzen die gleiche Fähigkeit für die Katalyse der CL-Reaktion. HRP VI A zeigt im Vergleich zu anderen Isoenzymen eine höhere Aktivität <sup>161</sup>.

In aktuellen Untersuchungen beschreiben Yu *et al.* <sup>167</sup> und Sakharov *et al.* <sup>168</sup> die erfolgreiche Verwendung von HRP aus Sojabohnen (SbP, *engl.* anionic Soybean Peroxidase) zur Katalyse der Luminoloxidation und den Einsatz in Immunoassays. Der SbP-basierte CL-ELISA zeigt, im Vergleich zu HRP-basierten CL-ELISAs eine bessere Leistungsfähigkeit bezüglich Nachweisgrenze, IC<sub>50</sub>-Wert und Arbeitsbereich <sup>168</sup>.

### 4.4.3 Chemilumineszenz-Assays in der Rückstandsanalytik

Die CL-basierte Detektion wird für viele analytische Fragestellungen aufgrund ihrer hohen Sensitivität und des geringen Kostenaufwandes eingesetzt. Sie findet Anwendung in der Flow Injection Analysis (FIA), der Flüssigkeitschromatographie (LC), der Kapillarelektrophorese (CE), in Biosensoren und in Immunoassays <sup>157</sup>. In der LC wird häufig Luminol als Reagenz für die Nachsäulen-Detektion eingesetzt <sup>169</sup>. In den letzten 20 Jahren wurde eine Reihe von Übersichtsartikeln publiziert, die sich mit der CL-Detektion und deren Anwendung in der Analytik beschäftigen <sup>149,170,171</sup>. Einen detaillierten Überblick über die Anwendung der Luminoloxidation in der analytischen Chemie, insbesondere in Immunoassays, geben Marquette *et al.* <sup>148,172</sup>.

**Tabelle 4.1: Einige Beispiele für den Einsatz der enzymkatalysierten Luminoloxidation in der Rückstandsanalytik**

Rückstand	Matrix	Enzym-Konjugat	Assayformat	Literatur
$\beta$ -Lactame, Sulfonamide, Aminoglycoside	Milch	sekundärer Antikörper-HRP	Biochip	<sup>120</sup>
Clenbuterol	Urin	Clenbuterol-HRP	Mikrotiterplatten	<sup>173</sup>
Sulfamethoxypyridazin (Sulfonamid)	Milch	Streptavidin-SbP	Mikrotiterplatten	<sup>168</sup>
Chloramphenicol	Milch	Chloramphenicol-HRP	Mikrotiterplatten	<sup>174</sup>
Estradiol	Blut	Estradiol-HRP	Magnetpartikel	<sup>175</sup>
Chlorpyrifos (Pestizid)	Wasser, Fruchtsaft, Honigextrakt	Antikörper-HRP	Mikrotiterplatten	<sup>176</sup>
Aflatoxin M <sub>1</sub>	Milch	Antikörper-HRP	Mikrotiterplatten	<sup>177</sup>
DDT	Lebensmittel, Umweltproben	Antikörper-HRP	Mikrotiterplatten	<sup>178</sup>

## 4.5 Magnetpartikel als Werkzeug in der Analytik

Seit etwa 1970 werden magnetische Partikel vermehrt für medizinische und biologische Anwendungen eingesetzt <sup>179</sup>.

Spezifische Bindungsmoleküle werden an die Oberfläche der Magnetpartikel gekoppelt. Die modifizierten Partikel können anschließend mit einer Lösung, die die Zielanalyten (Antigene, DNA, Peptide etc.) enthält, gemischt werden. Nach einer Inkubationsphase werden die gebildeten Magnet-Zielanalyt-Komplexe durch magnetische Trennung isoliert. Hierfür wird das Probengefäß kurze Zeit in einen geeigneten Magneten gestellt, wodurch die Partikel an die Gefäßwand fixiert werden. Anschließend kann die überstehende Lösung abdekantiert werden.

Verschiedenste Probenmatrices können bei dieser Technik verwendet werden, wie zum Beispiel Zelllysate, Blut, Fermentationsprodukte, Milch und Urin <sup>180</sup>.

Die Trennung mittels magnetischer Partikel bietet viele Vorteile gegenüber konventionellen Trenntechniken. Die magnetischen Partikel ermöglichen einen einfachen, schonenden und schnellen Wasch- bzw. Trennschritt ohne Zentrifugation oder Filtration. Zudem bietet die große Oberfläche der Partikel und die Verteilung der Partikel in der Suspension eine schnelle Assaykinetik aufgrund kurzer Diffusionswege. Dies führt zur Steigerung der Effizienz und kürzeren Analysezeiten <sup>181,182</sup>. Auch die grundlegende Ausstattung ist kostengünstig und einfach in der Handhabung. Für die Trennung wird ein starker Permanent-Magnet verwendet, der in den unterschiedlichsten Ausführungsgrößen und -formen kommerziell erhältlich ist.

Aufgrund der besonderen superparamagnetischen Eigenschaft der Partikel zeigen diese nur in Anwesenheit eines externen Magnetfeldes magnetische Eigenschaften. Bei Abwesenheit eines äußeren Magneten können die magnetischen Partikel wieder leicht resuspendiert werden <sup>180</sup>. Es sind verschiedenste Partikel Ausführungen kommerziell erhältlich. Dynabeads® werden häufig für magnetische Techniken eingesetzt und sollen hier näher betrachtet werden.

Sie sind einheitliche, poröse Polystyrol-Partikel mit ferromagnetischer Eigenschaft <sup>183</sup>. Je nach spezifischer Kopplungsanwendung sind tosylaktivierte Partikel, Partikel mit Carbonsäuren-, Amino- oder Epoxygruppen erhältlich <sup>184</sup>. Auch chemisch

modifizierte Partikel mit spezifischen Liganden, wie Streptavidin oder Protein A, sind gängige Angebotsformen.

In dieser Arbeit wurden magnetische Partikel mit Epoxygruppen verwendet, an die sich das Rezeptorprotein PBP 2x\* über primäre Amino- oder Sulfhydrylgruppen koppeln lässt (siehe unter 6.4.1.).

Aufgrund verschiedenster Oberflächenmodifizierungen der magnetischen Partikel und Kopplungen mit spezifischen Erkennungsmolekülen (Antikörper und Rezeptorproteine) ist der Einsatz sehr vielfältig und erstreckt sich über einen breiten Einsatzbereich, wie biotechnologische <sup>185</sup>, mikrobiologische <sup>182</sup>, biomedizinische <sup>180</sup> und rückstandsanalytische <sup>186</sup> Anwendungen. Eines der größten Einsatzgebiete stellt die Isolierung, Aufreinigung und Anreicherung von Proteinen, Nucleinsäuren, Zellen oder Zellorganellen dar <sup>179,180</sup>. Einen detaillierten Überblick über magnetische Techniken zur Zellisolierung gibt Safarik *et al.* <sup>180</sup>.

Magnetpartikel wurden zuerst für die Aufreinigung von Lymphocyten in Blut <sup>187</sup> und die Trennung von DNA in Zellsuspensionen <sup>188</sup> eingesetzt. Seit Jahren finden sie zudem Anwendung in Immunoassays.

Eine Vielzahl von Veröffentlichungen beschreibt ELISA Methoden, die anstatt einer Mikrotiterplatte magnetische Partikel als Festphase verwenden <sup>189-193</sup>.

Auch elektrochemische Magneto-Immunoassays werden in der Literatur beschrieben <sup>181,194,195</sup>. Zacco *et al.* <sup>181</sup> entwickelten einen elektrochemischen Magneto-Immunoassay zur Analyse von Sulfonamiden in Milch. Hierbei dienen die modifizierten magnetischen Partikel als physikalisches Label und können mit Hilfe eines Magnetsensors, der gleichzeitig als Transducer dient, „eingefangen“ und direkt detektiert werden.

## 5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines kompetitiven Assays zum Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika in Niere und anderen Matrices. Als Ausgangspunkt für diese Arbeit sollte ein kolorimetrisches Mikrotiterplatten-Testsystem, das in einer vorausgegangenen Arbeit von Lamar <sup>129</sup> entwickelt wurde, dienen. Im Testverfahren von Lamar wurde als spezifische Bindungskomponente das Rezeptorprotein PBP 2x\* eingesetzt.

PBP 2x\* erfasst beide Gruppen der  $\beta$ -Lactame (Penicilline und Cephalosporine) und zeigte in den vorausgehenden Arbeiten großes Potential in familienspezifischen Testverfahren eingesetzt zu werden. Aus diesem Grund sollte es als analytisches Tool für das neue Testformat Verwendung finden.

Screeningverfahren sollen eine nicht aufwändige und schnelle Probenaufarbeitung gewährleisten. Eine Vielzahl von kommerziell erhältlichen Screeningverfahren beschränkt sich auf die Untersuchung von Milch und ist nicht geeignet zur Analyse von essbarem Gewebe (wie Muskel und Niere). Aus diesem Grund wurde geprüft, ob die Herstellung des Tausaftes und eine nachfolgende Verdünnung in Puffer geeignet sind, um  $\beta$ -Lactam-Antibiotika an ihren jeweiligen Höchstmengen mittels des kolorimetrischen Assays nachzuweisen.

Ausgehend von dieser Fragestellung sollte geprüft werden, ob durch den Einsatz von Chemilumineszenz-Detektion eine Empfindlichkeitssteigerung des Tests erreicht werden könnte. Generell ist die Chemilumineszenz- im Vergleich zur kolorimetrischen Detektion etwa um den Faktor  $10^5$  empfindlicher. Demzufolge müsste eine stärkere Verdünnung der Probe möglich sein, durch die eine Minimierung eventuell störender Matrixbestandteile resultieren würde.

Als Detektionsmöglichkeit sollte das Potential der Luminoloxidation, die in zahlreichen Immunoassay-Systemen eingesetzt wird, untersucht werden. Die Reaktion beruht auf einer meist durch Meerrettichperoxidase katalysierten Oxidation mit Wasserstoffperoxid und Luminol.

Diese Chemilumineszenzreaktion sollte hinsichtlich der Leistungsfähigkeit mit der kolorimetrischen Detektionsreaktion verglichen werden. Für den CL-Assay sollten anschließend geeignete Arbeitsbedingungen, wie PBP 2x\*-Beschichtungsmenge, Konzentrationen der Analysenkomponenten und Messzeitpunkt ermittelt werden.

Matrixbestandteile können einen erheblichen Einfluss auf die Analyse von Lebensmitteln besitzen. Aus diesem Grund sollte für beide Testverfahren der Einfluss verschiedener Matrixparameter, wie zum Beispiel Tier- und Gewebeart ermittelt und gegenüber gestellt werden. Schwerpunktmäßig sollte der Matrixeinfluss für Schweineiere betrachtet werden. Einzelne Leistungsparameter, wie Wiederholpräzision, Nachweis- und Bestimmungsgrenze sollten modellhaft anhand von vier  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (Ampicillin, Benzylpenicillin, Cefquinom und Ceftiofur) ermittelt werden. Im Rahmen dieser Analysen sollte zudem geprüft werden, ob der aktive Metabolit des Ceftiofurs (Desfuroylceftiofur) mittels PBP 2x\* nachgewiesen werden kann, da sich die Höchstmenge auf den Metaboliten bezieht. Untersuchungen in Bezug auf die Robustheit, wie Bearbeiter- und Gerätewechsel, waren ebenfalls durchzuführen.

Parallel zu diesen Untersuchungen war ein weiteres Ziel, ein CL-Einzelproben-Testverfahren zu konzipieren. Hierfür sollte geprüft werden, ob das CL-Mikrotiterplatten-Testsystem für die Anforderungen eines Charm II-Messgerätes modifiziert werden kann. Als partikuläre Phase sollten oberflächenmodifizierte Magnetpartikel, an die PBP 2x\* gebunden werden kann, eingesetzt werden. Die Trennung der PBP 2x\*-gekoppelten Partikel und der Flüssigkeit sollte mittels eines Permanentmagneten erfolgen.

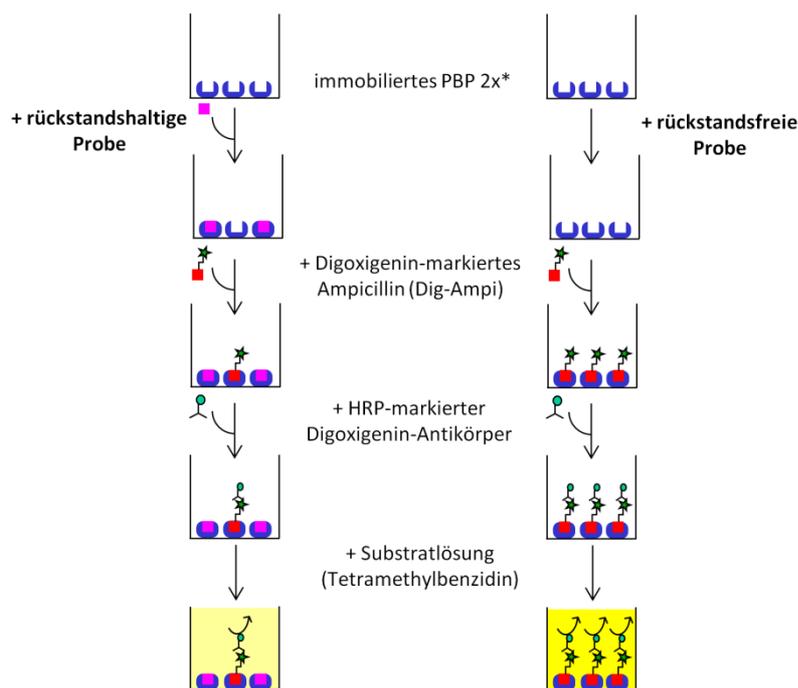
Wegen der besonderen Bedeutung der Niere bei amtlichen Rückstandskontrolluntersuchungen sollte die Leistungsfähigkeit der verschiedenen Testverfahren auf  $\beta$ -Lactam-Rückstände in dieser Matrix beurteilt und miteinander verglichen werden.

## 6 Ergebnisse und Diskussion

### 6.1 kolorimetrischer Mikrotiterplatten-Test nach Lamar

#### 6.1.1 Testprinzip

Der Testablauf des von Lamar entwickelten Assays <sup>129,130</sup> ist in Abbildung 6.1 schematisch dargestellt. Es handelt sich um einen indirekten kompetitiven Mikrotiterplattentest mit anschließender Meerrettichperoxidase-katalysierter kolorimetrischer Detektion. Als  $\beta$ -Lactam-spezifischer Rezeptor wird das Penicillin-bindende Protein PBP 2x\* verwendet, das an der Oberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert ist. Das in dieser Arbeit verwendete PBP 2x\* ist ein nicht-membrangebundenes, wasserlösliches rekombinantes Protein aus einem gentechnisch modifizierten *E.coli*-Stamm.



**Abbildung 6.1: Verwendeter kolorimetrischer Mikrotiterplattentest für den Nachweis von  $\beta$ -Lactamen; Testprinzip nach Lamar <sup>129</sup>; rechts dargestellt: Testablauf mit rückstandsfreier Probe, links dargestellt: Testablauf mit rückstandshaltiger Probe.**

Sind in der Probelösung  $\beta$ -Lactam-Rückstände enthalten, besetzen diese die Rezeptoren. Anschließend wird das Markermolekül Dig-Ampi zugegeben, das ein Digoxigenin-markiertes Ampicillin darstellt. Dig-Ampi besitzt eine Doppelfunktion. In der Molekülstruktur ist eine Rezeptor- und eine Anti-Digoxigenin-Antikörper-Erkennungsregion vorhanden (siehe Abbildung 6.2).

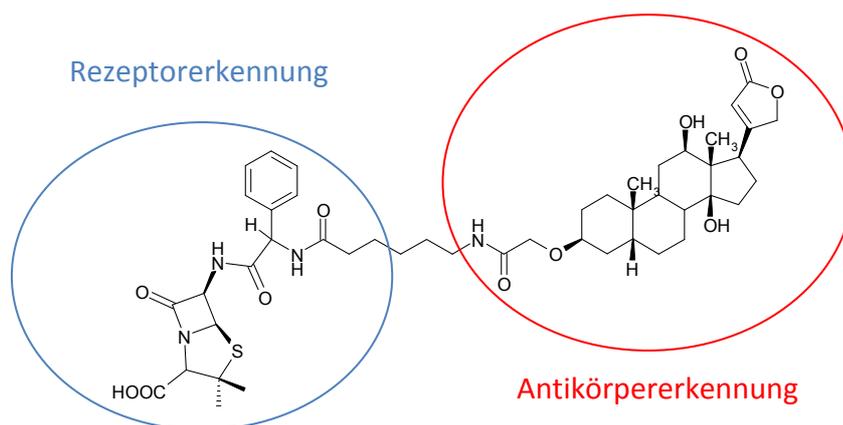


Abbildung 6.2: Struktur des Markermoleküls Dig-Ampi

An Rezeptoremolekülen, deren Bindungsstellen bereits durch  $\beta$ -Lactam-Rückstände besetzt sind, kann Dig-Ampi nicht mehr gebunden werden. Bei rückstandshaltigen Proben werden deshalb weniger Dig-Ampi-Moleküle gebunden als bei rückstandsfreien.

In einem weiteren Schritt bindet ein Digoxigenin-spezifischer Antikörper an den Digoxigeninrest des gebundenen Dig-Ampi. Dieser Antikörper, ein mit dem Enzym Meerrettichperoxidase markiertes Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragment, katalysiert in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid die Oxidation einer Farbkomponente. Die von Frey *et al.*<sup>196</sup> entwickelte und heutzutage gebräuchliche 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Lösung (TMB) dient in dem verwendeten Assay zur Detektion (bei 450 nm). Das TMB wird hierbei durch Wasserstoffperoxid unter Entwicklung einer Blaufärbung oxidiert (siehe Abbildung 6.3).

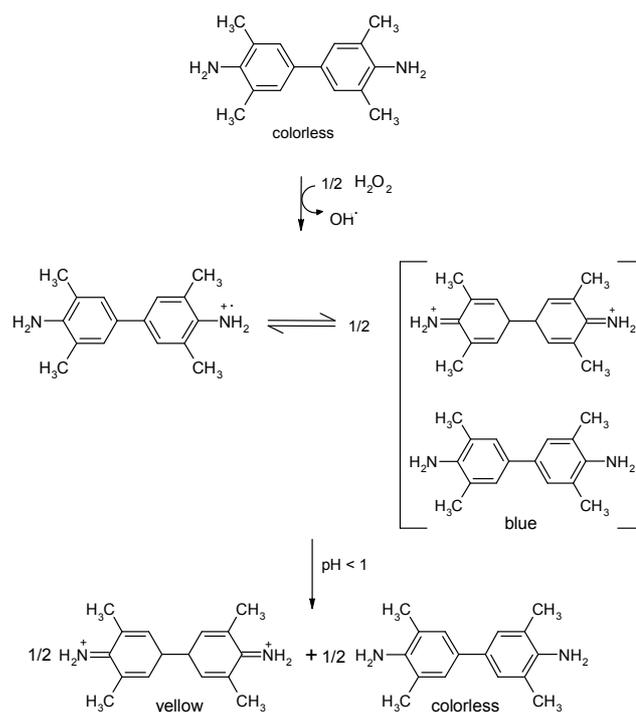


Abbildung 6.3: enzymkatalysierte Oxidation von TMB <sup>196</sup>

Die blaue Farbe schlägt durch das Stoppen der enzymatischen Reaktion mit einer Salzsäurelösung (1 M HCl) anschließend in eine Gelbfärbung um. Diese Gelbfärbung resultiert aus der Bildung des zweifach geladenen Kations und dem ungeladenen farblosen TMB-Molekül. Die Färbung ist invers korreliert zur  $\beta$ -Lactam-Konzentration in der Probe.

### 6.1.2 Assay-Komponenten

Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragmente und TMB sind kommerziell erhältlich. Die weiteren Assay-Komponenten, PBP 2x\* und Dig-Ampi, wurden selbst hergestellt.

Die Expression und Aufreinigung des PBP 2x\* wurde im Gegensatz zu Lamar <sup>129</sup> in Anlehnung nach Maurer *et al.* <sup>45</sup> durchgeführt (siehe Abschnitt 9.1). Der wesentliche Unterschied liegt in der Aufreinigung des Rezeptorproteins. Lamar führte die Abspaltung des GST-Proteins vom PBP 2x\*-GST-Fusionsprotein (siehe 2.4.1) separat nach der Affinitätschromatographischen Aufreinigung durch.

Bei Maurer *et al.* <sup>45</sup> erfolgte die Fixierung des Fusionsproteins an GSH-Sepharose (GSH; Glutathion) und die Abtrennung störender Bestandteile, sowie die Abspaltung des GST-Proteins durch PreScission Protease, direkt in der Säule. PBP 2x\* wurde durch den PreScission Protease-Verdau von der Sepharose gelöst und konnte ohne zusätzlichen Arbeitsschritt durch Elution von der Säule erhalten werden.

Durch den direkten PreScission-Protease-Verdau in der Säule konnte die Aufreinigungszeit um einen Tag reduziert werden. Dig-Ampi wurde nach Lamar <sup>129</sup> hergestellt. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen wurde jeweils nur eine Charge verwendet. Die Standard-Testbedingungen (Beschichtungsmenge 150 ng/Kavität, Dig-Ampi-Verdünnung 1:60.000, Inkubationszeiten, Volumenzugabe der Substratlösung, Puffer, Temperatur) wurden von Lamar übernommen.

Im Rahmen der Weiterentwicklung dieses kolorimetrischen Assays wurden ergänzende Untersuchungen in Hinblick auf die Farbentwicklung durchgeführt.

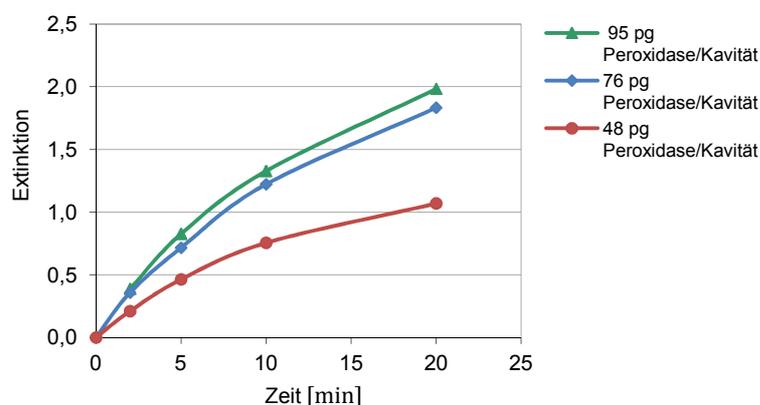
### 6.1.3 Systematische Untersuchungen zur Detektionsreaktion

#### Reaktionszeit für die Farbentwicklung

Die Analysen mittels der Standard-Testbedingungen von Lamar zeigten eine erhebliche Variabilität der absoluten Extinktionsmesswerte von Test zu Test. Ein kritischer Punkt in Hinblick auf die Robustheit stellt vor allem die Variabilität der Farbentwicklung im letzten Schritt des Testverfahrens dar. Lamar legte bei ihren Untersuchungen eine Farbreaktion von 10 min fest <sup>129</sup>. Nach Crowther *et al.* <sup>106</sup> sollte die Stopplösung (hier 1 mol/l HCl) dann zur Farbreaktion gegeben werden, wenn eine lineare Reaktionsabhängigkeit vorliegt. Es sollte demnach geprüft werden, ob der lineare Bereich nach 10 min noch gegeben ist und ob eventuell eine kürzere Farbreaktionszeit gewählt werden kann.

Zur Überprüfung wurde in Anlehnung an Hiepler <sup>197</sup> ein Peroxidase-Test durchgeführt. Für orientierende Versuche wurde die preiswerte „freie“ Meerrettichperoxidase (HRP; Typ VI) und später auch Peroxidase-Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragment (HRP-F<sub>ab</sub>) verwendet.

Für die Untersuchung wurde eine Kalibrierung mit unterschiedlichen HRP-Konzentrationen in PBS-Puffer hergestellt. Je 5 µl dieser Kalibrierlösung wurden in eine 96-well-Mikrotiterplatte vorgelegt und anschließend 100 µl TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (hergestellt nach Tabelle 9.6, siehe Abschnitt 9.3.1) zugegeben. Die Farbentwicklung wurde ohne Schütteln im Dunkeln durchgeführt und nach unterschiedlichen Zeitpunkten (2-20 min) mit Salzsäure gestoppt. Die Auswertung erfolgte photometrisch bei 450 nm. Vom erhaltenen Messwert wurde der Blindwert (PBS-Puffer), der keine HRP enthielt, subtrahiert.



**Abbildung 6.4: Zeitlicher Verlauf der TMB-Farbentwicklung bei verschiedenen Peroxidase-Konzentrationen**

In Abbildung 6.4 ist der Zeitverlauf der Farbentwicklung für unterschiedliche Peroxidase-Mengen dargestellt. Je höher die eingesetzte Enzymmenge, desto mehr TMB konnte pro Zeiteinheit oxidiert werden. Dies führte wiederum zu höheren Extinktionswerten. Anzumerken ist hierbei, dass der Messwert zum Zeitpunkt 0 nicht experimentell ermittelt werden konnte und hier nur als 0 angenommen wurde.

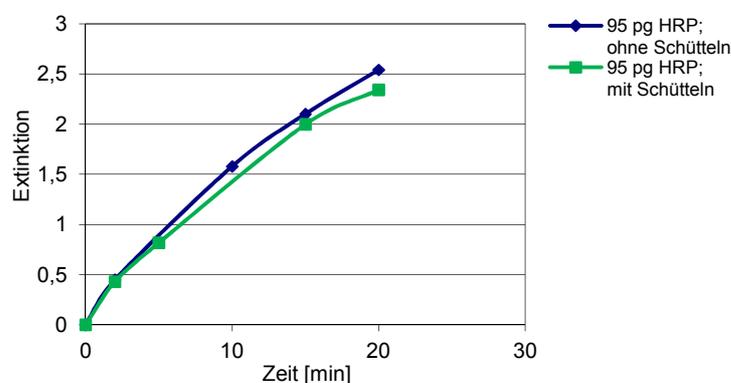
Die Kinetik enzymkatalysierter Reaktionen ist sehr komplex und von einer Reihe von Faktoren, wie beispielsweise von der Enzym- und Substratkonzentration, dem pH-Wert und der Temperatur abhängig<sup>198</sup>. Sehr vereinfacht kann gesagt werden, dass die Farbintensität von der Wasserstoffperoxid-, der TMB-, der Enzymkonzentration und der Reaktionszeit abhängig ist. Hierbei ist die TMB-Konzentration aufgrund der geringen Löslichkeit des TMB im wässrigen Lösungen limitiert und

die Wasserstoffperoxid-Konzentration in Rahmen der Untersuchungen konstant festgelegt. Der Messzeitraum sollte möglichst kurz sein und dennoch zu hohen Extinktionen führen. Aus Abbildung 6.4 wird ersichtlich, dass ein linearer Verlauf der Farbentwicklung in den ersten Minuten gegeben ist, allerdings für alle hier untersuchten Enzymkonzentrationen nach etwa 8 min in einen nicht linearen Bereich übergeht.

### Untersuchung verschiedener Einflüsse auf die Farbreaktion

#### *Einfluss: Schütteln der Mikrotiterplatte*

Es sollte überprüft werden, ob eine kontinuierliche Schüttelbewegung der Mikrotiterplatte mittels eines Laborschüttlers während der Farbreaktion einen Effekt auf die resultierende Extinktion ausübt. Hierfür wurde der oben beschriebene Versuch vergleichend ohne Schütteln und mit Schütteln der Mikrotiterplatte durchgeführt. In Abbildung 6.5 ist der zeitliche Verlauf der Farbreaktion für die gleiche Enzymkonzentration gegenüberstellend mit und ohne Schütteln aufgeführt.



**Abbildung 6.5: Einfluss des Schüttelns auf den zeitlichen Verlauf der Farbentwicklung mit TMB**

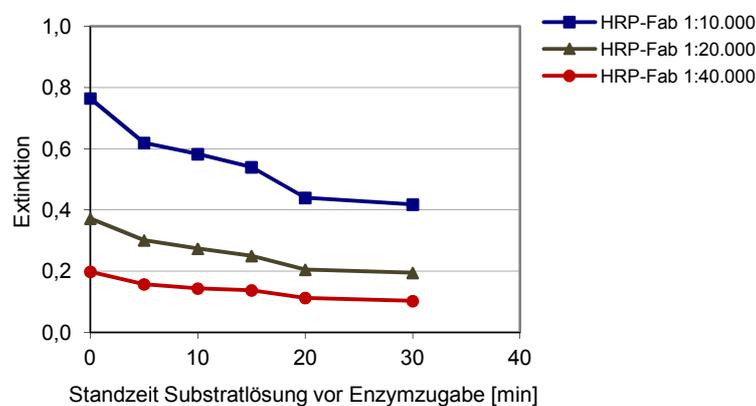
Anhand der erhaltenen Extinktionswerte ist abzuleiten, dass kein Schütteleffekt vorliegt. In den folgenden Versuchen wurde aus diesem Grund auf das Schütteln der Mikrotiterplatte verzichtet.

### *Einfluss: Standzeit der fertigen TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung*

Die Problematik der TMB-Stabilität wird in zahlreichen Arbeiten beschrieben <sup>196,199,200</sup>. Frey *et al.* <sup>196</sup> umgingen die Instabilität von TMB in wässriger Lösung, indem sie ein Zwei-Komponenten-System für die TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung entwickelten.

Diese kombinierte Lösung wurde arbeitstäglich neu hergestellt. Bei einer Standzeit der TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung über 30 min zeigte sich eine deutlich zunehmende Blaufärbung. Aus diesem Grund sollte überprüft werden, ob unterschiedliche Standzeiten der fertigen TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (vor Gebrauch) einen Einfluss auf die erhaltenen Extinktionswerte ausüben.

Es wurden drei verschiedene Verdünnungsstufen des Peroxidase-Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragmentes in PBS-Puffer angesetzt. 10 µl der jeweiligen Standardlösung (bzw. 10 µl PBS-Puffer für den Blindwert) wurden in eine 96-well-Mikrotiterplatte vorgelegt und 100 µl TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (0,24 g/l) hinzugefügt. Die Farbreaktion wurde nach 3 min mit 1 M HCl gestoppt. In Abbildung 6.6 sind die resultierenden Messwerte abhängig von verschiedenen Standzeiten der fertigen TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (vor Gebrauch) dargestellt.



**Abbildung 6.6:** Resultierende Farbentwicklung nach unterschiedlicher Standzeit der Substratlösung; Reaktionszeit 3 min

Auch hier resultierten bei einer höheren Enzymkonzentration höhere Extinktionswerte. Eine Standzeit der TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung von 0 bis 5 min führt zu einer deutliche Abnahme der erhaltenen Messwerte. Bei längeren Standzeiten,

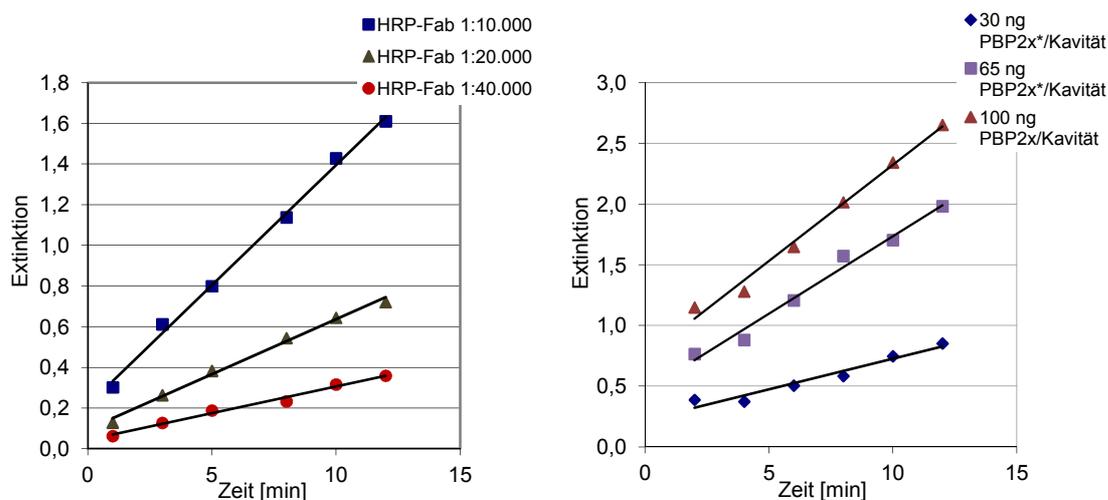
wurde hingegen nur eine geringe Extinktionsabnahme beobachtet. Folglich wurde für die Robustheit der Methode eine Standzeit der fertigen TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung vor Gebrauch von mindestens 5 min festgesetzt. Längere Standzeiten sollten jedoch vermieden werden, da die Verfügbarkeit des TMB für den Assay, aufgrund der schlechten Stabilität in wässriger Lösung, mit der Zeit abnimmt. Die folgenden Untersuchungen wurden mit einer Standzeit der TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung von 5 min durchgeführt.

### *Einfluss: Enzymmenge auf den linearen Bereich der Farbentwicklung*

Um Aussagen über den linearen Bereich der Farbentwicklung treffen zu können, wurden unterschiedliche Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragment-Verdünnungen mit TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (0,24 g/l) unterschiedlich lange (2 bis 12 min) getestet.

Zudem sollte überprüft werden, ob ein Effekt auf den linearen Bereich besteht, wenn das Enzym gebunden am PBP 2x\*-Dig-Ampi-Komplex vorliegt. Hierfür wurde vergleichend der kolorimetrische Assay mit unterschiedlichen PBP2x\*-Beschichtungsmengen nach Punkt 9.3.1 durchgeführt. Es wurde keine Konkurrenz mit  $\beta$ -Lactam-Antibiotika vorgenommen, sondern lediglich die maximale Extinktion betrachtet.

Bei einer höheren PBP 2x\*-Beschichtungsmenge stehen dem Dig-Ampi mehr Bindungsplätze zur Verfügung. Folglich kann mehr Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragment binden und es wird eine höhere Extinktion erhalten.



**Abbildung 6.7: Einfluss der Enzymmenge auf den zeitlichen Verlauf der Farbentwicklung mit TMB (100  $\mu$ l, 5 min Standzeit vor Gebrauch); links: ungebundene Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragmente (unterschiedliche Verdünnungsstufen), homogene Lösung; rechts: an PBP 2x\* gebundene Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragmente (verschiedene Beschichtungsmengen von PBP 2x\*); Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragment 1:1500 verdünnt**

In Abbildung 6.7 (links) wurden unterschiedliche HRP-F<sub>ab</sub>-Verdünnungen verwendet und das Signal in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Es wurde die ho-

mogene Lösung (ohne Waschstritte) gemessen. Zum Zeitpunkt „0“ sollte theoretisch keine Farbentwicklung stattgefunden haben. Die Messung zum Zeitpunkt „0“ konnte allerdings experimentell nicht durchgeführt werden. Beim Vergleich der Farbentwicklung der „ungebundenen“ und „an PBP 2x\* gebundenen HRP-F<sub>ab</sub>“ war bezüglich des linearen Bereichs der Farbreaktion kein Effekt ersichtlich. Zudem konnte festgestellt werden, dass die Farbreaktion von 2 bis über 10 min in einem linearen Bereich verläuft.

Beim Vergleich der Farbentwicklung mit der „freien“ HRP und der HRP- F<sub>ab</sub> (siehe Abbildung 6.4 und Abbildung 6.7 (links)) zeigte sich bei der HRP- F<sub>ab</sub> ein wesentlich längerer linearer Verlauf. Es stellte sich heraus, dass für die HRP- F<sub>ab</sub> katalysierte Farbentwicklung kein Modell mit „freier“ HRP möglich ist.

Es zeigte sich im Rahmen dieser Untersuchungen, dass eine lineare Abhängigkeit zwischen der Enzymmenge und der resultierenden Farbintensität nach 5 min gewährleistet ist. In den folgenden Versuchen wurde somit ein praktikabler Farbentwicklungszeitraum von 5 min festgelegt. Die Testbedingungen bei Lamar lagen mit 10 min Farbentwicklungszeit auch noch im linearen Bereich.

**Tabelle 6.1: verwendete Bedingungen beim Assay-Verlauf**

Parameter	verwendete Assay-Bedingungen	Assay-Bedingungen nach Lamar <sup>129</sup>
Beschichtungsmenge PBP 2x*	150 ng/Kavität	
Volumenzugabe Standardlösung	100 µl	
Dig-Ampi	100 µl, Verdünnung 1:60.000	
Anti-Dig-F <sub>ab</sub> -Fragment	100 µl, Verdünnung 1:2000	100 µl, Verdünnung 1:1500
Standzeit der TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung	5 min	keine Angabe
Schütteln der Mikrotiterplatte	nein	
Farbentwicklungszeitraum	5 min	10 min

Zusammenfassend sind in Tabelle 6.1 die verwendeten Bedingungen für den Assayablauf aufgeführt. Gegenübergestellt sind die Bedingungen nach Lamar. Pufferlösungen, Temperatur und Inkubationszeiten wurden von Lamar übernommen. Es zeigte sich, dass eine definierte Standzeit der TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung vor Gebrauch die Variabilität der absoluten Extinktionen im Assay-System verminderte.

#### 6.1.4 Matrixeinflüsse

Lebensmittel sind als biologische Systeme sehr komplexe Matrices. Besonders die Anwesenheit einer Tiermatrix kann die Leistungsfähigkeit einer Methode durch eine Reihe von Faktoren – wie pH-Wert, Proteinbindung oder Abbau des Zielanalyten durch Matrixbestandteile – beeinflussen <sup>96</sup>. Bei kompetitiven Assay-Formaten können unspezifische Matrix-Bindungen insofern ein großes Problem darstellen, da sie zu falsch-negativen Ergebnissen führen können <sup>118</sup>. Falsch-positive Ergebnisse führen zu einem erheblichen Mehraufwand, da erforderliche Bestätigungsuntersuchungen folgen. Demzufolge ist es ein wichtiger Aspekt bei der Entwicklung einer Methode, den Matrixeinfluss zu untersuchen. Dies erfolgt am einfachsten über eine Kalibrierung in der Lebensmittelmatrix mit Vergleich zur Kalibrierung in Puffer. Die Verdünnung der Matrix-haltigen Probe in Puffer ist eine häufig eingesetzte Strategie zur Minimierung unspezifischer Bindungen und wird zur Untersuchung vorliegender Matrixeffekte eingesetzt <sup>201</sup>.

Um mögliche Matrixinterferenzen zu überprüfen, wurden Standardkurven in den verschiedenen Matrices Niere, Muskelfleisch und Rohmilch aufgenommen. Lamar <sup>129</sup> untersuchte Milch, Muskelfleisch, Ei und Honig. Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag im Folgenden auf der Matrix Schweineniere.

## Matrix: Tierische Gewebe

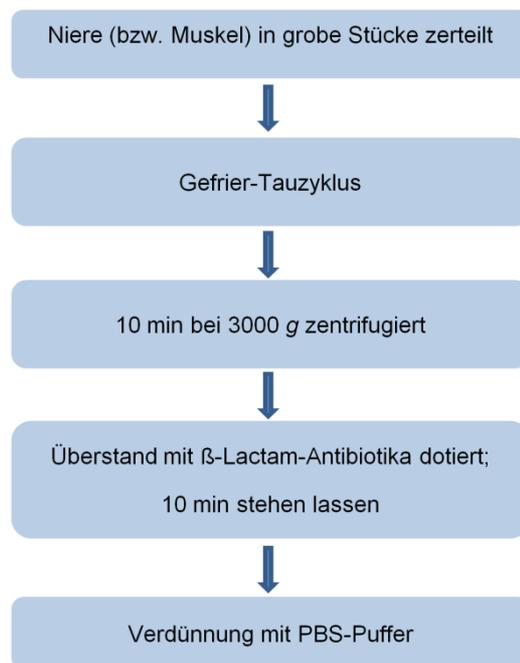
### *Niere*

Eine Screening-Methode soll eine schnelle und wenig aufwändige Probenaufarbeitung beinhalten.

In der Niere stellt die sogenannte extrazelluläre Matrix eine komplex zusammengesetzte Interzellulärsubstanz zwischen den tierischen Zellen dar und bildet einen breiten Raum, der als Filtersystem dient. Sie besteht hauptsächlich aus Collagenen, den Ankerproteinen und den raumausfüllenden Proteoglycanen <sup>198</sup>.

Im Premi-Test <sup>97</sup> (siehe unter 4.1) wurde gezeigt, dass für den Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika in Muskel und Niere der entsprechende Tausaft verwendet werden kann, da die  $\beta$ -Lactame über einen Gefrier-/ Tau-Zyklus aus dem Gewebe zum größten Teil in den Tausaft übergehen. Die Aufarbeitung der Probe ist im Fließschema in Abbildung 6.8 dargestellt. Sie besteht im Wesentlichen aus einem einfachen Gefrier-/ Tau-Zyklus mit anschließender Zentrifugation. Dabei ist auf einen langsamen Gefrierprozess zu achten. Die Zahl der je Zeiteinheit gebildeten Kristalle nimmt mit sinkender Temperatur rasch zu. Beim schnellen Gefrieren werden hauptsächlich kleine, intrazelluläre Kristalle gebildet. Beim langsamen Gefrieren kommt es zu unregelmäßigen, großen Kristallbildungen, vor allem zwischen den Zellen. Die Osmolarität des interzellulären nicht ausgefrorenen Wassers bewirkt somit über ein Brüchigwerden der Zellen die Zerstörung der Zellstruktur <sup>202</sup>.

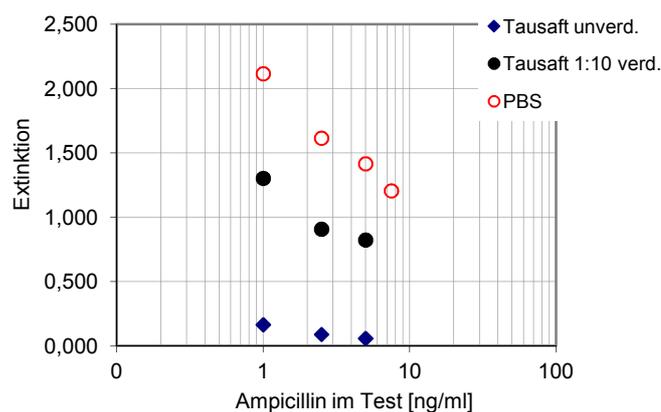
Die in dieser Arbeit untersuchten Nieren wurden bei verschiedenen Metzgereien erworben, um zu gewährleisten, dass diese von unterschiedlichen Tieren stammen. Das Volumen der resultierenden Tausäfte variierte je 100 g Niere zwischen 5 bis 9 ml. Zudem zeigten die Tausäfte unterschiedliche Rotfärbungen und Trübungen. Der pH Wert der Tausäfte lag bei 6,7-6,8.



**Abbildung 6.8: Tausaftgewinnung und Dotierung mit β-Lactam-Antibiotika**

Mögliche Matrixeffekte auf das Testsystem wurden überprüft, indem Kalibrierkurven im unverdünnten und um Faktor 10 mit PBS-Puffer verdünnten Tausaft gemessen wurden. Die Tausäfte wurden mit Ampicillin im Konzentrationsbereich von 0 bis 7,5 ng/ml dotiert. Diese Kalibrierkurven wurden anschließend mit einer Kalibrierkurve in PBS-Puffer verglichen. Zur Vergleichbarkeit der möglichen Matrixeffekte werden hier die erhaltenen Messwerte in Abhängigkeit von der absoluten Ampicillinkonzentration im Test betrachtet. Je stärker der Matrixeinfluss, desto geringer war das erhaltene Messsignal.

Lamar führte Untersuchungen über mögliche Matrixeffekte auf dem kolorimetrischen Assay bei Muskelfleisch durch. Eine 1:10 Verdünnung erwies sich bei ihren Analysen als geeignet, um störende Matrixeffekte zu minimieren <sup>129</sup>. In Anlehnung an diese Untersuchungen wurde überprüft, ob mit einer 1:10-Verdünnung in PBS-Puffer auch bei Tausäften aus Schweinenieren gearbeitet werden kann. Ein genügend hohes Signal liegt vor, wenn hohe Extinktionswerte für rückstandsfreie Proben (Extinktion von ca. 1,0 bis 1,5) resultieren und die Extinktionsdifferenz zwischen dotierter und undotierter Probe möglichst groß ist.



**Abbildung 6.9: Kolorimetrischer Assay: Vergleich unterschiedlicher Verdünnungsstufen des dotierten Tausaftes aus Schweineniere mit einer Kalibrierung in PBS-Puffer**

Abbildung 6.9 zeigt, vergleichend zur Kalibrierung im PBS-Puffer, die Kalibrierung direkt in Schweinenieren-Tausaft und im 1:10 mit PBS-Puffer verdünntem Tausaft. Für die Untersuchung wurden 2 Schweinenieren unterschiedlicher Herkunft verwendet. Von jedem dieser beiden Tausäfte wurde eine 2-fache Messung vorgenommen und aus den insgesamt 4 Messungen ein Mittelwert gebildet. Für die Kalibrierung im unverdünnten Tausaft wurden deutlich niedrigere Messwerte als für den verdünnten Tausaft erhalten. Der unverdünnte Tausaft führte zu falsch positiven Ergebnissen.

Die Beobachtungen lassen sich dahingehend interpretieren, dass durch Verdünnung des Tausaftes weniger störende Matrixbestandteile im Test enthalten sind, die das Messsignal herabsetzen können. Bei einer 1:10 Verdünnung mit PBS-Puffer wird ein genügend hohes Messsignal erhalten. Zudem wurde eine deutliche Extinktionsdifferenz zwischen einer undotierten und einer dotierten Probe erhalten.

Bei **Ampicillin und Benzylpenicillin** wurde die **Verdünnung in PBS-Puffer um Faktor 10** für die nachfolgenden Untersuchungen verwendet.

#### Nachweis- und Erfassungsgrenze

Die Nachweis- und Erfassungsgrenze (NG und EG) stellen wichtige Verfahrenskenndaten bei der Entwicklung einer Methode dar. Nach der Definition der

DIN 32645 <sup>203</sup> ist die NG der Wert, ab dem über das Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein einer Substanz entschieden wird. Dies bedeutet, dass die NG die kleinste Konzentration ist, die sich qualitativ mit ausreichender statistischer Sicherheit erfassen lässt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt bei 50 %. Die EG ist die kleinste Konzentration, die mit einer definierten Ergebnisunsicherheit bestimmt werden kann <sup>203,204</sup>.

Aufgrund der unterschiedlichen Bindeaffinität des PBP 2x\* zu den verschiedenen  $\beta$ -Lactamen ist die Bestimmung der NG und EG für jedes  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum einzeln durchzuführen <sup>129</sup>. Zusätzlich muss die NG und EG in dem entsprechenden Lebensmittel bestimmt werden, um mögliche Interferenzen der Probenmatrix zu berücksichtigen. Die Nachweis- und Erfassungsgrenzen wurden über Kalibrierkurven in der entsprechenden Matrix bestimmt und nach dem VBA-Programm (engl. Visual-Basic for Applications) von Steliopoulos <sup>205</sup> ausgewertet. Bei diesem Programm handelt es sich um eine in Excel durchführbare statistische Datenanalyse zur Bestimmung der Verfahrenskenndaten eines Enzymimmunoassays.

Ampicillin, Benzylpenicillin, Cefquinom und Ceftiofur finden bei Schweinen häufig Anwendung und wurden deshalb auf ihre NG und EG hin untersucht.

**Tabelle 6.2: Parameter zur Herstellung der Kalibrierkurven im Tausaft aus Schweineniere**

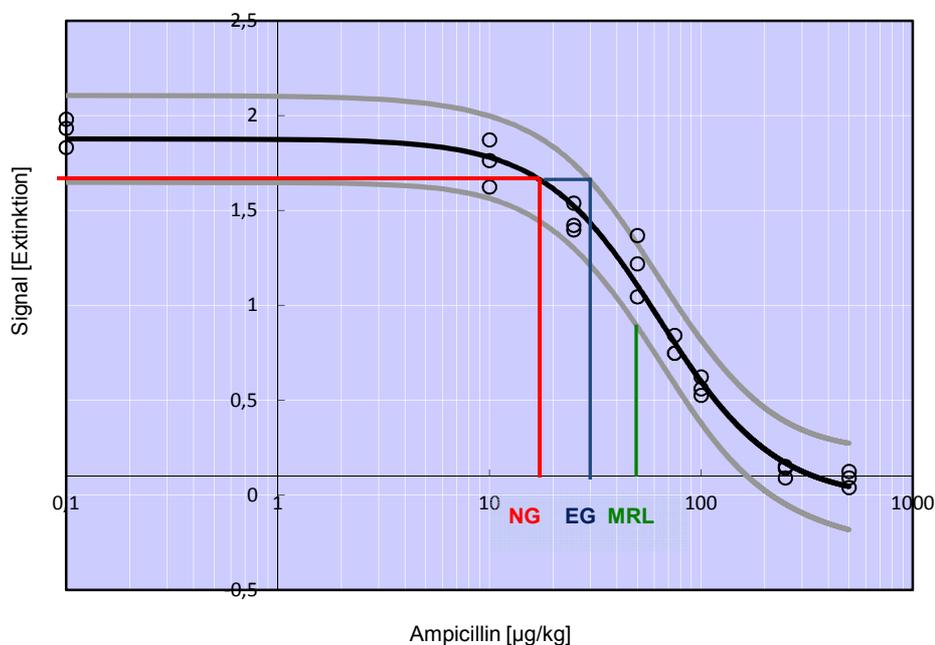
Rückstand	Anzahl der Nieren (n) <sup>[1]</sup>	Verdünnungsstufe des dot. Tausaftes	Konzentrationsbereich [µg/kg]
Ampicillin	3	1:10	10 - 500
Benzylpenicillin	3	1:10	2,5 - 150
Cefquinom	3	1:40	10 - 800
Desfuroylceftiofur	4	1:500	800 - 16000

<sup>[1]</sup> Nieren stammen jeweils aus unterschiedlicher Herkunft

Die unverdünnten Tausäfte (siehe Abbildung 6.8) von verschiedenen Schweinenieren wurden je nach der festgesetzten Höchstmenge (MRL) im Konzentrationsbereich von mindestens 0,5 x MRL bis 3 x MRL dotiert. Nach Lamar <sup>129</sup> lag der Arbeitsbereich (linearer Bereich) des kolorimetrischen Assays in Puffer zum Beispiel

für Benzylpenicillin zwischen 1 und 10 ng/ml. Da das PBP 2x\* jeweils unterschiedliche Bindeaffinitäten zu den  $\beta$ -Lactamen besitzt, wurden unterschiedliche Verdünnungsstufen der unverdünnten, dotierten Tausäfte gewählt (siehe Tabelle 6.2), um im linearen Bereich zu liegen.

In Abbildung 6.10 ist für Ampicillin exemplarisch die Kalibrierkurve für die Ermittlung der NG und EG dargestellt (Kalibrierkurven der weiteren  $\beta$ -Lactame befinden sich im Anhang). Das Signal [Extinktion] ist hier gegen die Konzentration zum Zeitpunkt der Dotierung dargestellt. Es wird angenommen, dass die Konzentration  $\mu\text{g/l}$  im Tausaft der Konzentration  $\mu\text{g/kg}$  in Niere entspricht.



**Abbildung 6.10: Kalibrierkurve mit Ampicillin im Tausaft aus Schweineniere (n = 3) und Bestimmung der NG und EG (NG = 18  $\mu\text{g/kg}$ , EG = 30  $\mu\text{g/kg}$ , Höchstmenge (MRL) = 50  $\mu\text{g/kg}$ ); 0,1  $\mu\text{g}$  Ampicillin/kg wählt die Software als Äquivalent für 0  $\mu\text{g}$  Ampicillin/kg aufgrund der logarithmischen Skalierung; Kurvenverlauf über ein 4-Parameter-logistisches Modell an Kalibrierdaten angepasst<sup>205</sup>; grau dargestellte Linien entsprechen den berechneten Prognosebändern;  $\alpha = 0,05$**

Tabelle 6.3 zeigt zusammenfassend die ermittelten NG und EG für die verschiedenen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. Die NG und EG lagen deutlich unterhalb der festgesetz-

ten Höchstmengen. Auch das Desfuroylceftiofur konnte mittels des PBP 2x\* erfasst werden. Lamar führte nur Untersuchungen mit Ceftiuofur, nicht aber mit dem Metaboliten Desfuroylceftiofur durch.

Das PBP 2x\* Desfuroylceftiofur binden kann, war zu erwarten, da es sich um einen Metaboliten mit einem intakten  $\beta$ -Lactam-Ring handelt.

**Tabelle 6.3: Ermittelte Nachweis- und Erfassungsgrenzen im Vergleich zur rechtlich festgesetzten Höchstmenge (MRL) in Schweinenieren;  $\alpha = 0,05$**

Rückstand	NG [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	EG [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	Höchstmenge [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]
Ampicillin	18	30	50
Benzylpenicillin	10	20	50
Cefquinom	44	88	200
Ceftiofur (gemessen als Desfuroylceftiofur)	2500	4400	6000

### Wiederholbarkeit

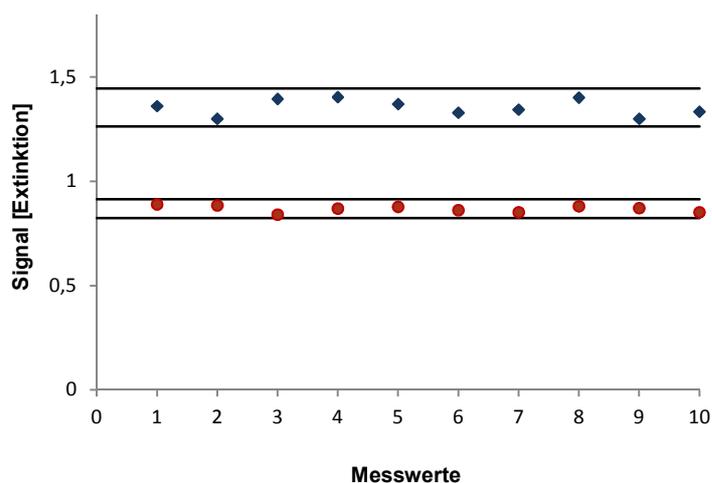
In dieser Arbeit sollten erste Parameter in Bezug auf eine Validierung nach der EU-Entscheidung 2002/657/EC untersucht werden. Nachfolgend wird die Bestimmung der Wiederholbarkeit, die Einflussgrößen bezüglich der Matrix und die Anwendbarkeit in Hinblick auf verschiedene Geräte beschrieben.

Nach der EU-Entscheidung 2002/657/EC <sup>93</sup> ist die Wiederholbarkeit definiert als die Präzision unter wiederholten Bedingungen. Unter wiederholten Bedingungen werden Bedingungen verstanden, mit denen unabhängige Messergebnisse mittels der gleichen Methode erhalten werden. Die Analyse muss hierbei unter identischen Testeinstellungen, im selben Labor, mit derselben Geräteausstattung und durch denselben Bearbeiter durchgeführt werden. Die Präzision wird durch die Standardabweichung (s) oder der relativen Standardabweichung (VK) [%] ausgedrückt.

Die Bestimmung der Wiederholbarkeit ist als Parameter im Rahmen der Robustheitsprüfung in der EU-Entscheidung 2002/657/EC gefordert.

Anhand von Angaben über den Intra-Assay-Variationskoeffizienten für verschiedene Konzentrationsbereiche kann die Genauigkeit der Ergebnisse eines Testverfahrens eingestuft werden. Zur Bestimmung der Intra-Assay-Variation kann die Standardabweichung ( $s$ ) bzw. der Variationskoeffizient (VK) einer Probe durch wiederholte Messung der gleichen Probe unter gleichen Bedingungen herangezogen werden <sup>105</sup>.

Es wurde ein aufgearbeiteter Schweinenieren-Tausaft (nach Abbildung 6.8) zehnmal unter gleichen Bedingungen innerhalb eines Testdurchlaufes analysiert. Für die Untersuchung des dotierten Tausaftes wurde der Tausaft für jede Messung mit Ampicillin an der Höchstmenge ( $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) jeweils neu dotiert und 1:10 verdünnt. In Abbildung 6.11 sind die Ergebnisse für einen undotierten und einen an der Höchstmenge dotierten Tausaft dargestellt.



**Abbildung 6.11: Intra-Assay-Variation: wiederholte Messung derselben Probe;** blau: undotierter Schweinenierentausaft, rot: an der Höchstmenge dotierter Schweinenierentausaft; schwarze Linien: Erwartungsbereich = 95 %)

Aus Abbildung 6.11 ist ersichtlich, dass die Messung der Probe unter wiederholten Bedingungen präzise verläuft. Die Messung der undotierten Probe zeigt im Gegensatz zur Messung der dotierten Probe eine größere Streuung. Der Variationskoeffizient für die undotierte Probe lag bei 2,9 % und für die dotierte Probe bei 1,9 %.

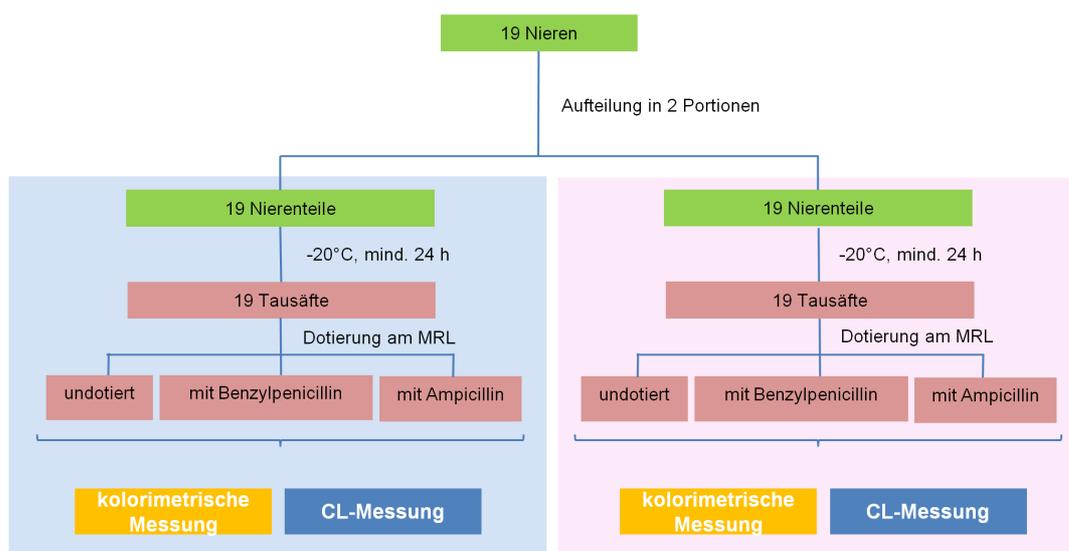
Der Vergleich der Standardabweichungen des undotierten und an der Höchstmenge dotierten Tausafts kann mittels des F-Tests erfolgen und gibt Auskunft darüber, ob Varianzhomogenität vorliegt bzw. ob der undotierte Tausaft mit der gleichen Präzision wie der an der Höchstmenge dotierte Tausaft gemessen wird. Die Prüfgröße (PF; hier mit  $PF = 5,89$ ) wird aus dem Quotienten der Varianzen ermittelt. Der PF-Wert wird mit dem kritischen F-Wert (hier = 3,18; Tabellenwert aus <sup>206</sup>; Signifikanzniveau von 5%) verglichen. Da dieser Wert größer ist als der kritische Wert, sind folglich die Standardabweichungen von undotiertem Tausaft und an der Höchstmenge dotiertem Tausaft signifikant unterschiedlich <sup>206</sup> (Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5%).

Eine konzentrationsabhängige Streuung von Messwerten in Immunoassays wurde schon von Märtlbauer <sup>105</sup> beobachtet, der in seinen Arbeiten zu antimikrobiell wirksamen Stoffen die Präzision von Enzymimmunoassays diskutierte. Insbesondere bei den Werten, die von der Lage innerhalb der Kalibrierkurve (sigmoide Kurve) nahe dem oberen „Plateau“ liegen, wird die Konzentrationsberechnung „ungenauer“.

Die Streuung der Messwerte in Abbildung 6.11 war in dieser Untersuchung nur von der Messmethodik und den Matrixeffekten bei einer einzigen Niere abhängig. Inwieweit eine Variabilität zwischen verschiedenen Nieren vorliegt wird im Folgenden weiter betrachtet.

### Untersuchung von Schweinenieren-Tausäften mittels des Kolorimetrischen Assays unter Wiederholbedingungen

Die Wiederholbarkeit des Testsystems für die Matrix Schweineniere wurde anhand von 19 Schweinenieren untersucht. Diese wurden nach Abbildung 6.8 aufgearbeitet und undotiert, sowie an der Höchstmenge (MRL) mit 50 µg/kg dotiert, gemessen.



**Abbildung 6.12: Arbeitsschema Nierenverwendung für Wiederholmessungen;** Messung Tag 1 =blau unterlegt; Messung Tag 2 = rosa unterlegt; CL-Messung siehe Abschnitt 6.2.3

Benzylpenicillin und Ampicillin wurden als Modellsubstanzen eingesetzt. Die 19 Schweinenieren wurden nach Abbildung 6.12 verwendet. Sie wurden geviertelt und die diagonal gegenüberliegenden Viertel zu einer Portion vereinigt. An verschiedenen Tagen wurden aus den portionierten Nierenteilen Tausäfte hergestellt. Diese Tausäfte wurden dotiert und für die Untersuchung mittels des UV-Tests untersucht. Zusätzlich wurden die undotierten und dotierten Tausäfte am selben Tag mit einem weiteren Testverfahren analysiert (siehe Abschnitt 6.2.3).

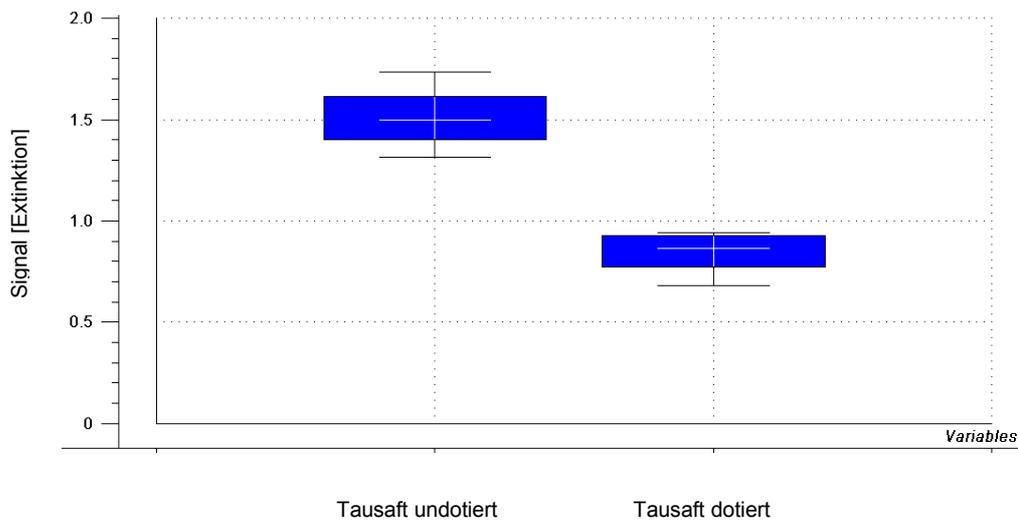
Bei der Untersuchung wurden Reagenzien, Geräte und Bearbeiter nicht variiert.

Zur Veranschaulichung der Lage- und Streumaße der Datensätze wurde der Box Plot verwendet. Box Plots verdeutlichen auf einfache Weise die Mitte und Streuung

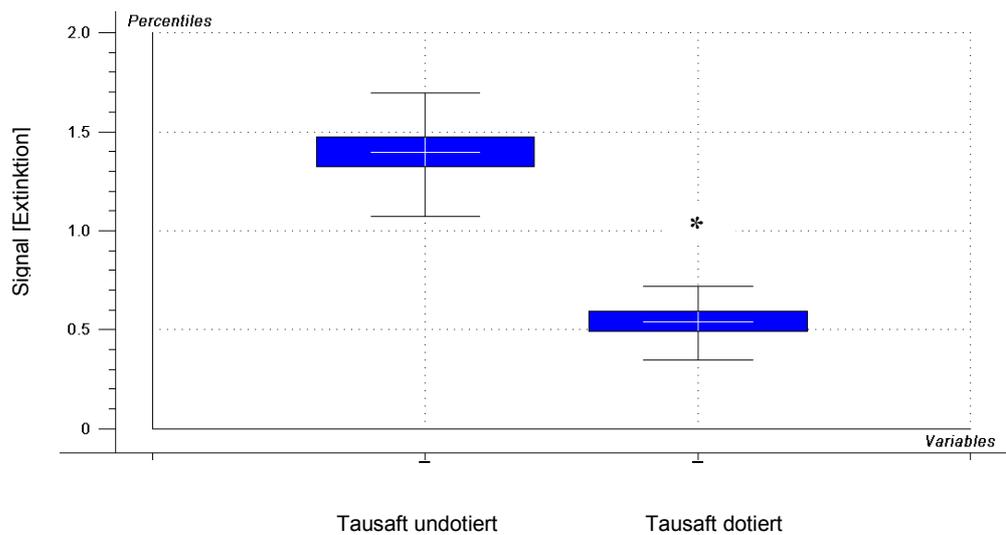
von Verteilungen und eignen sich besonders gut zum Vergleich von Datensätzen. Die hier dargestellten Boxen stellen 50 % der Messwerte dar.

In Abbildung 6.13 ist die Verteilung der Messwerte für undotierte und an der Höchstmenge dotierte Nierentausäfte mit Ampicillin und mit Benzylpenicillin dargestellt. Einzelne Ausreißer wurden nach Grubbs<sup>204</sup> eliminiert (siehe unter 6.2.3). Der Variationskoeffizient, der an zwei verschiedenen Tagen mit den gleichen Nieren ermittelt wurde, lag für die undotierten Proben bei 8-11%.

a)



b)



**Abbildung 6.13: Verteilung der Messergebnisse für undotierte und an der Höchstmenge dotierte Nierentausäfte mit a) Ampicillin und b) Benzylpenicillin; Box stellt 50 % der Messwerte, Maximum und Minimum dar, Box-Plots nach Eliminierung der Ausreißer (nach Grubbs<sup>204</sup>; b) \* = Ausreißer; Signifikanzniveau = 5 %)**

Die Untersuchung ergab für beide Antibiotika, wie schon zuvor beobachtet, eine größere Streuung der Messwerte für die undotierten Proben. Die größere Streu-

ung der undotierten Proben ist auch darauf zurückzuführen, dass diese näher an der NG liegen. Da es sich um ein kompetitives Assay-Format handelt, werden für kleinere Antibiotika-Konzentrationen größere Messwerte erhalten. Die Irrtumswahrscheinlichkeit an der NG liegt bei 50 %. Bedingt durch die biologische Variabilität der verschiedenen Nieren wird ein höherer VK erhalten als im Vergleich zur Messung von nur einer Niere.

#### Tag zu Tag-Variabilität

Die Tag-zu-Tag-Variabilität beschreibt die Präzision an 2 unterschiedlichen Tagen. Die 19 undotierten Nierentausaft-Ansätze (siehe Abbildung 6.12), die im Rahmen der Wiederholuntersuchungen verwendet wurden, wurden an zwei verschiedenen Tagen untersucht, um Aussagen über die Robustheit zu erhalten. Alle weiteren Parameter, wie Chargen, Geräte und Bearbeiter wurden nicht variiert. Die erhaltenen Messwerte von Tag 1 und Tag 2 wurden mittels des T-Tests auf signifikante Unterschiede überprüft. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 6.4 aufgeführt

**Tabelle 6.4: Tag-zu-Tag-Variabilität für undotierte Schweinenieren-Tausäfte (n =19); Mittelwerte, Standardabweichungen und Varianzen; t-Wert und kritischer t-Wert**

	absolute Messwerte	
	Tag 1	Tag 2
<b>Mittelwert</b>	1,572	1,510
<b>Standardabweichung</b>	0,149	0,122
<b>Varianz (s<sup>2</sup>)</b>	0,022	0,015
<b>Freiheitsgrade (df)</b>	18	18
<b>t-Wert</b>	1,676	1,676
<b>krit. t-Wert bei zweiseitigem Test</b>	2,101	2,101

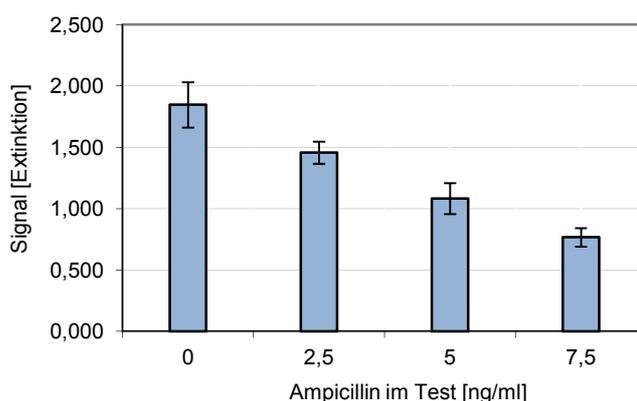
Auf einem Signifikanzniveau von 5 % ergibt sich ein t-Wert ( $t = 1,676$ ) der kleiner ist als der kritische Wert (kritische t-Wert = 2,101; Tabellenwert aus <sup>206</sup>) ist.

Demzufolge wurde für die Messung der undotierten Tausäfte bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 5 \%$  kein signifikanter Unterschied von Tag zu Tag festgestellt.

### *Muskelfleisch*

Lamar <sup>129</sup> untersuchte den Matrixeinfluss auf das Testsystem bei Muskelfleisch verschiedener Tierarten. Eine 1:10-Verdünnung des Tausaftes von Schweinefleisch war ausreichend, um Matrixeffekte zu minimieren. Rindfleisch zeigte einen stärkeren Matrixeinfluss, jedoch wurde durch eine 1:10 Verdünnung mit Puffer ein genügend hohes Signal erhalten.

Im Rahmen der durchgeführten Matrixuntersuchungen wurde auch Muskelfleisch vom Rind (unterschiedlicher Herkunft) untersucht. In Abbildung 6.14 ist beispielhaft die Abhängigkeit des Signals von der  $\beta$ -Lactam-Konzentration in der Messlösung für eine 1:10 Verdünnung des Tausaftes für Muskelfleisch vom Rind dargestellt. Als Modellsubstanz wurde Ampicillin verwendet. 5 Proben Muskelfleisch wurden zur Tausaftgewinnung analog der Abbildung 6.8 aufgearbeitet und hatten im Mittel einen pH-Wert von 5,5.



**Abbildung 6.14: Kalibrierung in Rindermuskel-Tausaft (1:10):** der Balken stellt den Mittelwert aus Tausaftproben ( $n = 5$ ) dar

Übereinstimmend mit den Beobachtungen von Lamar wurde mit einer 1:10 Verdünnung in PBS-Puffer ein genügend hohes Signal erhalten. Die erhaltenen Variationskoeffizienten lagen für den Kalibrierbereich zwischen 6 und 12 %.

Weiterführende Untersuchungen mit Muskelfleisch, insbesondere in Hinblick auf Wiederholbarkeit, wurden mittels des kolorimetrischen Assays nicht durchgeführt, da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Analyse von Schweineniere lag.

### **Matrix Rohmilch**

Die Matrix Rohmilch wurde von Lamar ausführlich untersucht. In dieser Arbeit wurden einzelne Untersuchungen mit Rohmilch durchgeführt.

Lamar zeigte <sup>129</sup>, dass beim entwickelten UV-Test eine Entfettung der Rohmilch durch Zentrifugation ausreichte, um Matrixinterferenzen zu minimieren.

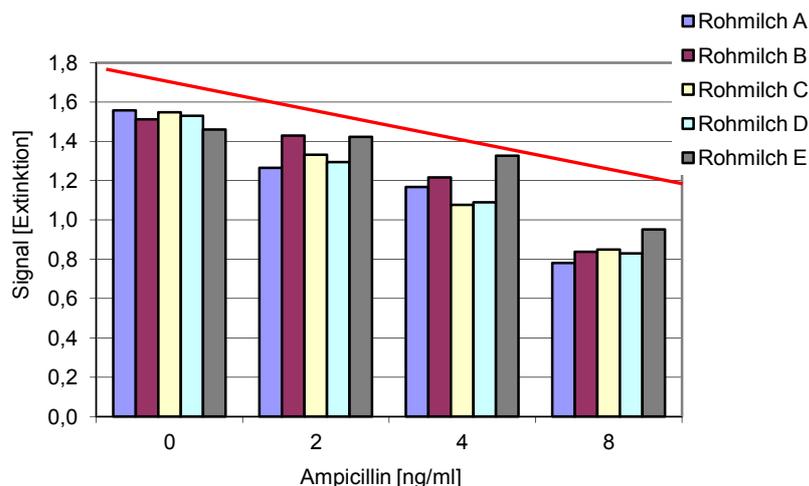
Ein wichtiger Aspekt bei der Betrachtung der Matrixeinflüsse auf das Testsystem ist die Variabilität der Matrixeffekte bei Rohmilchen von verschiedenen Kühen. Eine Reihe von Faktoren, wie Alter, Fütterung, Stoffwechsel oder Gesundheit der Tiere können zu unterschiedlichen Matrixbestandteilen in der Milch führen. Die Rohmilch von verschiedenen Kühen unterscheidet sich in ihrer Zusammensetzung hinsichtlich des Fett- und Proteingehaltes und der Anzahl der somatischen Zellen. Aufgrund der aufgeführten Variation kann es zur Beeinflussung der Nachweisgenauigkeit von Antibiotika kommen <sup>207</sup>.

Um dies zu prüfen, wurden fünf Rohmilch-Proben undotiert, an der halben Höchstmenge, an der Höchstmenge und an der doppelten Höchstmenge mit Ampicillin dotiert und am selben Tag analysiert. Die rechtlich festgesetzte Höchstmenge für Ampicillin in Rohmilch liegt bei 4 µg/kg (entspricht 4 ng/ml) <sup>4</sup>. Für die Analyse wurden folgende fünf Rohmilch-Proben von Landwirten bezogen:

- Rohmilch A: Herde vom Biohof
- Rohmilch B: Kuh 1 von Landwirt 1
- Rohmilch C: Kuh 2 von Landwirt 1 (gleiches Futter wie B)
- Rohmilch D: Herde 1 von Landwirt 2
- Rohmilch E: Herde 2 von Landwirt 2 (gleiches Futter wie D)

Das Verfahren der Dotierung eines Rückstandes zum rückstandsfreien Lebensmittel soll möglichst eine authentische, rückstandshaltige Probe simulieren. Aus diesem Grund wurde die Zugabe der Kalibrierlösung mit 1 % gewählt, um die Matrixeigenschaften nicht durch einen Verdünnungseffekt zu verändern.

Die Entfettung und Dotierung, wurde wie unter Punkt 9.3.4 beschrieben, durchgeführt.



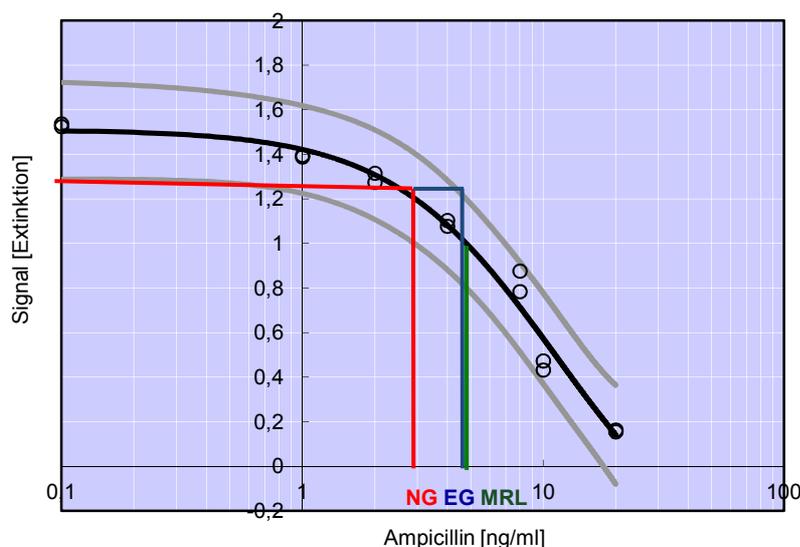
**Abbildung 6.15: Variabilität der verschiedenen Rohmilchproben (entfettet) bei unterschiedlichen Dotierungslevels mit Ampicillin;** dargestellte Messpunkte jeweils Mittelwert aus 2-fach Messung; die rote Linie stellt die Abnahme der Signalstärke bei steigender Ampicillin-Konzentration dar

In Abbildung 6.15 wird deutlich, dass die verschiedenen entfetteten Rohmilchproben unterschiedliche Messsignale liefern. Die Variationskoeffizienten variieren je nach Dotierungslevel zwischen 3-10 %. Ein Zusammenhang zwischen Fütterung und Signalintensität wird nicht deutlich.

#### Nachweis- und Erfassungsgrenze

Die Bestimmung der Nachweis- und Erfassungsgrenze wurde analog den Untersuchungen mit Schweineniere durchgeführt.

Es wurden hierfür jeweils einzelne Kalibrierkurven in entfetteter Rohmilch (n = 2; Rohmilch D und E) über eine Dotierung mit Ampicillin hergestellt und gemessen.



**Abbildung 6.16: Kalibrierkurve mit Ampicillin zur Bestimmung der Nachweis- und Erfassungsgrenze in Rohmilch (n = 2); NG = 2 ng/ml; EG = 4 ng/ml; Höchstmenge (MRL) = 4 ng/ml; 0,01 µg Ampicillin/kg wählt die Software als Äquivalent für 0 µg Ampicillin/kg aufgrund der logarithmischen Skalierung; Kurvenverlauf über ein 4-Parameter-logistisches Modell an Kalibrierdaten angepasst <sup>205</sup>; grau dargestellte Linien entsprechen den berechneten Prognosebändern;  $\alpha = 0,05$**

In Abbildung 6.16 ist die Kalibrierkurve in entfetteter Rohmilch mit der berechneten Nachweis- und Erfassungsgrenze im Vergleich zur gesetzlich festgesetzten Höchstmenge dargestellt. Die Nachweisgrenze liegt mit 2 ng/ml unter der festgelegten Höchstmenge für Rohmilch von 4 ng/ml.

Lamar <sup>129</sup> verwendete für die Ermittlung der Nachweisgrenze die Standardabweichung und die aus den  $B_0$ -Werten resultierenden Mittelwerte. Nach Lamar ergab sich eine Nachweisgrenze für Ampicillin in Rohmilch von 1 µg/kg.

### Matrizeinflussgrößen

Zur Ermittlung signifikanter Einflussgrößen bezüglich der verwendeten Gewebematrizes wurde ein chemometrisches Screening-Design mit den drei Parametern Tierart (Rind, Schwein), Gewebe (Niere, Muskel) und Individuum (Tier 1 und Tier 2) verwendet. Die Untersuchung wurde am selben Tag und mit denselben Tausäften vorgenommen. Aufgrund der geringen Anzahl an Parametern wurde

hier ein Full Factorial Design gewählt. Das Full Factorial Design ist ein Screening-Design, bei dem alle möglichen Kombinationen von Faktorstufen experimentell durchgeführt werden (vollständig faktorielle Versuchspläne).

Hierzu wurden die Tausäfte der verschiedenen Tierarten und Gewebesorten (wie in Abbildung 6.8 beschrieben) gewonnen und an der Höchstmenge (50 µg/kg) mit Ampicillin als Modellsubstanz dotiert. Die resultierenden Extinktions-Werte wurden als Responsegrößen herangezogen. Pro Experiment wurden drei Wiederholversuche (Replicates) durchgeführt.

Die statistische Versuchsplanung und Auswertung erfolgte mit der Software The Unscrambler™ (Fa. CAMO ASA).

Es ergab sich ein Versuchsplan mit 24 Experimenten (siehe Anhang), wobei die Experimente in randomisierter Reihenfolge durchgeführt wurden. Die Randomisierung ist wichtig, um mögliche systematische Fehler auszugleichen.

In Tabelle 6.5 sind die berechneten Effekte und die dazugehörigen p-Werte für die einzelnen Parameter aufgeführt. Die Effekte der Parameter werden über eine Varianzanalyse (Analysis of Variance = ANOVA) berechnet.

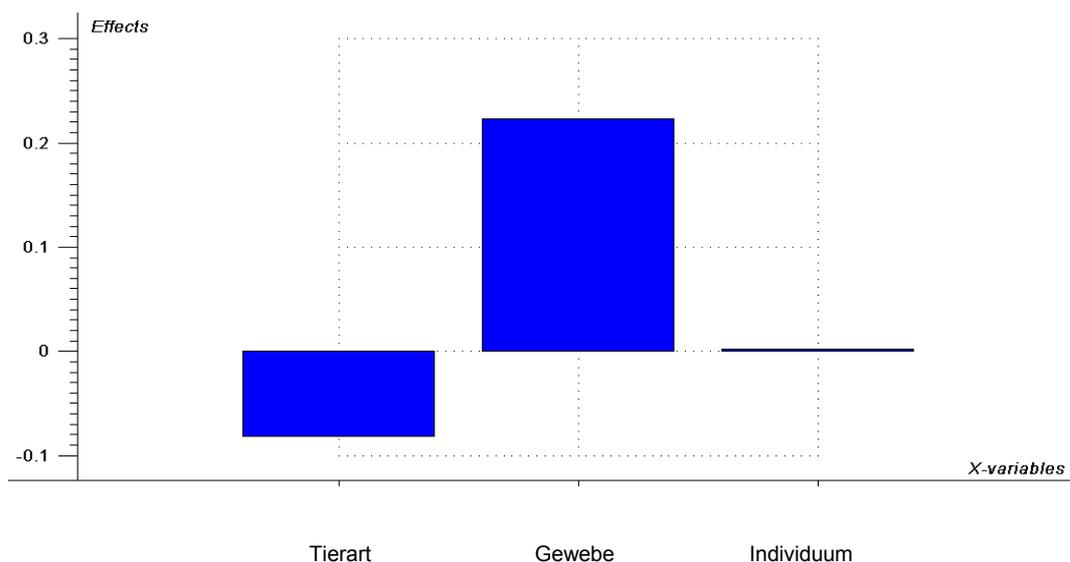
Der p-Wert stellt das Signifikanzniveau dar, bei dem die Nullhypothese, bei der der Unterschied zweier Varianzen nur zufälliger Natur ist, gerade noch abgelehnt wird. Das Signifikanzniveau wurde in diesem Versuch mit 95% (Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha = 0,05$ ) festgelegt. Dies bedeutet, dass diejenigen Effekte als signifikant gelten, deren p-Wert kleiner als 0,05 ist.

**Tabelle 6.5: ermittelte Effekte, p-Werte und Signifikanzen**

Parameter	Effekt	p-Wert	Signifikanz
Tierart	-0,0816	0,0079	signifikant
Gewebe	0,223	0,0000	hoch signifikant
Individuum	0,0017	0,9501	nicht signifikant

Abbildung 6.17 stellt die resultierenden Effekte als Balkengraphik dar. Je höher die Balken, desto stärker ist der jeweilige Einfluss des Parameters.

Ein negativer p-Wert bedeutet allgemein, dass die Einflussgröße zu einer Erniedrigung der Responsegröße führt. Hier ist jedoch anzumerken, dass bei dieser Untersuchung lediglich das Signifikanzniveau des jeweiligen Parameters betrachtet werden soll. Es spielt hier eine untergeordnete Rolle, ob der Effekt einen positiven oder negativen Einfluss besitzt.



**Abbildung 6.17: Balkengraphik der Haupteffekte;** die Balkenhöhe repräsentiert die Einflussstärke des jeweiligen Parameters auf die UV-Messung

Aus den dargestellten Ergebnissen ist abzuleiten, dass die gewählte Gewebeart (Muskel, Niere) und Tierart (Schwein, Rind) einen signifikanten Einfluss auf das Testverfahren besitzt. Dieses Ergebnis lässt sich damit erklären, dass bei den Tausäften erhebliche Tierart- und Gewebe-bedingte Matrixunterschiede vorliegen. Diese Unterschiede wurden auch durch verschiedene Färbung und Trübung (nach Zentrifugation) der Tausäfte beobachtet. Tausäfte aus Nieren wiesen in der Regel eine deutlich stärkere Trübung gegenüber den Tausäften aus Muskel auf. Schweineproben zeigten eine erheblich hellere Färbung als Rinderproben.

Aufgrund der genannten Einflüsse auf den UV-Test ist eine Kalibrierung in der entsprechenden Matrix erforderlich.

### Robustheitsprüfung: Geräteeinfluss

Um zu prüfen, ob bei Verwendung verschiedener Messgeräte (Mikrotiterplattenreader BioRad und FLUOstar Optima; siehe unter Punkt 9.3) ein signifikanter Einfluss auf die Messergebnisse besteht, wurde die oben beschriebene Untersuchung des Full-Factorial Designs mit zwei verschiedenen Messgeräten unmittelbar nacheinander gemessen. Mittels des T-Tests wurden die erhaltenen Messwerte von Gerät 1 und Gerät 2 auf einen signifikanten Unterschied überprüft. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 6.6 aufgeführt, die Messwerte befinden sich im Anhang.

**Tabelle 6.6: Geräteeinfluss auf das kolorimetrische Testsystem; erhaltene Mittelwerte, Standardabweichungen, Varianzen und t-Werte**

	Gerät 1	Gerät 2
<b>Mittelwert</b>	1,162	1,159
<b>Standardabweichungen</b>	0,432	0,399
<b>Freiheitsgrade (df)</b>	19	
<b>Varianz (<math>s^2</math>)</b>	0,186	0,159
<b>t-Wert</b>	0,187	
<b>krit. t-Wert bei zweiseitigem Test</b>	2,093	
<b>Unterschied</b>	Nicht signifikant	

Der resultierende t-Wert wird auf einem Signifikanzniveau von 5% mit dem kritischen t-Wert (hier = 2,093, Tabellenwert aus <sup>206</sup>) verglichen. Der t-Wert ist kleiner als der kritische t-Wert, folglich sind die Mittelwerte von Gerät 1 und 2 nicht signifikant unterschiedlich <sup>206</sup>. Ein Geräteeinfluss auf das Testverfahren ist erwartungsgemäß nicht vorhanden.

### Fazit zu den Untersuchungen mittels des kolorimetrischen Assays

Im Hinblick auf den Detektionsschritt konnte gezeigt werden, dass bei der Einhaltung von 5 min Standzeit der TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung vor Gebrauch eine gute Konstanz der Signalintensität erhalten wurde. Zusätzlich konnte die Detektionszeit im Vergleich zu den Testbedingungen nach Lamar <sup>129</sup> von 10 min auf 5 min reduziert werden.

Ampicillin, Benzylpenicillin und Cefquinom konnten, wie auch bei Lamar, mit Hilfe von PBP 2x\* nachgewiesen werden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass mit Hilfe des PBP 2x\* Desfuroylceftiofur, der aktive Metabolit des Ceftiofurs, erfasst werden kann.

Untersuchungen mit Schweinenieren zeigten, dass der kolorimetrische Test sich auch für den Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika in Niere unter Verwendung des Tausaftes mit einer Verdünnung in Puffer anwenden lässt. Dazu ist eine Kalibrierung in der Matrix erforderlich.

Die NG und EG lagen für die hier untersuchten  $\beta$ -Lactame in Niere deutlich unterhalb der festgesetzten Höchstmengen.

## 6.2 Chemilumineszenz-Mikrotiterplatten-Test

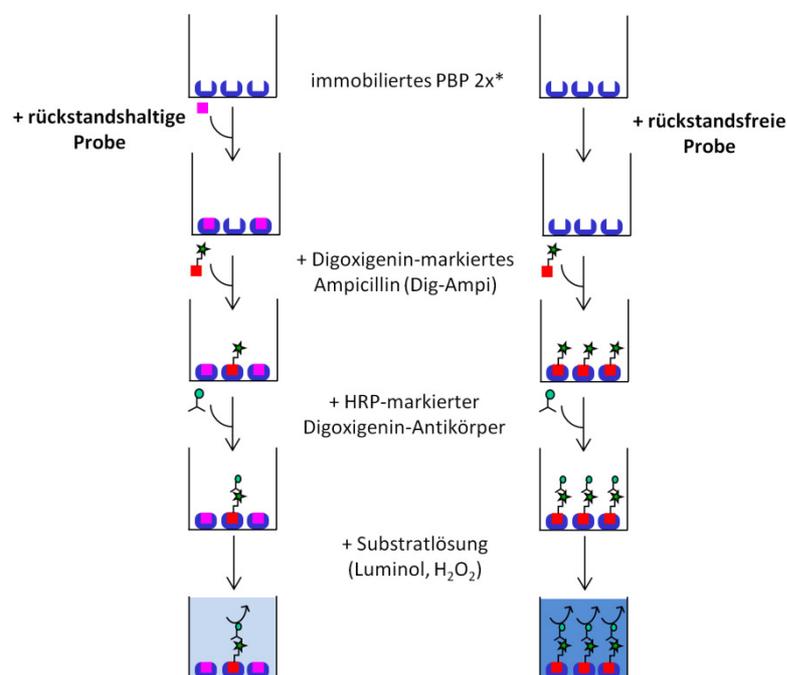
Ausgangspunkt für die Entwicklung eines Chemilumineszenz-Mikrotiterplatten-tests (CL-Test) zum Nachweis auf  $\beta$ -Lactame war der von Lamar <sup>129</sup> beschriebene Kolorimetrischer Assay. Die Sensitivität des Testverfahrens sollte durch den Einsatz der Chemilumineszenz verbessert werden.

Hierfür wurde der prinzipielle Testaufbau beibehalten. Als letzten Schritt wurde die Meerrettichperoxidase-katalysierte Luminolreaktion für die Detektion verwendet.

Störungen durch Matrix wurden untersucht und mit dem kolorimetrischen Assay verglichen.

### 6.2.1 Testprinzip

Das Testprinzip des indirekten kompetitiven Chemilumineszenz-Tests ist in Abbildung 6.18 schematisch dargestellt.



**Abbildung 6.18: Testprinzip des CL-Assay zum Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika;** links dargestellt: Testablauf mit rückstandshaltiger Probe; rechts dargestellt: Testablauf mit rückstandsfreier Probe.

Prinzipiell ähnelt der Testablauf des CL-Assays dem des kolorimetrischen Assays. Der letzte Schritt wurde im Vergleich zum beschriebenen kolorimetrischen Assay durch den Einsatz der Luminoloxidation verändert. Zur Detektion fand als CL-Substrat die kommerziell erhältliche SuperSignal®-Lösung Anwendung. Darin sind Wasserstoffperoxid, ein spezieller CL-Enhancer und Luminol enthalten <sup>172</sup>. Details werden von der Firma nicht bekannt gegeben. Durch die Meerrettichperoxidase-Reaktion mit Wasserstoffperoxid und Luminol als CL-bildende Komponente entsteht eine blaue Chemilumineszenz (siehe Abschnitt 4.4.2).

Wasserstoffperoxid dient hierbei als Substrat der Meerrettichperoxidase. Die Intensität der erhaltenen Chemilumineszenz ist zum  $\beta$ -Lactamgehalt in der Probe umgekehrt proportional.

## 6.2.2 Entwicklung eines Chemilumineszenz-Assays

### Konzeptionelle Vorgehensweise bei der Entwicklung des CL-Assays

Bei der Entwicklung des CL-Assays in dieser Arbeit waren folgende grundlegende Fragestellungen wichtig für das experimentelle Vorgehen.

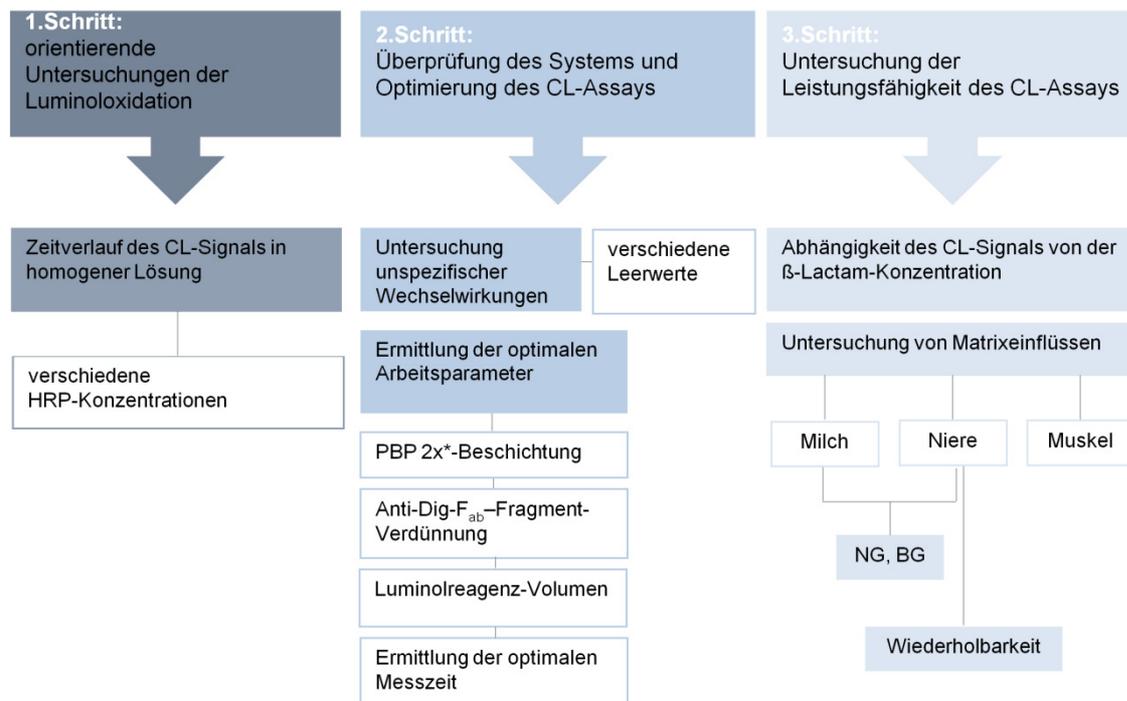
- Welche Ziele werden verfolgt?
- Wie sind die Ausgangsbedingungen?
- Welche Voraussetzungen müssen erfüllt sein?
- Welche Arbeitsparameter haben welchen Einfluss auf das CL-Signal?
- Wie hängt das CL-Signal von der  $\beta$ -Lactam-Konzentration ab?

Im Rahmen der Entwicklung des CL-Assays wurden schwerpunktmäßig zwei Ziele verfolgt. Die Empfindlichkeit des von Lamar beschriebenen kolorimetrischen Tests sollte durch den Einsatz der Chemilumineszenz verbessert werden. Des Weiteren sollte die Anwendung des CL-Assays für den Nachweis von  $\beta$ -Lactamen in verschiedenen Lebensmittelmatrices erfolgen und die Leistungsfähigkeit des Tests ermittelt werden. Als besonders interessante Matrix kam hierbei die Niere aufgrund ihrer Bedeutung als Anreicherungsorgan in Frage. Der Aspekt der Matrixeinflüsse auf das CL-Testsystem wird im Abschnitt 6.2.3 detailliert beschrieben.

Die erarbeiteten Erkenntnisse von Lamar <sup>129</sup> dienten als Ausgangspunkt für die weiterführenden Untersuchungen in dieser Arbeit. Insofern wurden bereits ermittelte Parameter, wie zum Beispiel die Spezifität, nicht mehr untersucht. Weiterhin zeigte Lamar bei der Methodenentwicklung des kolorimetrischen Assays mittels chemometrischer Optimierung, dass als Haupteinflussparameter die PBP 2x\*-Beschichtung, die Dig-Ampi-Verdünnung und die Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragment-Verdünnung zu sehen sind <sup>129</sup>. Die Inkubationszeiten, die physikochemischen Parameter, pH-Wert, Ionenstärke und Temperatur wurden von Lamar übernommen.

Für die Eignung des CL-Assays müssen weitere Punkte gegeben sein: 1) Es dürfen keine unspezifischen Wechselwirkungen zwischen den Assaykomponenten untereinander und den  $\beta$ -Lactamen auftreten. 2) Der Zeitverlauf des CL-Signals muss unter gegebenen Bedingungen bekannt sein, damit ein definierter Messzeitraum

festgelegt werden kann. 3) Die Intensität des CL-Signals muss abhängig von der vorhandenen  $\beta$ -Lactamkonzentration in der Probe sein und reproduzierbar sein. In Abbildung 6.19 ist das Konzept der experimentellen Vorgehensweise dargestellt.



**Abbildung 6.19: Konzeptionelle Vorgehensweise bei der Entwicklung des CL-Assays zum Nachweis auf  $\beta$ -Lactam-Antibiotika;**

Nach Prüfung von gegebenenfalls vorhandenen unspezifischen Wechselwirkungen sollten optimale Testbedingungen nach folgenden Kriterien entwickelt werden:

- Es sollte eine möglichst hohe Zählrate (relative light units, RLU in counts per seconds) bei der Abwesenheit von  $\beta$ -Lactam-Rückständen in der Probe erhalten werden, um einen großen Arbeitsbereich sicherzustellen.
- Das Messsignal sollte über einen gewissen Zeitraum konstant sein, da dies für die Robustheit der Methode von Vorteil ist.
- Eine niedrige Konzentration an  $\beta$ -Lactamen sollte einen möglichst großen Effekt auf die CL-Intensität zeigen.
- Besonders die teuren und aufwändig hergestellten Assay-Komponenten (PBP 2x\*, Dig-Ampi und das CL-Reagenz) sollten ressourcensparend eingesetzt werden.

### Schritt 1: Orientierende Versuche zur Luminoloxidation

Die enzymkatalysierte CL-Reaktion von Luminol folgt einem komplexen Mechanismus, der stark von den gewählten Reaktionsbedingungen abhängt. Insbesondere ist der Bildungsmechanismus des Luminolhydroperoxids ( $\text{LO}_2\text{H}^-$ ), der Schlüsselkomponente, (siehe Abschnitt 4.4.2), abhängig von den gewählten Komponenten und deren relativen Konzentrationsverhältnis zueinander.

Die Intensität des Messsignals ist unter bestimmten Bedingungen proportional zur Bildungsrate der Luminolradikale. Diese hängt von der Wasserstoffperoxid-Konzentration, der Geschwindigkeit des Enzymumsatzes und dem Elektronentransfer zwischen den Phenoxy-Radikalen des Verstärkers und dem Luminol ab <sup>158,160,161</sup>.

Besonders das Enzym-Wasserstoffperoxid-Verhältnis und der pH-Wert sind hierbei als wichtige Aspekte zu betrachten <sup>149</sup>.

Der Abbau der Luminol-Hydroperoxide ist nur vom dem pH-Wert des Systems abhängig <sup>159</sup>. Der pH-Wert der CL-Substratlösung lag bei 8,7 und wurde nicht variiert.

Es sollte schwerpunktmäßig untersucht werden, wie sich das Verhältnis von Enzym zur Substratlösung auf den Verlauf des CL-Signals auswirkt.

Zunächst wurden Versuche mit einer nicht konjugierten, freien HRP und dem CL-Reagenz in homogener Lösung im Mikrotiterplattenformat durchgeführt. Zu 50  $\mu\text{l}$  einer HRP-Lösung (in PBS-Puffer) wurden mit Hilfe einer im Gerät installierten Dosiervorrichtung 150  $\mu\text{l}$  Luminolsubstrat-Reagenz (SuperSignal®-Reagenz) dazugegeben, gemischt und anschließend der Signalverlauf (relative light units, RLU) über einen definierten Zeitraum verfolgt.

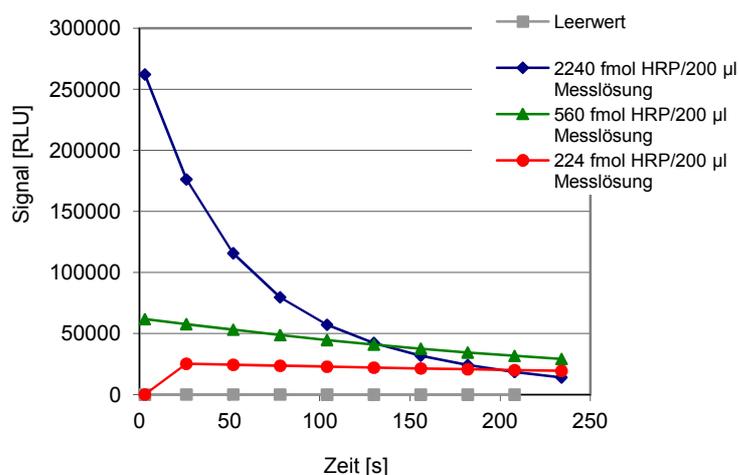
In Abbildung 6.20 und Abbildung 6.21 sind die Signalverläufe der Luminoloxidation bei unterschiedlichen Enzym-Substrat-Verhältnissen dargestellt, abhängig vom Messzeitpunkt in Sekunden. Die Zugabe des Luminolsubstrat-Reagenzes erfolgte mit 150  $\mu\text{l}$  im Überschuss, so dass  $c_{\text{Substrat}} > c_{\text{Enzym}}$ . Bei den dargestellten HRP-Mengen handelt es sich um absolute Mengenangaben pro Kavität.

Die Messungen wurden in zwei verschiedenen Modi durchgeführt. Für die Betrachtung sehr kurzer Zeiträume (bis ca. 2 min) wurde der Well Modus verwendet, längere Zeiträume (bis ca. 15 min) wurden mit dem Plate Modus verfolgt. Beim Well Modus wird eine Kavität direkt mehrfach gemessen, deshalb eignet sich dieser Modus besonders für schnelle kinetische Reaktionen. Beim Plate Modus wird die gesamte Mikrotiterplatte in definierten Zeitintervallen gemessen.

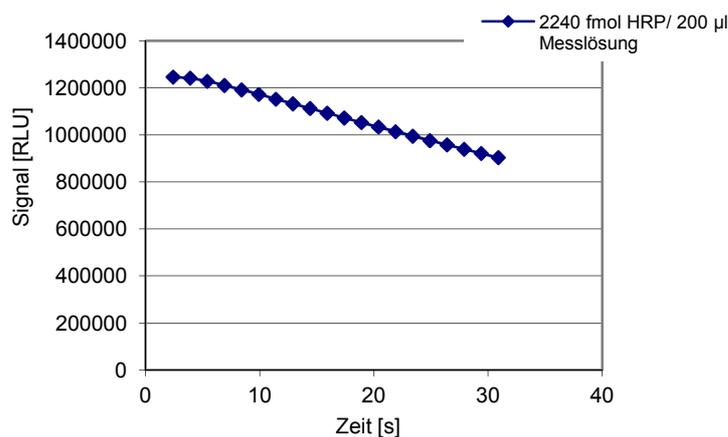
Der Gain-Faktor bezeichnet die Verstärkung des elektrischen Signals. Die Signalintensitäten, die mittels unterschiedlicher Gain-Faktoren ermittelt wurden, können nicht miteinander verglichen werden. Für die ersten Messungen wurde ein Gain-Faktor von 500 bis 1000 verwendet. Für alle weiteren Messungen war der Gain-Faktor 1966. Dieser wurde mit dem Messsignal ermittelt, das die höchsten RLU-Werte ergab.

In Abbildung 6.20 A) ist bei der höchsten HRP-Menge ein starker Abfall des CL-Signals zu beobachten. Der typische Kurvenverlauf des „glow-Typs“ (siehe Abbildung 4.7) der für die verstärkte Luminoloxidation charakteristisch ist <sup>166</sup>, kann hier nicht gesehen werden. Erst bei einer HRP-Menge (absolut) von 224 fmol wird der typische Kurvenverlauf deutlich, bei dem die Intensität des CL-Signals für mehrere Minuten konstant bleibt.

A)

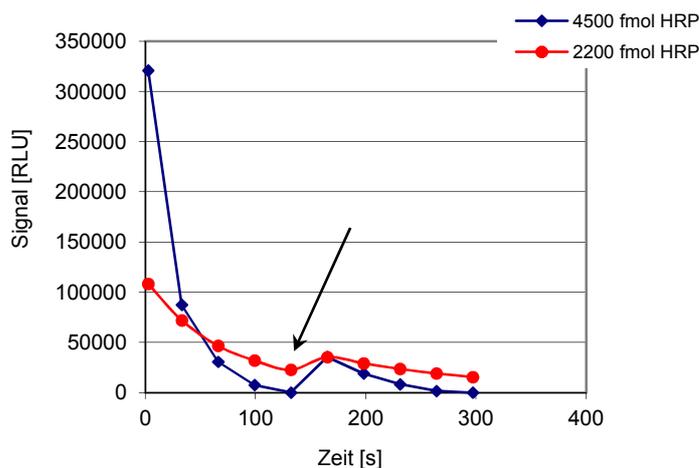


B)



**Abbildung 6.20: CL-Signalverlauf in homogener Lösung;** A) CL-Signalverlauf in Abhängigkeit von verschiedenen HRP-Mengen über einen Messzeitraum von 4 min; Plate-Modus, Gain = 750, Messstartpunkt = 3 s; B) CL-Signalverlauf bei hoher HRP-Menge innerhalb der ersten 30 s; well-Modus, Gain = 1000, Messstartpunkt = 2,4 s)

In Abbildung 6.21 ist der CL-Signalverlauf bei zwei verschiedenen Enzym-Substrat-Verhältnissen dargestellt, wobei nach Abklingen des CL-Signals eine erneute Zudosierung von 50  $\mu\text{l}$  Substratlösung erfolgte. Der Anstieg des CL-Signals zeigt die Abhängigkeit des CL-Signals von der aktuellen Substratkonzentration. Bei niedriger Enzymmenge ergab eine erneute Zugabe kaum bzw. keinen Effekt, da das Substrat in diesem Fall nach 132 s noch nicht verbraucht war.



**Abbildung 6.21: Abhängigkeit des CL-Signalverlauf von der Substrat- und Enzymmenge in homogener Lösung;** Messstartpunkt = 2,5 s; Pfeil stellt erneute Zudosierung (bei 132 s) von 50  $\mu\text{l}$  SuperSignal-Lösung dar, Gain = 500

Kapeluich *et al.*<sup>164</sup> nehmen an, dass das Abklingen der Chemilumineszenz durch die irreversible Inaktivierung der HRP zustande kommt. Der hohe Überschuss an Wasserstoffperoxid führt zur Bildung reaktiver radikalischer Zwischenprodukte, die die prosthetische Gruppe der HRP modifizieren. Während der Messzeit läge demnach keine konstante Enzymaktivität vor.

Ob das beobachtete Abklingen der Chemilumineszenz nur von dem Verbrauch der Substratlösung oder auch von der angenommenen Inaktivierung des Enzyms abhängt, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

## Schritt 2: Überprüfung des CL-Testsystems

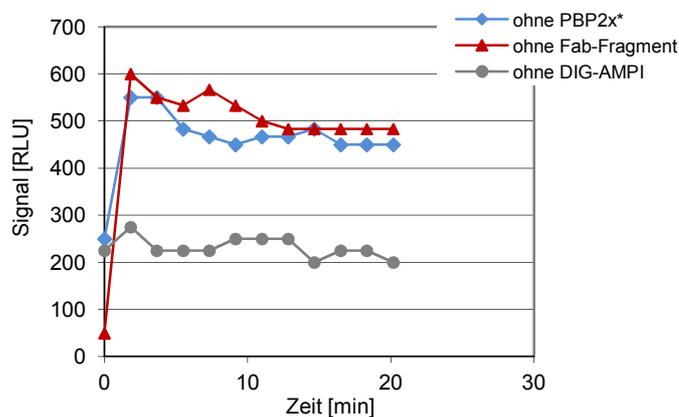
Um ein Assayformat erfolgreich einsetzen zu können, dürfen keine unspezifischen Wechselwirkungen innerhalb des Arbeitsablaufes auftreten. Aus diesem Grund wurden verschiedene Leerwerte untersucht, bei denen je eine Assay-Komponente weggelassen wurde. Demzufolge sollte kein bzw. ein sehr geringes CL-Signal detektiert werden. Statt der entsprechenden Reagenzien wurde PBS-Puffer verwendet.

Es wurden folgende Leerwerte analysiert:

- ohne PBP 2x\*-Beschichtung
- ohne Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragment
- ohne Dig-Ampi

Anhand des Leerwertes ohne PBP 2x\* sollte geprüft werden, ob Substanzen unspezifisch an das Mikrotiterplattenmaterial binden.

Die zeitlichen Verläufe des CL-Signals der entsprechenden Leerwerte sind in Abbildung 6.22 dargestellt. Die hier gezeigten Messpunkte ergaben sich aus den Mittelwerten einer Dreifachmessung.



**Abbildung 6.22: Zeitlicher Verlauf des CL-Signals der verschiedenen Leerwerte, Messstartpunkt = 3 s, Plate-Modus, Gain = 1966**

Wie Abbildung 6.22 zeigt, sind die erhaltenen RLU-Werte verhältnismäßig gering im Vergleich zu den maximalen Werten (Vergleich zu Abbildung 6.23), sodass davon ausgegangen wird, dass keine unspezifischen Wechselwirkungen auftreten.

### **Ermittlung der optimalen Arbeitsparameter für den CL-Assay**

Es sollte überprüft werden, inwieweit die Verdünnung des Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragments, die PBP 2x\*-Beschichtung und die Volumenzugabe des Luminolreagenzes die Intensität des CL-Signals und den Zeitverlauf beeinflussen. Daraus sollte der optimale Messzeitraum ermittelt werden. Zunächst wurden keine  $\beta$ -Lactam-Antibiotika als Kompetitor verwendet, sondern nur Maximalwerte gemessen. Anstelle der Analytlösung wurde PBS-Puffer eingesetzt. Die Dig-Ampi-Verdünnung betrug 1:60.000 und wurde nicht variiert. Untersuchungen von Lamar<sup>129</sup> hatten gezeigt, dass bei Verwendung dieser Dig-Ampi-Verdünnung und einer PBP 2x\*-Beschichtung von 100-150 ng/Kavität ein guter Messbereich erhalten wurde. Zudem ist die Synthese und Aufreinigung der Dig-Ampi-Lösung verhältnismäßig aufwändig, sodass eine ressourcensparende **1:60.000 Dig-Ampi-Verdünnung** (in PBS-Puffer) als guter Anhaltspunkt gesehen wurde. Allerdings muss das Dig-Ampi als Kompetitor zu den  $\beta$ -Lactamen in der Probe im Überschuss zugegeben werden, damit alle am PBP 2x\* noch unbesetzten Bindungsplätze vollständig mit markierten  $\beta$ -Lactam besetzt werden können.

Da der Assay aus mehreren Arbeitsschritten (siehe Abbildung 6.1) besteht, sind viele Einflussparameter gegeben und es ergibt sich ein sehr komplexes System. Die Ermittlung der optimalen Haupteinflussgrößen wurde, anders als bei Lamar<sup>129</sup> anhand der klassischen Methode „one Variable at time (OVAT)“ vorgenommen. Hierbei wird jeweils eine Variable variiert und die anderen Parameter konstant gehalten.

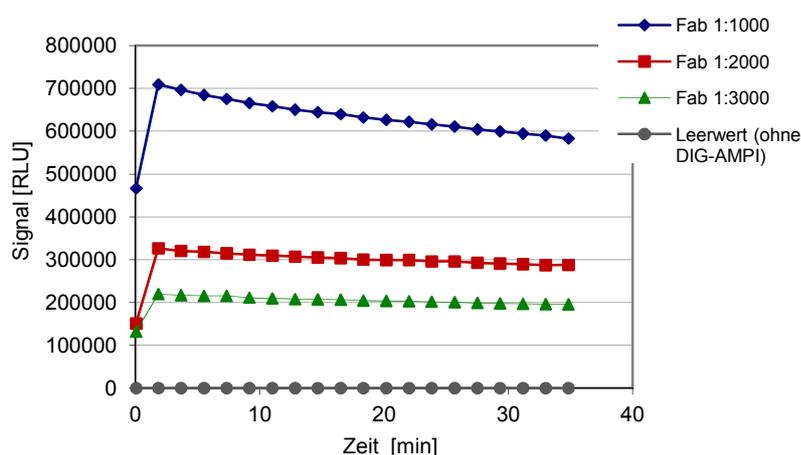
### Optimierung der Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragment-Verdünnung

Um den Effekt der Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragment-Verdünnung auf das CL-Signal zu untersuchen, wurden drei unterschiedliche Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragment-Verdünnungen in 1%iger Casein-PBS-Pufferlösung (1:1000, 1:2000 und 1:3000) verwendet. (siehe Tabelle 6.7) Die Temperatur wurde mit 20°C konstant gehalten. Zum Vergleich wurde außerdem ein Leerwert ohne Dig-Ampi-Zugabe durchgeführt.

**Tabelle 6.7: Testbedingungen des CL-Tests bei der Untersuchung der Verdünnungsstufe der Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragmente**

Einflussparameter	
PBP 2x*-Beschichtung	100 ng/Kavität
Dig-Ampi-Verdünnung	1:60.000
<b>Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragment-Verdünnung<sup>[1]</sup></b>	<b>1:1000</b>
	<b>1:2000</b>
	<b>1:3000</b>
CL-Substratreagenz-Volumen	150 µl/Kavität

<sup>[1]</sup> variiertes Parameter fett gedruckt



**Abbildung 6.23: zeitlicher Verlauf des CL-Signals mit unterschiedlichen Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragment-Verdünnungen;** Plate-Modus, Gain = 1966; Messstartpunkt = 2,4 s, dargestellte Messpunkte jeweils Mittelwert aus 2-fach Messung; Fab entspricht Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragment-Peroxidase

In Abbildung 6.23 ist der Zeitverlauf des Messsignals über einen Zeitraum von 35 min für die unterschiedlichen Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragment-Verdünnungen dargestellt. Die maximale Signalintensität wurde für alle drei untersuchten Verdünnungen nach 2 min erhalten, wobei die Zählraten (RLU) mit steigender Verdünnung abnahmen. Innerhalb der ersten 5 min zeigte sich unter den gegebenen Bedingungen für die untersuchten Verdünnungen ein relativ konstantes CL-Signal. Lediglich für die geringste F<sub>ab</sub>-Fragmenten-Verdünnung war ein leichter Abfall des Messsignals erkennbar. Dies lässt darauf schließen, dass mehr Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragmente an das von PBP 2x\*-fixierte Dig-Ampicillin gebunden haben. Demzufolge wurde das CL-Substratreagenz schneller verbraucht und lag im Vergleich zur HRP-Menge nicht mehr im Überschuss vor. Ein konstantes Signal mit einer hohen Intensität wurde mit einer **1:2000 Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragment-Verdünnung** erhalten. Für die folgenden Optimierungsversuche wurde deshalb diese Verdünnungsstufe verwendet.

#### Optimierung der PBP 2x\*-Beschichtung

Die untersuchten PBP 2x\*-Beschichtungsmengen lagen bei 100 und 150 ng/Kavität. Aufgrund der aufwändigen und teuren Aufreinigung des PBP 2x\* sollte die Beschichtungsmenge möglichst gering gewählt werden und richtete sich nach den Erkenntnissen von Lamar <sup>129</sup>. Nach dem theoretischen Modell sollte die Menge an gebundenem Dig-Ampi und demzufolge an Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragmenten mit zunehmender Rezeptorproteinmenge steigen. Jedoch führten höhere Beschichtungsmengen wahrscheinlich zur Sättigung der Kavität und einer sterischen Behinderung der Bindungstasche des PBP 2x\*. Es wurden trotz größerer Mengen Rezeptorprotein weniger Dig-Ampi-Moleküle gebunden.

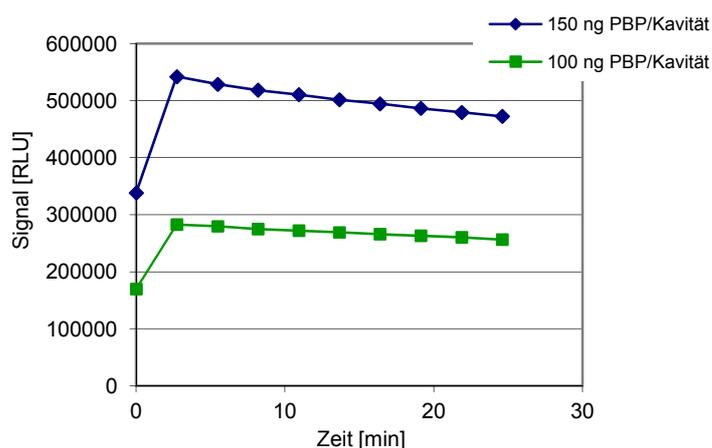
**Tabelle 6.8: Testbedingungen des CL-Tests bei der Ermittlung der optimalen Beschichtungsmenge von PBP 2x\***

Einflussparameter	
<b>PBP 2x*-Beschichtung<sup>[1]</sup></b>	<b>100 ng/Kavität</b> <b>150 ng/Kavität</b>
Dig-Ampi-Verdünnung	1:60.000
Anti-Dig-F <sub>ab</sub> -Fragment-Verdünnung	1:2000
CL-Substratreagenz-Volumen	150 µl/Kavität

<sup>[1]</sup> variiertes Parameter fett gedruckt

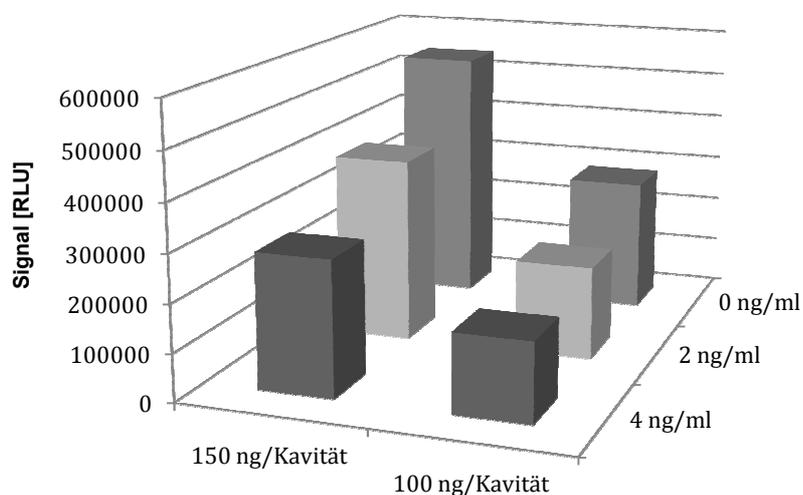
In Abbildung 6.24 ist der zeitliche Verlauf des CL-Signals innerhalb der ersten 25 Minuten für zwei unterschiedliche Beschichtungsmengen an PBP 2x\* dargestellt. Die resultierenden CL-Signalverläufe zeigten für beide Beschichtungsmengen den typischen Verlauf des „Glow-typs“.

Für die Beschichtungsmenge 150 ng/Kavität wurde im Gegensatz zu 100 ng/Kavität PBP 2x\* eine in etwa doppelt so hohe Signalintensität erhalten. Der extreme Unterschied der Signalintensitäten bei geringer Variation der PBP 2x\*-Menge verdeutlicht den starken Einfluss dieses Parameters auf das Test-System. Dies wurde auch von Lamar <sup>129</sup> beschrieben. Ein hohes CL-Signal lässt einen großen dynamischen Arbeitsbereich erwarten.



**Abbildung 6.24: Zeitlicher Verlauf des CL-Signals bei unterschiedlichen PBP 2x\*-Beschichtungsmengen;** Plate Modus, Gain = 1966, Messstartpunkt = 3 s; dargestellte Messpunkte jeweils Mittelwert aus 3-fach Messungen

Abbildung 6.25 zeigt **die Konkurrenz mit  $\beta$ -Lactam-Antibiotika** für die beiden PBP 2x\*-Beschichtungsmengen. Die gemessenen RLU-Werte sind für zwei Ampicillin-Konzentrationen in PBS-Puffer nach einer Messzeit von 2,7 min dargestellt.



**Abbildung 6.25: RLU-Werte bei unterschiedlicher PBP 2x\*-Beschichtungsmenge und Konkurrenz mit Ampicillin; Messzeitpunkt 2,73 min;** (Gain = 1966) dargestellte Messpunkte jeweils Mittelwert aus 3-fach Messung

Das Signal lag bei einer Ampicillinzugabe von 4 ng/ml für beide Beschichtungsmengen bei etwa 50 % des CL-Signals ohne Analyt („Maximalwert“). Das erhaltene Messsignal war für die höhere Beschichtungsmenge etwa doppelt so hoch. Dies verdeutlicht, dass mit beiden Beschichtungsmengen in etwa die gleiche Empfindlichkeit erhalten wird, sich aber eine größere PBP 2x\*-Menge im Hinblick auf den dynamischen Arbeitsbereich positiv auswirkt.

Aufgrund der signifikant höheren Signalintensität wurde die **Beschichtungsmenge von 150 ng PBP 2x\*/Kavität** für die nachfolgenden Untersuchungen verwendet.

### Ermittlung der optimalen Volumenzugabe des Luminolreagenzes

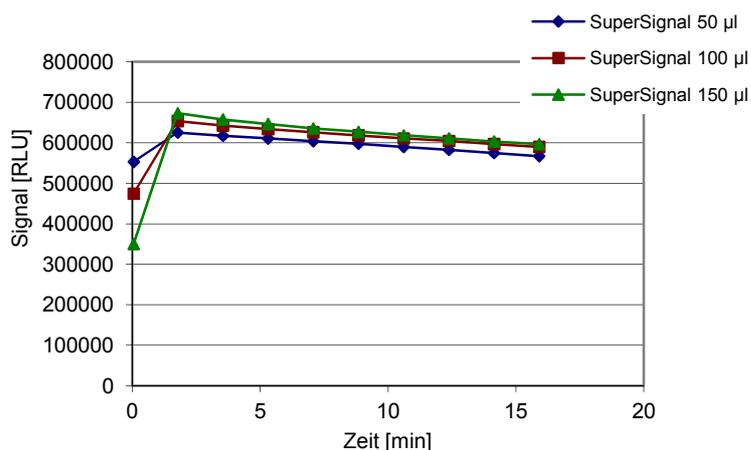
Um die Kosten des Assays möglich niedrig zu halten, sollte geprüft werden, ob die Volumenzugabe des Luminolreagenzes (SuperSignal) reduziert werden kann. Zum Überblick sind in Tabelle 6.9 die Testbedingungen der bisherigen Optimierung aufgeführt. Der zeitliche Verlauf des Messsignals wurde in Abhängigkeit von verschiedenen Volumenzugaben des CL-Substratreagenzes über 16 min verfolgt. Der Volumenunterschied wurde nicht durch Puffer ausgeglichen, da laut Hersteller (Firma Perbio) eine Verdünnung des Reagenzes zu Sensitivitätsverlusten führt.

**Tabelle 6.9: Testbedingungen des CL-Tests bei variiertes Volumenzugabe des Luminolreagenzes**

Einflussparameter	
PBP 2x*-Beschichtung	150 ng/Kavität
Dig-Ampi-Verdünnung	1:60.000
Anti-Dig-F <sub>ab</sub> -Fragment-Verdünnung	1:2000
<b>CL-Substratreagenz-Volumen<sup>[1]</sup></b>	<b>150 µl/Kavität</b>
	<b>100 µl/Kavität</b>
	<b>50 µl/Kavität</b>

<sup>[1]</sup> variiertes Parameter fett gedruckt

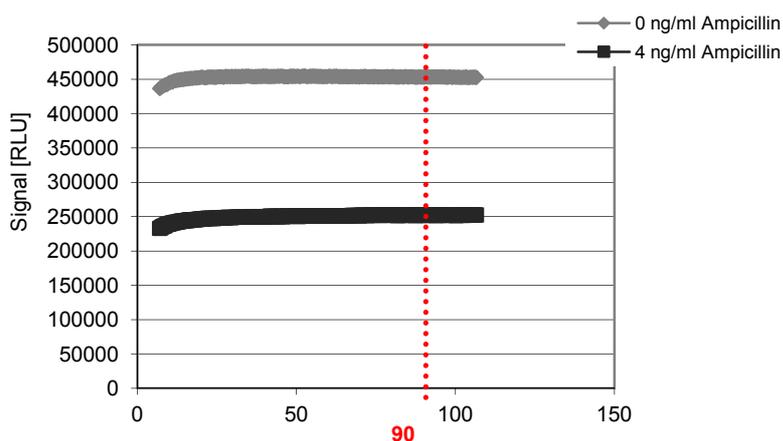
Abbildung 6.26 zeigt den zeitlichen Verlauf des CL-Signals über einen Messzeitraum von 16 min bei verschiedener Volumenzugabe an SuperSignal, **ohne Konkurrenz durch  $\beta$ -Lactam-Antibiotika**. Es ist kaum ein Einfluss auf das CL-Signal zu erkennen. Dies lässt darauf schließen, dass nach einer Zugabe von nur 50 µl SuperSignal das Substrat unter den gegebenen Bedingungen im Überschuss vorliegt. In Bezug auf den wirtschaftlichen Gesichtspunkt ist die **Zugabe von 50 µl SuperSignal pro Kavität** als sehr günstig zu bewerten.



**Abbildung 6.26: Zeitlicher Verlauf des CL-Signals bei unterschiedlicher Volumenzugabe des CL-Substratreagenzes;** Plate Modus, Gain = 1966, Messstartpunkt = 2,8 s; dargestellte Messpunkte jeweils Mittelwert aus 3-fach Messung

### Ermittlung des optimalen Messzeitraums

Da hinter dem Messsignal der Luminoxidation ein kinetischer Verlauf verborgen liegt, ist die Ermittlung des Messzeitpunktes ein wichtiger Aspekt. Es wurde aus diesem Grund geprüft, nach welcher Reaktionszeit eine möglichst hohe und konstante Signalintensität erhalten wurde.



**Abbildung 6.27: Optimierung des Messzeitraums;**

Well Modus, Gain = 1966, Messstartpunkt = 7 s; erhaltene Messsignale ohne und mit Zugabe von Ampicillin unter optimierten Bedingungen

In Abbildung 6.27 ist der zeitliche Verlauf des CL-Signals für die ersten 100 Sekunden dargestellt. Hierbei wurde die absolute Zählrate sowohl ohne, als auch nach Zugabe von einer Ampicillinmenge (4 ng/ml) in PBS-Puffer gemessen. **90 s wurde als Messzeitpunkt** für die nachfolgenden Untersuchungen festgelegt. Tabelle 6.10 gibt einen Überblick über die optimierten Arbeitsbedingungen des CL-Tests.

**Tabelle 6.10: Eckdaten der optimierten CL-Methode** <sup>[1]</sup>

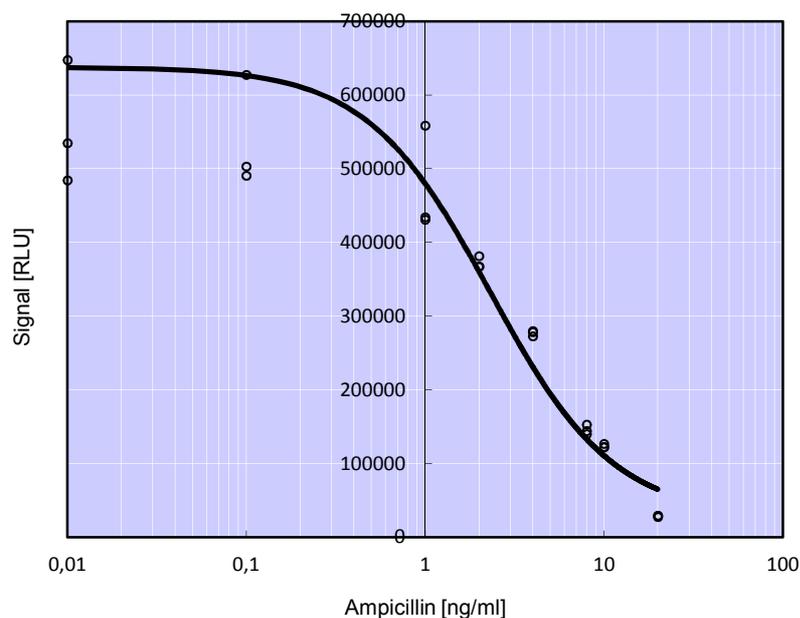
Einflussparameter	
PBP 2x*-Beschichtung	150 ng/Kavität
Dig-Ampi-Verdünnung	1:60.000
Anti-Dig-F <sub>ab</sub> -Fragment-Verdünnung	1:2000
CL-Substratreagenz-Volumen	50 µl/Kavität
Messzeitraum	90 s

<sup>[1]</sup> gemessen wurde im Endpoint-Modus (Bedingungen siehe Tabelle 9.8); im Endpoint Modus wird nach einer definierten Zeitspanne einmal gemessen

Nach der Ermittlung der optimalen Arbeitsbedingungen hinsichtlich der Einflussgrößen auf den Verlauf und die Intensität des CL-Signals, sollte das Assayformat unter diesen Bedingungen weiter charakterisiert und im Hinblick auf die Empfindlichkeit optimiert werden.

### Schritt 3: Abhängigkeit des CL-Signals von der $\beta$ -Lactam-Konzentration

Es sollte untersucht werden, wie das CL-Signal von der  $\beta$ -Lactamkonzentration abhängt. Aus den Arbeiten von Lamar geht hervor, dass das PBP 2x\* unterschiedliche relative Bindeaffinitäten zu den verschiedenen  $\beta$ -Lactamen aufweist <sup>129</sup>. Es wurde eine Kalibrierung mit Ampicillin in PBS-Puffer gemessen. Abbildung 6.28 zeigt den resultierenden Kurvenverlauf in einem Konzentrationsbereich von 0 -20 ng/ml. Der für Immunoassays typische sigmoide Kurvenverlauf wurde erhalten <sup>106</sup>. Das Signal verhielt sich umgekehrt proportional zur Ampicillin-Konzentration. In Tabelle 6.11 sind die dazugehörigen RLU-Werte, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient aufgeführt. Die dargestellten Messwerte stellen den Mittelwert aus einer 3-fach-Bestimmung (PBS-Puffer wurde jeweils neu dotiert) dar. Die Messungen wurden am selben Tag durchgeführt, um eine Tag zu Tag Variabilität auszuschließen.



**Abbildung 6.28: Kalibrierkurve mit Ampicillin in PBS-Puffer;** 0,01  $\mu$ g Ampicillin/kg wählt die Software als Äquivalent für 0  $\mu$ g Ampicillin/kg aufgrund der logarithmischen Skalierung; Kurvenverlauf über ein 4-Parameter-logistisches Modell an Kalibrierdaten angepasst <sup>205</sup>

Die Streuung der 3-fach-Bestimmung ist bei den niedrigeren Ampicillin-Konzentrationen bzw. bei der rückstandsfreien Probe größer als bei den höheren Ampicillin-Konzentrationen.

Anhand der erhaltenen Kalibrierkurve kann gefolgert werden, dass in einen Arbeitsbereich von 1 bis 10 ng Ampicillin/ ml Messlösung ein annähernd linearer Verlauf vorliegt.

**Tabelle 6.11: Messsignal in Abhängigkeit von der Ampicillin-Konzentration in PBS-Puffer**

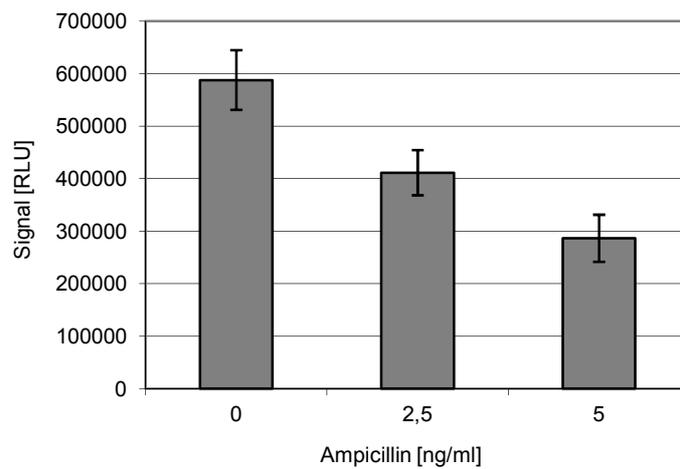
Ampicillin [ng/ml]	Messsignal, gemittelt [RLU]	s [RLU]	VK [%]
0,01	548731	83555	15
0,1	546931	75660	14
1	474486	72716	15
2	371926	8169	2
4	276896	3759	1
8	145619	6533	4
10	123768	2549	2
20	28599	965	3

\* 0,01 µg Ampicillin/kg wählt die Software als Äquivalent für 0 µg Ampicillin/kg aufgrund der logarithmischen Skalierung; n = 3; VK = Variationskoeffizient; s = Standardabweichung

### Tag-zu-Tag-Variabilität

Um die Streuung der Messwerte an verschiedenen Tagen abzuschätzen, wurden die absoluten Messwerte von drei verschiedenen Dotierungsstufen verglichen.

An 5 Tagen wurden undotierte PBS-Puffer-Proben, mit 2,5 ng und 5 ng Ampicillin/ml dotierte PBS-Puffer-Probe (n =5) für die Untersuchung herangezogen. Die Analysen wurden unter gleichen Assaybedingungen durchgeführt. Hierbei wurde jede Probelösung 2-fach gemessen. Um einen systematischen Fehler auszuschließen, wurden die Proben auf der Mikrotiterplatte zufällig verteilt.



**Abbildung 6.29: Unterschiedliche Dotierungsstufen in PBS-Puffer;** dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung der Messwerte an verschiedenen Tagen (n =5)

In Abbildung 6.29 ist kein signifikanter Trend hinsichtlich der Streuung der Messwerte erkennbar. Der Variationskoeffizient lag bei 10-16 %.

### 6.2.3 Matrixeinflüsse

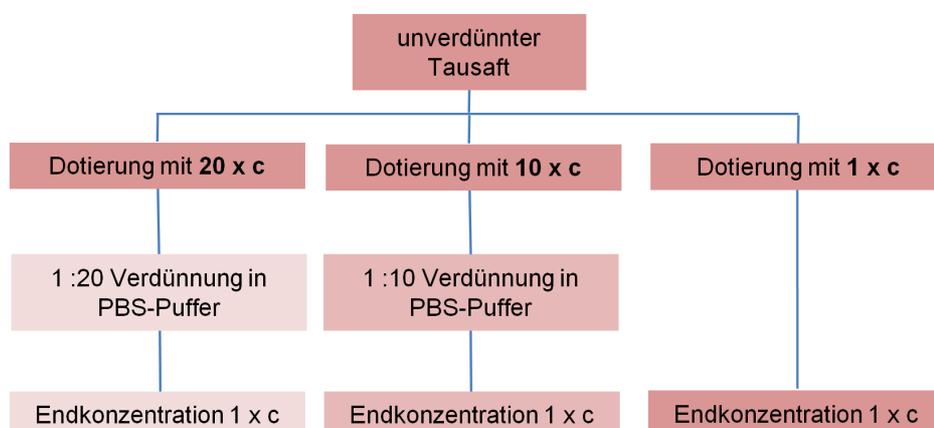
Mögliche Matrixinterferenzen wurden wie zuvor beim kolorimetrischen Assay mit Standardkurven in den verschiedenen Lebensmittelmatrices Niere, Muskelfleisch und Rohmilch überprüft.

## Matrix: Tierische Gewebe

### Niere

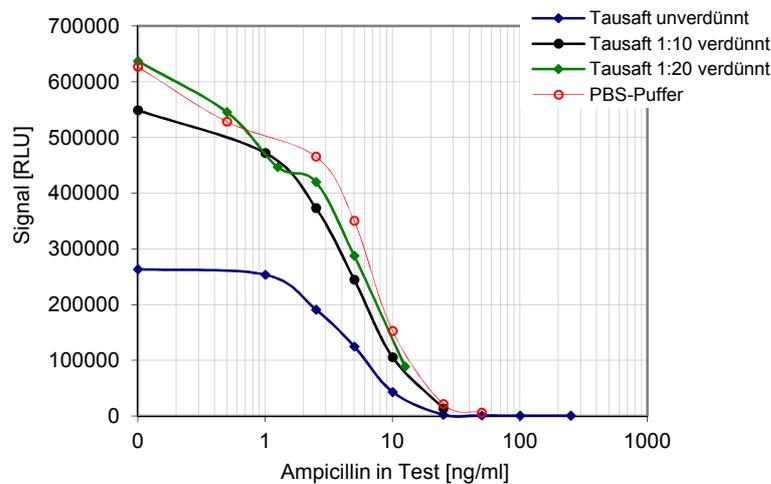
Bei der Untersuchung von  $\beta$ -Lactam-Rückständen in Schweineniere wurde der nach Abbildung 6.8 gewonnene Tausaft verwendet.

Um das Ausmaß des Matrixeffektes auf das CL-Signal zu überprüfen, wurden Kalibrierkurven mit Ampicillin im unverdünnten - und um Faktor 10 und 20 mit PBS-Puffer verdünnten Tausaft gemessen. Pro Tausaftverdünnungsstufe wurde die gleiche Menge an Ampicillin verwendet (siehe Abbildung 6.30).

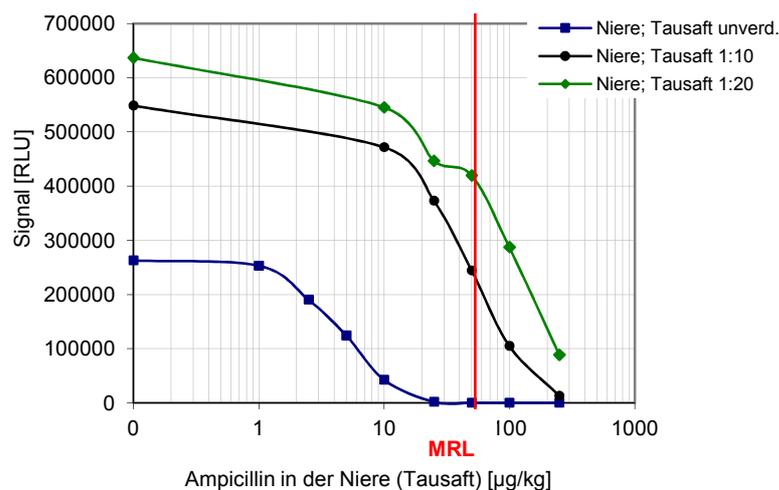


**Abbildung 6.30: Dotierungsschema für die verschiedenen Verdünnungsstufen des Tausaftes; c = Konzentration an Ampicillin 0,5 – 250 ng/ml**

A)



B)



**Abbildung 6.31: Lumineszenz-Signal bei verschiedenen Verdünnungsstufen des Tausaftes aus Schweineniere;** A) CL-Signal aufgetragen gegen die Ampicillin-Konzentration im Test; B) CL-Signal aufgetragen gegen die Ampicillin-Konzentrationen im Tausaft vor dessen Verdünnung (entspricht der Konzentration im Nierengewebe), rote Linie entspricht der festgesetzten Höchstmenge (MRL) für Niere (50 µg/kg);

In Abbildung 6.31 A) ist der Effekt der Verdünnung auf das CL-Messsignal im Vergleich zur Kalibrierkurve in PBS-Puffer dargestellt. Bei einer Verdünnung des Tausaftes um den Faktor 10 oder 20 zeigt die Kalibrierkurve einen ähnlichen Verlauf

wie die Kalibrierkurve in PBS-Puffer. Eine 1:10-Verdünnung reicht aus, um Matrixeinflüsse weitestgehend zu reduzieren.

Zur besseren Vergleichbarkeit mit der festgesetzten Höchstmenge (MRL) ist in Abbildung 6.31 B) das CL-Signal gegen die Ampicillin-Konzentration zum Zeitpunkt der Dotierung dargestellt. Hier wird angenommen, dass 1 Liter Tausaft einer Masse von 1 kg entspricht und somit auf die Masse in  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Niere zurückgerechnet werden kann.

Im interessanten Bereich um  $50 \mu\text{g Ampicillin}/\text{kg Niere}$  zeigt die Kalibrierung im unverdünnten Tausaft kein Signal, das bedeutet alle PBP 2x\*-Bindungsplätze sind durch  $\beta$ -Lactam-Antibiotika aus der Probe besetzt oder Matrixbestandteile stören. Bei einer 1:10-Verdünnung des Tausaftes ( $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) wird ein genügend hohes Signal erhalten. Zusätzlich sind auch die störenden Matrixbestandteile durch die Verdünnung reduziert. Dies kann anhand der Abbildung 6.31 A) gefolgert werden.

Inwieweit die Verdünnung einen Einfluss auf die Empfindlichkeit des Testsystems besitzt wird über den Vergleich der  $\text{IC}_{50}$  (inhibition concentration) der beiden Verdünnungsstufen ermittelt. Der  $\text{IC}_{50}$  ist die Konzentration aus der Kalibrierkurve, für die  $B = 0,5 \cdot B_0$  ist.

Die stärkere Verdünnungsstufe des Tausaftes (1:20) ergab einen deutlich höheren  $\text{IC}_{50}$ -Wert ( $\text{IC}_{50}$ -Wert = 85) als die niedrigere 1:10-Verdünnungsstufe ( $\text{IC}_{50}$ -Wert = 43). Dies bedeutet, dass das Testverfahren bei einer höheren Verdünnungsstufe unempfindlicher wird. Die Abnahme der Empfindlichkeit lässt sich durch die stärkere Verdünnung der absoluten Ampicillinmenge erklären. Die stärkere Verdünnung der störenden Matrixbestandteile stellt entsprechend eine untergeordnete Rolle dar.

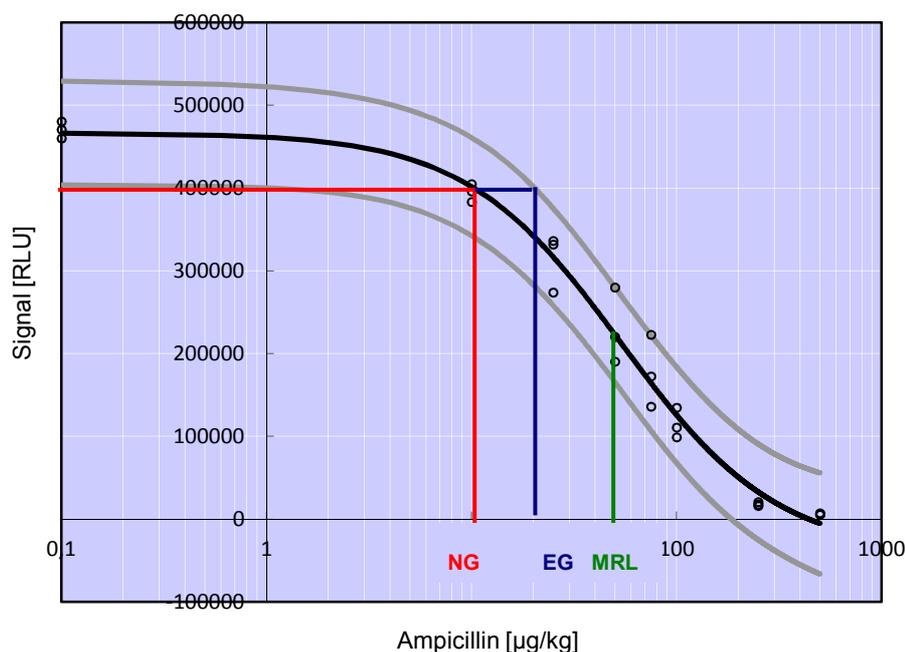
Die Verdünnung des Tausaftes mit PBS-Puffer **um Faktor 10** stellt aufgrund des **genügend hohen Messsignals** und des **geringen  $\text{IC}_{50}$ -Wertes** eine gute Verdünnungsstufe für die Analyse von Ampicillin und Benzylpenicillin dar.

### Nachweis- und Erfassungsgrenze

Die NG und EG wurden wie beim kolorimetrischen Assay (siehe unter 6.1.4) ermittelt.

Je nach der festgesetzten Höchstmenge wurden die unverdünnten Tausäfte von verschiedenen Schweinenieren (siehe Abbildung 6.8) im entsprechenden Konzentrationsbereich dotiert. Die unterschiedlichen Verdünnungsstufen der unverdünnten, dotierten Tausäfte wurden wie beim kolorimetrischen Assay durchgeführt (siehe Tabelle 6.2).

Die Kalibrierkurve für die Bestimmung der NG und EG ist exemplarisch für Ampicillin in Abbildung 6.32 abgebildet (die Kalibrierkurven der weiteren  $\beta$ -Lactame befinden sich im Anhang).



**Abbildung 6.32:** Kalibrierkurve mit Ampicillin im Tausaft aus Schweineniere ( $n = 3$ ) und Bestimmung der NG und EG (NG = 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , EG = 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , Höchstmenge (MRL) = 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); 0,1  $\mu\text{g}$  Ampicillin/kg wählt die Software als Äquivalent für 0  $\mu\text{g}$  Ampicillin/kg aufgrund der logarithmischen Skalierung; Kurvenverlauf über ein 4-Parameter-logistisches Modell an Kalibrierdaten angepasst<sup>205</sup>; grau dargestellte Linien entsprechen den berechneten Prognosebändern;  $\alpha = 0,05$

In Tabelle 6.12 sind die ermittelten NG und EG für die verschiedenen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika dargestellt.

Es zeigte sich, dass die NG und EG für die gewählten Rückstände deutlich unterhalb der entsprechend festgesetzten Höchstmengen lagen.

**Tabelle 6.12: Ermittelte Nachweis- und Erfassungsgrenze im Vergleich zur rechtlich festgesetzten Höchstmenge in Schweinenieren; Konfidenzintervall von 95% ( $\alpha = 0,05$ )**

Rückstand	NG [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	EG [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	Höchstmenge [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]
Ampicillin	10	20	50
Benzylpenicillin	4	10	50
Cefquinom	26	73	200
Ceftiofur (gemessen als Desfuroylceftiofur)	1500	3000	6000

### Beurteilung der Methode anhand verschiedener Verfahren zur Nachweisgrenzebestimmung

Lamar <sup>129</sup> berechnete die NG aus dem Mittelwert der Leerproben abzüglich der 3-fachen Standardabweichung. Dieses Verfahren wurde mit der Bestimmungsmethode nach Steliopoulos verglichen.

Zur Bestimmung der NG von Benzylpenicillin in Schweineniere wurden 20 undotierte Schweinenieren-Tausäfte verwendet. Der Mittelwert wurde berechnet und die 3-fache Standardabweichung abgezogen. Es wurde eine Kalibrierkurve in Schweinenieren-Tausaft ( $n = 3$ ) im Konzentrationsbereich von 0 bis 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  mit Benzylpenicillin aufgenommen und über diese der Wert für die NG ermittelt. Für die Kalibrierung wurden die Tausäfte der Nieren 1, 2 und 3 verwendet (siehe Tabelle 6.13). Alle 20 Tausäfte, sowie die Kalibrierungen wurden an einem Tag gemessen. In Tabelle 6.13 sind die erhaltenen Signalwerte für die 20 undotierten Nieren-Tausäfte und in Abbildung 6.33 die Kalibrierkurve nach Steliopoulos dargestellt.

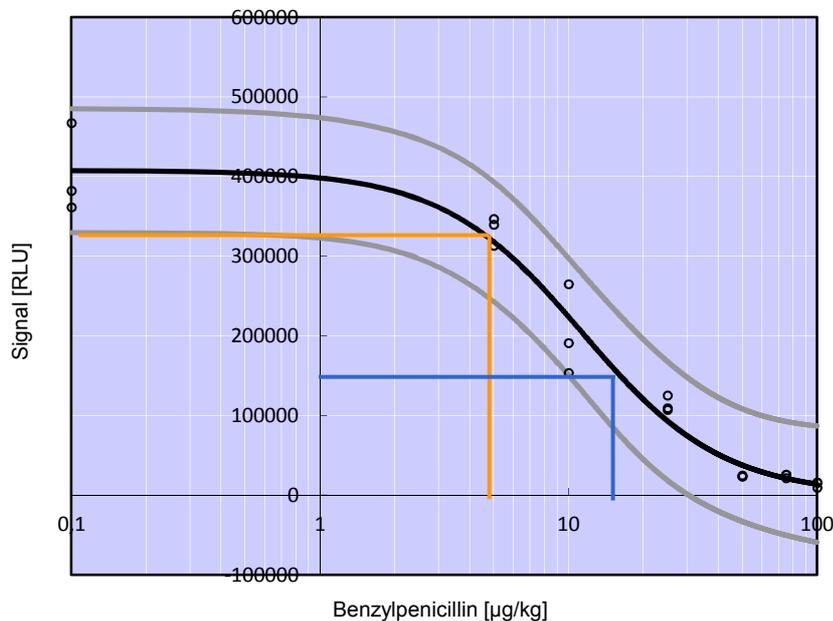
**Tabelle 6.13: Messdaten zur Bestimmung der Nachweisgrenze über das Verfahren der 3-fachen Standardabweichung**

<b>Probe</b>			
<b>Schweineniere</b>	<b>Messwert [RLU]</b>		
Tausaft 1	467205		
Tausaft 2	361365		
Tausaft 3	382100		
Tausaft 4	319430		
Tausaft 5	323475		
Tausaft 6	415910		
Tausaft 7	340385		
Tausaft 8	295035		
Tausaft 9	329735		
Tausaft 10	347185		
Tausaft 11	302600		
Tausaft 12	334730		
Tausaft 13	275650	<b>Mittelwert (<math>B_0</math>)</b>	<b>324863</b>
Tausaft 14	315495	<b>Standardabweichung (s)</b>	<b>60105</b>
Tausaft 15	265305	<b>Varriationskoeffizient [%]</b>	<b>19</b>
Tausaft 16	223770	<b>3*s</b>	<b>180316</b>
Tausaft 17	212945	<b><math>B_0-3*s</math></b>	<b>144547</b>
Tausaft 20	337795		

In dieser Messreihe ergab sich die Nachweisgrenze nach dem Verfahren der 3-fachen Standardabweichung über den Vergleich mit der Kalibrierung zu **16 µg/kg**. Für die Methode nach Steliopoulos wurde eine Kalibrierung aus drei verschiedenen Nieren-Tausäften (Tausaft 1, 2 und 3) im Bereich von 0 bis 100 µg/kg Benzylpenicillin hergestellt (siehe Abbildung 6.33). Aus Tabelle 6.14

zeigt sich, dass die ausgewählten undotierten Nieren zufällig hohe Blank-RLU-Werte lieferten. Demzufolge ist der Vertrauensbereich hier relativ eng und das führt wiederum zu einer relativ geringen NG. Es ergibt sich für die verwendete Kalibriergerade ( $n = 3$ ) eine errechnete NG für Benzylpenicillin von **5  $\mu\text{g}/\text{kg}$** .

Die nach der 3-fachen Standardabweichung ermittelte NG liegt demzufolge um etwa das 3-fache höher als die errechnete NG mit dem Programm nach Steliopoulos.



**Abbildung 6.33: Unterschiedliche Verfahren zur Nachweisgrenzenbestimmung; Kalibrierung in Schweinenierentaft ( $n = 3$ ); orange Linie: NG nach Steliopoulos, blaue Linie: NG nach Verfahren der 3-fachen Standardabweichung; 0,1  $\mu\text{g}$  Benzylpenicillin/kg wählt die Software als Äquivalent für 0  $\mu\text{g}$  Benzylpenicillin/kg aufgrund der logarithmischen Skalierung; Kurvenverlauf über ein 4-Parameter-logistisches Modell an Kalibrierdaten angepasst <sup>205</sup>; grau dargestellte Linien entsprechen den berechneten Prognosebändern**

Zu beachten ist hierbei, dass innerhalb der Prognosebänder in Abbildung 6.33 95% der Messwerte liegen, dies entspricht  $\approx x \pm 2 \cdot s$ . Bei der Kalibriermethode wurde der  $\alpha$ -Fehler mit 0,025 verwendet. Das Signifikanzniveau liegt demzufolge

bei 95 %. Bei dem Verfahren der 3-fachen-Standardabweichung wird ein Signifikanzniveau von 99 % angenommen.

Bei Betrachtung der Streuung der 20 undotierten Nieren-Tausäfte zeigte sich eine relativ hohe Unpräzision, ausgedrückt durch den Variationskoeffizienten von 19 %. Es lag ein hoher naturbedingter Matrixeffekt vor, der in die Berechnung der NG mit dem Faktor 3 eingeht.

**Tabelle 6.14: Messwerte der Kalibrierung in Tausaft von Schweineniere; n =3; Mittelwert und Standardabweichung für jeden Kalibrierpunkt**

Benzylpenicillin [µg/kg]	RLU			Mittelwert	s	VK [%]
	Niere 1	Niere 9	Niere 11			
0,1	467205	382100	361365	403557	56088	14
5	346700	313030	339470	333067	17725	5
10	153415	264830	190955	203067	56686	28
25	125060	109195	107020	113758	9848	9
50	24660	23425	23445	23843	707	3
75	21340	25585	25605	24177	2457	10
100	9265	15755	15640	13553	3714	27

s = Standardabweichung

VK = Variationskoeffizient

Im Gegensatz dazu wurden dotierte Proben in der Regel präziser gemessen als die Blankproben.

Der Vorteil bei der Auswertung mittels des Programms nach Steliopoulos ist, dass der gesamte Kalibrierbereich für die Bestimmung der NG berücksichtigt wird. Allerdings ist es schwierig, für die Kalibrierung repräsentative Nieren zu bekommen. Die Blank-Werte der Tausäfte 1,2 und 3 liegen oberhalb von 36000 RLU, die 17 anderen Blank-Werte hingegen liegen unterhalb von 36000. Für das Verfahren nach der 3-fachen Standardabweichung werden Proben benötigt, die weitgehend

mit dem „echten“ Proben übereinstimmen, den Analyten aber nicht enthalten. Dies ist in der Praxis eine meist schwer erfüllbare Forderung.

Alle gemessenen 20 Blank-Nieren wurden als negativ bewertet, es wurden keine falsch positiven Ergebnisse ( $\geq 50 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) erhalten.

Beide Methoden liefern NG unterhalb der festgesetzten Höchstmenge von  $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ .

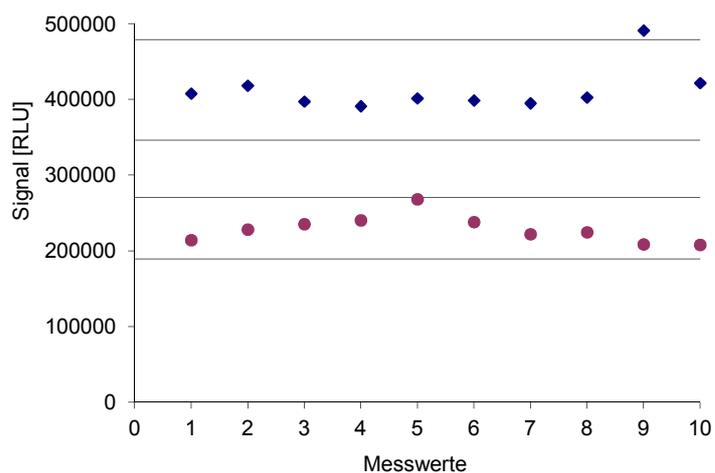
### Wiederholbarkeit

Vergleichend zum kolorimetrischen Assay (siehe unter Punkt 6.1.4) wurde die Wiederholbarkeit überprüft. Im Folgenden werden die Wiederholbarkeit im Hinblick auf verschiedene Bearbeiter und dem Einfluss der Matrix betrachtet.

### Intra-Assay-Variation

Die Intra-Assay-Variation für den CL-Assay wurde mit demselben Tausaft und am selben Tag wie für den kolorimetrischen Assay (siehe Abbildung 6.11) durchgeführt.

Der nach Abbildung 6.8 gewonnene Tausaft ( $n = 1$ ) wurde 10-mal undotiert und an der Höchstmenge dotiert gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.34 aufgeführt.



**Abbildung 6.34: Intra-Assay-Variation: wiederholte Messung der gleichen Probe wiederholte Messung der gleichen Probe;** blau: undotierter Schweinenierentausft, rot: an der Höchstmenge dotierter Schweinenierentausft; schwarze Linien: Erwartungsbereich = 95 %)

Beim Vergleich der Variationskoeffizienten von undotierten und dotierten Proben zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Der Variationskoeffizient für die undotierten Tausaft-Proben lag bei 7 %, der für die dotierten bei 8 %.

Der Vergleich der Standardabweichungen des undotierten und an der Höchstmenge dotierten Tausafts wurde analog zum kolorimetrischen Assay durchgeführt. Der resultierende PF-Wert ist 2,63. Der kritische F-Wert (hier = 3,18; Tabellenwert aus <sup>206</sup>; Signifikanzniveau von 5%) ist größer.

Dies deutet darauf hin, dass die Standardabweichungen der Messwerte von undotiertem Tausaft und an der Höchstmenge dotiertem Tausaft beim CL-Assay bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% nicht signifikant unterschiedlich sind.

Im Vergleich zum kolorimetrischen Assay wurde beim CL-Assay eine größere Streuung der Messwerte erhalten, das bedeutet, dass die Bestimmung unpräziser ist. Das kein signifikanter Unterschied zwischen den Standardabweichungen der undotierten und dotierten Tausaftprobe vorliegt, hängt vermutlich mit der größeren Streuung der Messwerte insgesamt zusammen. Der Unterschied geht vermutlich statistisch im  $\beta$ -Fehler „unter“.

Da bei dieser Untersuchung nur der Tausaft einer Niere verwendet wurde, kann keine Aussage über die Variabilität zwischen verschiedenen Nieren gemacht werden. Dies wird, analog zum kolorimetrischen Assay, im Folgenden betrachtet.

#### Untersuchung von Schweinenieren-Tausäften unter Wiederholbedingungen

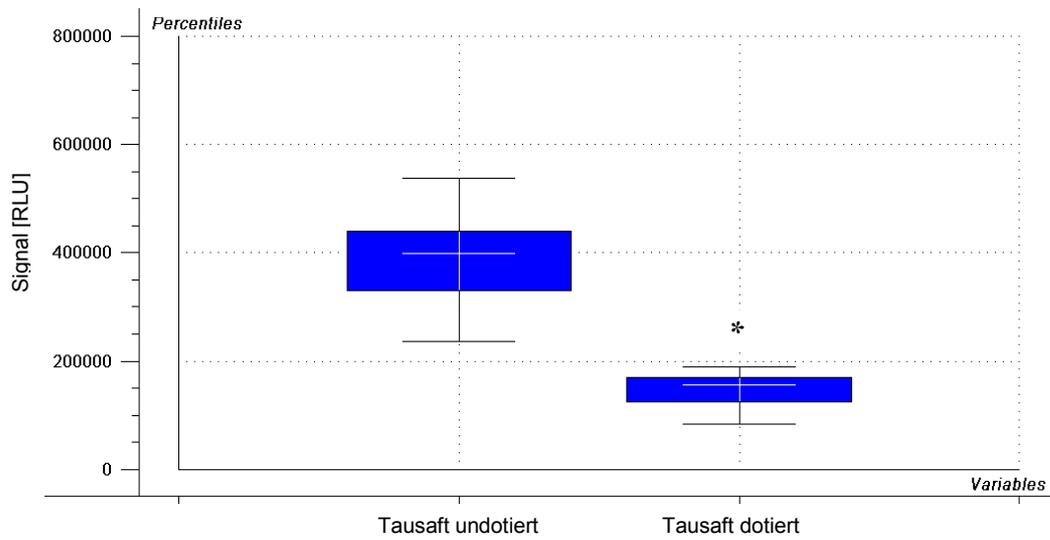
Um die Wiederholbarkeit des Testsystems für die Matrix Schweineniere zu bestimmen, wurden Tausäfte von 19 Schweinenieren undotiert und am MRL dotiert untersucht. Als Modellsubstanzen wurden Ampicillin und Benzylpenicillin verwendet. Die Untersuchung wurde vergleichend zum kolorimetrischen Assay (siehe Abbildung 6.12), mit den gleichen Nieren und am selben Tag wie die Analyse bezüglich des kolorimetrischen Assays durchgeführt.

Zur Veranschaulichung der Streuung wurden Box-Plots verwendet. Die dargestellten Boxen beinhalten 50 % der Messwerte.

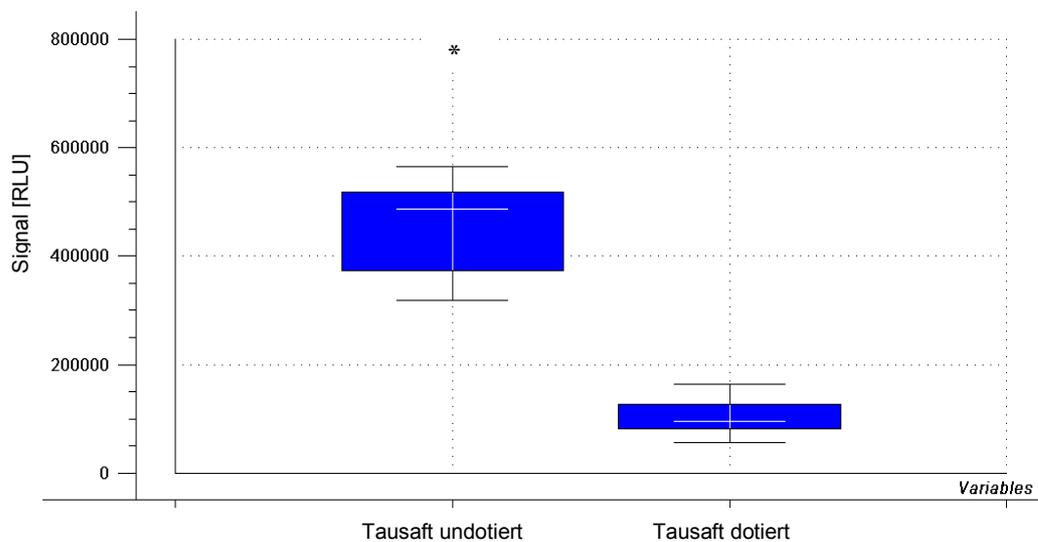
Abbildung 6.35 zeigt die Verteilung der Messwerte für undotierte und an der Höchstmenge dotierte Nierentausäfte mit Benzylpenicillin und Ampicillin. Bei den durchgeführten Wiederholmessungen mittels des CL-Assays zeigten sich häufig einzelne extreme Ausreißer; hier exemplarisch für die undotierten Tausäfte dargestellt.

Dies lässt auf eine große Störanfälligkeit des Verfahrens schließen. Die hohe Störanfälligkeit erklärt sich mit der hohen Empfindlichkeit der Lumineszenz, was in Übereinstimmung mit García-Campaña *et al.* <sup>153</sup> steht.

a)



b)



**Abbildung 6.35: Verteilung der Messergebnisse für undotierte und an der Höchstmenge dotierte Nierentausäfte mit a) Ampicillin und b) Benzylpenicillin; Box stellt 50 % der Messwerte, Maximum und Minimum dar, Box-Plots nach Eliminierung der Ausreißer (nach Grubbs<sup>204</sup>; a), b) \* = Ausreißer ; Signifikanzniveau = 5 %)**

Abbildung 6.35 zeigt anhand der Größe der Box-Plots die hohe Unpräzision der undotierten Tausäfte. Die Dotierung des Schweinenierentausafte mit Ampicillin und Benzylpenicillin führte zu einer übereinstimmenden Verteilung der Messwerte, die unabhängig von dem verwendeten  $\beta$ -Lactam ist.

Die nach Signalintensität sortierten Messsignale, einerseits für den kolorimetrischen Assay und andererseits für den CL-Assay, führten zu einer unterschiedlichen Rangfolge der Nierentausäfte (Messwerte im Anhang). Daraus ist abzuleiten, dass die Streuung der Messwerte zufälliger Natur ist.

#### Tag zu Tag-Variabilität

Zur besseren Vergleichbarkeit zwischen zwei Tagen wurden normierte Messwerte betrachtet. Die für die Wiederholmessungen verwendeten Nieren wurden zusätzlich an einem weiteren Tag gemessen. Da die entsprechenden Nieren portionsweise bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren wurden, konnte eine Lagerung der fertigen, mikrobiell anfälligen Tausäfte vermieden werden. Jeweils die gleichen Nieren wurden an einem anderen Tag neu dotiert und analysiert. Die RLU-Werte der undotierten Probe wurden gleich 100 % gesetzt und die anderen RLU-Werte hierzu in Beziehung gesetzt (rel. RLU =  $B/B_0 \cdot 100$ ).

Tabelle 6.15 zeigt zusammenfassend die relativen RLU-Werte (%) und die absoluten RLU-Werte von verschiedenen Schweinenieren-Tausäften. Anhand der rel. RLU-Werte wird deutlich, inwiefern das Signal durch die Anwesenheit der  $\beta$ -Lactame gehemmt wird. Je höher die  $\beta$ -Lactam-Konzentration, desto niedriger das relative Signal. Es wurden von Tag zu Tag stark schwankende RLU-Werte erhalten. Dies ist unter anderem dadurch zu erklären, dass eine völlig identische Einhaltung der Testbedingungen nie gegeben ist.

Die hohen Variationskoeffizienten einer Analyse eines Tages deuten auf eine Variabilität der Nierenproben hin. Da es sich um biologische Proben mit komplexer Matrix handelt, ist eine Streuung der Analysenmesswerte typisch. Die Variationskoeffizienten liegen mit 13 bis 22 % jedoch relativ hoch und deuten die Störanfälligkeit des Verfahrens an.

**Tabelle 6.15: CL-Assay- Untersuchung von Schweinenieren-Tausäften an verschiedenen Tagen.** Die Nieren wurden geviertelt und tiefgefroren (-20°C), sodass jeweils an verschiedenen Tagen die gleichen Nieren untersucht werden konnten. Pro Tag wurden jeweils 18 bzw. 19 Nieren dotiert und analysiert. Angegeben sind die relativen RLU-Werte, wobei undotierte Nierentausäfte gleich 100 % gesetzt wurden.

<b>Ampicillin [ng/ml]</b>	<b>Tag 1 (n =18)</b>	<b>Tag 2 (n = 19)</b>
undotiert	100 % 432278 ± 13 % <sup>a</sup>	100% 393109 ± 22 %
25	64 % 284309 ± 14 %	62 % 229626 ± 24 %
50	52 % 228718 ± 22 %	38 % 146051 ± 23 %

<sup>a</sup> RLU-Mittelwert ± VK

Der hohe Einfluss der Matrix ist als kritisch anzusehen.

Die Tag-zu-Tag-Variabilität wurde analog zum kolorimetrischen Assay (siehe unter Punkt 6.1.4) ermittelt. Die jeweils 18 undotierten Tausäfte wurden an zwei Tagen mittels des CL-Assays untersucht (siehe Tabelle 6.15). Mittels des t-Tests wurden die resultierenden Messwerte von Tag 1 und Tag 2 verglichen. Tabelle 6.16 zeigt die zusammengefassten Ergebnisse der Untersuchung.

**Tabelle 6.16 Tag-zu-Tag-Variabilität für undotierte Schweinenieren-Tausäfte (n =18); Mittelwerte, Standardabweichungen und Varianzen; t-Wert und kritischer t-Wert**

	absolute Messwerte	
	Tag 1	Tag 2
<b>Mittelwert</b>	432278	393891*
<b>Standardabweichung</b>	57856	88222
<b>Varianz (s<sup>2</sup>)</b>	3347304029	7783072223
<b>Freiheitsgrade (df)</b>	17	17
<b>t-Wert</b>	1,512	1,512
<b>krit. t-Wert bei zweiseitigem Test</b>	2,110	2,110

\* für den t-Test wurde eine der 19 Messungen nicht berücksichtigt; hierdurch wird ein anderer Mittelwert als in Tabelle 6.15 (Tag 2) erhalten

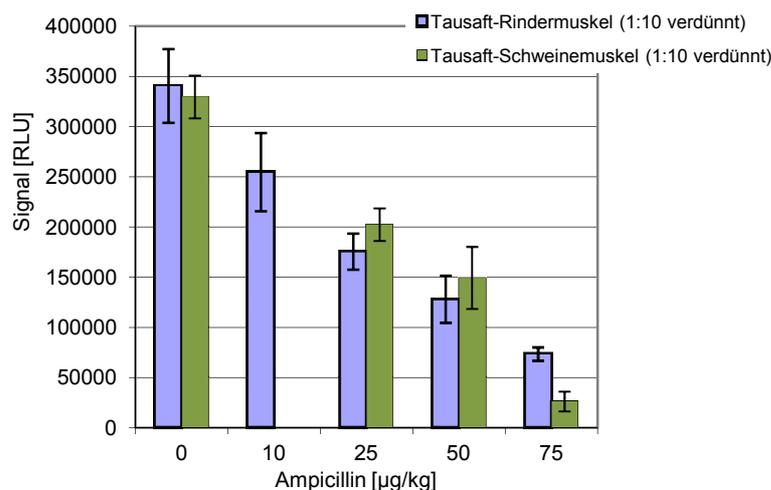
Anhand der Überprüfung ergibt sich ein t-Wert von 1,512. Dieser wird bei einem definierten Signifikanzniveau von 5% mit dem kritischen t-Wert (hier = 2,110, Tabellenwert aus <sup>206</sup>) verglichen.

Mit einer statistischen Sicherheit von 95 % sind die Mittelwerte von Tag 1 und 2 nicht signifikant unterschiedlich <sup>206</sup>.

### *Muskelfleisch*

Nach Lamar <sup>129</sup> führt eine 1:10 Verdünnung des Schweinemuskel-Tausaftes zu einer genügenden Minimierung des Matrixeffektes. Beim Tausaft von Rindermuskel wurde hingegen auch bei einer 1:10 Verdünnung ein deutlicher Matrixeinfluss festgestellt. Eine Kalibrierung in der entsprechenden Matrix ist demnach durchzuführen. Eigene Untersuchungen mittels des kolorimetrischen Assays (siehe Abschnitt 6.1.4) zeigten, dass eine 1:10 Verdünnung des Rindermuskel-Tausaftes ausreicht, um ein genügend hohes Signal zu erhalten.

Es wurden vier unterschiedliche Schweine- bzw. fünf verschiedene Rindermuskelfleisch-Proben aus dem Einzelhandel nach Punkt 9.3.5 aufgearbeitet und die entsprechenden Tausäfte im Bereich von 0-75 µg/kg (bezogen auf den Zeitpunkt der Dotierung) mit Ampicillin dotiert.



**Abbildung 6.36: Kalibrierung in Schweinemuskel-Tausaft (1:10) und in Rindermuskel-Tausaft (1:10);** Balken stellen Mittelwerte aus Tausaftproben (Schweinemuskel  $n = 4$ ; Rindermuskel  $n = 5$ ) dar

Anhand der Kalibrierungen in Abbildung 6.36 zeigt sich, dass mit einer 1:10 Verdünnung, übereinstimmend mit den kolorimetrischen Messungen, ein deutlicher Unterschied zwischen dotierten und undotierten Proben erhalten wurde. Unterschiede zwischen Rind und Schwein sind nicht erkennbar.

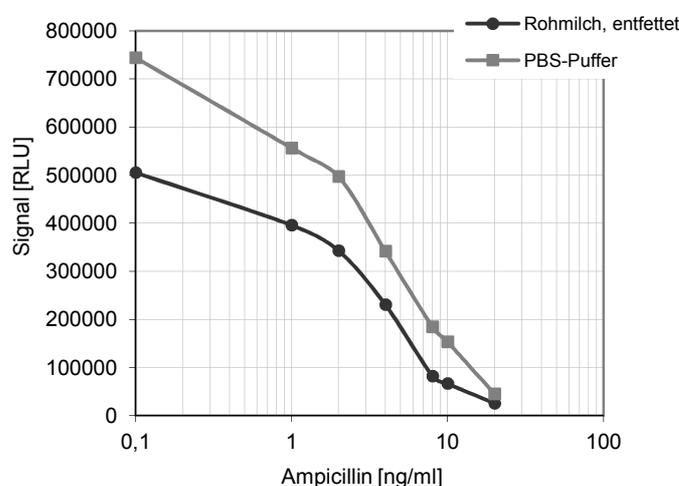
### Matrix Rohmilch

Vergleichend zu den Untersuchungen mittels des kolorimetrischen Assays wurden die dotierten, entfetteten Rohmilchproben-Ansätze (siehe Abbildung 6.15) mittels des CL-Assays analysiert. Um einen direkten Vergleich der Methoden zu erhalten, wurden die mit dem kolorimetrischen Assay analysierten Proben parallel mittels des CL-Assays am selben Tag und vom selben Bearbeiter untersucht. Statt transparenten Mikrotiterplatten (kolorimetrischer Assay) wurden weiße Mikrotiterplatten mit der gleichen Oberflächenmodifikation wie beim kolorimetrischen Assay verwendet. Die Mikrotiterplatten wurden identisch behandelt (gleiche PBP 2x\*-Beschichtungsmenge, gleiche Dig-Ampi-Verdünnung etc.).

Zur Überprüfung des Matrixeinflusses wurde Ampicillin als Modellsubstanz verwendet.

Es wurde eine Standardkalibrierung in entfetteter Rohmilch mit einer Standardkalibrierung in PBS-Puffer verglichen. Hierfür wurden die von den verschiedenen Landwirten erhaltenen Rohmilch-Proben ( $n = 5$ ) zu gleichen Teilen miteinander vermengt.

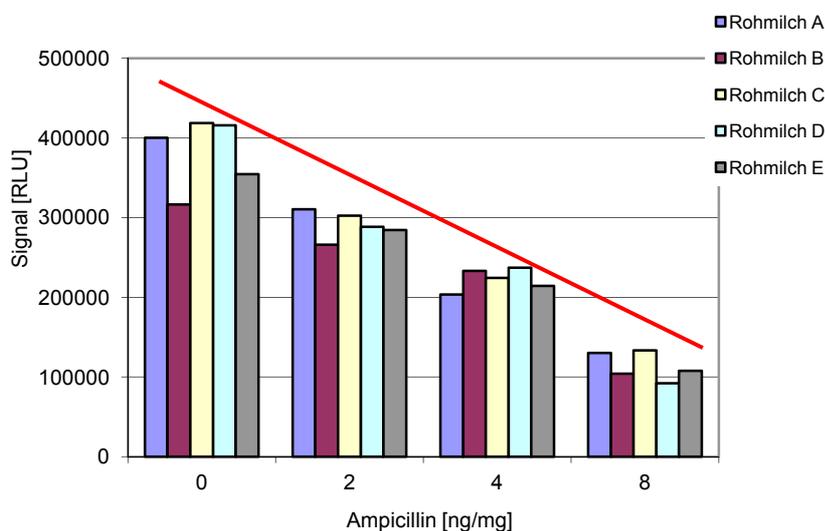
In Abbildung 6.37 ist die Kalibrierkurve von 0-20 ng/ml mit Ampicillin in entfetteter Rohmilch vergleichend zur Kalibrierkurve in PBS-Puffer dargestellt. Die niedrigeren RLU-Werte bei der entfetteten Rohmilch zeigen im Vergleich zur Kalibrierkurve in PBS-Puffer, dass die Milchmatrix (entfettet) einen Effekt auf das Testsystem besitzt. Anders als bei Lamar <sup>129</sup> reichte im Gegensatz zum kolorimetrischen Assay beim CL-Assay eine Entfettung der Rohmilch nicht aus, um Matrixeffekte komplett zu eliminieren. Weitere Bestandteile in der Milch, wie zum Beispiel Casein können das Messsystem stören. Es wurde bei der Kalibrierung in entfetteter Rohmilch ein genügend hohes CL-Signal mit einem breiten linearen Bereich erhalten. Um den Matrixeinfluss der Rohmilch (entfettet) zu berücksichtigen, ist allerdings eine Kalibrierung in dieser Matrix erforderlich.



**Abbildung 6.37: Vergleich der Kalibrierkurven mit Ampicillin in entfetteter Rohmilch (von 5 Kühen gemischt) und in PBS-Puffer;** aufgetragen sind die absoluten Messwerte gegen die Konzentration

Desweiteren wurde vergleichend zum kolorimetrischen Assay die Variabilität innerhalb fünf verschiedener Rohmilch-Proben betrachtet. Die Messung wurde mit den gleichen Milch-Ansätzen am gleichen Tag wie die Messung mittels des kolori-

metrischen Assays (siehe Abbildung 6.15) durchgeführt, um Rückschlüsse auf eventuelle Unterschiede zwischen den Testverfahren ziehen zu können. Die verschiedenen Rohmilch-Proben waren undotiert, an der halben, an der einfachen und an der doppelten Höchstmenge mit Ampicillin dotiert.



**Abbildung 6.38: Variabilität der verschiedenen Rohmilchproben (entfettet) bei unterschiedlichen Dotierungslevels mit Ampicillin;** dargestellte Messpunkte jeweils Mittelwert aus 2-fach Messung; rote Trendlinie stellt Abnahme der Signalstärke hinsichtlich steigender Ampicillin-Konzentration dar

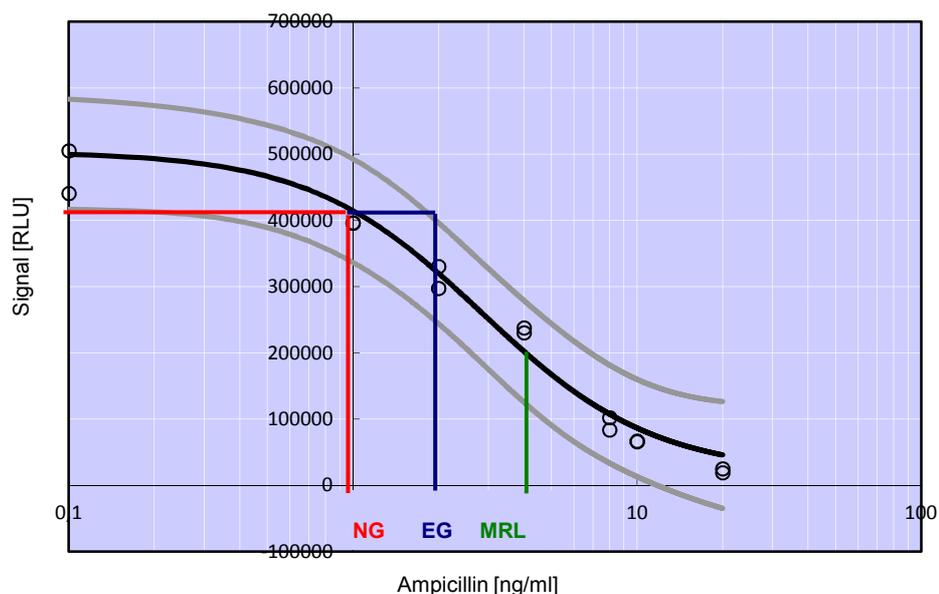
Abbildung 6.38 zeigt die Messsignale der fünf verschiedenen, entfetteten Rohmilch-Proben. Wie beim kolorimetrischen Assay (siehe Abbildung 6.15), wurde auch hier eine verhältnismäßig hohe Variabilität zwischen den einzelnen Rohmilchen erhalten. Die Variationskoeffizienten variieren je nach Dotierungslevel zwischen 6-15 %. Eine ähnliche Streuung zeigte sich auch im PBS-Puffer.

Im Vergleich zu den Ergebnissen des kolorimetrischen Assays zeigt sich für höhere Ampicillin-Konzentrationen ein deutlich stärkerer Abfall der Signalintensität (rote Trendlinie; Vergleich siehe Abbildung 6.15; Messwerte in Puffer siehe Tabelle 6.11). Dies deutet auf eine Empfindlichkeitssteigerung durch den CL-Assay hin. Allerdings streuen die Messwerte des CL-Assays stärker.

Weitere Untersuchungen bezüglich der Präzision wurden in Rohmilch nicht durchgeführt.

Bezüglich der Anwendung des CL-Assays für Rohmilch ist die **Bestimmung der Nachweis- und Erfassungsgrenze** von großer Bedeutung. Diese Leistungsparameter wurden analog den Untersuchungen mittels des kolorimetrischen Assays (siehe Abbildung 6.16) mittels des VBA-Programms (engl. Visual-Basic for Applications) von Steliopoulos<sup>205</sup> ausgewertet.

Die Entfettung und Dotierung wurde wie unter Punkt 9.3.4 durchgeführt. Es wurden zwei Kalibrierkurven in entfetteter Rohmilch (Mischung aus A-E; jeweils 2-mal dotiert) verwendet. Die Untersuchung wurde am selben Tag und vom selben Bearbeiter durchgeführt.



**Abbildung 6.39:** Kalibrierkurve mit Ampicillin zur Bestimmung der Nachweis- und Erfassungsgrenze in Rohmilch (Mischung aus gleichen Teilen Rohmilch A bis E) (NG = 1 ng/ml; EG = 2 ng/ml; Höchstmenge (MRL) = 4 ng/ml); 0,01 µg Ampicillin/kg wählt die Software als Äquivalent für 0 µg Ampicillin/kg aufgrund der logarithmischen Skalierung; Kurvenverlauf über ein 4-Parameter-logistisches Modell an Kalibrierdaten angepasst<sup>205</sup>; grau dargestellte Linien entsprechen den berechneten Prognosebändern;  $\alpha = 0,05$

Abbildung 6.39 stellt die Kalibrierkurve in Rohmilch mit der berechneten Nachweis- und Erfassungsgrenze im Vergleich zur gesetzlich festgesetzten Höchstmenge dar. Die Nachweisgrenze liegt mit 1 ng/ml deutlich unter der Höchstmenge für Rohmilch von 4 ng/ml.

### Matrixeinflussgrößen

Signifikante Einflussgrößen bezüglich der verwendeten Matrix wurden mittels eines Screening-Design mit den drei Parametern Tierart (Rind, Schwein), Gewebe (Niere, Muskel) und Individuum (Tier 1 und Tier 2) ermittelt. Analog zur Untersuchung des kolorimetrischen Assays (siehe Abschnitt 6.1.4) wurde ein Full Factorial Design durchgeführt. Hierbei wurden die kolorimetrischen Assay- und CL-Assay-Untersuchungen am selben Tag mit denselben Nierentausäften vorgenommen, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse sicherstellen zu können. Als Responsegröße werden die resultierenden RLU-Werte verwendet.

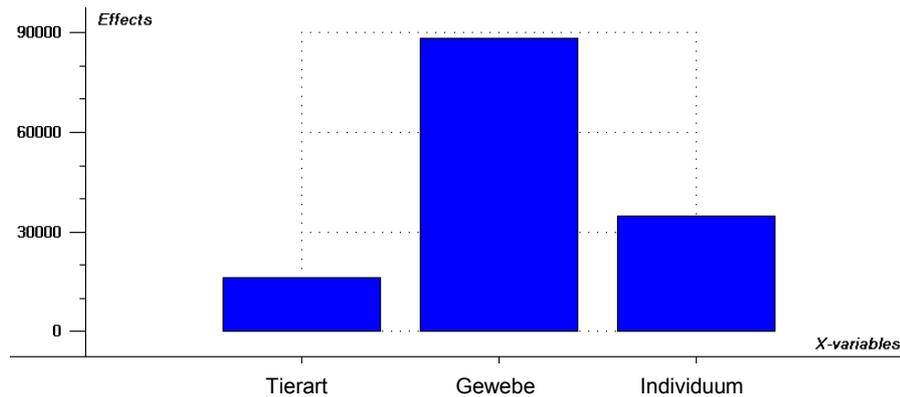
Tabelle 6.17 zeigt die berechneten Effekte und die dazugehörigen p-Werte für die einzelnen Parameter.

**Tabelle 6.17: ermittelte Effekte, p-Werte und Signifikanzen <sup>[1]</sup>**

Parameter	Effekt	p-Wert	Signifikanz
Tierart	16250	0,4183	nicht signifikant
Gewebe	88410	0,0002	hoch signifikant
Individuum	34840	0,0918	nicht signifikant

<sup>[1]</sup> Erläuterungen hierzu siehe Seite 91

Die Haupteffekte der Einflussgrößen sind als Balkendiagramm in Abbildung 6.40 verdeutlicht (Vergleich zum kolorimetrischen Assay siehe Abbildung 6.17).



**Abbildung 6.40: Balkengraphik der Haupteffekte;** die Balkenhöhe repräsentiert die Einflussstärke des jeweiligen Parameters auf die CL-Messung

Die Höhe der Balken stellt die Stärke des jeweiligen Parametereffekts auf das Testverfahren dar. Die gewählten Gewebearten (Muskel, Niere) zeigen bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % einen signifikanten Einfluss. Diese Beobachtung ist mit den deutlich unterschiedlichen Matrixbestandteilen im Gewebe und Muskel erklärbar.

Bezüglich Rind-Schwein zeigte der Parameter Tierart, gegenüberstellend zu den Untersuchungen mit dem kolorimetrischen Assay, kein signifikanten Effekt auf das Testverfahren. Der Parameter Tierart ist kleiner als der Parameter Individuum. Dies ist beim kolorimetrischen Assay anders. Diese Beobachtung lässt sich dahingehend erklären, dass aufgrund der stärkeren Streuung der Messwerte (im Vergleich zum kolorimetrischen Assay) ein Parameter statistisch in dem  $\beta$ -Fehler „untergeht“.

Um die oben genannten Matrixeinflüsse bezüglich der Gewebeart zu berücksichtigen, ist wie beim kolorimetrischen Assay eine Kalibrierung in der entsprechenden Matrix (Muskel, Niere) notwendig.

### Robustheitsprüfung: Einfluss von geübtem bzw. ungeübtem Bearbeiter

Die zur Bestimmung der Nachweisgrenze untersuchten 20 Schweinenieren-Tausäfte (siehe Tabelle 6.13) wurden zusätzlich von einem weiteren Bearbeiter am selben Tag analysiert. Bearbeiter 1 und 2 verwendeten somit identische Tausäfte. Es sollte geprüft werden, ob eine Variabilität der Messergebnisse im Bezug auf den Bearbeiter besteht.

**Tabelle 6.18: Vergleich der Messergebnisse im Bezug auf den Bearbeiter;** erhaltene Mittelwerte, Standardabweichungen, Varianzen und t-Wert für undotierte Schweinenieren-Tausäfte (n =20)

	Bearbeiter 1	Bearbeiter 2
<b>Mittelwert</b>	400029	324863
<b>Standardabweichungen</b>	91112	60105
<b>Freiheitsgrade (df)</b>	19	
<b>Varianz (<math>s^2</math>)</b>	3612670491	8301353585
<b>t-Wert</b>	3,134	
<b>krit. t-Wert bei zweiseitigem Test</b>	2,093	
<b>Unterschied</b>	signifikant	

Anhand der Ergebnisse aus Tabelle 6.18 ist ersichtlich, dass unterschiedliche Mittelwerte aus 20 Nieren-Tausäften von Bearbeiter 1 und Bearbeiter 2 erhalten wurden.

Der resultierende t-Wert wird bei einem definierten Signifikanzniveau von 5% mit dem kritischen t-Wert (hier = 2,093; Tabellenwert aus <sup>206</sup>) verglichen. Die Ergebnisse von Bearbeiter 1 und 2 sind signifikant unterschiedlich <sup>206</sup>, somit ist ein Bearbeeinfluss auf das Testverfahren gegeben.

Bei Bearbeiter 1 (ungeübt) und 2 (geübt) handelte es sich um Personen unterschiedlichen Trainingstandes. Der Einfluss geübter - ungeübter Bearbeiter ist somit ein Grund für den signifikanten Unterschied der beiden Messreihen.

### Fazit zur Untersuchung mittels des CL-Assays

Bei der Methodenentwicklung wurden verschiedene Arbeitsparameter, wie die Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragment-Verdünnung, die PBP 2x\*-Beschichtungsmenge, das Volumen des CL-Substratreagenzes und der Messzeitraum in Hinblick auf Signalintensität und Empfindlichkeit ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Abhängigkeit des CL-Signals von der  $\beta$ -Lactam-Konzentration gegeben ist und die Chemilumineszenz als Detektionsart für diese Anwendung prinzipiell eingesetzt werden kann.

Der lineare Arbeitsbereich liegt bei einer absoluten  $\beta$ -Lactam-Konzentration von 1-10 ng/ml. Ein Matrixeffekt wurde bei allen hier untersuchten Matrices erhalten.

Gustavsson <sup>208</sup> und Cacciatore <sup>16</sup> beschrieben in ihren Arbeiten, dass Matrixinterferenzen bei Rohmilch unter anderem durch Molkeproteine verursacht werden. Sie konnten zeigen, dass durch eine Hitzebehandlung der Milch (72°C, 5 min bzw. 95°C, 3 min), die eine Denaturierung der Molkeproteine zur Folge hat, unspezifische Bindungen in der SPR-Analyse um 70 % reduziert wurden. Auch beim CL-Assay zeigte sich, dass die Entfettung der Rohmilch nicht ausreicht, um Matrixeffekte komplett zu reduzieren. Weitere Bestandteile, unter anderem Proteine in der Matrix könnten die Analyse stören. Es ist anzunehmen, dass auch bei den Nieren- und Muskel-Tausäften die enthaltenen Proteine einen wesentlichen Beitrag zu Matrixeffekten liefern. Eine Erhitzung der Proben wurde nicht durchgeführt.

Bedingt durch den deutlichen Matrixeffekt, ist eine Kalibrierung in der Matrix erforderlich.

Für Niere und Muskel ist zum Nachweis von Ampicillin und Benzylpenicillin eine 1:10 Verdünnung des Tausaftes in PBS-Puffer ausreichend, um ein genügend hohes Signal zu erhalten.

Die in Nieren-Tausaft durchgeführten Untersuchungen zeigten eine verhältnismäßig große Streuung der Messwerte. Insbesondere bei der Messung der Blankproben wurde eine hohe Unpräzision erhalten. Bei den Analysen unter wiederholten Bedingungen wurden häufig Ausreißer beobachtet. Dies deutet auf eine Störanfälligkeit des Verfahrens hin.

Die ermittelten NG und EG der untersuchten  $\beta$ -Lactame in Nierentausaft und Rohmilch lagen alle unterhalb der gesetzlich festgelegten Höchstmenge.

Zusammenfassend ist abzuleiten, dass einhergehend mit der hohen Empfindlichkeit der Chemilumineszenz auch die Störanfälligkeit des Systems zunimmt.

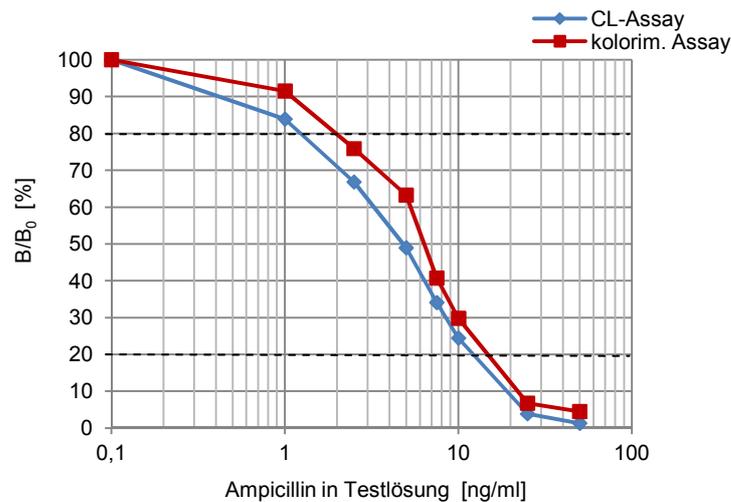
### 6.3 Vergleich von kolorimetrischem – und Chemilumineszenz-Assay

Beim Vergleich von kolorimetrischem- und CL-Assay spielen verschiedene Gesichtspunkte eine Rolle. Wesentlich sind hier die analytischen Leistungsparameter der Verfahren, die Einsatzmöglichkeit und der wirtschaftliche Aspekt zu nennen. In Tabelle 6.19 sind verschiedene Parameter der beiden Testverfahren gegenübergestellt. Die Präzision ist beim kolorimetrischen Verfahren höher als beim CL-Verfahren. Dies war besonders deutlich bei den Untersuchungen zur Wiederholbarkeit bei undotierten Nieren-Tausäften erkennbar (siehe Abbildung 6.13 und Abbildung 6.35).

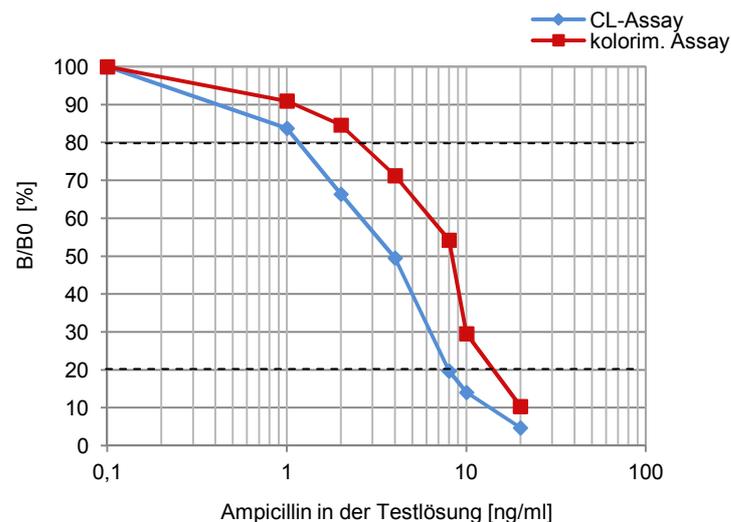
**Tabelle 6.19: Gegenüberstellung von CL- und kolorimetrischem Assay**

Parameter	CL-Assay	Kolorimetrischer Assay
Linearer Arbeitsbereich	1 – 10 ng/ml	2 – 15 ng/ml
NG, EG	um Faktor 2 niedriger	---
Wiederholpräzision undotierte Proben VK (%)	13-22	8-11
Kalibrierung in Matrix erforderlich	ja	ja
Intra-Assay-Variation dotierte Proben VK (%)	8	2
Präzision	niedrig	hoch
Matrix-Einflussgröße:		
Individuum	nicht vorhanden	nicht vorhanden
Tierart	nicht vorhanden	vorhanden
Gewebe	vorhanden	vorhanden
Gerätekosten	ca. 4-fach höher	---
Reagenzienkosten/100 Analysen	ca. 20 Euro	ca. 5 Euro
Analysenzeit	4 Stunden	2,5 Stunden
Messzeit	90 min	2 min

A)



B)



**Abbildung 6.41: Kalibrierkurven für die Untersuchung von Ampicillin in A) Schweinenierensaft und B) Rohmilch mittels des CL- und Kolorimetrischer Assays;** dargestellt sind jeweils die Mittelwerte (Schweinenieren n = 3; Rohmilch n = 2); Messwerte aus NG-Bestimmungen siehe Abbildung 6.10, Abbildung 6.16, Abbildung 6.32, Abbildung 6.39)

In Abbildung 6.41 sind die mittels des kolorimetrischen und CL-Assays erhaltenen Kalibrierkurven in Schweinenieren-Tausaft oben) und in Rohmilch unten) vergleichend dargestellt. Das relative Signal, berechnet mit  $B/B_0 \cdot 100$ , ist gegen die Konzentration in der Messlösung aufgetragen.  $B_0$  entspricht der maximalen Response

und B der durch  $\beta$ -Lactam-Antibiotika gehemmten Extinktion bzw. RLU. Der Bereich, in dem das maximale Signal zu 20 - 80 % gehemmt ist, wird als linearer Arbeitsbereich definiert <sup>209,210</sup> (gestrichelte Linien). Der Arbeitsbereich für den CL-Assay ist mit 1-10 ng/ml vergleichbar mit dem kolorimetrischen Assay mit 2-15 ng/ml.

In der Literatur ist eine Vielzahl von CL-Assays beschrieben, die die HRP-katalysierte Luminoloxidation für die Untersuchung unterschiedlicher Rückstände verwenden. Die entwickelten kompetitiven CL-ELISA-Systeme von Magliulo *et al.* <sup>177</sup> und Ding *et al.* <sup>209</sup> zeigten gegenüber den entsprechenden kolorimetrischen Enzymimmunoassays eine 10-fache Empfindlichkeitssteigerung. Zudem wiesen die CL-Assays jeweils einen größeren linearen Bereich auf. Auch Zhang *et al.* <sup>210</sup> beschrieben einen CL-ELISA zur Untersuchung von Chloramphenicol in Hühnerfleisch mit einer 10-fachen Empfindlichkeitssteigerung gegenüber dem entsprechenden kolorimetrischen ELISA. Diesen Testverfahren lagen Antigen-Antikörper-Reaktionen zugrunde.

Die in der Literatur beschriebene Empfindlichkeitssteigerung konnte bei dem hier entwickelten CL-Test gegenüber dem konventionellen kolorimetrischen Test nicht beobachtet werden. Zwar besitzt der vorgestellte CL-Assay eine niedrigere Nachweisgrenze, jedoch lediglich um den Faktor 2. Die  $IC_{50}$ -Werte liegen zum Beispiel bei den Kalibrierkurven in Rohmilch beim CL-Assay ( $IC_{50} = 4$  ng/ml) nur geringfügig niedriger als beim kolorimetrischem Assay ( $IC_{50} = 8$  ng/ml) (siehe Abbildung 6.41 B).

Die Empfindlichkeit wird unter anderem durch die Affinität des Rezeptors zum entsprechenden  $\beta$ -Lactam und unspezifischen Matrixwechselwirkungen beeinflusst. Die Affinität des Rezeptors zum Analyten beeinflusst die Detektionsart nicht, wohingegen Matrixeffekte einen erheblichen Effekt auf das resultierende Signal besitzen können.

Da es sich bei den Testverfahren um kompetitive Systeme handelt, ist für die Nachweisgrenze insbesondere die Unterscheidung von maximalem Signal (ohne Analyt) zu reduziertem Signal (mit Analyt) wesentlich. Bei einem direkten Assayformat hingegen spielt das Signal/Rausch-Verhältnis zur Bestimmung der

NG die entscheidende Rolle. Hier ist das Hindergrundrauschen (ohne Analyt) im Vergleich zum kleinsten Signal, das durch die Anwesenheit des Analyten detektiert werden kann, wesentlich. Die Tatsache, dass durch die Chemilumineszenz nur eine verhältnismäßig geringe Empfindlichkeitssteigerung erhalten wurde, hängt vermutlich damit zusammen, dass das Signal/Rausch-Verhältnis keine Rolle spielt. Die Beobachtungen aus den Matrixuntersuchungen lassen sich dahingehend interpretieren, dass der Haupteffekt auf die Empfindlichkeit durch Wechselwirkungen mit vorhandenen Matrixbestandteilen zustande kommt. Hierbei sind zum einen die Wechselwirkung der Matrixbestandteile mit Rezeptorproteinen, zum anderen die Wechselwirkungen mit den verwendeten Reagenzien (zum Beispiel mit Dig-Ampi, Luminol, Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragmente) zu berücksichtigen. Matrixbestandteile (zum Beispiel Fett, Proteine etc.) können eventuell unspezifisch an PBP 2x\* binden, dadurch die „Bindungstasche“ des Rezeptors sterisch hindern und somit eine nachfolgende Bindung mit  $\beta$ -Lactam-Antibiotika bzw. Dig-Ampi verhindern. Durch Verdünnen bzw. Entfetten der Probelösung können Matrixeffekte reduziert werden. Eine Möglichkeit störende Proteine zu entfernen wäre eventuell der Einsatz der Ultrafiltration. Dies würde allerdings einen weiteren Aufarbeitungsschritt bedeuten.

Beide Verfahren wiesen eine NG für das Ampicillin, Benzylpenicillin, Cefquinom und Ceftiofur (gemessen als Desfuoylceftiofur) deutlich unterhalb der festgesetzten Höchstmengen für die Matrix Rohmilch und Schweineniere auf. Demzufolge sind beide Verfahren prinzipiell für die Messung der hier untersuchten  $\beta$ -Lactame geeignet. Das CL-Verfahren zeichnet sich im Vergleich zum kolorimetrischen Assay durch niedrigere NG in allen hier untersuchten Matrices aus. Die Empfindlichkeitssteigerung lag bei ca. Faktor 2.

Muskel und Niere unterschieden sich in beiden Testverfahren signifikant. Eine Kalibrierung in der jeweiligen Matrix ist für beide Assays erforderlich. Bedingt durch die hohe Unpräzision beim CL-Assay, stellte die Tierart Schwein – Rind im Gegensatz zum kolorimetrischen Assay keinen diskriminierenden Effekt dar.

In Hinblick auf die wirtschaftlichen Aspekte besitzt der kolorimetrische Assay deutliche Vorteile gegenüber dem CL-Testverfahren. Insbesondere die beim

CL-Assay 4-fach höheren Reagenzienkosten pro Analyse und die längere Analysenmesszeit bedeuten in der Routineanalytik einen erheblich größeren Aufwand. Die längere Messzeit beim CL-Assay hängt mit dem Profil des CL-Signals zusammen. Um Variabilitäten bezüglich des Messzeitpunktes auszuschließen, wurde jede Kavität nach exakt 90 Sekunden gemessen. Demzufolge war nur alle 180 s eine Messung möglich, was eine Gesamtmesszeit von 90 min zur Folge hatte.

Konventionelle kolorimetrische Mikrotiterplatten-Reader sind in der Regel um das 4 bis 5-fache günstiger als entsprechende Lumineszenz-Messgeräte.

## 6.4 Chemilumineszenz-Assay unter Verwendung des Charm II-Szintillationszählers

In der Praxis der amtlichen und nicht-amtlichen Lebensmittelüberwachung sind nicht nur größere Probenserien zu untersuchen, sondern häufig auch nur eine geringe Probenzahl oder sogar nur Einzelproben. Die Entwicklung eines CL-Assays unter Verwendung des Charm II-Systems sollte es ermöglichen, insbesondere Einzelproben kostengünstig zu analysieren. Anders als beim Mikrotiterplatten-Format (96-Kavitäten) entsteht beim Charm-Test (Röhrchen-Format) kein finanzieller Nachteil aufgrund ungenutzter Kapazitäten. Beim Charm II-System handelt es sich um einen Flüssigszintillationszähler, der die Messung von Lumineszenz ermöglicht. Das entstehende Licht wird über einen Photomultiplier (Messanordnung hier unterhalb des Röhrchens) in ein elektrisches Signal umgewandelt <sup>151</sup>. Die Analysenröhrchen werden nacheinander in die Messkammer gestellt und nach einer definierten Zeitspanne gemessen. Ein Charm-II-System steht vielen amtlichen rückstandsanalytischen Laboratorien für Screeninguntersuchungen zur Verfügung.

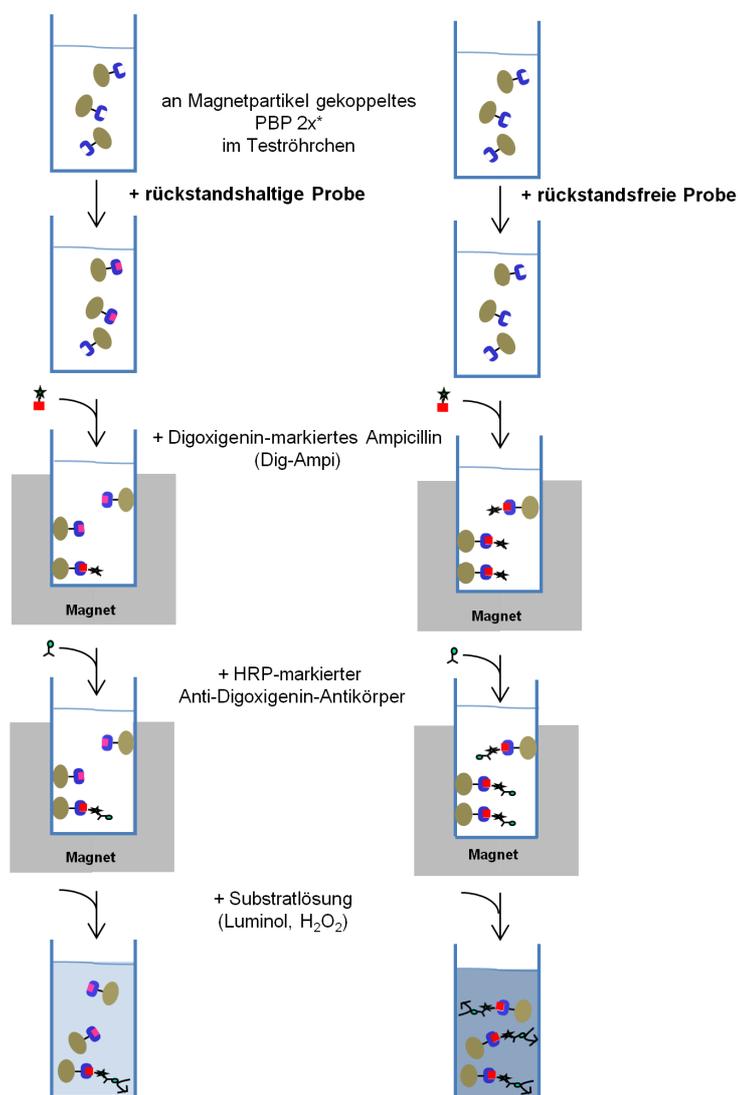
Im Folgenden werden das Testprinzip des CL-Assay, das konzeptionelle Vorgehen der Methodenentwicklung und die entsprechend durchgeführten Vorversuche erläutert.

### 6.4.1 Testprinzip

Die konzeptionelle Idee basiert, wie beim Mikrotiterplatten-CL-Assay, auf einem indirekten kompetitiven Assay mit PBP 2x\* als spezifischer Bindungskomponente. Anders als beim Mikrotiterplatten-Format werden hier als Träger Dynabeads® M-270 Epoxy Magnetpartikel verwendet. Das PBP 2x\* lässt sich direkt über primäre Amino- oder Sulfhydrylgruppen an die Epoxy-Oberflächen-modifizierten Partikel koppeln.

Die magnetischen Partikel ermöglichen zur Entfernung von überschüssigem markierten Ampicillin bzw. von nicht gebundenem Anti-Digoxigenin-F<sub>ab</sub>-Fragment ei-

ne einfache und schnelle Trennung. Die Trennung erfolgt mit Hilfe eines speziellen Permanent-Magneten, der als externe Magnetquelle die beschichteten, superparamagnetischen Partikel an der Wandung des Teströhrchens fixiert. Anschließend kann die überschüssige Lösung mittels Überkopfdrehen des im Magneten stehenden Teströhrchens entfernt werden. Zu den gewaschenen Magnetpartikeln wird im Anschluss die Luminol und Wasserstoffperoxid enthaltende SuperSignal-Lösung gegeben und die entstehende Chemilumineszenz im Charm-Szintillationszähler gemessen.



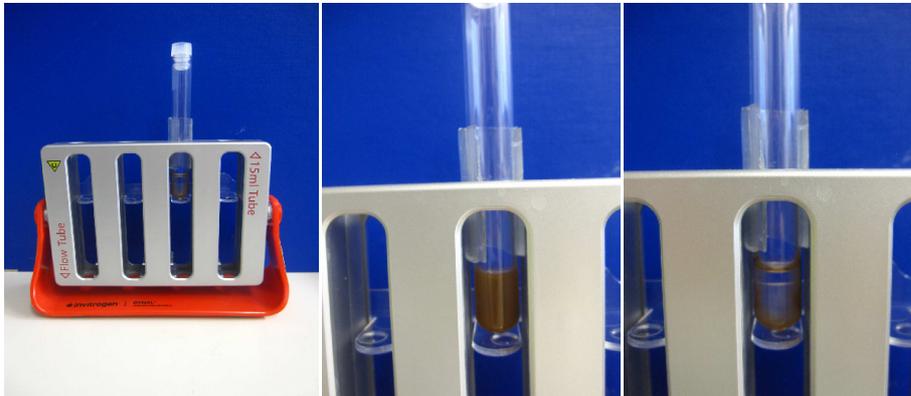
**Abbildung 6.42: Testprinzip des CL-Assays mittels Magnetpartikel und Charm II-System;** dargestellt sind die einzelnen Schritte im Teströhrchen; links: Testablauf mit rückstandshaltiger Probe; rechts Testablauf mit rückstandsfreier Probe

In Abbildung 6.42 ist schematisch das Testprinzip des CL-Assays unter Verwendung von Magnetpartikeln und des Charm II-Systems dargestellt.

A)

B)

C)



**Abbildung 6.43: Waschschriffe des Testsystem mittels Magnetpartikel;** A) Teströhrchen im Permanent-Magneten; B) Standzeit des Röhrchens im Magnet = 0 min; C) Standzeit des Röhrchens im Magnet = 1 min

Abbildung 6.43 zeigt die magnetische Trennung während eines Waschschriffes. Dargestellt ist ein im Permanent-Magneten stehendes Teströhrchen mit einer Magnetpartikel-Suspension. Die Bilder zeigen unterschiedliche Zeitpunkte der magnetischen Trennung.

Die Fixierung der Magnetpartikel an die Gefäßwand erfolgt hierbei innerhalb von 2 min.

### 6.4.2 Weitere Untersuchungen im Rahmen der Methodenentwicklung

Die Assay-Entwicklung erfolgte anhand verschiedener orientierender Versuche. Die konzeptionelle Vorgehensweise ist schematisch in Abbildung 6.44 dargestellt.

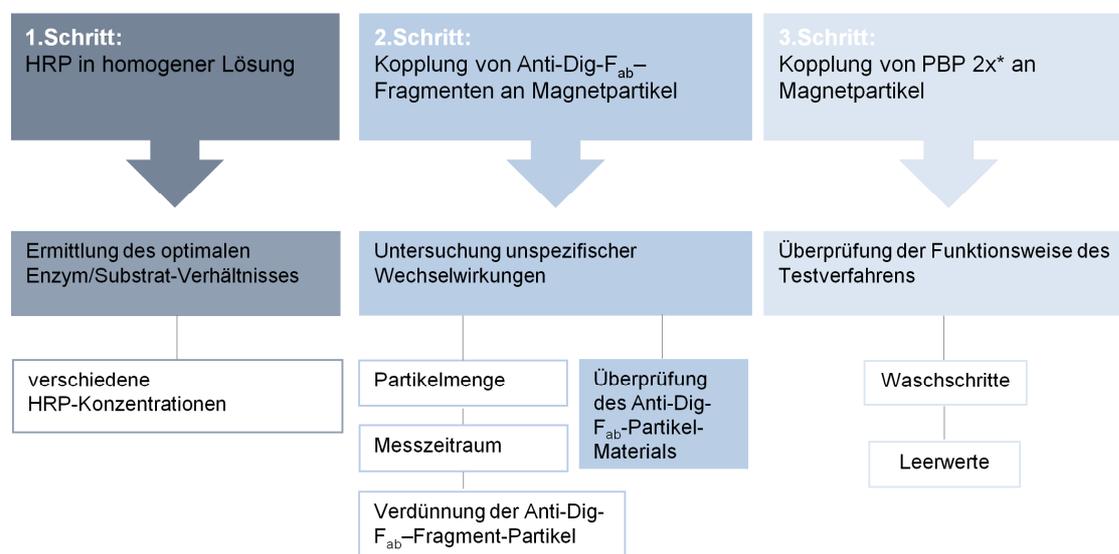


Abbildung 6.44: Konzeptionelle Vorgehensweise bei der Überprüfung des Chemilumineszenz/Charm II-Testformats

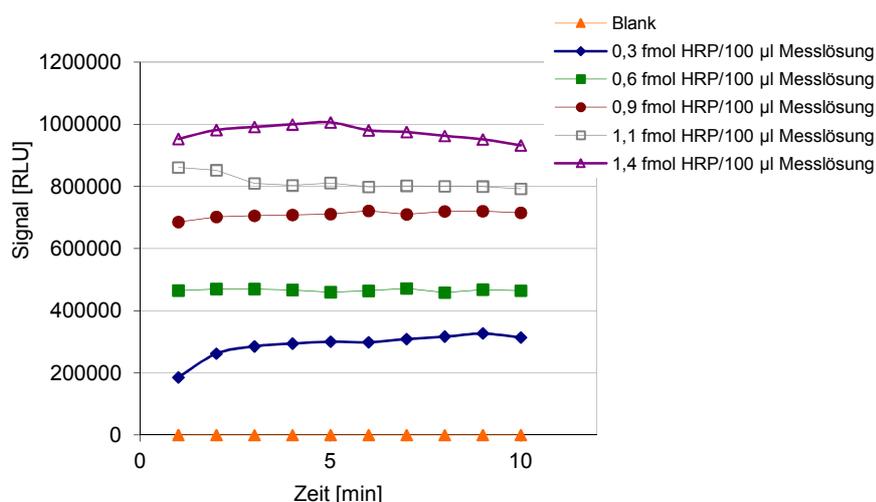
#### 1.Schritt: HRP katalysierte Luminoloxidation in homogener Lösung

Da die Selektivität und Linearität des CL-Signals von dem gewählten System und den exakten Reaktionsbedingungen abhängt, sollten diese im Vorfeld der Methodenentwicklung für die HRP in homogener Lösung überprüft werden. Die Bildung der Luminolhydroperoxide ist vom Verhältnis der Luminolkonzentration, der Enzym- und Wasserstoffperoxid-Konzentration abhängig<sup>149</sup>. Es wurde das Konzentrationsverhältnis der fertigen Luminol/Wasserstoffperoxid-Lösung zu der HRP-Menge untersucht.

Laut Garcia-Campana *et al.*<sup>153</sup> liegt das Detektionslimit für die Luminoloxidation in wässriger Lösung bei 0,1 fmol. Ausgehend hiervon wurden Versuche mit einer HRP-Absolutmenge im Bereich von 0,3-1,4 fmol durchgeführt. Aus einer wässrigen HRP-Lösung (10 ng/ml) wurden durch Verdünnen mit tridestilliertem Wasser entsprechende Verdünnungen (6-1 ng/ml) für die Untersuchung hergestellt (siehe

9.4.1) und jeweils 10  $\mu\text{l}$  für den Test eingesetzt. Für den Assay wurde mit einem Endvolumen von 100  $\mu\text{l}$  gearbeitet.

In Abbildung 6.45 sind die zeitlichen Verläufe des CL-Signals für unterschiedliche HRP-Konzentrationen/100  $\mu\text{l}$  Messlösung über einen Messzeitraum von 10 min dargestellt. Als Vergleich wurde eine Blanklösung verwendet, die kein HRP enthielt. Der Zeitverlauf des CL-Signals bis zur ersten Minute konnte nicht detektiert werden, da die Reagenzien nicht automatisch im Gerät, sondern außerhalb des Gerätes manuell zugegeben wurden. In diesem Punkt unterscheiden sich die Untersuchungen mittels Mikrotiterplatten-Reader (siehe Abbildung 6.20) und Charm-Analysengerät. Aufgrund der unterschiedlichen Gerätesysteme, der unterschiedlichen Messzeiträume und den unterschiedlich zugegebenen Mengen an SuperSignal-Lösung (150  $\mu\text{l}$  und 90  $\mu\text{l}$ ) ist ein direkter Vergleich der beiden Untersuchungen nicht möglich.



**Abbildung 6.45: Zeitlicher Verlauf des CL-Signals für unterschiedliche HRP-Konzentrationen in homogener Lösung**

Innerhalb des getesteten Bereichs (0,3-1,4 fmol HRP/100  $\mu\text{l}$ ) wurde eine Abhängigkeit zwischen der HRP-Menge und der Signalintensität erhalten, geringere Enzymmengen ergaben eine geringere CL-Intensität. Die Messsignale ähnelten dem Profil eines Glow-Typs (siehe Abschnitt 4.4.2), der für die HRP-katalysierte Reaktion typisch ist.

## 2. Schritt: Untersuchungen mit gekoppelter Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragment-Magnetpartikeln

Um PBP 2x\* zu sparen, wurden erste Kopplungsversuche mit den HRP-markierten Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragmenten durchgeführt. Die Kopplung der Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragmente an die magnetischen Partikel, die eingesetzte Partikelmenge und die Beschichtungsmenge der Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragmente folgten den Vorgaben des Hersteller (Invitrogen GmbH, Darmstadt) nach 9.4.2.

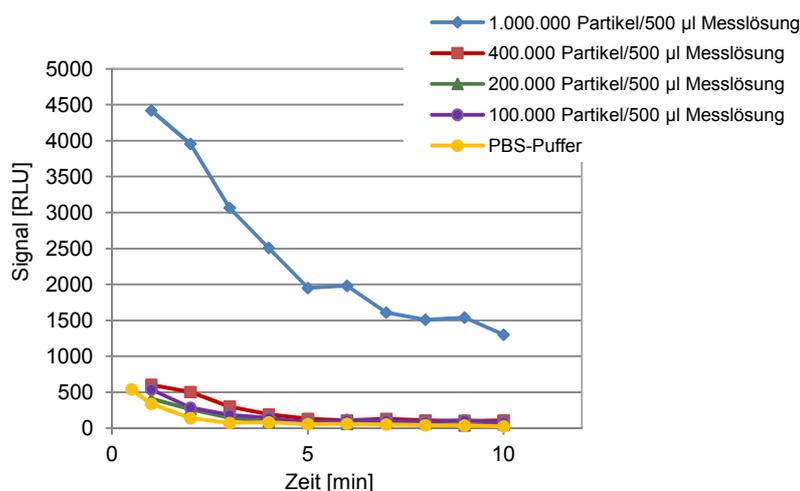
In den nachfolgenden Untersuchungen wurde eine festgelegte Anzahl beschichteter Magnetpartikel direkt mit der Luminol/Wasserstoffperoxid-Lösung (450 µl) versetzt. Das gesamte Messvolumen betrug 500 µl. Nach Zugabe der Luminol/Wasserstoffperoxid-Lösung zu der Partikel-Suspension erfolgte eine gute Durchmischung, um eine schnelle Reaktionskinetik zu gewährleisten. Die Chemilumineszenz wurde über einen definierten Zeitraum gemessen.

### *Optimale Partikelmenge*

Um eine bessere Vergleichbarkeit in Hinblick auf eventuelle Licht- und Streueffekte durch die Magnetpartikel zu erhalten, wurde jeweils die gleiche Partikelmenge pro Assay verwendet.

Orientierende Untersuchungen wurden mit Partikeln durchgeführt, an die Casein gekoppelt war. Es wurden verschiedene Verdünnungen der Casein-gekoppelten Magnetpartikel in PBS-Puffer hergestellt, mit SuperSignal-Reagenz vermischt und die Chemilumineszenz über einen Zeitraum von 10 min gemessen. Eine Zugabe von HRP erfolgte bei diesen Untersuchungen nicht. Da keine HRP-Zugabe erfolgte, sollte das erhaltene Messsignal gering sein.

Aus Abbildung 6.46 ist ersichtlich, dass bei  $\leq 4 \cdot 10^5$  Partikeln pro Test kein signifikanter Unterschied zum Messwert in PBS-Puffer erhalten wurde. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Tian-Bing *et al.* <sup>211</sup> wurden für höhere Partikelmengen von  $\geq 10^6$  Partikeln (Messwerte siehe Anhang) extrem hohe Messwerte erhalten. Für die weiteren Untersuchungen wurden  $10^5$  Partikel pro Ansatz verwendet.



**Abbildung 6.46: Vergleich Blankwerte: PBS-Puffer und Casein-Partikel**

Bei allen Ansätzen wurde innerhalb der ersten Minuten jeweils eine geringe Signalintensität erhalten, die anschließend schnell abfiel. Da keine HRP zugegeben wurde, sollte keine Chemilumineszenz entstehen.

In der Literatur wird beschrieben, dass bei der Luminoloxidation auch nicht enzymatische Schritte, wie Ein-Elektronen-Übergänge, die weiter zu verschiedenen ionischen Luminolradikalen führen, eine geringe Rolle spielen können. <sup>159,160</sup> Demzufolge lassen sich die Beobachtungen dahingehend interpretieren, dass das resultierende Signal eventuell durch lichtinduzierte Radikalbildung entstanden ist, da das Mischen der Reagenzien außerhalb des Messraums stattgefunden hat.

Die erhaltenen Zählraten (RLU) des CL-Signals für  $\cdot 10^5$  Partikel lagen in den ersten Minuten in einem niedrigen Bereich. Diese Menge wurde als Partikelmenge für die folgenden Versuche eingesetzt.

Um den Einfluss unterschiedlicher Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragment-Verdünnungen zu betrachten, wurde auf diese konstant zu haltende Partikelzahl aufgefüllt. Hierfür wurden mit Casein gekoppelte Magnetpartikel verwendet.

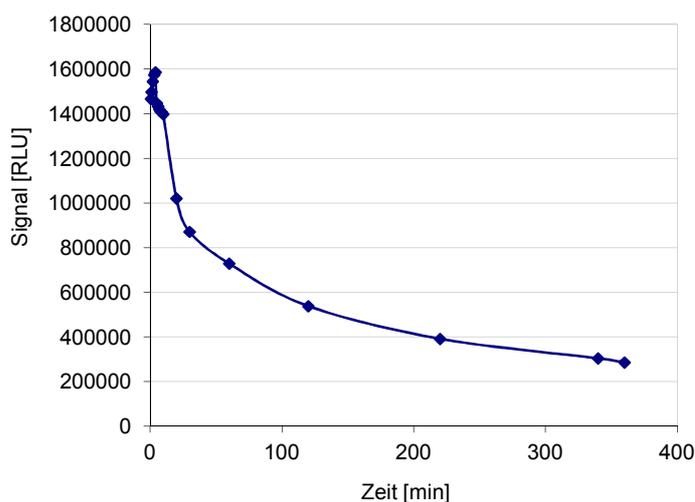
Die Menge an Magnetpartikel pro Test stellt einen wesentlichen Parameter für das System dar. Voraussetzung für das Testformat ist eine ausreichend große Magnetpartikel-Menge pro Teströhrchen, die mit bloßen Augen erkennbar ist, um das Handling bei den geplanten Waschschrinen zu vereinfachen. Zu hohe

Partikelmengen sollten allerdings vermieden werden, da überschüssige Magnetpartikel das emittierte Licht absorbieren können<sup>211</sup>. Zudem sollte die Menge aufgrund der hohen Kosten der Partikel so gering wie möglich gewählt werden.

#### *Optimaler Messzeitraum*

In Abbildung 6.47 ist der zeitliche Verlauf des CL-Signals mit Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-gekoppelten Magnetpartikeln über mehrere Stunden dargestellt. Der Verlauf der RLU-Werte wurde beispielhaft mit einer absoluten Enzymaktivität von 300  $\mu$ U untersucht. Es zeigte sich eine exponentielle Abnahme des CL-Signals mit der Zeit. In den ersten 10 Minuten wurde ein relativ konstantes Signal erhalten, welches mit der Zeit immer stärker abfiel.

Der Abfall des CL-Signals war zu erwarten, da das Luminol im Laufe der Zeit verbraucht wird und somit pro Zeiteinheit weniger Luminolhydroperoxide (Vorläufer der Lichtemission) gebildet werden (siehe Abschnitt 4.4.1). Zudem können auch andere Faktoren, wie die Inaktivierung der HRP eine Rolle spielen. Bedingt durch den Hydroperoxid-Überschuss, können eine Reihe hoch reaktiver Intermediate entstehen, die die prostetische Gruppe der HRP angreifen und zum Verlust der Enzymaktivität führen können<sup>159,161</sup>.



**Abbildung 6.47: Zeitverlauf des CL-Signals mit Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-gekoppelten Magnetpartikel;** eingesetzte absolute Partikelmenge =  $10^5$ ; Enzymmenge = 300  $\mu$ U

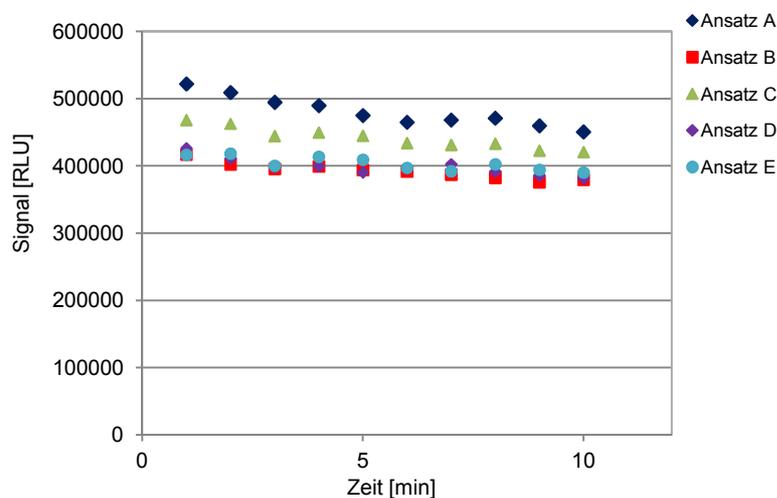
Innerhalb der ersten 10 min ist das CL-Signal verhältnismäßig konstant und fällt erst anschließend stärker ab. Die folgenden Untersuchungen wurden in einem Messzeitraum von 10 min durchgeführt.

#### *Überprüfung der Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-gekoppelten Magnetpartikel*

Es sollte geprüft werden, ob durch die Kopplungsreaktion ein homogenes Enzym-Partikel-Material erhalten wird und inwiefern ein Aktivitätsverlust bei der Lagerung der gekoppelten Partikel stattfindet.

Ist kein homogenes Partikel-Enzym-Material gegeben, würde dies beim Verdünnen der Partikel zu unreproduzierbaren Messwerten führen.

Für die Überprüfung auf ein homogenes Partikel-Enzym-Material wurde ein Kopplungsansatz mit  $6 \times 10^8$  Partikeln (siehe 9.4.2) mit Casein-gekoppelten Partikeln fünfmal in gleicher Weise verdünnt, so dass bei 50  $\mu\text{l}$  eingesetztes Volumen eine Absolutkonzentration von 150  $\mu\text{U}$  Enzymaktivität erhalten wurde. Diese Untersuchung wurde am selben Tag mit derselben SuperSignal-Lösung (450  $\mu\text{l}$ ) durchgeführt.



**Abbildung 6.48:** Vergleich der Wiederholmessungen der Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-gekoppelten Magnetpartikel; Enzymaktivität 150  $\mu\text{U}$

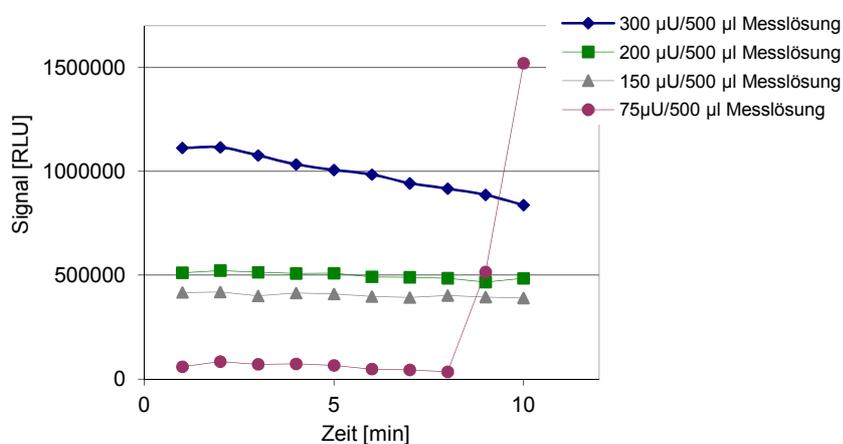
Wie aus Abbildung 6.48 ersichtlich, zeigten die 5 Ansätze ähnliche CL-Signalsintensitäten. Bei Betrachtung des CL-Signals nach 5 min Messzeit ergab sich bei-

spielsweise ein Mittelwert von 422535 RLU mit einer Standardabweichung von 32564 RLU, also ein Variationskoeffizient von 8 %. Nach diesem Ergebnis ist von einem homogenen Partikel-Enzym-Material auszugehen.

#### *Einfluss unterschiedlicher Enzymaktivitäten auf das Messsignal*

Ein weiterer grundlegender Punkt hinsichtlich der Methodenentwicklung ist die Überprüfung, inwiefern sich unterschiedliche Enzymkonzentrationen auf das Messsignal auswirken.

Dies wurde durch Verdünnen des Kopplungsansatzes ( $6 \times 10^8$  Partikeln), der auch schon in dem vorherigen Versuch zur Überprüfung der Homogenität verwendet wurde, durchgeführt. Mit diesem Ansatz wurde nach Punkt 9.4.3 durch Verdünnen mit Casein-gekoppelten Partikeln Lösungen von 75  $\mu\text{U}$  bis 300  $\mu\text{U}$  erstellt. Die Enzymaktivität pro Partikel wird als konstant angenommen. Die Messung erfolgte wie unter Punkt 9.4.3 beschrieben mit einem Gesamtmessvolumen von 500  $\mu\text{l}$ . Auch hier wurde die Untersuchung am selben Tag und mit derselben SuperSignal-Lösung durchgeführt, um möglichst gleiche Messbedingungen zu gewährleisten.



**Abbildung 6.49: Zeitlicher Verlauf des CL-Signals in Abhängigkeit der Enzymkonzentration**

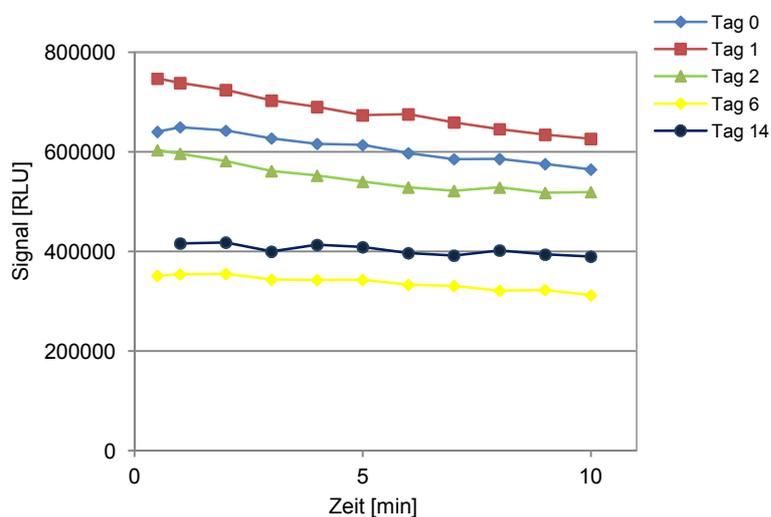
Aus Abbildung 6.49 wird deutlich, dass, entsprechend den theoretischen Annahmen, mit steigender Enzymkonzentration eine höhere CL-Signal-Intensität erhalten wurde. Eine Abhängigkeit zwischen HRP-Menge und CL-Signal ist demzufolge gegeben. Die erhaltenen Messsignale ähnelten, übereinstimmend mit den Versu-

chen mit „freier HRP“ dem Profil des Glow-Typs, wobei ein Plateau über mehrere Minuten resultierte.

Bei der Messung der geringsten Enzymaktivität von 75  $\mu\text{U}$  ist nach 8 min ein sprunghafter Anstieg des CL-Signals zu verzeichnen. Ähnliche Effekte wurden bei sehr geringen Enzymmengen häufig beobachtet. Nach theoretischen Überlegungen sollte das Signal im Laufe der Zeit weiter abnehmen, da das Wasserstoffperoxid und Lunimol verbraucht wird. Die bislang ungeklärten Beobachtungen deuten auf eine große Störanfälligkeit des Detektionsverfahrens hin.

#### *Überprüfung der Lagerstabilität der Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-gekoppelten Magnetpartikel*

Um Aussagen über die Stabilität der gekoppelten Partikel zu erhalten, wurde der Ansatz (Kopplung nach 9.4.2) zwei Wochen bei 6 °C im Kühlschrank gelagert. Für die Testdurchführung wurde der Ansatz arbeitstäglich auf gleiche Weise verdünnt und der Zeitverlauf des CL-Signals gemessen (siehe Abschnitt 9.4.5). Als Enzymmenge wurden 150  $\mu\text{U}$  pro Test eingesetzt. Abbildung 6.50 zeigt die resultierenden CL-Intensitäten für verschiedene Lagerzeiten der Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-gekoppelten Partikel.



**Abbildung 6.50: Einfluss der Lagerzeit der gekoppelten Partikel auf das CL-Signal**

Nach einer Lagerung von einem Tag wurden höhere CL-Intensitäten erhalten als für die direkt nach der Kopplung verwendeten Partikel (Tag 0). Eine deutliche Ab-

nahme der Enzymaktivität der gekoppelten Partikel ist in den ersten zwei Tagen nicht erkennbar. Die erhaltenen unterschiedlichen Messsignale liegen im Rahmen der Test-zu-Test-Schwankungen, deuten allerdings auf eine geringe Reproduzierbarkeit des Verfahrens hin. Eine signifikante Abnahme der Signalintensität ist nach einer Lagerung von 6 und 14 Tagen zu erkennen.

Auf Grundlage der hier erhaltenen Ergebnisse kann gefolgert werden, dass eine Lagerung der gekoppelten Partikel bei 6°C für zwei Tage möglich ist. Eine Lagerung über mehrere Tage sollte vermieden werden.

### Schritt 3: Untersuchungen mit gekoppelten PBP 2x\*-Magnetpartikeln

Analog zur Herstellung der Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragment-Magnetpartikel, wurden Magnetpartikel mit PBP 2x\* gekoppelt (siehe 9.4.4). Die Assaydurchführung ist in Abbildung 6.51 dargestellt. Eine Kompetition mit  $\beta$ -Lactamen wurde hier nicht durchgeführt, da vorerst die Funktionsweise des Testverfahrens untersucht werden sollte. Das erhaltene Signal entspricht somit dem maximalen Messsignal. Als Voraussetzung für das Testverfahren müssen niedrige, reproduzierbare Leerwerte gegeben sein.

Unter dem Begriff „Leerwert“ ist hier das Signal zu verstehen, das durch das Fehlen einer Assaykomponente (zum Beispiel Dig-Ampi) erhalten wird. Dabei sollte, entsprechend der Modellvorstellung, kein Signal erhalten werden.

Das beschriebene Testverfahren besitzt zwei notwendige Waschschriffe: die Abtrennung der überschüssigen, nicht gebundenen Dig-Ampi-Moleküle von den am PBP 2x\* gebundenen Dig-Ampi-Molekülen (Arbeitsschritt 3) und die Abtrennung von nicht eingefangenen Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragmenten von den an Dig-Ampi-PBP2x\* gebundenen Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragmenten (Arbeitsschritt 5).

Anhand der resultierenden Leerwert-Messsignale können Aussagen über die Waschschriffeffizienz getroffen werden. Bei einer unvollständigen Entfernung überschüssiger Komponenten resultieren hohe, unreproduzierbare Leerwerte.

Bei der Verwendung von PBS-Puffer statt Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragment wurde ein niedriger Leerwert erhalten. Dies entspricht den Erwartungen, da keine Peroxidase-Aktivität ins Testsystem gebracht wurde.

Der Leerwert ohne Zugabe von Dig-Ampi führte zu hohen Leerwerten. Dieser sollte auch niedrig sein, da nach dem Modell keine Peroxidase gebunden wird, sondern durch den nachfolgenden Waschschriffe wieder entfernt werden.

Aus diesem Grund musste der Waschschriffe 2) (Abbildung 6.51) genauer betrachtet und sollte auf niedrige, reproduzierbare Leerwerte optimiert werden.

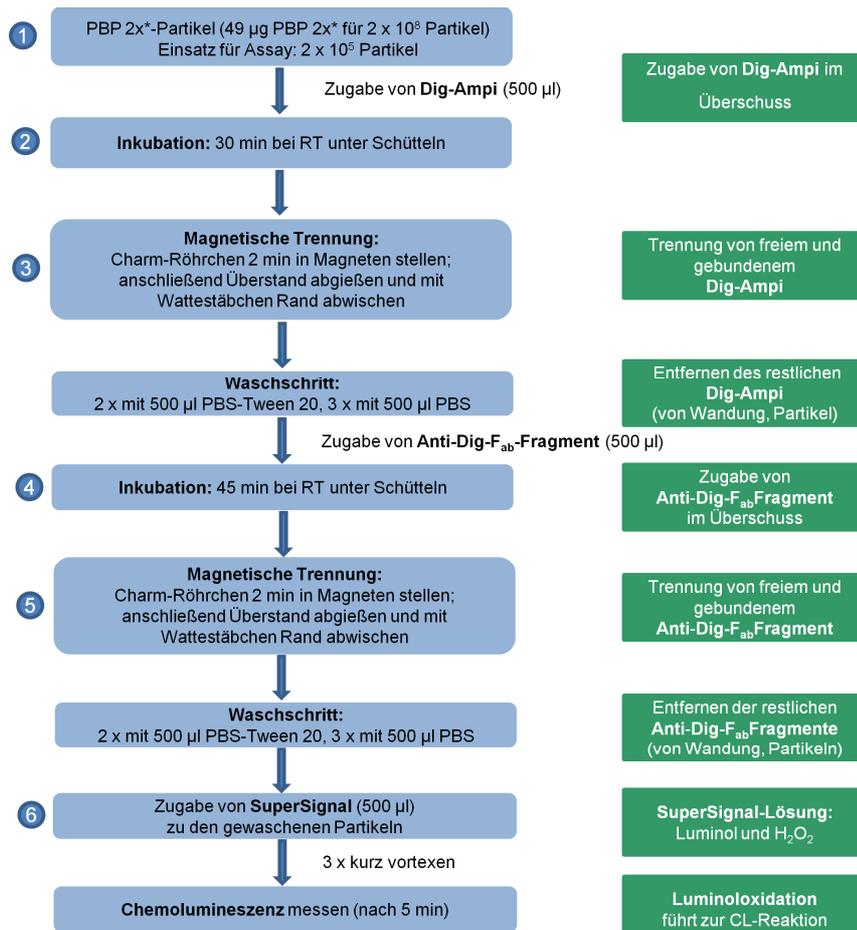


Abbildung 6.51: Konzeptionelle Assaydurchführung mittels PBP 2x\*-Magnetpartikeln

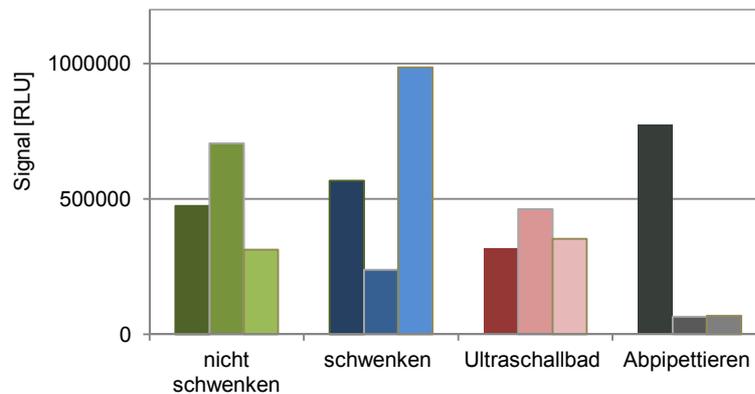
### Optimierung des Waschschrittes

Zur Optimierung der Waschschritte (siehe Schritt 3 und 5, Abbildung 6.51) wurde der Leerwert ohne Zugabe von Dig-Ampi verwendet. Es wurden verschiedene Resuspendierungstechniken nach der magnetischen Trennung getestet.

Eine gute Resuspendierung der Magnetpartikel nach der magnetischen Trennung ist wichtig, um eine vollständige Entfernung nicht-gebundener, störender Komponenten zu erreichen.

Zur Resuspendierung der Partikel wurde die Suspension a) nicht geschwenkt, b) leicht geschwenkt oder c) mittels Ultraschall behandelt. Für jede Technik wurden 3 Assays durchgeführt.

Zusätzlich wurde nach dem Schwenken anstatt des oben beschriebenen „Abgießens“ der überschüssigen Lösung Arbeitsschritt 5, das „Abpipettieren“ der überschüssigen Lösung getestet.



**Abbildung 6.52: 3 Assays bei unterschiedlichen Arbeitstechniken für die Waschschr**itte; resultierende Leerwerte (ohne Zugabe von Dig-Ampi, aber mit Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragmente)

Wie aus Abbildung 6.52 ersichtlich, führten alle hier untersuchten Arbeitstechniken zu relativ hohen und wenig reproduzierbaren Messwerten.

### 6.4.3 Fazit der Untersuchungen

Die Waschschrirte, die zur Entfernung des überschüssigen Dig-Ampi bzw. der Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragmente durchgeführt wurden, stellen erhebliche Schwachstellen der Methode dar.

Die teilweise sehr hohen Leerwerte deuten darauf hin, dass Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragmente trotz intensiver Spülung der Wandung im Teströhrchen verbleiben. Auch über verschiedene Arbeitstechniken des Resuspendierens (Ultraschall, Schwenken) ließ sich der Waschschrirte nicht optimieren.

Beim Resuspendieren mittels Ultraschall wurde auf eine kurze Einwirkungszeit von 1 min geachtet. Aufgrund der Scherkräfte, die während einer Ultraschalleinwirkung entstehen, könnte es zu einer Veränderung der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur des Proteins kommen und zum Verlust der enzymatischen Aktivität.

Es ist zudem möglich, dass nicht die ganze Partikeloberfläche mit Casein deaktiviert wurde (siehe Abbildung 9.6), so dass eventuell Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragmente direkt an die Partikel gekoppelt wurden. Dies würde die unerwünschte Peroxidaseaktivität erklären.

Anhand der Untersuchungen kann gefolgert werden, dass der Test in diesem Format (Charm-Röhrchen) nicht durchführbar ist.

## 7 Zusammenfassung

Auf Grund der niedrigen, gesetzlich festgesetzten Höchstmengen für  $\beta$ -Lactam-Antibiotika und komplexer Lebensmittelmatrixen ist ein sehr sensitives und störungsunempfindliches Testverfahren zum Nachweis erforderlich. Im günstigsten Fall können störende Bestandteile durch einen einfachen Verdünnungsschritt eliminiert werden.

In dieser Arbeit wurde ein kompetitiver, rezeptorgestützter Mikrotiterplatten-Assay mittels Lumineszenz-Detektion zum Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika in Niere entwickelt. Als Rezeptor für  $\beta$ -Lactame wurde das Penicillin-bindende Protein PBP 2x\* eingesetzt. Ein Ampicillin-Digoxigenin-Konjugat diente als Marker und konkurrierte mit den  $\beta$ -Lactamen um die Bindungsstellen am PBP 2x\*. Als dritter Assay-Baustein kam ein Digoxigenin-spezifischer Antikörper, der mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert war, zum Einsatz. Dieses Testprinzip wurde schon erfolgreich in einem Mikrotiterplatten-Test mit kolorimetrischer Detektion von Lamar <sup>129</sup> eingesetzt. In Weiterentwicklung des Testverfahrens wurde Chemilumineszenz (CL) mittels einer HRP-katalysierten Luminoloxidation als Detektionssystem verwendet. Als Detektionreagenz wurde eine Lösung, die Wasserstoffperoxid und Luminol enthielt, eingesetzt.

Die Einsatzmöglichkeit des CL-Assays zur Analyse von Niere und anderen Matrixen wurde geprüft und mit dem von Lamar entwickelten Assay verglichen. Verschiedene Einflussfaktoren und analytische Leistungsdaten wurden ermittelt. Neben Rohmilch und Muskelfleisch wurde schwerpunktmäßig Schweineniere untersucht.

Zudem wurde der Detektionsschritt des kolorimetrischen Assays weiter untersucht. Die Detektion des kolorimetrischen Assays basiert auf einer Farbreaktion mit Tetramethylbenzidin (TMB). Ergänzend zu den Arbeiten von Lamar wurden verschiedene Einflussfaktoren, wie Peroxidasekonzentration, Standzeit der fertigen TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung und Schütteln der Mikrotiterplatte, auf den zeitlichen Verlauf der TMB-Farbentwicklung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass durch Einhaltung von einer 5-minütigen Standzeit der fertigen TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (vor

Gebrauch), die Präzision des Testsystems verbessert werden konnte. Zusätzlich wurde eine lineare Abhängigkeit zwischen Farbtintensität und Enzymmenge nach 5 min festgestellt. Der Farbentwicklungszeitraum konnte um die Hälfte reduziert werden.

Es konnte modellhaft anhand vier  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (Benzylpenicillin, Ampicillin, Cefquinom und Ceftiofur (gemessen als Desfuroylceftiofur)) gezeigt werden, dass eine Abhängigkeit des Lumineszenz-Signals von der  $\beta$ -Lactamkonzentration in der Probe vorlag. Mit Tausaft von Schweinenieren ließ sich das erarbeitete Screeningverfahren für den Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika erfolgreich einsetzen. Die Matrixinterferenzen waren stark ausgeprägt, konnten aber bei Muskelfleisch und Niere durch Zentrifugation und Verdünnung mit PBS-Puffer minimiert werden. Anhand der Matrix Niere wurden, angelehnt an den Anforderungen der EU-Entscheidung 2002/657/EC und der DIN 32645, für die genannten  $\beta$ -Lactame verschiedene Leistungsparameter ermittelt, wie Nachweis- und Erfassungsgrenze, Arbeitsbereich und Wiederholpräzision.

Für Rohmilch und Schweineniere wiesen beide Verfahren für alle hier untersuchten  $\beta$ -Lactam-Antibiotika Nachweisgrenzen auf, die deutlich unterhalb der rechtlichen Höchstmengen lagen. Auch Desfuroylceftiofur konnte mittels PBP 2x\* erfasst werden. Der Arbeitsbereich von kolorimetrischem und CL-Assay lag in der gleichen Größenordnung. Beim CL-Assay wurde jedoch eine größere Streuung der Messwerte als beim kolorimetrischen Assay beobachtet. Der CL-Assay war im Vergleich zum kolorimetrischen Assay insgesamt störanfälliger und weniger präzise. Die mit dem CL-Assay ermittelten Nachweisgrenzen in Schweineniere lagen allerdings für alle untersuchten  $\beta$ -Lactam-Antibiotika um ca. Faktor 2 niedriger als für den kolorimetrischen Assay.

Anhand eines Full Factorial Designs wurden vergleichend für den kolorimetrischen und den CL-Assay die signifikanten Einflussfaktoren bezüglich der Matrix ermittelt. Niere und Muskel unterschieden sich bei beiden Testverfahren signifikant. Somit war eine Kalibrierung in der jeweiligen Matrix für beide Tests erforderlich. Bedingt durch die hohe Streuung der Messwerte beim CL-Assay, stellte der Parameter Tierart (Schwein – Rind), im Gegensatz zum kolorimetrischen Assay,

keinen diskriminierenden Effekt dar. In Bezug auf wirtschaftliche Aspekte zeigte der kolorimetrische Assay deutliche Vorteile gegenüber dem CL-Assay (Kosten, Analysenzeit).

Da in der amtlichen Lebensmittelüberwachung nicht nur größere Probenserien zu bearbeiten sind, sondern häufig auch Einzelproben untersucht werden müssen, wurde ein CL-Verfahren konzipiert, mit dem material-sparend Einzelproben untersucht werden können. Das CL-Testverfahren wurde auf Eignung zur Analyse von  $\beta$ -Lactamen geprüft. Das CL-Mikrotiterplatten-Testprinzip wurde durch Koppelung von PBP 2x\* an Magnetpartikeln auf ein Röhrchen-Testformat übertragen. Für die Testentwicklung wurden Epoxy-modifizierte Magnetpartikel eingesetzt. Die Epoxyfunktion erlaubt eine kovalente Bindung von PBP 2x\* an die Oberfläche der Partikel. Für die notwendigen Waschschrte zur Entfernung von überschüssigen Assay-Komponenten wurde ein spezieller Permanent-Magnet verwendet, mit Hilfe dessen eine Fixierung der Magnetpartikel während des Waschschrtes möglich war. Die Einsatzmöglichkeit eines Charm II-Rezeptortestsystems wurde geprüft. Das Verfahren zeigte deutliche Schwachstellen bei den Waschschrten. Verschiedene Arbeitstechniken der Waschschrte (Ultraschall, Schwenken etc.) wurden untersucht, führten allerdings zu keiner Optimierung. Auf Grund der resultierenden, hohen Leerwerte eignete sich das Verfahren nicht zum zuverlässigen Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Rückständen.

Zusammenfassend zeigt der CL-Mikrotiterplatten-Assay als weitere Variante zum kolorimetrischen Mikrotiterplatten-Assay großes Potential zum Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Rückständen in Niere. Einhergehend mit der hohen Empfindlichkeit der Chemilumineszenz erhöhte sich allerdings die Störanfälligkeit des Systems.

## 8 Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass neben der Kolorimetrie auch die Chemilumineszenz als Detektionsart beim Screening-Verfahren zum Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika in Lebensmitteln eingesetzt werden kann.

Der Vergleich der beiden Mikrotiterplatten-Testsysteme wurde schwerpunktmäßig anhand der Matrix Niere vorgenommen. Beide Testverfahren erlaubten den sicheren Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika in Niere und Rohmilch unterhalb der jeweiligen Höchstmengen. Zur weiteren Validierung des Screeningverfahrens, wäre die Untersuchung authentischer, rückstandshaltiger Proben erforderlich, die durch Medikation von Tieren erhalten wurden.

Um in der Routineanalytik der amtlichen Lebensmittelüberwachung Eingang zu finden, muss eine Validierung auf Basis der EU-Entscheidung 2002/657/EC <sup>93</sup> erfolgen. Von Interesse wäre weiterhin die Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze in weiteren Matrices, wie zum Muskelfleisch. In der EU ist hierfür eine Höchstmenge von 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  festgesetzt <sup>4</sup>.

Die Störanfälligkeit und geringe Präzision des CL-Testverfahrens stellt einen kritischen Punkt für den erfolgreichen Einsatz in der Routineanalytik dar. Zudem konnten störende Matrixbestandteile durch Verdünnen der Probe nicht vollständig eliminiert werden. Dies erforderte somit eine matrixabhängige Kalibrierung. Eine Entfernung der Matrixbestandteile, insbesondere der Proteine, könnte zur Steigerung der Empfindlichkeit und Robustheit führen.

Um Proteine abzutrennen und somit unspezifische Wechselwirkungen mit Assaykomponenten zu vermeiden, könnte beispielweise eine Ultrafiltration oder eine Hitzebehandlung der Proben im Rahmen der Probenaufarbeitung durchgeführt werden. Von Cacciatore <sup>16</sup> und Gustavsson <sup>208</sup> wurde eine Hitzebehandlung in Rohmilch zur Minimierung unspezifischer Bindungen in der SPR-Analytik erfolgreich eingesetzt.

Im Zusammenhang mit der Empfindlichkeitssteigerung und der Robustheitsprüfung, wäre die Untersuchung physikochemischer Parameter, wie zum Beispiel pH-Wert, Temperatur und Ionenstärke, interessant.

Wenn es gelingen würde diese Herausforderungen zu lösen, stellt die neue Methode eine echte Alternative aufgrund ihrer überlegenen Sensitivität dar.

## 9 Material und Methoden

### 9.1 Expression und Aufreinigung von PBP 2x\*

*E. coli* BL21 (pGEX-tet-PBP 2x\*) wurde freundlicherweise von Frau Prof. Regine Hakenbeck der Universität Kaiserslautern zur Verfügung gestellt und zur Überexpression verwendet. Abbildung 9.1 gibt einen Überblick über die einzelnen Arbeitsschritte.

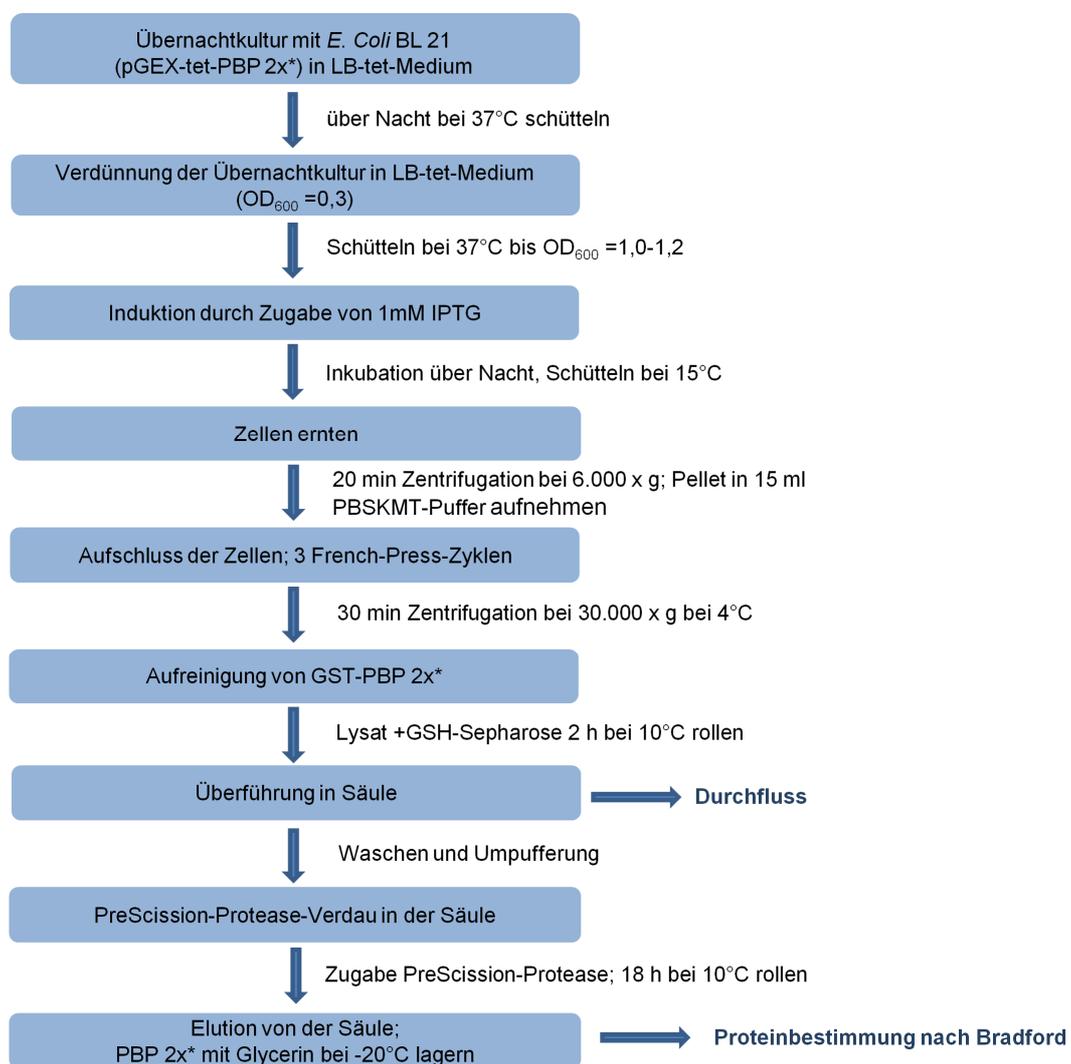


Abbildung 9.1: Fließschema zur Expression und Aufreinigung von PBP 2x\*

Materialien und Geräte

Anlage zur Reinstwasserherstellung (Milli-Q plus; Millipore GmbH, Schwalbach)

Elektronische Analysenwaage Modell 1712MP8 (Sartorius, Göttingen)

Grobwaage (Sartorius BP 1200, VWR International, Darmstadt)

Schüttelinkubator (Typ: Innova 4000, New Brunswick Scientific, New Jersey, USA)

Zentrifuge Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed-Centrifuge, Rotor: GS3 (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich)

Zentrifuge Sorvall Ultrazentrifuge T865-1 (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich)

French Press (American Instruments Co. Inc., Silver Spring, Md.)

Autoklav: Varioklav Typ 500 V (H + P Labortechnik, Oberschleißheim)

Zentrifuge Hermle Z200 A, Rotor: 220.96 V01 (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen)

Schüttler Typ 3015 GFL (Gesellschaft für Labortechnik m. b. H & Co., Burgwedel)

Kühlwand Queue® (InterMed Nunc GmbH, Wiesbaden)

Biofuge fresco (Heraeus Instruments GmbH, Osterode)

Erlenmeyerkolben, 100 ml (VWR International GmbH, Darmstadt)

Glassäule (1 x 10 cm) mit Luer-Lock-Anschluss (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)

0,22 µm Spritzenfilter, PVDF, steril (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

10 ml Einmalspritzen, steril (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Reagenzien

Glutathion-Sepharose™ 4 fast flow (GE Healthcare Bio Sciences AB; Uppsala, Schweden)

E. coli BL21-Stammkultur mit dem Plasmid pGEX-tet-PBP 2x\* (gelagert bei -80°C)

PreScission-Protease (Amersham Biosciences, Freiburg)

Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG) (Roche Applied Science, Mannheim)

Dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)

Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA) Dinatrium Dihydrat (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Natriumchlorid (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Trypton (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Hefeextrakt (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Tetracyclin (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)

Dinatriumhydrogenphosphat, p.a. wasserfrei (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Kaliumdihydrogenphosphat, p.a. (Merck, KGaA, Darmstadt)

Kaliumchlorid, p.a. (Merck, KGaA, Darmstadt)

Tween® 20 (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)

Magnesiumchlorid (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Trizma® Hydrochlorid (Tris-HCl) (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)

Glycerin (≥ 99 %) (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)

Coomassie-Brillantblau G 250 (Trimethylmethanfarbstoff)

Tabelle 9.1: Verwendete Medien und Lösungen zur Anzucht von *E. coli*

Lösungen	Ansatz
<b>LB-Medium</b>	10g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl <i>ad</i> 1000 ml Reinstwasser
<b>Tetracyclin</b>	Stammlösung: 20 mg/ml in 70 % EtOH sterilfiltrieren Endkonzentration: 20 µg/ml (Stammlösung 1:1000 verdünnt)
<b>IPTG</b>	Stammlösung: 100 mM sterilfiltrieren Endkonzentration: 1mM (Stammlösung 1:100 verdünnt)

Das Nährmedium wurde 16 min bei 121°C und 1,2 bar autoklaviert. Nach Abkühlung wurde zu dem Medium 1 ml einer sterilfiltrierten Tetracyclin-Lösung (20 mg/ml) hinzugefügt.

Tabelle 9.2: Lösungen zur Reinigung GST-fusionierter Proteine<sup>[1]</sup>

Lösungen	Volumen/Menge	Endkonzentration
<b>20 x PBS</b> <b>(Phosphate buffered saline)</b> <b>(pH 7,3)</b>	160 g NaCl 23 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (wasserfrei) 4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <i>ad</i> 1000 ml Reinstwasser	
<b>PBSKM-Puffer (pH 7,3)</b>	50 ml 20 x PBS 1 ml (Stammlösung 1 M) 1,5 ml (Stammlösung 2 M) <i>ad</i> 1000 ml Reinstwasser	1 x PBS 1 mM MgCl <sub>2</sub> 3 mM KCl
<b>PBSKMT-Puffer (pH 7,3)</b>	50 ml 20 x PBS 1 ml Tween 20 1 ml (Stammlösung 1 M) 1,5 ml (Stammlösung 2 M) <i>ad</i> 1000 ml Reinstwasser	1 x PBS 0,1 % Tween 1 mM MgCl <sub>2</sub> 3 mM KCl
<b>Elutionspuffer (pH 8,0)</b>	1 ml Tris pH 8,0 (Stammlösung 1 M) 64,1 mg GSH <i>ad</i> 20 ml Reinstwasser	50 mM Tris  10 mM GSH
Den Elutionspuffer erst kurz vor der Benutzung herstellen, da GSH sonst oxidiert wird!		

<sup>[1]</sup> alle Lösungen wurden autoklaviert

Lösungen	Volumen/Menge	Endkonzentration
<b>Cleavage-Puffer</b>	20 ml Tris-HCl (Stammlösung 0,5 M)	50 mM Tris-HCl (pH 7,0)
	600 µl NaCl (Stammlösung 5M)	15 mM NaCl
	2 ml EDTA (Stammlösung 0,1 M)	1mM EDTA
	200 µl DTT (Stammlösung 1 M)	1mM DTT
	<i>ad</i> 200 ml Reinstwasser	

<sup>[1]</sup> alle Lösungen wurden autoklaviert

### 9.1.1 Proteinexpression in *E. coli*

Zur Überexpression der Proteine wurden 20 ml LB-Medium mit 100 µl einer Stammkultur von *E. coli* BL21 (pGEX -tet-PBP 2x\*) angeimpft, Tetracyclin (20 µg/ml) hinzugefügt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Übernachtskultur wurde in 200 ml LB-Medium mit Tetracyclin (20 µg/ml) verdünnt. Die erhaltende optische Dichte OD<sub>600nm</sub> sollte 0,3 betragen. Die *E. coli*-Kultur wurde bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 1,0-1,2 herangezogen. Anschließend wurden durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) die Lactoserepressoren inaktiviert und die Expression der Gene induziert. Zur weiteren Proteinsynthese wurde über Nacht bei 15°C weiter inkubiert, um ein Entstehen von inclusion bodies zu vermeiden. Die Zellen wurden durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 6.000 x g geerntet. Die sedimentierten Zellen wurden in 15 ml PBSKMT-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde drei French-Press-Zyklen unterzogen. Hierbei wurden die Zellen schonend bei 18.000 psi lysiert. Zur Trennung des löslichen Teils des Gesamtzelllysates vom unlöslichen Teil wurde bei 30.000 x g für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert und anschließend das GST-PBP 2x\*-Fusionsprotein mittels Glutathion-Affinitätschromatographie aufgereinigt.

Zur Dokumentation der Produktion und Aufreinigung des Proteins PBP 2x\* wurde eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli <sup>212</sup> durchgeführt.

### 9.1.2 Aufreinigung des PBP 2x\*

Zur Überprüfung der GST-Fusionsproteine wurde eine Testbindung an GSH-Sepharose durchgeführt. Hierbei sollten die GST-Fusionsproteine an GSH-Sepharose binden.

Hierfür wurde 300 µl der GSH-Sepharose (Slurry) dreimal mit je 1 ml PBSKMT-Puffer gewaschen, um das zur Lagerung der GSH-Sepharose enthaltende Ethanol zu entfernen. Anschließend wurde zur gewaschenen GSH-Sepharose 1,5 ml Lysat gegeben und diese Suspension 1 h bei 10°C gerollt. Die Zentrifugation der Sepharose erfolgte hierfür bei sehr niedriger g-Zahl für 30 s, um eine Schädigung der Sepharose zu vermeiden. Nach erneutem Waschen der Sepharose (dreimal mit je 1 ml PBSKMT-Puffer), wurde die Sepharose mit 40 µl 2fach-konzentriertem Lämmli-Puffer versetzt und 2 min bei 95°C erhitzt.

#### Aufreinigung über GSH-Sepharose

Für die Glutathion-Affinitätschromatographie wurden 2 ml GSH-Sepharose dreimal mit je 15 ml PBSKMT-Puffer gewaschen. Die Waschschritte wurden durch Zentrifugation für 3 min bei 2000 rpm durchgeführt. Die gewaschene Sepharose wurde mit 35 ml Lysat versetzt und 2 h bei 10°C gerollt. Da die Fusionsproteine einen GST-tag besitzen, konnten diese an die GSH-Sepharose binden, wohingegen andere Proteine ungebunden blieben. Die Suspension aus Sepharose und Lysat wurde anschließend in eine Glassäule gegeben und der Durchfluss aufgefangen. Anschließend wurde das Säulenmaterial zweimal mit 20 ml PBSKMT-Puffer und einmal mit 10 ml PBSKM-Puffer gewaschen, um das über den GST-tag gebundene Protein von anderen Proteinen und Fremdstoffen zu trennen.

Hierfür wurde die Sepharose zur Umpufferung zweimal mit je 20 ml Cleavage-Puffer gewaschen, anschließend mit 2ml Cleavage-Puffer versetzt und 20 µl

PreScission-Protease hinzugegeben. Der Protease-Verdau wurde 18 h bei 10 °C unter leichtem Rollen inkubiert. Anschließend wurden 2 ml aus der Säule aufgefangen und mit 1 ml Cleavage-Puffer gewaschen. Das aufgereinigte PBP 2x\* wurde nach Zugabe von Glycerin (Endkonzentration 10 %) im flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -20°C gelagert.

### 9.1.3 Quantifizierung der Proteine

Der Proteingehalt wurde nach Bradford <sup>213</sup> mit BSA als Standardprotein ermittelt.

Der verwendete Farbstoff Coomassie-Brillantblau G 250 (Trimethylmethan-Farbstoff) kann sich unspezifisch an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten von Proteinen anlagern. Durch die Komplexbildung mit den Proteinen verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm.

#### Materialien und Geräte

Anlage zur Reinstwasser-Herstellung (Milli-Q plus; Millipore GmbH, Schwalbach)

Elektronische Analysenwaage Modell 1712MP8 (Sartorius, Göttingen)

Mikrotiterplatten Reader (Model 680, Bio-Rad Laboratories GmbH, München)

96-well Mikrotiterplatten, Polysorb™, klar, F-Boden (Nunc, Wiesbaden)

1,5 ml Reaktionsgefäße (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

50 ml Reaktionsröhrchen (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

#### Reagenzien und Lösungen

Roti-Nanoquant (Bradford-Reagenz); 5-fach Konzentrat (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Bovines Serumalbumin (BSA) (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)

50 µl des entsprechenden BSA-Standards (6 – 100 µg/ml) bzw. der Probenverdünnung aus der PBP 2x\*-Expression wurden als Mehrfachbestimmung in die Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettiert. Es wurden 200 µl des verdünnten Bradford-Reagenzes hinzugefügt und nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur die Absorption bei 595 nm gemessen.

### 9.1.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Dokumentation der verschiedenen Schritte bei der Proteinaufreinigung erfolgte durch elektrophoretische Trennung der Proteine mittels Polyacrylamid-Gelen nach Lämmli <sup>212</sup>.

Die Detektion der aufgetrennten Proteine erfolgte mit Hilfe des Farbstoffes Coomassie BrilliantBlue R-250®. Dieser bindet in saurem Medium an freie geladene Amino- und Iminogruppen der Proteine.

#### Materialien und Geräte

Regelbares Netzgerät Typ EA-3050 (Elektro-Automatik GmbH & Co. KG, Viersen)

Gießapparatur, Elektrophoresekammern mit zugehörigen Glasplatten und Elektrophorese-Kamm 0,075 mm (Mini Protan II, Bio-Rad Laboratories GmbH, München)

Schüttler Typ GFL 3011 (VWR International, Darmstadt)

Dokumentationsgerät Gel Doc 2000 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)

Zentrifuge Heraeus Biofuge 15 R (VWR International, Darmstadt)

Anlage zur Reinstwasserherstellung (Milli-Q plus; Millipore GmbH, Schwalbach)

Elektronische Analysenwaage Modell 1712MP8 (Sartorius, Göttingen)

Grobwaage (Sartorius BP 1200, VWR International, Darmstadt)

#### Reagenzien

SigmaMarker™ High Range wt 36.000-205.000 Da (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)

RotiBlue®-Färbelösung (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

30:0,8 Acrylamid:Bis-Acrylamid (30% AA:0,8% BAA) (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)

Tris (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)

*N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamine (TEMED) (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)

Natriumdodecylsulfat (SDS) (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)

Glycin (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Methanol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Ammoniumpersulfat (APS) (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)

Tabelle 9.3: Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE

	Komponenten	Konzentration/Volumen
2x Lämmli-Probenpuffer	Reinstwasser	1,875 ml
	0,5 M Tris pH 6,8	1,875 ml
	50 % Glycerin	3 ml
	SDS	0,3 g
	Bromphenolblau	0,2 mg
	2-Mercaptoethanol	0,750 ml
Elektrophorese-Laufpuffer	Tris	3,03 g
	Glycin	14,4 g
	SDS	1 g
	Reinstwasser	<i>ad</i> 1000 ml
RotiBlue®-Färbelösung	RotiBlue®-Konzentrat	20 ml
	Reinstwasser	60 ml
	Methanol	20 ml
Entfärberlösung	Methanol	250 ml
	Reinstwasser	750 ml

Tabelle 9.4: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels

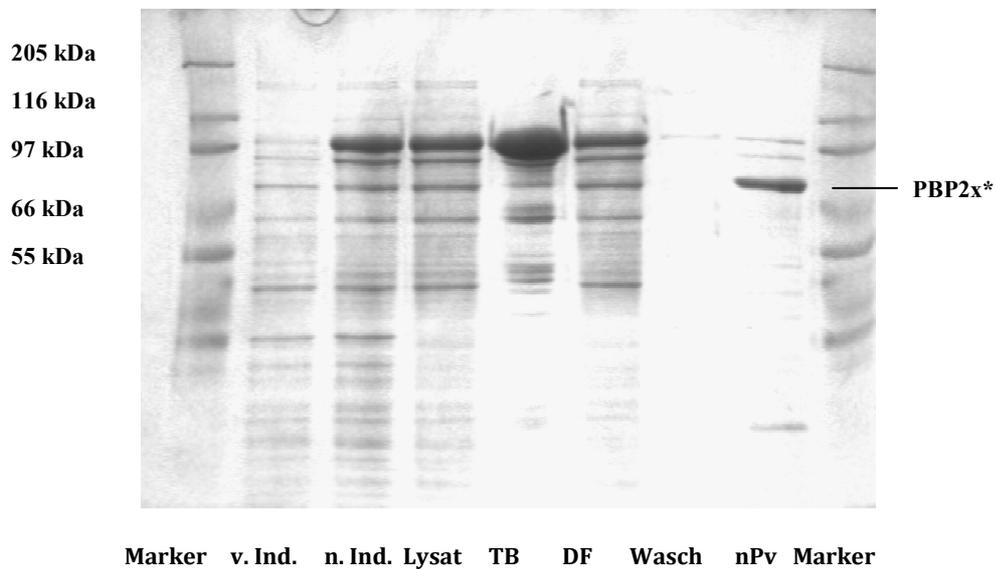
	Komponenten	Konzentration/Volumen
Sammelgel (5 %ig)	Reinstwasser	2,85 ml
	0,5 M Tris pH 6,8	1,25 ml
	30% AA:0,8% BAA	0,85 ml
	10 % SDS	50 µl
	10 % APS	25 µl
	TEMED	2,5 µl
Trenngel (10 %ig)	Reinstwasser	4,05 ml
	0,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml
	30% AA:0,8% BAA	3,35 ml
	10 % SDS	100 µl
	10 % APS	25 µl
	TEMED	2,5 µl

Die in dieser Arbeit verwendete Gelelektrophorese erfolgte in einem diskontinuierlichen Tris-HCl/Tris-Glycin Puffersystem. Die Gele bestehen aus einem kurzen, weitporigen Sammelgel (5 %ig), in dem die Aufkonzentrierung der Proteine erfolgt und einem langen, engporigen Trennungsgel (10 %ig). Im Trennungsgel findet die Auftrennung der Proteine nach der von ihrem Molekulargewicht abhängigen elektrophoretischen Beweglichkeit ab.

10 µl der Proben wurden mit 15 µl 2x Lämmli-Puffer versetzt und 2 min bei 95°C erhitzt. Anschließend wurden hiervon je 3 µl auf das Gel aufgetragen. Als Standard für verschiedene Molekulargewichte wurde ein Proteinstandard (SigmaMarker™) verwendet. Die elektrophoretische Trennung wurde im Elektrophorese-Laufpuffer bei 110-165 V durchgeführt.

Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte über Nacht durch Inkubation (unter Schütteln) der Gele in Roti-Blue®-Färbelösung. Anschließend wurden die Gele in wässriger Methanollösung (25 %ig) entfärbt.

In Abbildung 9.2 ist exemplarisch die Geldokumentation der einzelnen Schritte während der Expression und Aufreinigung des Rezeptorproteins PBP 2\* dargestellt.



**Abbildung 9.2: Dokumentation der Expression und Aufreinigung von PBP 2x\* mittels SDS-PAGE;** Aufgetragen sind Molekulargewichtsstandard (Marker), Probe vor Induktion (v. Ind.), Probe nach Induktion (n. Ind.), Zellysate nach Aufschluss (Lysat), Testbindung des GST-Fusionsproteins (TB), Durchfluss der Affinitätschromatographie (DF), Waschschrift (Wasch) und Probe nach PreScission-Protease-Verdau (nPv)

### 9.1.5 Bestimmung der Bindekapazität des PBP 2x\* mittels HPLC

Die Bestimmung der Bindekapazität des PBP 2x\* erfolgte wie bei Cacciatore <sup>16</sup> beschrieben nach der „active site titration“ mit einem nicht-kompetitiven Assay mit Ampicillin und Bocillin FL in Anlehnung an Jasmin *et al.* <sup>214</sup>.

#### Materialien und Geräte

HPLC-Anlage: Merck Hitachi LaChrom-System (VWR, International, Darmstadt)

Pumpe Model L-7100

Autosampler Model L-7250

Fluoreszenzdetektor Model L-7485

Integrator Model D-7500

#### Reagenzien

Ampicillin Natriumsalz (Fluka, Taufkirchen)

Penicillin Bindeprotein PBP 2x\* (eigene Herstellung, siehe 9.1)

Bocillin FL (Mobitec, Göttingen)

di-Natriumhydrogenphosphat (Sigma, Taufkirchen)

Kaliumhydrogenphosphat (Fluka, Taufkirchen)

Acetonitril HPLC-grade (Roth, Karlsruhe)

Reinstwasser (MilliQ Plus, Millipore, Eschborn)

Chromatographische System zur Aktivitätsbestimmung von PBP 2x\*

Säule:	Biosep-SEC-S-2000, 300 x 7,8 mm
Eluent:	Eluent A: 100 mM Phosphat-Puffer, pH 6,8 Eluent B: Acetonitril 0-10 Minuten 100 % A 10-12 Minuten 50 % A 12-30 Minuten 50 % A 30-32 Minuten 100 % A 30-45 Minuten 100 % A
Fluss:	1 ml/Minute
Druck:	38 bar
Injektionsvolumen:	50 µl
Detektionswellenlänge:	$\lambda_{\text{Ex}}$ 480 nm, $\lambda_{\text{Em}}$ 520 nm

Für die Bestimmung wurden 20 µl einer verdünnten PBP 2x\*-Lösung (98 µg/ml) für 15 min mit verschiedenen Ampicillinmengen (1,7 pmol, 3,4 pmol, 6,8 pmol, 13,5 pmol und 27 pmol in 20 µl PBS-Puffer) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 20 µl Bocillin FL (60 pmol) hinzugefügt und erneut 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bestimmung der verbliebenen Penicillin-bindenden Aktivität wurde gelchromatographisch ermittelt. Unter der Annahme, dass PBP 2x\* und Ampicillin ein äquimolares Konjugat bilden, kann die Bindekapazität des PBP 2x\* über die Kalibrierreihe mit Ampicillin extrapoliert werden. Die Kapazität des PBP 2x\* ist definiert über die Ampicillin-Menge, die das Enzym vollständig inhibiert. 20 µl der oben genannten PBP 2x\*-Lösung werden durch 13 pmol Ampicillin komplett gehemmt.

## 9.2 Synthese und relative Konzentrationsbestimmung des Digoxigenin-markierten Ampicillins (Dig-Ampi)

Die Synthese und die relative Konzentrationsbestimmung erfolgte in Anlehnung an Cacciatore.<sup>16</sup> und Lamar<sup>129</sup>.

### Materialien und Geräte

Vortex-Mischer (VWR International, Darmstadt)

HPLC-Anlage: Merck Hitachi LaChrom-System (VWR, International, Darmstadt)

Pumpe Model L-7100

Autosampler Model L-7250

Fluoreszenzdetektor Model L-7485

UV/VIS Detektor Model L-7420

Integrator Model D-7500

### Reagenzien

Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl- $\epsilon$ -aminocaprönsäure-N-hydroxysuccinimidester (DIG-NHS) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

Ammoniumacetat (Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen)

Ampicillin Natriumsalz (Fluka, Taufkirchen)

Penicillin Bindeprotein PBP 2x\* (eigene Herstellung, siehe 9.1)

Bocillin FL (Mobitec, Göttingen)

di-Natriumhydrogenphosphat (Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen)

Kaliumhydrogenphosphat (Fluka, Taufkirchen)

Acetonitril HPLC-grade (Roth, Karlsruhe)

Reinstwasser (MilliQ Plus, Millipore, Eschborn)

Dimethylformamid (Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen)

$\beta$ -Lactamase aus *Enterobacter cloacae*, Typ IV (Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen)

Es wurden 10 mg DIG-NHS in 240  $\mu$ l Dimethylformamid gelöst. Nach Zugabe einer Ampicillinlösung (20 mg in 240  $\mu$ l Reinstwasser; entspricht 52  $\mu$ mol) wurde das Reaktionsgemisch 15 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt.

Anschließend wurde 1 ml Reinstwasser hinzugefügt. Es folgte die Aufreinigung und Fraktionierung des Dig-Ampi-Reaktionsgemisches mittels HPLC. Die Identifizierung des Dig-Ampi-Peaks wurde, wie bei Lamar <sup>129</sup> beschrieben, durch Zugabe von  $\beta$ -Lactamasen durchgeführt.

Folgende chromatographische Bedingungen wurden verwendet:

Chromatographisches System zur Dig-Ampi-Aufreinigung

Säule:	Supelcosil LC 308 RP 8; 250 mm, 5 $\mu\text{m}$ , 300 $\text{\AA}$ (Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen)
Eluent:	Eluent A: 25 mM Ammoniumacetat
	Eluent B: 25 mM Ammoniumacetat/Acetonitril (70/30; v/v)
	A/B (15/85; v/v)
Injektionsvolumen:	50 $\mu\text{l}$
Fluss:	1 ml/Minute
Detektionswellenlänge:	230 nm

Die erhaltenen Dig-Ampi-Fractionen wurden vereinigt und das Acetonitril unter Stickstoff entfernt. Anschließend wurde die Lösung gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde in 1 ml PBS-Puffer aufgenommen und diese Stammlösung in 50  $\mu\text{l}$  Aliquots bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die relative Konzentrationsbestimmung wurde in Anlehnung an Cacciatore <sup>16</sup> durchgeführt. Die Bestimmung erfolgte anhand eines nicht-kompetitiven Assays mit PBP 2x\* und Bocillin FL. Hierfür wurden 20  $\mu\text{l}$  PBP 2x\* (98  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in 10  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer verdünnt und mit 10  $\mu\text{l}$  einer Dig-Ampi-Lösung (1:2500 und 1:1500) oder verschiedenen Mengen Ampicillin (1,7 pmol, 3,4 pmol, 6,8 pmol und 13,5 pmol) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  einer Bocillin FL-Lösung (60 pmol) und ebenfalls eine Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur. Abschließend wurden 60  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer zur Lösung gegeben und mittels HPLC analysiert.

Die verbliebene Penicillin-bindende Aktivität wurde chromatographisch nach Punkt 9.1.5 analysiert (n = 2). Anschließend wurden die resultierenden Flächeneinheiten für die Dig-Ampi-Inkubation mit denen von Ampicillin verglichen. Die

Ermittlung des relativen Gehalts an Dig-Ampi erfolgte über die Extrapolation der Ampicillin-Kalibrierung. Es ergab sich eine relative Dig-Ampi-Konzentration von 1625 µg/ml.

### 9.3 Analysen mittels des Mikrotiterplatten-Tests

Es wurden Analysen von unterschiedlichen Matrices mittels des photometrischen Mikrotiterplatten- und des Chemilumineszenz-Mikrotiterplatten-Tests durchgeführt. In Tabelle 9.5 sind die Puffer und Lösungen, die für die verschiedenen Analysenverfahren gemeinsam verwendet wurden, aufgeführt.

#### Materialien und Geräte

Mikrotiterplatten-Washer (Bio Tek Instruments, Bad Friedrichshall)

Schüttler für Mikrotiterplatten (Typ SM 25, Edmund Bühler GmbH, Hechingen)

Temperiereinheit für Mikrotiterplatten (eigene Herstellung: Aluminiumboxen, die mit temperierten Wasser durchströmt werden)

Heiz- und Kühlsystem LAUDA (Typ RM T6, Messgeräte-Werk LAUDA Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen)

Digitales pH-Meter (Typ 646, Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin)

pH-Elektrode (Typ Z-451, Schott Instruments GmbH, Mainz)

Grobwaage (Sartorius BP 1200, VWR International, Darmstadt)

Analysenwaage (ACCULAB, sartorius group ALC)

Tischzentrifuge (Thermo Scientific, Heraeus PICO 17 centrifuge)

Zentrifuge Eppendorf 5702R mit Rotor A-4-38 (Eppendorf AG, Hamburg)

pH-Meter (HANNA HI 208 pH Meter)

Vortexer (VV3, VWR International, Darmstadt)

Mehrkanalpipette 30-300 µl (Eppendorf AG, Hamburg)

Multipette Plus (Eppendorf AG, Hamburg)

Finnpipette® (FP-Digital 1-5 ml, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich)

Kolbenhubpipetten, variabel (0,5-10 µl; 20-200 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl)  
(Eppendorf AG, Hamburg)

Reaktionsgefäße, verschiedene Größen (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

### Reagenzien

Penicillin Bindeprotein PBP 2x\* (eigene Herstellung, siehe 9.1)

Digoxigenin-markiertes Ampicillin (eigene Herstellung, siehe 9.2)

Anti-Digoxigenin-POD Konjugat; Lyophilisat, 150 U/ml (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

Ampicillin Natriumsalz (Fluka, Taufkirchen)

Benzylpenicillin Kaliumsalz (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)

Cefquinomsulfat (Dr. Ehrendorfer GmbH, Augsburg)

Desfuroylceftiofur (Toronto Research Chemicals Inc., Kanada)

Natriumchlorid (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Natriumhydrogencarbonat (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Dinatriumcarbonat p.a. (Merck, KGaA, Darmstadt)

Dinatriumhydrogenphosphat, p.a. wasserfrei (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Kaliumdihydrogenphosphat, p.a. (Merck, KGaA, Darmstadt)

Tween® 20 (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)

Casein (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)

wasserfreies Toluol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

wasserfreies Aceton (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Dimethyldichlorsilan (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)

### Software

Zur Steuerung und Aufzeichnung der Daten stand die Software BMG Labtech Control Software, Version 2.20 zur Verfügung. Daten, die mit dem Mikrotiterplatten Reader FLUOstar OPTIMA erhalten wurden, wurden mittels der Auswertungssoftware Microsoft Excel Office Version 2002 ausgewertet.

### **Für die kolorimetrische Detektion zusätzlich:**

#### Materialien und Geräte

Mikrotiterplatten Reader (Model 680, Bio-Rad Laboratories GmbH, München)

Mikrotiterplatten Reader FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech GmbH, Offenburg)

96-well Mikrotiterplatten, Maxisorb™, klar, F-Boden (Nunc, Wiesbaden)

Deckel für Nunc-Mikrotiterplatten mit Kondensationsring (Nunc, Wiesbaden)

#### Reagenzien

Kaliumhydroxid (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Citronensäure-Monohydrat (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)

Salzsäure, 37 %ig (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Methanol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Aceton (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Wasserstoffperoxid, 30% (w/w); PERDROGEN® (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)

**Für die Chemilumineszenz - Detektion zusätzlich:**Materialien und Geräte

Mikrotiterplatten Reader FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech GmbH, Offenburg)

96-well Mikrotiterplatten, Maxisorb™, weiss, F-Boden (Nunc, Wiesbaden)

Deckel für Nunc-Mikrotiterplatten mit Kondensationsring (Nunc, Wiesbaden)

Reagenzien

Meerrettichperoxidase Typ VI-A; 250-330 units/mg solid (Pyrogallol als Substrat)  
(Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)

SuperSignal® ELISA PICO, Chemilumineszenzsubstrat (Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn)

**Tabelle 9.5: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Reagenzien für die Durchführung der Mikrotiterplatten-Tests (allgemein)**

	Komponenten	Menge
<b>Bicarbonatpuffer pH 9,5 (Beschichtungspuffer)</b>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,16 ml
	NaHCO <sub>3</sub>	0,29 ml
	Reinstwasser	100 ml
<b>0,01 mol/l PBS pH 7,2</b>	NaCl	6,8 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4 g
	Reinstwasser	1000 ml
<b>2 %ige Caseinlösung (Blockpuffer)</b>	Casein	4 g
	0,01 mol/l PBS-Puffer	200 ml
<b>Waschlösung</b>	NaCl	8,6 g
	Tween 20	0,25 ml
	Reinstwasser	1000 ml

### Allgemeiner Testverlauf

Zur Immobilisierung des Rezeptorproteins wurde die PBP 2x\*-Stammlösung mit Bicarbonatpuffer (pH 9,5) verdünnt und anschließend 100 µl dieser Lösung in die Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettiert. Die Absolutmenge an PBP 2x\* pro Kavität sollte 150 ng betragen. Die beschichtete Mikrotiterplatte wurde bei 4-8°C über Nacht inkubiert.

Anschließend wurde die Platte mit PBS-Puffer gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen auf der Platte zu blockieren, wurde mit 200 µl einer 2 %igen Caseinlösung für 30 min bei 20°C nachbeschichtet. Überschüssiges Casein wurde durch Waschen mit PBS-Puffer entfernt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl Standard- bzw. Probelösung und eine Inkubation für 30 min unter leichtem Schwenken bei 20°C. Hierbei binden eventuell enthaltene  $\beta$ -Lactame aus der Probelösung an die freien Bindungsstellen des PBP 2x\*. Im Folgeschritt wurde 100 µl eines Digoxigenin-markierten Ampicillins (Stammlösung 1:60.000 verdünnt) als Kompetitor hinzugegeben. Es wurde wiederum für 30 min unter Schwenken bei 20°C inkubiert. Überschüssiges nicht-gebundenes Digoxigenin-markiertes Ampicillin wurde durch zweifaches Waschen mit PBS-Puffer und Waschlösung entfernt. 100 µl anti-Digoxigenin-F<sub>ab</sub> Fragmente, die an Meerrettichperoxidase konjugiert sind, wurden in die Kavitäten pipettiert und 45 min unter Schwenken bei 20°C inkubiert. Hierbei können die Antikörper an das vorhandene Digoxigenin-markierte Ampicillin binden.

Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS-Puffer (je zweimal) und Waschlösung (je zweimal) wurde die Menge an gebundener Meerrettichperoxidase durch die Zugabe von 100 µl Substrat-/Chromogenlösung bestimmt. Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen erfolgten nach dem allgemeinen Fließschema in Abbildung 9.3. Der Detektionsschritt variierte je nach durchgeführtem Verfahren und ist ausführlich unter den folgenden Punkten beschrieben.

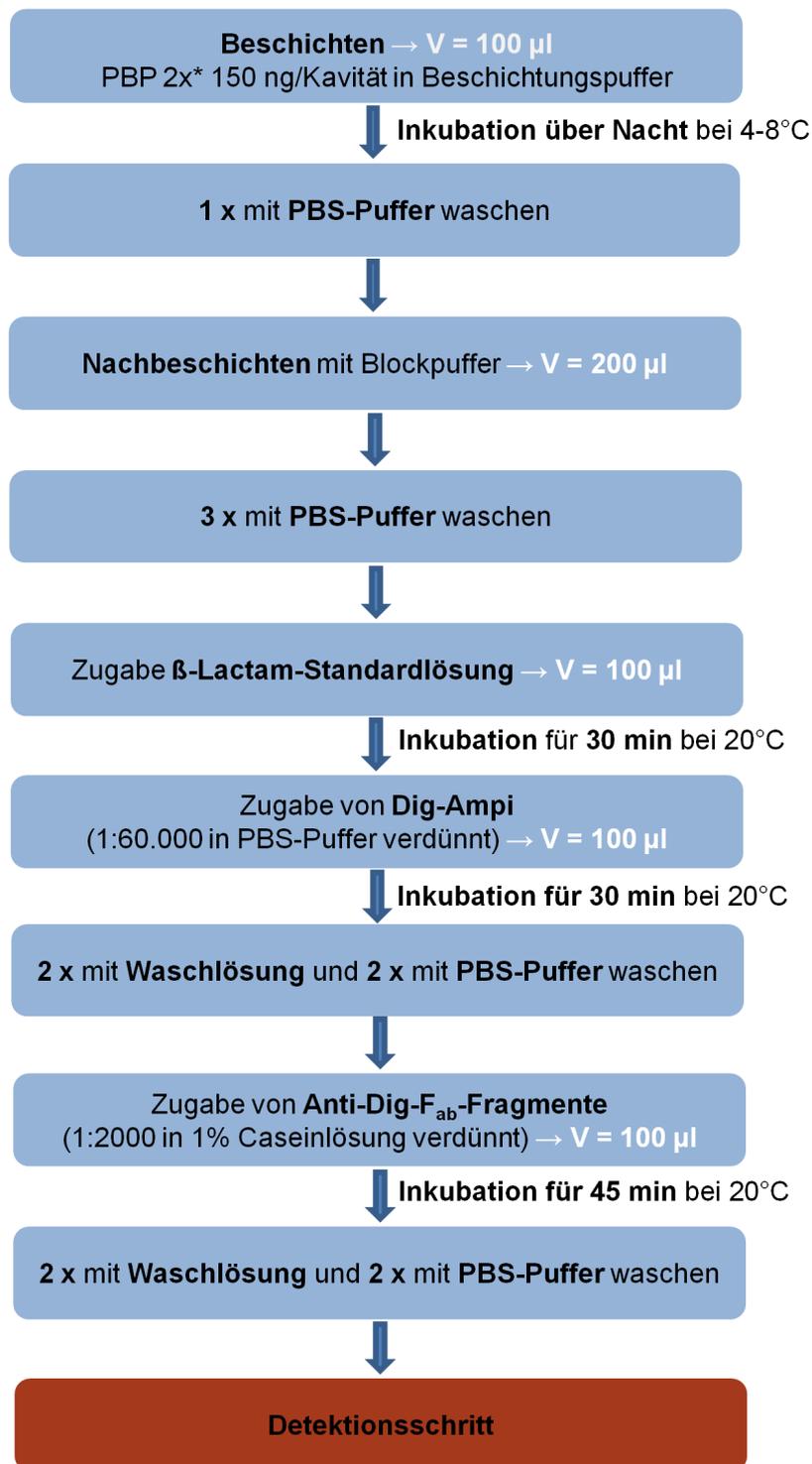


Abbildung 9.3: Allgemeines Fließschema des kolorimetrischen und CL-Mikrotiterplatten-Tests

### 9.3.1 Kolorimetrischer Mikrotiterplatten-Test

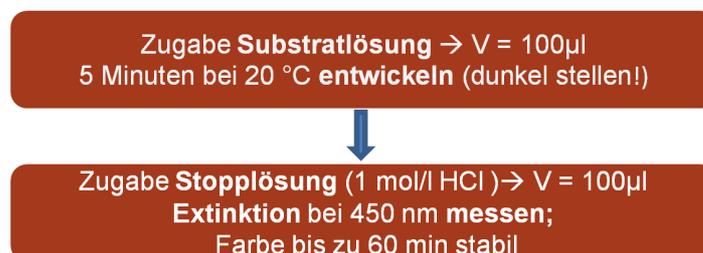
Für den Test wurden die im Folgenden aufgeführten zusätzlichen Puffer und Lösungen verwendet.

**Tabelle 9.6: Zusätzlich benötigte Reagenzien und Lösungen für den kolorimetrischen Mikrotiterplatten-Test**

	Komponenten	Menge
0,21 mol/l Citratpuffer pH 4,0	Citronensäure-Monohydrat	2,2 g
	1 mol/l KOH	10 ml
	Reinstwasser	40 ml
3,3',5,5'- Tetramethylbenzidinlösung	Tetramethylbenzidin	12,6 mg
	Aceton	0,25 mg
	Methanol	2,25 ml
Substratlösung für die Meerrettichperoxidase <sup>[1]</sup>	0,21 mol/l Citratpuffer	20 ml
	Tetramethylbenzidinlösung	1 ml
	Wasserstoffperoxid (30 %ig)	6,5 µl
Stoppreagenz	1 mol/l HCl	

<sup>[1]</sup> vor Gebrauch sollte die Substratlösung ca. 5 min im Dunkeln stehen

Der Test wurde wie in der Abbildung 9.3 beschrieben durchgeführt. Die Beschichtungsmenge des Rezeptorproteins PBP 2x\* und die Verdünnungen der einzelnen Komponenten erfolgten in Anlehnung an Lamar.



**Abbildung 9.4: Detektionsschritt des kolorimetrischen Mikrotiterplattentests**

Für den Detektionsschritt wurde eine Tetramethylbenzidin-Wasserstoffperoxid-Lösung verwendet. Die Entwicklung der blauen Farbe erfolgte für 5 min im Dunkeln. Nach der Farbentwicklung wurde die enzymatische Reaktion der

Meerrettichperoxidase durch Absenkung des pH-Wertes mit 100  $\mu$ l 1 M HCl gestoppt und die Extinktionen bei 450 nm gemessen (siehe Abbildung 9.4).

### Untersuchungen zur Farbreaktion

Für die Untersuchung der Farbreaktion wurden verschiedene Testansätze durchgeführt. Alle Versuche erfolgten hierbei bei Raumtemperatur (21°C).

Für orientierende Versuche wurde eine Kalibrierung von HRP in Reinstwasser verwendet. Hierfür wurden 13 mg HRP in 1 ml Reinstwasser gelöst und 1:10.000 mit Reinstwasser verdünnt. Aus dieser Lösung wurde durch Verdünnung mit PBS-Puffer die Konzentrationen 19, 15 und 9 HRP ng/ml hergestellt. 5  $\mu$ l der entsprechenden Standardlösung bzw. 5  $\mu$ l PBS-Puffer (Blindwert) wurden in die Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurden 100  $\mu$ l Substratlösung (10 min vor Gebrauch angesetzt; siehe Tabelle 9.6) dazu gegeben. Die Farbentwicklung wurde ohne Schütteln im Dunkeln durchgeführt und nach 2, 5, 10 und 20 min mit 100  $\mu$ l 1 M HCl gestoppt. Die Auswertung erfolgte photometrisch bei 450 nm. Vom erhaltenen Messwert wurde der Blindwert (PBS-Puffer), der keine HRP enthielt, subtrahiert.

Zur Überprüfung eines eventuell vorhandenen Schütteleffekts wurde der oben beschriebene Versuch vergleichend mit und ohne Schwenken der Mikrotiterplatte während der Farbentwicklung durchgeführt.

Des Weiteren wurde die Standzeit der Substratlösung vor dem Gebrauch der Assay-Durchführung im Bereich von 0 bis 30 min variiert. Während dieser Zeit stand die Lösung im Dunkeln. Für die Untersuchung eines eventuellen Effekts in Hinblick auf die Standzeit der TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung wurden verschiedene Verdünnungsstufen (1:10.000, 1:20.000 und 1:40.000) des Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragmentes in PBS-Puffer angesetzt. 10  $\mu$ l der jeweiligen Standardlösung (bzw. 10  $\mu$ l PBS-Puffer für den Blindwert) wurden in eine 96 well-Mikrotiterplatte pipettiert und 100  $\mu$ l TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (0,24 g/l) hinzugefügt. Die Farbentwicklung wurde im Dunkeln ohne Schwenken durchgeführt. Die Farbreaktion wurde nach 3 min mit 100  $\mu$ l HCl (1

mol/l) gestoppt. Die resultierende Färbung wurde photometrisch bei 450 nm gemessen.

Zur Überprüfung des linearen Bereiches der Farbentwicklung wurde zusätzlich die Farbentwicklung der drei verschiedenen Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragment-Verdünnungen nach unterschiedlichen Zeitpunkten gestoppt. Die Standzeit der fertigen TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (vor Gebrauch) betrug 5 min.

Hierfür wurde der Versuch wie oben beschrieben durchgeführt und die Farbreaktion nach 1, 3, 5, 8, 10 und 12 min mit 100 µl 1 M HCl gestoppt.

Zur Überprüfung des linearen Bereichs der Farbreaktion wurden abschließend unterschiedliche Beschichtungsmengen an PBP 2x\* (30, 65 und 100 ng/Kavität) verwendet. Der allgemeine Testablauf wurde nach dem Fließschema in Abbildung 9.3 durchgeführt. Abweichend hierzu wurden unterschiedliche PBP 2x\*-Beschichtungsmengen und eine Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragment-Verdünnung von 1:1500 verwendet. Die Entwicklung der Farbe wurde nach unterschiedlichen Zeitpunkten (2, 4, 6, 8, 10 und 12 min) gestoppt. Es erfolgte kein Zusatz von β-Lactamen, da nur die maximalen Messwerte betrachtet wurden.

### 9.3.2 Chemilumineszenz-Mikrotiterplatten-Test

Der Testverlauf erfolgte wie in der Abbildung 9.3 beschrieben. Die Detektion wurde durch Zugabe von Luminol als Lumineszenzreagenz und anschließender Chemilumineszenzmessung durchgeführt. Näheres zum Detektionsschritt wird im Folgenden beschrieben.

Der Verlauf der Chemilumineszenz-Intensität wurde über verschiedene Zeiträume (2,4 s-30 s, 3 s-4 min, 2,5 s-5 min, 3 s-20 min, 3 s-25min und 2,4 s-35 min) untersucht, um den Zeitpunkt auszuwählen, bei dem ein stabiles, genügend hohes Messsignal erhalten wird. Für die Ermittlung der optimierten Bedingungen wurden keine  $\beta$ -Lactam-Antibiotika zugegeben, sondern lediglich die maximale Lichtintensität gemessen. Anstatt der  $\beta$ -Lactam-Zugabe erfolgte die Zugabe von 100  $\mu$ l PBS-Puffer. Für die Untersuchung von gegebenenfalls vorhandenen unspezifischen Wechselwirkungen wurden verschiedene Leerwerte untersucht. Bei den Leerwerten wurde jeweils eine Komponente aus dem Versuchsablauf durch PBS-Puffer ersetzt. Es wurden folgende Leerwerte gemessen:

- Leerwert ohne PBP 2x\*-Beschichtung
- Leerwert ohne Dig-Ampi
- Leerwert ohne Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragmente

### Untersuchungen des Verlaufes der Luminoloxidation

Die Untersuchungen des Verlaufes der Luminoloxidation wurden in zwei verschiedenen Modi durchgeführt. Für die Betrachtung sehr kurzer Zeiträume (bis ca. 2 min) wurde der Well-Modus verwendet, längere Zeiträume (bis ca. 35 min) wurden mit dem Plate Modus verfolgt.

**Tabelle 9.7: Parameter bei der Messung im Well-Modus (zu Abbildung 6.20)**

Einstellungen	
Anzahl der Intervalle	20
Kinetische Intervallzeit [s]	1,5
Startzeit der Messung [s]	2,4
Intervallmesszeit [s]	1,5
Gain	1000
Positioning delay [s]	0.2

Die Wartezeit innerhalb einer Position (positioning delay) wurde für beide Modi auf 0.2 s gesetzt. Dies ist die minimale Zeit, die das Gerät benötigt, um zur nächsten Position überzugehen. Der Gain-Faktor (Verstärkung des elektrischen Signals) wurde mit dem Messsignal, das die höchsten RLU-Werte ergab, ermittelt. Hierfür wurde eine PBP 2x\*-Beschichtung von 150 ng/ml, eine Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragmente-Verdünnung von 1:1000 und ein Dig-Ampi-Verdünnung von 1:60.000 verwendet. Zur Vergleichbarkeit mit nachfolgenden Untersuchungen wurde der Gain-Faktor bei allen hier optimierten, durchgeführten Messungen auf 1966 gesetzt.

Die Detektion der Meerrettichperoxidase gekoppelten F<sub>ab</sub>-Fragmente wurde durch die Zugabe von 50 µl des Chemilumineszenz-Substrates SuperSignal® ELISA PICO durchgeführt. Die erhaltene blaue Chemilumineszenz wurde unter optimierten Bedingungen nach 90 s in relative light units (RLU) gemessen (siehe Abbildung 9.5).



Abbildung 9.5: Detektionsschritt des CL-Mikrotiterplattentests

Die Untersuchungen wurden mit dem im Folgenden aufgeführten optimierten Einstellungen im Endpoint-Modus durchgeführt.

Tabelle 9.8: Messparameter für die optimierte Methode

Einstellungen	
Messzeitpunkt [s]	nach 90
Interval time [s]	0.20
Gain	1966
Schüttelzeit	10 s vor der Messung der Platte
Schüttelmodus	doppelt orbital
Injektionsvolumen [ $\mu$ l]	50
Pumpengeschwindigkeit [ $\mu$ l/s]	310
Injektionszyklus	1
Temperatur [ $^{\circ}$ C]	25
Positioning delay [s]	0.2 s

### 9.3.3 Analyse von $\beta$ -Lactamen in PBS-Puffer

Für die Erstellung von Kalibrierkurven wurden die entsprechenden  $\beta$ -Lactam-Antibiotika in PBS-Puffer zu 1 mg/ml jeweils arbeitstäglich frisch angesetzt. Aus diesen Stammlösungen wurden durch Verdünnen mit PBS-Puffer die entsprechenden Kalibrierlösungen (0,1- 250 ng/ml) hergestellt. Für die Herstellung von Stamm- und Standardlösungen wurden desaktivierte Glasgefäße bzw. Polyethylengefäße verwendet.

### 9.3.4 Analyse von Milchproben

Die verwendeten Rohmilchproben wurden in Anlehnung an Lamar <sup>129</sup> aufgearbeitet. Sie wurden vor der Analyse durch Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 3000 g entfettet. Die Dotierung erfolgte durch Zusatz der Kalibrierlösung mit  $\leq 1\%$  zu der entfetteten Rohmilch. Anschließend wurden die Milchproben für 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt.

### 9.3.5 Analyse von Muskelfleisch- und Nierenproben

Die Analyse von  $\beta$ -Lactamen in Muskelfleisch und Nieren verschiedener Tierarten erfolgte über die Dotierung der entsprechenden Tausäfte.

Die jeweiligen Tausäfte wurden durch einen einfachen Gefrier-Tauzyklus und anschließende Zentrifugation gewonnen. Die in dieser Arbeit verwendeten Muskelfleischsorten bzw. Nieren wurden aus dem Handel bei verschiedenen Metzgereien bezogen. Für die Tausaftgewinnung wurde das frische Muskelfleisch bzw. die Niere in grobe Stücke zerkleinert und anschließend in 50 ml-Greiner-Tubes bei -20°C mindestens einen Tag eingefroren. Anschließend wurden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut. Der Tausaft wurde für 10 min bei Raumtemperatur und 3000 g zentrifugiert, um eventuell störende Gewebereste zu sedimentieren.

Für die Dotierung mit  $\beta$ -Lactam-Antibiotika wurden jeweils 25  $\mu$ l der entsprechenden Kalibrierlösung in 475  $\mu$ l des unverdünnten Tausaftes gegeben, kurz gevortext und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die gewonnenen, gegebenenfalls dotierten Tausaftproben wurden unverdünnt oder nach einem Verdünnungsschritt mit PBS-Puffer ohne weitere Aufreinigungsschritte direkt für die Analyse eingesetzt.

Für die Analysen der Muskelfleisch-Tausäfte wurden Ampicillin und Benzylpenicillin als Standardsubstanzen in einem Bereich von 10-250 ng/ml, bezogen auf den unverdünnten Tausaft, verwendet. Anschließend erfolgte eine 1:10-Verdünnung des dotierten Tausaftes in PBS-Puffer.

Die Untersuchung der Nieren erfolgte mit Ampicillin, Benzylpenicillin, Cefquinom und Desfuroylceftiofur. Die Dotierungslevels richteten sich hierbei an die Höchstmenge der jeweiligen  $\beta$ -Lactame. Für die Analysenreihen mit Ampicillin und Benzylpenicillin wurden die gewünschten Konzentrationen von 10-250 ng/ml (bezogen auf den Zeitpunkt der Dotierung des unverdünnten Tausaftes) verwendet. Es folgte eine 1:10 Verdünnung in PBS-Puffer. Die Dotierung mit Cefquinom wurde in einem Bereich von 10-800 ng/ml und anschließender 1:40 Verdünnung in PBS-Puffer durchgeführt. Der untersuchte Konzentrationsbereich des Desfuroylceftiofurs betrug 800-16000 ng/ml mit folgender 1:500 Verdünnung in PBS-Puffer. Die Verdünnungslevels wurden so gewählt, dass ein genügend hohes Messsignal erhalten wurde.

Als Vergleich zur rückstandshaltigen Probe wurde zusätzlich die jeweilige Verdünnungsstufe des undotierten Tausaftes gemessen.

## 9.4 Chemilumineszenz-Test mittels Charm II-System

Im Folgenden werden die einzelnen Entwicklungsschritte beschrieben.

### Materialien und Geräte

Charm II-Gerät LSC 6600 (MCS Diagnostics, Swalmen, NL)

Zubehör zum Charm II-Gerät (MCS Diagnostics, Swalmen, NL):

Vortex-Mischer

Heizblock

Zentrifuge IEC Centra CL 2

Charm II Software

Magnet DynaMag™-15 (Invitrogen GmbH, Darmstadt)

Vortexer (Vibrofix V-T1 Electronic (Janke & Kunkel)

Schüttler (Typ SM 25, Edmund Bühler GmbH, Hechingen)

### Reagenzien

Meerrettichperoxidase Typ VI-A; 250-330 units/mg solid (Pyrogallol als Substrat)  
(Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)

SuperSignal® ELISA PICO, Chemilumineszenzsubstrat (Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn)

Dynabeads M-270-Epoxy (Invitrogen GmbH, Darmstadt)

Penicillin Bindeprotein PBP 2x\* (eigene Herstellung, siehe 9.1)

Digoxigenin-markiertes Ampicillin (eigene Herstellung, siehe 9.2)

Anti-Digoxigenin-POD Konjugat; Lyophilisat, 150 U/ml (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

Ampicillin Natriumsalz (Fluka, Taufkirchen)

Natriumchlorid (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Natriumhydrogencarbonat (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Dinatriumcarbonat p.a. (Merck, KGaA, Darmstadt)

Dinatriumhydrogenphosphat, p.a. wasserfrei (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Kaliumdihydrogenphosphat, p.a. (Merck, KGaA, Darmstadt)

Tween® 20 (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)

Casein (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)

Dimethylformamid (99 % for molecular biology, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)

Ammoniumsulfat ((Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)

### 9.4.1 Chemilumineszenz-Versuche in homogener Lösung mittels Charm

#### II-Detektion

10 mg HRP wurden in 5 ml tridestillierten Wasser gelöst und bei 4°C dunkel gelagert (Lösung I). Diese Lösung wurde anschließend in mehreren Schritten (siehe Tabelle 9.9) mit tridestillierten Wasser zur arbeitstäglichen Verwendung (Lösung V) verdünnt. Hieraus wurde die entsprechende Standardlösung durch Verdünnen mit tridestillierten Wasser (6-1 ng/ml) für die Untersuchung hergestellt. Die Verdünnungen wurden arbeitstäglich neu angesetzt und während der Untersuchung auf Eis gelagert.

**Tabelle 9.9: Verdünnungen für Arbeits- und Standardlösungen**

Arbeitslösung	Herstellung	Verdünnung	Konzentration
I	10 mg HRP in 5 ml H <sub>2</sub> O	---	2 mg/ml
II	50 µl Lösung I auf 5 ml H <sub>2</sub> O	1:100	20 µg/ml
III	50 µl Lösung II auf 5 ml H <sub>2</sub> O	1:100	200 ng/ml
IV	100 µl Lösung III in 1 ml H <sub>2</sub> O	1:10	20 ng/ml
V	500 µl Lösung III auf 1 ml H <sub>2</sub> O	1:2	10 ng/ml

HRP-Standard <sup>[1]</sup>	Herstellung	Konzentration [ng/ml]	Menge/Assay [fmol]
Standard 1	600 µl Lösung V in 1 ml H <sub>2</sub> O	6	1,4
Standard 2	500 µl Lösung V in 1 ml H <sub>2</sub> O	5	1,1
Standard 3	400 µl Lösung V in 1 ml H <sub>2</sub> O	4	0,9
Standard 4	250 µl Lösung V in 1 ml H <sub>2</sub> O	2,5	0,6
Standard 5	125 µl Lösung V in 1 ml H <sub>2</sub> O	1,25	0,3

<sup>[1]</sup> Standard 1-5 für Assay eingesetzt

Für den Assay wurden jeweils 10 µl der wässrigen HRP-Standardlösung (1-5) in ein Charm-Röhrchen vorgelegt, 90 µl des SuperSignal-Reagenzes dazugegeben (in die Flüssigkeit pipettiert) und kurz gevortext. Anschließend wurde für unterschiedliche Mengen an HRP für einen Zeitraum von 10 min (Messung jede 60 s)

der CL-Zeitverlauf bei Raumtemperatur (21°C) gemessen. Als Vergleich wurde eine Blanklösung verwendet, die kein HRP enthielt. Hierfür wurden statt 10 µl Standardlösung 10 µl tridestilliertes Wasser für die Analyse eingesetzt.

Die Reagenzien wurden nicht automatisch innerhalb des Gerätes, sondern außerhalb manuell gemischt. Das Messröhrchen verblieb während der gesamten Analyse von 10 min in der Messzelle.

### 9.4.2 Herstellung der Casein- und Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragmente-Magnetpartikel

Die für die Kopplung der Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragmente an die Magnetpartikel verwendeten Lösungen sind in Tabelle 9.10 zusammengestellt.

Die Durchführung der Kopplung und die Beschichtungsmenge wurden gemäß der Produktinformation der Firma Invitrogen <sup>184</sup> durchgeführt. Zur Verdünnung der Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragmente-Magnetpartikel wurden mit Casein gekoppelte Magnetpartikel verwendet.

**Tabelle 9.10: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen für die Kopplung der Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragmente an Magnetpartikeln**

	Komponenten	Menge
0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,4)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,5 g
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	14,4 g
	Reinstwasser	1000 ml
3 M Ammoniumsulfat-Lösung	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	36,9 g
	0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,4)	100 ml
PBS-Puffer (pH 7,4)	NaCl	8,8 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,2 g
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,3 g
	Reinstwasser	1000 ml
PBS mit 0,1 % Casein	Casein	0,1 g
	PBS-Puffer (pH 7,4)	100 ml

### Durchführung der Kopplung der Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragmente bzw. des Caseins an Magnetpartikel

In Abbildung 9.6 ist das allgemeine Fließschema für die Kopplung dargestellt. Es wurden zwei Ansätze A) und B) durchgeführt. Ansatz A für die Casein-Magnetpartikel, Ansatz B für die Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragment-Magnetpartikel.



**Abbildung 9.6: Fließschema der Kopplung der Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragmente an Magnetpartikeln**

#### 1. Schritt: Resuspendieren der Magnetpartikel

Die gefriergetrockneten Magnetpartikel wurden in DMF resuspendiert. Hierfür wurden 30 mg ( $2 \times 10^9$  Partikel /ml) in 1 ml DMF resuspendiert. Die Suspension wurde 1-2 min gevortext und 300  $\mu$ l für Ansatz B abgenommen. Für Ansatz A wurden 100  $\mu$ l der Magnetpartikel-Suspension verwendet. Anschließend wurden beide Ansätze 4 min in den Magneten gestellt und der Überstand nach der magnetischen Separation abpipettiert.

## 2. Schritt: Equilibrieren der Magnetpartikel

Zu den Ansätzen wurden je Fraktion 200  $\mu\text{l}$  0,1 M Natriumphosphatpuffer gegeben. Diese Suspensionen wurden kurz gevortext und anschließend 10 min bei Raumtemperatur mittels Schüttler gemischt. Nachfolgend wurden die Ansätze 2 min einer magnetischen Trennung unterzogen und der Überstand anschließend abpipettiert. Dieser Waschschrift wurde nochmals wiederholt. Die gewaschenen Partikel wurden in Natriumphosphatpuffer (siehe Tabelle 9.10) aufgenommen.

## 3. Schritt: Kopplung

In Tabelle 9.11 sind die eingesetzten Kopplungsmenge aufgeführt (Annahme: bei der Kopplung geht keine Aktivität der Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragmente verloren).

**Tabelle 9.11: Angaben zu den Kopplungsansätzen**

	Ansatz A	Ansatz B
Menge der Magnetpartikel	2 x 10 <sup>8</sup> Partikel	6 x 10 <sup>8</sup> Partikel
Anti-Dig-Fab-Fragmente [ $\mu\text{l}$ ]	---	300
Caseinlösung 0,1 %ig [ $\mu\text{l}$ ]	30	---
Natriumphosphatpuffer [ $\mu\text{l}$ ]	90	60
Ammoniumsulfatlösung [ $\mu\text{l}$ ]	60	180
Endvolumen [ $\mu\text{l}$ ]	180	540

Je Kopplungsansatz wurde somit eine Partikelmenge von 1 x 10<sup>9</sup> Partikel /ml erhalten. Die Ansätze wurden unter leichten Schwenken (auf Vortexer; Stufe 1) für 18 Stunden bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Partikel durch magnetische Separation (4 min) von dem Überstand abgetrennt.

## 4. Schritt: Wasch-/Blockschritt

Die Wasch- und Blockschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Um noch freie Bindungsstellen auf den Partikeln abzudecken, wurden die gekoppelten Magnetpartikel mit einer 0,1 % igen Casein-Lösung geblockt. Hierfür wurden zweimal 500  $\mu\text{l}$  Caseinlösung zu den Ansätzen gegeben und diese Suspensionen 10 min gemischt (Vortexer Stufe 1). Anschließend wurden die Suspensionen für

2 min in den Magneten gestellt und die Überstände abpipettiert. Der Waschschrift wurde zweimal mit 500 µl PBS-Puffer wiederholt.

Um für beide Ansätze die gleiche Partikelkonzentration ( $2 \times 10^8$  Partikel/ml) zu erhalten, erfolgte anschließend die Verdünnung der Magnetpartikel in PBS-Puffer. Diese Suspension diente als Arbeitssuspension. Hieraus wurden die entsprechenden Verdünnungen für die Entwicklung des Testverfahrens verdünnt.

Die Arbeitssuspensionen wurden jeweils mit PBS-Puffer 1:100 verdünnt. Somit wurde für die Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragment-Partikel (Suspension I) und für die Casein-Partikel (Suspension II) eine Partikelmenge von  $2 \times 10^6$  Partikel /ml erhalten. Bei Verwendung von 50 µl pro Assay entspricht dies einer absoluten Partikelmenge von  $1 \times 10^5$ . Für die Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragment-Partikel ergibt dies eine Enzymmenge (absolut) von 7,5 mU.

### 9.4.3 Assaydurchführung mittels Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragment-Magnetpartikeln

Für die Assaydurchführung wurde die Arbeitssuspension (Suspension I) der mit Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragmenten gekoppelten Magnetpartikel (siehe unter Punkt 0) verwendet. Ausgehend von dieser Arbeitssuspension ( $2 \times 10^6$  Partikel /ml; 7,5 mU/50 µl) erfolgte die weitere Verdünnung mit Casein-Partikeln ( $2 \times 10^6$  Partikel /ml; Suspension II). Es wurden Standard-Suspensionen mit 75 µU bis 300 µU erhalten. Die Verdünnung der Partikelsuspension ist in Tabelle 9.12 aufgeführt. Die Standardsuspensionen wurden während der Assaydurchführung auf Eis gelagert, um einen Verlust der Enzymaktivität zu vermeiden.

**Tabelle 9.12: Herstellung der Standard-Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Partikelsuspensionen**

Anti-Dig-F <sub>ab</sub> -Standard <sup>[1]</sup>	Verdünnung	Enzymaktivität/Assay [µU]
Standard 1	1:25	300
Standard 2	1:37,5	200
Standard 3	1:50	150
Standard 4	1:100	75

Für den Assay wurden 50  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Magnetpartikel-Suspension in ein Charm-Röhrchen pipettiert. Dies entspricht einer absoluten Partikelmenge von  $10^5$  pro Test. Nach Zugabe von 450  $\mu\text{l}$  Super-Signal-Reagenz wurde der Ansatz kurz gevortext und anschließend 5 s die Lumineszenz gemessen.

Um den zeitlichen Verlauf des CL-Signals verfolgen zu können, wurde für mehrere Stunden bzw. für 10 min alle 60 s die Messung wiederholt. Währenddessen wurde das Analysenröhrchen nicht aus dem Messraum genommen. Die Blankmessung erfolgte anhand von 50  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer bzw. 50  $\mu\text{l}$  Casein-Partikel mit 450  $\mu\text{l}$  SuperSignal-Reagenz.

Für die Untersuchung der Lagerstabilität der Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragment-gekoppelten Magnetpartikel wurde der Ansatz nach 0 bei 6°C im Kühlschrank bis 2 Wochen gelagert. Für die Untersuchungen wurde ausgehend von diesem Ansatz durch Zusatz von Casein gekoppelten Partikeln auf eine Absolutmenge von 150  $\mu\text{U}$  pro Test verdünnt (siehe Tabelle 9.12). Die Assaydurchführung wurde wie oben beschrieben vorgenommen. Es wurde nach 0, 1, 2, 6 und 14 Tagen jeweils für 10 min der zeitliche Verlauf des CL-Signals gemessen.

#### 9.4.4 Kopplung von PBP 2x\* an Magnetpartikeln

Die Kopplung von PBP 2x\* an Magnetpartikel wurde in Anlehnung an die Kopplung der Anti-Dig-Fab-Fragmente an Magnetpartikel (siehe unter Punkt 0) durchgeführt.

Abweichend hiervon wurden für den Kopplungsschritt (3. Schritt) die in Tabelle 9.13 aufgeführten Mengen an Kopplungsreagenzien eingesetzt. Das verwendete PBP 2x\* besaß eine Konzentration von 982 µg/ml, dies entspricht einer eingesetzten Menge von 49 µg PBP 2x\* pro Kopplungsansatz.

**Tabelle 9.13: Angaben zu den PBP 2x\*-Kopplungsansätzen**

	Ansatz A
Menge der Magnetpartikel	2 x 10 <sup>8</sup> Partikel
PBP 2x* [µl]	50
Natriumphosphatpuffer [µl]	70
Ammoniumsulfatlösung [µl]	60
Endvolumen [µl]	180

Je Kopplungsansatz wurde eine Partikelmenge von 10<sup>9</sup> Partikel/ml erhalten. Der Ansatz wurde unter leichtem Schwenken für 18 Stunden bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Partikel durch magnetische Separation (4 min) von dem Überstand abgetrennt und wie unter Abschnitt 0 gewaschen.

Um eine Partikelkonzentration von 2 x 10<sup>8</sup> Partikel/ml zu erhalten, erfolgte anschließend die Verdünnung der Magnetpartikel in PBS-Puffer. Diese Suspension wurde arbeitstäglich mit PBS-Puffer 1:50 verdünnt und diente als Arbeitssuspension. Es wurde eine Partikelsuspension mit einer Partikelmenge von 4 x 10<sup>6</sup> Partikel/ml erhalten. Aus dieser Arbeitssuspension wurden die entsprechend Konzentration für die Entwicklung des Testverfahrens verdünnt.

Bei Verwendung von 50 µl pro Assay entspricht dies einer absoluten Partikelmenge von 2 x 10<sup>5</sup> (entspricht 49 ng PBP 2x\*).

#### 9.4.5 Assaydurchführung mittels PBP 2x\*-Magnetpartikeln

Für die Überprüfung des Testverfahrens wurde der Assay nach Abbildung 6.51 durchgeführt. Die Dig-Ampi-Verdünnung betrug 1:10.000 (in PBS-Puffer). Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragmente wurden mit einer Verdünnung von 1:1000 (in 1%iger Caseinlösung) verwendet. Die Abtrennung überschüssiger Assaykomponenten (z. B. Dig-Ampi) wurde mittels des Magneten durchgeführt (magnetische Trennung). Nach jedem Waschschrift (PBS-Tween- und PBS-Puffer) wurde eine magnetische Trennung durchgeführt. Das Teströhrchen wurde hierfür für 2 min in den Magneten gestellt. Anschließend wurde durch Umkippen des Röhrchens, ohne dieses aus den Magneten zu nehmen, die überschüssige Lösung entfernt. Die Magnetpartikel verblieben an der Röhrchen-Wandung. Beim folgenden Waschschrift wurde die Wandung jeweils mit der entsprechenden Waschlösung gespült (kreisförmig).

Zum anschließenden Resuspendieren der Partikel wurden verschiedene Techniken getestet. Das Röhrchen wurde hierfür aus den Magneten genommen und je nach Arbeitstechnik, a) nicht geschwenkt, b) leicht geschwenkt oder c) für 1 min bei RT ins Ultraschallbad gestellt. Während der magnetischen Trennung wurde als weitere Technik anstatt des oben beschriebenen „Abgießens“ der überschüssigen Lösung, das „Abpipettieren“ der überschüssigen Lösung getestet. Das Teströhrchen verblieb während des „Abpipettierens“ im Magneten. Das „Abpipettieren“ wurde sehr vorsichtig durchgeführt, um ein Verlust an Magnetpartikeln zu vermeiden.

Folgende Leerwerte wurden betrachtet:

- Leerwert ohne Zugabe von Dig-Ampi
- Leerwert ohne Zugabe von Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-Fragmenten

Es wurden statt 500 µl der entsprechenden Assaykomponente 500 µl PBS-Puffer verwendet.

---

Die resultierende Chemilumineszenz wurde nach Zugabe von 500  $\mu$ l SuperSignal-Lösung nach genau 5 min gemessen. Während der 5 min standen die Testsuspensionen im Dunkeln.

## 10 Literaturverzeichnis

- (1) Kantiani, L.; Farré, M.; Barceló, D. Analytical methodologies for the detection of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk and feed samples. *Trend in Analytical Chemistry* **2009**, *28*, 729–744.
- (2) BfR. *BVL>Tierarzneimittel>Rückstände in Lebensmitteln>Archiv der Berichte zum Nationalen Rückstandskontrollplan>Jahresbericht 2009) zum Nationalen Rückstandskontrollplan>Bewertungsbericht 2009 des Bundesinstitutes für Risikobewertung* **2010** www.bvl.bund.de (accessed Dec 16, 2011).
- (3) Kroker, R. *Kompaktwissen Tierarzneimittelrückstände*; Behr's Verlag, 2003.
- (4) *Verordnung (EU) Nr. 37/2010 der Kommission vom 22. Dezember 2009 über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs*; ABl. L 15, vom **2010**.
- (5) Schmädicke, I. Nationaler Rückstandskontrollplan - Stärkung des Verbraucherschutzes durch gezielte Kontrollen bei tierischen Lebensmitteln. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* **2006**, *1*, 51–56.
- (6) Fleming, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Brit. J Exp Pathol* **1929**, *10*, 226–236.
- (7) Chain, E.; Florey, H.; Gardner, A.; Heatley, N.; Jennings, M.; Orr-Ewing, J.; Sanders, A. Penicillins as a therapeutic agent. *Lancet* **1940**, *II*, 226–228.
- (8) Abraham, E. P. History of  $\beta$ -lactam antibiotics. In *Antibiotics containing the  $\beta$ -lactam structure*; Demain, A. L.; Abraham, E. P., Eds.; Springer-Verlag, **1983**; 1–19.
- (9) Crowfoot, D.; Bunn, C.; Rogers-Low, B.; Turner-Jones, A. The x-ray crystallographic investigation of the structure of penicillin. In *The chemistry of penicillin*; Clark, H.; Johnson, J.; Robinson, R., Eds.; Princeton University Press: Princeton, **1949**; 310–366.
- (10) Gräfe, U. *Biochemie der Antibiotika: Struktur-Biosynthese-Wirkmechanismus*; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, **1992**.
- (11) Forth, W.; Henschler, D.; Rummel, W.; Förstermann, U.; Starke, K. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie*; Urban & Fischer Verlag: München, **2001**.
- (12) van Krimpen, P. C.; van Bennekom, W. P.; Bult, A. Penicillins and cephalosporines: Physicochemical properties and analyses in pharmaceutical and biological matrices. *Pharm. Weekbl Sci* **1987**, *9*, 1–23.
- (13) Elander, RP. Industrial production of beta-lactam antibiotics. *Appl Microbiol Biotechnol* **2003**, *61*, 385–392.

- (14) McGregor, D. Penicillins. In *Comprehensive heterocyclic chemistry*; W. Lwowski, Ed.; Pergamon Press: Oxford, **1984**; Vol. 7, 299–339.
- (15) Verdon, E. in L.M.L Nollet, F. Toldra (Eds.), *Handbook of Muscle Food Analysis*, CRC Press, Boca Raton, **2009**, 855-947
- (16) Cacciatore, G. *Screening auf Rückstände auf  $\beta$ -Lactam-Antibiotika in Milch: Entwicklung eines optischen Biosensor-Assays mit Penicillin-bindenden Proteinen*. Dissertation: Universität Wuppertal, **2005**. (urn:nbn:de:hbz:468-20050138)
- (17) Page, M. The mechanism of reactions of beta-lactam antibiotics. *Acc Chem Res* **17** **1984**, 177-151.
- (18) Finholdt, P.; Jürgensen, G.; Kristiansen, H. Catalytic Effect of Buffers on Degradation of Penicillin G in Aqueous Solution. *J Pharm Sci* **1965**, *54*, 387–393.
- (19) Hou, J.; Poole, J.  $\beta$ -Lactam antibiotics: their physicochemical properties and biological activities in relation to structure. *J Pharm Sci* **1971**, *60*, 503–532.
- (20) Testa, B.; Mayer, J. *Hydrolysis in drug and prodrug metabolism. Chemistry, biochemistry and enzymology*; Verl. Helevetica Chimica Acta: Zürich, **2003**.
- (21) Degelaen, J.; Loukas, S.; Freeney, J.; Roberts, G.; Burgen, A. A nuclear Magnetic Resonance Study of the Degradation of Penicillin G in Acidic Solution. *J Chem Soc II*, **1979**, 86–90.
- (22) Yamana, T.; Tsuji, A. Comparative stability of cephalosporins in aqueous solution: kinetics and mechanism of degradation. *J Pharm Sci* **1976**, *65*, 1563–1574.
- (23) Deshpande, A. D.; Baheti, K. G.; Chatterjee, N. R. Degradation of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Current Science* **2004**, *87*, 1684–1695.
- (24) Kaiser, G.; Kukulja, S. Modification of the  $\beta$ -lactam system. In *Cephalosporines and penicillins: chemistry and biology*; Flynn, E., Ed.; Academic Press: New York, **1972**; 125–133.
- (25) Riediker, S.; Rytz, A.; Stadler, R. H. Cold-temperature stability of five  $\beta$ -lactam antibiotics in bovine milk and milk extracts prepared for liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis. *Journal of Chromatography A* **2004**, *1054*, 359–363.
- (26) Schenck, F. J.; Friedman, S. L. The effect of storage at 4°C on the stability of ampicillin residues in raw milk. *Food Additives and Contaminants* **2000**, *17*, 675–677.
- (27) Verdon, E.; Fuselier, R.; Hurtaud-Pessel, D.; Couedor, P. Stability of penicillin antibiotic residues in meat during storage Ampicillin. *Journal of Chromatography A* **2000**, *882*, 135–143.
- (28) O'Brien, J. J.; Campbell, N.; Conaghan, T. Effect of cooking and cold storage on biologically active antibiotic residues in meat. *J. Hyg. Camb.* **1981**, *87*, 511–523.

- (29) Weidel, W.; Pelzer, H. Bagshaped macromolecules - a new outlook on bacterial cell walls. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1964**, *26*, 193–232.
- (30) Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J. *Brock. Biology of Microorganisms*; Pearson Education, Inc.: New Jersey, **2003**.
- (31) Linnett, P.; Strominger, J. Amidation and cross-linking of enzymatically synthesized peptidoglycan of *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Biological Chemistry* **1974**, *249*, 2489–2496.
- (32) Declour, J.; Ferain, T.; Deghorain, M.; Palumbo, E.; Hols, P. The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **1999**, *76*, 159–184.
- (33) Lengeler, J.; Drews, G.; Schlegel, H. *Biology of the prokaryotes*; Thieme: Stuttgart, **1999**.
- (34) Sleytr, U.; Messner, P.; Minnikin, D.; Heckels, J.; Virji, M.; Russell, R. Structure of bacteria and their envelopes. In *Bacterial cell surface techniques*; Hancock, I.; Poxton, I., Eds.; John Wiley & Sons: Chichester, **1988**, 1–30.
- (35) Waxman, D. J.; Strominger, J. L. Penicillin-Binding Proteins and the Mechanism of Action of  $\beta$ -Lactam Antibiotics. *Ann. Rev. Biochem.* **1983**, *52*, 825–869.
- (36) Ghuysen, J. M. Serine Beta-Lactamases and Penicillin-Binding Proteins. *Annual Review of Microbiology* **1991**, *45*, 37–67.
- (37) Hakenbeck, R.; Briese, T.; Ellenbrok, H. Antibodies against the benzylpenicilloyl-binding moiety as a probe for penicillin-binding proteins. *European Journal of Biochemistry* **1986**, *157*, 101–106.
- (38) Hakenbeck, R.; Kohiyama, M. Purification of penicillin-binding protein 3 from *Streptococcus Pneumoniae*. *European Journal of Biochemistry* **1982**, *127*, 231–236.
- (39) Terrak, M.; Ghosh, T.; van Hejenoort, J.; Van Beeumen, J.; Lampilas, M.; Aszodi, J.; Ayala, J.; Ghuysen, J.; Nguyen-Disteche, M. The catalytic, glycosyl transferase and acyl transferase module of the cell wall peptidoglycan-polymerizing penicillin-binding protein 1b of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **1999**, *34*, 350–364.
- (40) Schwartz, B.; Markwalder, J.; Wang, Y. Lipid II: total synthesis of the bacterial cell wall precursor and utilization as a substrate for glycosyltransfer and transpeptidation by penicillin-binding protein (PBP) 1b of *Escherichia coli*. *J Am Chem Soc* **2001**, *123*.
- (41) Goffin, C.; Ghuysen, J. M. Multimodular penicillin binding proteins: An enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **1998**, *62*, 1079–1093.

- (42) van der Linden, M. P. G.; Haan, L. de; Dideberg, O.; Keck, W. Site-directed mutagenesis of proposed active-site residues of penicillin-binding protein 5 from *Escherichia coli*. *Biochemical Journal* **1994**, *303*, 357–362.
- (43) Pares, S.; Mouz, N.; Pétilot, Y.; Hakenbeck, R.; Dideberg, O. X-ray structure of *Streptococcus pneumoniae* PBP2x, a primary penicillin target enzyme. *Nature structural biology volume 3* **1996**, *3*, 284–289.
- (44) Laible, G.; Keck, W.; Lurz, R.; Mottl, H.; Frere, J. M.; Jamin, M.; Hakenbeck, R. Penicillin-binding protein 2x of *Streptococcus pneumoniae*. Expression in *Escherichia coli* and purification of a soluble enzymatically active derivative. *European Journal of Biochemistry* **1992**, *207*, 943–949.
- (45) Maurer, P.; Rutschmann, J.; Klein, U.; Hakenbeck, R. *Überexpression, Reinigung und Analytik von membranassoziierten Proteinen - Penicillin-bindenden Proteinen. Praktikumsskript; Technische Universität Kaiserslautern, 2006.*
- (46) Todorova, K.; Hakenbeck, R. *Untersuchungen von Domänenstrukturen von Penicillin-bindenden Proteinen. Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Abteilung Mikrobiologie der Technischen Universität Kaiserslautern, 2007.*
- (47) Zhao, G. S.; Meier, T. I.; Kahl, S. D.; Gee, K. R.; Blaszcak, L. C. BOCILLIN FL, a sensitive and commercially available reagent for detection of penicillin-binding proteins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1999**, *43*, 1124–1128.
- (48) Heisig, P. Wirkungs- und Resistenzmechanismen der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. *Pharm. Unserer Zeit* **2006**, *5*, 400–408.
- (49) Tipper, D. J.; Strominger, J. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc Natl Acad Sci USA* **1965**, *54*, 1133–1141.
- (50) Adriaens, P.; Meesschaert, B.; Frère, J.; Vanderhaege, H.; Degelaen, J.; Ghuysen, J.; Eyssen, H. Stability of D-5,5-dimethyl- $\Delta^2$ -thiazoline-4-carboxylic acid in relation to its possible occurrence as a degradation product of penicillin by the exocellular DD-carboxypeptidase-transpeptidase from *Streptomyces* R61 and the membrane-bound DD-carboxypeptidase from *Bacillus stearothermophilus*. *J Biol Chem* **1978**, *253*, 1483–1490.
- (51) Frère, J.; Ghuysen, J.; Perkins, H. Interaction between exocellular DD-carboxypeptidase-transpeptidase from *Streptomyces* R61, substrate and  $\beta$ -lactam antibiotics. *European Journal of Biochemistry* **1975**, *57*, 353–359.
- (52) Nicholas, R.; Strominger, J. Site-directed mutants of a soluble form of penicillin-binding protein 5 from *Escherichia coli* and their catalytic properties. *J Biol Chem* **1988**, *263*, 2034–2040.

- (53) Williamson, R.; Hakenbeck, R.; Tomasz, A. The penicillin-binding proteins of *Streptococcus pneumoniae* grown under lysis-permissive and lysis-protective (tolerant) conditions. *FEMS Microbiol Lett* **1980**, *7*, 127–131.
- (54) Frère, J.; Ghuysen, J.; Iwatsubo, M. Kinetics of interaction between exocellular DD-carboxypeptidase-transpeptidase from *Streptomyces* R61 and  $\beta$ -lactam antibiotics. *European Journal of Biochemistry* **1975**, *57*, 343–351.
- (55) Blumberg, P.; Strominger, J. Inactivation of D-alanine carboxypeptidase by penicillins and cephalosporins is not lethal in *Bacillus subtilis*. *Proc Nat Acad Sci* **1971**, *68*, 2814–2817.
- (56) Nicholas, R.; Krings, S.; Tomberg, J.; Nicola, G.; Davies, C. Crystal structure of wild-type penicillin-binding protein from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 52826–52833.
- (57) Duez, C.; Vanhove, M.; Gallet, X.; Bouillenne, F.; Docquier, J.; Brans, A.; Frère, J. Purification and characterization of PBP4a, a new low-molecular weight penicillin-binding protein from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **2001**, *182*, 1595–1599.
- (58) Di Guilmi, A.; Mouz, N.; Andrieu, J.; Hoskins, J.; Jaskunas, S.; Gagnon, J.; Dideberg, O.; Vernet, T. Identification, purification and characterization of transpeptidase and glycosyltransferase domains of *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein 1a. *J Bacteriol* **1998**, *180*, 5652–5659.
- (59) Lepage, S.; Lakaye, B.; Galleni, M.; Thamm, I.; Crine, M.; Gros Lambert, S.; Frère, J. Saturation of penicillin-binding protein 1 by  $\beta$ -lactam antibiotics in growing cells of *Bacillus licheniformis*. *Mol Microbiol* **1995**, *16*, 365–372.
- (60) Philippon, A.; Dusart, J.; Joris, B.; Frère, J. The diversity, structure and regulation of  $\beta$ -lactamases. *Cell Mol Life Sci* **1998**, *54*, 341–346.
- (61) McCormick, A.; Whitney, C.; Farley, M.; Lynfield, R.; Harrison, L.; Bennett, N.; Schaffner, W.; Reingold, A.; Hadler, J.; Cieslak, P.; Samore, M.; Lipsitch, M. Geographic diversity and temporal trends of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *Nature Medicine* **2003**, *9*, 424–430.
- (62) Baquero, F. Gram-positive resistance: challenge for the development of new antibiotics. *J Antimicrob Chemother* **39 Supplement A** **1997**, 1–6.
- (63) Stürenburg, E.; Mack, D. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy and infection control. *J Infect* **2003**, *47*, 273–295.
- (64) Rolle, M.; Mayr, A. *Medizinische Mikrobiologie. Infektions- und Seuchenlehre*; Georg Thieme Verlag, **2007**.
- (65) Hakenbeck, R.; Coyette, J. Resistant penicillin-binding proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* **1998**, *54*, 332–340.

- (66) Massova, I.; Kollman, P. pKa, MM and QM studies of mechanisms of  $\beta$ -lactamases and penicillin-binding proteins: acylation step. *J Comp Chem* **2002**, 23, 1559–1576.
- (67) Olesky, M.; Hobbs, M.; Nicholas, R. Identification and analysis of amino acid mutations in porin IB that mediate intermediate-level resistance to penicillin and tetracycline in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**, 46, 2811–2820.
- (68) Löscher, W.; Ungemach, F. R.; Kroker, R. *Grundlagen der Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*; Paul Parey Verlag Berlin, **2006**.
- (69) Schneiderei, M. *Interview: Antibiotikaresistenz* **2009** [www.bft-online.de/de/schwerpunktthemen](http://www.bft-online.de/de/schwerpunktthemen).
- (70) Thomas, G.; Freund, A.; Gründig, F. Regelungen im Verkehr mit Lebensmitteln und Bedarfsgegenständen in Deutschland. In *Taschenbuch für Lebensmittelchemiker*, 3.<sup>th</sup> ed.; W. Frede, Ed.; Springer-Verlag: Berlin-Heidelberg, **2010**; pp 60–94.
- (71) Kleiner Markt mit großer Bedeutung. *TIERGESUNDHEIT im Blickpunkt* **2010**, 62, 2.
- (72) Tierarzneimittelmarkt 2010 in Deutschland. *TIERGESUNDHEIT im Blickpunkt* **2011**, 66, 3.
- (73) Tierarzneimittelmarkt in Deutschland 2011. Abgeschwächtes Wachstum. *TIERGESUNDHEIT im Blickpunkt*, **2012**, 69, 3.
- (74) Schneiderei, M. *Antibiotikaeinsatz in der Veterinärmedizin-Situation in Deutschland und anderen europäischen Veredelungsregionen*. Vortrag anlässlich der 20. Jahrestagung der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie **2006** [www.bft-online.de/de/schwerpunktthemen](http://www.bft-online.de/de/schwerpunktthemen). (accessed Oct 10, 2012)
- (75) *Verordnung (EG) Nr. 178/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 28. Januar 2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit*; ABl. L 31, **2002**.
- (76) *Verordnung (EG) Nr. 470/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 6. Mai 2009 über die Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Rückstände pharmakologisch wirksamer Stoffe in Lebensmitteln tierischen Ursprungs, zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates und zur Änderung der Richtlinie 2001/82/EG des Europäischen Parlaments und des Rates und der Verordnung (EG) Nr. 726/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates*; ABl. L 31, von **2002**.
- (77) *Verordnung (EWG) Nr.2309/93 des Rates vom 22. Juli 1993 zur Festlegung von Gemeinschaftsverfahren für die Genehmigung und Überwachung von Human- und Tierarzneimitteln und zur Schaffung einer Europäischen Agentur für die Beurteilung von Arzneimitteln*; (Abl. EG Nr. L214/1).

- (78) *European Medicines Agency* [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu). (accessed Oct 10, 2012)
- (79) G. Gallhoff, G. G. R. Die Europäische Union, die Europäische Gemeinschaft und ihre Rechtsordnung, die Europäische Lebensmittelkontrolle. In *Taschenbuch für Lebensmittelchemiker*, 3<sup>rd</sup> ed.; W. Frede, Ed.; Springer-Verlag: Berlin-Heidelberg, **2010**, 2–28.
- (80) BVL. *BVL > Untersuchungen > Referenzlaboratorien > EU-Referenzlabor (EURL)* **2012**, [www.bvl.bund.de](http://www.bvl.bund.de) (accessed Oct 10, 2012).
- (81) Gowik, P. Das Europäische Netzwerk für die Rückstandskontrolle. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* **2006**, *1*, 222–227.
- (82) Companyo, R.; Granados, M.; Guiteras, J.; Prat, M. D. Antibiotics in food: Legislation and validation of analytical methodologies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, *395*, 877–891.
- (83) W. Frede, Ed. *Taschenbuch für Lebensmittelchemiker*; Springer-Verlag: Berlin-Heidelberg, **2010**.
- (84) Tschiersky-Schöneburg, H.; Büttner, A. Organisation des gesundheitlichen Verbraucherschutzes auf Bundesebene. In *Taschenbuch für Lebensmittelchemiker*, 3<sup>rd</sup> ed.; W. Frede, Ed.; Springer-Verlag: Berlin-Heidelberg, **2010**; pp 95–104.
- (85) BVL. *Nationaler Rückstandskontrollplan (NRKP) und Einfuhrüberwachungsplan (EÜP) für Lebensmittel tierischen Ursprungs*. **2010** [www.bvl.bund.de/nrkp](http://www.bvl.bund.de/nrkp) (accessed Oct 10, 2012).
- (86) *Richtlinie 96/23/EG des Rates vom 29. April 1996 über Kontrollmaßnahmen hinsichtlich bestimmter Stoffe und ihrer Rückstände in lebenden Tieren und tierischen Erzeugnissen und zur Aufhebung der Richtlinie 85/358/EWG, 86/469/EWG und der Entscheidung 89/187/EWG und 91/664/EWG*; (ABl. EG L 125/10 vom 23.05.1996).
- (87) *BVL > Tierarzneimittel > Tierarzneimittelrückstände in Lebensmitteln > Archiv der Berichte > Jahresbericht 2009 zum Nationalen Rückstandskontrollplan* [www.bvl.bund.de](http://www.bvl.bund.de) (accessed Oct 10, 2012).
- (88) *Entscheidung 97/747/EG der Kommission vom 27. Oktober 1997 über Umfang und Häufigkeit der in der Richtlinie 96/23/EG des Rates vorgesehenen Probennahme zum Zweck der Untersuchungen in Bezug auf bestimmte Stoffe und ihre Rückstände in bestimmten tierischen Erzeugnissen*; (ABl. EG Nr. L 303/12 vom 6.11.1997).
- (89) *BVL > Tierarzneimittel > Tierarzneimittelrückstände in Lebensmitteln > Jahresbericht 2010 zum Einfuhrückstandskontrollplan*, [www.bvl.bund.de](http://www.bvl.bund.de) (accessed Oct 10, 2012).
- (90) *BVL > Tierarzneimittel > Tierarzneimittelrückstände in Lebensmitteln > Jahresbericht 2010 zum Nationalen Rückstandskontrollplan*, [www.bvl.bund.de](http://www.bvl.bund.de) (accessed Oct 10, 2012).

- (91) CVUA Karlsruhe Jahresbericht **2009**, Nachweis von Antibiotikarückständen in Fleisch, 47–48.
- (92) Hinkel, C.; Götz-Schmidt, E.-M.; Holtmannspötter, H. Nachuntersuchung positiver Hemmstoffbefunde in Bayern, 39. Lebensmittelchemikertag, Stuttgart-Hohenheim, 20.-22.09.2010. *Poster, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit*.
- (93) *Entscheidung 2002/657/EC von der Kommission zur Umsetzung der RL 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysenmethoden und die Auswertung von Ergebnissen*; ABI 221, **2002**.
- (94) Verdon, E. Antibiotic residues in muscle tissues of edible animal products. In *Handbook of Muscle Food Analysis*; Nollet, L. M. L.; Toldra, F., Eds.; CRC Press: Boca Raton, **2009**, 855–947.
- (95) Mitchell, J.; Griffiths, M.; McEwen, S.; McNab, W.; Yee, A. Antimicrobial Drug Residues in Milk and Meat: Causes, Concerns, Prevalence, Regulations, Tests, and Test Performance. *Journal of Food Protection* **1998**, *61*, 742–756.
- (96) Pikkemaat, M. G. Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, *395*, 893–905.
- (97) DSM. *Produktinformation Premi-Test*  
[www.dsm.com/en\\_US/html/premitest/home.htm](http://www.dsm.com/en_US/html/premitest/home.htm) (accessed Oct 10, 2012).
- (98) Cantwell, H.; O’Keeffe, M. Evaluation of the Premi-Test and comparison with the One-Plate Test for the detection of antimicrobials in kidney. *Food Additives and Contaminants: Part A* **2006**, *23*, 120–125.
- (99) Schneider, M. J.; Lehotay, S. J. A comparison of the FAST, Premi and KIS Test for screening antibiotic residues in beef kidney juice and serum. *Anal Bioanal Chem* **2008**, *390*, 1775–1779.
- (100) DSM Food Specialities. *Produktinformation BRT-Test AS Brillant*  
[www.dsm.com/en\\_US/html/dfs/dairy-products-tests.htm](http://www.dsm.com/en_US/html/dfs/dairy-products-tests.htm). (accessed Jan 11, 2011).
- (101) Copan Italia. *Produktinformation CMT-Copan Milk Test*  
[www.copanswabs.com/products/cmt/](http://www.copanswabs.com/products/cmt/) (accessed Jan 11, 2011).
- (102) Diserens, J.-M.; Henzelin, A. B.; Le Breton, M.-H.; Perroud, M.-C. S. Current situation & compilation of the commercially available screening methods for the detection of inhibitors/antibiotic residues in milk. *Bulletin of the International Dairy Federation* **2010**, *442*.
- (103) DSM Food Specialities. *Produktinformation Delvotest*  
[www.dsm.com/le/de\\_DE/delvotest/html/home.htm](http://www.dsm.com/le/de_DE/delvotest/html/home.htm). (accessed Oct 10, 2012).
- (104) Lottspeich, F.; Zorbas, H. *Bioanalytik*; Spektrum Verlag: Heidelberg, **1998**.

- (105) Märtlbauer, E. *Enzymimmuntests für antimikrobiell wirksame Stoffe*; Ferdinand Enke Verlag: Stuttgart, **1993**.
- (106) Crowther, J. R., Ed. *The ELISA guidebook*; Humana Press Inc., **2001**.
- (107) Bonwick, G. A.; Smith, C. J. Immunoassays: their history, development and current place in food science and technology. *International Journal of Food Science and Technology* **2004**, *39*, 817–827.
- (108) Cliquet, P.; Cox, E.; van Dorpe, C.; Schacht, E.; Goddeeris, B. M. Generation of class-selective monoclonal antibodies against the penicillin group. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49*, 3349–3355.
- (109) Litz, S. *Entwicklung und Charakterisierung enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von Penicillinen*. Dissertation; Ludwig-Maximilians-Universität München, **1995**.
- (110) Usleber, E.; Litz, S.; Märtlbauer, E. Production and characterization of group-specific antibodies against penicillin antibiotics. *Food and Agricultural Immunology* **1998**, *10*, 317–324.
- (111) Dietrich, R.; Usleber, E.; Märtlbauer, E.; The potential of monoclonal antibodies against ampicillin for the preparation of a multi-immunoaffinity chromatography for penicillins. *Analyst* **1998**, *123*, 2749–2754.
- (112) Strasser, A. *Entwicklung eines Biosensors zum Nachweis von Antibiotika und Sulfonamiden in Milch - Herstellung der immunochemischen Komponenten*. Dissertation; Ludwig-Maximilians-Universität-München, **2003**.
- (113) RANDOX. *Drug residues>ELISA tests>beta-lactam ELISA kit>Produktinformation* [www.randox.com](http://www.randox.com) (accessed Jan 11, 2011).
- (114) Zhang, Y.; Jiang, Y.; Wang, S. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Detect Benzylpenicilloic Acid, a Degradation Product of Penicillin G in Adulterated Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 8171–8175.
- (115) Nakamura, H.; Karube, I. Current research activity in biosensors. *Anal Bioanal Chem* **2003**, *377*, 446–468.
- (116) Baeumner, A. J. Biosensors for environmental pollutants and food contaminants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2003**, *377*, 434–445.
- (117) Ricci, F.; Volpe, G.; Micheli, L.; Palleschi, G. A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis. *Analytica Chimica Acta* **2007**, *605*, 111–129.
- (118) Petz, M. Recent applications of surface plasmon resonance biosensors for analyzing residues and contaminants in food. *Monatshefte für Chemie* **2009**, *140*, 953–964.

- (119) Knecht, B. G.; Strasser, A.; Dietrich, R.; Martlbauer, E.; Niessner, R.; Weller, M. G. Automated microarray system for the simultaneous detection of antibiotics in milk. *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 646–654.
- (120) Kloth, K.; Rye-Johnsen, M.; Didier, A.; Dietrich, R.; Märtlbauer, E.; Niessner, R.; Seidel, M. A regenerable immunochip for the rapid determination of 13 different antibiotics in raw milk. *Analyst* **2009**, *134*, 1433–1439.
- (121) Kloth, K.; Niessner, R.; Seidel, M. Development of an open stand-alone platform for regenerable automated microarrays. *Biosensors & Bioelectronics* **2009**, *24*, 2106–2112.
- (122) Charm, S. E.; Chi, R. Microbial receptor assay for the rapid detection and identification of seven families of antimicrobials in milk: collaborative study. *J Assoc Of Anal Chem* **1988**, *71*, 304–316.
- (123) Korsrud, G. O.; Craig D. C. Salisbury; Adrian C. E. Fesser; MacNeil, J. D. Investigation of Charm Test II receptor assays for the detection of antimicrobial residues in suspect meat samples. *Analyst* **1994**, *119*, 2737–2741.
- (124) Salter, R. Charm II System - Comprehensive Residue Analysis System For Honey. *APIACTA* **2003**, *38*, 198–206.
- (125) Charm Science Inc. >products>Charm II>Beta lactams>Produktinformation Charm II [www.charm.com](http://www.charm.com) (accessed Jan 11, 2011).
- (126) Chr. Hansen. >produkte>Hemmstofftests>Produktinformation  $\beta$ -Star [www.chr-hansen.de](http://www.chr-hansen.de) (accessed Jan 11, 2011).
- (127) Twinsensor. *Produktinformation Twinsensor BT* [www.twinsensor.com/bt.php](http://www.twinsensor.com/bt.php) (accessed Jan 11, 2011).
- (128) Cacciatore, G.; Petz, M.; Rachid, S.; Hakenbeck, R.; Bergwerff, A. A. Development of an optical biosensor assay for detection of beta-lactam antibiotics in milk using the penicillin-binding protein 2x\*. *Analytica Chimica Acta* **2004**, *520*, 105–115.
- (129) Lamar, J. *Entwicklung, Optimierung und Validierung eines rezeptorproteingestützten Mikrotiterplatten-Test zur Rückstandsanalytik von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika*. Dissertation: Universität Wuppertal, 2007. (urn:nbn:de:hbz:468-20070084)
- (130) Lamar, J.; Petz, M. Development of a receptor-based microplate assay for the detection of beta-lactam antibiotics in different food matrices. *Analytica Chimica Acta* **2007**, *586*, 296–303.
- (131) Samanidou, V. F.; Nisyriou, S. A.; Papadoyannis, I. N. Residue Analysis of Penicillins in Food Products of Animal Origin by HPLC: A review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2007**, *30*, 1145–1204.
- (132) Moreno-Bondi, M. C.; Marazuela, M. D.; Herranz, S.; Rodriguez, E. An overview of sample preparation procedures for LC-MS multiclass antibiotic determination in

- environmental and food samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, 395, 921–946.
- (133) Becker, M.; Zittlau, E.; Petz, M. Residue analysis of 15 penicillins and cephalosporines in bovine muscle, kidney and milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2004**, 520, 19–32.
- (134) Moats, W. A.; Romanowski, R. D. Determination of penicillin G in beef and pork tissues using an automated LC cleanup. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, 46, 1410–1413.
- (135) Moats, W. A.; Romanowski, R. D. Multiresidue determination of beta-lactam antibiotics in milk and tissues with the aid of high-performance liquid chromatographic fractionation for clean up. *Journal of Chromatography A* **1998**, 812, 237–247.
- (136) Blanchflower, W. J.; Hewitt, S. A.; Kennedy, D. G. Confirmatory Assay for the Simultaneous Detection of Five Penicillins in Muscle, Kidney and Milk Using Liquid Chromatography-Electrospray mass Spectrometry. *Analyst* **1994**, 119, 2595–2601.
- (137) Bruno, F.; Curini, R.; Di Corcia, A.; Nazzari, M.; Samperi, R. Solid-phase extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry for trace determination of beta-lactam antibiotics in bovine milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, 49, 3463–3470.
- (138) Msagati, T. A.; Nindi, M. M. Determination of  $\beta$ -Lactam residues in foodstuffs of animal origin using supported liquid membrane extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry* **2007**, 100, 836–844.
- (139) Riediker, S.; Diserens, J. M.; Stadler, R. H. Analysis of beta-lactam antibiotics in incurred raw milk by rapid test methods and liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, 49, 4171–4176.
- (140) Holstege, D. M.; Puschner, B.; Whitehead, G.; Galey, F. D. Screening and mass spectral confirmation of beta-lactam antibiotic residues in milk using LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, 50, 406–411.
- (141) Fagerquist, C. K.; Lightfield, A. R.; Lehotay, S. J. Confirmatory and Quantitative Analysis of  $\beta$ -Lactam Antibiotics in Bovine Kidney Tissue by Dispersive Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 1473–1482.
- (142) Mastovska, K.; Lightfield, A. R. Streamlining methodology for the multiresidue analysis of beta-lactam antibiotics in bovine kidney using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2008**, 1202, 118–123.
- (143) van Holthoon, F.; P. P. J. Mulder; E. O. van Bennekom; Heskamp, H.; Zuidema, T.; Quantitative analysis of penicillins in porcine tissues, milk and animal feed using

- derivatisation with piperidine and stable isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **2010**, 396, 307–3040.
- (144) Makarov, A.; Denisov, E.; Kholomeev, A.; Baischun, W.; Lange, O.; Strupat, K.; Horning, S. Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Analytical Chemistry* **2006**, 78, 2113–2120.
- (145) van der Heeft, E.; Y. J. C. Bolck; Beumer, B.; A. W. J. M. Nijrolder; A. A. M. Stolker; M. W. F. Nielen. Full-Scan Accurate Mass Selectivity of Ultra-Performance Liquid Chromatography Combined with Time-of-Flight and Orbitrap Mass Spectrometry in Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis. *J Am Soc Mass Spectrom* **2009**, 20, 451–463.
- (146) Garcia-Campana, A. M.; Baeyens, W. R. G., Eds. *Chemiluminescence in analytical chemistry*; Marcel Dekker Inc.: New York, Basel, **2001**.
- (147) Francis, P. S.; Hogan, C. F. Luminescence. In *Comprehensive Analytical Chemistry*; Koley, S. D.; Mckelvie, I. D., Eds.; Elsevier, **2008**; 54, 1–783.
- (148) Marquette, C. A.; Blum, L. J. Applications of the luminol chemiluminescent reaction in analytical chemistry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2006**, 385, 546–554.
- (149) Dodeigne, C.; Thunus, L.; Lejeune, R. Chemiluminescence as a diagnostic tool. A review. *Talanta* **2000**, 51, 415–439.
- (150) Rongen, H. A. H.; Hoetelmans, R. M. W.; Bult, A.; Bennekom, W. P. Chemiluminescence and immunoassay. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis* **1994**, 12, 433–462.
- (151) Skoog, D. A.; Leary, J. J. *Instrumentelle Analytik. Grundlagen - Geräte - Anwendungen*; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, 1996.
- (152) Kulmala, S.; Suomi, J. Current status of modern analytical luminescence methods. *Analytica Chimica Acta* **2003**, 500, 21–69.
- (153) García-Campaña, A. M.; Baeyens, W. R. G.; Zhang, X. Chemiluminescence-Based Analysis. In *Chemiluminescence in analytical chemistry*; Ana M. García-Campaña; Willy R. G. Baeyens, Eds.; Marcel Dekker Inc.: New York, Basel, **2001**; 42–61.
- (154) *bmglabtech>products>microplate-readers*  
<http://www.bmglabtech.com/products/microplate-reader> (accessed Aug 04, 2012).
- (155) *thermoscientific>Products>Microplate Readers* <http://www.thermoscientific.com> (accessed Aug 04, 2012).
- (156) Albrecht, H.O.. Über die Chemilumineszenz des Aminophthalsäure Anhydrids. *Z. Phys. Chem.* **1928**, 136, 321–330.

- (157) Gamiz-Garcia, L.; Garcia-Campana, A. M.; Soto-Chinchilla, J. J.; Huertas-Perez, J. F.; Gonzalez-Casado, A. Analysis of pesticides by chemiluminescence detection in the liquid phase. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry* **2005**, *24*, 927–942.
- (158) Easton, P. M.; Simmonds, A. C.; Rakishev, A.; Egorov, A. M.; Candeias, L. P. Quantitative model of the enhancement of peroxidase-induced luminol luminescence. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 6619–6624.
- (159) Merenyi, G.; Lind, J.; Eriksen, T. E. Luminol Chemiluminescence: Chemistry, Excitation, Emitter. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* **1990**, *5*, 53–56.
- (160) Vlasenko, S. B.; Arefyev, A. A.; Klimov, A. D.; Kim, B. B.; Gorovits, E. L.; Osipov, A. P.; Gavrilova, E. M.; Yegorov, A. M. An Investigation on the catalytic mechanisms of enhanced chemiluminescence: Immunochemical applications of this reaction. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* **1989**, *4*, 164–176.
- (161) Dotsikas, Y.; Loukas, Y. L. Effect of the luminol signal enhancer selection on the curve parameters of an immunoassay and the chemiluminescence intensity and kinetics. *Talanta* **2007**, *71*, 906–910.
- (162) Kuroda, N.; Shimoda, R.; Wada, M.; Nakashima, K. Lophine derivatives and analogues as new phenolic enhancers for the luminol-hydrogen peroxide-horseradish peroxidase chemiluminescence system. *Anal. Chim. Acta* **2000**, 131–136.
- (163) Thrope, G. H. G.; Kricka, L. J.; Moseley, S. B.; Whitehead, T. P. Phenols as Enhancers of the Chemiluminescent Horseradish Peroxidase-Luminol-Hydrogen Peroxide Reaction: Application in Luminescence-Monitored Enzyme Immunoassays. *Clinical Chemistry* **1985**, *31*, 1335–1341.
- (164) Kapeluich, Y. L.; Rubtsova, M. Y.; Egorov, A. M. Enhanced Chemiluminescence Reaction Applied to the Study of Horseradish Peroxidase Stability in the Course of p-Iodophenol Oxidation. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* **1997**, *12*, 299–308.
- (165) Dotsikas, Y.; Loukas, Y. L.; Siafaka, I. Determination of umbilical cord and maternal plasma concentrations of fentanyl by using novel spectrophotometric and chemiluminescence enzyme immunoassays. *Analytical Chimica Acta* **2002**, *459*, 177–185.
- (166) Champiat, D.; Roux, A.; Lhomme, O.; Nosenzo, G. Biochemiluminescence and Biomedical Applications. *Cell Biology and Toxicology* **1994**, *10*, 345–351.
- (167) Yu, F.-Y.; Vdovenko, M. M.; Wang, J.-J.; Sakharov, I. Y. Comparison of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays with Chemiluminescent and Colorimetric Detection for the Determination of Ochratoxin A in Food. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 809–813.

- (168) Sakharov, I. Y.; Berlina, A. N.; Zherdev, A.; Dzantiev, B. B. Advantages of Soybean Peroxidase over Horseradish Peroxidase as the Enzyme Label in Chemiluminescent Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Sulfamethoxy-pyridazine. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 3284–3289.
- (169) Roda, A.; Pasini, P.; Guardigli, M.; Baraldini, M.; Musiani, M.; Mirasoli, M. Bio- and chemiluminescence in bioanalysis. *Fresenius J Anal. Chem.* **2000**, *366*, 752–759.
- (170) Baeyens, W. R. G.; Schulman, S. G.; Calokerinos, A. C.; Zhao, Y.; García Campaña, A. M.; Nakashima, K.; De Keukeleire, D. Chemiluminescence-based detection: principles and analytical applications in flowing streams and in immunoassays. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **1998**, *17*, 941–953.
- (171) Robards, K.; Worsfold, P. J. Analytical applications of liquid-phase chemiluminescence. *Anal. Chim. Acta* **1992**, *266*, 147–173.
- (172) Marquette, C. A.; Blum, L. J. Chemoluminescent enzyme immunoassays: a review of bioanalytical applications. *Bioanalysis* **2009**, *1*, 1259–1269.
- (173) Roda, A.; Manetta, A. C.; Piazza, F.; Simoni, P.; Lelli, R. A rapid and sensitive 384-microtiter wells format chemiluminescent enzyme immunoassay for clenbuterol. *Talanta* **2000**, *52*, 311–318.
- (174) Lin, S.; Han, S. Q.; Liu, Y. B.; Xu, W. B.; Guan, G. Y. Chemiluminescence immunoassay for chloramphenicol. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2005**, *382*, 1250–1255.
- (175) Xin, T.-B.; Liang, S.-X.; Wang, X.; Li, H.; Lin, J.-M. Determination of estradiol in human serum using magnetic particles-based chemiluminescence immunoassay. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *627*, 277–284.
- (176) Soler, C.; Girotti, S.; Ghini, S.; Fini, F.; Montoya, A.; Manclús, J. J.; Mañes, J. Analysis of Chlorpyrifos in Water, Fruit Juice and Honeybee Extract by Chemiluminescent Elisa. *Analytical Letters* **2008**, *41*, 2539–2553.
- (177) Magliulo, M.; Mirasoli, M.; Simoni, P.; Lelli, R.; Portanti, O.; Roda, A. Development and Validation of an Ultrasensitive Chemiluminescent Enzyme Immunoassay for Aflatoxin M1 in Milk. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3300–3305.
- (178) Botchkareva, A. E.; Ermin, S. A.; Montoya, A.; Manclús, J. J.; Mickova, B.; Rauch, P.; Fini, F.; Girotti, S. Development of chemiluminescent ELISAs to DDT and its metabolites in food and environmental samples. *Journal of Immunological Methods* **2003**, *283*, 45–57.
- (179) Masashige, S. Functional Magnetic Particles for Medical Application. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2002**, *94*, 606–613.

- (180) Saiyed, Z. M.; Telang, S. D.; Ramchand, C. N. Application of magnetic techniques in the field of drug discovery and biomedicine. *BioMagnetic Research and Technology* **2003**, *1*, 2.
- (181) Zacco, E.; Adrian, J.; Marco, M.-P.; Alegret, S.; Pividori, M. I. Electrochemical magneto immunosensing of antibiotic residues in milk. *Biosensors & Bioelectronics* **2007**, *22*, 2184–2191.
- (182) Olsvik, O.; Popovic, T.; Skjerve, E.; Cudjoe, K. S.; Hornes, E.; Ugelstad, J.; Uhlen, M. Magnetic Separation Techniques in Diagnostic Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* **1994**, *7*, 43–54
- (183) Šafařík, I.; Šafaříková, M. Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *Journal of Chromatography B* **1999**, *722*, 33–53.
- (184) *invitrogen.com > dynabeads > dynabeads m-270 > dynabeads® M-270 Epoxy > support docs > manuals & product inserts.* (accessed Oct 10, 2012)
- (185) Safarik, I.; Safarikova, M. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. *BioMagnetic Research and Technology* **2004**, *2*, 7.
- (186) Lawruk, T. S.; Gueco, A. M.; Mihaliak, C. A.; Dolder, S. C.; Dial, G. E.; Herzog, D. P.; Rubio, F. M. Development of a Magnetic Particle-based Enzyme Immunoassay for Chlorpyrifos in Water. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 2913–2918.
- (187) Lea, T.; Vartdal, F.; Davies, C.; Ugelstad, J. Magnetic monosized polymer particles for fast and specific fractionation of human mononuclear cells. *Scand. J. Immunol.* **1985**, *22*, 207–216.
- (188) Uhlén, M. Magnetic separation of DNA. *Nature* **1989**, *340*, 730–734.
- (189) Stannard, C. J.; Patel, P. D.; Haines, S. D.; Gibbs, P. A. Magnetic enzyme immunoassay (MEIA) for staphylococcal enterotoxin B. In *The Society for Applied Bacteriology Technical Series no. 24. Immunological Techniques in Microbiology*; Grange, J. M.; Fox, A.; Morgan, N. L., Eds.; Blackwell Scientific Publications: Oxford, **1987**.
- (190) Liabakk, N. B.; Nustad, K.; Espevik, T. A rapid and sensitive immunoassay for tumor necrosis factor using magnetic monodisperse polymer particles. *J. Immunol. Methods* **1990**, *134*, 253–259.
- (191) Gundersen, S. G.; Haagensen, I.; Jonassen, T. O.; Figenshau, K. J.; De Jonge, N.; Deedler, A. M. Magnetic bead antigen capture enzyme-linked immunoassay in microtiter trays for rapid detection of schistosomal circulating anodic antigen. *J. Immunol. Methods* **1992**, *148*, 1–8.
- (192) Cudjoe, K. S.; Thorsen, L. I.; Sørensen, T.; Reseland, J.; Olsvik, Ø.; Granum, P. E. Detection of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in faecal and food samples using immunomagnetic separation (IMS)-ELISA. *International Journal of Food Microbiology* **1991**, *12*, 313–322.

- (193) McNeill, A.; Kastrup, J.; Bäckström, B. T. A Simplified Cytokine Immunoassay Using Magnetic Polymer Particles. *Scand. J. Immunol.* **2004**, *60*, 287–291.
- (194) Zacco, E.; Pividori, M. I.; Alegret, S. Electrochemical Magnetoimmunosensing Strategy for the Detection of Pesticides Residues. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 1780–1788.
- (195) Richardson, J.; Hawkins, P.; Luxton, R. The use of coated paramagnetic particles as a physical label in an magneto-immunoassay. *Biosensors & Bioelectronics* **2001**, *16*, 989–993.
- (196) Frey, A.; Meckelein, B.; Externest, D.; Schmidt, M. A. A stable and highly sensitive 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Immunological Methods* **2000**, *233*, 47–56.
- (197) Hiepler, C. *Capsaicinoide in Capsicum-Früchten definierter Herkunft und ihre Stabilität bei Verarbeitung und Lagerung*. Dissertation: Universität Wuppertal, **2004**. (urn:nbn:de:hbz:468-20040280)
- (198) Koolman, J.; Röhm, L.-H. *Taschenatlas der Biochemie*; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York, **1994**.
- (199) Gallati, H.; Pracht, I. Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien und Optimierung der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **1985**, *23*, 453–460.
- (200) A. K. John Goka; Michael J. G. Farthing. The use of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine as a peroxidase substrate in microplate enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Immunoassay* **1987**, *8*, 29–41.
- (201) Grotjan, H. D.; Keel, B. A. *Data Interpretation and Quality Control*; Academic Press, **1996**.
- (202) Krämer, J. *Lebensmittelmikrobiologie*; UTB-Verlag: Stuttgart, **2002**.
- (203) Deutsches Institut für Normung e.V. Chemische Analytik: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen-Begriffe, Verfahren, Auswertung. DIN32645, ICS 71.040.01; DIN Deutsches Institut für Normung e.V.
- (204) Küster-Thiel. *Rechentafeln für die chemische Analytik*; Walter de Gruyter: Berlin, New York, **2002**.
- (205) Steliopoulos, P. *VBA-Programm zur Bestimmung der Verfahrenskennndaten eines ELISAs*: CVUA Karlsruhe, **2009**.
- (206) Kaiser, R.; Gottschalk, G. *Elementare Tests zur Beurteilung von Messdaten. Soforthilfe für statistische Tests mit wenigen Messdaten*; Bibliographisches Institut AG: Mannheim, **1972**.
- (207) Andrew, S. M. Effect of fat and protein content of milk from individual cows on the specificity rates of antibiotic residues screening tests. *J. Dairy Sci* **2000**, *83*, 2992–2997.

- (208) Gustavsson, E. *SPR biosensor analysis of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk*. Doctoral thesis: Uppsala, 2003.
- (209) Ding, K.; Zhao, C.; Cao, Z.; Liu, Z.; Liu, J.; Zhan, J.; Ma, C.; Xi, R. Chemiluminescent Detection of Gatifloxacin Residue in Milk. *Analytical Letters* **2009**, *42*, 505–518.
- (210) Zhang, S.; Zhang, Z.; Shi, W.; Eremin, S. A.; Shen, J. Development of a chemiluminescent ELISA for Determining Chloramphenicol in Chicken Muscle. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 5718–5722.
- (211) Tian-Bing, X.; Shu-Xuan, L.; Xu, W.; Haifang, L.; Jin-Ming, L. Determination of estradiol in human serum using magnetic particles -based chemiluminescence immunoassay. *Analytica Chimica Acta* **2008**, *627*, 277–284.
- (212) Lämmlli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
- (213) Bradford, M. M. A rapid and sensitive methode for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **1976**, *72*, 248–254.
- (214) Jamin, M.; Damblon, C.; Millier, S.; Hakenbeck, R.; Frere, J. M. Penicillin-binding protein 2x of Streptococcus-pneumoniae – enzymtic activities and interactions with beta-lactams. *Biochemical Journal* **1993**, *292*, 735–741.

## 11 Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
6-ACA	6-Aminocephalosporansäure
Ampi	Ampicillin
AMG	Arzneimittelgesetz
ANOVA	Analysis of Variance
6-APA	6-Aminopenicillansäure
APS	Ammoniumperoxosulfat
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BfT	Bundesverband für Tiergesundheit
BL	Biolumineszenz
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
BPA	Benzylpenicilloinsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicher- heit
CE	Kapillarelektrophorese
CL	Chemilumineszenz
CRLs	Community Reference Laboratories
CVUA	Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt
Da	Dalton
DIG	Digoxigenin
Dig-Ampi	Digoxigenin-Ampicillin-Konjugat
DIN	Deutsche Institut für Normung

---

DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EG	Erfassungsgrenze
ELISA	Enzym-linked-immunosorbent-assay
EMA	European Medicines Agency
EÜP	Einfuhrüberwachungsplan
ESI	Electrospray-Ionisation
FAO	Welternährungsorganisation
FIA	Flow Injection Analysis
FL	Fluoreszenz
FVO	Food and Veterinary Office
GlcNac	N-Acetylglucosamin
GST	Glutathion-S-Transferase
HMW PBP	PBP mit großem Molekulargewicht
HPLC	High performance liquid chromatography
HRP	Horse Radish Peroxidase, Meerrettich-Peroxidase
IC	Inhibition concentration
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
LC	Liquid Chromatography
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
MG	Molekulargewicht
MRL	Maximum residue limit

---

MS	Massenspektrometrie
MurNac	N-Acetylmuraminsäure
NG	Nachweisgrenze
NRKP	Nationale Rückstandskontrollplan
NRL	Nationales Referenzlabor
PASA	Parallel affinity sensor array
PBP	Penicillin-bindendes Protein
PBS	Phosphate-buffered saline
PF	Prüfgröße
PIP	p-Iodophenol
pKa	Dissoziationskonstante
PL	Photolumineszenz
RLU	Relative Light Units
RT	Raumtemperatur
s	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidelektrophorese
SPR	Surface plasmon resonance
TEMED	Tetramethylethylamin
TLC	Thin layer chromatography
TMB	Tetramethylbenzidin
TOF	Time of flight
UV	Ultraviolette Strahlung
VBA	Visual basic for application
VK	Variationskoeffizient

WHO Weltgesundheitsorganisation

## 12 Anhang

**Tabelle 12.1: Experimenteller Versuchsplan und Responsewerte des Full Factorial Screening-Designs für den kolorimetrischen Assay**

		Tierart	Gewebe	Individuum	Extinktion
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
Cube001a	<b>1</b>	Rind	Muskel	A	0.400
Cube001b	<b>2</b>	Rind	Muskel	A	0.4630
Cube001c	<b>3</b>	Rind	Muskel	A	0.3860
Cube002a	<b>4</b>	Schwein	Muskel	A	0.2730
Cube002b	<b>5</b>	Schwein	Muskel	A	0.2620
Cube002c	<b>6</b>	Schwein	Muskel	A	0.2810
Cube003a	<b>7</b>	Rind	Niere	A	0.7880
Cube003b	<b>8</b>	Rind	Niere	A	0.5470
Cube003c	<b>9</b>	Rind	Niere	A	0.5100
Cube004a	<b>10</b>	Schwein	Niere	A	0.4930
Cube004b	<b>11</b>	Schwein	Niere	A	0.5090
Cube004c	<b>12</b>	Schwein	Niere	A	0.5900
Cube005a	<b>13</b>	Rind	Muskel	B	0.3800
Cube005b	<b>14</b>	Rind	Muskel	B	0.3730
Cube005c	<b>15</b>	Rind	Muskel	B	0.4710
Cube006a	<b>16</b>	Schwein	Muskel	B	0.3200
Cube006b	<b>17</b>	Schwein	Muskel	B	0.3200
Cube006c	<b>18</b>	Schwein	Muskel	B	0.2440
Cube007a	<b>19</b>	Rind	Niere	B	0.6070
Cube007b	<b>20</b>	Rind	Niere	B	0.5670
Cube007c	<b>21</b>	Rind	Niere	B	0.5100
Cube008a	<b>22</b>	Schwein	Niere	B	0.5980
Cube008b	<b>23</b>	Schwein	Niere	B	0.5720
Cube008c	<b>24</b>	Schwein	Niere	B	0.5590

**Tabelle 12.2: Experimenteller Versuchsplan und Responsewerte des Full Factorial Screening-Designs für den CL-Assay**

		Tierart	Gewebe	Individuum	RLU
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
Cube001a	<b>1</b>	Rind	Muskel	A	1.5547e+05
Cube001b	<b>2</b>	Rind	Muskel	A	1.4141e+05
Cube001c	<b>3</b>	Rind	Muskel	A	1.6454e+05
Cube002a	<b>4</b>	Schwein	Muskel	A	1.2152e+05
Cube002b	<b>5</b>	Schwein	Muskel	A	1.3838e+05
Cube002c	<b>6</b>	Schwein	Muskel	A	1.2463e+05
Cube003a	<b>7</b>	Rind	Niere	A	2.0560e+05
Cube003b	<b>8</b>	Rind	Niere	A	2.0567e+05
Cube003c	<b>9</b>	Rind	Niere	A	2.2252e+05
Cube004a	<b>10</b>	Schwein	Niere	A	2.5344e+05
Cube004b	<b>11</b>	Schwein	Niere	A	2.2760e+05
Cube004c	<b>12</b>	Schwein	Niere	A	2.4097e+05
Cube005a	<b>13</b>	Rind	Muskel	B	1.8661e+05
Cube005b	<b>14</b>	Rind	Muskel	B	1.5617e+05
Cube005c	<b>15</b>	Rind	Muskel	B	1.5848e+05
Cube006a	<b>16</b>	Schwein	Muskel	B	2.3799e+05
Cube006b	<b>17</b>	Schwein	Muskel	B	1.6540e+05
Cube006c	<b>18</b>	Schwein	Muskel	B	1.2973e+05
Cube007a	<b>19</b>	Rind	Niere	B	2.1444e+05
Cube007b	<b>20</b>	Rind	Niere	B	1.8710e+05
Cube007c	<b>21</b>	Rind	Niere	B	3.1524e+05
Cube008a	<b>22</b>	Schwein	Niere	B	2.4509e+05
Cube008b	<b>23</b>	Schwein	Niere	B	4.1654e+05
Cube008c	<b>24</b>	Schwein	Niere	B	2.0701e+05

Tabelle 12.3: Daten zur Überprüfung des Geräteinflusses auf den kolorimetrischen Assay

	Extinktion-Leerwert	
	Fluostar	BioRad
1	1,611	1,547
2	0,536	0,575
3	1,060	1,035
4	1,531	1,508
5	1,575	1,568
6	1,593	1,569
7	0,810	0,852
8	1,641	1,619
9	0,598	0,607
10	1,021	1,026
11	1,547	1,566
12	1,726	1,621
13	0,727	0,701
14	0,742	0,888
15	1,621	1,601
16	0,476	0,503
17	1,032	0,989
18	1,509	1,414
19	0,922	0,963
20	0,957	1,035

Tabelle 12.4: Daten zur Überprüfung des Bearbeitereinflusses auf den CL-Assay

Niere	Signal [RLU]	
	Bearbeiter 1	Bearbeiter 2
1	467205	499115
2	329735	480195
3	302600	420995
4	319430	358445
5	323475	357235
6	415910	259330
7	340385	463030
8	295035	468170
9	361365	498475
10	347185	420120
11	382100	355650
12	334730	330880
13	275650	515225
14	315495	523080
15	265305	381370
16	223770	341805
17	212945	372870
18	277575	260570
19	369570	216115
20	337795	477910

**Tabelle 12.5: Kalibrierkurven zur Bestimmung der NG und EG mittels kolorimetrischen Assay**

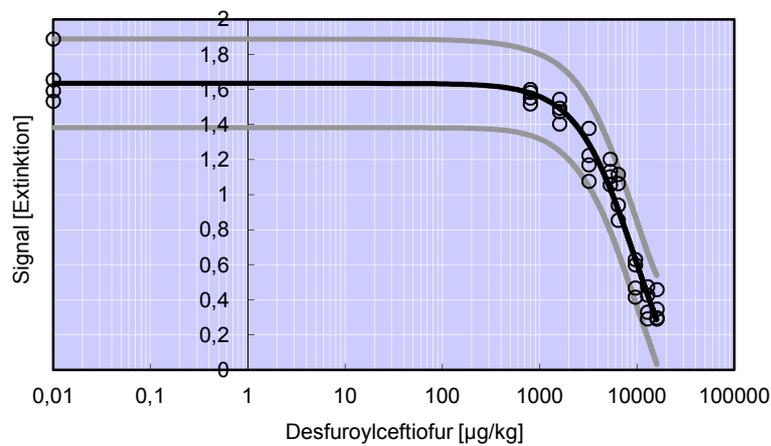
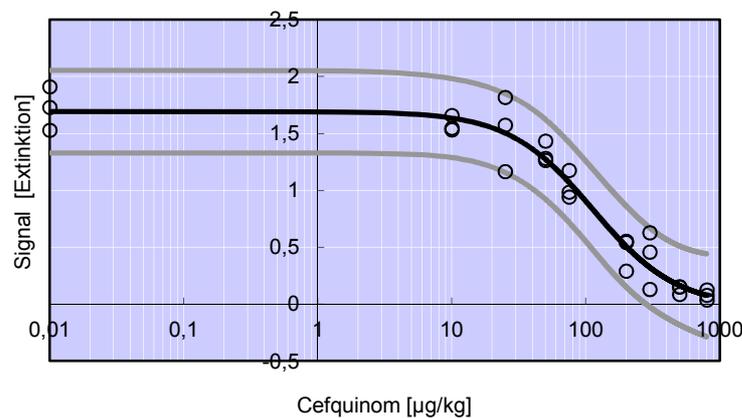
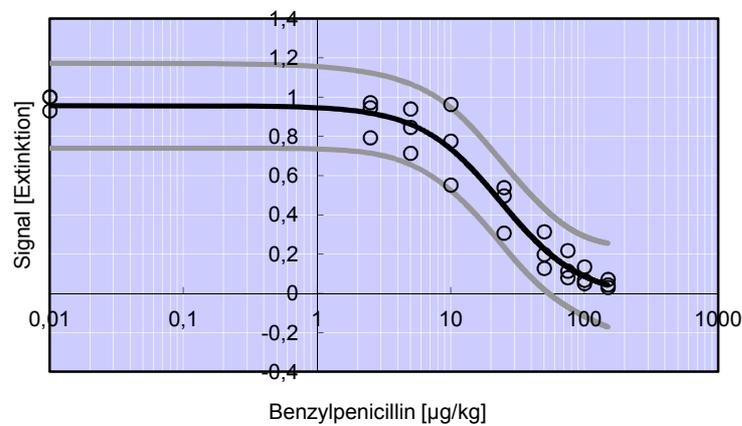


Tabelle 12.6: Kalibrierkurven zur Bestimmung der NG und EG mittels CL-Assay

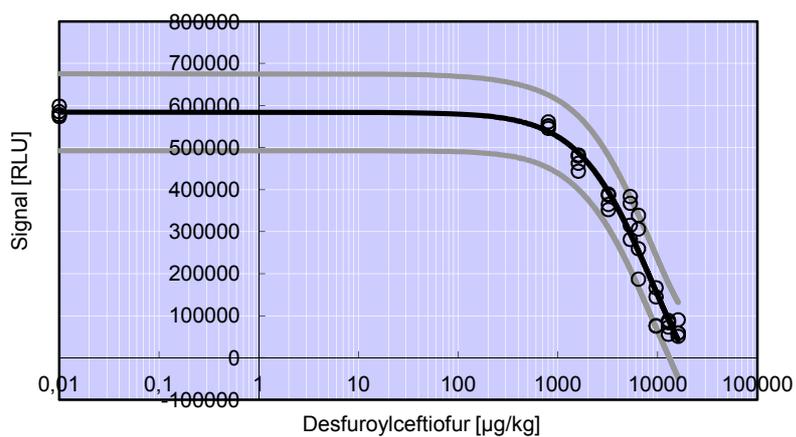
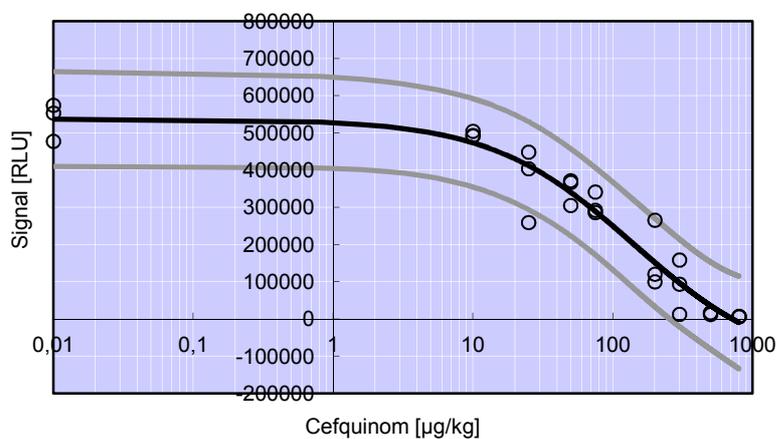
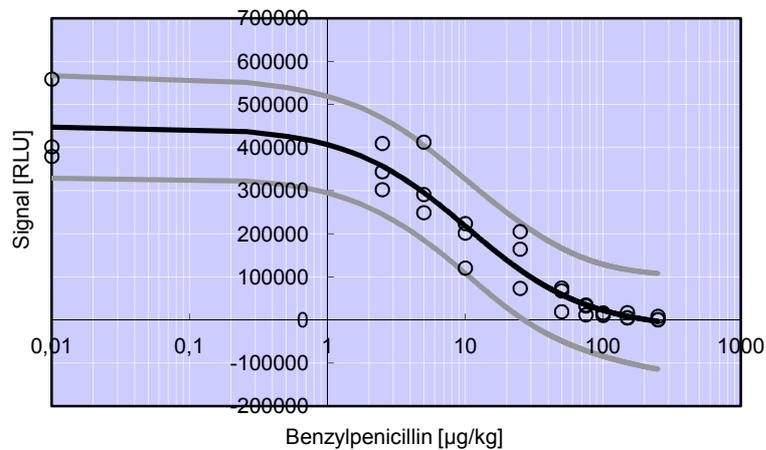


Tabelle 12.7: Daten zu Blankwerten der Casein-Magnetpartikel (zu Abbildung 6.46)

t [min]	Signal [RLU]				
	1x10 <sup>7</sup> Beads	1x10 <sup>6</sup> Beads	4x10 <sup>5</sup> Beads	2x10 <sup>5</sup> Beads	1x10 <sup>5</sup> Beads
1	173736	4420	603	409	541
2	188980	3955	502	262	285
3	166551	3065	301	146	185
4	127114	2507	192	92	146
5	94412	1950	130	100	76
6	55989	1981	107	61	115
7	49601	1609	130	100	107
8	38469	1509	107	69	92
9	28799	1540	100	38	107
10	24146	1300	107	53	84

**Tabelle 12.8: Daten zum Zeitverlauf des CL-Signals mit Anti-Dig-F<sub>ab</sub>-gekoppelten Magnetpartikeln (zu Abbildung 6.47)**

<b>t [min]</b>	<b>Signal [RLU]</b>  <b>1x10<sup>5</sup> Partikel</b>  <b>300 µU</b>
0,5	1466755
1	1497769
2	1544825
3	1574128
4	1586260
5	1447625
6	1433016
7	1419676
8	1409457
9	1407227
10	1398332
20	1020959
30	871121
60	728484
120	537994
220	391431
340	304009
360	285932