

**Gewinnung von Antikörpern gegen ein bakterielles
Zellwandpeptid als multispezifische Rezeptoren für die
Rückstandsanalytik von β -Lactam- und
Glykopeptidantibiotika**

Dem Fachbereich Chemie der Bergischen Universität - Gesamthochschule Wuppertal
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

— Dr. rer. nat. —

vorgelegte

Dissertation

von

Joachim Schlösser

aus Wuppertal

Wuppertal 2000

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung und unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. M. Petz

an der Bergischen Universität - Gesamthochschule Wuppertal im Fachbereich Chemie,
Arbeitsgruppe Lebensmittelchemie

in der Zeit von Januar 1997 bis August 2000

Dank

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Petz für die interessante Themenstellung, die intensive Betreuung sowie für die gewährten Freiheiten bei der Durchführung dieser Arbeit. Seine zahlreichen Ratschläge und Gespräche waren mir eine große Hilfe.

Ebenso nachdrücklich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. E. Usleber für die Übernahme der Immunisierung, für zahlreiche Hilfestellungen und wertvolle Diskussionen bei Planung und Durchführung der immunologischen Experimente sowie für die Überlassung diverser Immunreagenzien.

Herrn Prof. Dr. H. Guth danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Mein besonderer Dank gilt ebenfalls Frau M. Straka für die Durchführung der Titerbestimmungen sowie für die vielen praktischen Tipps bei der Durchführung von ELISA-Experimenten.

Weiterhin möchte ich Frau Dr. E. Müller-Seitz für das Interesse an der Thematik dieser Arbeit und die tiefgründige und kritische Hinterfragung der gewonnenen Ergebnisse sowie für die Sorgfalt bei der Durchsicht der Arbeit danken.

Herrn Dr. Johannsen von der landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalt in Kiel danke ich für die Überlassung des Avoparcin-Standards sowie der Avoparcin-haltigen Futtermittel.

Weiterhin danke ich folgenden Personen: Herrn Dr. M. Kirschbaum und Herrn Dr. M. Roggel für die hilfreiche Beratung und Unterstützung während der Planung und Durchführung diverser Peptidsynthesen, Herrn Prof. Dr. W. Reinecke für die Beratung in mikrobiologischen Fragestellungen und das Interesse an dieser Arbeit sowie meiner Schwester Frau Dr. S. Schlösser für die Erläuterung medizinischer Fragestellungen und Fachbegriffe.

Meinen lieben Kolleginnen und Kollegen danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, in der diese Arbeit entstanden ist. Frau C. Rometsch danke ich insbesondere für die Herstellung von verdeckten Kontrollanalysen und Herrn Dr. N. Dillhage für die ausgezeichnete Organisation im Arbeitskreis.

Schließlich möchte ich meinen Eltern und meiner Verlobten für ihre Geduld und liebenswürdige Geduld und Unterstützung danken.

Für die finanzielle und technische Unterstützung während dieser Arbeit sei der Bergischen Universität-Gesamthochschule Wuppertal mein Dank ausgesprochen.

Für Anja

Meinen Eltern in Dankbarkeit

Abstract

A novel approach was investigated to produce multi-specific antisera equally useful for the detection of β -lactam and glycopeptide antibiotics which was based on the natural mode of action of both classes of antibiotics. In addition a novel mechanism of a specific enzyme immunoassay was established which proved to be useful for the detection of the glycopeptide antibiotic avoparcin in animal feed.

For the development of multi-specific antisera, the peptide N α -acetyl-L-lysiny-D-alanyl-D-alanine (N α Ac-Lys-D-Ala-D-Ala) was chosen as hapten for immunization instead of using the respective antibiotics. This peptide is the natural substrate of the D,D-transpeptidase reaction which is essential for synthesis of bacterial cell walls. β -lactam antibiotics are supposed to be molecular mimics of D-Ala-D-Ala, and binding of these antibiotics to the active site of a D,D-transpeptidase leads to an irreversible inhibition of this enzyme. In contrast, glycopeptide antibiotics form complexes with D-Ala-D-Ala-terminated peptides. In this complex D-Ala-D-Ala is no longer available for the D,D-transpeptidase reaction.

Antibodies raised against D-Ala-D-Ala can be expected to have binding characteristics similar to bacterial D,D-transpeptidases. On the one hand they are supposed to bind D-Ala-D-Ala-terminated peptides as well as β -lactam antibiotics and on the other hand the binding to D-Ala-D-Ala-terminated peptides should be suppressed in the presence of glycopeptide antibiotics. Such antibodies could be useful tools in screening tests for penicillin residues in milk and meat as well as for the glycopeptide antibiotic avoparcin which was widely used as feed additive until its ban in 1997.

The peptide N α Ac-Lys-D-Ala-D-Ala was synthesized using the NHS-ester method. In addition the preparation of further peptides e.g. N α -acetyl-L-lysiny-L-alanyl-L-alanine is described. All peptides and intermediates were characterized using spectroscopic (IR) and chromatographic (DC, HPLC) methods. For the development of group specific antibodies N α Ac-Lys-D-Ala-D-Ala was conjugated to glucose oxidase (GOD) using the periodate method. A GOD-ampicillin conjugate was prepared in the same manner. In order to develop several variations of enzyme immunoassays and enzyme receptor assays, peptides and antibiotics were conjugated to horseradish peroxidase (HRP) and bovine serum albumine (BSA) using the glutaraldehyde and periodate method. N α Ac-Lys-D-Ala-D-Ala conjugates were characterized using a stereo-specific HPLC method to quantify the amount of bound D-Alanine. In addition the successful synthesis of all conjugates was shown in several specific enzyme immunoassays or enzyme receptor assays.

The GOD-N α Ac-Lys-D-Ala-D-Ala conjugate was given intradermally to three rabbits. After six weeks specific antibodies against N α Ac-Lys-D-Ala-D-Ala were detected in all rabbits. Even after a re-immunisation with the GOD-ampicillin conjugate no cross-reactivity with β -lactam antibiotics was observed. This did not disprove the concept as shown by binding studies with various peptides (epitope mapping). Although D-Ala-D-Ala was essential for binding, only N α Ac-Lys-D-Ala-D-Ala gave a sufficient fit to the antibodies' binding sites. This fact makes the binding sites of the antibodies different from that of D,D-transpeptidases with the consequence that β -lactams were not recognized. For glycopeptide antibiotics, more successful results with the produced rabbit antibodies can be reported. Glycopeptide antibiotics form a complex with the N α Ac-Lys-D-Ala-D-Ala terminus of the conjugates used in several ELISA tests. Thus it prevents the N α Ac-Lys-D-Ala-D-Ala terminus to be recognised by the antibodies. These results were in accordance with the concept outlined and showed that it was successful in principle.

Finally, this approach was used for the development of a novel competitive enzyme immunoassay. Studies involving a wide variety of different feed samples with avoparcin concentrations commonly used before the ban of avoparcin, showed that this test system is applicable for the screening of the illegal use of avoparcin in feed for food producing animals.

Theoretischer Teil

1 Einleitung

2 Penicilline und Glykopeptidantibiotika

2.1 Geschichtlicher Überblick	3
2.2 Struktur und physiko-chemischen Eigenschaften	5
2.3 Wirkmechanismen	12
2.4 Humanpathologische Wirkung	21
2.5 Anwendung in Tierhaltung und Veterinärmedizin	23

3 Analytik von Tierarzneimittelrückständen

3.1 Gesetzliche Grundlagen und Analysenstrategie	26
3.2 Screeningtests	28
3.3 Physikalisch-chemische Analysenverfahren	31

4 Enzyme und Peptide der bakteriellen Zellwandsynthese als Rezeptoren

4.1 Allgemeines	34
4.2 Rezeptortests für β -Lactamantibiotika	34
4.3 Lysinyl-D-Alanyl-D-Alanin als Rezeptor für Glykopeptidantibiotika	36

5 Immun-chemische Nachweisverfahren für Penicilline und Glykopeptidantibiotika

6 Antikörper-Gewinnung und Aufbau immun-chemischer Testsysteme

6.1 Einführung	41
6.2 Eigenschaften von Antikörpern gegen kleine Haptene	43
6.3 Aufbau immun-chemischer Screeningtests	45

7 Zielsetzung

Experimenteller Teil

8 Synthese eines $N\alpha$ -Acetyl-L-Lysyl-D-Alanyl-D-Alanin-Haptens

8.1 Kriterien zur Auswahl des Haptens	51
8.2 Synthesemethode	51
8.3 Synthese von $N\epsilon$ -Trifluoracetyl- $N\alpha$ -Acetyl-Lysin	53
8.4 Peptidsynthese	56
8.5 Charakterisierung der freien Peptide	62

9 Herstellung der Immunreagenzien

9.1 Auswahl von Carrierprotein, Festphasenantigen und enzymmarkiertem Antigen	70
9.2 Synthese der Konjugate	74

10 Charakterisierung der Konjugate

10.1 Möglichkeiten zur Bestimmung der Kopplungsrate	78
10.2 Charakterisierung des GOD- bzw. des BSA-Lys-D-Ala-D-Ala-Konjugats	79
10.3 Charakterisierung des Glucoseoxidase-Ampicillin-Konjugats	88

11 Immunisierung und Gewinnung spezifischer Antiseren

11.1 Immunisierung	93
11.2 Serumgewinnung	93
11.3 Überwachung des Immunisierungsverlaufs (Titerbestimmung)	94

12 Charakterisierung der Seren

12.1 Überprüfung der Spezifität der gewonnenen Seren	101
12.2 Untersuchungen zur Identifizierung Penicillin-spezifischer Serumantikörper	104
12.3 Verhalten der Serumantikörper gegenüber Glykopeptidantibiotika	107
12.4 Charakterisierung der Antikörper-Bindestellen (Epitopmapping)	113

13 Screening von Avoparcin in Futtermitteln

13.1 Ziel	118
13.2 Auswahl von Probenmaterial und Extraktionsbedingungen	118
13.3 Avoparcin-Screening an 50 Futterproben unter verdeckten Bedingungen	121
13.4 Zusammenfassung der Ergebnisse	132

Diskussion und Arbeitsvorschriften

14 Diskussion und Ausblick

136

14.1 Auswahl und Synthese eines geeigneten D-Alanyl-D-Alanin-Haptens	137
14.2 Herstellung und Charakterisierung der Immunreagenzien	139
14.3 Gewinnung und Charakterisierung der Seren sowie Aufbau immun-chemischer Testverfahren	142
14.4 Avoparcin-Screening in Futtermitteln	147
14.5 Schlussbetrachtung und Ausblick	151

15 Material und Methoden

15.1 Synthese der N α Ac-Lys-Ala-Ala-Peptide	154
15.2 Analytik der Syntheseprodukte	158
15.3 Herstellung der Immunoreagenzien	164
15.4 Charakterisierung der Konjugate	169
15.5 ELISA-Techniken	171
15.6 Immun-chemischer Nachweis von Avoparcin in Futtermitteln	180

Literatur und Anhang

16 Literaturverzeichnis

183

17 Anhang

193

17.1 Auswertung von Standardkurven	193
17.2 Abkürzungsverzeichnis	195
17.3 Tabellenverzeichnis	197
17.4 Abbildungsverzeichnis	198

1 Einleitung

Die moderne Massentierhaltung wäre ohne den Einsatz verschiedenster Arzneimittel, allen voran Antibiotika und Cytostatika, praktisch undenkbar. Hohe Bestandsdichten in den Stallungen bergen ein hohes Infektionspotential durch gegenseitige Ansteckung. Auch züchterische Leistungen, die den Ertrag tierischer Produkte steigern, werden oftmals durch eine erhöhte Stress- und Krankheitsanfälligkeit der entsprechenden Rassen erkauft, und nicht zuletzt der hohe ökonomische Druck, dem die Erzeuger EU-weit ausgesetzt sind, zwingen den Landwirt zu einer kontinuierlichen medizinischen Überwachung und Versorgung der Bestände.

Penicilline finden bei der Therapie und Prophylaxe bakterieller Infektionen bei Milch- und Fleisch-liefernden Tieren breite Anwendung und zählen zusammen mit den Makrolidantibiotika und Tetracyclinen zu den am häufigsten eingesetzten Antibiotikaklassen. Aus diesem Grund sind es gerade Penicilline, die häufig als Rückstände in den genannten Lebensmitteln nachgewiesen werden. Nicht nur aufgrund gesundheitlicher Bedenken, sondern auch aus technologischer Sicht sind Penicillinrückstände unerwünscht, da diese bereits in geringsten Konzentrationen zu technologischen Störungen bei der Herstellung fermentierter Lebensmittel führen können.

Eine weitere Bedeutung haben Antibiotika als Futterzusatzstoffe in der Tiermast erlangt. Dieser Einsatz erfolgt nicht auf tierärztliche Veranlassung, sondern verfolgt das Ziel einer besseren Futterausnutzung und dadurch einer Verkürzung der Mastzeiten. Gleichzeitig können hierdurch hygienische Mängel in den Stallungen in einem gewissen Rahmen ausgeglichen werden. Seit einiger Zeit verhärtet sich jedoch der Verdacht, dass diese Praxis zu einer erhöhten Resistenzbildung zahlreicher Keime gegen die entsprechenden Antibiotikaklassen führt. Ein solcher Zusatzstoff ist das Glykopeptidantibiotikum Avoparcin, das in großem Umfang in der Tiermast verwendet wurde.

Zwar wird Avoparcin in der Humanmedizin nicht eingesetzt, doch ist es strukturell mit dem Glykopeptidantibiotikum Vancomycin sehr eng verwandt, dem oftmals letzten wirksamem Antibiotikum zur Behandlung Penicillin-resistenter Keime. Seit Beginn der 90er Jahre traten verstärkt Vancomycin-resistente Keime vor allem in Fäkalien und Fleisch von Tieren auf, denen zuvor Avoparcin als Futterzusatzstoff verabreicht worden war. Daher wurde die Verwendung dieses Wirkstoffs 1996 EU-weit verboten.

Während Anwendungen von Tierarzneimitteln, die unter tierärztlicher Aufsicht und unter Einhaltung der vom Gesetzgeber geforderten Randbedingungen erfolgen, keine Gefährdung

des Verbrauchers befürchten lassen, kann der illegale oder unfachmännische Einsatz dieser Substanzen zu unerwünschten Rückständen in Milch, Fleisch und Eiern führen.

Diese können ein Gefährdungsrisiko für den Verbraucher bzw. einzelne Personengruppen (z.B. Allergiker) bergen. Im Rahmen des vorbeugenden Verbraucherschutzes und zur Vermeidung technologischer Störungen ist der Einsatz von pharmakologisch wirksamen Substanzen bei der Produktion tierischer Lebensmittel EU-weit einheitlichen gesetzlichen Reglementierungen unterworfen, in denen sowohl zulässige Wirkstoffe und Anwendungsbeschränkungen als auch Wartezeiten nach Abschluss der Medikation und Höchstmengen in den betreffenden Lebensmitteln festgelegt sind. Die Einhaltung der gesetzlichen Rahmenbedingungen wird von den zuständigen Behörden überwacht, wobei Lebensmittel tierischer Herkunft entsprechend einem Kontrollplan auf Arzneimittel-Rückstände hin untersucht werden müssen.

Zur Erkennung potentiell Antibiotika-positiver Proben stehen leistungsfähige Screeningmethoden zur Verfügung. Neben mikrobiologischen Hemmstofftests sind hier besonders Rezeptortests und immun-chemische Methoden zu nennen. Rezeptortests in der Penicillinanalytik beruhen auf der hohen Affinität der Penicilline zu bakteriellen Rezeptorproteinen, auch Penicillin-bindende Proteine (PBP) genannt.

In immunologischen Testverfahren werden statt bakterieller Rezeptoren hochspezifische bzw. hochaffine Antikörper eingesetzt, die gezielt gegen die betreffende Substanz gewonnen wurden. So wurden in der Vergangenheit von zahlreichen Arbeitskreisen und Firmen Antikörper gegen Penicilline und Glykopeptidantibiotika (Vancomycin) durch die Immunisierung mit Vertretern der betreffenden Antibiotikaklassen gewonnen. Die Spezifität der so gewonnenen Antikörper beschränkte sich daher ausschließlich gegen einzelne Vertreter der jeweiligen Antibiotikaklasse. In der vorliegenden Arbeit sollte am Beispiel der β -Lactam- und Glykopeptidantibiotika geprüft werden, ob es möglich ist, nicht mehr die Antibiotika selbst, sondern stattdessen bestimmte, am Wirkmechanismus dieser Antibiotika beteiligte Strukturen in Bakterien bzw. in deren Zellwänden, für eine Immunisierung zu nutzen. Über diesen neuen Weg sollten Antikörper gewonnen werden, die in ihrem Verhalten gegenüber den Antibiotika ähnliche Eigenschaften wie die natürlichen Targets, z.B. bakterielle Enzyme oder Rezeptoren, aufweisen. Die Spezifität dieser Antikörper bzw. der mit ihnen aufgebauten Testverfahren wäre nicht mehr ausschließlich auf bestimmte Strukturmerkmale einzelner Antibiotika beschränkt. Vielmehr würden sich mit diesen Antikörpern immun-chemische Testverfahren entwickeln lassen, deren Funktionsprinzip auf der Nachahmung spezifischer biologischer Abläufe, bzw. deren Hemmung durch Antibiotika aufbaut.

2 Penicilline und Glykopeptidantibiotika

2.1 Geschichtlicher Überblick

2.1.1 Penicilline

Alexander Fleming publizierte 1929 eine Arbeit [1] über die antibiotische Wirkung eines Fadenpilzes auf zahlreiche Bakterien wie Streptokokken und Staphylokokken. In Anlehnung an die Bezeichnung des Pilzes *Penicillium notatum*, nannte er bereits in der ersten Veröffentlichung das wirksame Agens in den rohen Kulturfiltraten "Penicillin". Obwohl Fleming die Isolierung der Reinsubstanz versagt blieb, gelang ihm bereits eine erstaunlich genaue Charakterisierung des Wirkstoffs. Er erkannte Penicillin als eine von Pilzen ins Medium abgegebene Substanz, die sehr empfindlich gegenüber Säuren, Basen und Hitzeeinwirkung ist sowie eine hohe Wirksamkeit gegenüber zahlreichen Bakterien aufweist. Des Weiteren beschrieb er die geringe Toxizität dieser Substanz im Tierversuch.

Als auch spätere Versuche Penicillin in reiner Form zu isolieren misslangen, brach Fleming seine Arbeiten zunächst ab, hielt aber den penicillinproduzierenden Stamm in Kultur.

Mit Ausbruch des zweiten Weltkrieges 1939, der zu einer verstärkten Suche nach wirksamen Wund- und Infektionsheilmitteln führte, wurden in Oxford die Arbeiten an Penicillin wieder aufgenommen und führten 1940 zur Isolierung eines festen Produktes, das allerdings nach heutigen Schätzungen nur 3 % aktives Penicillin enthielt. 1941 wurden erstmalig Patienten mit schweren Staphylo- und Streptokokken-Infektionen erfolgreich behandelt [2] und bereits 1943 erfolgte der Einstieg in die großtechnische Produktion.

Die Grundstruktur des Penicillins, das β -Lactamsystem, wurde 1943 von CHAIN und ABRAHAM postuliert und 1945 röntgenspektroskopisch nachgewiesen [3].

Dem Entdecker des Penicillins Fleming und den beiden geistigen Führern der Oxford-Gruppe, FLOREY und CHAIN, wurde 1945 der Nobelpreis verliehen.

Ansätze zur Totalsynthese des Penicillins fanden bereits während des Krieges statt, blieben aber zunächst erfolglos. Den endgültigen Beweis der β -Lactamstruktur lieferte die zwischen 1947-1950 ausgearbeitete Synthese von SÜS [4], die in einer längeren Reihe synthetischer Einzelschritte zum Benzylpenicillin führte.

Für den großtechnischen Maßstab erwiesen sich die Methoden der Totalsynthese allesamt als zu aufwendig, wohingegen die biotechnologische Herstellung von Benzylpenicillin durch verbesserte Fermentationsverfahren, leistungsfähigere Zellkulturen und dem Zusatz von Phenyllessigsäure als Precursor bereits Anfang der fünfziger Jahre ihren technologischen Höhepunkt erreichte.

Die biotechnologische Herstellung anderer Penicilline, die eine bessere Säurestabilität und ein geringeres Allergierisiko aufweisen, war schwieriger, da die verwendeten Penicilliumstämme die zugegebenen Precursor nicht oder in zu geringem Ausmaß akzeptierten. Erst seit 1960 besteht die Möglichkeit mit Hilfe der Penicillinamidase das Penicillingrundgerüst, die 6-Aminopenicillansäure aus Benzylpenicillin in großtechnischem Maßstab zu gewinnen. Sie ist Ausgangspunkt aller halbsynthetischer Penicilline, mit gegenüber dem Benzylpenicillin deutlich verbesserten Eigenschaften [5].

2.1.2 Glykopeptidantibiotika

In den frühen fünfziger Jahren wurde Vancomycin als erster Vertreter einer großen Klasse natürlich vorkommender Glykopeptidantibiotika von ELI LILLY & Co. aus *Streptomyces orientalis* isoliert und 1958 als Therapeutikum zur Behandlung von Infektionen gegen gram-positive Erreger eingeführt.

Insbesondere zahlreiche Stämme von *Staphylokokkus aureus* zeigten zu diesem Zeitpunkt bereits Resistenzen gegen die damals verfügbaren Antibiotika, so dass Vancomycin eine wichtige Alternative darstellte. Allerdings verlor Vancomycin an Bedeutung, als Anfang der sechziger Jahre Methicillin und später die Cephalosporine eingeführt wurden, so dass sein Einsatz auf Patienten mit Penicillinallergien beschränkt blieb.

Erst seit dem Auftreten multi-resistenter Staphylokokken in den frühen 90er Jahren, gewann Vancomycin wieder zunehmend an Bedeutung. Diese Keime sprechen häufig auf keine der gängigen Antibiotikaklassen mehr an, so dass gegenwärtig Vancomycin und seine Strukturanalogen, als einzig wirksame "Reserveantibiotika" angesehen werden [6].

Obwohl mittlerweile eine Vielzahl Vancomycin-analoger Glykopeptidantibiotika isoliert und untersucht wurden, kommt neben Vancomycin bisher ausschließlich Teicoplanin humanmedizinische Bedeutung zu. Der im größten Maßstab gewonnene Vertreter dieser Substanzklasse ist Avoparcin, welches ausschließlich als Leistungsförderer in der Tiermast Verwendung fand und zuerst 1958 bei *CYANAMID aus Streptomyces candidus* isoliert wurde.

Erstaunlich war das lange Ausbleiben von Vancomycin-resistenten Keimen. Erst 1988 wurden erstmalig Fälle von resistenten Staphylokokken beschrieben [7]. 1994 stellten BATES et al. [8] einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten resistenter Keime und dem Einsatz von Avoparcin als Leistungsförderer her, nachdem solche Keime sowohl in der Gülle als auch im Fleisch von mit Avoparcin behandelten Tieren gefunden wurden.

Obwohl der Beweis eines kausalen Zusammenhangs zwischen dem Avoparcin-Einsatz und der Ausbildung Vancomycin-resistenter Keime bisher nicht geführt werden konnte, wurde sein Einsatz 1996 EU-weit verboten [9].

2.2 Struktur und physiko-chemischen Eigenschaften

2.2.1 Penicilline

Alle Penicilline sind Acylderivate der 6-Aminopenicillansäure (6-APS), deren Synthese biochemisch aus Cystein und Valin erfolgt. Kernstruktur der 6-APS ist ein als Penamsystem bezeichneter Bicyclus, der sich aus einem Thiazolidin- und einem β -Lactamring zusammensetzt [10, 11]. Abbildung 2-1 gibt den Aufbau des Penicillingrundgerüsts wieder und stellt die wichtigsten in der Veterinärmedizin eingesetzten Derivate vor.

Über die an sich bereits geringe Stabilität von β -Lactamen hinaus, zeigen Penamderivate eine erhöhte Reaktivität gegenüber nucleophilen Reaktionspartnern. Dies kann auf die durch die Winkelung des Bicyklus erzwungene sp^3 -Hybridisierung des Amid-Stickstoffs zurückgeführt werden, während in normalen β -Lactamsystemen der Stickstoff als trigonal planares sp^2 -Hybrid vorliegt [12].

Als freie Säuren weisen Penicilline im allgemeinen nur eine geringe Wasserlöslichkeit auf, während sie in Form ihrer Alkali- und Erdalkalisalze gut in Wasser löslich sind.

Die Salze der Penicilline sind gut kristallisierbar und in trockenem Zustand sehr stabil, während sie in wässrigen Lösungen in Abhängigkeit ihrer Seitenketten mehr oder weniger schnell abgebaut werden [13, 14]. Der Abbau ist stark vom pH-Wert abhängig und kann sowohl durch nucleophilen Angriff (alkalisches Milieu) als auch elektrophile Substitution eingeleitet werden (vergl. Abb. 2-2 und 2-3).

Wässrige Lösungen monobasischer Penicilline sind im pH-Bereich von 6-7 am stabilsten, diejenigen der amphoteren Penicilline weisen ein Stabilitätsmaximum im Bereich von pH 4-5 auf. Penicilline sind relativ starke Säuren, die Dissoziationskonstante (pK_a) der Carboxylgruppe liegt bei 2,6-2,8; die der Aminogruppe amphoterer Penicilline zwischen 7,0-7,4 [10]. Des Weiteren beeinflussen auch bestimmte Puffersalze, Schwermetalle und organische Lösemittel die Geschwindigkeit des Abbaus. Insbesondere Thiole zeigen eine starke katalytische Wirkung [14].

In Penicillinen kann eine Stabilisierung des β -Lactamsystems gegen Säuren durch elektronenziehende Gruppen (Halogene, Aminfunktion, Sauerstoff) in der α -Position der Seitenkette bewirkt werden, welche die Nucleophilie des Carbonylsauerstoffs in der Seitenkette herabsetzen. Dieser Fall ist in zahlreichen säurestabilen Penicillinen (z.B. Ampicillin) realisiert, die sich besonders für die orale Anwendung eignen.

Die Instabilität der Penicilline sowohl im basischen als auch im sauren Milieu kann besonders in der Rückstandsanalytik zu Problemen führen. Hierbei stellen die Extraktionsbedingungen während der Probenaufarbeitung und die Wahl geeigneter chromatographischer Systeme eine besondere Herausforderung dar. Ebenfalls muss ein besonderes Augenmerk auf die Herstellung und Lagerung von Standardlösungen gerichtet werden [15].

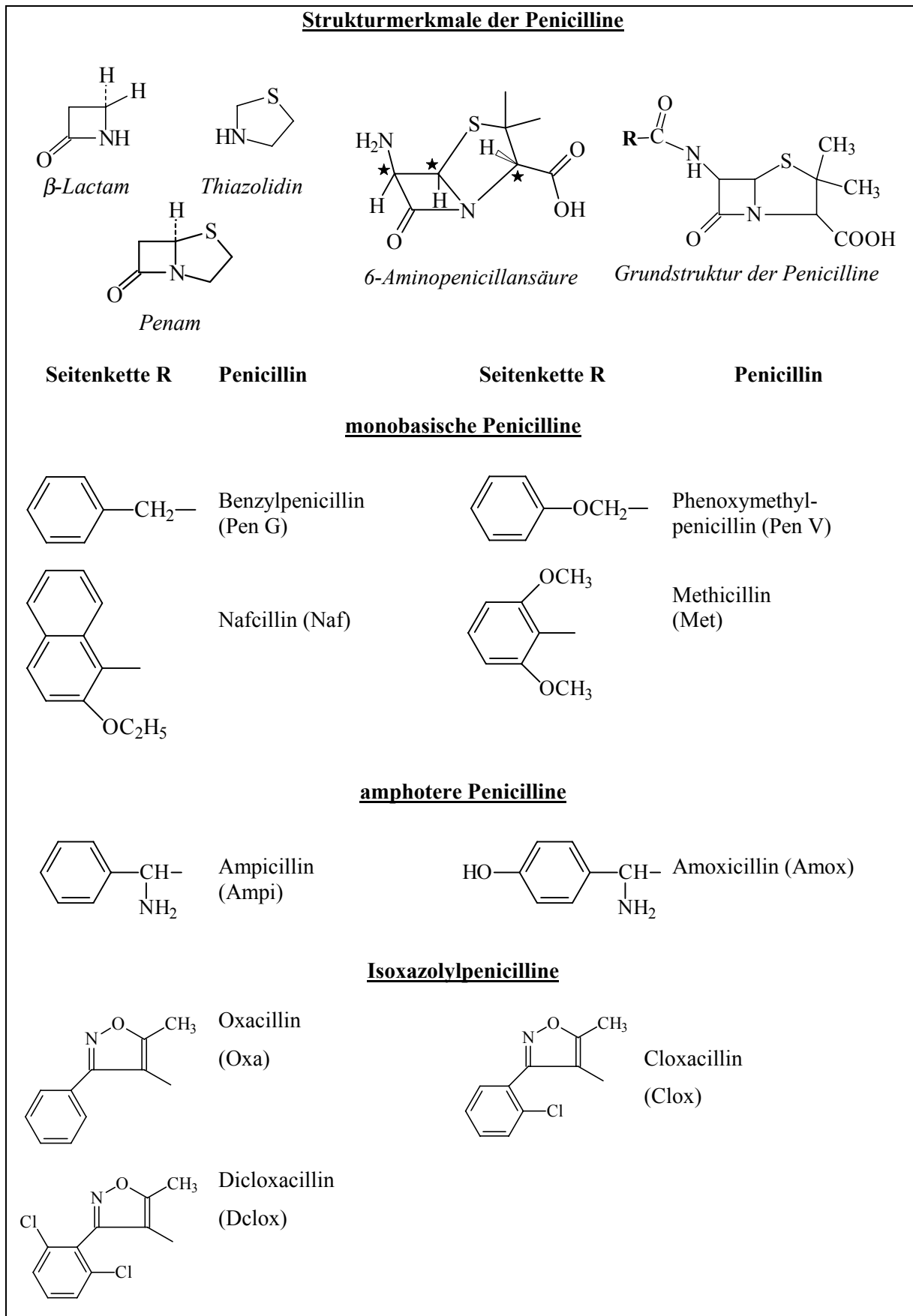


Abbildung 2-1: Strukturen veterinärmedizinisch relevanter Penicilline

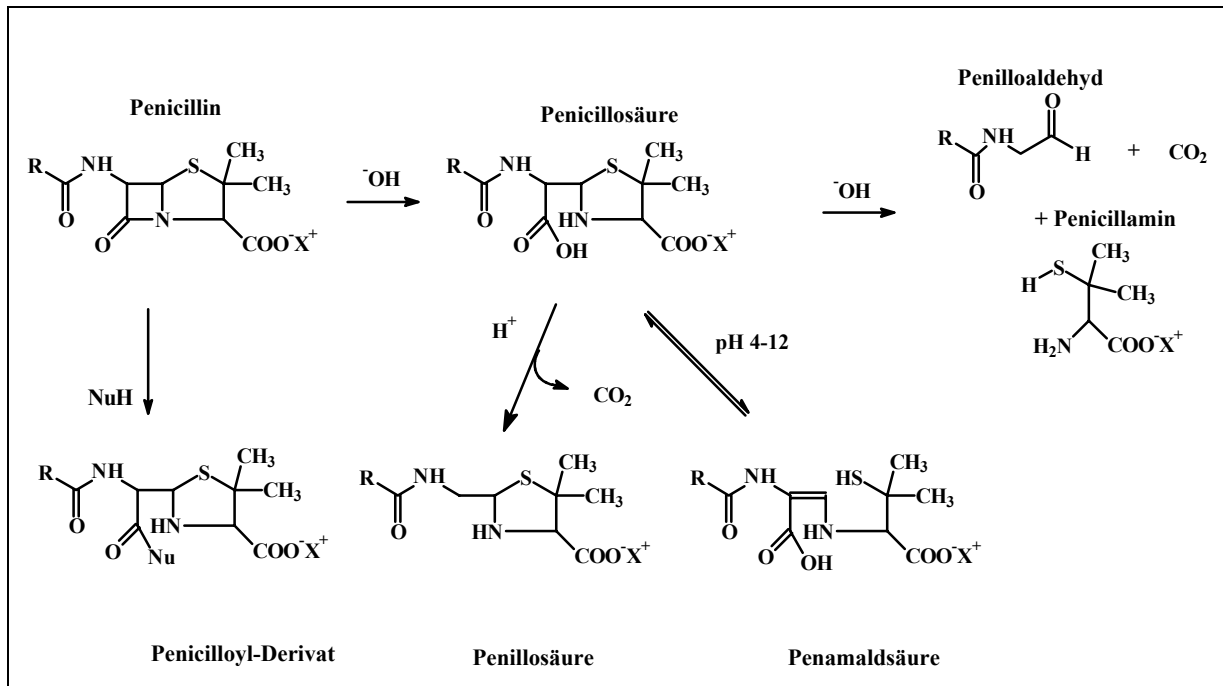


Abbildung 2-2: Abbaureaktionen durch nucleophilen Angriff [10, 11]

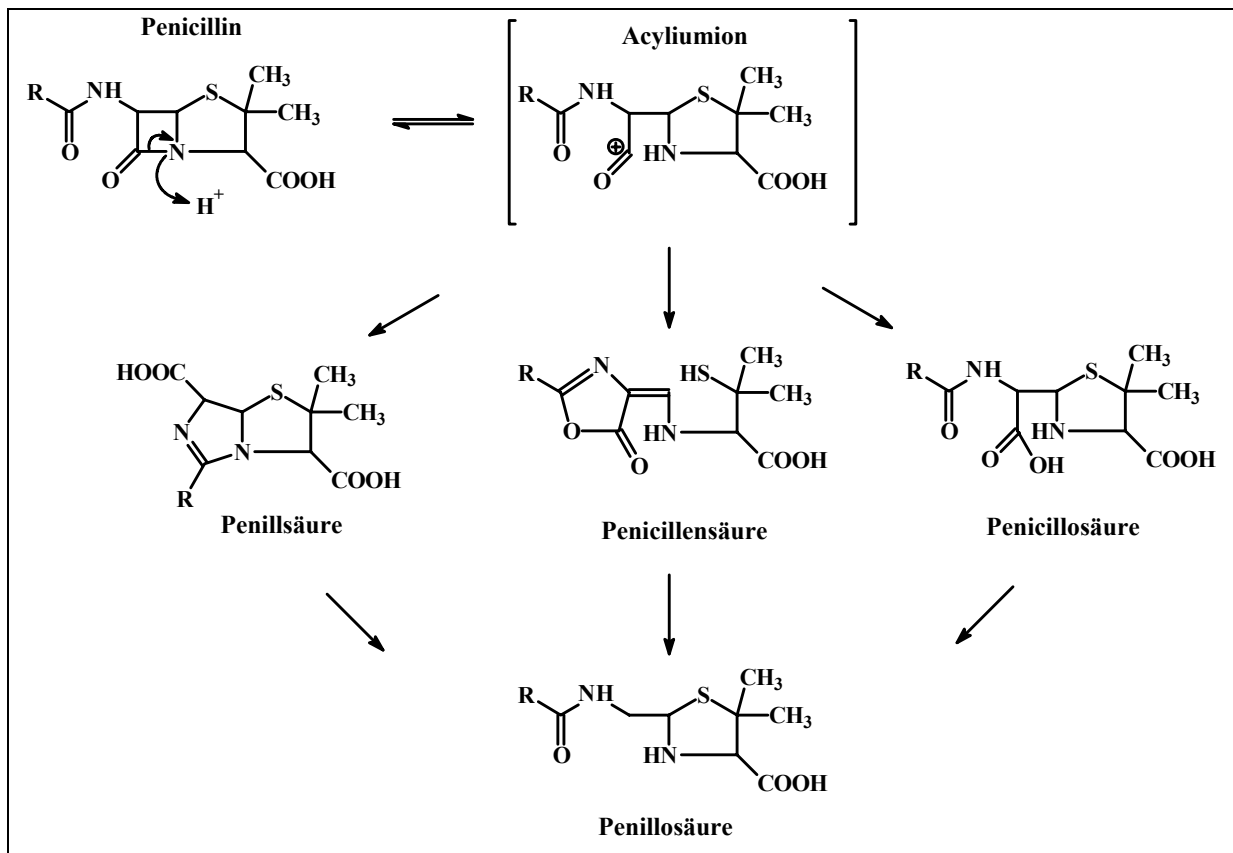


Abbildung 2-3: Abbaureaktion durch elektrophile Substitution [16]

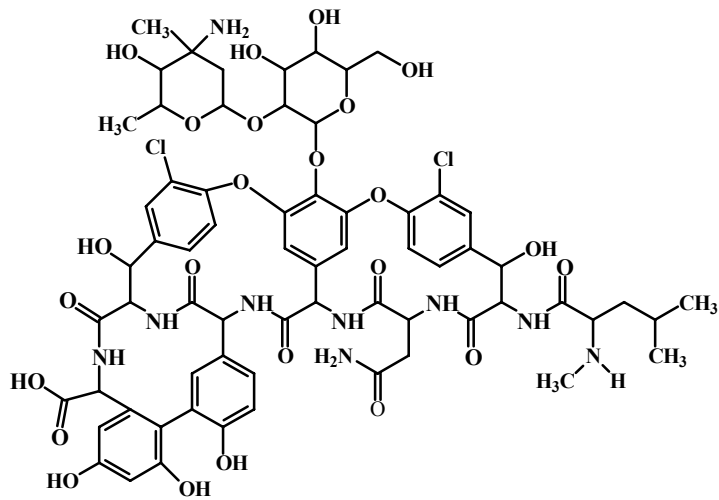
2.2.2 Glykopeptidantibiotika

Die im folgenden angesprochenen Glykopeptidantibiotika (Abb. 2-4) gehören zu einer Gruppe natürlich vorkommender Substanzen, die von verschiedenen Streptomyceten produziert werden und sich sowohl durch ihre strukturellen Ähnlichkeiten als auch durch ihre biologischen Eigenschaften beschreiben lassen. Zur deutlichen Abgrenzung von strukturell ähnlich aufgebauten Antibiotikaklassen mit anderen Wirkungsmechanismen (z.B. Lipopeptid- und Lipoglykopeptidantibiotika), wurde für die hier vorgestellten Glykopeptidantibiotika auch der Begriff "Dalbaheptide" vorgeschlagen [17]. Das essentielle Strukturmerkmal dieser Dalbaheptide ist ein lineares Heptapeptid, in dem die Seitenketten von mindestens fünf Aminosäuren miteinander verknüpft sind, wodurch dem Peptid eine starre Konformation aufgezwungen wird (vergl. Abb. 2-5).

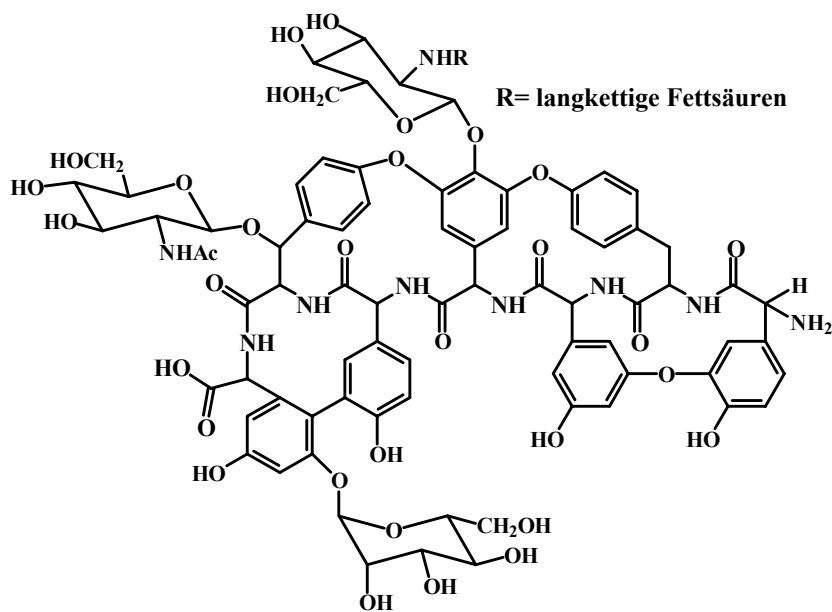
Die Aminosäuren bzw. -derivate an den Positionen AS 2, AS 4 und AS 6 sind in allen Glykopeptidantibiotika identisch (vergl. Abbildung 2-5). Ihre Reste bilden über Etherbrücken ein charakteristisches Triphenylethersystem. Ebenfalls stellen die Aminosäuren an den Positionen AS 5 und AS 7 ein konservatives Strukturelement dar, deren Reste über eine C-C-Bindung zu einem Diphenylsystem verknüpft sind.

Einzig die Positionen 1 und 3 sind variabel und können mit verschiedenen aliphatischen oder aromatischen Aminosäuren besetzt sein. Die Besetzung dieser Positionen (vergl. Tab. 2-1) wird zur Einteilung der Glykopeptidantibiotika in verschiedene Gruppen herangezogen [6].

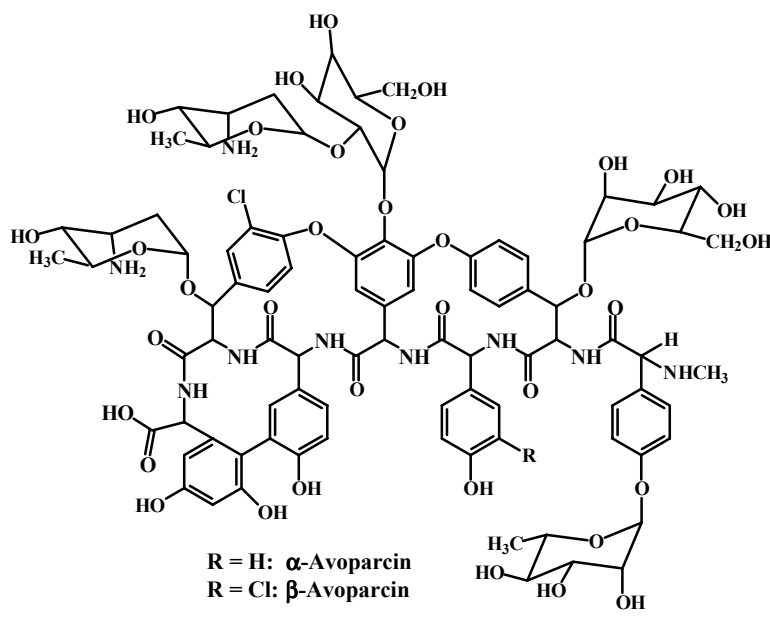
Die Zucker- bzw. Aminozuckerreste variieren sehr stark bezüglich Struktur, Anzahl und Position der Substitution und haben einen bedeutenden Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität, Toxizität und pharmakodynamischen Eigenschaften. Aufgrund dieser großen Variationsbreite sowie weiterer Substituenten wie Fettsäuren und Halogenatome überrascht es nicht, dass selbst pharmazeutische Präparationen von Glykopeptidantibiotika im allgemeinen neben einer definierten Hauptkomponente stets weitere Komponenten der entsprechenden Gruppe enthalten. So enthält Avoparcin ca. 30 % α - Avoparcin und 60 % β -Avoparcin, wobei β -Avoparcin sich von α -Avoparcin durch ein zusätzliches Chloratom unterscheidet, den Rest machen zahlreiche weitere Analoge beider Hauptkomponenten aus [18]. Glykopeptidantibiotika sind im allgemeinen in Wasser gut, in Alkoholen mäßig und in anderen organischen Lösemitteln schwer zu lösen. In trockenem Zustand sind alle Glykopeptidantibiotika stabil, während in wässrigen Lösungen ein temperatur- und pH-Wert-abhängiger Abbau erfolgt. Die mit Abstand bedeutendste Abbaureaktion des Vancomycins ist die Umlagerung zu den beiden „crystalline degradation products“ (CDP) CDP-1-M und CDP-1-m, da diese bereits unter physiologischen Bedingungen im Körper entstehen können [19].



Vancomycin



Teicoplanin



Avoparcin

Abbildung 2-4: Strukturen der wichtigsten Glykopeptidantibiotika (nach Nicas und Cooper [6])

Der Abbau erfolgt sowohl im sauren als auch im alkalischen Milieu und startet mit der Desaminierung des Asparaginrestes an Position 3 (AS 3) des Dalbaheptides, der eine Umlagerung zu in zwei CDP-Derivaten folgt. Das entstandene Hauptprodukt (CDP-1-Major) sowie das Nebenprodukt (CDP-1-minor) unterscheiden sich nur in der Orientierung des Chlorsubstituenten (Abb. 2-6) und weisen keine antibiotische Aktivität mehr auf.

Eine weitere Abbaureaktion, die sich prinzipiell auf alle Glykopeptide anwenden lässt, stellt die Hydrolyse einzelner Zuckerreste dar, was zu entsprechenden "glycopeptide aglycons" führt. Diese Reaktion bringt nicht zwangsläufig Einbußen der biologischen Aktivität mit sich. So wurden bereits zahlreiche Aglycone mit hoher antimikrobieller Wirkung beschrieben [6, 20, 21].

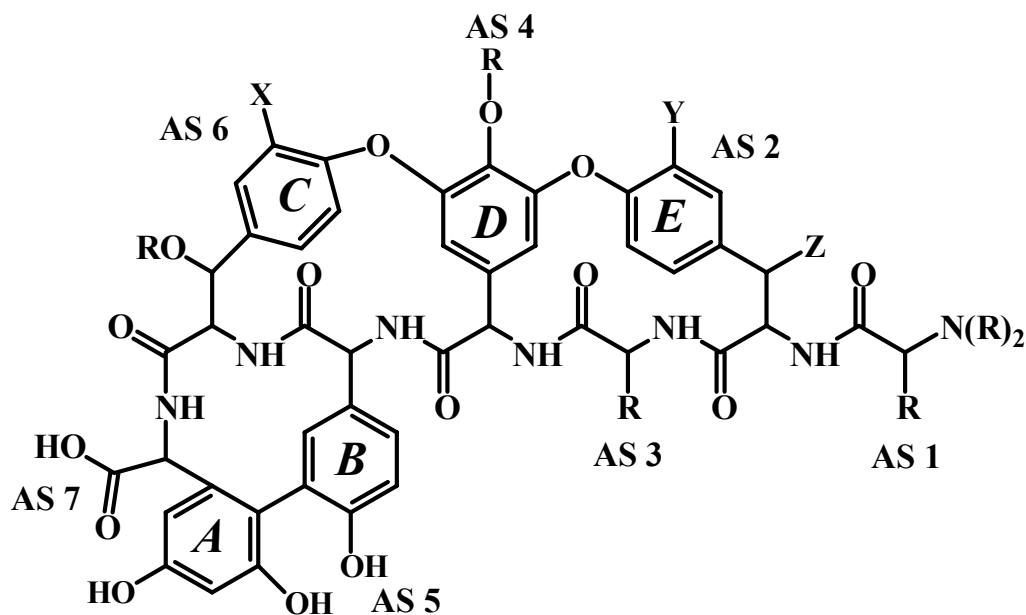


Abbildung 2-5 : Grundgerüst der Glykopeptidantibiotika (Nicas und Cooper [6])

Aminosäuren / besonderes Strukturelement	Gruppe	Bekannteste Vertreter
AS 1: aliphatisch AS 3: aliphatisch	Gruppe 1 (Vancomycintyp)	Vancomycin Eromomycin
AS 1: aromatisch AS 3: aromatisch	Gruppe 2 (Actinoidintyp)	Actinoidin Avoparcin
AS 1: aromatisch AS 3: aromatisch über Etherbrücken miteinander verknüpft	Gruppe 3 (Ristocetintyp)	Ristocetin Actaplanin
AS 1: aromatisch AS 3: aromatisch über Etherbrücken miteinander verknüpft an AS 4: zusätzliche Substitution des Aminoazuckers	Gruppe 4 (Teicoplanintyp)	Teicoplanin Ardacin

Tabelle 2-1: Einteilung der Glykopeptidantibiotika (nach Nicas und Cooper [6])

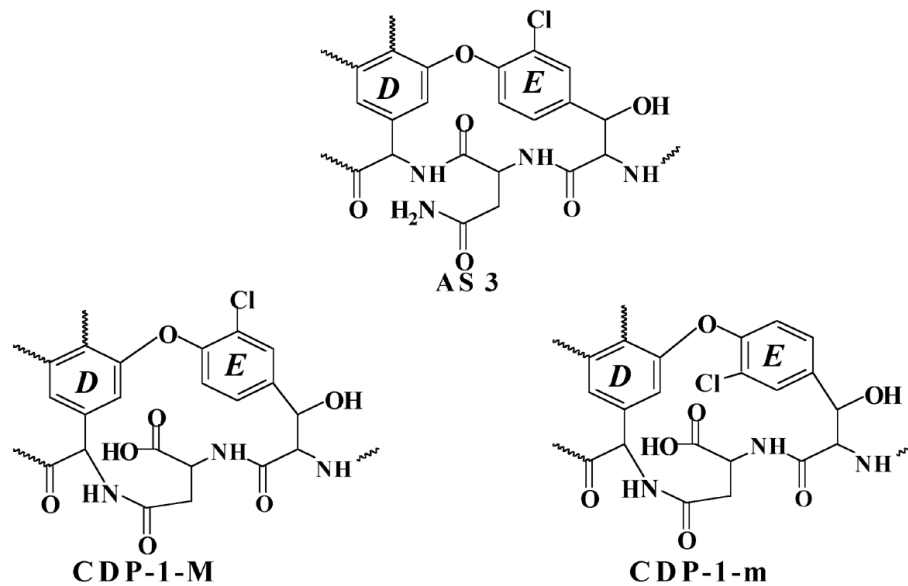


Abbildung 2-6: Abbau von Vancomycin zum "crystalline degradation product" (Backes et al. [19]) CDP-1-M: Hauptprodukt (M=major), CDP-1-m: Nebenprodukt (m=minor)

2.3 Wirkmechanismen

2.3.1 Antibiotika als Inhibitoren der bakteriellen Zellwandsynthese

Penicilline und Glykopeptidantibiotika wirken bakterizid, indem sie die Biosynthese der Murein-Stützsicht in der sich im Wachstum befindlichen Bakterienzellwand blockieren [6,11].

Der prinzipiell unterschiedliche Aufbau der Zellwand von grampositiven und gramnegativen Bakterien, schematisch in Abbildung 2-7 dargestellt, ist Ursache für die unterschiedliche Wirkung beider Antibiotikaklassen [22].

Penicilline und Glykopeptidantibiotika zeigen gegenüber grampositiven Bakterien, deren Zellwand überwiegend aus einer mehrschichtigen, dreidimensional vernetzten Mureinschicht besteht, eine außerordentlich hohe Wirksamkeit. Bei gramnegativen Bakterien hingegen ist der einschichtige Mureinsacculus durch eine außenliegende Lipopolysaccharidschicht abgeschirmt, der Zutritt zur Mureinschicht in wirksamen Konzentrationen ist daher nur amphoteren Penicillinen möglich, die aktiv durch die Porinkanäle transportiert werden können. Glykopeptidantibiotika zeigen ebenfalls gegen gramnegative Erreger keine Wirkung. Ihnen wird allein aufgrund ihrer Größe der Zutritt in den periplasmatischen Raum der Zellwand verwehrt [6].

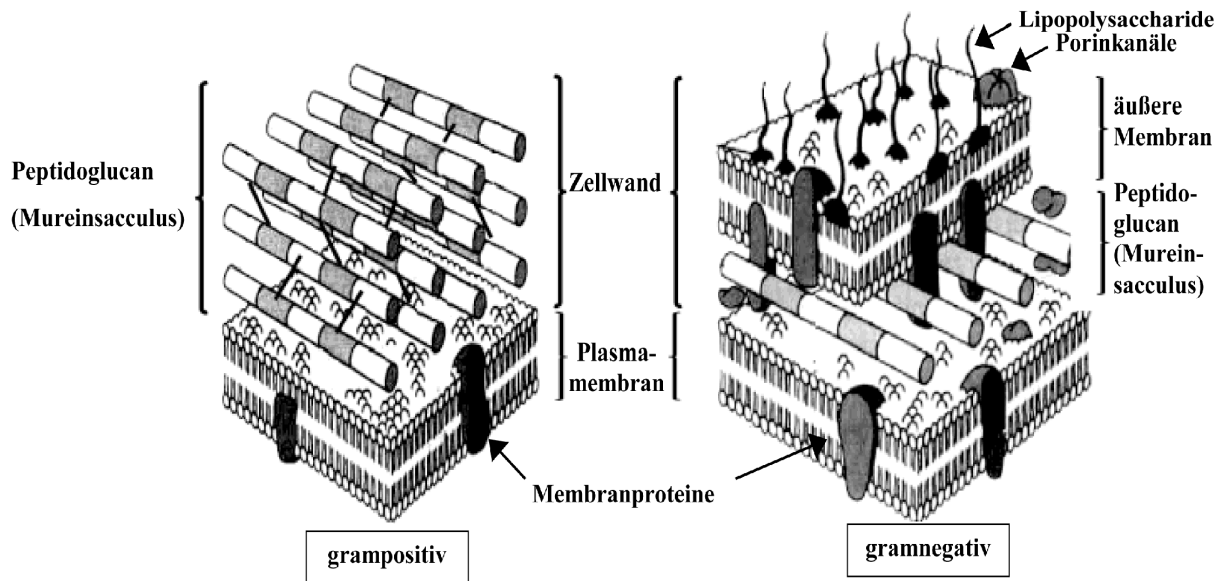


Abbildung 2-7: Aufbau der Zellwand grampositiver und gramnegativer Bakterien

Der Mureinsacculus wird in 3 Reaktionsschritten synthetisiert und besteht aus quervernetzten Peptidoglycanketten [22-24]. Die Hauptkette des Mureins ist aus sich wiederholenden Disaccharidbausteinen von α -1,4-verknüpftem N-Acetylglucosamin mit N-Acetylmuramylsäure aufgebaut. Letztere trägt eine Pentapeptidkette, die von zwei D-Alaninmolekülen terminiert wird. Dieses Pentapeptid ist über die ϵ -NH₂-Funktion des Lysins mit einer sogenannten Interpeptidbrücke (IP) substituiert, deren Zusammensetzung und Länge von der Natur des jeweiligen Bakteriums abhängt.

Die Quervernetzung der Mureinhauptketten entsteht im letzten Schritt der bakteriellen Zellwandsynthese (vergl. Abb. 2-8). Hierbei spaltet eine D,D-Transpeptidase (D,D-TP) das C-terminale D-Alanin-Molekül des Pentapeptids ab und überträgt gleichzeitig die Acylgruppe der verbleibenden Peptidkette auf die Interpeptidbrücke eines gegenüberliegenden Mureinstranges β -Lactam- und Glykopeptidantibiotika verhindern diese Vernetzungsreaktion. Bei im Wachstum befindlichen Bakterien weist die neu synthetisierte Zellwand nicht die notwendige mechanische Stabilität auf, um dem osmotischen Druck standzuhalten, was in letzter Konsequenz den Zelltod nach sich zieht.

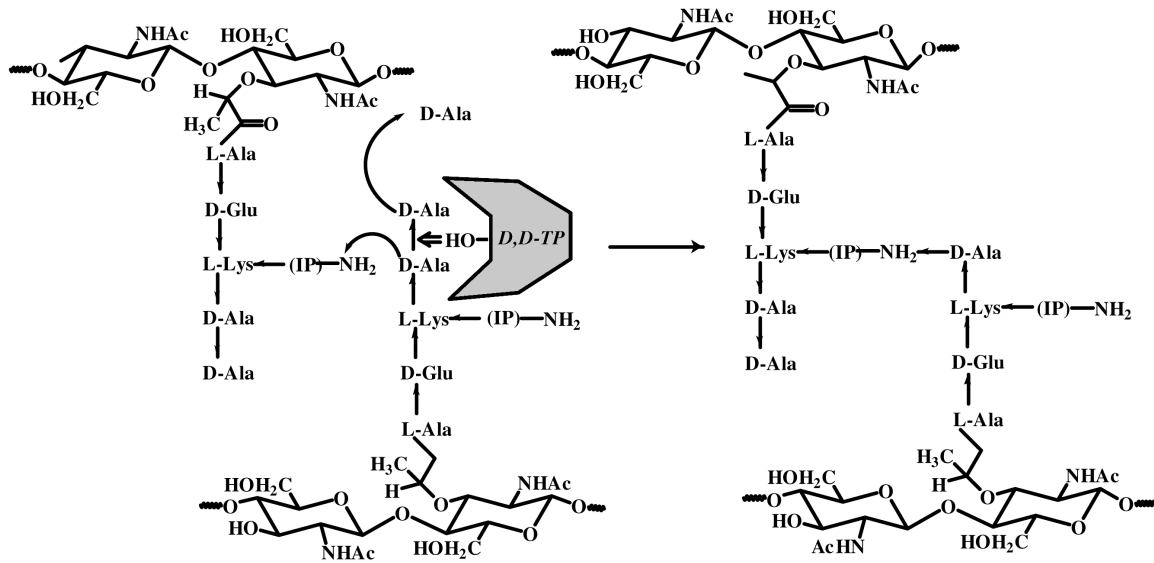


Abbildung 2-8: Quervernetzung zweier Mureinstränge (nach Rimpler [24])

2.3.2 Molekulare Grundlagen der Wirkmechanismen und der Resistenzbildung

2.3.2.1 β -Lactamantibiotika

TIPPER und STROMINGER postulierten 1965 [25] als erste den strukturellen Zusammenhang zwischen β -Lactamantibiotika und dem terminalen Dipeptid D-Alanyl-D-Alanin des Acetylmuramylpentapeptids. Demnach akzeptiert die Transpeptidase aufgrund der strukturellen Analogie von β -Lactamantibiotika und D-Ala-D-Ala erstere ebenfalls als Substrat (Abb. 2-9). Die enzymatische Hydrolyse des β -Lactamringes führt jedoch zu einer Acylierung im aktiven Zentrum der Transpeptidase und somit zu einer irreversiblen Hemmung des Enzyms.

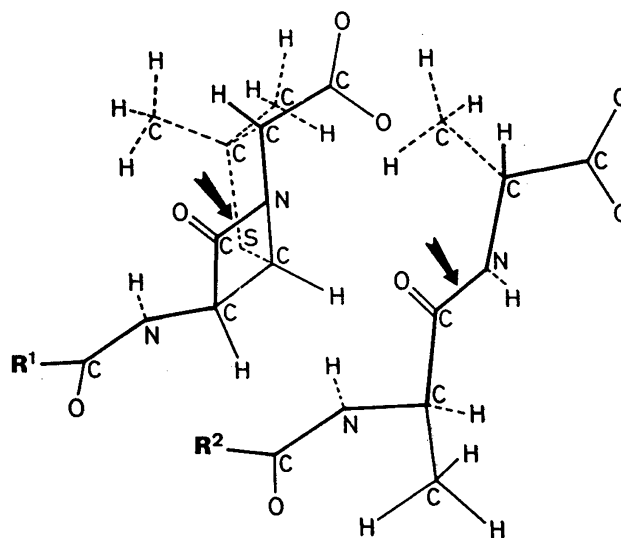


Abbildung 2-9: Modell der Penicilline (links) und des D-Alanyl-D-Alanin-Endes eines Pentapeptidstranges (rechts). Die Pfeile zeigen die Lage der CO-N-Bindung im β -Lactamring der Penicilline und der terminalen CO-N-Bindung von R^2CO -D-Ala-D-Ala. (Tipper und Strominger [25])

Nach diesem Modell ist die Distanz zwischen dem β -Lactamstickstoff und dem Carboxylkohlenstoff in Penicillinen identisch mit derjenigen zwischen dem Stickstoffatom der Peptidbindung und dem Carboxylkohlenstoff im D-Alanyl-D-Alanin (250 pm). Gleiches gilt für den Abstand zwischen dem β -Lactamstickstoff und der (substituierten) Aminogruppe in Penicillinen und den analogen Stickstoffatomen im Dipeptid (je 330 pm). Abweichungen zeigen die Abstände zwischen der Carboxylgruppe und der jeweiligen (substituierten) Aminofunktion im Penicillin (540 pm) bzw. D-Alanyl-D-Alanin (570 pm).

TIPPER und STROMINGER postulierten weiterhin, dass im Übergangszustand während der enzymatischen Spaltung die Peptidbindung von der planaren Konfiguration mit überwiegend Doppelbindungscharakter in eine nicht-planare Konfiguration übergeht. In diesem Fall wären die genannten Abstände in beiden Molekülen identisch.

LEE [26] untermauerte 1971 die Hypothese des Übergangszustandes, in dem er versuchte, die aus Röntgenbeugungsstudien an Penicillinkristallen ermittelten Bindungswinkel mit den (theoretischen) Daten für ein Glycyl-D-Alanyl-D-Alanin-Modellmolekül in Einklang zu bringen. Er kam zu dem Schluss, dass die beiden Moleküle die größte Analogie aufweisen, wenn der Dihedralwinkel entlang der Peptidbindung im D-Alanyl-D-Alanin nicht, wie normalerweise für Peptide üblich 180° , sondern $135,7^\circ$ beträgt, wie er für kristalline Penicilline gefunden wurde.

KELLY et al. [27-29] versuchten die Struktur/Wirkungs-Beziehung von β -Lactamantibiotika und L-Lysyl-D-Alanyl-D-Alanin aus Röntgenbeugungs-Strukturanalysen abzuleiten. Hierzu wurde u.a. eine wasserlösliche D,D-Carboxypeptidase¹ (*Streptomyces* sp. strain R 61) mit verschiedenen Antibiotika inkubiert und die entstandenen Enzym-Antibiotika-Komplexe zur Aufnahme der Röntgenbeugungsspektren kristallisiert. Tatsächlich konnte nur die Konformation des durch die Antibiotika acylierten Enzymkomplexes direkt ermittelt werden, d.h. der β -Lactamring der Antibiotika war bereits geöffnet und kovalent an einen Serinrest im aktiven Zentrum des Enzyms gebunden. Mit Hilfe der gewonnenen Strukturdaten ließen sich aber Rückschlüsse auf den möglichen Reaktionsmechanismus und somit auf die Strukturanforderungen ziehen, die das Enzym an sein Substrat bzw. den Inhibitor (β -Lactamantibiotika) stellt.

¹ D,D-Carboxypeptidasen zählen wie D,D-Transpeptidasen zu den Penicillin-bindenden Proteinen (PBP) und entsprechen bezüglich dem Aufbau ihres aktiven Zentrums sowie in ihrer Substratspezifität (D-Ala-D-Ala / β -Lactamantibiotika) den D,D-Transpeptidasen. Im Gegensatz zu D,D-Transpeptidasen, die ausschließlich eine Transpeptidierung katalysieren, katalysieren reine D,D-Carboxypeptidasen ausschließlich die Hydrolyse der Carboxy-terminalen D-Aminosäuren aus Peptiden die von mindestens zwei D-Aminosäuren terminiert werden. Die biologische Funktion der D,D-Carboxypeptidasen ist noch nicht vollständig aufgeklärt, jedoch sind sie im Gegensatz zu D,D-Transpeptidasen für die Bakterienzelle nicht essentiell.

Die aus diesen Modelling-Experimenten abgeleiteten Konformationen für das Tripeptid und die intakten β -Lactamantibiotika in der Bindungsstelle waren geeignet, um zum einen die frühe Annahme von TIPPER und STROMINGER, welche β -Lactamantibiotika als Analoge des Peptidsubstrats betrachteten zu unterstützen (Abb. 2-9) und zum anderen ließ sich dieses Modell so weit modifizieren, um auch die Hypothese von LEE zu bestätigen, der β -Lactamantibiotika als Analoge des Übergangszustandes betrachtete (Abb. 2-10).

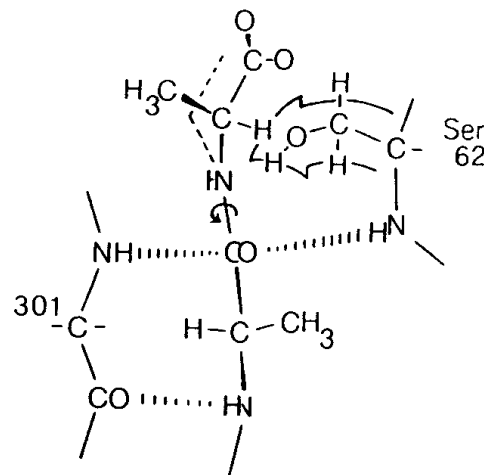


Abbildung 2-10: Interaktion einer D,D-Carboxypeptidase mit D-Ala-D-Ala und Penicillinen
 Dargestellt ist das Modell der Überführung des XCO-D-Ala-D-Ala-Moleküls in die Konformation des Übergangszustandes, der den β -Lactamantibiotika entsprechen soll. Es ist denkbar, dass nach Bindung des Peptids im aktiven Zentrum des Enzyms, die Hydroxylgruppe des Serin 62 der C-terminalen C α -N-Bindung nahe genug kommt, um eine Rotation aus dem planaren in den tetrahedralen Zustand zu bewirken. Die Drehrichtung verläuft in Richtung der Konformation wie sie in β -Lactamen vorliegt. (Kelly et al. [27])

Mit Hilfe von Methoden wie "geometry optimization" und Konformationsanalysen verschiedener D,D-Transpeptidase- und D,D-Carboxypeptidase-Substrate entwickelten LAMOTTE-BRASSEUR et al. [30] das Konzept der "productive binding entity". Dieses Konzept besagt, dass die Aktivität der "active-site-serine penicillin-binding proteins" von der genauen räumlichen Anordnung der funktionellen Gruppen abhängt, welche die zu spaltende Peptidbindung sowohl im Substrat als auch im Inhibitor umgeben. Eine solche "binding entity" stellt z.B. im Ac₂-L-Lys-D-Ala-D-Ala die Triade aus Carboxylat, der C=O-Gruppe der zu spaltenden Peptidbindung sowie der C=O-Gruppe der L-Lys-D-Ala-Peptidbindung dar. Eine analoge Triade fand sich auch in den untersuchten Inhibitoren wieder (z.B. Benzylpenicillin, Cephapirin).

Diese "binding-entity" erzeugt eine besondere elektronische Verteilung, und die Tatsache, dass sie in so unterschiedlichen Verbindungen wie Substrat und Inhibitoren konserviert vorliegt, legt die Annahme nahe, dass diese elektronische Verteilung die Voraussetzung für die Erkennung durch das Enzym darstellt (Abb. 2-11).

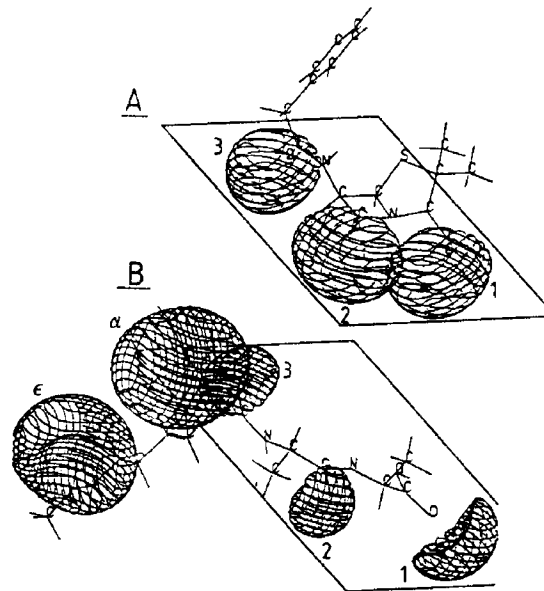


Abbildung 2-11: Koplanare binding-entity von Benzylpenicillin (A) und dem stabilsten, gestreckten Konformer von Ac₂-L-Lys-D-Ala-D-Ala (B). Konturen der elektrostatischen Potentiale: 1. COOH; 2. CO der zu spaltenden Peptidbindung; 3. CO des exocyclischen Carbonyl (Penicillin) bzw. der L-Lys-D-Ala-Bindung (Lamotte-Brasseur et al. [30])

Resistenzen gegenüber β -Lactamantibiotika

Bei einigen Bakterien führen Mutationen der D,D-Transpeptidasen zu einer Herabsetzung der Affinität gegenüber β -Lactamantibiotika ohne die eigentliche Transpeptidaseaktivität zu beeinträchtigen [34]. In diesen Fällen erweisen sich β -Lactamantibiotika als wirkungslos. Gram-negative Keime weisen zudem eine natürliche Resistenz gegenüber lipophilen Penicillinen auf, die auf die geringe Durchlässigkeit der äußeren Glykolipidmembran dieser Bakterien zurückzuführen ist [35]. Amphotere Penicilline wie Ampicillin oder Amoxicillin können durch Porinkanäle, welche die äußere Membran durchziehen, durch aktiven Transport in den periplasmatischen Innenraum der Zellwand gelangen, so dass auch hier eine ausreichend hohe Wirkstoffkonzentration erreicht wird [22].

Von besonderer Bedeutung für die Resistenz bei beiden Bakteriengattungen ist die Bildung von β -Lactamasen [22, 28, 32]. Diese entstanden im Zuge der Evolution aus Penicillin-bindenden Proteinen (PBP) wie D,D-Transpeptidasen und D,D-Carboxypeptidasen (vergl. Fußnote Kap. 2.3.2) und weisen wie diese eine hohe Affinität zu β -Lactamantibiotika auf [31].

Im Gegensatz zu den PBP bilden sie allerdings keine kovalenten Enzym-Substrat-Komplexe, sondern setzen das Antibiotikum nach Hydrolyse des β -Lactamringes wieder frei und können so weitere Antibiotikamoleküle zu antibiotisch inaktiven Penicilloyderivaten umsetzen. Man kennt heute eine Vielzahl unterschiedlicher β -Lactamasen, die sich hinsichtlich ihrer Affinität gegenüber den jeweiligen β -Lactamantibiotika unterscheiden. β -Lactamasen mit hoher Affinität gegenüber Penicillinen werden auch Penicillinasen, solche die bevorzugt Cephalosporine hydrolysieren als Cephalosporinasen bezeichnet [32].

Im Gegensatz zu resistenten gram-positiven Bakterien, welche β -Lactamasen in das umgebende Medium sezernieren, wird bei gram-negativen Vertretern die Resistenz durch β -Lactamasen im Periplasma vermittelt [23].

Im therapeutischen Rahmen setzt die Bekämpfung Penicillin-resistenter Keime in erster Linie bei den β -Lactamasen an. Durch Verwendung von Penicillinen mit sperrigen Seitenketten wie den Isoxazolylpenicillinen oder Methicillin wird die sogenannte Turnover-number, d.h. die Anzahl der pro Zeiteinheit von den β -Lactamasen umgesetzten Antibiotikamoleküle, drastisch reduziert, so dass eine genügend große Zahl an aktiven Molekülen zur Inhibierung der PBP zur Verfügung steht [23].

Alternativ können auch Breitbandantibiotika wie Amoxicillin und Ampicillin zusammen mit β -Lactamaseinhibitoren wie Clavulansäure und Sulbactam (Abb. 2-12) eingesetzt werden [24, 36]. Trotzdem gelingt es zahlreichen Bakterienstämmen immer wieder durch Modifizierung ihrer β -Lactamasen auch gegenüber den genannten Verbindungen Resistenzen auszubilden, so dass mit einem weiteren Anstieg der Zahl sogenannter multiresistenter Keime gerechnet werden muss [32].



Abbildung 2-12: β -Lactamaseinhibitoren Clavulansäure (A) und Sulbactam (B)

2.3.2.2 Glykopeptidantibiotika

Wie die β -Lactamantibiotika hemmen Glykopeptidantibiotika die Vernetzung des Mureinsacculus von sich im Wachstum befindlichen Bakterien, wobei auch hier das terminierende D-Alanyl-D-Alanin-Dipeptid des Muramylpentapeptids die Schlüsselposition des Wirkmechanismus darstellt [6]. Während β -Lactamantibiotika durch ihre bereits beschriebene Struktur analogie zu D-Alanyl-D-Alanin als klassische „Suizid-Substrate“ anzusehen sind, d.h. sie begehen als Substrate praktisch Selbstmord indem sie die D,D-Transpeptidase irreversibel acylieren, beruht der Wirkmechanismus von Glykopeptidantibiotika auf der Bildung von äußerst stabilen Komplexen mit X-D-Alanyl-D-Alanin welche für die Transpeptidasen nicht mehr zugänglich sind (vergl. Abb. 2-13).

WILLIAMS und WALTHO [37] klärten die Natur dieser Wechselwirkung unter Zuhilfenahme verschiedener D-Alanyl-D-Alanin-terminierter Modellpeptide NMR-spektroskopisch auf. Demnach wird dem Peptid-Rückgrat dieser Antibiotika durch die Verknüpfung seiner Seitenketten eine kuppelartige Form aufgezwungen. Hieraus resultiert ein optimaler "sterical fit" der Bindetasche des Antibiotikums mit D-Alanyl-D-Alanin-terminierten Peptiden, welcher durch einen Set von fünf Wasserstoff-Brückenbindungen stabilisiert wird und die hohe Spezifität und Stabilität dieser Komplexbildung erklärt.

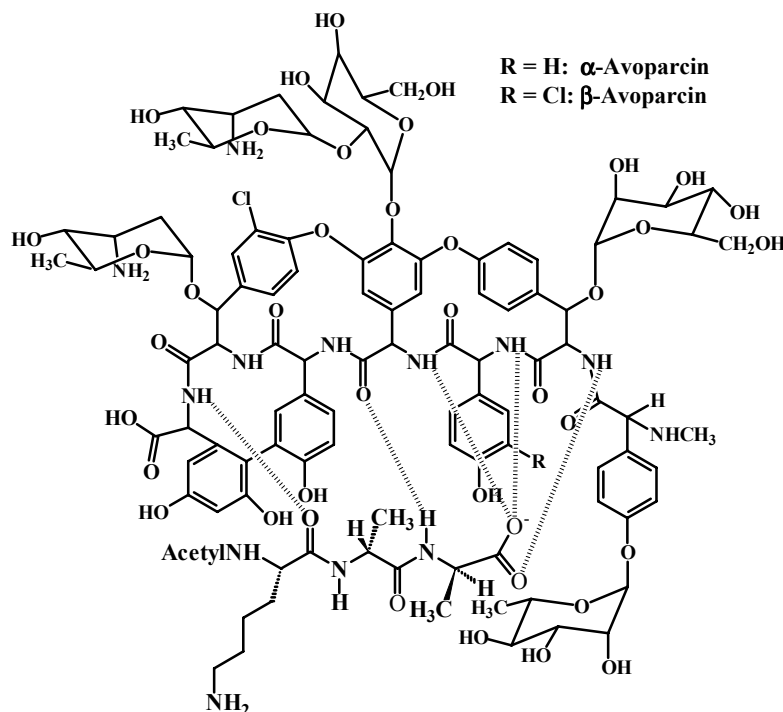


Abbildung 2-13: Komplex von Avoparcin mit N α -Ac-Lys-D-Ala-D-Ala (nach Nicas and Cooper [6])

Resistenzentwicklung gegen Glykopeptidantibiotika

Das Wirkungsspektrum der Glykopeptidantibiotika beschränkt sich ausschließlich auf grampositive Erreger. Gramnegative Bakterien besitzen eine natürliche Resistenz, da Glykopeptidantibiotika aufgrund ihrer Größe nicht in der Lage sind die äußere Zellmembran zu passieren.

Erstaunlich war das lange Ausbleiben von Resistenzen gegen diesen Antibiotikatypp bei grampositiven Bakterien. Erst 1988, also 30 Jahre nach der Einführung von Vancomycin, wurden erstmalig Resistenzen bei *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis* beschrieben [7].

Da Glykopeptidantibiotika direkt das zentrale Peptid der Zellwandsynthese komplexieren und dadurch den Zugang der Transpeptidasen verhindern, war die Resistenzbildung mit einer weitgehenden Umstellung der Zellwandsynthese und dem dafür verantwortlichen Enzymsystem verbunden [6]. Die Resistenz wird dadurch erreicht, dass das terminierende D-Alanyl-D-Alanin-Peptid des Muramylpentapeptids gegen ein D-Alanyl-D-Lactat-Peptid, ein sogenanntes Depsipeptid, ausgetauscht wird. Die Stabilität von X-D-Alanyl-D-Lactat/Glykopeptid-Komplexen ist um mindestens den Faktor 1000 geringer als die der entsprechenden X-D-Alanyl-D-Alanin-Komplexe [6, 38].

Zur Zeit werden zwei unterschiedliche Typen von Resistenzen unterschieden, der "VanA" und "VanB"-Typ. Der VanA-Typ zeigt eine Resistenz gegenüber Vancomycin und Teicoplanin und weist Kreuzresistenzen gegenüber allen untersuchten Glykopeptidantibiotika auf, während der VanB-Typ nur gegen Vancomycin resistent ist. Die VanA-Resistenz ist zur Zeit am besten untersucht. Als Ursache dieser Resistenz wurde ein Transposon identifiziert, das neun Gene trägt, von denen fünf für die Resistenz essentiell sind. Drei dieser Gene codieren Enzyme, die für die Synthese des neuen Zellwandprecursors notwendig sind. Einer D-Alanin-D-Lactat-Ligase kommt wohl die größte Bedeutung zu. Zwei weitere Gene sind Bestandteil eines neuen Regulationssystems [38].

Die Tatsache, dass die Resistenz plasmidcodiert ist und prinzipiell auf andere Bakterien übertragbar ist, stellt eine potentielle Gefahr dar. Insbesondere der Übergang der Vancomycin-Resistenz auf Methicillin-resistente Staphylokokken birgt die Gefahr des Auftretens von zur Zeit praktisch nicht zu behandelnden Krankheitserregern [39].

2.4 Humanpathologische Wirkung

2.4.1 Penicilline

Bereits Fleming stellte in Tierversuchen die äußerst geringe Toxizität des Penicillins fest [1]. Der überwiegende Anteil an aktivem Penicillin wird unverändert über die Niere ausgeschieden (60-80 %), der übrige Teil nach Metabolisierung zu inaktiven Derivaten [11, 33]. Das bedeutendste gesundheitliche Risiko geht von der sogenannten Penicillinallergie aus, die nach Sensibilisierung mit β -Lactamantibiotika hervorgerufen wird. Die Sensibilisierung wird hierbei nicht von Penicillinen an sich initiiert, da diese mit einem Molekulargewicht von < 400 Da zu klein sind, um selbst sensibilisierend zu wirken, sondern wird durch kovalente Bindung von Penicillinen an Serumproteine vermittelt. Die eigentliche antigene Determinante stellt das hierbei entstandene Penicilloyderivat dar [40, 41]. Nach AHLSTEDT und KRISTOFFERSEN [42] liegt die Häufigkeit des Auftretens allergischer Reaktionen während einer Penicillintherapie beim Menschen zwischen 1 und 10 %.

Symptome der allergischen Reaktion sind im allgemeinen Fieber, Exanthem und Enanthem (entzündliche Veränderungen der Haut bzw. Schleimhäute), Gelenkschmerzen und Albuminurie und klingen in der Regel nach 8-10 Tagen ab.

Bei sensibilisierten Personen kann im Zuge einer Therapie mit Penicillinen, ein anaphylaktischer Schock auftreten. Allein in den USA soll der während einer Penicillintherapie ausgelöste anaphylaktische Schock jedes Jahr zu 500 Todesfällen führen [43].

Es wurden auch Fälle von anaphylaktischen Reaktionen bei Personen beobachtet, deren initiale allergische Reaktion bereits Jahre zurücklag, ohne dass diese wissentlich mit Penicillinen in Berührung gekommen waren. Tatsächlich konnte in allen Fällen eine Exposition mit Penicillinen in sub-therapeutischen Mengen nachgewiesen werden, angefangen von Krankenbesuchen in Hospitälern bis hin zum Verkehr mit penicillintherapierten Geschlechtspartnern [44]. Ob bereits die orale Aufnahme von sub-therapeutischen Konzentrationen eine Sensibilisierung gegenüber Penicillinen auslösen kann, wird kontrovers diskutiert. Während einige Autoren eine Sensibilisierung bereits durch die orale Aufnahme von Penicillinrückständen über Lebensmittel oder Schimmelpilze für möglich halten [47], betrachten andere Autoren diesen Weg als sehr unwahrscheinlich [48]. Die Auslösung von allergischen Reaktionen bei sensibilisierten Personen durch extrem niedrige Konzentrationen, z.B. als Rückstände in tierischen Lebensmitteln, ist prinzipiell möglich, gilt aber als wenig wahrscheinlich [45, 46].

Sowohl JECFA (The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) als auch EMEA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) erachten das toxikologische Risiko von Penicillinrückständen in Lebensmitteln als äußerst gering [174, 175]. Auch bei der Festlegung von Rückstandshöchstmengen bzw. der MRL-Werte (maximum residue limit, MRL) für Penicillinrückstände in Lebensmitteln spielt es praktisch keine Rolle.

Zur Vermeidung allergischer Reaktionen sollte die Aufnahme von Penicillin (Benzylpenicillin) durch Rückstände auf einen Wert von maximal 30 µg pro Tag begrenzt werden [174]. Unter Zugrundelegung eines täglichen Verzehrs von 300 g Fleisch (Muskel), 100 g Leber, 50 g Niere und 1,5 kg Milch empfiehlt JECFA für Fleisch, Leber und Niere einen MRL-Wert von 50 µg/kg und für Milch einen MRL-Wert von 4 µg/kg. Bei einem Verzehr der genannten Lebensmittel und Mengen liegt die Aufnahme von Penicillin mit 29 µg knapp unterhalb der empfohlenen Tageshöstdosis. Die besondere Gewichtung des MRL-Wertes für Milch (4 µg/kg) im Vergleich zu den MRL-Werten für Fleisch, Niere und Leber (50 µg/kg) berücksichtigt mögliche technologische Störungen bei der Herstellung fermentierter Milchprodukte. Der MRL-Wert für Milch entspricht mit 4 µg/kg der Konzentration an Benzylpenicillin, unterhalb derer keine technologischen Störungen mehr zu befürchten sind.

Im Bereich der EU schlägt die EMEA MRL-Werte vor, die nach Durchlaufen der EU-Gesetzgebung für die Mitgliedstaaten verbindlich sind und in den Anhang der Verordnung der EWG 2377/90 [58] aufgenommen werden (vergl. Kap. 3.1). Auch hier wird die besondere Bedeutung von Penicillinrückständen bei der Herstellung fermentierter Produkte berücksichtigt. Diese Tatsache wird dadurch deutlich, dass für die Festsetzung der MRL-Werte für verschiedene Penicilline deren biologische Aktivität zugrundegelegt wird.

Da die biologische Aktivität für die Isoxazolympenicilline deutlich geringer ist als diejenige von Benzylpenicillin, ergeben sich für die Isoxazolympenicilline höhere MRL-Werte als für Benzylpenicillin (vergl. Tabelle 3-3).

2.4.2 Glykopeptidantibiotika

Glykopeptidantibiotika werden nach oraler Gabe nicht resorbiert, weshalb Vancomycin oral nur zur Behandlung von bakteriellen Enterokolitiden (Entzündungen des Dün- und Dickdarms) verabreicht wird [49]. Nach parenteraler Applikation wird der größte Teil über den Harn unverändert ausgeschieden. Die Halbwertszeit im Serum normaler Patienten liegt zwischen 5 und 11 Stunden (Vancomycin), während sie bei nierengeschädigten Patienten fünf und mehr Tage betragen kann. Aufgrund der langen Verweildauer von Vancomycin im Serum nierengeschädigter Patienten ist hier auch die verstärkte Bildung der bereits erwähnten CDP-Derivate zu beobachten [50].

Die beiden für die Humanmedizin wichtigsten Glykopeptidantibiotika Vancomycin und Teicoplanin zeigen nach parenteraler Gabe zahlreiche Nebenwirkungen, wobei vor allem ihre Nephro- (Nieren-) und Ototoxizität (irreversible Schädigung des Gehör- und Gleichgewichtssinns) zu nennen sind [19, 49]. Aus diesem Grund wird eine parenterale Therapie stets von einer ständigen Überwachung des Serumlevels begleitet, um Überdosierungen zu vermeiden und dennoch eine therapeutisch wirksame Serumkonzentration zu gewährleisten.

2.5 Anwendung in Tierhaltung und Veterinärmedizin

2.5.1 Penicilline

Im Rahmen der Veterinärmedizin finden Penicilline ihren größten Einsatz in der Mastitistherapie und -prophylaxe bei milchliefernden Nutztieren. Ca. 72 % aller auf dem deutschen Markt erhältlichen Mastitispräparate enthalten mindestens ein Penicillin, wobei Benzylpenicillin (44 %), Cloxacillin (20 %) und Ampicillin (8 %) die wichtigsten Vertreter sind [51].

Darüber hinaus werden Penicilline, allen voran Benzylpenicillin, auch bei Kälbern zur Behandlung von Infektionen des Atmungsapparates, Nabelinfektionen sowie Gelenkentzündungen und bei Schweinen zur Therapie bakterieller Infektionen wie Rotlauf und Glass'scher Krankheit eingesetzt [52].

Die amphoteren Aminopenicilline (Ampicillin, Amoxicillin) hingegen dienen überwiegend der Behandlung von bakteriellen Erkrankungen des Respirations-, Gastrointestinal- und Urogenitaltraktes bei Rindern, Kälbern, Schweinen und Pferden [53].

Allein aufgrund ihres verbreiteten Einsatzes muss stets mit Rückständen von Penicillinen in tierischen Lebensmitteln gerechnet werden, wobei als Hauptursache hierfür die Nichteinhaltung der vom Gesetzgeber vorgeschriebenen Wartezeit, d.h. die minimale Zeitspanne zwischen der letzten Applikation und der Lebensmittelgewinnung, angesehen wird.

Je nach Applikationsart werden pharmakologisch wirksame Substanzen mehr oder weniger rasch wieder ausgeschieden, wobei die Konzentration des Wirkstoffs im Organismus mit zunehmender Wartezeit asymptotisch gegen Null geht. Aufgrund der asymptotisch verlaufenden Ausscheidungskinetik und den immer empfindlicher werdenden Nachweismethoden ist daher die Forderung nach einer absoluten Rückstandsfreiheit heutzutage prinzipiell nicht mehr zu erfüllen. Daher wurden Höchstmengen (MRL-Werte) für Rückstände pharmakologisch wirksamer Substanzen in Lebensmitteln festgelegt, unterhalb derer Gefährdungen des Verbrauchers bzw. technologische Störungen bei der Verarbeitung praktisch ausgeschlossen sind (vergl. Kap. 2.4.1 und Tab. 3-3).

2.5.2 Glykopeptidantibiotika

Die Verbrauchszahlen für Dänemark (1994) von 24 kg Vancomycin in der Humanmedizin und 24 Tonnen Avoparcin in der Tiermast, unterstreichen die außerordentliche Bedeutung des Avoparcins [54]. Avoparcin ist das mit Abstand in größtem Maßstab produzierte Glykopeptidantibiotikum überhaupt, wobei seine antibiotische Wirkung weder zur Therapie akuter Erkrankungen noch zur Prophylaxe, sondern ausschließlich als Leistungsförderer in der Tiermast genutzt wurde. Dem therapeutischen Einsatz von Glykopeptidantibiotika allgemein kommt in der Veterinärmedizin keine Bedeutung zu. Wie alle antibiotisch wirksamen Leistungsförderer wird Avoparcin im Rahmen der Tiermast stets in subtherapeutischen Konzentrationen dem Futter zugesetzt (vergl. Tab. 2-2).

Hierbei sollen Leistungsförderer zu einer rascheren Gewichtszunahme und damit zu verkürzten Mastzeiten, einer besseren Ausnutzung des Futters (insbesondere bei nicht optimaler Futterzusammensetzung), sowie zur Verringerung von Aufzuchtverlusten führen. Im Vergleich zur Aufzucht ohne Leistungsförderer liegt in der Praxis die Leistungsverbesserung durch antibiotisch wirksame Futterzusatzstoffe zwischen 3-8 %. Die positiven Effekte werden um so deutlicher, je ungünstiger die hygienischen Verhältnisse und Fütterungsbedingungen in den jeweiligen Betrieben sind [55].

Kritiker des Antibiotikaeinsatzes in der Tiermast führen daher an, dass durch Optimierung der hygienischen Rahmenbedingungen sowie der Futterzusammensetzung prinzipiell auf antibiotisch wirksame Futterzusatzstoffe verzichtet werden kann, ohne dass für den Erzeuger und Verbraucher deutlich höhere Kosten entstehen würden [56].

Tierart	Höchstalter der Tiere	Gehalt im Alleinfutter (mg/kg)
Ferkel	4 Monate	10,0 - 40,0
Schweine	6 Monate	5,0 - 20,0
Masthühner	-	7,5 - 15,0
Masttruthühner	16 Wochen	10,0 - 20,0
Kälber	6 Monate	15,0 - 40,0
Mastrinder	-	15,0 - 20,0

Tabelle 2-2: bis 1997 in Deutschland zulässige Avoparcin-Konzentrationen in Futtermitteln [57]

Obwohl die positiven Effekte bei der Fütterung antibiotisch wirksamer Substanzen schon lange bekannt sind, ist ihr tatsächlicher Wirkmechanismus noch nicht eindeutig geklärt. Die Tatsache, dass die geschilderten Effekte nur bei oralen Gaben zu beobachten sind, nicht aber bei parenteraler Applikation, unterstützt die Theorie, dass es durch die entsprechenden Antibiotika zu einer positiven Beeinflussung der Magen-Darmflora kommt. Hierbei soll allerdings weniger eine Verschiebung der Population der Darmflora verantwortlich sein, sondern vielmehr eine Beeinflussung deren Stoffwechsels. So weist der geringere Ammoniakgehalt im Darmlumen behandelter Tiere auf einen verminderten bakteriellen Proteinabbau hin, infolge dessen dem Wirtsorganismus weniger essentielle Aminosäuren entzogen werden. Gleichzeitig soll die Konzentration toxischer Proteinabbauprodukte vermindert werden.

Daneben werden zahlreiche weitere Effekte wie die verminderte Toxinbildung im Magen-Darmtrakt der Tiere, eine verbesserte Glucoseausnutzung sowie Vitamin B-Versorgung für die positive Wirkung verantwortlich gemacht. Eine direkte Beeinflussung des Stoffwechsels der Tiere kann zumindest für die Antibiotika, die nicht resorbiert werden (z.B. Avoparcin, Flavophospholipol, Zink-Bacitracin), praktisch ausgeschlossen werden [55].

Da Avoparcin nach oraler Gabe nicht resorbiert wird, ist der Übergang ins zum Verzehr bestimmte Gewebe praktisch ausgeschlossen, was die im Rahmen des Zulassungsverfahrens für Avoparcin von der Herstellerfirma (CYANAMID) gewonnenen Daten zeigen (zitiert in [55]).

3 Analytik von Tierarzneimittelrückständen

3.1 Gesetzliche Grundlagen und Analysenstrategie

Im Bereich der Europäischen Union sind für alle zugelassenen Tierarzneimittel Höchstmengenregelungen (MRL-Werte = Maximum Residue Limits) durch die Verordnung 2377/90/EWG [58] getroffen. Tabelle 3-3 gibt die Höchstmengen für die bei Lebensmittel-liefernden Tieren zulässigen β -Lactamantibiotika wieder.

Die Grundlage der systematischen Überwachung im Binnenmarkt und somit auch der nationalen Rückstandskontrollpläne stellt die EU-Richtlinie 96/23/EWG dar [171]. Sie regelt die Untersuchungshäufigkeiten von Fleisch und Schlachttieren sowie von Milch, Eiern und Honig.

Eine Identifizierung und exakte Quantifizierung von Rückständen ist nur mittels physikalisch-chemischen Methoden möglich, wobei den chromatographischen Verfahren eine besondere Rolle zukommt. In der Praxis allerdings wäre eine Untersuchung aller Proben mit unbekanntem Rückstandsgehalt nur mit chromatographischen Methoden unmöglich, da diese zu geräte-, personal-, zeit-, und kostenaufwendig sind. Um die Effizienz der analytischen Vorgehensweise zu optimieren, lässt sich durch die Kombination verschiedener Methoden eine Auswahl der zu untersuchenden Proben treffen, welche dann weiteren Untersuchungsverfahren zugeordnet werden können.

Eine sinnvolle Analysenstrategie für ein rückstandsanalytisches Labor könnte wie folgt aussehen:

1. Schritt : Sind Rückstände vorhanden? => Ja/Nein-Entscheidung
2. Schritt : Rückstände stammen aus welcher Wirkstoffgruppe?
3. Schritt : Identifizierung und Quantifizierung der Rückstände mittels chromatographischer Verfahren
4. Schritt : Bestätigungsuntersuchung und Absicherung

Die Schritte 1 und 2 werden mittels sogenannter Screeningtests durchgeführt, die einen schnellen Hinweis auf eventuell vorhandene Arzneimittelrückstände geben und die Vorgehensweise der weiteren Analytik, überwiegend mittels physikalisch-chemischer Verfahren, bestimmen (Schritt 3 u. 4).

Innerhalb der EU sind durch die Entscheidung 93/256/EWG [60] Anforderungen an Routinemethoden der Rückstandsanalytik von Stoffen mit hormonaler bzw. thyreostatischer Wirkung vorgegeben. Über die EU-Entscheidung 93/257/EWG [61], die die Referenzmethoden betrifft, sind diese Anforderungen für fast alle Stoffe gültig und beziehen sich unter anderem auf folgende Methodenkriterien:

- Spezifität: Unterscheidung des Analyten von anderen Stoffen
- Genauigkeit: Übereinstimmung der gemessenen Werte mit dem Ist-Wert
- Präzision: Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit
(Übereinstimmung der Ergebnisse unter wiederholbaren bzw. vergleichbaren Bedingungen)
- Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Zwar schreibt die EU keine offiziellen Methoden für die Routineanalytik vor, empfiehlt aber die Verwendung zertifizierter Referenzmaterialien (CRM), mit denen die Tauglichkeit der Methode bezüglich der genannten Anforderungen überprüft werden sollte. Für zahlreiche Analyten und Probenmatrices sind solche CRM über das Institute for Reference Materials and Measurements verfügbar [62], für den Bereich der Tierarzneimittelanalytik bisher jedoch ausschließlich für Chloramphenicol in Fleisch. In Ermangelung solchen Referenzmaterials kann ersatzweise auf dotierte Proben zurückgegriffen werden.

Antibiotikum	MRL Wert [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	
	Milch	Muskulatur, Leber, Niere, Fett
Penicillin G	4	50
Ampicillin	4	50
Amoxicillin	4	50
Oxacillin	30	300
Cloxacillin	30	300
Dicloxacillin	30	300
Nafcillin	30	300
Phenoxymethylpenicillin	-	25

Tabelle 3-3: Maximal zulässige Penicillinrückstände in Lebensmitteln entsprechend VO 2377/90/EWG [58]

3.2 Screeningtests

3.2.1 Allgemeines

Für zahlreiche Antibiotika stehen eine Reihe empfindlicher, kommerziell erhältlicher Schnelltests zur Verfügung, welche sich durch ihre schnelle und einfache Durchführung und Auswertung auszeichnen. Zu diesen Tests zählen in erster Linie mikrobiologische Hemmstofftests, Rezeptortests und immun-chemische Verfahren. Für eine umfassende Übersicht gängiger Testsysteme für Antibiotika-Rückstände in Lebensmitteln sei auf den Review-Artikel von BOISON und MACNEIL [97] verwiesen. Prinzipiell gilt, dass Screeningtests möglichst keine falsch-negativen Ergebnisse liefern sollen, wobei falsch-positive Ergebnisse in bestimmten Grenzen toleriert werden können.

Die Übergänge zwischen den einzelnen Testverfahren sind fließend. So stellen die Rezeptortestverfahren häufig nichts anderes als *in vitro*-Tests der mikrobiologischen Testsysteme dar.

Der Begriff "Rezeptor" war ursprünglich nur auf bestimmte Proteine beschränkt, die in der Lage sind kleinere Moleküle, sogenannte Agonisten ("Effektoren"), spezifisch zu binden, woraufhin ein physiologischer Effekt ausgeübt wird (Rezeptor/Effektor-Wirkung).

Im Rahmen der modernen Pharmakologie wurde dieser Begriff allerdings auf alle Moleküle ausgeweitet, die mit hoher Affinität und Spezifität andere Substanzen (Liganden) binden.

Als Rezeptor/Ligand-Wechselwirkung beschreibt diese Definition nun alle spezifischen Bindungen, angefangen mit der klassischen Rezeptor/Effektor-Bindung, über die Bindung eines Substrats oder Inhibitors an ein Enzym, bis hin zur Antikörper-/Antigen- oder Biotin/Avidin-Wechselwirkung [98].

Den Screeningtests auf β -Lactamantibiotika sowie den mikrobiologischen Hemmstoff- und Proteinbindungs-Testsystemen liegt ein universelles Prinzip spezifischer Ligand/Rezeptor-Wechselwirkungen zugrunde. Diesem Prinzip, das in der vorliegenden Arbeit eine zentrale Rolle spielt, ist ein eigenständiges Kapitel gewidmet (Kapitel 4).

3.2.2 Mikrobiologische Testverfahren für β -Lactamantibiotika

Beim Screening auf Antibiotika-Rückstände in Lebensmitteln tierischer Herkunft haben mikrobiologische Hemmstofftests eine herausragende Stellung eingenommen und stellen derzeit die wichtigsten Routinemethoden dar. Zahlreiche Testsysteme sind kommerziell erhältlich und auf die jeweiligen Fragestellungen angepasst, wie z.B. der Brillantschwarz-Reduktionstest [99, 100], DELVOTEST P bzw. SP [100], SWAB TEST ON PREMISES (STOP) und LIVE ANIMAL SWAB TEST (LAST) [101]. Das Prinzip dieser Methoden beruht auf einer Hemmung des Wachstums und der Stoffwechsellistung der zum Test eingesetzten Mikroorganismen in Gegenwart von Antibiotika sowie anderer Hemmstoffe. Durch Standardisierung der Agardiffusionsverfahren bezüglich Agarzusammensetzung, pH-Wert, Bebrütungsdauer, Probenvorbereitung etc. und der Zucht und Verwendung definierter Bakterienstämme stehen heute zuverlässige mikrobiologische Verfahren zur Verfügung. Die Bakterienstämme sind über offizielle Sammlungen z.B. die "American Type and Culture Collection" [102] oder die "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen" [103] zu beziehen..

Durch Verfeinerung der Verfahren wie Variation in der Zusammensetzung der Nährmedien und durch Verwendung verschiedener Testkeime lässt sich zumindest ansatzweise eine Eingrenzung einzelner Wirkstoffklassen vornehmen. Als Beispiele hierfür seien der in die Methodensammlung nach § 35 LMGB aufgenommene 3-Plattentest [64] und der relativ aufwendige 12-Plattentest nach Lund [104] genannt.

Der in der amtlichen Sammlung von Untersuchungsmethoden nach § 35 LMGB verwendete Testkeim *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Penicillinen aus. Ansatzweise kann hier eine Abgrenzung der β -Lactamase-empfindlichen Penicilline von anderen Hemmstoffen durch den Einsatz von Penicillinase erfolgen. DE LEUW [105] beschrieb jedoch, dass bei hohen Konzentrationen an Penicillinase auch die als β -Lactamase-stabil geltenden Isoxazolympenicilline deaktiviert werden.

Bei klassischen Agardiffusionsverfahren erfolgt nach einer Bebrütungsdauer von 18-24 Stunden die Auswertung über die Hemmhofgröße, die auch eine semi-quantitative Aussage zulässt. Bei Hemmstofftests mit Auswertung über Stoffwechselprodukte liegt ein Ergebnis häufig bereits nach 3-6 Stunden vor [97].

Die drastische Verringerung der Bebrütungszeit wird erreicht durch rasch wachsende Bakterien und durch den Zusatz von Farbindikatoren zum Nährmedium, die durch Stoffwechselprodukte der Bakterien einen Farbumschlag erfahren.

Häufig verwendete Tests dieses Typs sind der Brillantschwarz-Reduktionstest [99], und der DELVOTEST™ P bzw. SP [106].

Beim Brillantschwarz-Reduktionstest, wie er z.B. in der amtlichen Sammlung nach § 35 LMGB für den Nachweis von Hemmstoffen in Milch beschrieben wird, enthält das Nährmedium den Redoxindikator Brillantschwarz. Wachstum und Stoffwechsel des Testkeims (*Bacillus stearothermophilus*) ist mit einer Änderung des Redoxpotentials des Mediums verbunden und führt zum Farbumschlag des Redoxindikators von schwarz-blau nach gelb. In Gegenwart von Hemmstoffen unterbleibt das Bakterienwachstum und der Indikator behält seine ursprüngliche Farbe bei.

Der DELVOTEST™ P/SP nutzt die Säureproduktion des Testkeims während des Wachstums. Die gebildete Säure führt zum Farbumschlag des dem Medium zugesetzten pH-Indikators Bromkresolpurpur von blau-rot nach gelb. Wie beim Brillantschwarz-Reduktionstest unterbleibt auch hier der Farbumschlag in Gegenwart von Hemmstoffen.

Alle genannten mikrobiologischen Testsysteme haben je nach Fragestellung und Probenmatrix diverse Vor- und Nachteile, wobei insbesondere das Auftreten falsch-positiver oder falsch-negativer Befunde bezüglich einzelner Wirkstoffe bzw. Wirkstoffgruppen eine besondere Rolle spielt [106, 107]. Des Weiteren ist die eindeutige Identifizierung einzelner Wirkstoffe i.d.R. nicht möglich. Aus diesen Gründen ist die Absicherung positiver Befunde und die Identifizierung durch physikalisch-chemische Methoden unerlässlich.

3.2.3 Hemmstofftest zum Nachweis von Avoparcin in Futtermitteln

Da das einzige bei Lebensmittel-liefernden Tieren eingesetzte Glykopeptidantibiotikum Avoparcin vom Organismus praktisch nicht resorbiert wird, beschränkt sich der Nachweis dieser Substanz ausschließlich auf Futtermittel bzw. Futter-Vormischungen.

Für die amtliche Untersuchung steht ein offizielles, EU-weit einheitliches mikrobiologisches Verfahren zur Verfügung [108, 109].

Dieser Test wird als klassischer Agar-Diffusionstest mit *Bacillus subtilis* als Testkeim durchgeführt. Avoparcin wird hierzu mit einem Aceton-Salzsäure-Gemisch aus dem Futter oder der Futter-Vormischung extrahiert, der Extrakt verdünnt, neutralisiert und anschließend auf die Agarplatte gegeben. Nach einer Bebrütungsdauer von 16-18 Stunden bei 30 °C werden bei positiven Proben die Hemmhöfe ausgemessen und quantitativ ausgewertet. Die Nachweisgrenze dieses Verfahrens wird mit 2 mg/kg angegeben.

Kürzlich wurde ein dünnschichtchromatographisches Verfahren zum Nachweis von Avoparcin in Futtermitteln, Vormischungen und Konzentraten vorgestellt, das gleichzeitig den Nachweis 15 weiterer Antibiotika ermöglicht [90]. Die Detektion der Substanzspots erfolgt jedoch ebenfalls auf mikrobiologischem Wege mittels Bioautographie.

3.3 Physikalisch-chemische Analysenverfahren

3.3.1 β -Lactamantibiotika

Wie in Kap. 3.1 erläutert müssen positive Ergebnisse der Screeningtests durch mindestens ein physikalisch-chemisches Referenzverfahren sowohl qualitativ als auch quantitativ abgesichert werden. Auch mit diesen Verfahren sollten möglichst alle in Frage kommenden Vertreter der betreffenden Wirkstoffgruppe nebeneinander erfasst werden können („Multimethoden“). Bei bestimmten Fragestellungen (z.B. Tetracyclinanalytik) ist darüber hinaus die gleichzeitige Erfassung möglicher Metaboliten erforderlich.

Speziell die Analytik von β -Lactamantibiotika-Rückständen in Lebensmitteln stellt nach wie vor eine besondere Herausforderung dar. Die einzelnen Verbindungen in dieser Substanzgruppe weisen viele unterschiedliche Eigenschaften auf, so dass bis heute eine simultane Erfassung aller relevanten Vertreter allein mit nur einer physikalisch-chemischen bzw. chromatographischen Methode gescheitert ist.

So wird eine verlustfreie Extraktion der Analyten aus der Probenmatrix schon durch die geringe chemische Stabilität des β -Lactamsystems erschwert.

Des Weiteren behindert die Vielfalt der möglichen Seitenketten und funktionellen Gruppen, die große Unterschiede in den Löslichkeits- und chromatographischen Eigenschaften mit sich bringt, die gleichzeitige Extraktion aller in Frage kommenden Penicilline und Cephalosporine in ein organisches Lösemittel oder die Adsorption an eine stationäre Phase (solid phase extraction, SPE). Dies betrifft besonders die amphoteren Penicilline Ampicillin und Amoxicillin.

Gaschromatographisch können bisher nur die monobasischen Penicilline nach einer vorausgehenden Methylierung der Carboxylgruppe getrennt werden. MEETSCHEN und PETZ beschrieben 1991 eine gaschromatographische Methode zum simultanen Nachweis sieben neutraler Penicilline nach Derivatisierung mit Diazomethan [63]. Aufgrund der zum Zeitpunkt der Methodenentwicklung nach der Fleischhygieneverordnung vorgeschriebenen Beurteilungswerte von $< 3 \mu\text{g}/\text{kg}$ für Milch und Gewebeproben konnte sich diese Methode trotz ihrer zahlreichen und zeitaufwendigen Arbeitsschritte als eine vorläufige Methode der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMGB etablieren [64].

Beim Nachweis mittels HPLC-Methoden stellt neben dem stark abweichenden chromatographischen Verhalten von neutralen und amphoteren Penicillinen das Fehlen einer spezifischen nativen UV-Absorption oder Fluoreszenz ein zusätzliches Problem dar, insbesondere in Gegenwart komplexer Matrices. Flüssigchromatographische Verfahren zum simultanen Nachweis verschiedener strukturanaloger Penicilline in Lebensmitteln erfordern entweder ein effektives und gleichzeitig schonendes Clean-up, welches eine ungestörte Bestimmung mittels UV-Detektion auch bei Wellenlängen von 200-230 nm [65-69] bzw. massenspektrometrische LC-MS-Kopplungen zulässt [70-72], oder aber eine Vor- bzw. Nachsäulen-Derivatisierung zur Erhöhung der Spezifität bzw. Selektivität der Detektion. Neben klassischen Derivatisierungsmethoden mit 9-Fluorenylmethyl-chlorformiat [73] oder Fluorescamin [74], mit denen sich die freien Aminogruppen der amphoteren Penicilline direkt derivatisieren lassen, beschreiben andere Autoren die Umsetzung der durch Hydrolysereaktionen des β -Lactamsystems gewonnenen Abbauprodukte mit 7-Fluor-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol [75] oder Dansylhydrazin [76] zu fluoreszierenden Derivaten. Die Umsetzung der amphoteren Penicilline Ampicillin und Amoxicillin mit Formaldehyd in Gegenwart von Trifluoressigsäure führt ebenfalls zu fluoreszierenden Derivaten und wurde erfolgreich zur Bestimmung dieser Penicilline in Milch, Fleisch und Fisch angewendet [77, 78].

Eine häufig beschriebene Derivatisierung ist die Umsetzung mit Quecksilber(II)chlorid in Gegenwart von Triazol oder Imidazol, wobei die Penicilline zu den entsprechenden Quecksilber-Mercaptiden umgesetzt werden, welche sich selektiv bei ca. 320 nm detektieren

lassen [79-82]. Diese Methode ist sowohl auf monobasische als auch amphotere Penicilline anwendbar, letztere müssen allerdings zuvor mit Essigsäure- bzw. Benzoesäureanhydrid acyliert werden [79, 80]. BERGER und PETZ beschreiben die Derivatisierung der Carboxylgruppe neutraler Penicilline mit 4-Bromomethyl-7-methoxy-coumarin zu fluoreszierenden Derivaten und deren Trennung mittels HPLC [83].

Eine weitere Detektionstechnik stellt die elektrochemische Detektion nach einer on-line Photolyse dar, die bei den monobasischen Penicillinen eine oxidative Elektroaktivität induziert. Die Isoxazolympenicilline zeigen nach der Bestrahlung darüber hinaus ein zusätzliches Absorptionsmaximum bei ca. 300 nm, welches zur selektiven UV-Detektion herangezogen werden kann [84]. Auch die besondere Eigenschaft der Penicilline durch die Stabilisierung von Superoxidradikalen die Chemilumineszenz des Luminol/Co²⁺/H₂O₂-Systems zu verstärken [85] kann zur Detektion in der HPLC genutzt werden [86].

Für weitere Einzelheiten bzw. detaillierte Hinweise zum chromatographischen Nachweis von Penicillinen unter Berücksichtigung verschiedener Methoden der Deproteinierung, Extraktion, Clean-up-Techniken, Derivatisierung, Detektion etc. sei auf ausführliche Übersichtsarbeiten [87-89] verwiesen.

3.3.2 *Glykopeptidantibiotika*

Im Gegensatz zu den β -Lactamantibiotika haben Glykopeptidantibiotika im Rahmen der Rückstandsanalytik in Lebensmitteln praktisch keine Bedeutung, da Avoparcin als einzig in Frage kommender Vertreter dieser Substanzklasse nur als Futterzusatzstoff eingesetzt wurde und praktisch nicht resorbiert wird.

Im Rahmen der Futtermittelanalytik kommt hauptsächlich das bereits beschriebene mikrobiologische Verfahren zum Einsatz (vergl. Kap. 3.2.3). FAGAN et al. beschreiben eine HPLC-Methode für den Nachweis von Ardacin in Futtermitteln [91]. Zwar lag für dieses Glykopeptidantibiotikum bereits eine vorläufige Zulassung als Futtermittelzusatzstoff vor, doch wurde es im Zuge des Avoparcinverbots nicht mehr am Markt eingeführt [92].

Zahlreiche HPLC-Methoden für Glykopeptidantibiotika, allen voran Vancomycin, wurden für Untersuchungen im Rahmen der klinischen Chemie und Forschung beschrieben, wobei die Trennung im allgemeinen auf RP-Phasen mit wässrigen Acetonitril- oder Methanol-Eluenten durchgeführt wird. Anschließend wird im UV detektiert [19, 93-96].

4 Enzyme und Peptide der bakteriellen Zellwandsynthese als Rezeptoren

4.1 Allgemeines

Rezeptortestverfahren basieren auf der Bindungsreaktion zwischen dem betreffenden Analyten und den Bindungsstellen spezifischer Rezeptoren von Bakterien. In der Regel werden diese Tests als Konkurrenzexperimente durchgeführt, wobei der Analyt aus der Probe mit zugesetztem markiertem Analyten um die betreffenden Rezeptoren konkurriert. Der zugesetzte Analyt kann z.B. radioaktiv oder mit einem Enzym markiert sein, wobei die Auswertung des Assays dann über eine Radioaktivitätsmessung bzw. über eine Enzymreaktion erfolgt [97]. Diese Techniken entsprechen im wesentlichen den gängigen Radio-Immuno-Assays (RIA) oder Enzym-Immuno-Assays (EIA). Häufig werden kommerzielle immun-chemische Testkits ebenfalls als Rezeptorassays bezeichnet.

4.2 Rezeptortests für β -Lactamantibiotika

Bei den "echten" Rezeptorassays sind die Rezeptoren häufig mit dem Angriffsort ("Target") der Antibiotika identisch und stehen im engen Zusammenhang mit deren Wirkmechanismus. Im Fall der β -Lactamantibiotika stellen membrangebundene D,D-Transpeptidasen den Rezeptor dar. Wie unter Punkt 2.3.2.1 beschrieben, akzeptieren D,D-Transpeptidasen aufgrund der Strukturanalogie mit D-Alanyl-D-Alanin β -Lactamantibiotika als Substrat, was zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen dem betreffenden Antibiotikum und dem aktiven Zentrum des Enzyms führt. Die hohe Stabilität dieses Komplexes erlaubt die Nutzung des Enzyms als Rezeptor für die Analytik.

In der Praxis haben sich für die Penicillinanalytik der CHARM-TEST II TM [110], CITE-PROBETM- und SNAP-TESTTM [111] und DELVO-X-PRESSTM [100] etabliert.

Beim CHARM-Test II konkurriert ein radioaktiv markiertes Penicillin mit β -Lactamantibiotika-Rückständen aus der Probe um die Rezeptoren einer Suspension von *Bacillus stearothermophilus*. Nach der Inkubation wird der Ansatz zentrifugiert und der verbleibende Pellet (bestehend aus den Bakterien und dem daran gebundenen Penicillin) zur Entfernung überschüssigen markierten Penicillins gewaschen und die Radioaktivität nach Zugabe von Szintillationslösung in einem Szintillationszähler gemessen. Die gemessene Radioaktivität (counts per minutes) nimmt mit zunehmender Konzentration an Penicillin in der Probe ab, so dass auch eine grobe Quantifizierung des Wirkstoffs möglich ist.

Im Gegensatz zum CHARM-Test, der auf intakte Bakterienzellen zurückgreift, werden im CITE-probe und SNAP-Test auf β -Lactamantibiotika speziell präparierte Bakterienzellwände verwendet, die auf einer Kunststoffmembran fixiert sind. Bei beiden Testsystemen konkurrieren β -Lactamantibiotika aus der Probe mit zugesetztem enzymmarkiertem Penicillin um die Rezeptoren in den Zellwänden. Der Nachweis des gebundenen enzymmarkierten Penicillins erfolgt mittels einer von den Herstellern nicht näher bekannt gegebenen Enzymreaktion, die zu einem farbigem Spot auf der Testmembran führt. In Gegenwart von unmarkiertem Penicillin wird die Färbung abgeschwächt. CITE-probe und SNAP-Tests sind auch für zahlreiche andere Antibiotika erhältlich und arbeiten nach dem gleichen Prinzip, wobei jedoch häufig statt spezifischer Rezeptoren Antikörper auf der Testmembran fixiert werden.

Der PENZYM-Test™ [112] stellt unter den Rezeptorassays eine Besonderheit dar und wurde erstmals 1980 von FRERE et al. [113] beschrieben. Wie beim CHARM, CITE-probe und SNAP-Test handelt es sich bei dem Rezeptor in diesem Assay um ein Enzym, das die Peptidbindung von D-Alanyl-D-Alanin hydrolysiert und von Penicillin irreversibel gehemmt wird. Im Gegensatz zu den vorstehend genannten Rezeptortestverfahren erfolgt im PENZYM-Test™ der Nachweis von Penicillinen nicht durch eine Konkurrenzreaktion von markierten Penicillinen und Penicillinrückständen aus der Probe, sondern über die Deaktivierung einer als Rezeptor eingesetzten D,D-Carboxypeptidase durch β -Lactamantibiotika.

Dem PENZYM-Test liegt die Hydrolyse des Tripetids $N\alpha$;N ϵ -Diacetyl-L-Lysino-D-Alanyl-D-Alanin durch eine lösliche D,D-Carboxypeptidase aus *Actinomadura R 39* zugrunde, wobei ein D-Alanin freigesetzt wird. Dieses freigesetzte D-Alanin wird anschließend mit Hilfe einer D-Aminosäureoxidase zu Pyruvat oxidiert, wobei Wasserstoffperoxid entsteht, welches in Gegenwart einer Peroxidase den zugesetzten Farbindikator von gelb nach pink-orange umschlagen lässt. Durch β -Lactamantibiotika wird die D,D-Carboxypeptidasereaktion gehemmt, weshalb die sich anschließenden Enzymreaktionen ebenfalls unterbleiben, so dass kein Farbumschlag beobachtet wird.

Wie die mikrobiologischen Testsysteme sind auch die genannten Rezeptortests gruppenspezifisch, d.h. die eindeutige Identifizierung einzelner β -Lactamantibiotika ist auch mit diesen Tests nicht möglich. Auch in diesem Fall müssen zur Absicherung positiver Befunde Referenzverfahren hinzugezogen werden.

4.3 Lysinyl-D-Alanyl-D-Alanin als Rezeptor für Glykopeptidantibiotika

CORTI et al. [115] beschrieben ein Verfahren zum spezifischen Nachweis von Glykopeptidantibiotika in Patienten-Seren mit Hilfe eines quantitativen kompetitiven Solid Phase Enzyme Rezeptor Assays (SPERA). Als Rezeptor dient hierbei ein Protein-Lysinyl-D-Alanyl-D-Alanin-Konjugat, das auf einem festen Träger immobilisiert wurde. Während der Testdurchführung konkurrieren Glykopeptidantibiotika aus dem zu testenden Serum mit Peroxidase-markiertem Teicoplanin um die zur Verfügung stehenden D-Alanyl-D-Alanin-Rezeptoren. Nach der Entfernung überschüssiger Reagenzien durch einen Waschschrift, wird die Aktivität der gebundenen Peroxidase durch eine Farbreaktion nachgewiesen. Die Intensität der Farbreaktion wird photometrisch bestimmt und verhält sich umgekehrt zur Konzentration der Glykopeptidantibiotika im Serum. Zwar hat sich dieses Verfahren in der klinischen Chemie nicht etablieren können, doch werden ähnlich aufgebaute Testsysteme zum Screening auf Glykopeptidantibiotika im Rahmen der pharmakologischen Forschung eingesetzt [6].

Der besondere Reiz, der von diesem Testsystem ausgeht, liegt in der Tatsache begründet, dass in diesem Fall nicht, wie bei den β -Lactamantibiotika D,D-Transpeptidasen oder D,D-Carboxypeptidasen als Rezeptor eingesetzt wurden, sondern vielmehr das natürliche D-Alanyl-D-Alanin-Substrat dieser Enzyme den eigentlichen Rezeptor darstellt.

5 Immun-chemische Nachweisverfahren

5.1 Immun-chemischer Nachweis von anti-Penicillin-Antikörpern

Aufgrund der außergewöhnlichen Bedeutung der immunpathologischen Nebenwirkungen während einer Penicillintherapie wurden bereits in den 50er Jahren Immunoassays für den Nachweis von anti-Penicillin-Antikörpern entwickelt [117]. Insbesondere der Radioallergosorbent-Test (RAST) zum Nachweis von Antikörpern gegen Benzylpenicilloylsäure hat im klinischen Bereich Bedeutung erlangt [118]. Neben weiteren Radioimmunoassays (RIA) zum Nachweis von Antikörpern gegen Penicilline und Cephalosporine [119-121] existieren ebenfalls Enzymimmunoassays zur Detektion von Antikörpern gegen die Penicilloylgruppe [122, 123] sowie zum Nachweis von gegen den unveränderten β -Lactamring gerichteten Antikörpern [124].

Das Ziel, das mit der Entwicklung der entsprechenden Testsysteme verfolgt wurde, beschränkte sich stets auf den Nachweis von anti-Penicillin-Antikörpern in Seren von Allergieklienten. Im Rahmen der Rückstandsanalytik spielen diese Testsysteme daher keine Rolle.

5.2 Immun-chemischer Nachweis von Penicillinen

Während die beschriebenen Immunoassays aus dem klinischen Bereich auf den Nachweis von anti-Penicillin-Antikörpern in Seren von Allergieklienten ausgerichtet sind, wurden umgekehrt sowohl für den Zweck der medizinischen Forschung als auch für die Analytik von Antibiotikarückständen in Lebensmitteln die gezielte Gewinnung von Antiseren und monoklonalen Antikörpern zum Nachweis verschiedener β -Lactamantibiotika beschrieben.

Je nach Vorgehensweise bei der Immunisierung bzw. Immunogensynthese war hierbei die Affinität dieser Antikörper überwiegend gegen die Penicilloylgruppe [125], gegen die Seitenkette [126] sowie gegen Seitenkette einschließlich Teilen des intakten Penam- bzw. Cephem-System gerichtet [127, 128].

Für die Erfassung aller in der Veterinärmedizin verwendeten Penicilline und Cephalosporine wäre entweder eine Kombination verschiedener Antikörper gegen die entsprechenden Substanzen oder aber ein multispezifischer Antikörper erforderlich, dessen Antigenbindungsstelle ausschließlich gegen das Penam- bzw. Cephem-Gerüst als gemeinsames Strukturelement der Penicilline bzw. Cephalosporine gerichtet wäre.

Bisher allerdings sind nur wenige Antikörper bzw. Antiseren beschrieben, die eine breite Kreuzreaktivität gegenüber Vertretern ihrer jeweiligen Substanzklasse aufweisen. Ein besonderes Problem bei der Gewinnung von anti-Penicillin-Antikörpern stellt die Hydrolyseempfindlichkeit des β -Lactamrings der Penicilline dar. Bereits bei der Herstellung des Penicillin/Proteinkonjugats und auch nach der Immunisierung in einem durch Adjuvantien gereizten Gewebe ist eine partielle Hydrolyse des Penicillinanteils im Immunogen nicht auszuschließen. Da auch diese Abbauprodukte, u.a. Penicilloyllderivate, eine Immunantwort auslösen können und die dabei gebildeten Antikörper wiederum im Zuge einer Kreuzreaktion an Penicilline binden können, wird die Gewinnung und Charakterisierung eines Antikörpers, der ausschließlich das intakte Penamsystem bzw. die 6-Aminopenicillansäure erkennt, zusätzlich erschwert.

Hervorzuheben sind hier ein Antiserum und ein monoklonaler Antikörper gegen Ampicillin, die von USLEBER et al. beschrieben wurden [129]. Diese Antikörper zeigen eine hohe Kreuzreaktivität gegenüber einer Vielzahl veterinärmedizinisch relevanter Penicilline, aber praktisch keine Kreuzreaktivität zu Cephalosporinen. Darüber hinaus konnte keine nennenswerte Kreuzreaktivität zu Penicilloylsäure-Derivaten festgestellt werden, was darauf hinweist, dass tatsächlich das intakte Penamsystem die antigene Determinante dieser Antikörper darstellt.

DIETRICH et al. [138] beschrieben kürzlich die Anreicherung von Penicillinen mittels Immunaффinitätschromatographie unter Verwendung der genannten monoklonalen Antikörper. Die Säulenkapazität lag bei 6,6 $\mu\text{g/ml}$ für Ampicillin bzw. 5,4 $\mu\text{g/ml}$ für Cloxacillin. Die Wiederfindungsraten von Amoxicillin, Ampicillin, Cloxacillin, Dicloxacillin, Penicillin G und Oxacillin aus Pufferlösungen lagen im Bereich von 67 bis 100 %. Allerdings war die Elution der Analyten nur durch hohe Konzentrationen an Methanol möglich, was zu einer irreversiblen Denaturierung bzw. Inaktivierung der immobilisierten Antikörper führte.

Als kommerziell erhältliche immun-chemische Testverfahren auf Penicilline haben sich der LACTEK™ [111, 130] und der FLUOROPHOS BETASCREEN™ [131, 132] etabliert. Beide Tests werden als Röhrchenschnelltest angeboten. Die Funktionsweise entspricht in etwa den genannten Rezeptortests: Penicilline aus der Probe konkurrieren mit enzymmarkierten Penicillinen um die Bindestellen der in den Röhrchen immobilisierten Antikörper. Der Nachweis des gebundenen enzymmarkierten Penicillins erfolgt durch eine Enzymreaktion, infolge derer beim LACTEK-Test ein Farbstoff bzw. beim FLUOROPHOS-Assay eine fluoreszierende Verbindung gebildet wird. Die Auswertung erfolgt photometrisch bzw. fluorimetrisch, wobei sich die gemessene Signalintensität umgekehrt zur Penicillinkonzentration in der Probe verhält.

5.3 Immun-chemischer Nachweis von Glykopeptidantibiotika

Im Gegensatz zu Penicillinen haben bei den in der Humanmedizin eingesetzten Glykopeptidantibiotika Vancomycin und Teicoplanin eine schmale therapeutische Breite: die für eine erfolgreiche Therapie notwendigen und die für Nebenwirkungen zu vermeidenden Plasmakonzentrationen liegen sehr nahe beieinander. Aus diesem Grund muss die Serumkonzentration während der Therapie ständig überwacht werden. Dafür stehen einige kommerzielle immun-chemisch Testsysteme zur Verfügung, wobei insbesondere die Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassay-Systeme (FPIA) der Firmen ABBOTT (Abbott FPIA Technology [133]) und INNOFLUOR [134] besonders verbreitet sind.

Im Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassay werden Fluoreszenz-markierte Antibiotika eingesetzt, welche stabile Antikörper/Antigenkomplexe bilden. Der Antikörper-gebundene Fluoreszenzmarker emittiert aufgrund der eingeschränkten Rotationsfähigkeit der Antikörper/Antigenkomplexe nach Bestrahlung mit polarisiertem Licht selbst polarisiertes Fluoreszenzlicht. In Gegenwart von unmarkiertem Antigen wird entsprechend markiertes Antigen aus den Antikörperkomplexen freigesetzt. Dem freigesetzten markiertem Antigen stehen nun wieder alle Freiheitsgrade der Rotation zur Verfügung, weshalb er Fluoreszenzlicht in verschiedenen Ebenen emittiert. Hierdurch nimmt der Anteil des polarisierten Fluoreszenzlichtes ab. Diese Abnahme der Intensität wird durch eine spezielle Optik detektiert und verhält sich proportional der Konzentration an Antikörper-gebundenem markiertem Antigen bzw. umgekehrt proportional der Konzentration des betreffenden Analyten [97, 134].

Der lineare Bereich dieses Verfahrens für Vancomycin in Patientenserum liegt zwischen 1-100 µg/ml [135]. Noch vor kurzem wurden Probleme aufgrund der Kreuzreaktivität der verwendeten Antikörper mit Vancomycin-Abbauprodukten beschrieben, insbesondere mit den unter Punkt 2.2.2. beschriebenen CDP-Derivaten [19, 136]. Da sich diese Abbauprodukte häufig bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion anreichern, kann dies zu einer Fehleinschätzung der Vancomycinkonzentration im Serum bei dieser Personengruppe führen. Durch Verwendung eines neuen monoklonalen Antikörpers konnten diese Schwachstellen des Testsystems offenbar behoben werden [137].

6 Antikörper-Gewinnung und Aufbau immun-chemischer Testsysteme

6.1 Einführung

Antikörper sind spezifische Rezeptor-Proteine (Immunglobuline), die bei Wirbeltieren im Zuge der sogenannten adaptiven Immunantwort gegen Viren, Bakterien, Parasiten aber auch gegen entartete körpereigene Zellen vom Organismus gebildet werden. Sie dienen in erster Linie der Markierung für nachfolgende Abwehrmechanismen [139]. Die Markierung verläuft hierbei über die Bindung der Antikörper an bestimmte molekulare Strukturen, die für den jeweiligen Eindringling charakteristisch sind und als Antigen bezeichnet werden. Tatsächlich werden allerdings nur bestimmte Teilbereiche mit einer Größe entsprechend einem Peptid aus bis zu 8 Aminosäuren von der Antikörperbindestelle (Paratop) erkannt. Diese Teilbereiche werden auch als antigene Determinanten oder Epitope bezeichnet. Epitope lösen in isolierter Form im allgemeinen selbst keine Immunantwort aus (inkomplette Antigene), da die Mechanismen der Immunantwort eine molekulare Mindestgröße von 3000-5000 Da (z.B. Polypeptide oder Proteine aus mind. 25-45 Aminosäuren) zur Erkennung körperfremder Strukturmerkmale erfordern [141-145]. Erst gegen sogenannte Vollantigene (Immunogene), welche diese strukturellen Mindestanforderungen erfüllen, kann der Säugetierorganismus Antikörper produzieren. Da höhere Organismen prinzipiell gegen alle als körperfremd erkannte Substanzen Antikörper bilden können, lassen sich auf diese Weise durch Immunisierung von Versuchstieren mit den entsprechenden Substanzen hochspezifische Rezeptoren für alle erdenklichen analytischen Fragestellungen gewinnen, so auch Rezeptoren gegen Antibiotika und andere Arzneimittel [143]. Abgesehen von einigen Ausnahmen sind Antibiotika zu klein, um selbst eine Immunantwort auszulösen [145]. Erst nach kovalenter Kopplung der Zielsubstanz, dem Hapten, an Proteine erhält man ein Vollantigen. Bevorzugt werden hierbei Proteine aus solchen Organismen verwendet, deren evolutionäre Verwandtschaft mit dem zu immunisierenden Tier möglichst gering ist [140, 141, 145]. Hierdurch erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass das Immunsystem des Versuchstiers das Konjugat aus Protein und Zielsubstanz tatsächlich als körperfremd erkennt und mit der Produktion von Antikörpern antwortet. Die große Mehrzahl dieser Antikörper wird gegen verschiedene (körperfremde) Epitope des Proteins gerichtet sein, allerdings besteht die Chance, dass ein Teil der Antikörper ebenfalls an das gewünschte Hapten bindet. Diese Antikörper lassen sich direkt im Blut bzw. dem Serum nachweisen. Für zahlreiche Anwendungen kann das sogenannte Anti-Serum direkt als Immunreagenz eingesetzt werden.

Nach einigen Wochen nimmt die Anzahl haptenspezifischer Antikörper im Serum im allgemeinen wieder ab. Zu diesem Zeitpunkt kann eine sog. Boosterimmunisierung oder Restimulierung durch eine erneute Injektion des Immunogens durchgeführt werden. Die Boosterimmunisierung führt im allgemeinen zu einem rapiden Anstieg der Antikörperkonzentration im Serum, welche diejenige der Erstimmunisierung i.d.R. um ein vielfaches übersteigt. Die Erklärung hierfür liegt in der Fähigkeit des Immunsystems, ein einmal als „fremd“ erkanntes Antigen sofort wiederzuerkennen und darauf mit einer verstärkten Immunantwort zu reagieren. Da hierbei bevorzugt die Selektion derjenigen Antikörper-bildenden Lymphozyten angeregt wird, deren Antikörper das Antigen am effektivsten binden, nimmt i.d.R. gleichzeitig die Spezifität und Affinität der Antikörper zu.

Neben den Blutseren können auch Eier (Geflügel) und die Milch von Wiederkäuern mögliche Antikörperquellen sein [98]. All diese Antikörperquellen liefern sogenannte polyklonale Antikörper, d.h. ein Gemisch von Antikörpern mit unterschiedlicher Affinität und Spezifität gegenüber dem Antigen. Die Hybridomtechnik hingegen ermöglicht die Produktion monoklonaler Antikörper, welche eine einheitliche Struktur und somit einheitliche Eigenschaften aufweisen [140, 142]. Bei dieser Technik werden Versuchstiere (i.d.R. Mäuse) mit der Zielsubstanz immunisiert. Im Zuge der Immunantwort kommt es, wie bei der klassischen Antikörpergewinnung auch, zur Differenzierung Antikörper-produzierender Zellen (B-Lymphozyten). Diese Zellen können aus der Milz des immunisierten Tieres entnommen werden. Allerdings sind ausdifferenzierte B-Lymphozyten nicht teilungs- und nur wenige Tage lebensfähig. Durch Fusion dieser B-Lymphozyten mit Tumorzellen erhält man Hybridomazellen, denen sowohl die Fähigkeiten zur Antikörperproduktion als auch zur Zellteilung innewohnt. Über diverse Selektions- und Screeningprozesse lassen sich nun aus dieser Zellpopulation einzelne fusionierte Zellen isolieren und in Kultur nehmen. Durch fortwährende Zellteilung erhält man sogenannte Klone, d.h. identische Nachfahren der jeweiligen Stammzelle, welche jeweils einen einzigen Typ von Antikörpern (monoklonale Antikörper) mit identischen Eigenschaften produzieren. Da sich diese Antikörper problemlos aus dem Nährmedium isolieren lassen und die betreffende Hybridoma-Zelllinie zudem potentiell unsterblich ist, lassen sich auf diese Weise Antikörper mit definierten Eigenschaften in praktisch unbegrenzter Menge produzieren. Obwohl monoklonale Antikörper aufgrund ihrer definierten Eigenschaften und der Möglichkeit des potentiell unbegrenzten Zugriffs für die Entwicklung standardisierter Screeningtests von großem Vorteil sein können, sind sie nicht zwangsläufig polyklonalen Antikörpern bzw. Antiseren überlegen.

So weisen monoklonale Antikörper häufig eine geringere Affinität zum betreffenden Zielanalyten auf als ein vergleichbares Anti-Serum. Gleiches gilt für die in zahlreichen Screeningtests erwünschte Kreuzreaktivität gegenüber mit der Zielsubstanz strukturell verwandten Substanzen, welche bei polyklonalen Antiseren oftmals stärker ausgeprägt ist [140, 146] als bei monoklonalen Antikörpern. Somit hängt die Entscheidung für monoklonale oder polyklonale Antikörper immer auch vom beabsichtigten Zweck und den zur Verfügung stehenden finanziellen und technischen Ressourcen ab.

Für weitere Informationen, einschließlich detaillierter Arbeitsprotokolle bezüglich der Gewinnung poly- und monoklonaler Antikörper sei auf die zitierte Literatur [140, 146] verwiesen.

6.2 Eigenschaften von Antikörpern gegen kleine Haptene

Epitope bzw. antigene Determinanten zeigen eine enorme Vielfalt bezüglich Struktur, Größe, Fläche, Ladung, Hydratisierung und Chiralität. Die Besonderheit der immun-chemischen Spezifität liegt in der Fähigkeit, viele dieser Eigenschaften zu unterscheiden.

Die Antikörper/Antigen-Wechselwirkung selbst ist charakterisiert durch das Zusammenwirken verschiedener schwacher unspezifischer Wechselwirkungen, sowohl attraktiver als auch repulsiver Natur in der Antikörperbindestelle. Erst die Summe all dieser Wechselwirkungen (van-der-Waals- und Coulombkräfte, Wasserstoff- und Salzbrücken, hydrophobe Wechselwirkungen etc.) führt schließlich zur spezifischen Antikörper/Antigenreaktion [140, 142].

Studien an Antikörpern gegen Proteine zeigten, dass die kritische Oberfläche eines Proteinepitops einer Größe von drei bis fünf Aminosäuren entspricht, d.h. dass in diesem Fall die maximale Komplementarität (Passgenauigkeit) zwischen Paratop und Epitop gewährleistet ist. Die Vergrößerung eines gegebenen Peptidhaptens von ursprünglich 4-5 Aminosäuren durch Anfügung weiterer Aminosäuren hat im allgemeinen nur geringe Auswirkungen auf die Bindungsaffinität, während kleinere Abschnitte des Epitops, sogenannte Teilepitope, eine geringere Affinität zur Antikörperbindestelle zeigen [144].

Abgesehen von einigen Ausnahmen (z.B. Peptid- und Glykopeptidantibiotika, Amino-glykoside u.a.) liegt die molare Masse von Arzneimitteln unterhalb der Größe, die für eine optimale Komplementarität notwendig ist, sie müssen daher stets als Teilepitope betrachtet werden. Solche Teilepitope weisen häufig nur eine verminderte Affinität zur Antikörperbindestelle auf, da ihnen im Vergleich zum vollständigen Epitop nicht der vollständige "Set" aller attraktiven Kräfte zur Verfügung steht.

Daher werden wesentlich höhere Anforderungen an die Komplementarität des Teilepitops als an das vollständige Epitop gestellt. Bereits geringfügige Veränderungen der Strukturmerkmale dieses Teilepitops, z.B. durch eine zusätzliche oder fehlende molekulare Gruppierung, können zu einer deutlichen Veränderung der Affinität führen [144].

Diese Tatsache spielt eine besondere Rolle bei der Entwicklung multi-spezifischer Screeningtests auf niedermolekulare Substanzen (Pestizide, Arzneimittel etc.). Mit diesen Tests soll nicht ein einzelner Wirkstoff sondern vielmehr eine ganze Substanzklasse gleichzeitig erfasst werden (z.B. β -Lactamantibiotika). Bei der Immunisierung wird i.d.R. ein Vertreter aus der betreffenden Substanzgruppe gewählt, dessen Grundstruktur möglichst sämtliche relevanten Derivate repräsentiert und der gleichzeitig über eine funktionelle Gruppe verfügt, die für die Protein/Hapten-Kopplung zur Verfügung steht [143]. Die so gewonnenen Antikörper besitzen i.d.R. die höchste Affinität zu dem ursprünglich zur Immunogensynthese eingesetzten Antigen (homologe Antigene). Kreuzreagierende Antigene, die mit dem ursprünglichen Antigen verwandt sind, weisen aufgrund der nicht exakten Komplementarität von (Teil-) Epitop und Paratop im allgemeinen eine deutlich geringere Affinität zum Antikörper auf (heterologe Antigene). Nur in seltenen Fällen können heterologe Antigene auch eine höhere Affinität als homologe Antigene aufweisen (heteroklitische Antigene) [142]. Die Problematik bei der Entwicklung multi-spezifischer Screeningtests für eine Substanzklasse liegt in erster Linie darin, ein Antiserum bzw. einen monoklonalen Antikörper zu gewinnen, mit dem möglichst alle relevanten Vertreter mit gleicher Empfindlichkeit nachgewiesen werden können. Nur so ist die Etablierung standardisierter Analysenprotokolle möglich.

Theoretische Ansätze, wo z.B. mit Hilfe des Molecular Modellings nach Haptenen gefahndet wird, die eine bestimmte Substanzklasse am besten repräsentieren, sollen die Wahrscheinlichkeit für die erfolgreiche Gewinnung eines multispezifischen Antikörpers bzw. Antiserums erhöhen [147, 148]. Da Versuchstiere allerdings individuell sehr unterschiedlich auf Immunogene antworten, steht auch heute nach wie vor der empirische Ansatz im Vordergrund. Ein Blick in die einschlägige Literatur zeigt, dass in den allermeisten Fällen optimale, d.h. kommerziell verwertbare Antikörper für immun-chemische Screeningtests erst nach Immunisierung zahlreicher Versuchstiere mit verschiedenen Immunogenen bzw. Hapten/Protein-Konjugaten gewonnen werden konnten, gleichgültig ob ein polyklonales Antiserum oder ein monoklonaler Antikörper später Kernstück des Testsystems wurde.

6.3 Aufbau immun-chemischer Screeningtests

In Analogie zu den beschriebenen Rezeptortestverfahren (Kap. 4.2, 4.3) liegt den immun-chemischen Verfahren die Antikörper-Antigen-Reaktion als spezifische Rezeptor/Ligand-Wechselwirkung zugrunde. Auch hier werden niedermolekulare Substanzen kompetitiv, d.h. durch eine Konkurrenzreaktion zwischen einem markierten Antigen und dem Zielanalyten um die spezifische Bindestelle nachgewiesen. Je nach Testsystem können radioaktive Isotope (Radioimmunoassay (RIA)), Enzyme (Enzymimmunoassay (EIA)) und lumineszierende oder fluoreszierende (Fluoreszenzimmunoassay (FIA)) Verbindungen als sogenannte Marker eingesetzt werden [140, 142, 144]. Zum Nachweis von Antikörper-gebundenem markiertem Antigen ist bei fast allen kompetitiven Testsystemen zuvor die Trennung der Antikörper/Antigen-Komplexe von den ungebundenen markierten Antigenen erforderlich.

Bei Testsystemen in denen alle Reaktionspartner in Lösung vorliegen, kann dieses z.B. durch Zugabe von Fällungsreagenzien, Dialyse oder Ultrafiltration erfolgen. Spezifisch gebundenes markiertes Antigen kann anschließend in Abhängigkeit von der Natur des eingesetzten Markers nachgewiesen und über die Signalintensität (Radioaktivität, Fluoreszenz, enzymatischer Substratumsatz) quantifiziert werden. In Gegenwart von unmarkiertem Antigen (Kompetitionsexperiment) wird während der Gleichgewichtseinstellung sowohl markiertes als auch unmarkiertes Antigen von den Antikörpern gebunden. Unter optimierten Testbedingungen, in denen die Konzentration an Antikörpern und markiertem Antigen konstant gehalten wird, ist die gemessene Signalintensität um so niedriger, je höher die Konzentration des unmarkierten Zielanalyten ist.

Bei den sogenannten *Sorbentassays* wird ein Reaktionspartner z.B. Antigen oder Antikörper an einem Trägermaterial immobilisiert. Die Testdurchführung und Auswertung entspricht den vorstehend beschriebenen Testsystemen, allerdings können bei dieser Testanordnung nach der Gleichgewichtseinstellung überschüssige Reagenzien von den immobilisierten Antikörper/Antigen-Komplexen durch einen Waschschrift abgetrennt werden, was den Arbeitsaufwand erheblich minimiert.

Im folgenden soll auf den Aufbau des Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) näher eingegangen werden. Dessen Funktionsprinzip lässt sich aber sinngemäß auf alle möglichen Sorbentassays übertragen [97].

Prinzipiell lassen sich sowohl Antikörper als auch Antigene auf einem Trägermaterial immobilisieren (z.B. Reaktionsgefäße von Polystyrol-Mikrotiterplatten, Nitrocellulose, Latexpartikel etc.) und werden auch als Festphasenantikörper bzw. Festphasenantigen bezeichnet.

Man unterscheidet direkte und indirekte ELISA-Systeme (Abbildung 6-1) [142, 145]. Beim direkten Testsystem werden je nach Testaufbau enzymmarkierte Antigene oder enzymmarkierte (antigenspezifische) Antikörper eingesetzt, die spezifisch an den jeweiligen immobilisierten Reaktionspartner (Festphasenantikörper bzw. -antigen) binden. Nach geeigneter Inkubationszeit und einem Waschschrift erfolgt der Nachweis der gebildeten Antikörper/Antigen-Komplexe *direkt* durch Messung des enzymatischen Substratumsatzes, der sich proportional zur Menge des enzymmarkierten Antigens bzw. Antikörpers verhält.

Beim indirekten Aufbau hingegen sind weder Antigen noch der antigenspezifische Antikörper markiert. Der Nachweis der Antikörper/Antigen-Komplexe erfolgt hierbei *indirekt* durch Zugabe eines enzymmarkierten Sekundärantikörpers. So können von einem Festphasenantigen spezifisch gebundene Antikörper z.B. mit Hilfe eines enzymmarkierten tierartspezifischen anti-Immunglobulin-Antikörper nachgewiesen werden.

Da spezifische Antiseren in der Regel in Kaninchen, Schafen oder Mäusen gewonnen werden, kommen als Sekundärantikörper z.B. anti-Kaninchen-Immunglobulin-, anti-Schaf-Immunglobulin- oder anti-Maus-Immunglobulin-Antiseren zur Anwendung.

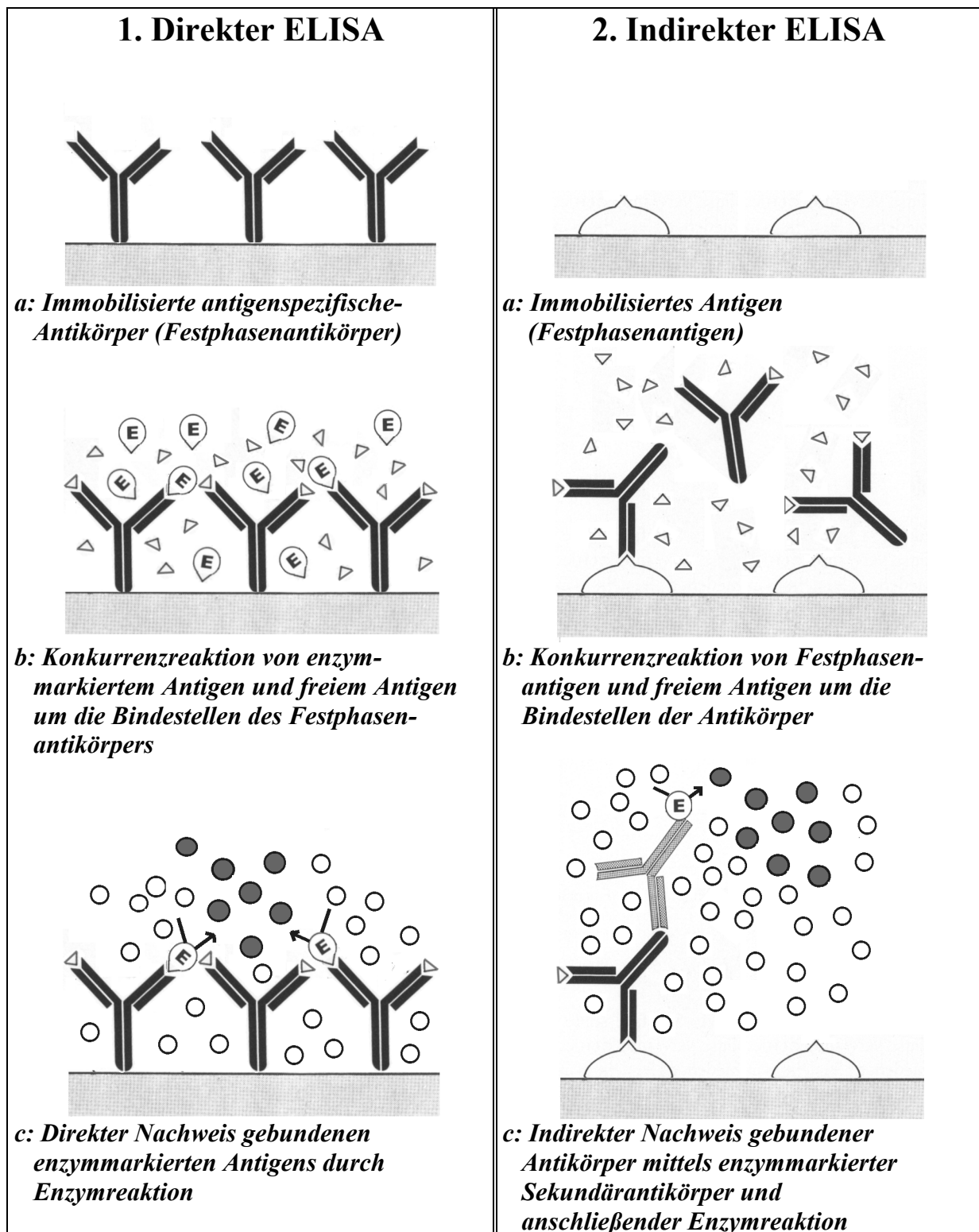


Abbildung 6-1: Vergleich von direktem (1) und indirektem (2) ELISA (nach Märtlbauer[145] sowie Peters und Baumgarten [146])

Speziell bei ELISA-Verfahren gegen niedermolekulare Substanzen sind homologe und heterologe Kombinationen von Immunogen und Hapten-Enzymkonjugat bzw. Festphasenantigen zu unterscheiden. Bei homologen Kombinationen ist die antigene Determinante von Immunogen und Enzymkonjugat bzw. Festphasenantigen identisch, während bei heterologen Kombinationen unterschiedliche Haptene (heterologe Haptene), Kopplungsreagenzien (heterologe Brücken) oder auch eine andere Kopplungsstelle am Molekül (heterologe Seite) bei der Synthese von Immunogen und enzymmarkierten Antigen bzw. Festphasenantigen eingesetzt werden.

Wie unter Kap. 6.2 erläutert, bilden homologe Antigene die stabilsten Antikörper/Antigen-Komplexe aus. Zu beachten ist die mögliche Beteiligung der sowohl im Immunogen als auch im enzymmarkierten oder Festphasenantigen vorhandenen Verknüpfungsstelle (Brücke, Spacer) zwischen Trägerprotein und Hapten. Freie niedermolekulare Haptene können i. d. R. nur einen Teilbereich der Antikörperbindestellen besetzen. Daher weisen diese Antikörper/Antigen-Komplexe eine deutlich geringere Stabilität auf als die entsprechenden Komplexe mit dem homologen Antigen (z.B. dem Festphasenantigen). Für kompetitive Testsysteme bedeutet dies, dass sehr hohe Konzentrationen an freiem Hapten notwendig sind, um ein homologes Antigen aus der Bindetasche des Antikörpers zu verdrängen. Aufgrund dieser Tatsache führt die Verwendung homologer Antigene als Festphasenantigen bzw. enzymmarkiertes Antigen i. d. R. zu einer hohen Nachweisgrenze für das freie Hapten bzw. den Analyten. Durch Verwendung unterschiedlicher Kopplungsreagenzien bei der Synthese von Immunogen und Antigen-Konjugat, entfällt die zusätzliche Wechselwirkung zwischen Antikörper-Bindestelle und Spacer, so dass die Bindung des Antigens einzig durch die molekulare Struktur des betreffenden Haptens vermittelt wird. In diesem Fall sollte eine geringere Konzentration an freiem Antigen (Zielanalyt) ausreichen, um Festphasenantigen oder enzymmarkiertes Antigen aus den Antikörper/Antigen-Komplexen zu verdrängen. Die entsprechende Nachweisgrenze für den Zielanalyten sollte also in diesem Fall deutlich niedriger liegen als bei Verwendung von homologen Festphasenantigenen bzw. enzymmarkierten Antigenen.

Die Entwicklung und Optimierung verschiedener kompetitiver ELISA-Systeme in der Rückstandsanalytik auf Penicilline durch den Einsatz der genannten möglichen heterologen Kombinationsmöglichkeiten wurde in einer Arbeit von LITZ [166] beschrieben. Für eine weiterführende, ausführliche Darstellung der Prinzipien immun-chemischer Methoden für niedermolekulare Substanzen (Schwerpunkt: antimikrobiell wirksame Substanzen) unter besonderer Berücksichtigung mathematischer Modelle sei auf MÄRTLBAUER [145] verwiesen.

7 Zielsetzung

Die Möglichkeit der Behandlung bakterieller Infektionen durch Antibiotika muss als eine der bedeutendsten Errungenschaften des zwanzigsten Jahrhunderts angesehen werden. Der weitverbreitete Antibiotikaeinsatz sowohl in der Human- als auch der Veterinärmedizin ermöglicht allerdings die rasche Selektion Antibiotika-resistenter Keime, wobei sogenannte multi-resistente Keime als besondere Bedrohung anzusehen sind, da diese mit den gegenwärtigen Antibiotika nur schwer bzw. nicht mehr zu behandeln sind.

Auch stellen Antibiotika-Rückstände in tierischen Lebensmitteln ein potentiell toxikologisches oder immunpathologisches Risiko für den Verbraucher dar. Weiterhin können Antibiotika-Rückstände Ursache für Störungen bei der Herstellung fermentierter Produkte sein.

Durch gesetzgeberische Maßnahmen in der EU soll den Risiken des Antibiotikaeinsatzes bei der Produktion von Lebensmitteln tierischer Herkunft begegnet werden. Hierzu zählen z.B. Anwendungsverbote und -beschränkungen für bestimmte Substanzklassen, Wartezeiten, Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln etc. und nicht zuletzt die Schaffung gesetzlicher Rahmenbedingungen für die Überwachung der erlassenen EU-Vorschriften.

Eine wirkungsvolle Rückstandskontrolle setzt das Vorhandensein geeigneter Analysemethoden voraus, die einen hohen Probendurchsatz ermöglichen und gleichzeitig die betreffenden Wirkstoffe mit ausreichender Empfindlichkeit im Bereich der gesetzlichen Rückstandshöchstmengen erfassen.

Für β -Lactamantibiotika stehen eine Vielzahl kommerziell erhältlicher Screeningtests zur Verfügung. Die strukturelle Vielfalt der in der Veterinärmedizin zulässigen Vertreter dieser Wirkstoffgruppe und darüber hinaus die Festlegung unterschiedlicher Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln erschwert die sichere Erfassung und Differenzierung potentiell positiver Proben.

Bei der Gewinnung tierischer Lebensmittel soll ebenfalls der Einsatz unzulässiger Antibiotika als Leistungsförderer unterbunden werden. Im Rahmen der Futtermittelanalytik auf Antibiotika werden bisher einzig mikrobiologische Verfahren eingesetzt.

Ziel dieser Arbeit ist die Gewinnung eines Antikörpers, der als universeller Rezeptor sowohl für die Rückstandsanalytik auf β -Lactamantibiotika in Lebensmitteln tierischer Herkunft als auch zum Nachweis von Glykopeptidantibiotika z.B. in Futtermitteln eingesetzt werden kann.

Zwar unterscheiden sich die β -Lactamantibiotika und Glykopeptidantibiotika bezüglich ihrer chemischen Struktur, jedoch beruht in beiden Fällen der Wirkmechanismus auf einer Störung des Zusammenspiels eines D-Alanyl-D-Alanin-terminierten Peptids mit D,D-Transpeptidasen im letzten Schritt der bakteriellen Zellwandsynthese. Penicilline und Cephalosporine führen durch eine Acylierung des aktiven Zentrums zu einer irreversiblen Hemmung der D,D-Transpeptidasen, die so für die weitere Zellwandsynthese nicht mehr zur Verfügung stehen.

Glykopeptidantibiotika hingegen bilden einen Komplex mit D-Alanyl-D-Alanin. Der resultierende Komplex ist außerordentlich stabil und verhindert den D,D-Transpeptidasen den Zugang zu ihrem Substrat und somit den Abschluss der bakteriellen Zellwandsynthese.

Obwohl nicht einwandfrei geklärt ist, ob β -Lactamantibiotika als Analoge von D-Alanyl-D-Alanin-terminierten Peptiden oder eher als Analoge für den Übergangszustand dieser Peptide während der Transpeptidase-Reaktion aufzufassen sind, kann es als gesichert angesehen werden, dass eine strukturelle Übereinstimmung die Voraussetzung für die Erkennung durch das Enzym darstellt. Die Literatur zeigt zahlreiche Beispiele auf, wie durch eine Immunisierung mit Substratanalogen, insbesondere aber mit Strukturanalogen von Übergangszuständen enzymatischer Reaktionen, Antikörper mit enzymatischer Aktivität gewonnen werden können (Abzyme), was für eine Analogie der Antikörper-Bindungsstelle und der "active site" von Enzymen spricht [149]. Daher sollte es möglich sein gegen das Epitop D-Alanyl-D-Alanin Antikörper herzustellen, die auch β -Lactamantibiotika als kreuzreagierende Antigene akzeptieren und mit hinreichender Affinität binden. Ein Antikörper mit diesen Eigenschaften könnte als multispezifischer Rezeptor sowohl in Screeningtests auf Rückstände von β -Lactamantibiotika in Lebensmitteln als auch für Cleanup-Verfahren im Rahmen einer Immunaффinitätschromatographie eingesetzt werden. Da sowohl dieser Antikörper als auch die Glykopeptidantibiotika als Komplexbildner für X-D-Ala-D-Ala aufzufassen sind, sollte es möglich sein mit diesem Antikörper ein kompetitives Testsystem für das Screening auf Glykopeptidantibiotika in Futtermitteln (Avoparcin) oder Patientenserum (Vancomycin, Teicoplanin) zu entwickeln.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der Synthese und Charakterisierung eines geeigneten D-Alanyl-D-Alanin-Haptens sowie der übrigen Immunreagenzien die für die Immunisierung und die Durchführung der späteren Experimente erforderlich waren.

Des Weiteren sollten die gewonnenen Antiseren charakterisiert und auf ihre Eignung für den Einsatz in Screeningtests auf β -Lactam- und Glykopeptidantibiotika hin geprüft bzw. praktikable Testsysteme entwickelt werden.

8 Synthese des N α -Acetyl-L-Lysyl-D-Alanyl-D-Alanin-Haptens

8.1 Kriterien zur Auswahl des Haptens

Aufgrund der beschriebenen Strukturanalogie von D-Alanyl-D-Alanin mit dem entsprechenden Strukturelement der β -Lactamantibiotika, sollten gegen den D-Alanyl-D-Alanin-Rest Antikörper hergestellt werden, welche in einer Kreuzreaktion an das analoge Strukturelement der β -Lactamantibiotika binden. Darüber hinaus sollten diese Antikörper sich auch in Gegenwart von Glykopeptidantibiotika ähnlich einer D,D-Transpeptidase verhalten.

Wegen der angestrebten Homologie der Bindestelle der Antikörper mit der entsprechenden active-site von D,D-Transpeptidasen und D,D-Carboxypeptidasen sollte das verwendete Hapten selbst ein gutes Substrat für diese Enzyme darstellen. Des Weiteren sollte es ein guter Ligand für Glykopeptidantibiotika sein und definiert an ein Trägerprotein gekoppelt werden können. Sowohl als gutes D,D-Transpeptidase- bzw. D,D-Carboxypeptidasesubstrat und gleichzeitig guter Ligand für Glykopeptidantibiotika wurde u.a. das Mono- und Diacetylderivat des L-Lysyl-D-Alanyl-D-Alanin beschrieben [114, 150]. Aufgrund seiner freien und somit für Kopplungsreaktionen verfügbaren ϵ -Aminofunktion, bietet sich insbesondere N α -Acetyl-L-Lys-D-Ala-D-Ala als Hapten bei der Immunogensynthese an, wobei der Acetyl-Lysin-Rest hierbei gleichzeitig als Spacer zum Carrierprotein fungieren kann. Weitere D,D-Transpeptidase- und Carboxypeptidasesubstrate wie z.B. acyclische Depsipeptide (Peptide aus Aminosäuren und α -Hydroxy-Carbonsäuren, z.B. Phenylacetyl-D-Alanyl-D-Lactat) oder entsprechende Thioester, welche im Gegensatz zu D-Alanyl-D-Alanin-terminierten Peptiden sogar von β -Lactamasen hydrolysiert werden [151], wurden aufgrund ihrer Hydrolyseempfindlichkeit als mögliche Haptene nicht weiter in Betracht gezogen.

8.2 Synthesemethode

Zwar wird N α -Acetyl-L-Lys-D-Ala-D-Ala kommerziell angeboten, nicht jedoch das diastereomere N α -Acetyl-L-Lys-L-Ala-L-Ala, mit dem später die Spezifität der erhaltenen Antikörper gegenüber dem D-Ala-D-Ala-Terminus überprüft werden sollte. Daher wurden beide Tripeptide selbst synthetisiert. Die Literatur enthält zahlreiche Hinweise zur Synthese dieser Peptide ohne allerdings detaillierte Arbeitsanweisungen zu geben. NIETO und PERKINS [151] synthetisierten N α -Acetyl-L-Lys-D-Ala-D-Ala neben zahlreichen weiteren Peptiden sowohl in Lösung als auch über die Merrifield-Festphasen-Synthese. In beiden Fällen wurde von den entsprechend geschützten Aminosäuren ausgegangen, die mittels Dicyclohexylcarbodiimid oder als NHS-Ester gekoppelt wurden.

Nach jedem Kopplungsschritt mußten jeweils die entsprechenden Schutzgruppen abgespalten werden. Bei der konventionellen Methode war nach Abspaltung der Schutzgruppe eine Aufreinigung des Peptids mittels Ionenaustausch, gefolgt von einer Umkristallisation aus Ethanol/Wasser ausreichend, während bei den über die Festphasensynthese hergestellten Peptiden zusätzlich eine Papier-Elektrophorese erforderlich war.

RAO und WHITESIDES [152] gingen bei ihrer Synthese ebenfalls von geschützten Aminosäuren aus (t-Butylester- bzw. Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppen). Die Kopplung in Lösung erfolgte mit 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-Hexafluorophosphat (HBTU). Der mittels präparativer HPLC aufgereinigte t-Butylester des Peptids diente allerdings lediglich als Vorstufe für weitere Derivate.

Lysin und Alanin sind bereits in geschützter Form kommerziell erhältlich, doch muß nach jedem Kopplungsschritt die Abspaltung mindestens einer Schutzgruppe und, sofern keine Festphasensynthese durchgeführt wird, eine Aufreinigung aller Zwischenprodukte erfolgen. Durch Verwendung von Alanyl-Alanin, das sowohl als D,D- wie auch als L,L-Enantiomer preisgünstig zu beziehen ist, kann jedoch ein Kopplungsschritt einschließlich der anschließend notwendigen Abspaltung der Schutzgruppe umgangen werden.

Weiterhin läßt sich durch die Wahl geeigneter Kopplungsbedingungen dieses Dipeptid ohne Schutz der C-terminalen Carboxylgruppe direkt mit einem entsprechend aktivierten Lysin bzw. N α -Acetyl-Lysin umsetzen. Der folgende Syntheseverlauf zeigt wie letztendlich die Einführung bzw. Abspaltung einer einzigen Schutzgruppe für die gesamte Synthese ausreicht:

1. Schutz der freien Aminofunktionen des Lysins

. selektiver Schutz der ϵ -Aminofunktion durch eine Trifluoracetyl (TFA)-Schutzgruppe

. Acetylierung der α -Aminofunktion (Acetylgruppe ist Bestandteil des fertigen Tripeptids)

2. Aktivierung der Carboxylgruppe des geschützten Lysins und Kopplung an die freie Aminogruppe von Alanyl-Alanin

3. Abspaltung der TFA-Schutzgruppe in alkalischer Lösung.

Man erhält das gewünschte Produkt: N α -Acetyl-Lysyl-Alanyl-Alanin mit der freien ϵ -Aminofunktion

8.3 Synthese von Nε-Trifluoracetyl-Nα-Acetyl-Lysin

8.3.1 Möglichkeiten zur selektiven Umsetzung der ε-Aminogruppe von Lysin

Die beiden Aminogruppen des Lysins zeigen deutliche Unterschiede sowohl hinsichtlich Basizität als auch Reaktivität. Unter geeigneten Reaktionsbedingungen lassen sie sich daher unabhängig voneinander derivatisieren.

In Gegenwart von Cu^{2+} -Ionen, welche die α -Aminogruppe komplexieren, kann Lysin selektiv mit Hilfe aktivierter Schutzgruppen in die Nε-geschützte Aminosäure überführt werden, was allerdings eine relativ aufwendige Abtrennung der Kupferionen nach sich zieht [153].

Ein einfacher Weg die ε-Aminogruppe des Lysins selektiv zu schützen, verläuft über die Einführung einer Trifluoracetylgruppe (TFA) mit Hilfe von S-Ethyl-trifluoro-Thioacetat nach SCHALLENBERG und CALVIN [154], wobei sich das gebildete Nε-Trifluoracetyl-Lysin direkt als Präzipitat aus dem Reaktionsansatz niederschlägt und durch Filtration isoliert werden kann.

Nach der Peptidsynthese kann die TFA-Gruppe unter milden alkalischen Bedingungen selektiv wieder abgespalten werden (Abb. 8-1).

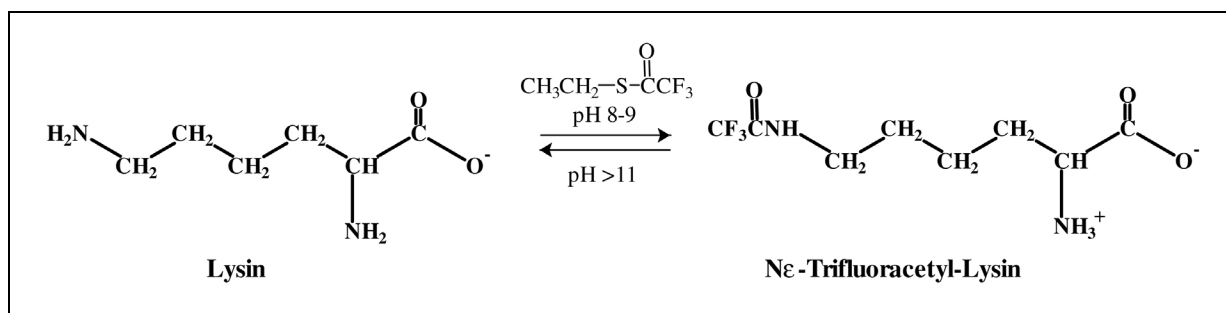


Abbildung 8-1: Synthese von Nε-Trifluoracetyl-Lysin (nach Schallenberg und Calvin)

Die Synthese wurde entsprechend der Originalvorschrift durchgeführt und der Reaktionsverlauf dünnschichtchromatographisch überprüft. Der Schmelzbereich des Produktes ($227\text{-}230^\circ\text{C}$; Zersetzung) stimmte mit dem in der Originalvorschrift angegebenen Schmelzbereich ($226\text{-}231^\circ\text{C}$; Zersetzung) überein. Die Ausbeute nach der Umkristallisation lag mit 53 % knapp unter den in der Literatur beschriebenen Ausbeuten von 69 %.

Die Einführung der Trifluoracetylgruppe konnte IR-spektroskopisch aufgrund der intensiven C-F-Schwingung bei 1180 cm^{-1} nachgewiesen werden (Abb. 8-2). Je eine intensive Bande bei 3300 cm^{-1} sowie bei 1680 cm^{-1} (Amid I) zeigten das Vorhandensein der $\text{CF}_3\text{CO-NH}$ -Amidbindung an, während die für zahlreiche Aminosäuren typische Bande bei 2100 cm^{-1} von der (protonierten) α -Aminogruppe stammen dürfte [155].

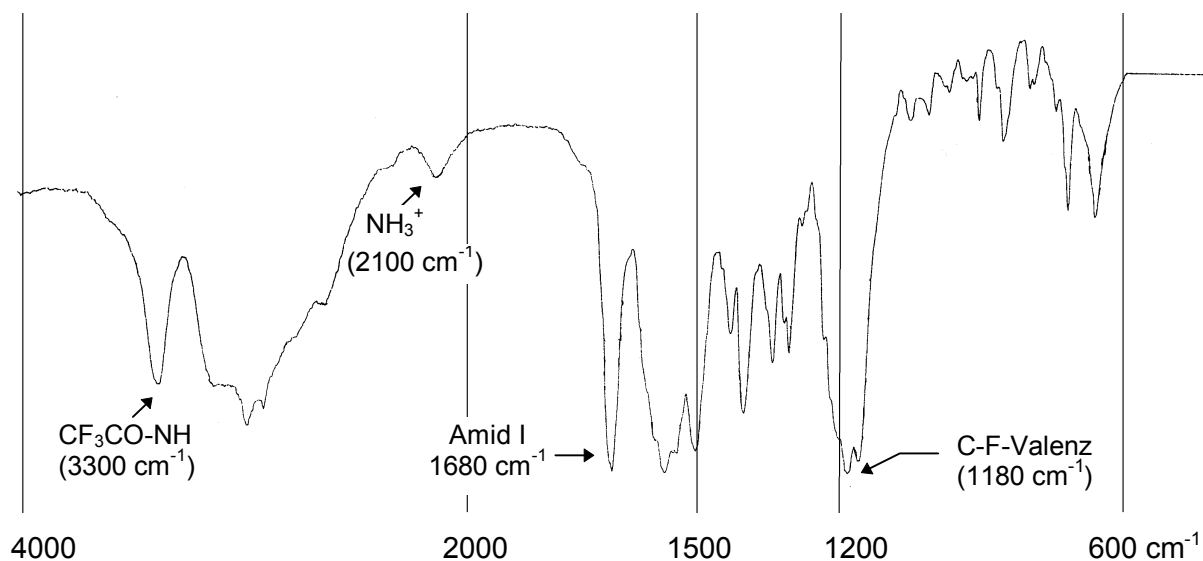


Abbildung 8-2: Infrarotspektrum von Nε-Trifluoroacetyl-L-Lysin (KBr)

8.3.2 Synthese von Nε-Trifluoroacetyl-Nα-Acetyl-Lysin

Nε-Trifluoroacetyl-Nα-Acetyl-Lysin wurde durch Acetylierung des Nε-Trifluoroacetyl-Lysins mit Essigsäureanhydrid hergestellt (Abb. 8-3).

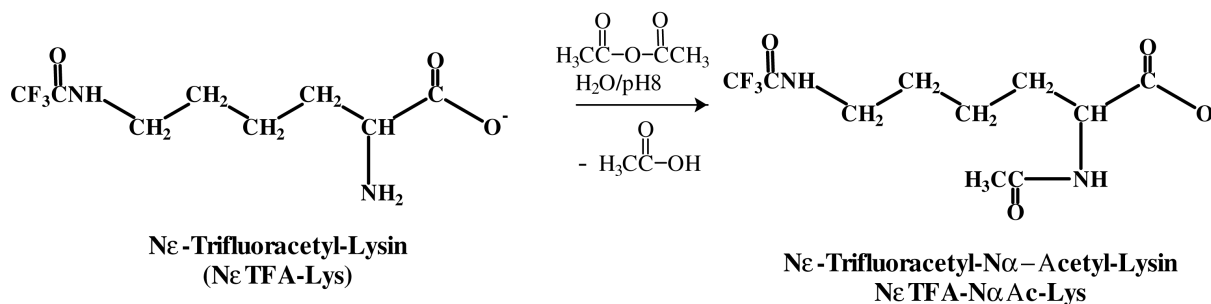
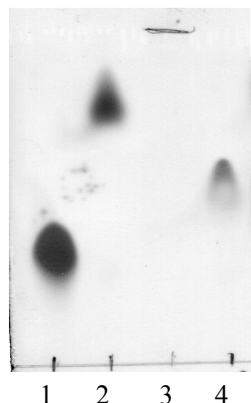


Abbildung 8-3: Acetylierung von Nε-Trifluoroacetyl-Lysin

Die Reaktion erfolgte durch Zugabe einer Lösung von Essigsäureanhydrid zu einer wässrigen Lösung von Nε-Trifluoroacetyl-Lysin, wobei durch sukzessive Zugabe einer 10 %igen Natriumcarbonatlösung der pH-Wert des Reaktionsgemisches auf pH 8 gehalten wurde. Sobald mit Ninhydrin (Tüpfelprobe auf DC-Folien) im Reaktionsgemisch keine freien Aminogruppen mehr nachweisbar waren, wurde der Reaktionsansatz auf pH 2 angesäuert und das Reaktionsprodukt mit Methylisobutylketon (MIBK) ausgeschüttelt. Nach Entfernung des Lösemittels am Rotationsverdampfer konnte das Produkt durch Behandlung des öligen Rückstandes mit Ether als weißes Pulver ausgefällt werden. Die Ausbeute betrug 85 % der Theorie.

Mit Ninhydrin waren nach Dünnschichtchromatographie keine freien Aminogruppen nachzuweisen, was auf die vollständige Acetylierung der Ausgangsverbindung schließen ließ. Nach Abspaltung der Schutzgruppe durch Behandlung mit 1 N NaOH konnte mit Ninhydrin die Bildung eines neuen Produktes nachgewiesen werden (Abb.8-4).



1. Lysin
2. *Nε*-Trifluoroacetyl-Lysin
3. Reaktionsprodukt nach Acetylierung (Ninhydrin-negativ)
4. Reaktionsprodukt nach Abspaltung der Schutzgruppe (*Nα*-Acetyl-Lysin)

Detektion: Ninhydrin

Abbildung 8-4: Dünnschichtchromatographische Kontrolle der Synthese von *Nε*TFA-*Nα*Ac-Lysin

Laufmittel: n-Butanol/Aceton/Wasser/Eisessig 35 + 35 + 23 + 7 (v+v+v+v)

Trennschicht: Polygram Sil G/UV₂₅₄

IR-spektroskopisch konnte wiederum die TFA-Gruppe durch die intensive Bande bei 1180 cm^{-1} nachgewiesen werden (Abb. 8-5). Im Bereich um 3300 cm^{-1} (3360 u. 3290 cm^{-1}) und 1700 cm^{-1} (1710 cm^{-1} u. 1685 cm^{-1}) erschienen je zwei Banden, welche auf das Vorhandensein von zwei Peptidbindungen im Moleküle hindeuten. Das für Aminosäuren charakteristische Signal bei 2100 cm^{-1} (NH_3^+) war erwartungsgemäß nicht mehr zu beobachten. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass die Umsetzung zum *Nε*-Trifluoroacetyl,*Nα*-Acetyl-Lysin erfolgreich verlaufen war.

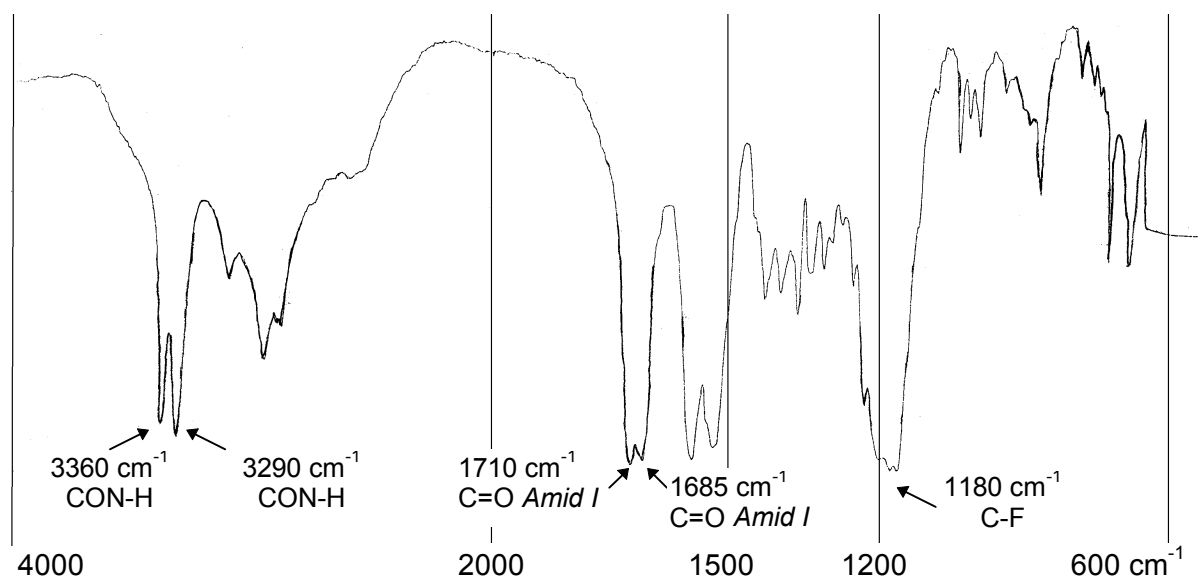


Abbildung 8-5: Infrarotspektrum von *Nε*-Trifluoroacetyl-*Nα*-Acetyl-L-Lysin (KBr)

8.4 Peptidsynthese

8.4.1 Aktivierung von Aminosäuren mit Carbodiimiden und *N*-Hydroxysuccinimid

Carbodiimide, allen voran Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI), haben als Aktivierungsreagenz bei Peptidsynthesen in Lösung und auch an festen Phasen eine herausragende Bedeutung erlangt. Sie können sowohl zur Synthese aktivierter Carboxylderivate (z.B. symmetrische Anhydride und aktivierte Ester) als auch zur direkten Kopplung von Carbonsäuren und Aminen verwendet werden. Der primäre Reaktionsschritt bei allen Reaktionen mit Carbodiimiden ist die Umsetzung der Carbonsäure zu O-Acylisoharnstoff, welcher ein hochreaktives Acylierungsreagenz darstellt (Abb. 8-6).

Bei der direkten Kopplung brauchen nur die Amino- und Säurekomponente zusammen mit DCCI im äquimolaren Verhältnis in einem organischen Lösemittel zur Reaktion gebracht zu werden, wobei die Kopplung entweder direkt durch Aminolyse des O-Acylisoharnstoffs oder der intermediär entstehenden symmetrischen Carbonsäureanhydride erfolgt. Wahrscheinlich treten beide Effekte nebeneinander auf [156]. Der im Zuge der Aminolyse bzw. Anhydridbildung entstehende Dicyclohexylharnstoff besitzt in den meisten Lösemitteln nur eine geringe Löslichkeit und kann daher durch Filtration nahezu vollständig aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden.

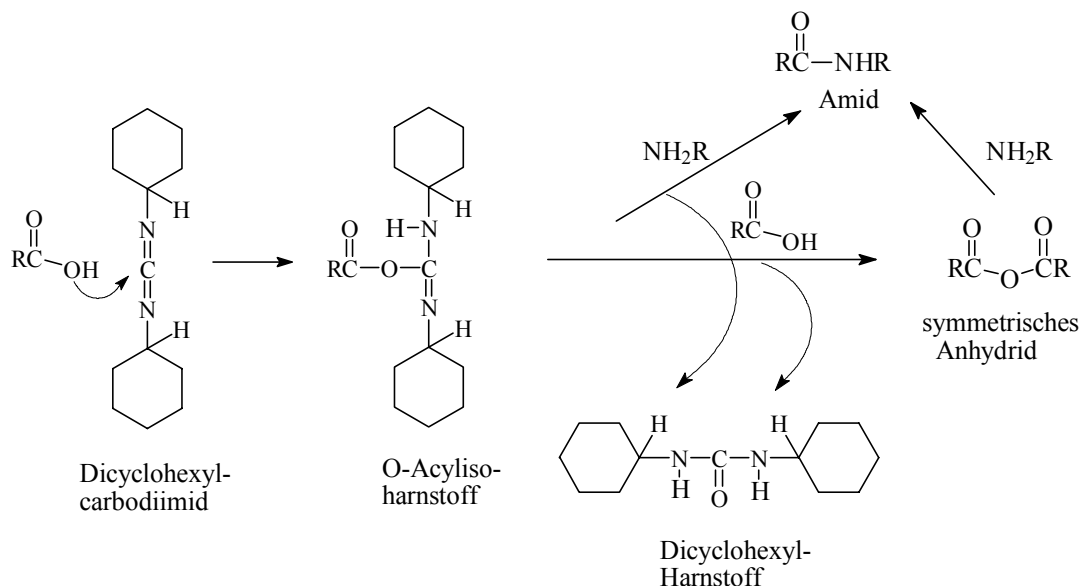


Abbildung 8-6: Knüpfung einer Peptidbindung mittels DCCI (nach Jones [156])

Probleme bei der Verwendung von DCCI können allerdings durch Racemisierung der aktivierten Aminosäure sowie durch eine intramolekulare Umlagerung des O-Acylisoharnstoff zum N-Acylharnstoff auftreten. Letzterer kann Probleme bei der Aufreinigung des Reaktionsproduktes verursachen. WEYGAND et al. [157] zeigten, dass in Gegenwart eines Überschusses von N-Hydroxysuccinimid (NHS) sowohl die Racemisierung als auch die Bildung von N-Acylharnstoff weitgehend unterdrückt werden kann. NHS reagiert mit den intermediär gebildeten O-Acylisoharnstoffderivaten der Aminosäuren zu den entsprechenden Aminosäure-N-Hydroxysuccinimidestern. Diese Ester sind zwar weniger reaktiv als die ursprünglichen O-Acylharnstoffderivate dafür aber weitaus weniger empfindlich gegenüber Racemisierung.

ANDERSON et al. [158] isolierten die mit Hilfe von DCCI hergestellten NHS-Ester zahlreicher Aminosäuren als Reinsubstanzen und setzten sie zur Peptidsynthese in wässriger Lösung ein. Der Vorteil dieser und ähnlicher „Aktiver-Ester-Methoden“ liegt im Gegensatz zur Peptidsynthese über die direkte Kopplung vor allem darin, dass der Reaktionspartner keinen Schutz der Carboxylgruppe benötigt und dass sowohl in organischen als auch in wässrigen Lösungen gute Ausbeuten erzielt werden.

8.4.2 Darstellung und Charakterisierung des Nε-TFA-Nα-Acetyl-Lysyl-NHS-Esters

Bereits NIETO und PERKINS [151] setzten bei der nicht näher beschriebene Synthese von Nα-Acetyl-L-Lysyl-D-Alanyl-D-Alanin die NHS-Ester der betreffenden Aminosäuren ein, die sie nach der Vorschrift von ANDERSON herstellten. Die Rahmenbedingungen für die eigene Herstellung des Nε-TFA,Nα-Ac-Lys-NHS-Esters wurden aus der Originalvorschrift von ANDERSON [158] abgeleitet. Da Nε-TFA,Nα-Ac-Lysin in den von ANDERSON et al. bevorzugten Lösemitteln Dimethoxyethan und Dioxan nur schwierig zu lösen war, wurde statt dessen auf Acetonitril zurückgegriffen.

Nε-TFA-Nα-Ac-Lysin und N-Hydroxysuccinimid (NHS) (molares Verhältnis 1:1,5) wurden gemeinsam in Acetonitril gelöst. Anschließend wurde unter Eiskühlung tropfenweise eine Lösung von DCCI in Acetonitril zugegeben. Innerhalb weniger Minuten zeigte ein Niederschlag von Dicyclohexylharnstoff den Ablauf der Reaktion an. Nach achtstündigem Rühren unter Eiskühlung wurde dieser Niederschlag abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer bei Umgebungstemperatur bis auf wenige Milliliter eingengt. Durch tropfenweise Zugabe von Diethylether wurde die Kristallisation des Produktes in Gang gesetzt, welche nach ca. einer Stunde unter Eiskühlung vollständig abgeschlossen war.

Die Ausbeuten lagen zwischen 80 und 85 %, der Schmelzpunkt betrug 119 °C.

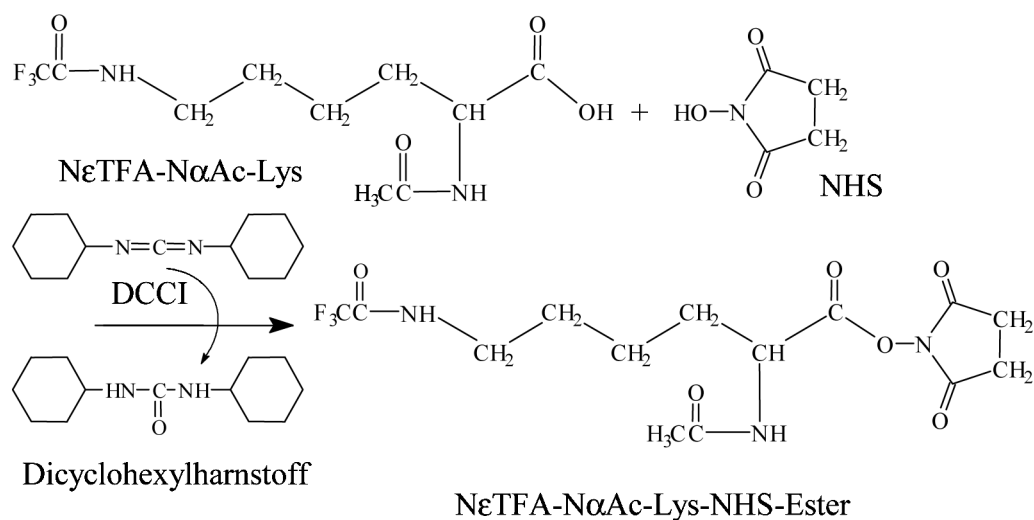


Abbildung 8-7: Synthese des Nε-TFA-Nα-Acetyl-Lysin-NHS-Esters

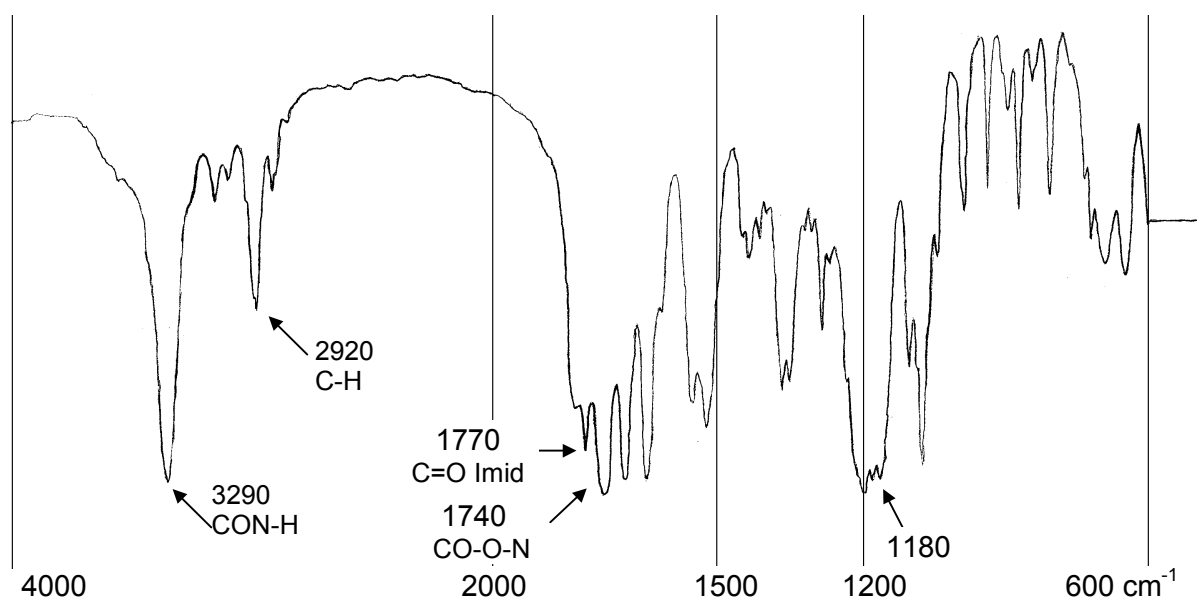


Abbildung 8-8: IR-Spektrum des Nε-TFA, Nα-Acetyl-Lysin-NHS-Esters (KBr)

8.4.3 Durchführung der Peptidsynthese

Erste Kopplungsversuche mit L-Alanyl-L-Alanin analog der Originalvorschrift von ANDERSON et al. [158] erfolgten durch Zugabe des in Acetonitril gelösten NHS-Esters zu einer Lösung von Alanyl-Alanin in wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung, wobei alle Substanzen in einem äquimolaren Verhältnis vorlagen (Abb. 8-9).

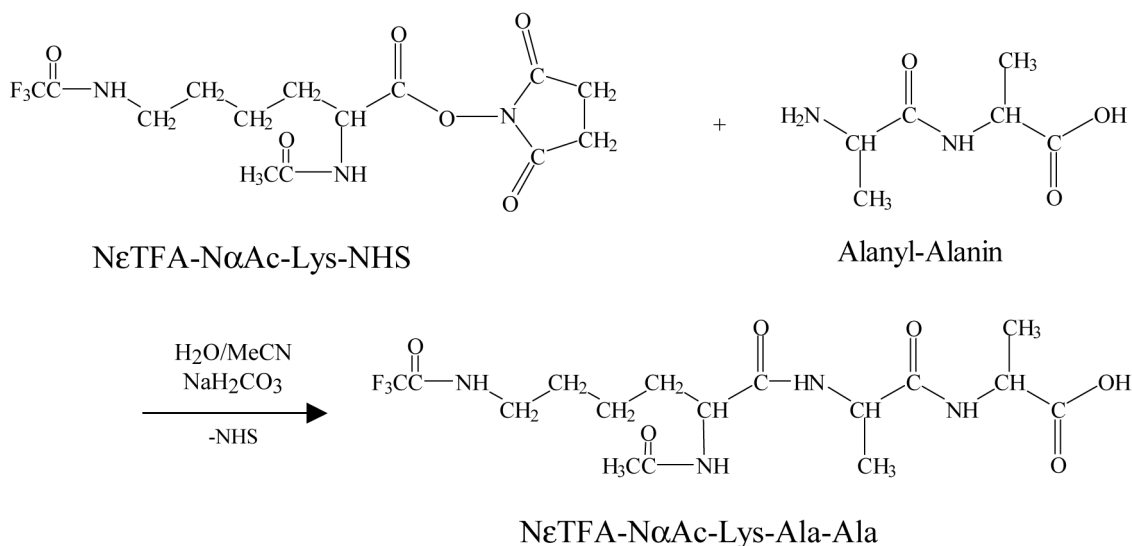
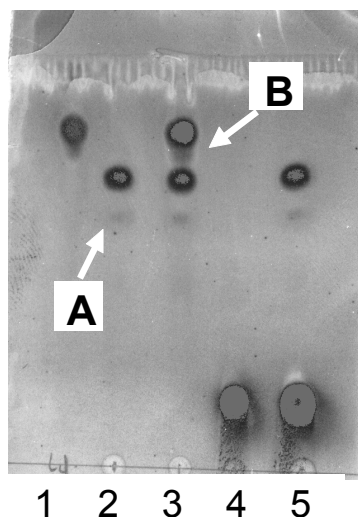


Abbildung 8-9: Kopplung von NεTFA-NαAc-Lys-NHS an Alanyl-Alanin

Zwar konnte dünn-schichtchromatographisch nach Abspaltung der Schutzgruppe mit konz. Ammoniak die Bildung eines neuen Produktes nachgewiesen werden, doch zeigte das Vorhandensein sowohl von Alanyl-Alanin und als auch von Nα-Acetyl-Lysin eine unvollständige Umsetzung an. Durch Änderung des molaren Verhältnisses zugunsten von Ala-Ala (1:1,5) konnte die als Konkurrenzreaktion ablaufende Hydrolyse des NHS-Esters zurückgedrängt und eine weitgehend vollständige Umsetzung zum Tripeptid erreicht werden. Entgegen der Vorgehensweise der Originalvorschrift konnte das Produkt nicht durch Ansäuern des Reaktionsansatzes gefällt werden. Ebenso schlugen Versuche fehl, das Produkt durch Ausschütteln in ein organisches Lösemittel zu isolieren. Durch Verwendung einer mit einem Kationenaustauschers (H⁺-Form) gefüllten Chromatographiesäule wurde die Reaktionslösung von überschüssigem NH₂-Alanyl-Alanin und Natriumionen befreit. Diejenigen Fraktionen, welche das entsprechende TFA-Tripeptid enthielten, wurden gesammelt, durch eine Gefriertrocknung vom Lösemittel befreit und das Rohprodukt aus Methanol/Diethylether umgefällt.

Die Ausbeuten, bezogen auf L-Ala-L-Ala bzw D-Ala-D-Ala, lagen bei ca. 80 % der Theorie.



1. $N\epsilon$ -TFA- $N\alpha$ -Ac-Lys-NHS-Ester
2. Reaktionsprodukt
3. Reaktionsprodukt + $N\epsilon$ -TFA- $N\alpha$ -Ac-Lys-NHS
4. Ala-Ala
5. Reaktionsprodukt + Ala-Ala

A markiert eine Verunreinigung im Reaktionsprodukt (nicht identifiziert)

B im $N\epsilon$ -TFA- $N\alpha$ -Ac-Lys-NHS-Ester (als $N\epsilon$ -TFA- $N\alpha$ -Ac-Lys identifiziert)

Abbildung 8-10: Dünnschichtchromatographische Überprüfung der Kopplungsreaktion

Trennbedingungen: Trennschicht: Polygram Sil G/UV₂₅₄

Fließmittel: Chloroform/Methanol/Eisessig 95+25+25 (v+v+v)

Detektion: 1. Chlorkammer 2. Kaliumiodid/Stärkelösung (Tauchreagenz) [159]

Sowohl dünnschichtchromatographisch als auch mittels HPLC (vergl. Abb 8-13) wurden in den Produkten Verunreinigungen festgestellt. Neben NHS und freiem $N\epsilon$ -TFA, $N\alpha$ -Ac-Lysin konnte eine Verunreinigung später als das jeweilige D-Lysin Diastereomer des D-Ala-D-Ala- bzw. L-Ala-L-Ala-Peptids identifiziert werden. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit zeigte sich jedoch, dass sich diese Diastereomere nach Abspaltung der TFA-Schutzgruppe vollständig abtrennen ließen, so dass an dieser Stelle keine weitere Aufreinigung der Produkte mehr vorgenommen wurde.

In den IR-Spektren der Kopplungsprodukte (Abb. 8-11, 8-12) war wiederum die intensive Bande der Trifluoressigsäure bei 1180 cm^{-1} festzustellen. Die Lage der Banden in den Spektren der beiden Diastereomeren ist sehr ähnlich, obwohl sich die relativen Intensitäten einzelner Banden teilweise stark voneinander unterscheiden. Das Spektrum von $N\epsilon$ -TFA, $N\alpha$ -Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala (Abb. 8-12) zeigt im Bereich von $1730\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ wesentlich schlechter aufgelöste Banden als das von $N\epsilon$ -TFA, $N\alpha$ -Ac-L-Lys-L-Ala-L-Ala (Abb. 8-11).

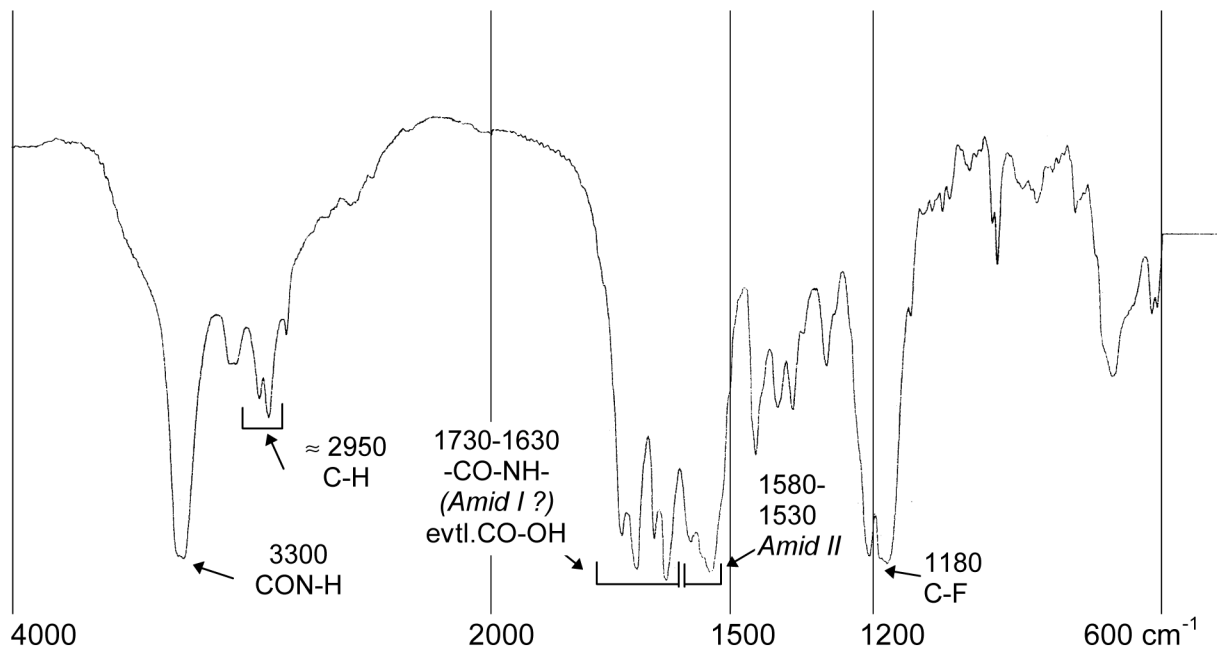


Abbildung 8-11: IR-Spektrum von N ϵ -TFA, N α -Acetyl-L-Lysyl-L-Alanyl-L-Alanin (KBr)

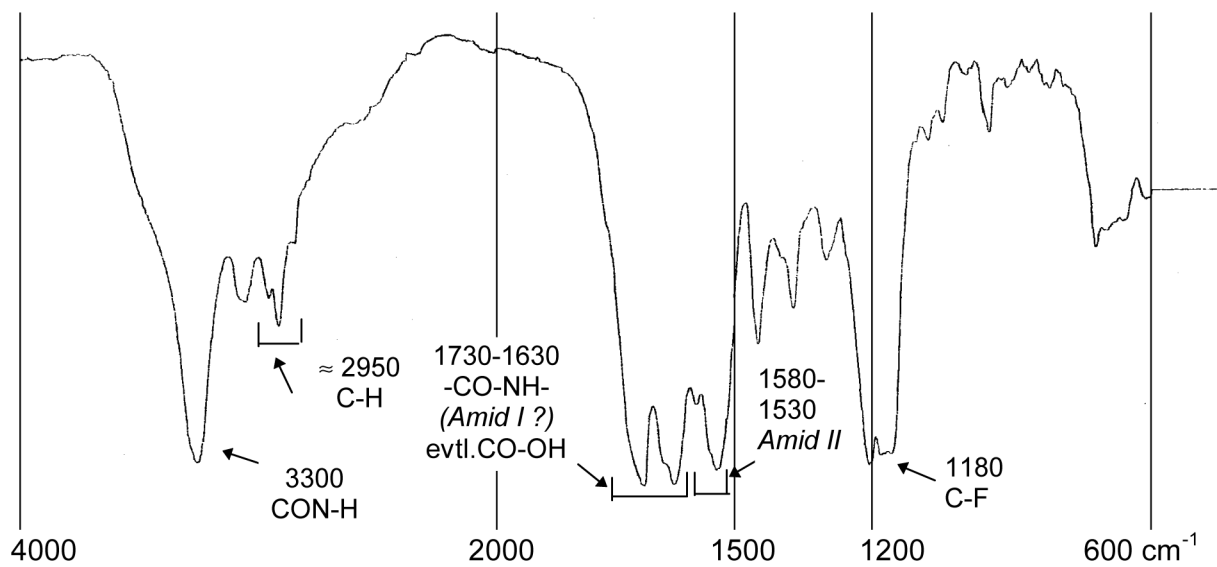


Abbildung 8-12: IR-Spektrum von N ϵ -TFA, N α -Acetyl-L-Lysyl-D-Alanyl-D-Alanin (KBr)

8.4.4 Abspaltung der Schutzgruppe durch konzentrierte Ammoniaklösung

In der Literatur werden für die alkalische Abspaltung der TFA-Schutzgruppe (Abb. 8-1) 1 M NaOH [154] oder Piperidinlösung [160] bzw. konzentrierte Ammoniaklösung [154] empfohlen. Obwohl im Gegensatz zu Ammoniak für die Verwendung von Natronlauge und Piperidin detaillierte Arbeitsanweisungen vorlagen, erschien die Abspaltung der Schutzgruppe durch konz. Ammoniak am vorteilhaftesten, da dieses unter Vakuum aus der Reaktionslösung entfernt werden kann. Die Abspaltung der Schutzgruppe erfolgte durch Lösen des TFA-Peptids in 25 %igem Ammoniak (1 ml NH₃ / 0,07 mmol TFA-Peptid) bei 0 °C und benötigte ca. 5 h. Der Zeitbedarf der Hydrolyse der TFA-Gruppe war zuvor in einem Modellversuch mit Nε-TFA,Nα-Acetyl-L-Lysin ermittelt worden.

Nach Abspaltung der TFA-Schutzgruppe wurde die freigesetzte Trifluoressigsäure durch Einsatz eines Anionenaustauschers entfernt und daraufhin der Reaktionsansatz gefriergetrocknet. In den so erhaltenen Rohprodukten konnte mittels HPLC neben NHS auch die bereits erwähnten D-Lysinyl-Diastereomere der Tripeptide als Verunreinigungen nachgewiesen werden, welche sich allerdings durch eine Umkristallisation aus Wasser/Ethanol entfernen ließen. Die Ausbeute lag bei 75 %.

8.5 Charakterisierung der freien Peptide (HPLC)

8.5.1 Ionenpaarchromatographie (HPLC) der Syntheseprodukte

Im Gegensatz zu den geschützten Peptiden ließen sich die Peptide nach Abspaltung der TFA-Schutzgruppe nicht mittels reversed-phase-HPLC unter Verwendung herkömmlicher Puffer/Acetonitril- bzw. Puffer/Methanol-Eluenten mit zufriedenstellender Auflösung trennen. Erst durch den Einsatz eines Ionenpaarreagenzes (Na-Heptansulfonat) konnten sowohl die geschützten als auch die freien Peptide gut voneinander getrennt werden.

Abbildung 8-13 zeigt eine Zusammenstellung der Chromatogramme sowohl der geschützten als auch der freien Peptide. Die Übereinstimmung der Retentionszeit für käufliches NαAc-L-Lys-D-Ala-D-Ala (7) mit der des entsprechenden Peptids aus der eigenen Synthese (5,6) wurde als Hinweis auf die Identität betrachtet. Die Reinheit des eigenen Produktes lag nach der Umkristallisation bei mindestens 95% (berechnet über die Peakfläche unter Berücksichtigung der spezifizierten Reinheit des kommerziellen Produktes von 90 %).

Sowohl vor als auch nach der Abspaltung der Schutzgruppe konnte in den jeweiligen Rohprodukten (**a-d**) die Bildung von Diastereomeren (**a'-d'**) der entsprechenden Peptide nachgewiesen werden. Die Racemisierung von Aminosäuren ist allgemein ein besonders kritischer Punkt während der Kopplungsreaktion. Dies betrifft in erster Linie die α -Position der an der Carboxylgruppe aktivierten Aminosäure, hier Lysin, die sich während der Kopplungsreaktion über einen Übergangszustand in das entgegengesetzte Diastereomer umlagern kann. Zwar wurden zur Verifizierung dieser Annahme keine D-Lysin-Standards der entsprechenden Peptide herangezogen, doch konnte anhand weiterer Untersuchungen gezeigt werden (vergl. Kap. 8.5.2), dass eine Racemisierung des Alanin praktisch nicht statt fand.

Aufgrund des chromatographischen Verhaltens chiraler Verbindungen lassen sich darüber hinaus Rückschlüsse über die Identität der entstandenen Diastereomere ziehen. Während sich z.B. Diastereomerenpaare mit den Chiralitätszentren LDD/DDD oder DLL/LLL auch auf nicht-chiralen stationären Phasen trennen lassen, gelingt dieses nicht bei Enantiomeren, d.h. bei Verbindungen die sich exakt spiegelbildlich zueinander verhalten wie Verbindungen mit den Chiralitätszentren LDD/DLL und LLL/DDD. Aus diesem Grund werden im Chromatogramm eines Gemisches der Rohprodukte von N α Ac-Lys-D-Ala-D-Ala und N α Ac-Lys-L-Ala-L-Ala die Peaks der D-Lysin-Nebenprodukte von denen der jeweils enantiomeren Hauptprodukte überlagert. Weiterhin ist das Auftreten des jeweils diastereomeren Nebenproduktes in vergleichbaren Anteilen sowohl vor als auch nach der Abspaltung der Schutzgruppe nachzuweisen, was zusätzlich beweist, dass die Diastereomere tatsächlich bereits während der Kopplungsreaktion entstehen und nicht als Artefakt während der Abspaltung der TFA-Schutzgruppe auftreten.

Interessanterweise scheint der Grad der Racemisierung von der Chiralität der eingesetzten Alanyl-Alanin-Dipeptide abzuhängen: während bei der Synthese von N α Ac-D-Lys-L-Ala-L-Ala der Grad der Racemisierung weniger als 3 % betrug, lag dieser bei der Synthese des entsprechenden D-Ala-D-Ala Tripeptids zwischen 10-20 %.

Da sich neben Resten von NHS und Spuren von TFA-Peptiden die diastereomeren Nebenprodukte durch Umkristallisation aus wässrigem Ethanol praktisch vollständig entfernen ließen und gleichzeitig zufriedenstellende Ausbeuten erzielt wurden, konnte auf eine weitere Optimierung der Synthesebedingungen, z.B. durch Wahl anderer Kopplungsmethoden und Schutzgruppen, verzichtet werden.

1: Produkte der Synthese von
Nε-TFA,*Nα*Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala
a: *Nε*-TFA,*Nα*Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala
a': *Nε*-TFA,*Nα*Ac-D-Lys-D-Ala-D-Ala

2: Produkte der Synthese von
Nε-TFA,*Nα*Ac-L-Lys-L-Ala-L-Ala
b: *Nε*-TFA,*Nα*Ac-L-Lys-L-Ala-L-Ala
b': *Nε*-TFA,*Nα*Ac-D-Lys-L-Ala-L-Ala

3: Rohprodukte aus (2) nach
 Abspaltung der Schutzgruppe
c: *Nα*Ac-L-Lys-L-Ala-L-Ala
c': *Nα*Ac-D-Lys-L-Ala-L-Ala

4: Cochromatogramm der
 entschützten Peptide (vergl. Chr. 3 u. 5)

5: Rohprodukte aus (1) nach
 Abspaltung der Schutzgruppe
d: *Nα*Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala
d': *Nα*Ac-D-Lys-D-Ala-D-Ala

6: *Nα*Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala nach
 Umkristallisation aus Wasser/Ethanol

7: *Nα*Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala-Standard
 (Fa. Bachem)

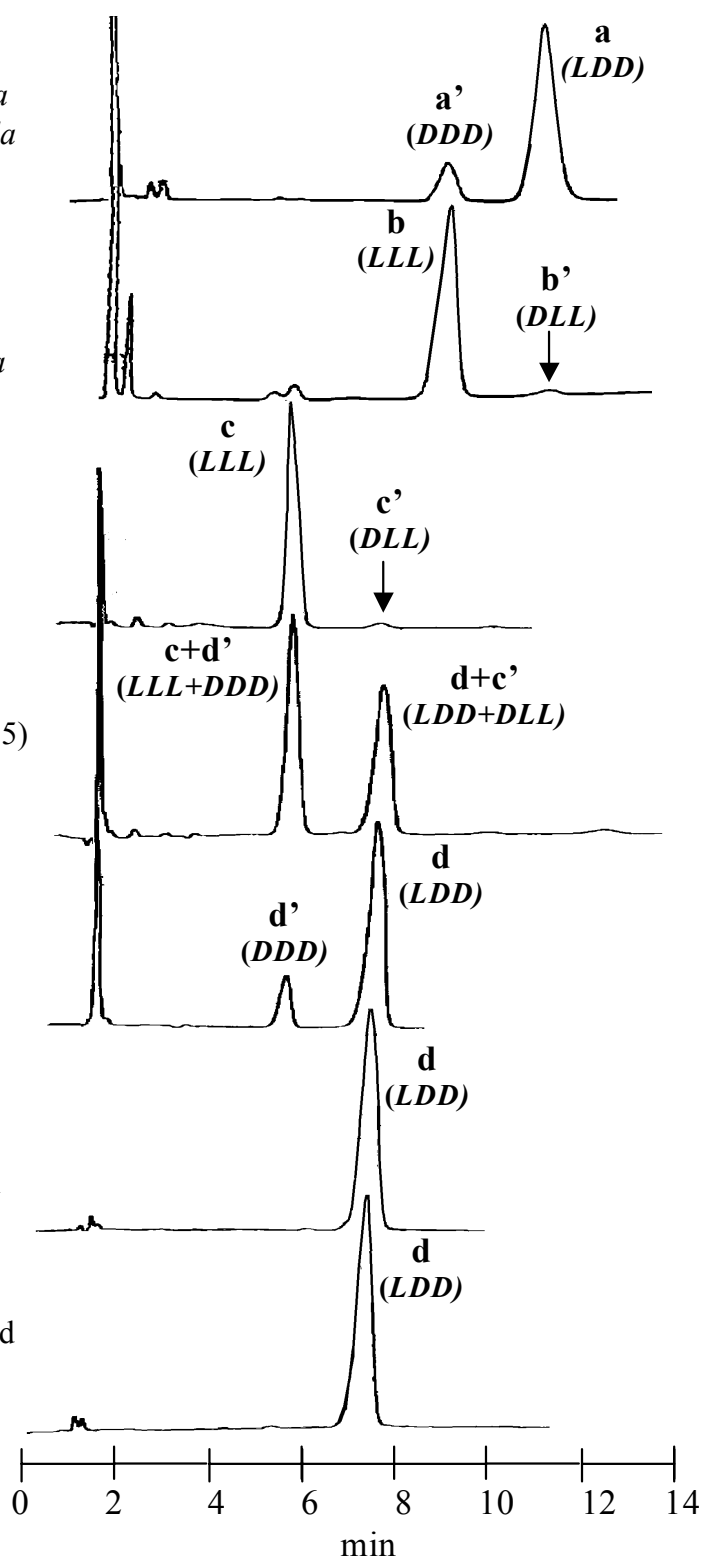


Abbildung 8-13: HPLC-Chromatogramme (Ionenpaarchromatographie) HPLC-Bedingungen: LiChrospher RP-18, 5 µm 125-4; Puffer: Phosphat/Na-Heptan-1-Sulfonat, Eluent: Puffer/Acetonitril 85+15, Fluss 1 ml/min, Detektion: UV 220 nm

8.5.2 Totalhydrolyse der Peptide und HPLC-Trennung der 2,3,4,6-tetra-O-Acetyl-1-thio- β -D-Glucose-Derivate von D- und L-Alanin

Zur Absicherung, dass nur der Lysin-Anteil in den Syntheseprodukten partiell racemisiert war, sollte die Aminosäure-Zusammensetzung dieser Peptide nach einer Totalhydrolyse untersucht werden. Die entsprechende Analytik musste folgende Kriterien erfüllen: Zum Ersten durfte die Totalhydrolyse selbst nicht zu einer nennenswerten Racemisierung führen und zum Zweiten sollten enantiomere Aminosäuren nebeneinander nachgewiesen werden können. CSAPO et al. [161] zeigten, dass bei der sauren Totalhydrolyse von Proteinen und Peptiden bei Anwendung hoher Temperaturen (170 °C) und kurzer Hydrolysezeiten (1 h) eine Racemisierung der Aminosäuren während der Hydrolyse im Vergleich zur klassischen sauren Hydrolyse (110 °C/24 h) weitgehend unterdrückt werden kann. Gleichzeitig stellten sie eine chirale Derivatisierung zahlreicher D- und L-Aminosäuren mit o-Phthalaldehyd / 2,3,4,6-tetra-O-Acetyl-1-thio- β -D-Glucose (TATG) zu diastereomeren, fluoreszierenden Verbindungen vor (Abb. 8-14). Diese Derivate der D- und L-Aminosäuren ließen sich an einer herkömmlichen RP-18 Phase trennen und über ihre Fluoreszenz detektieren.

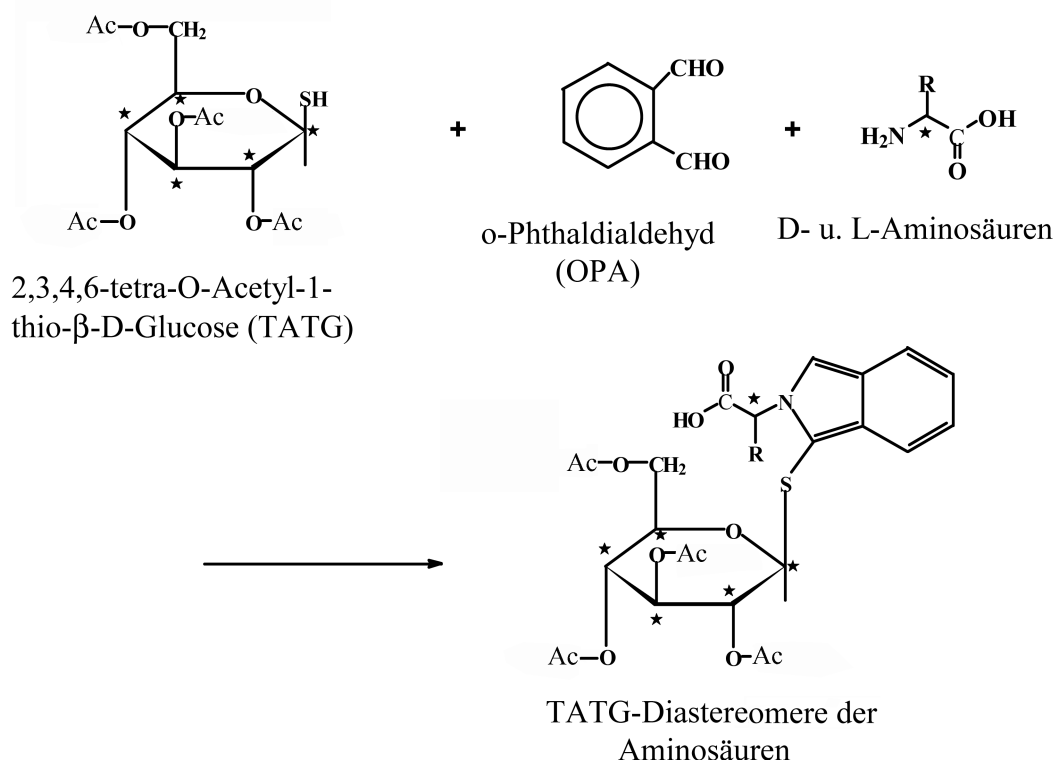


Abbildung 8-14: Derivatisierung von D,L-Aminosäuren zu diastereomeren Verbindungen

Zwar waren in eigenen Experimenten nach der Derivatisierung mit dem TATG/OPA-Reagenz D- und L-Alanin gut zu trennen, doch versagte diese Methode beim Nachweis der Lysin-Enantiomere. Dennoch wurden die N α Ac-Lys-Ala-Ala-Peptide nach der zitierten Methodik untersucht, um zumindest eine Racemisierung des Alanin-Anteils während der Peptidsynthese auszuschließen.

Abb. 8-15 zeigt die Chromatogramme eines D,L-Ala-Standardgemisches (äquimolares Verhältnis) und das Chromatogramm für das Hydrolysat eines Rohproduktes von N α Ac-Lys-D-Ala-D-Ala. Im Hydrolysat betrug der Anteil an L-Alanin ca. 4% vom Gesamt-Alanin und lag im Rahmen der von CSAPÓ et al. [161] beschriebenen Racemisierung in dieser Analysenmethode. Im Gegensatz dazu wurde mit Hilfe der Ionenpaarchromatographie (vergl. 8.5.1) in diesem Syntheseprodukt ein Anteil von ca. 20 % des Diastereomer festgestellt. Da eine so hohe Racemisierung des D-Alanin praktisch ausgeschlossen ist, kann dieser Anteil des diastereomeren Nebenproduktes nur durch eine partielle Racemisierung des L-Lysins erklärt werden.

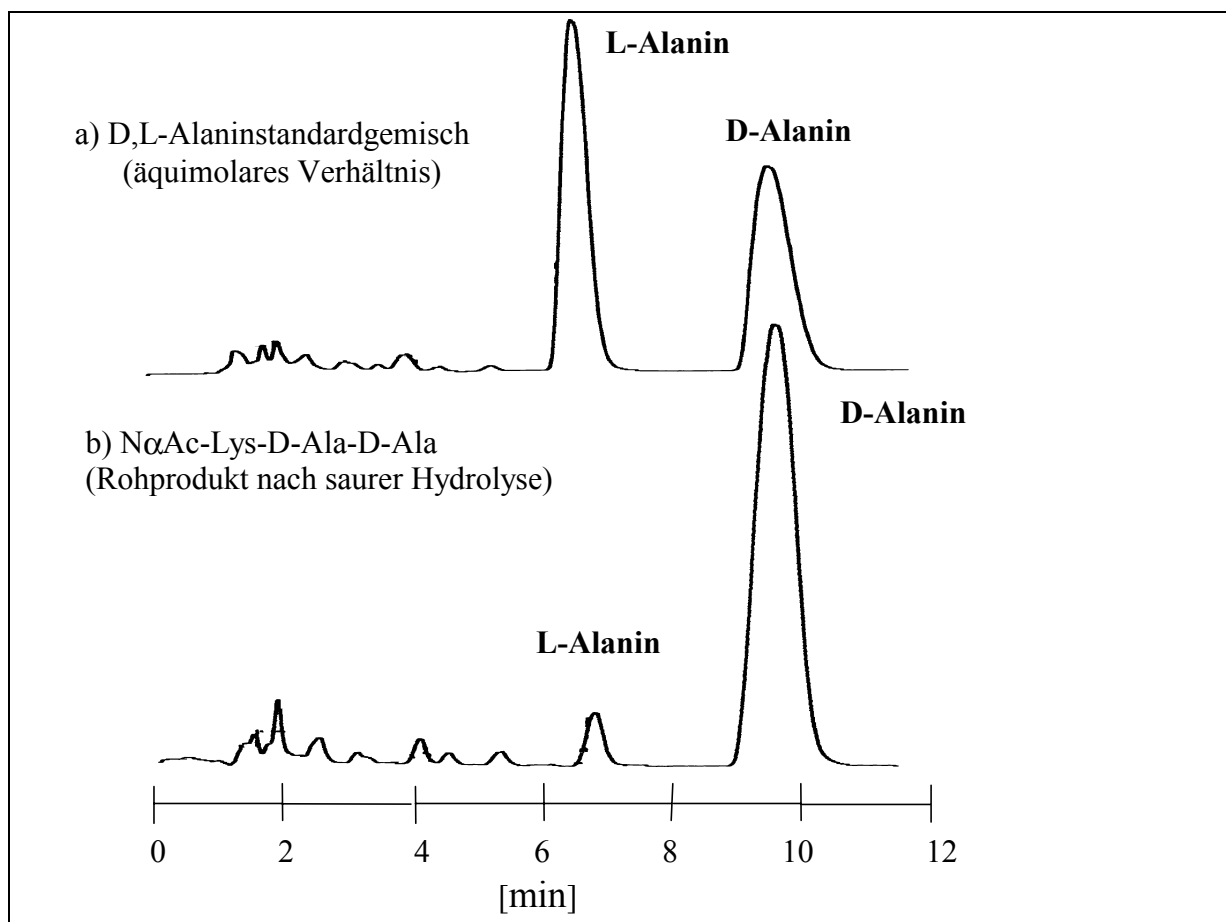


Abbildung 8-15: HPLC-Chromatogramme a) Gemisch der Einzelverbindungen D-Ala und L-Ala; b) von N α -Ac-Lys-D-Ala-D-Ala nach saurer Hydrolyse und Derivatisierung mit OPA/TATG

HPLC-Bedingungen: LiChrospher RP-18, 5 μ m 125-4; Phosphatpuffer/MeOH (60 + 40)
Detektion: Fluoreszenz Ex 325 nm, Em 420 nm

8.5.3 IR-spektroskopische Charakterisierung der freien Peptide

8.5.3.1 Nachweis der Identität des synthetisierten Peptids

In den Abbildungen 8-16 u. 8-17 wird das Spektrum des synthetisierten N α -Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala-Peptids mit dem Spektrum des Peptids der Fa. Bachem verglichen. Alle Banden im Spektrum des eigenen Produkts finden sich im Spektrum des kommerziellen Produktes wieder, allerdings weist letzteres drei zusätzliche Banden bei den Wellenzahlen 1750, 1725 und 1010 cm⁻¹ auf. Des Weiteren zeigen einzelne Banden deutliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Intensität. Beide Beobachtung sind wahrscheinlich auf den Gehalt an Essigsäure im kommerziellen Produkt zurückzuführen, laut Spezifikation des Herstellers immerhin 9 %. Dies würde das Auftreten der Bande bei 1725 cm⁻¹ (C=O-Schwingung aliphatischer Säuren) erklären.

Das IR-Spektrum des synthetisierten diastereomeren N α -Ac-L-Lys-L-Ala-L-Ala (Abb. 8-18) entspricht überwiegend dem Spektrum von N α -Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala. Allerdings zeigen die Spektren beider Diastereomere im „Fingerprint“-Bereich (<1500 cm⁻¹) deutliche Unterschiede der relativen Bandenintensitäten.

Der Vergleich dieser Spektren der freien Peptide mit denen der geschützten Peptide (Abb. 8-11 u. 8-12) zeigt deutlich die Unterschiede. So ist im „Fingerprint“-Bereich die Bande der C-F-Bindung (1180 cm⁻¹), welche in allen bisher vorgestellten Spektren eine besonders intensive Bande darstellt, in den freien Peptiden entsprechend den Erwartungen nicht mehr nachweisbar. Statt dessen erscheint bei 2110 cm⁻¹ die Bande der (wahrscheinlich protonierten) freien ϵ -Aminogruppe. Des Weiteren hat sich die Lage der Banden, die den Amidbindungen zugeordnet wurden, nach Abspaltung der Schutzgruppe zu niederen Wellenzahlen verschoben (3300 \rightarrow 3280 cm⁻¹; 1730 \rightarrow 1625 cm⁻¹ (Amid I) und 1580 \rightarrow 1530 cm⁻¹).

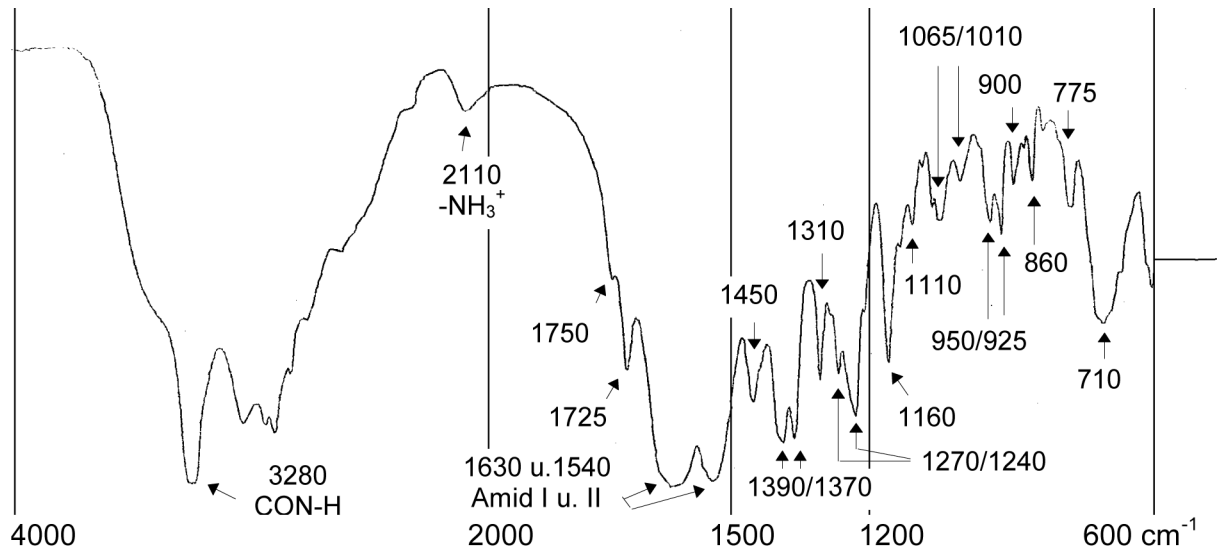


Abbildung 8-16: IR-Spektrum des N α -Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala-Standards, Fa. Bachem (KBr)

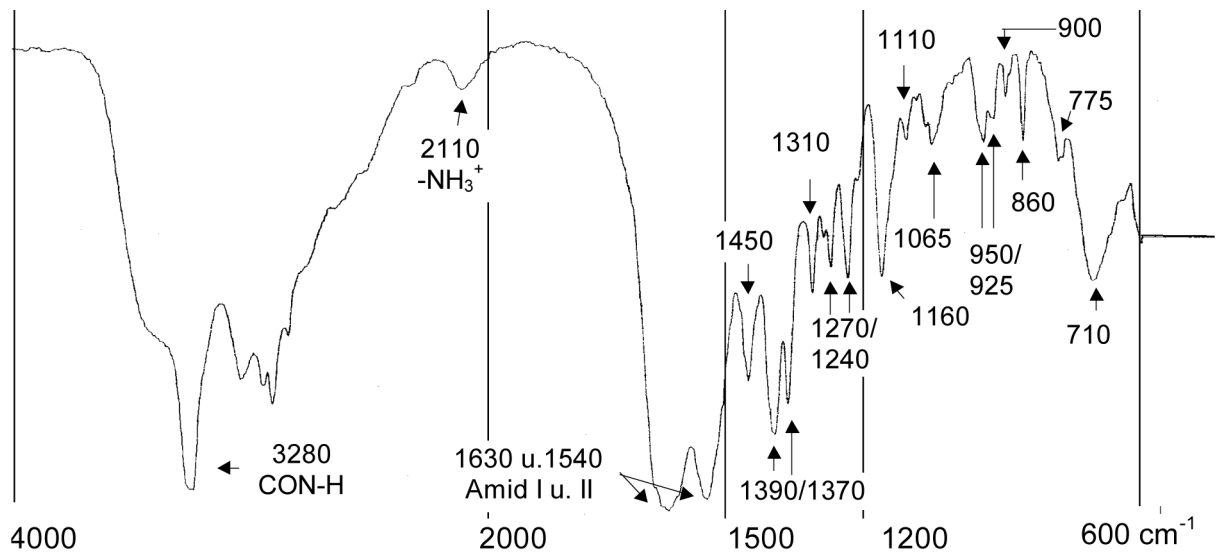


Abbildung 8-17: IR-Spektrum von N α -Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala (eigenes Produkt) (KBr)

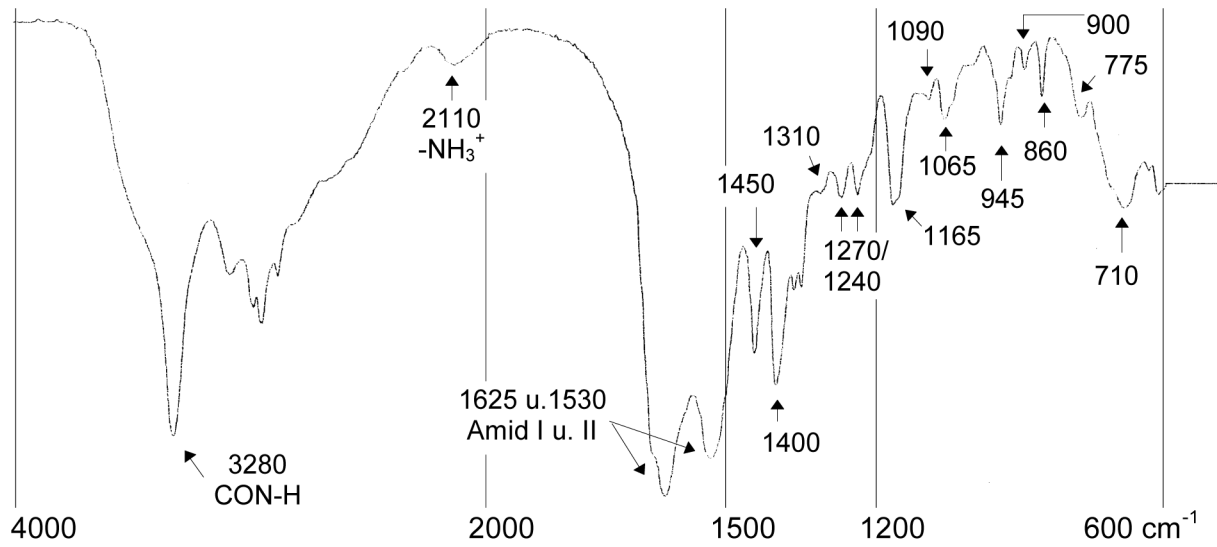
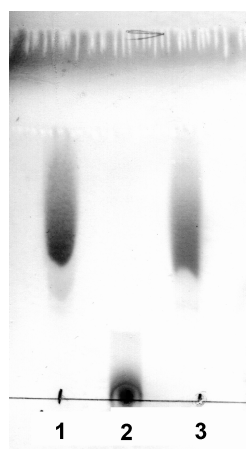


Abbildung 8-18: IR-Spektrum von N α -Ac-L-Lys-L-Ala-L-Ala (eigenes Produkt) (KBr)

8.5.4 Selektive Komplexbildung mit Vancomycin

NIETO und PERKINS [151] zeigten, dass sich der Komplex aus Vancomycin und Lys-D-Ala-D-Ala von freiem Vancomycin bzw. freiem Tripeptid dünn-schichtchromatographisch trennen lässt, wobei sie in allen Testsystemen (Papier- und Silicagelplatten) für den Komplex stets einen deutlich geringeren Rf-Wert als für die freien Komplexpартner erhielten.

Dieses DC-Experiment wurde mit den eigenen Syntheseprodukten nachvollzogen, mit dem Ziel auch deren funktionale Eigenschaften zu überprüfen. Zu diesem Zweck wurden jeweils Lösungen der Peptide im äquimolaren Verhältnis mit Vancomycin inkubiert und anschließend dünn-schichtchromatographisch untersucht.



Trennschicht: Polygram SilG/UV 254

Laufmittel: EtOH/H₂O/konz. NH₃ 75 + 25 + 0,5 (v+v+v)

1. Vancomycin: 0,5 μmol/mL

2. Vancomycin und NαAc-Lys-D-Ala-D-Ala: je 0,5 μmol/ mL

3. Vancomycin und NαAc-Lys-L-Ala-L-Ala: je 0,5 μmol/ mL

(Lösemittel: EtOH/H₂O 50 + 50 (v+v))

Detektion : Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz [159]
(Vancomycin-spezifisch)

Abbildung 8-19: Nachweis der Komplexbildung von NαAc-Lys-D-Ala-D-Ala durch Vancomycin

Das zur Detektion verwendete Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz reagiert mit den Zuckerresten des Vancomycins, wohingegen die Peptide nicht angefärbt werden.

Abb. 8-19 zeigt, dass für freies Vancomycin (Spur 1) unter den gewählten Bedingungen ein Rf-Wert von ca. 0,4 erhalten wurde. In Gegenwart von NαAc-Lys-D-Ala-D-Ala wird praktisch kein freies Vancomycin mehr detektiert (Spur 2). Diese Beobachtung wurde bereits von NIETO und PERKINS auf die Bildung äußerst stabiler Komplexe zurückgeführt. Das Kontrollexperiment mit dem diastereomeren NαAc-Lys-L-Ala-L-Ala, welches keine Komplexe mit Vancomycin bildet, zeigt, dass auch unspezifische Faktoren für die Unterdrückung der chromatographischen Mobilität von Vancomycin in Gegenwart eines Tripeptids auszuschließen sind (Spur 3). Dieser eindeutige Nachweis der Komplexbildung des synthetisierten Nα-Acetyl-Lys-D-Alanyl-D-Alanins durch Vancomycin kann in Ergänzung zur chromatographischen und spektroskopischen Charakterisierung als abschließender Beweis für die erfolgreiche Synthese beider Peptide angesehen werden.

9 Herstellung der Immunreagenzien

9.1 Auswahl von Carrierprotein, Festphasenantigen und enzymmarkiertem Antigen

9.1.1 Carrierproteine

Wie bereits in der Zielsetzung beschrieben, sollten die Versuchstiere mit N α -Acetyl-L-Lysyl-D-Alanyl-D-Alanin immunisiert werden. Im Laufe der im folgenden beschriebenen Arbeiten wurde jedoch nur die Grundimmunisierung mit diesem Peptid als Hapten durchgeführt. Für die Boosterimmunisierung bzw. Restimulierung (vergl. Kap. 6.1) wurde Ampicillin als Antigen verwendet. Durch diese Vorgehensweise sollte die Immunantwort verstärkt gegen das gemeinsame Strukturelement von D-Alanyl-D-Alanin und Penicillinen gelenkt werden.

Sowohl N α -Acetyl-L-Lysyl-D-Alanyl-D-Alanin als auch Ampicillin sind mit ihrer molaren Masse von ca. 350 Da zu klein, um selbst eine Immunantwort auszulösen, und müssen daher kovalent an immunogene Trägerproteine gebunden werden. Als allgemeine Regel gilt, dass Trägerproteine eine umso größere Immunogenität zeigen, je größer der durch die Evolution bedingte verwandtschaftliche Unterschied zwischen dem Organismus, aus dem das Trägerprotein stammt und dem zu immunisierenden Tier ist. Als Trägerproteine finden daher häufig Proteine aus wirbellosen Organismen Verwendung, wobei das Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH), ein Protein aus einer murinen Napfschnecke, besonders hervorzuheben ist. Als bakterielle Carrierproteine wären das (inaktivierte) Tetanus- und Diphtherietoxin zu nennen. Die Praxis zeigt aber, dass auch verschiedene Albumine aus Wirbeltieren (Rinderserum-, Humanserum-, Ovalbumin etc.) als Trägerproteine für die Immunisierung z.B. von Kaninchen oder Mäusen geeignet sind [140, 141, 146].

BÜRK et al. [162] beschreiben die erfolgreiche Verwendung von Glucoseoxidase aus *Aspergillus niger* als immunogenes Trägerprotein für das Muscheltoxin Neosaxitoxin, welches sie über eine zweistufige Natriumperiodatmethode nach WILSON und NAKANE [163] an das Protein koppelten. Obwohl zur Kopplung nur eine sehr geringe Menge an Neosaxitoxin eingesetzt wurde (weniger als 1 mol Hapten/mol Glucoseoxidase) führte die Immunisierung mit diesem Konjugat zum Erfolg. Diese Tatsache zeigt, dass auch mit deutlich geringeren Kopplungsraten als üblicherweise empfohlen (5 mol gebundenes Hapten/mol Protein) [140, 146] bei Verwendung geeigneter Trägerproteine die erwünschte Immunantwort ausgelöst werden kann.

Aufgrund der hohen Immunogenität der Glucoseoxidase/Hapten-Konjugate und der einfachen Durchführbarkeit der Natriumperiodat-Kopplung sollte diese Methode zur Herstellung der D-Ala-D-Ala- und Ampicillin-Immuno gene herangezogen werden.

9.1.2 Festphasenantigen und enzymmarkiertes Antigen

Zum Nachweis einer erfolgreichen Immunisierung und für die spätere Charakterisierung der Antisera sollten die zugehörigen ELISA-Techniken etabliert werden. Zu diesem Zweck sollte sowohl der direkte als auch der indirekte Testaufbau genutzt werden, weshalb neben einem enzymmarkierten Antigen für den direkten Testaufbau ebenfalls ein Festphasenantigen für den indirekten ELISA hergestellt werden mussten.

Zur Enzym-Markierung von N α -Acetyl-L-Lysyl-D-Alanyl-D-Alanin wurde Meerrettichperoxidase (HRP) gewählt. Dieses Enzym ist relativ stabil und unempfindlich gegenüber chemischen Modifikationen am Protein, erlaubt eine äußerst empfindliche Nachweisreaktion und es liegen relativ gut nachvollziehbare Arbeitsprotokolle vor [140, 146]. Zudem ist Meerrettichperoxidase im Vergleich zu anderen in Betracht gezogenen Enzymen wie z.B. die alkalische Phosphatase relativ preisgünstig in der notwendigen Reinheit erhältlich.

Für die Synthese des Festphasenantigens wurde auf Rinderserumalbumin (BSA) zurückgegriffen. Rinderserumalbumin findet als indifferentes Protein für die Synthese von Festphasenantigen breite Verwendung und wird als Ausgangsprotein für die Entwicklung von indirekten ELISA-Testsystemen empfohlen, falls nicht bereits für die Immunisierung BSA-Konjugate eingesetzt wurden [140].

9.1.3 Kopplungsmethoden

Die Auswahl eines geeigneten Kopplungsreagenzes hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie Natur und Anzahl kopplungsfähiger funktioneller Gruppen in Protein und Hapten, chemischer Stabilität der Reaktionspartner gegenüber den Kopplungsbedingungen und nicht zuletzt auch dem methodischen Aufwand bei der Kopplung.

Konjugate für die Immunisierung

Bei der Herstellung von Glucoseoxidase/Hapten-Konjugaten mittels der zweistufigen Natriumperiodatmethode nach WILSON und NAKANE [163] wird vor der eigentlichen Kopplung der Kohlenhydratanteil von Glykoproteinen (z.B. Glucoseoxidase, Meerrettichperoxidase) durch Natriumiodat oxidativ gespalten, wobei reaktive Aldehydgruppen am Protein entstehen.

Diese Aldehydgruppen lassen sich im 2. Schritt mit primären Aminogruppen z.B. aus Peptiden zu Schiffischen Basen umsetzen und anschließend zu stabilen sekundären Aminogruppen reduzieren.

Im allgemeinen werden diejenigen Epitope eines proteingebundenen Haptens vom Immunsystem besonders gut erkannt, welche den größten Abstand zum Trägerprotein aufweisen und somit dem Immunsystem am besten präsentiert werden [140-142]. Dieser Abstand und die Orientierung des Epitops zur Proteinoberfläche können durch Einführung eines geeigneten „Abstandhalters“ (Spacer) zwischen Hapten und Protein variiert werden. Die Länge eines solchen Spacers sollte ca. 6-9 Kohlenstoffatomen entsprechen, längere Spacer sind eher nachteilig [141, 145].

Zur Gewinnung von D-Alanyl-D-Alanin-spezifischen Antikörpern wurde daher die Kopplung des Haptens N α -Acetyl-Lys-D-Ala-D-Ala an das Trägerprotein über die N ϵ -Aminogruppe des Lysins gewählt, so dass der Lysinrest selbst als Spacer fungieren und eine optimale Orientierung des D-Alanyl-D-Alanin-Terminus zur Proteinoberfläche gewährleisten konnte.

Analog dazu sollte bei der Synthese des Ampicillin-Immunogens die Kopplung des Ampicillins über dessen freie primäre Aminogruppe erfolgen.

Konjugate für ELISA-Techniken

Bei der Synthese von Enzym- bzw. Proteinkonjugaten zum Nachweis von Hapten-spezifischen Antikörpern in ELISA-Techniken ist zu beachten, dass sich die Kopplungsmethoden bzw. die hierbei eingeführten Spacer von denjenigen der Immunogensynthese unterscheiden müssen („heterologe Brücken“). Ansonsten können Antikörper, die gegen den Spacer gerichtet sind, Hapten-spezifische Antikörper vortäuschen. Aus diesem Grund wurde sowohl für die Synthese der Konjugate mit Meerrettichperoxidase als auch mit BSA auf die Glutardialdehydmethode nach AVRAMEAS [153] zurückgegriffen.

Glutardialdehyd ist ein weit verbreitetes bifunktionelles Kopplungsreagenz, das Haptene und Proteine über kopplungsfähige Aminogruppen miteinander verknüpft. Die Reaktion kann sowohl einstufig (alle Reaktionspartner liegen nebeneinander vor) als auch mehrstufig (ein Reaktionspartner wird vor der Kopplung durch Glutardialdehyd aktiviert) mit guten Kopplungsausbeuten durchgeführt werden [140, 141].

Die Reaktion von Glutardialdehyd mit Proteinen betrifft überwiegend die ϵ -Aminofunktion der Lysinreste (Ca. 4 Mol Glutardialdehyd reagieren mit einem Mol Lysin), aber auch die terminalen α -Aminogruppen sowie Sulfhydrylgruppen, letztere reagieren allerdings in weitaus geringerem Ausmaß [141]. Zwar ist der Reaktionsmechanismus noch nicht in allen Einzelheiten geklärt, doch geht man von dem unter Abbildung 9-1 dargestellten Ablauf aus.

Unter sauren Bedingungen, wie sie in kommerziell erhältlichen wässrigen Lösungen herrschen, liegt Glutardialdehyd im Gleichgewicht mit der cyclischen Hemiacetalform und deren Polymer vor (a). Die Kopplungsreaktionen werden meist im pH-Bereich von ca. 7-8 durchgeführt, wobei Glutardialdehyd in α,β -ungesättigte Aldehydpolymere übergeht (b).

Primäre Aminogruppen von Proteinen reagieren mit den α,β -ungesättigten Aldehydpolymeren dann intermediär zu prinzipiell labilen Schiffischen Basen, die jedoch aufgrund von Wechselwirkungen mit benachbarten Doppelbindungen zu einem stabilen Endprodukt führen(c). Aufgrund dieser Stabilisierung ist, im Gegensatz z.B. zur Natriumperiodatmethode, keine Reduktion der Schiffischen Basen zu sekundären Aminen notwendig.

Bei hohen Konzentrationen an primären Aminen soll darüber hinaus eine Stabilisierung durch eine 1,4-Addition bzw. konjugierte Addition an das π - System der α,β -ungesättigten Carbonylverbindung erfolgen (d).

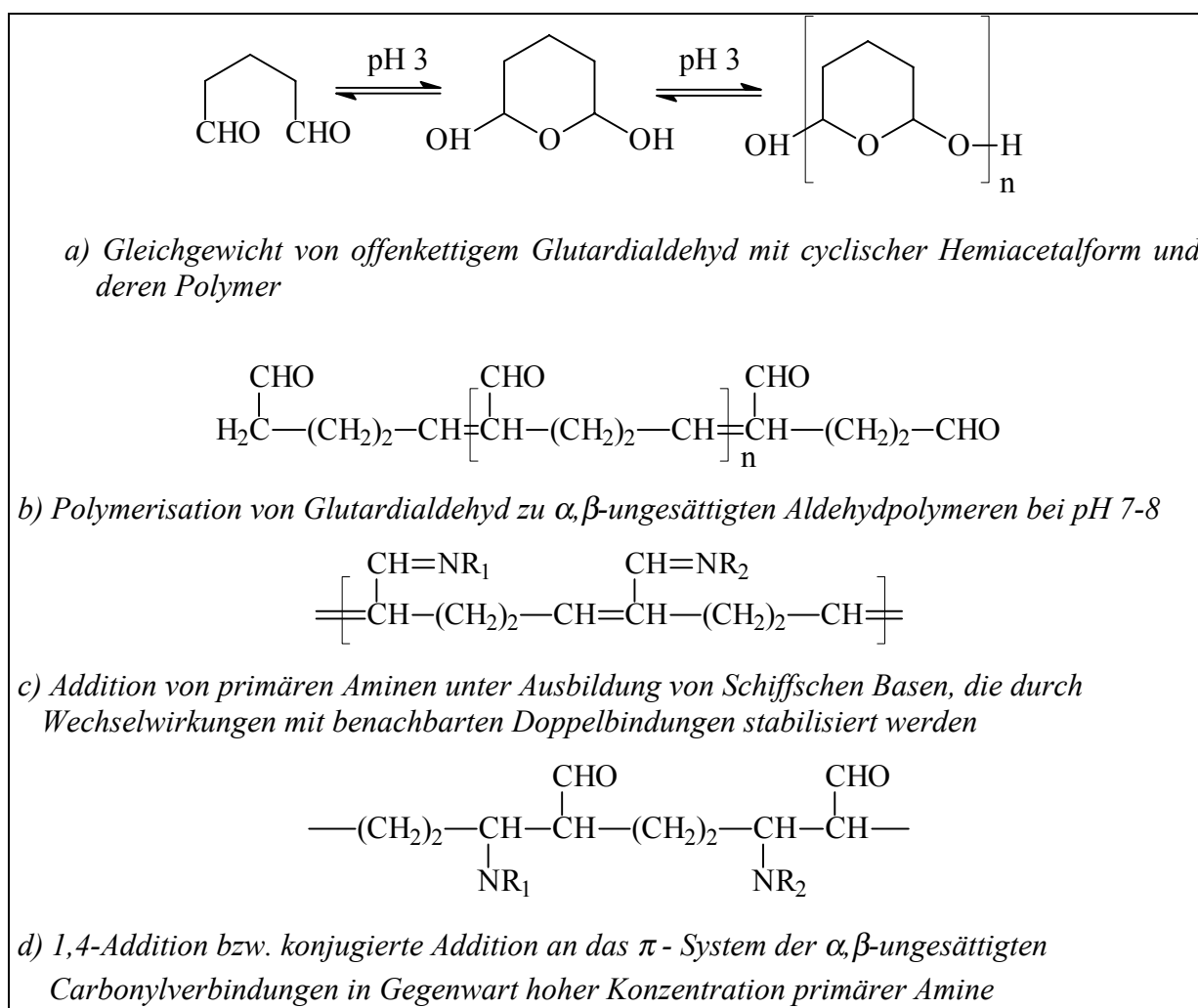


Abbildung 9-1: Reaktion von Glutardialdehyd während der Umsetzung mit primären Aminen (nach Regenmortel [141])

9.2 Synthesen der Konjugate

9.2.1 Natriumperiodat-Kopplung

Als Immunogen wurden sowohl Glucoseoxidase-N α -Acetyl-L-Lysyl-D-Alanyl-D-Alanin (GOD-Ac-Lys-D-Ala-D-Ala) als auch Glucoseoxidase-Ampicillin in Anlehnung an die von BÜRK et al. [162] bzw. WILSON und NAKANE [163] beschriebenen Arbeitsanweisungen hergestellt. Ablauf und Ausbeuten der Synthesen sind in Tabelle 9-1 zusammengefasst. Dabei erfolgte die Kopplung über die Aldehydgruppen, welche durch eine Natriumperiodat-Spaltung aus dem Kohlenhydratanteil des Proteins erhalten werden. Nach einer Dialyse zur Entfernung überschüssigen Natriumperiodats sowie sonstiger niedermolekularer Bestandteile wurde das aktivierte Protein mit dem Hapten (N α -Acetyl-Lys-D-Ala-D-Ala bzw. Ampicillin) zur Reaktion gebracht. Zur Stabilisierung der Hapten-Protein-Bindungen, wurden anschließend die intermediär gebildeten Schiffschen Basen durch Zugabe von Natriumborhydrid zu stabilen sekundären Aminen reduziert. Weitere Dialysen zur Aufreinigung der Konjugate schlossen die Synthesen ab.

Ebenfalls mit der Natriumperiodatmethode wurde ein Meerrettich-Vancomycin-Konjugat (HRP-Vanco) hergestellt, das später in einem Rezeptortest zum Nachweis von Protein-gebundenem N α -Lys-D-Ala-D-Ala eingesetzt werden sollte. Im Zuge dieser Experimente zeigte sich allerdings, dass im speziellen Fall des Vancomycin-Konjugats die Dialyse allein zur Entfernung von ungebundenem Vancomycin nicht ausreichte. Dieses gelang erst durch Ultrafiltration mit einem Ausschlussvolumen von 30.000 Da, was allerdings mit einem relativ hohen Verlust an Konjugat verbunden war.

Speziell bei der Synthese des Ampicillin-Konjugates durfte während der Kopplungsreaktion und der anschließenden Reduktion mit Natriumborhydrid ein pH-Wert von 7 nicht überschritten werden, um einer Hydrolyse des Ampicillins vorzubeugen. Aus diesem Grund wurde der pH-Wert der Reaktionslösung sowohl bei der Kopplungsprozedur als auch bei der anschließenden Reduktion mit Hilfe einer pH-Elektrode überwacht. Allerdings brauchte während der gesamten Kopplungsreaktion keine Korrektur des pH-Wertes vorgenommen werden. Aus dem gleichen Grund wurde das Ampicillin-Konjugat zur Entfernung ungebundenen Haptens gegen eine phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) mit einem pH-Wert von 6,5 dialysiert. Bei den übrigen abschließenden Dialysen wurde standardmäßig PBS-Puffer mit einem pH-Wert von pH 7,2-7,5 eingesetzt.

9.2.2 *Glutardialdehyd-Kopplung*

Zum Nachweis Hapten-spezifischer Antikörper mittels ELISA wurden sowohl ein BSA-N α -Acetyl-L-Lys-D-Ala-D-Ala-Konjugat (Einsatz im direkten ELISA als Festphasen-gebundenes Antigen) als auch ein HRP-N α -Acetyl-L-Lys-D-Ala-D-Ala-Konjugat (Einsatz im indirekten ELISA mit Festphasen-gebundenen Antikörpern) mit Glutardialdehyd als homobifunktionellem Kopplungsreagenz hergestellt (vergl. Tab. 9-1). Aufgrund des einfachen Herstellungsverfahrens wurde für die Synthese des BSA-Konjugats die einstufige Kopplungsmethode nach [141] herangezogen. Diese Technik ist sowohl für die Synthese von Immunogenen als auch von Beschichtungsantigenen für ELISA-Techniken geeignet [140, 141].

Prinzipiell muss jedoch bei einstufigen Kopplungsmethoden mit Glutardialdehyd neben der Protein/Hapten-Kopplung auch mit der Vernetzung einzelner Proteinmoleküle gerechnet werden. Bei der Synthese von Immunogenen und Festphasenantigenen spielen solche Effekte, abgesehen von evtl. auftretenden Löslichkeitsproblemen, eine eher untergeordnete Rolle. In Einzelfällen kann sogar die Immunogenität der Konjugate durch eine partielle Vernetzung deutlich gesteigert werden.

Bei der Synthese von enzymmarkierten-Antigenen hingegen kann die Quervernetzung einzelner Enzymmoleküle zu inhomogenen Konjugaten und später zu schlecht reproduzierbaren Testergebnissen führen [140, 146]. Aus diesem Grund wurde das HRP-Lys-D-Ala-D-Ala-Konjugat nach der von MÄRTLBAUER [145] beschriebenen zweistufigen Methodik hergestellt (vergl. Tab 9-1). Durch einen Überschuss an Glutardialdehyd werden in kürzester Zeit alle kopplungsfähigen Lysinreste des Proteins mit Glutardialdehyd umgesetzt, ohne dass es zu einer Quervernetzung kommen kann.

Die Kopplungen wurden wie in Tabelle 9-1 beschrieben durchgeführt und die fertigen Konjugatlösungen durch Dialyse von überschüssigen Reagenzien befreit.

Hapten/Carrierprotein (eingesetztes Verhältnis mol Protein : mol Hapten)	Kopplungsmethode/Ablauf	Proteingehalt in Konjugatlösung (Ausbeute)*
a) N α -Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala Glucoseoxidase (GOD) (30 : 1)	zweistufige Natriumperiodatmethode: 1. Periodatspaltung des Kohlenhydratanteils der GOD (pH-Wert während Spaltung: pH 4,4) 2. Dialyse (1 x 12 h gegen 1 L Acetatpuffer pH 4,4) 3. Zugabe Haptenlösung in PBS-Puffer (pH 7,2) 4. Einstellung des pH-Wertes auf 7-8 mit NaHCO ₃ -Lösung 5. Reaktionsbedingungen: 4 h, RT 6. Reduktion der Hapten/Protein-Bindung durch NaBH ₄ (1 h, 4 °C) 7. Dialyse (2 x 12 h gegen je 5 L PBS pH 7,2)	2,1 mg/ml (91 %)
b) Ampicillin Glucoseoxidase (GOD) (30 : 1)	zweistufige Natriumperiodatmethode: 1. Periodatspaltung des Kohlenhydratanteils der GOD (pH-Wert während Spaltung: pH 4,4) 2. Dialyse (1 x 12 h gegen 1 L Acetatpuffer pH 4,4) 3. Zugabe Haptenlösung in PBS-Puffer (pH 6,5) 4. Einstellung des pH-Wertes auf 6,5 mit NaHCO ₃ -Lösung 5. Reaktionsbedingungen: 4 h , RT (pH-Kontrolle: 6,5 - 7) 6. Reduktion der Hapten/Protein-Bindung durch NaBH ₄ (1 h, 4 °C) 7. Dialyse (3 x 12 h gegen je 5L PBS pH 6,5)	2,2 mg/ml (95 %)

Tabelle 9-1: Übersicht über die Konjugatsynthesen; *Proteinbestimmung nach Bradford [165]

<p>c)</p> <p>Vancomycin Meerrettichperoxidase (25 : 1)</p>	<p>zweistufige Natriumperiodattechnik</p> <p>Durchführung analog GOD-Lys-D-Ala-D-Ala (a), nach Kopplungsreaktion Entfernung überschüssiger Reagentien durch Ultrafiltration</p>	<p>0,06 mg/ml (11 %)</p>
<p>d)</p> <p>Nα-Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala Rinderserumalbumin (BSA) (50 : 1)</p>	<p>einstufige Glutardialdehydmethode</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Hapten und Protein gemeinsam in PBS-Puffer lösen 2. Kopplungsreaktion durch Zugabe von Glutardialdehyd (2%ig) starten 3. Reaktionsbedingungen: 4 h / RT 4. Reduktion freier Kopplungsstellen durch NaBH₄ 5. Dialyse (2 x 12 h gegen PBS pH 7,2) 	<p>0,47 mg/ml (94%)</p>
<p>e)</p> <p>Nα-Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala Meerrettichperoxidase (HRP) (30 : 1)</p>	<p>zweistufige Glutardialdehydmethode</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Aktivierung der HRP durch Lösen in Glutardialdehyd (1,25 %ig in PBS pH 7,2) 2. Reaktionsbedingungen: (12 h / RT) 3. Dialyse (1x 12h gegen PBS pH 7,2) 4. Zugabe Nα-Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala in PBS pH 7,2, Inkubation (4 h / RT) 4. Umsetzung freier Kopplungsstellen mit Glycin 5. Dialyse (3 x 12h gegen PBS pH 7,2) 	<p>1,95 mg/ml (88 %)</p>

Tabelle 9-1: (Fortsetzung) Übersicht über die Konjugatsynthesen

10 Charakterisierung der Konjugate

10.1 Möglichkeiten zur Bestimmung der Kopplungsrate

Der Nachweis der erfolgreichen Synthese von Protein/Haptenkonjugaten kann qualitativ und quantitativ erfolgen. Bei quantitativen Methoden wird die sog. Kopplungsrate, d.h. das Verhältnis von Mol gebundenem Hapten zu Mol Protein bestimmt und kann auf direktem oder indirektem Weg erfolgen. Die direkten Bestimmungsmethoden setzen im allgemeinen das Vorhandensein gut detektierbarer funktioneller Gruppen am Hapten voraus. So kann der Anteil proteingebundener Haptene mit einem Absorptionsmaximum oberhalb von 300 nm oftmals direkt photometrisch ermittelt werden, vorausgesetzt das Protein besitzt nicht selbst im betreffenden Bereich eine nennenswerte Absorption [145]. Analog hierzu kann bei Verwendung von radioaktivmarkierten Haptenen auch durch Radioaktivitätsmessung die Kopplungsrate ermittelt werden. Auch eine saure oder alkalische Hydrolyse des Proteins ist oftmals geeignet die Belegungsdichte über die Menge an freigesetztem Hapten im Hydrolysat zu ermitteln, setzt allerdings eine entsprechende Stabilität des Analyten gegenüber Säuren bzw. Basen voraus. Des Weiteren ist auch eine Ermittlung der Kopplungsrate über die molare Masse der Konjugate möglich. Da allerdings die Massenzunahme des Hapten-Protein-Konjugats im Vergleich zum unmodifizierten Protein relativ gering ausfällt, sind hochauflösende Analysemethoden wie Kapillarelektrophorese oder massenspektrometrische Methoden (z.B. LC-MS, MALDI-TOF) erforderlich. Darüber hinaus darf die Masse von Hapten und Protein nicht bereits durch das Kopplungsreagenz bzw. Methode unspezifisch beeinflusst werden, was allerdings nur in wenigen Fällen (z.B. photochemische Kopplungen) sichergestellt werden kann.

Bei indirekten Methoden wird oftmals der Anteil an freiem Hapten vor und nach der Kopplung ermittelt und aus der Differenz die Belegungsdichte bestimmt. Diese Vorgehensweise muss allerdings sehr kritisch betrachtet werden, da im allgemeinen ein großer Überschuss an freiem Hapten zur Kopplung eingesetzt wird, während die Menge tatsächlich gebundenen Haptens häufig sehr gering ausfällt. Daher ist eine sehr genaue Analysestrategie erforderlich, die sowohl gerätebedingte Messfehler als auch unspezifische Analytverluste während der Kopplungsprozedur berücksichtigt.

Die Kopplungsrate erlaubt noch keine Aussage über die tatsächliche Verfügbarkeit der Haptene für die Rezeptoren des Immunsystems. Prinzipiell kann nicht davon ausgegangen werden, dass sich die während der Kopplungsprozedur gebundenen Haptene in optimaler Ausrichtung zur Proteinoberfläche befinden, was allerdings für die Erkennung durch Rezeptoren des Immunsystems (hier: membrangebundene haptenspezifische Immunglobuline (IgM) von B-Lymphozyten) essentiell ist. Ein Teil der Haptene kann in sogenannten Proteintaschen gebunden vorliegen und so der Immunantwort nicht zur Verfügung stehen. Des Weiteren können Haptene aber auch zu nah auf der Oberfläche bzw. in ungünstiger Orientierung gebunden sein [141, 145].

Durch geeignete Rezeptortests lässt sich das Vorhandensein von hinreichend präsentierten Haptenen auf der Proteinoberfläche detektieren. Diese Methodik nutzt spezifische Hapten (Ligand)/Antikörper (Rezeptor) - Wechselwirkungen aus. Idealerweise werden als Rezeptoren ebenfalls haptenspezifische Antikörper eingesetzt, da diese die immun-chemischen Gegebenheiten am besten repräsentieren. Diese Tests können in Form klassischer Präzipitationstests oder Radio- bzw. Enzym-Immuno-Assays durchgeführt werden. In Ermangelung von Antikörpern können ersatzweise auch andere Rezeptoren wie z.B. geeignete Enzyme eingesetzt werden, die mit bekannter Affinität an das entsprechende Hapten binden, was z.B. eine bestimmte Enzymreaktion auslöst bzw. inhibiert.

10.2 Charakterisierung des GOD- bzw. des BSA-Lys-D-Ala-D-Ala-Konjugats

10.2.1 Chromatographischer Nachweis von D-Alanin in den BSA- bzw. GOD-N α -Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala-Konjugaten

Das verwendete Hapten (N α -Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala) weist keine chromophore Gruppe im Molekül auf, welche zur direkten Bestimmung der Kopplungsrate herangezogen werden könnte. Allerdings kann der Anteil an D-Alanin, der durch saure Hydrolyse aus dem Protein freigesetzt wird, zur Bestimmung der Kopplungsrate herangezogen werden, da D-Alanin als nicht-proteinogene Aminosäure in Proteinen eukaryotischer Organismen nicht anzutreffen ist. Zur chromatographischen Bestimmung des D-Alaninanteils im GOD- bzw. BSA- Lys-D-Ala-D-Ala- Konjugat wurde die bereits in Kap. 8.5.2 vorgestellte Hydrolyse- und Derivatvisierungsmethode nach CSAPÓ et al. [161] herangezogen.

Zusätzlich zu den beiden Konjugaten wurden in einem Kontrollexperiment auch die nativen Proteine unter den gleichen Bedingungen hydrolysiert (6 M HCl / 170 °C, 45 min) und die freigesetzten Aminosäuren mit o-Phthalaldehyd / 2,3,4,6-tetra-O-Acetyl-1-thio-β-D-Glucose zu den entsprechenden diastereomeren Derivaten von D- und L-Aminosäuren umgesetzt. Die HPLC-Trennung der Derivate erfolgte isokratisch an einer RP18-Phase mit Fluoreszenzdetektion. Die Chromatogramme sind in Abb. 10-1 dargestellt.

Ähnlich wie bei den unter 8.5.2 durchgeführten Untersuchungen, kam es trotz den speziell gewählten Hydrolysebedingungen zu einer geringfügigen Racemisierung des L-Alaninanteils. Für das native Rinderserumalbumin bzw. die native Glucoseoxidase wurde ein D-Alaninanteil von jeweils ca. 3 % (bezogen auf Gesamtalanin) festgestellt. Zwar konnten für die GOD- und BSA-Lys-D-Ala-D-Ala-Konjugate deutlich höhere D-Alaninhalte festgestellt werden, eine quantitative Auswertung wurde jedoch durch eine unzureichende Abtrennung von nicht näher identifizierten Begleitpeaks erschwert. Eine Abschätzung des proteingebundenen Lys-D-Ala-D-Ala-Haptens in den Konjugaten erfolgte auf Grundlage des natürlichen L-Alanin gehaltes in Glucoseoxidase (62 mol L-Alanin /mol Protein) bzw. Rinderserumalbumin (46 mol L-Alanin /mol Protein) [167, 168] und lag nach Abzug des als Artefakt der Hydrolyse gebildeten D-Alanins bei ca. 4 mol Tripeptid/mol Protein (GOD-Konjugat) bzw. 7 mol Tripeptid/mol Protein (BSA-Konjugat).

Neben analogen Experimenten zur Überprüfung des HRP-Lys-D-Ala-D-Ala-Konjugats und zur Absicherung der bisher gewonnenen Daten waren weitere Kontrollexperimente geplant, doch traten im weiteren Verlauf der HPLC-Untersuchungen von Proteinhydrolysaten zunehmend Störungen des chromatographischen Trennsystems auf, die zuvor bei den Untersuchungen der freien Peptide nicht beobachtet wurden (vergl. Kap. 8.5.2). Hierbei ist vor allem die drastische Abnahme der Trennleistung der verwendeten Trennsäule zu nennen. Zwar weisen CSAPÓ et al. [161] ebenfalls auf solche Störungen hin und empfehlen dringend die Verwendung von Vorsäulen und diverse Spülschritte des chromatographischen Systems, doch aufgrund der Tatsache, dass trotz dieser Maßnahmen die Trennsäule nach ca. 15 Injektionen der Proteinhydrolysate praktisch unbrauchbar war, wurden keine weiteren HPLC-Untersuchungen mehr durchgeführt.

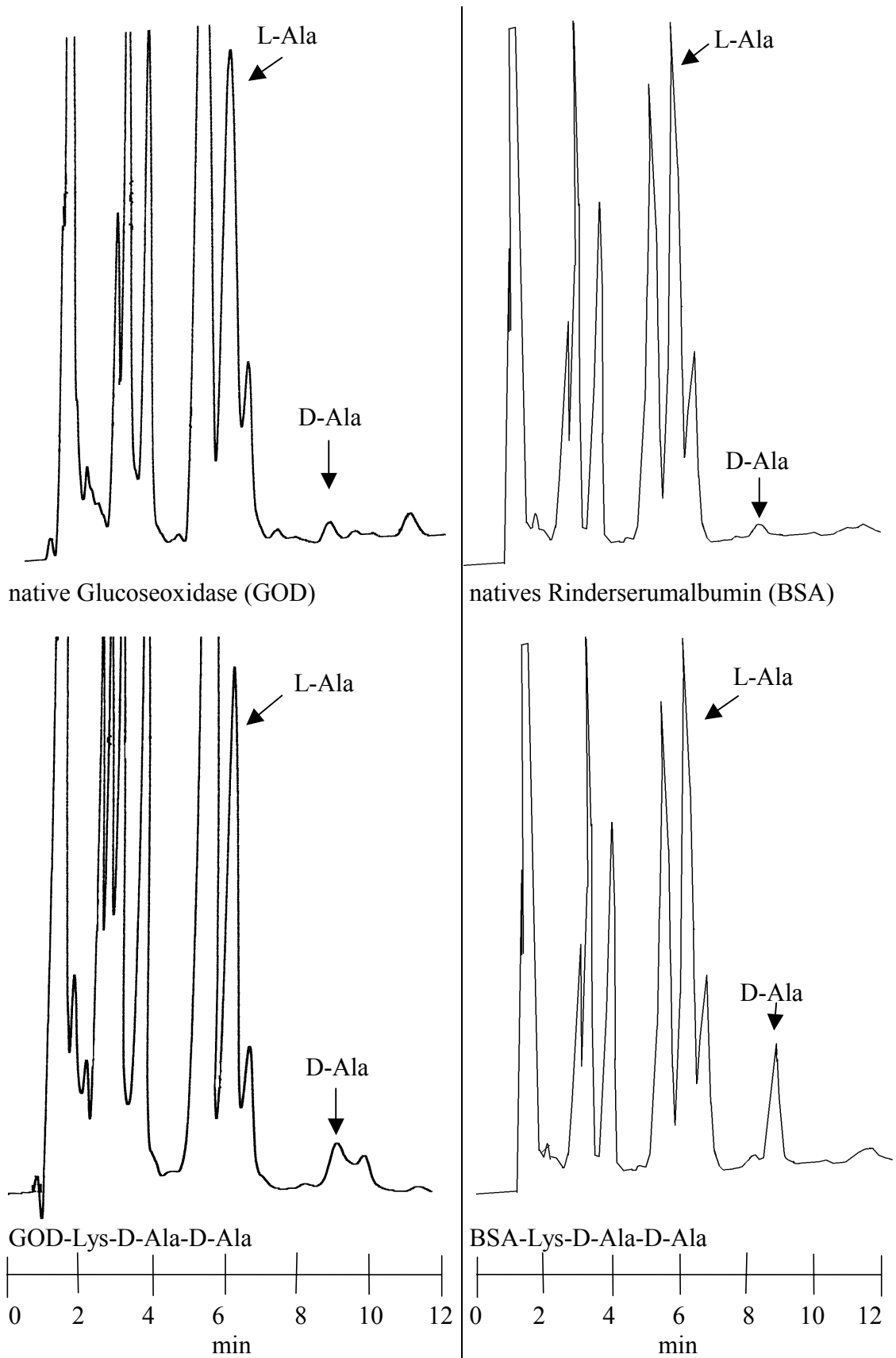


Abbildung 10-1: Ermittlung der Kopplungseffizienz von Lys-D-Ala-D-Ala an Glucoseoxidase (Periodattechnik) und Rinderserumalbumin (Glutardialdehydkopplung)

10.2.2 Nachweis von proteingebundenem *N*αAc-Lys-D-Ala-D-Ala im Vancomycin-Rezeptortest

Zur Bestimmung des proteingebundenen Tripeptids Lys-D-Ala-D-Ala wurde eine Variante des bereits beschriebenen Solid-Phase-Rezeptor-Assay auf Glykopeptidantibiotika nach CORTI et al. [115] herangezogen (vergl. Kap. 4.3). Im Gegensatz zu CORTI et al., die ein Meerrettichperoxidase-Teicoplanin-Konjugat einsetzten, wurde für die eigenen Untersuchungen das entsprechende Vancomycin-Konjugat verwendet (vergl. Kap. 9.2.2).

Diese Experimente sollten gleichzeitig zwei Fragestellungen beantworten. Zum einen sollten sie in Ergänzung zu den HPLC-Untersuchungen beweisen, dass das Lys-D-Ala-D-Ala-Hapten wirklich in biologisch aktiver Form an den entsprechenden Carrierproteinen gebunden war, zum anderen würde ein positiver Ausgang dieser Experimente gleichzeitig die erfolgreiche Synthese des Vancomycin-HRP-Konjugats beweisen (vergl. Kap. 9.2.1). Der Test wurde im Mikrotiterformat durchgeführt und hat Ähnlichkeiten mit dem Aufbau eines indirekten ELISA (vergl. Abb. 6-1). Der Ablauf dieses Assays ist schematisch in Abb. 10-3 dargestellt. Nach der Beschichtung der Platten mit dem zu überprüfenden BSA- bzw. GOD-Lys-D-Ala-D-Ala-Konjugat wurde eine Lösung mit dem Vancomycin-Meerrettichperoxidase-Konjugat zugeben und die Platte 2 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Waschschrift zur Entfernung der in Lösung gebliebenen Reagenzien wurden daraufhin die an das immobilisierte Lys-D-Ala-D-Ala gebundenen Vancomycin-Peroxidase-Konjugate enzymatisch nachgewiesen.

Der Detektionsreaktion (vergl. Abb. 10-2), welche durch die Meerrettichperoxidase katalysiert wird, liegt die Oxidation des farblosen 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidins (TMB) durch Wasserstoffperoxid zugrunde [175, 176]. Hierbei entstehen intermediär einfach geladene radikalische Kationen. Je zwei dieser einfach geladenen Kationen disproportionieren in ein zweifach geladenes Kation und ein ungeladenes TMB-Molekül. Unter den Bedingungen der Peroxidasereaktion, die in der Regel in einem pH-Bereich zwischen pH 3-8 durchgeführt wird, liegen beide Spezies gemeinsam in einem intensiv blau gefärbten Charge-Transfer-Komplex vor. Üblicherweise wird in ELISA- und Rezeptortestverfahren mit Peroxidase-markierten Molekülen vor der photometrischen Messung die Enzymreaktion durch Zugabe von 1 mol/l Schwefelsäure abgebrochen, was gleichzeitig zu einer Absenkung des pH-Wertes auf pH < 1 führt. Unter diesen Bedingungen dissoziiert der Komplex in ein farbloses TMB-Molekül und das intensiv gelb-gefärbte zweifach geladene Kation mit einem Absorptionsmaximum bei 450 nm.

Die photometrische Messung des Substratumsatzes erfolgt also letztendlich über die Bestimmung der Konzentration des zweifach geladenen Kations.

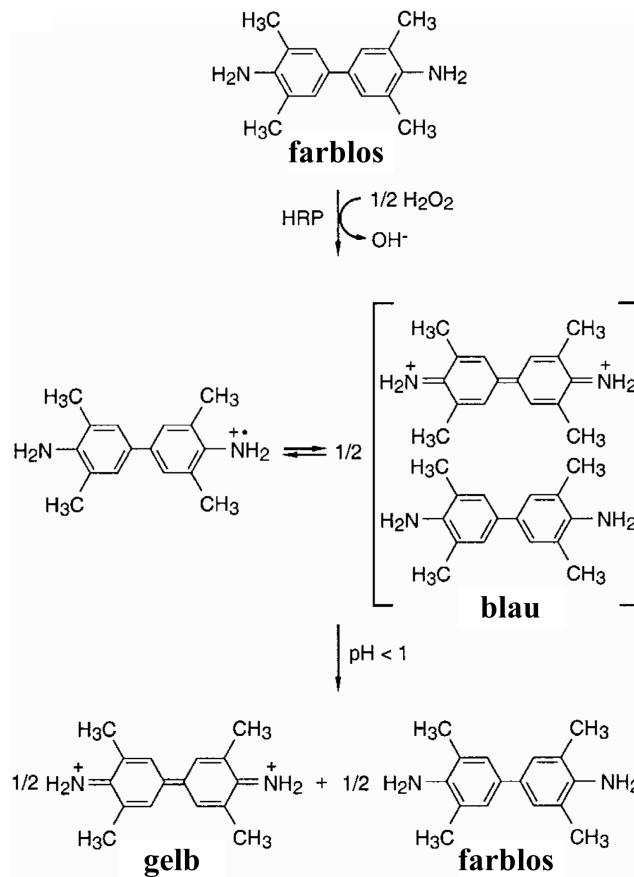
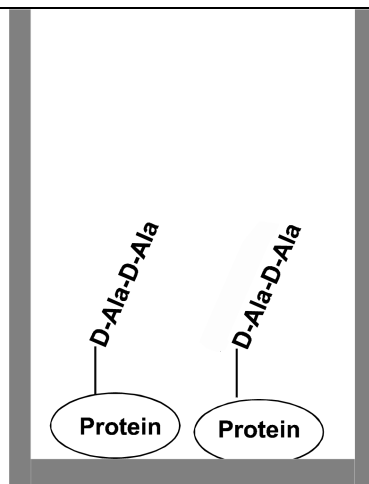


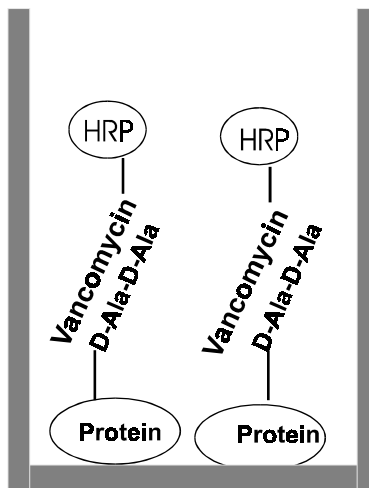
Abbildung 10-2: Oxidation von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin durch Wasserstoffperoxid und Meerrettichperoxidase (HRP) [176]

Die im vorigen Kap. 10.2. beschriebenen HPLC-Untersuchungen zum D-Alanin-Gehalt in den Konjugaten weisen auf einen höheren Lys-D-Ala-D-Ala-Haptenanteil im BSA-Lys-D-Ala-D-Ala-Konjugat als im GOD-Konjugat hin. Daher wurden erste orientierende Experimente mit dem BSA-Konjugat durchgeführt.

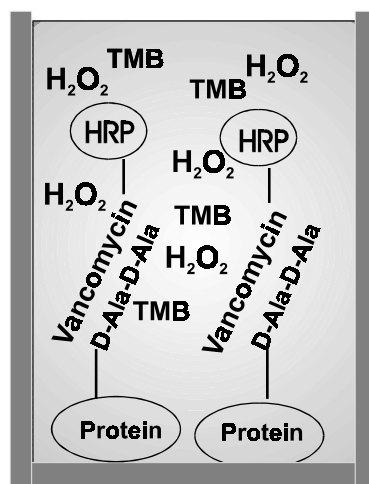
Eine erfolgreiche Durchführung des Rezeptor-Assay gelang jedoch erst, nachdem das dialysierte Vancomycin-Konjugat einen weiteren Aufreinigungsschritt mittels Ultrafiltration (MWCO 30 kDa) durchlaufen hatte. Freies Vancomycin (molare Masse 1490 g/mol) wurde allein durch Dialyse (MWCO 12-19 kDa) der Reaktionsansätze offensichtlich nicht in ausreichendem Maße entfernt und störte später kompetitiv die Bindung des Vancomycin-Konjugats an das Festphasen-gebundene N α Ac-Lys-D-Ala-D-Ala.



Beschichtung der Mikrotiterplatten mit dem Protein/D-Ala-D-Ala-Konjugat



Zugabe von Peroxidase-markiertem Vancomycin (und gegebenenfalls Kompetitor)



Nachweis spezifisch gebundenen enzymmarkierten Vancomycins mittels Enzymreaktion

Abbildung 10-3: Ablauf des Solid-Phase-Enzyme-Rezeptor-Assay (SPERA) auf Glykopeptidantibiotika

In Abbildung 10-4 ist eine Titrationskurve für steigende Vancomycin-HRP-Konzentrationen bei einer konstanten Menge an Festphasen-gebundenem BSA-Lys-D-Ala-D-Ala dargestellt.

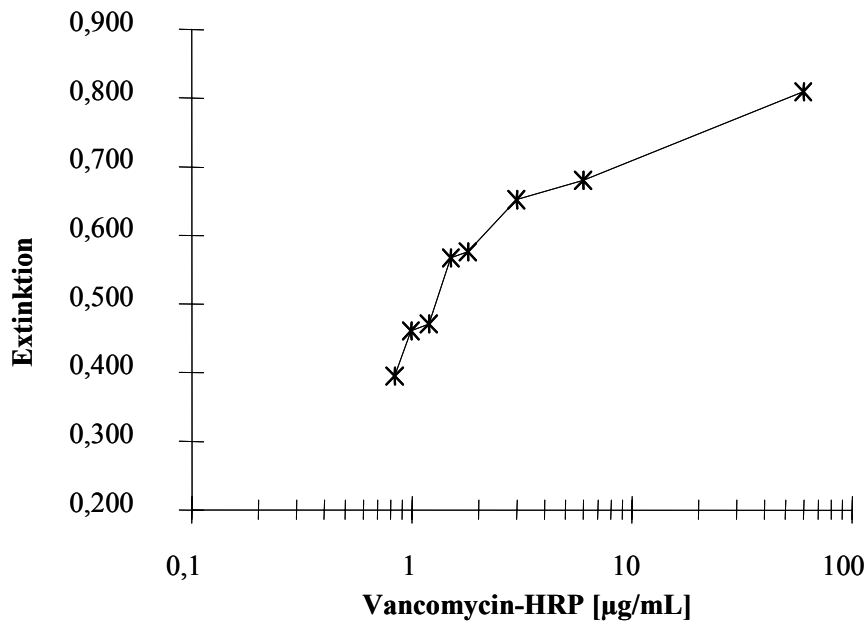


Abbildung 10-4: Bindung des Vancomycin-Konjugats an festphasengebundenen BSA-Lys-D-Ala-D-Ala (1 µg/Kavität)

Diese Titrationskurve zeigt die Bindung des Vancomycin-Konjugats an das Festphasengebundene BSA-Lys-D-Ala-D-Ala. Je mehr Vancomycin-Konjugat zugegeben wird, desto mehr wird an das immobilisierte BSA-Lys-D-Ala-D-Ala-Konjugat gebunden. Kontrollexperimente mit einem Überschuss entweder von freiem Vancomycin oder freiem N α Ac-Lys-D-Ala-D-Ala (je 100 µg/ml) führten zu einer nahezu vollständigen kompetitiven Unterdrückung der Bindung des Vancomycin-Meerrettichperoxidase Konjugats an das immobilisierte BSA-Lys-D-Ala-D-Ala. Dies kann als Hinweis der Spezifität der Bindung des Vancomycin-HRP-Konjugats an das BSA-Lys-D-Ala-D-Ala Konjugat angesehen werden und bestätigt zusammen mit den Ergebnissen aus den HPLC-Experimenten die erfolgreiche Synthese des BSA-Lys-D-Ala-D-Ala-Konjugats. Darüber hinaus kann das verwendete Rezeptortestsystem im übertragenen Sinne als „Probelauf“ für das spätere Screening von Lys-D-Ala-D-Ala spezifischen Antiseren im indirekten ELISA angesehen werden.

Besondere Bedeutung hat der Rezeptortest für die Charakterisierung des Glucoseoxidase-Lys-D-Ala-D-Ala-Konjugats, welches als Immunogen für die Erstimmunisierung zur Gewinnung der gewünschten Antikörper verwendet werden sollte.

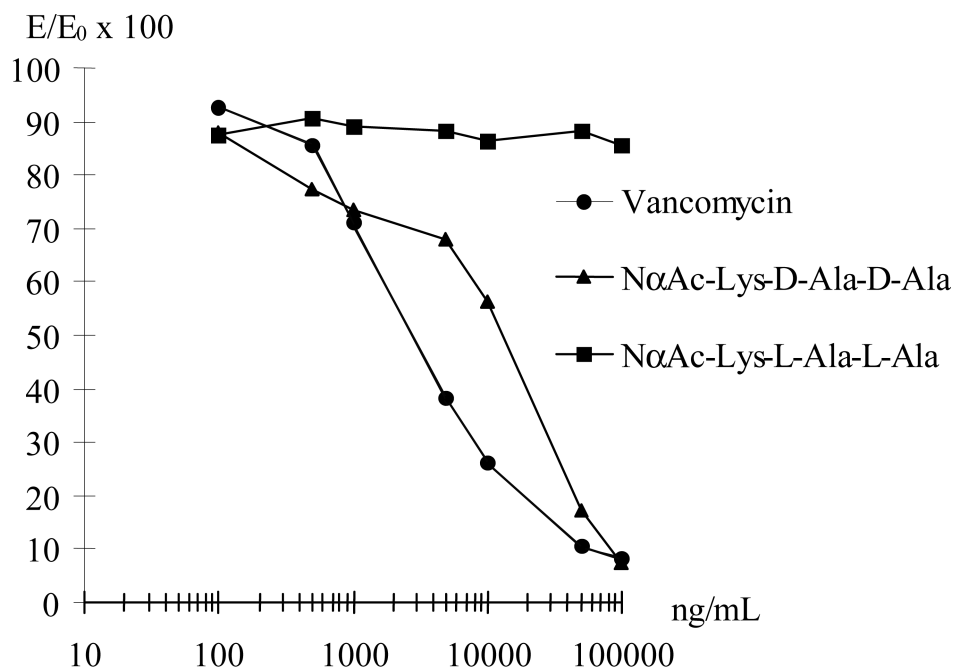
Zur Durchführung dieses Tests wurden Mikrotiterplatten mit dem GOD-Lys-D-Ala-D-Ala-Konjugat beschichtet.

Neben dem Nachweis der Bindung des Vancomycin-Konjugats an das GOD-Lys-D-Ala-D-Ala-Konjugat wurden, analog dem oben beschriebenen Testsystem auch Titrationskurven mit verschiedenen Kompetitorverdünnungen aufgenommen. Dabei wurde die Menge an Vancomycin-Konjugat konstant gehalten.

Aufgrund der Erfahrungen bei der Verwendung des BSA-Konjugats erschien eine Vancomycin-Konjugat-Konzentration von ca. 50 µg/ml sinnvoll, die ohne Kompetitor zu einem gut auswertbaren Messsignal ($E = 0,75-0,8$) führen sollte.

Abbildung 10-5 zeigt den Verlauf der Standardkurven für das GOD-Lys-D-Ala-D-Ala-Konjugat. Wie für das BSA-Lys-D-Ala-D-Ala-Konjugat konnte auch für das GOD-Konjugat eine deutliche Wechselwirkung mit Vancomycin-HRP festgestellt werden.

Freies Vancomycin sowie freies $N\alpha$ -Ac-Lys-D-Ala-D-Ala führten zu einer deutlichen Hemmung der Wechselwirkung des Festphasen-gebundenen GOD-Lys-D-Ala-D-Ala-Konjugats mit dem Vancomycin-HRP-Konjugat. Um eine unspezifische Hemmung des Testsystems auszuschließen, wurde in einem Kontrollexperiment das diastereomere $N\alpha$ -Acetyl-Lysin-L-Alanyl-L-Alanin als Kompetitor eingesetzt, da dieses keine Wechselwirkungen mit Glykopeptidantibiotika eingeht (vergl. Kap. 8.5.4). Entsprechend den Erwartungen führte dieses Diastereomer auch in hohen Konzentrationen zu keiner Hemmung des Testsystems.



**Abbildung 10-5: Standardkurven (Kompetitionsexperiment) mit GOD-Lys-D-Ala-D-Ala-Konjugat (Festphasenantigen, 1 µg/Kavität) und dem Vancomycin-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat (50 µg/ml). (100 % relative Extinktion: $E = \text{ca. } 0,45$ Einheiten)
Kompetitoren: Vancomycin, $N\alpha$ -Ac-Lys-D-Ala-D-Ala, $N\alpha$ -Ac-Lys-L-Ala-L-Ala**

Somit bestätigte der Rezeptortest auch in diesem Fall die erfolgreiche Synthese des GOD-Lys-D-Ala-D-Ala-Konjugats und zeigt darüber hinaus, dass das N α -Ac-Lys-D-Ala-D-Ala in genügendem Maße sterisch zugänglich am Protein gebunden ist.

An dieser Stelle soll daraufhin gewiesen werden, dass mit der angegebenen Verdünnung von 50 μ g/ml Vancomycin-Konjugat die erwartete Extinktion von ca. 0,7-0,8 Einheiten für die ohne Kompetitor ablaufende Reaktion mit GOD-Lys-D-Ala-D-Ala (ca. 0,45 Einheiten) nicht erreicht wurde. Ursache hierfür könnte sein, dass im Vergleich zum BSA-Konjugat für das GOD-Konjugat eine geringere Kopplungsrate erzielt wurde, was mit den HPLC-Ergebnissen korrelieren würde. Zum anderen könnte für diesen Effekt verantwortlich sein, dass von den Mikrotiterplatten eine geringere Menge Proteinkonjugat gebunden wurde, da die Ausbeute bei der Immobilisierung auch von der Natur des Proteins beeinflusst werden kann [140].

10.3 Charakterisierung des Glucoseoxidase-Ampicillin-Konjugats

10.3.1 Einsatz des GOD-Ampicillin-Konjugats als Beschichtungsantigen im indirekten Penicillin-ELISA

Zur Charakterisierung des Ampicillin-Glucoseoxidase-Konjugates wurde dieses als Festphasenantigen in einem indirekten Penicillin-ELISA-Test eingesetzt. Das zu diesem Zweck verwendete anti-Ampicillin-Antiserum wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Ewald Usleber zur Verfügung gestellt. Dieses Antiserum zeichnet sich durch seine hohe Spezifität gegenüber intaktem Penicillin aus und zeigt nur eine geringe Kreuzreaktion gegenüber hydrolysiertem Penicillin [129]. Der prinzipielle Testablauf des indirekten ELISA ist in Abbildung 10-7 dargestellt; Aufbau und Durchführung des Tests orientierten sich an den von MÄRTLBAUER [145] beschriebenen Bedingungen.

Vor der Testdurchführung wurden die Mikrotiterplatten mit verschiedenen Verdünnungsstufen des GOD-Ampicillin-Konjugats beschichtet. Aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit des β -Lactamsystems der Penicilline wurde die Beschichtung nicht, wie sonst standardmäßig üblich, unter alkalischen Bedingungen (Carbonatpuffer pH 9,5) sondern bei leicht-saurem pH-Wert (PBS, pH 6,5) durchgeführt, da unter diesen Bedingungen Ampicillin wesentlich stabiler ist (vergl. Bedingungen der Konjugatsynthese Kap. 9.2.1).

Die Spezifität der Bindung der anti-Ampicillin-Antikörper an das Protein-gebundene Ampicillin wurde in einem Konkurrenzexperiment mit freiem Ampicillin abgesichert.

Der Verlauf des mit diesem Testsystem erhaltenen Kurvenverlaufs für die verschiedenen Mengen an GOD-Ampicillin zeigt deutlich die Bindung des anti-Ampicillin-Antiserums an das Beschichtungsantigen (Abb. 10-6).

Freies Ampicillin (1000 ng/ml) führt zu einer deutlichen Herabsetzung der Wechselwirkung, die bei einer Menge an Beschichtungsantigen oberhalb 100 ng/Kavität in einer Größenordnung von ca. 50 % lag. Aufgrund dieser Ergebnisse kann von einer erfolgreichen Kopplung von Ampicillin an Glucoseoxidase ausgegangen werden. Da das verwendete Antiserum allerdings auch eine geringe Kreuzreaktivität gegenüber hydrolysiertem Ampicillin aufweist, können allein anhand dieses Experiments keine Aussagen darüber getroffen werden, ob das proteingebundene Ampicillin tatsächlich noch in intakter Form vorliegt.

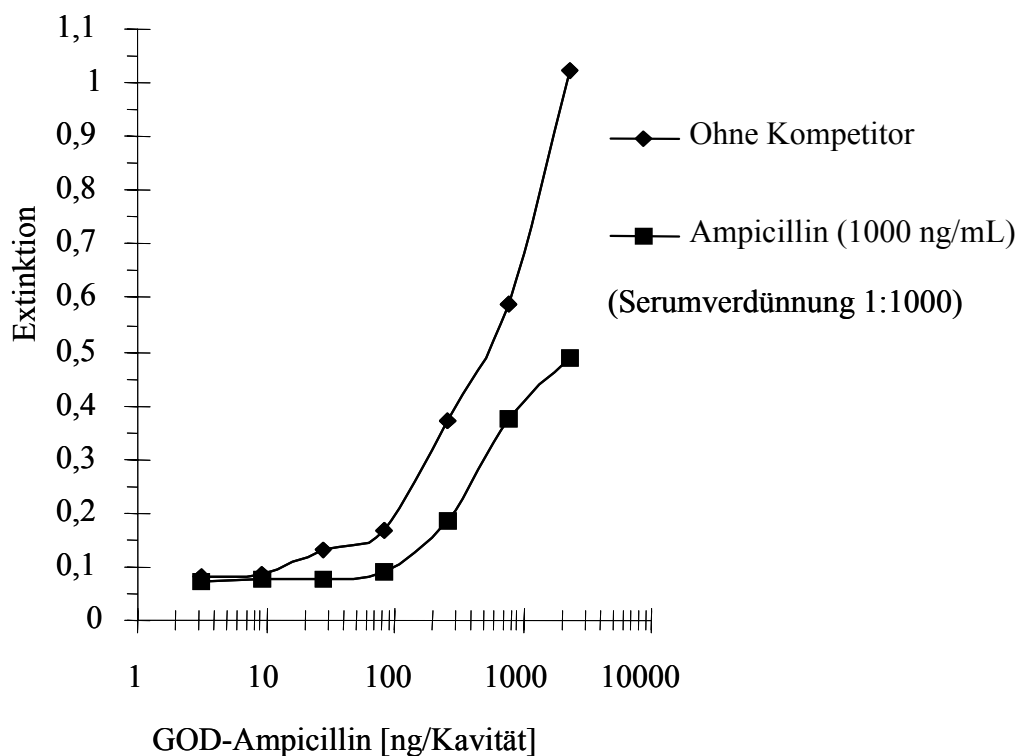
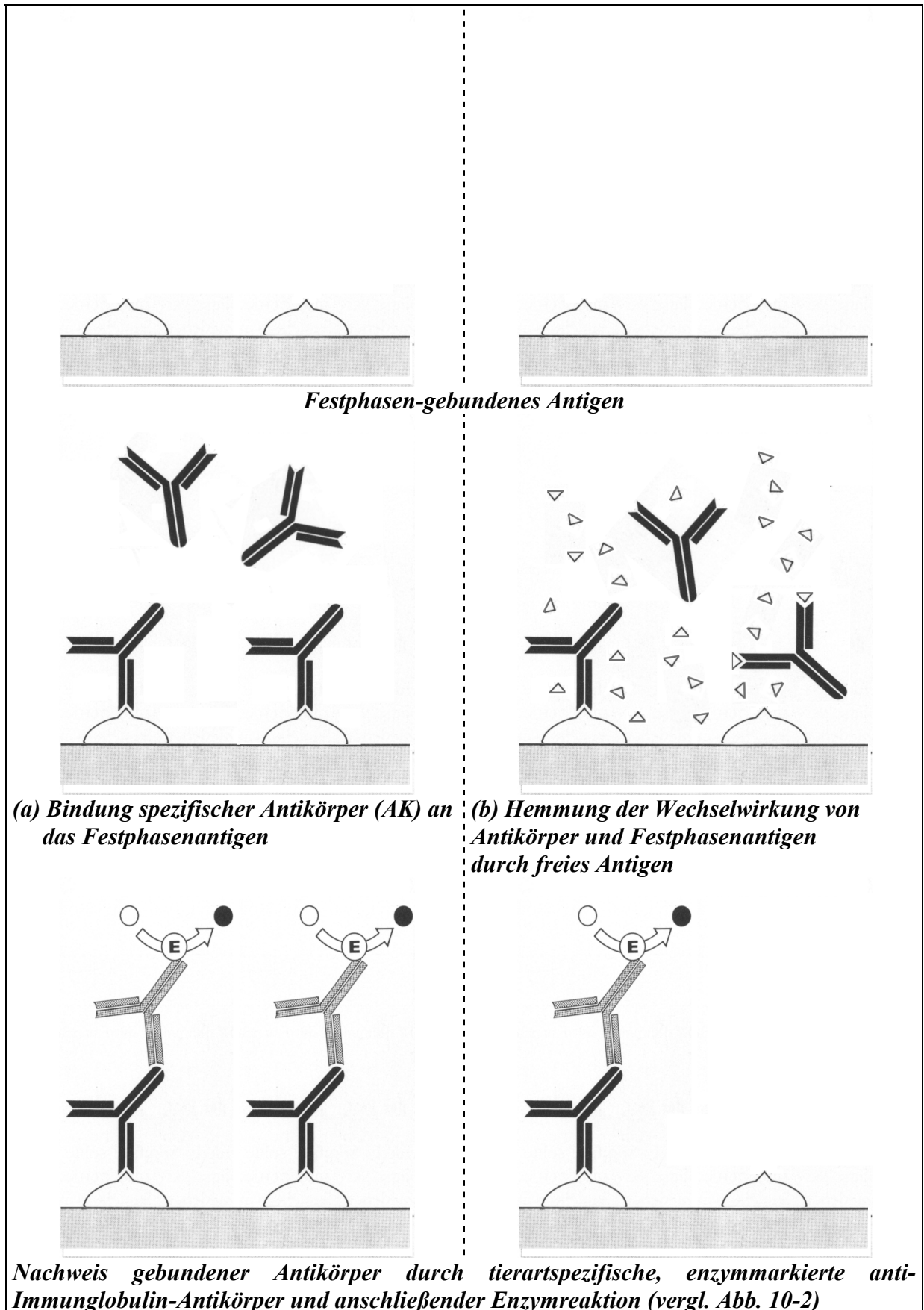


Abbildung 10-6: Überprüfung des GOD-Ampicillin-Konjugates (1 μ g/Kavität) im indirekten Penicillin-ELISA, Anti-Ampicillin-Antiserum



(a) Bindung spezifischer Antikörper (AK) an das Festphasenantigen

(b) Hemmung der Wechselwirkung von Antikörper und Festphasenantigen durch freies Antigen

Nachweis gebundener Antikörper durch tierartspezifische, enzymmarkierte anti-Immunglobulin-Antikörper und anschließender Enzymreaktion (vergl. Abb. 10-2)

Abbildung 10-7: Ablauf des indirekten ELISA (links ohne, rechts mit Kompetitoren)

10.3.2 Einsatz des Ampicillin-GOD-Konjugates im PENZYME-TEST

Der PENZYME-TEST [112] wurde bereits in Kap. 4.2 als Rezeptortest zum Nachweis von β -Lactamantibiotika vorgestellt und beruht auf der Hemmung der Hydrolyse von D-Alanyl-D-Alanin durch D,D-Carboxypeptidasen in Gegenwart von Penicillinen. Der Test ist spezifisch für intakte Penicilline bzw. den intakten β -Lactamring. Experimente des Testherstellers zeigten, dass der PENZYME-TEST auch zur Detektion von intaktem Penicillin in Protein-Konjugaten geeignet ist. Allerdings soll der Test für diesen Fall nur zu rein qualitativen Aussagen genutzt werden, da nicht geklärt ist, ob Protein-gebundene Penicilline von der D,D-Carboxypeptidase mit gleicher Aktivität wie die freien Antibiotika umgesetzt werden [173].

In eigenen Experimenten sollte mit diesem Test qualitativ das Vorhandensein des intakten β -Lactamrings im Ampicillin-GOD-Konjugat abgesichert werden, wobei diese Experimente nicht ausschließen konnten, dass neben intaktem Penicillin auch die Penicilloyllderivate vorliegen können.

Dazu wurde nach jedem der Dialyseschritte, welche zur Abtrennung von überschüssigem bzw. ungebundenem Ampicillin aus der Konjugatlösung notwendig waren, sowohl die Konjugatlösung (Retenat) als auch der verwendete Dialysepuffer (Dialysat) im Penzymtest eingesetzt. Die Durchführung bezüglich Temperatur und Reaktionszeiten entsprach den Vorgaben des Testherstellers. Tabelle 10-1 fasst die Testergebnisse zusammen. Nach der ersten Dialyse (12 h / 5 L PBS) war sowohl für das unverdünnte Retenat als auch für das unverdünnte Dialysat eine eindeutige Hemmung festzustellen. Während das Dialysat nach einer Verdünnung von 1:100 keine Hemmung mehr zeigte, führte das Retenat auch in einer Verdünnung von 1:500 zu einer deutlichen Hemmung. Dies bedeutet, dass am Konjugat tatsächlich intaktes Ampicillin gebunden war. Allerdings konnte nicht ausgeschlossen werden, dass sich bedingt durch eine unvollständige Gleichgewichtseinstellung, noch deutlich mehr freies Ampicillin als erwartet im Retenat befinden und Protein-gebundenes Ampicillin vortäuschen könnte. Aus diesem Grund wurden noch zwei weitere Dialysen in gleicher Weise durchgeführt. Tatsächlich ließ sich nach der zweiten und dritten Dialyse nur noch mit einer 1:10 Verdünnung des Retenats eine Hemmung des Testsystems erzielen.

Insbesondere aber nach der dritten Dialyse konnte das Vorhandensein von freiem Ampicillin im Retenat praktisch ausgeschlossen werden. Daher war die mit dem Retenat erzielte Hemmung des Testsystems ausschließlich auf proteingebundenes Ampicillin zurückzuführen. Diese Ergebnisse beweisen, dass tatsächlich ein Teil des Protein-gebundenen Ampicillins in intakter Form vorliegen muss und für Rezeptorproteine (Antikörper, D,D-Carboxypeptidasen) zugänglich ist.

Dialyseschritt	Verdünnung	Testergebnis			
		Retenat		Dialysat	
		8 min*	15 min	8 min	15 min
1. Dialyse	unverdünnt	+	+	+	+
	1:100	+	+	-	-
	1:500	+	+		
	1:1000	-	-		
2. Dialyse	unverdünnt	+	+	-	-
	1:10	+	+		
	1:100	-	-		
3. Dialyse	unverdünnt	+	+		
	1:10	+	+		
	1:50	-	-		
Kontrolle: native GOD	ca. 1mg/ml	-	-		

Tabelle 10-1: Untersuchung von Retenaten und Dialysaten im Penzymtest (+ = positives, - = negatives Testergebnis)

***Vom Hersteller vorgegebene Inkubationszeiten bis zur 1. Ablesung des Testergebnisses (8 min), gefolgt von einer zweiten Ablesung 7 min später (15 min)**

11 Immunisierung und Gewinnung spezifischer Antisera

11.1 Immunisierung

Drei weibliche Kaninchen der Rasse Chinchilla Bastard sollten mit dem GOD-N α -Lys-D-Ala-D-Ala-Konjugat grundimmunisiert und im weiteren Verlauf mit dem GOD-Ampicillin-Konjugat "restimuliert" werden. Tierhaltung, Entwurf des Immunisierungsschemas, Immunisierung und Überwachung des Titerverlaufs erfolgten in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. E. Usleber und Frau M. Straka, Ludwig-Maximilians-Universität München, Veterinärmedizinische Fakultät.

Zur Grundimmunisierung wurde das GOD-N α -Lys-D-Ala-D-Ala-Immunogen mit sterilem dest. Wasser auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt und mit komplettem Freund'schen Adjuvans¹ in einem Volumenverhältnis von 1 + 3 emulgiert. Pro Tier wurden etwa 500 μ g Protein in 2 ml Emulsion intracutan auf ca. 20 Stellen am Rücken verteilt appliziert.

In der 14. Woche nach der Grundimmunisierung wurde bei allen Tieren eine „Restimulierung“ mit dem GOD-Ampicillin-Konjugat durchgeführt, um die Ausrichtung der Immunantwort gegenüber den gemeinsamen Strukturmerkmalen von D-Ala-D-Ala und dem Penicillingerüst zu forcieren (vergl. Kap. 6.1). Die Durchführung der Restimulierung mit dem Ampicillin-Konjugat erfolgte analog der Vorgehensweise bei der Erstimmunisierung, mit dem Unterschied, dass das Immunogen nun intramuskulär appliziert wurde.

11.2 Serumgewinnung

Allen Tieren wurde erstmalig in der sechsten Woche nach der Grundimmunisierung und dann in zweiwöchigem Abstand jeweils bis zu 10 ml Blut entnommen. Durch Zentrifugation wurde das Blut in zelluläre Bestandteile und Serum getrennt und letzteres ohne weitere Aufarbeitung bei -18 °C gelagert.

¹ Adjuvans (lat. Adiuvare unterstützen, helfen) in der Immunchemie die Bezeichnung für eine Substanz, die bei gemeinsamer Injektion mit einem Antigen die Antwort des Immunsystems unspezifisch verstärkt. Freund'sches Adjuvans enthält Aluminiumverbindungen und Mineralöle (= inkomplettes Freund'sches Adjuvans) sowie zusätzlich inaktivierte Mykobakterien (= komplettes Freund'sches Adjuvans)

11.3 Überwachung des Immunisierungsverlaufs (Titerbestimmung)

11.3.1 Methodik zur Ermittlung des Serumtiters

In der Immunologie wird der Begriff „Serumtiter“ in der Regel mit dem Zahlwert der Verdünnungsstufe eines Antiserums gleichgesetzt, welches in einem gegebenen Testsystem mit einer konstanten Menge an Antigen zur Bildung einer eben noch sicher nachzuweisenden Menge an Antikörper/Antigen-Komplexen führt. Bei konstanter Menge an Antigen ist die Menge der im Zuge einer Gleichgewichtsreaktion gebildeten Antikörper/Antigen Komplexe abhängig von der Affinität eines Antikörpers zu seinem Antigen, welche sich durch die Dissoziationskonstante (K_d) beschreiben lässt, sowie der Konzentration in welcher der betreffende Antikörper vorliegt $[Ak]$ (Gleichungen 11-1 bis 11-3).

Antikörper/Antigen-Reaktion :

Gleichung 11-1



Dissoziationskonstante:

$$K_d = \frac{[Ak]_{frei} \cdot [Ag]_{frei}}{[AkAg]}$$

Gleichung 11-2

Konzentration Antikörper/Antigen-Komplex:

Gleichung 11-3

$$[AkAg] = \frac{[Ak]_{frei} \cdot [Ag]_{frei}}{K_d}$$

Anders als bei monoklonalen Antikörpern setzt sich die Gesamtpopulation an (spezifischen) Serumantikörpern aus einer Reihe von Immunglobulinen unterschiedlicher Affinitäten und Konzentrationen zusammen. Daher können hohe Serentiter sowohl durch eine geringe Konzentration hochaffiner Antikörper als auch durch eine hohe Konzentration von Antikörpern mit geringer Affinität zustandekommen. Der Titer erlaubt noch keine Aussagen über die tatsächliche Brauchbarkeit der Seren für die beabsichtigte Zweckbestimmung, ist aber ein wertvolles Hilfsmittel um die Immunantwort zu verfolgen bzw. erste Anhaltspunkte für eine erfolgreiche Immunisierung zu erhalten.

Titerbestimmung in ELISA-Techniken

Bei der Ermittlung des Titers mittels ELISA-Techniken können die gebildeten Antikörper/Antigen-Komplexe je nach Technik entweder direkt über die Menge von gebundenem enzymmarkierten Antigen (direkter ELISA: auf Festphase immobilisierte Serumantikörper) oder indirekt über die Menge der spezifisch gebundenen Antikörper nach Inkubation mit einem enzymmarkierten Sekundärantikörper nachgewiesen werden (indirekter ELISA: auf Festphase immobilisiertes Antigen z.B. BSA-Lys-D-Ala-D-Ala).

Unter der Voraussetzung, dass enzymmarkiertes Antigen bzw. Festphasenantigen $[Ag^*]$ im Überschuss vorliegen und ein linearer Zusammenhang zwischen gebundener Enzymmenge und gemessener Extinktion besteht, gilt in beiden ELISA-Techniken für einen engen Konzentrationsbereich eine proportionale Abhängigkeit zwischen Antikörperkonzentration (bzw. Serumverdünnung) und der gemessenen Extinktion.

$$[E] \sim [AkAg^*] \text{ bzw. } E \sim [Ak] \qquad \text{Gleichung 11-4}$$

(mit $[Ag^*] \gg [Ak]$ sowie $[Ag^*] = \text{konstant}$)

Da die absolute Zahl der gebildeten Antikörper/Antigen-Komplexe im ELISA nicht ohne weiteres bestimmt werden kann, wird als Bezugsgröße eine Extinktion definiert, bei welcher der sichere Nachweis einer Antikörper/Antigen-Wechselwirkung geführt werden kann. So definiert MÄRTLBAUER als Bezugspunkt für den Serumtiter i.d.R. die Serumverdünnung welche im Test zu einer Extinktion von 0,3 Einheiten führt [145].

Die Vergleichbarkeit von Titern unterschiedlicher Seren ist aber nur gewährleistet, wenn stets alle Bedingungen wie Aufbau des Testsystems (indirekt / direkt), Inkubationszeiten, Temperatur etc. streng konstant gehalten werden. Es erwies sich als vorteilhaft, wenn die zu vergleichenden Seren nebeneinander, d.h. gemeinsam auf einer einzigen Mikrotiterplatte untersucht wurden, da nur so die Konstanz der Randbedingungen tatsächlich gewährleistet ist.

Double Antibody Solid Phase -Technik

Die Serentiter wurden mit der in Abb. 11-1 dargestellten „Double Antibody Solid Phase“-Technik (DASP-Technik) nach MÄRTLBAUER [145] unter Verwendung des Meerrettichperoxidase-Lys-D-Ala-D-Ala-Konjugats durchgeführt. Die DASP-Technik stellt eine Modifikation des direkten ELISA dar, beruht also auf der Komplexbildung eines immobilisierten Antikörpers mit einem enzymmarkierten Antigen.

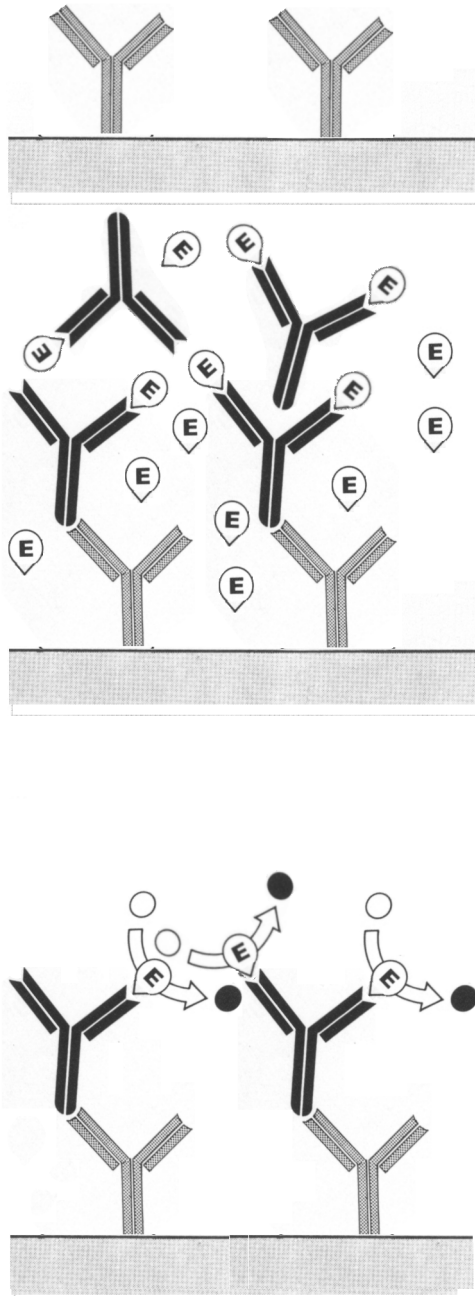
Die Immobilisierung der Serumantikörper erfolgt hierbei über einen tierartsspezifischen anti-Immunglobulin-Antikörper, mit dem vor der Testdurchführung die Kavitäten der Mikrotiterplatten beschichtet werden. Er bindet nach Zugabe des Serums alle darin enthaltenen Immunglobuline, d.h. neben den nachzuweisenden spezifischen Antikörpern auch unspezifische Antikörper, wobei letztere bis zu 90% der Gesamt-Antikörperkonzentration im Serum ausmachen können. Auf diese Weise entstehen die Festphasen-gebundenen „Double-Antibody“-Komplexe, aus denen sich der Name dieses Testsystems ableitet. Die DASP-Technik ermöglicht den Einsatz der rohen Antiseren im direkten ELISA, da Begleitproteine des Serums nicht gebunden werden sondern ausschließlich die Immunglobuline.¹

Die Verwendung der rohen Seren ist zwar auch bei Anwendung des indirekten ELISA möglich, bei dem eine Selektion spezifischer Serumantikörper durch das Festphasen-gebundene Antigen erfolgt (vergl. Abb. 9-6). Der Nachweis der gebundenen Antigen-spezifischen Antikörper erfolgt hierbei zeitlich getrennt von der Antikörper/Antigen-Reaktion durch Zugabe eines weiteren enzymmarkierten, tierartsspezifischen Antikörpers und erfordert somit einen zusätzlichen Arbeitsschritt.

Die DASP-Technik bietet des Weiteren den Vorteil der simultanen Testdurchführung, d.h. sowohl das rohe Serum, enzymmarkiertes Antigen als auch Kompetitoren können gemeinsam (simultan) in die beschichteten Kavitäten pipettiert werden. Nach geeigneter Inkubationszeit und einem Waschschrift kann die Menge des spezifisch gebundenen enzymmarkierten Antigens durch Zugabe des Enzymsubstrats direkt detektiert werden.

Bei allen ELISA-Techniken können Kreuzreaktivitäten der Serumantikörper, z.B. gegen bestimmte Epitope des Carrierproteins bzw. Enzyms oder des Spacers zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Aus diesem Grund muss die Spezifität der getesteten Antikörper stets durch Konkurrenzexperimente mit dem freien Hapten abgesichert werden. Erst wenn sich durch freies Hapten eine deutliche Herabsetzung der Antikörper/Antigen-Reaktion erzielen lässt, kann von einer Hapten-spezifischen Immunreaktion ausgegangen werden.

¹ Mikrotiterplatten haben nur eine relative geringe Bindekapazität für Proteine. Aus diesem Grund sollten rohe Seren nicht unmittelbar zur Beschichtung eingesetzt werden, da Begleitproteine zu einer verringerten Adsorption von Immunglobulinen führen können. Allerdings lassen sich Immunglobuline bereits durch eine Ammoniumsulfat-Fällung weitgehend von störenden Begleitproteinen befreien



Immobilisierung von tierartspezifischen Antikörpern:

Auf einer Festphase (z.B. Reaktionsgefäß einer Polystyrol-Mikrotiterplatte) immobilisierte tierartspezifische anti-Immunglobulin-Antikörpern (z.B. anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus Ziege)

Testdurchführung:

Simultane Zugabe von spezifischem Antiserum (hier: Kaninchenserum) und enzymmarkiertem Antigen. Die spezifischen Antikörper (hier: IgG) binden an das enzymmarkierte Antigen und werden gleichzeitig selbst von den immobilisierten anti-Kaninchen-IgG-Antikörpern gebunden. (nicht dargestellt sind unspezifische Antikörper (IgG), die i.d.R. ein Vielfaches der spezifischen Antikörper ausmachen und ebenfalls von den immobilisierten Antikörpern gebunden werden, jedoch nicht an das markierte Antigen binden)

Nachweis der gebundenen spezifischen Antikörper:

Die von den immobilisierten tierart-spezifischen Antikörpern gebundenen spezifischen Serumantikörper werden nach einem Waschschriff und Zugabe von Enzymsubstrat direkt über die Menge an gebundenem enzymmarkiertem Antigen bestimmt. Unter der Voraussetzung, dass die Konzentration an markiertem Antigen stets konstant gehalten wird, hängt der gemessene Substratumsatz nur von der Konzentration der spezifischen Antikörper und ihrer Affinität zum markierten Antigen ab.

Abbildung 11-1: Titerbestimmung im direkten ELISA (DASP-Technik) nach Märtilbauer [145]

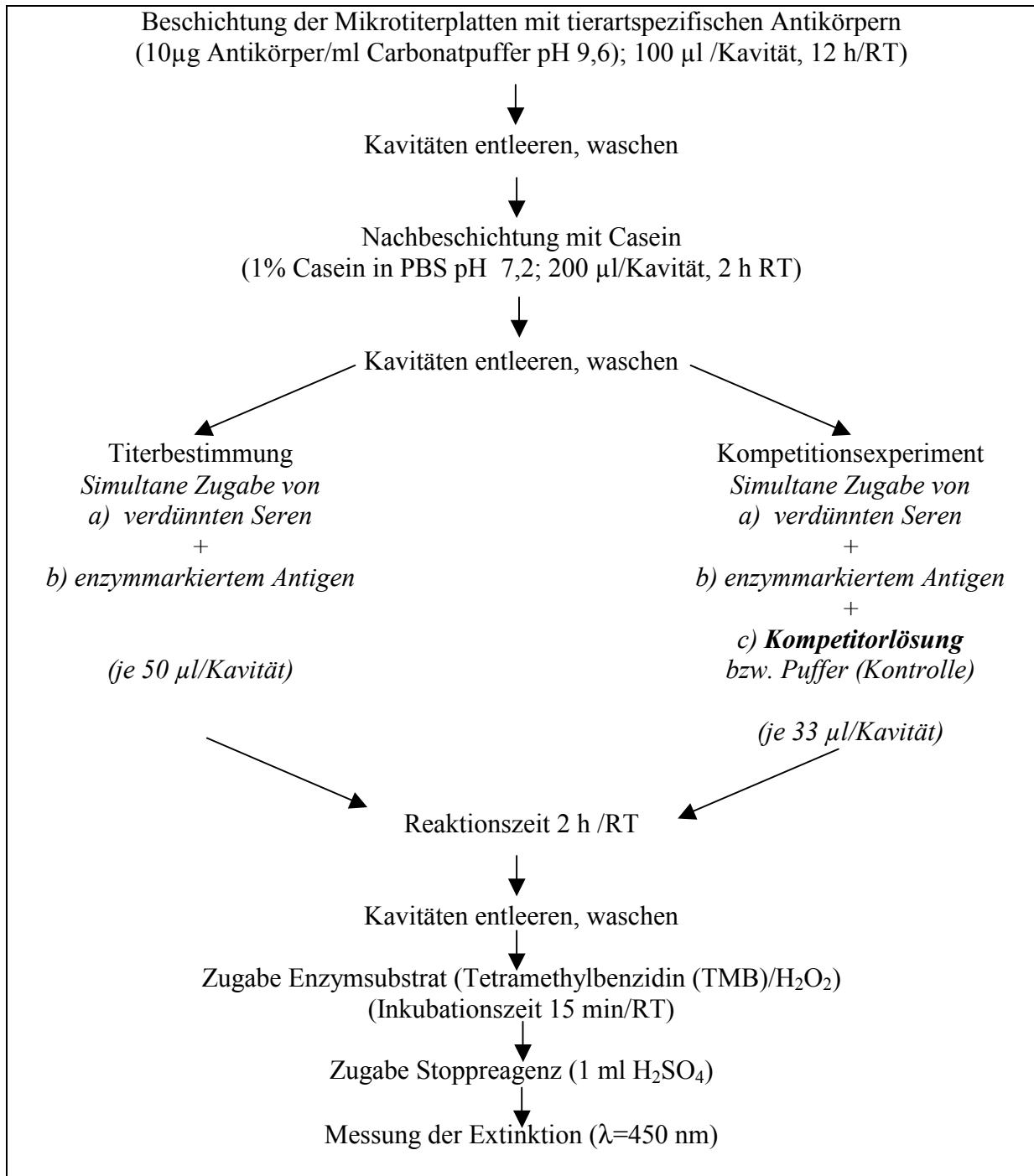


Abbildung 11-2: Durchführung der Titerbestimmung bzw. der Kompetitionsexperimente mittels DASP-Technik (direkter ELISA)

11.3.2 Zeitlicher Verlauf der Serentiter

Der mit der DASP-Technik ermittelte zeitliche Verlauf der Titerentwicklung ist in Abb.11-3 dargestellt. Der Vergleich mit den Kontrollseren (Prä-Immunsere = Entnahmen vor der Immunisierung; „0. Woche“) zeigte bereits bei der ersten Blutentnahme nach 6 Wochen die Bildung von Antikörpern. Die maximalen Titer, d.h. die stärksten Verdünnungen der Seren mit denen Extinktionen von 0,3 Einheiten erzielt wurden, lagen bei Verdünnungen von 1 : 480.000 (Tier 1 / 10. Woche), 1: 410.000 (Tier 2 / 8. Woche) und 1: 310.000 (Tier 3 / 6 Woche) vor. Die maximalen Extinktionswerte für die Kontrollseren lagen bei 0,04 Einheiten.

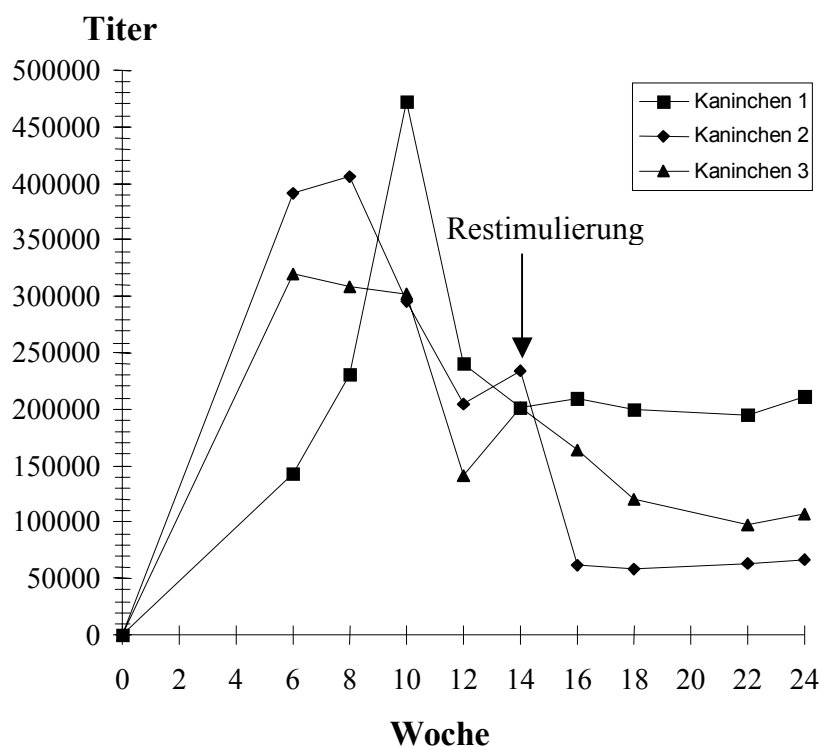


Abbildung 11-3: Zeitlicher Verlauf der Serentiter; als Titer wurde die höchste Serenverdünnung festgelegt, die unter den genannten Bedingungen zu einer Extinktion von 0,3 Einheiten führte (erste Blutentnahme 6. Woche nach der Grundimmunisierung, Restimulierung mit GOD-Ampicillin in der 14. Woche nach der Grundimmunisierung), DASP-Technik

Die Nachimmunisierung mit dem GOD-Ampicillin-Immunogen führte bei keinem Tier zu einer Erhöhung des Serentiters. Während die Serentiter von Kaninchen 1 nach der Restimulierung bis zur 24. Woche praktisch konstant blieben, war für das Kaninchen 3 eine langsame Abnahme des Serumtiters festzustellen. Bei Kaninchen 2 fiel 14 Tage nach der Restimulierung der Titer von 1: 240.000 auf 1:60.000 ab und blieb dann bis zur 24. Woche konstant.

Der charakteristische Verlauf einer Titrationskurve mit einem tierartspezifischen Festphasenantikörper (hier: anti-Kaninchen-IgG-Antikörper) ist am Beispiel des Serums von Tier 2 / 8. Woche dargestellt (Abbildung 11-4). Bei hohen Antikörpergehalten, d.h. einer niedrigen Serumverdünnung, wird die IgG-Bindungskapazität der Festphase überschritten, so dass nur ein konstanter maximaler Anteil aller im Serum vorhandenen Antikörper (spezifische und unspezifische IgG) von den Festphasenantikörpern gebunden wird. Somit wird kein proportionaler Anteil an Antigen-Enzym-Konjugat (hier: HRP-Lys-D-Ala-D-Ala) bzw. an spezifisch markierten Serumantikörpern gebunden [145]. Dies zeigt sich am Verlauf der dargestellten Kurve für Serumverdünnungen unterhalb von 1 : 9.000. Ab einer genügend hohen Serumverdünnung (= Maximum der Titrationskurve) werden alle IgG Moleküle gebunden und damit auch alle spezifisch mit dem Enzymkonjugat markierten Antikörper. Der weitere Verlauf der Titrationskurve zeigt die erwartete Abnahme in Abhängigkeit von der Serumverdünnung ($[E] \sim [AkAg^*]$, vergl. Gleichung 11-4).

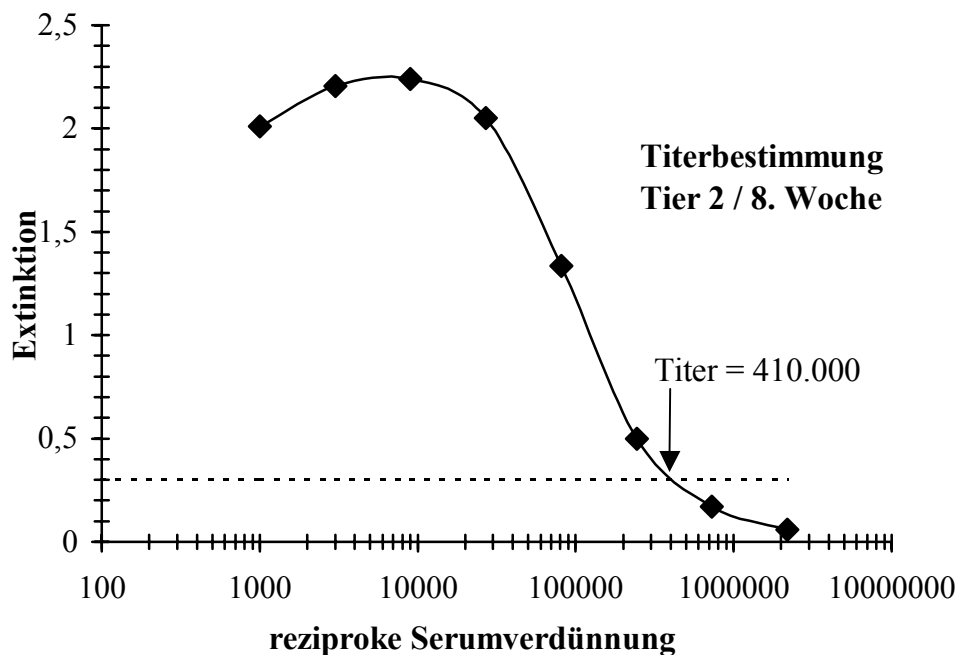


Abbildung 11-4: Beispiel einer Titrationskurve zur Ermittlung des Serumtiters im direkten ELISA (DASP-Technik) (Tier 2/8.Woche) Randbedingungen: vergl. Abbildung 11-2

12 Charakterisierung der Seren

12.1 Überprüfung der Spezifität der gewonnenen Seren

Kompetitionsexperimente sollten die Frage beantworten, ob die Seren spezifisch gegen N α -Acetyl-Lysiny-D-Alanin-D-Alanin gerichtet sind, und ob sich mit der zur Titerbestimmung angewandten ELISA-Technik bereits eine Kreuzreaktivität gegen β -Lactamantibiotika nachweisen lässt. Zu diesem Zweck wurde eine Serentitration in Gegenwart von a) N α -Acetyl-Lys-D-Ala-D-Ala (homologer Kompetitor) bzw. b) einer Mischung von Ampicillin, Benzylpenicillin und Cloxacillin (heterologe Kompetitoren) durchgeführt („Titration mit Hemmung“). Während sich mit freiem N α -Acetyl-Lys-D-Ala-D-Ala (100 ng/ml) bei allen Seren eine deutliche Hemmung der Antikörper/Antigenwechselwirkung nachweisen ließ, zeigte das Penicillingemisch trotz der vergleichsweise hohen Konzentration (1000 ng/ml pro Penicillin) in diesem Testsystem keine Hemmung dieser Wechselwirkung.

Allgemein liegen den beschriebenen kompetitiven ELISA-Testsystemen zwei Gleichgewichtsreaktionen (vergl. Gl.12-1) zugrunde: a) die Bindung der Antikörper an das enzymmarkierte Antigen [Ag*] und als Konkurrenzreaktion dazu b) die Bindung des freien Antigens [Ag] an die entsprechenden Antikörper [Ak].



$$\text{bzw.: } Ag + Ag^* + Ak = AgAk + Ag^*Ak + (Ag_{\text{frei}} + Ag_{\text{frei}}^* + AK_{\text{frei}})$$

Die Stabilität der jeweiligen Komplexe lässt sich wiederum durch die jeweilige Dissoziationskonstante (Kd bzw. Kd*) beschreiben (siehe Gleichung 12-2).

$$Kd = \frac{[Ak]_{\text{frei}} \cdot [Ag]_{\text{frei}}}{[AkAg]} \quad \text{(Gleichung 12-2)}$$

$$Kd^* = \frac{[Ak]_{\text{frei}} \cdot [Ag^*]_{\text{frei}}}{[AkAg^*]} \quad \text{(Gleichung 12-3)}$$

Bei konstanter Antikörperkonzentration hängt somit die im Kompetitionsexperiment gemessene Extinktion von den Konzentrationen an markierten und unmarkierten Antigenen sowie von ihren Dissoziationskonstanten ab. Auch wenn für polyklonale Antiseren die Dissoziationskonstanten diskreter Antikörper nicht direkt zugänglich sind, gelten diese Aussagen sinngemäß auch für Antiseren.

Die vorstehend durchgeführte ELISA-Technik zur Titerbestimmung hatte das primäre Ziel, möglichst alle in den Seren enthaltenen Hapten-spezifischen Antikörper nachzuweisen. Entsprechend der in der Literatur beschriebenen Vorgehensweise [145] wurde daher das HRP-Lys-D-Ala-D-Ala-Konjugat im Überschuss zu den vorhandenen spezifischen

Antikörperbindestellen eingesetzt, um auch für Antikörper mit geringeren Affinitäten eine möglichst hohe Ausbeute an enzymmarkierten Antikörper/Antigen-Komplexen zu erzielen. Aus der relativ hohen Konzentration an markiertem Antigen folgt, dass in dem durchgeführten Wettbewerbsexperiment („Titration mit Hemmung“) ebenfalls relativ hohe Konzentrationen an freiem Antigen notwendig sind, um zu einer messbaren Konkurrenzreaktion zu führen.

Quantitative kompetitive ELISA-Techniken sind hingegen auf eine maximale Empfindlichkeit bezüglich eines Konkurrenten ausgelegt, d.h. geringste Konzentrationen des zu bestimmenden Analyten, sollen zu einer maximalen Hemmung des Testsystems führen. Im homologen direkten ELISA-Format entspricht dies der Konkurrenzreaktion zwischen freiem Antigen (Analyt) und enzymmarkiertem Antigen um die im Testsystem vorhandenen Antikörper. Die theoretisch erreichbare Empfindlichkeit hängt von der Affinität der verwendeten Antikörper ab und kann bei Kenntnis der Dissoziationskonstante der Antikörper/Antigen-Komplexe rechnerisch ermittelt werden.

Die in der Praxis erreichbare maximale Empfindlichkeit eines ELISA-Systems wird primär von den Konzentrationen an Antikörper und enzymmarkiertem Antigen bestimmt und durch die Kinetik des verwendeten Marker-Enzyms sowie durch gerätetechnische Parameter bei der photometrischen Auswertung des Substratumsatzes limitiert. Um eine maximale Empfindlichkeit zu erzielen und gleichzeitig einen linearen Zusammenhang zwischen Analyt-Konzentration und Substratumsatz des Markerenzym zu gewährleisten, müssen daher die Testsysteme bezüglich Serenverdünnung und der Konzentration an enzymmarkiertem Antigen optimiert werden. Unter optimierten Bedingungen sollte nach Abschluss der enzymatischen Detektionsreaktion (ca. 15–30 min für das Substrat Tetramethylbenzidin/H₂O₂) die Extinktion zwischen 0,8 und 1,5 Einheiten liegen. Gleichzeitig sollten Konkurrenten zu einer möglichst starken Abnahme der Extinktion führen. Diese Bedingungen müssen empirisch ermittelt werden (vergl. Kap. 12.3.2 und 15.4.3.4).

In Tabelle 12-1 sind die Ergebnisse für die optimierten Testsysteme (Serum der 12. Woche) zusammengefasst. Die Konzentrationen an freiem N α -Acetyl-Lys-D-Ala-D-Ala, die zur Absenkung der Extinktion (E) auf die Hälfte der Extinktionswerte für die ungehemmte Reaktion (E₀) führten (50%-Dosis), lagen je nach Kombination an Serum- und Enzymkonjugat-Verdünnung zwischen 7,9 und 19,7 ng/ml.

Diese Konzentrationen sind durchaus vergleichbar mit denen für ähnlich aufgebaute Testsysteme wie z.B. den Penicillin-ELISA von USLEBER et al. [126]. Weiterhin bleibt festzuhalten, dass im optimierten Testsystem keine signifikanten Unterschiede für die Seren einzelner Kaninchen festzustellen waren. Mit den individuellen Seren aller Kaninchen ließen sich bezüglich der 50%-Dosis vergleichbare Testsysteme aufbauen.

Tier	Titer (12. Woche)	Verdünnung Antiserum	Verdünnung HRP-Konjugat	E_0	$E/E_0 = 50\%$ (50%-Dosis Lys-D-Ala-D-Ala)
1	1 : 240.000	1 : 8.000	1 : 8.000	1,496	15,0 ng/ml
		1 : 8.000	1 : 16.000	1,030	8,3 ng/ml
2	1 : 200.000	1 : 4.000	1 : 32.000	1,218	7,9 ng/ml
		1 : 8.000	1 : 16.000	1,532	9,9 ng/ml
3	1 : 145.000	1 : 4.000	1 : 8.000	1,760	19,7 ng/ml

Tabelle 12-1: Bestimmung der 50%-Dosis ($E/E_0 = 50\%$) unter optimierten ELISA-Bedingungen (DASP-Technik, Enzymreaktion: 15 min TMB/ H_2O_2 -Reaktion)

Auch unter diesen optimierten Bedingungen war für Penicilline mit diesem Testsystem (DASP-Technik) keine Hemmung nachweisbar. Der für die Konkurrenzexperimente verwendete Testaufbau entsprach analog der Titerbestimmung bezüglich des Antigens einer sog. *homologen* Testanordnung, d.h. das für die Immunisierung verwendete Hapten (GOD-Lys-D-Ala-D-Ala) war identisch mit dem zur Detektion der Antikörper eingesetzten enzymmarkierten Antigen (HRP-Lys-D-Ala-D-Ala).

Im allgemeinen binden Antikörper mit wesentlich höherer Affinität an homologe als an heterologe Antigene. Da die Penicilline in einem homologen Testaufbau als heterologe Konkurrenten eingesetzt wurden, konnte aus diesem negativen Ergebnis noch nicht geschlossen werden, dass in den Antiseren keine mit Penicillinen kreuzreagierenden Antikörper vorhanden waren. Des Weiteren muss beachtet werden, dass die Konzentration potentiell kreuzreagierender Antikörper im Vergleich zu ausschließlich Lys-D-Ala-D-Ala spezifischen Antikörpern deutlich geringer ausfallen würde. Beide Faktoren konnten dafür verantwortlich sein, dass auch hohe Penicillinkonzentrationen nicht zu einer messbaren Hemmung im homologen Testaufbau führten.

Mit dem Glykopeptidantibiotikum Vancomycin (>1000 ng/ml) konnte bereits für die Seren der 6. Woche eine deutliche Hemmung beobachtet werden. Aufgrund des besonderen Mechanismus, der zur Hemmung der Antikörper/Antigen-Reaktion führt wird auf dieses Phänomen unter Kap. 12.3 näher eingegangen werden.

12.2 Untersuchungen zur Identifizierung Penicillin-spezifischer Serumantikörper

Jede der beiden Immunisierungen, sowohl die mit dem GOD-Lys-D-Ala-D-Ala- wie auch die mit dem GOD-Ampicillin-Konjugat, hätte eigenständig zu Penicillin-bindenden Antikörpern führen können, wobei zwei unterschiedliche Mechanismen zugrunde gelegen hätten. Ein möglicher Mechanismus würde zu der gewünschten Kreuzreaktivität von Lys-D-Ala-D-Ala-spezifischen Antikörpern gegenüber Penicillinen aufgrund der übereinstimmenden strukturellen Analogien zwischen beiden Molekülen führen. Die spezifische Immunantwort gegenüber diesem gemeinsamen Strukturelement in beiden Molekülen sollte durch die Restimulierung mit dem GOD-Ampicillin-Konjugat verstärkt werden.

Der zweite Mechanismus hätte aufgrund der Restimulierung mit dem GOD-Ampicillin-Konjugat direkt zu Penicillin-bindenden Antikörpern führen können. Diese Antikörper würden zwar an Penicilline binden, doch würde diese Bindung mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließlich durch Ampicillin-spezifische Epitope vermittelt (vergl. Kap. 5.2). Das auch diese Antikörper aufgrund der Strukturanalogien von Ampicillin und D-Alanyl-D-Alanin im Zuge einer Kreuzreaktivität ebenfalls Lys-D-Ala-D-Ala binden wäre zwar prinzipiell möglich, erscheint jedoch eher unwahrscheinlich.

Darüber hinaus durfte in diesem Zusammenhang nicht außer acht gelassen werden, dass prinzipiell auch mit dem Vorhandensein von Pencilloylderivaten am Ampicillin-Immunogen gerechnet werden musste, und diese Abbauprodukte ebenfalls als potentielle Haptene fungieren konnten. Demnach konnte die Präsenz z.B. von anti-Pencilloyl-Antikörpern nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund ihrer möglichen Kreuzreaktivität auch gegenüber intakten Penicillinen hätten diese Antikörper zu Fehlinterpretationen der Testergebnisse führen können.

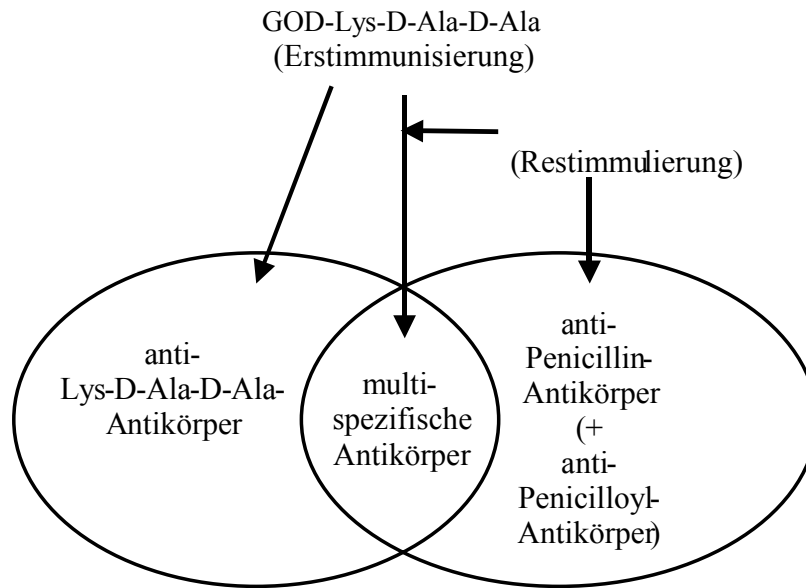


Abbildung 12-1: Mögliche Bildungswege von anti-Lys-D-Ala-D-Ala- und anti-Penicillin-Antikörpern im Zuge des angewandten Immunisierungsprotokolls; die Schnittmenge repräsentiert die gewünschten multispezifischen Antikörper

Die unter Kap. 12.1 beschriebenen kompetitiven Testsysteme mit HRP-Lys-D-Ala-D-Ala als enzymmarkiertes Antigen, konnten aufgrund des homologen Testaufbaus (N α Ac-Lys-D-Ala-D-Ala als Hapten für enzymmarkiertes Antigen und Immunogen) nur bedingt für den Nachweis von Penicillin-spezifischen Antikörpern eingesetzt werden. Auch unter optimierten Bedingungen (s. Tab. 12-1) hätten Penicilline nur dann zu einer Hemmung der Testsysteme geführt, wenn die Stabilität der gebildeten Penicillin/Antikörper-Komplexe mindestens in einer vergleichbaren Größenordnung gelegen hätte wie die Stabilität der entsprechenden HRP-Lys-D-Ala-D-Ala/Antikörper-Komplexe. Des Weiteren waren diese Testsysteme nicht geeignet, das mögliche Auftreten von anti-Penicillin- bzw. anti-Penicilloyl-Antikörpern nachzuweisen, welche in einem prinzipiell möglichen, von der Primärimmunisierung unabhängigen Immunresponse gegen das Ampicillin-GOD-Konjugat bzw. dessen Penicilloylinderivate entstanden sein konnten.

Titration der Seren im heterologen direkten Penicillin ELISA

Um tatsächlich Antikörper mit einer Affinität zu Penicillinen nachzuweisen, wurden die Seren unter Verwendung verschiedener Penicillin-HRP-Konjugate analog den unter 11.3 beschriebene Bedingungen „titriert“.

Die verwendeten Penicillin-Peroxidase-Konjugate (vergl. Tabelle 12-2) wurden von Herrn Prof. Dr. E. Usleber zur Verfügung gestellt.

Weder vor noch nach der Restimulierung konnte jedoch mit den Penicillin-Konjugaten die gewünschte Affinität der Antikörper zu Penicillinen nachgewiesen werden. Ebenfalls wurde keine Wechselwirkung mit dem Penicilloylsäure-HRP-Konjugat festgestellt.

An dieser Stelle musste also zur Kenntnis genommen werden, dass die in der Zielsetzung definierte Strategie zur Gewinnung eines Penicillin-spezifischen Antikörpers auf Grundlage der Strukturanalogien von Penicillinen und D-Ala-D-Ala nicht zum gewünschten Erfolg geführt hatte.

Konjugat/Kopplungsmethode	
<p style="text-align: center;"><i>HRP-N=CH</i> <i>Glutarialdehyd</i></p>	<p style="text-align: center;"><i>HRP-NH-CH2</i> <i>Kohlenhydratrest</i></p>
<p>Ampicillin-HRP/Glutarialdehydtechnik Referenz: Litz [166]</p>	<p>Ampicillin-HRP/Periodatmethode Referenz: Litz [166]</p>
<p>Benzylpenicillin-HRP/ Aktive Estertechnik (Carbodiimid/NHS) Referenz: Litz [166]</p>	<p>Cloxacillin-HRP/Aktive Estertechnik (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl- Carbodiimid)) Usleber et al [126]</p>

Abbildung 12-2: schematische Darstellung der zur Detektion penicillinspezifischer Antikörper im direkten ELISA eingesetzten Penicillin-Meerrettichperoxidase (HRP)-Konjugate
 Referenz: Beschreibung von Synthese und Charakterisierung der verwendeten Konjugate

12.3 Verhalten der Serumantikörper gegenüber Glykopeptidantibiotika

12.3.1 Hemmung der Antikörper/Antigen-Reaktion durch Glykopeptidantibiotika

Bei den Konkurrenzexperimenten in Kap. 12.1. wurde erwähnt, dass mit Vancomycin als Kompetitor im direkten ELISA (Titration mit Hemmung) bereits im Serum der ersten Blutabnahme (6. Woche) eine deutliche Hemmung der Antikörper/Antigen-Wechselwirkung festgestellt werden konnte. Da Glykopeptidantibiotika keine strukturellen Analogien zu Lys-D-Ala-D-Ala aufweisen, konnte diese Hemmung nicht auf einer unmittelbaren Wechselwirkung mit dem Antikörper im Sinne einer Antikörper/Antigen-Reaktion beruhen. Vielmehr ist davon auszugehen, dass die Wechselwirkungen mit dem enzymmarkierten Antigen bzw. Festphasenantigen erfolgten. In Analogie zur Hemmung von D,D-Carboxypeptidasen bzw. D,D-Transpeptidasen durch Glykopeptidantibiotika (vergl. Kap. 2.3.2.2), ist die Bildung äußerst stabiler Glykopeptidantibiotika/Lys-D-Ala-D-Ala-Komplexe und somit die Maskierung des Lys-D-Ala-D-Ala-Epitops für die Unterdrückung der Antikörper/Antigen-Reaktion verantwortlich.

Es ergibt sich ein von klassischen kompetitiven ELISA-Techniken (vergl. Abb. 6-1) vollständig abweichendes Funktionsprinzip: Während in klassischen ELISA-Systemen ein freies Antigen (Analyt) mit einem Festphasen-gebundenen bzw. enzymmarkierten Antigen um eine begrenzte Anzahl spezifischer Antikörperbindestellen konkurriert, konkurrieren in diesem Fall Lys-D-Ala-D-Ala-spezifische Antikörper und Glykopeptidantibiotika um eine begrenzte Anzahl von zur Verfügung stehenden Lys-D-Ala-D-Ala-Epitopen. Vereinfacht ausgedrückt konkurrieren in diesem Testsystem zwei verschiedene Rezeptoren (Antikörper und Glykopeptidantibiotika) um einen gemeinsamen Liganden (Lys-D-Ala-D-Ala).

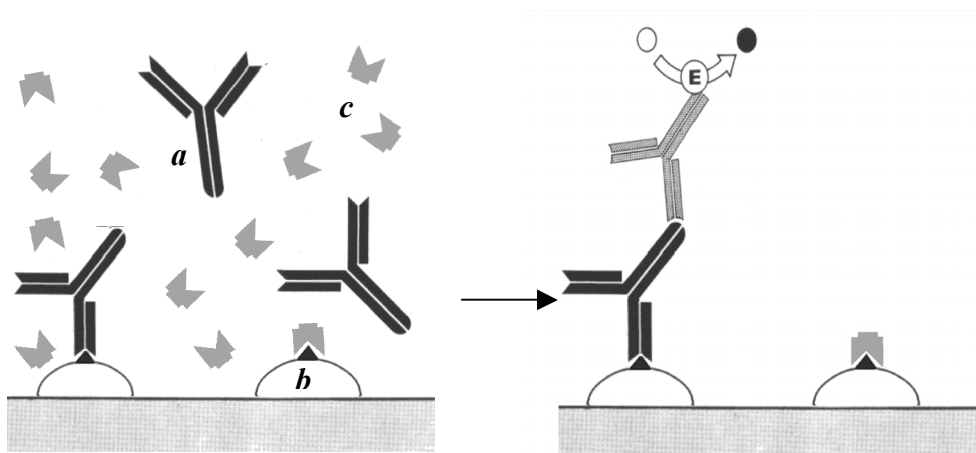


Abbildung 12-3: Hemmung der Bindung von Lys-D-Ala-D-Ala-spezifischen Antikörpern (a) an immobilisiertes BSA-N α Ac-Lys-D-Ala-D-Ala (b) in Gegenwart von Glykopeptidantibiotika (c) (indirekter ELISA)

12.3.2 Untersuchungen zur Optimierung eines indirekten ELISA-Systems zum Nachweis der Glykopeptidantibiotika Avoparcin und Vancomycin

Die nachfolgenden Untersuchungen dienten der Entwicklung eines Avoparcin-Assays für die Futtermittelanalytik. In Vorversuchen mit Vancomycin hatte sich die indirekte ELISA-Technik als vorteilhaft erwiesen, da die hiermit erzielten Ergebnisse wesentlich reproduzierbarer ausfielen und gleichzeitig eine stärkere Hemmung durch Glykopeptidantibiotika erzielt wurden als bei Anwendung der direkten ELISA-Technik.

Um die maximale Empfindlichkeit eines ELISA-Systems zu erreichen, werden die Testsysteme bezüglich Serenkonzentration und Konzentration an enzymmarkiertem Antigen bzw. Festphasenantigen derart optimiert, dass nach Abschluss der enzymatischen Reaktion (ca. 15–30 min für das Substrat Tetramethylbenzidin/H₂O₂) die Extinktion zwischen 0,8 und 1,5 Einheiten liegt und gleichzeitig Kompetitoren (Analyten) zu einer maximalen Abnahme der Extinktion führen. Diese Randbedingungen mussten empirisch durch Variation von Serenverdünnung und der Menge des jeweiligen Antigens ermittelt werden (vergl. Kap. 12.1. und Kap. 15.4.3.4)

Abbildung 12-4 zeigt die Titrationskurven eines im indirekten ELISA getesteten Serums zur Ermittlung der optimalen Serumverdünnung. Das Optimum der jeweiligen Serumverdünnung liegt dort, wo E₀ (= ungehemmte Reaktion) zwischen 0,8 und 1,5 liegt. Dies ist für das Tier 1/14. Woche beispielsweise die Verdünnung 1:80.000 (s. Abb. 12-4). Für die übrigen Seren sind die optimalen Verdünnungen in Tab. 12-2 angegeben.

Die optimale Menge an Beschichtungsantigen lag für alle Seren bei ca. 5 ng/Kavität. Dies ist eine rein rechnerische Größe (5 ng/Kavität), die sich aus der Proteinkonzentration im Beschichtungspuffer (50 ng/ml) sowie dem zur Beschichtung eingesetzten Volumen (i.d.R. 100 µl/Kavität) zusammensetzt. Die Menge an Protein, die von den verwendeten Polystyrol-Mikrotiterplatten gebunden wird, hängt von verschiedenen Faktoren wie der Natur des eingesetzten Proteins, pH-Wert des Beschichtungspuffers, von der Proteinkonzentration im Beschichtungspuffer sowie der Dauer des Beschichtungsvorganges ab [140]. Mikrotiterplatten für ELISA-Techniken werden speziell daraufhin spezifiziert, dass sie unter ansonsten konstant gehaltenen Bedingungen für eine gegebene Proteinkonzentration reproduzierbar eine definierte Proteinmenge binden.

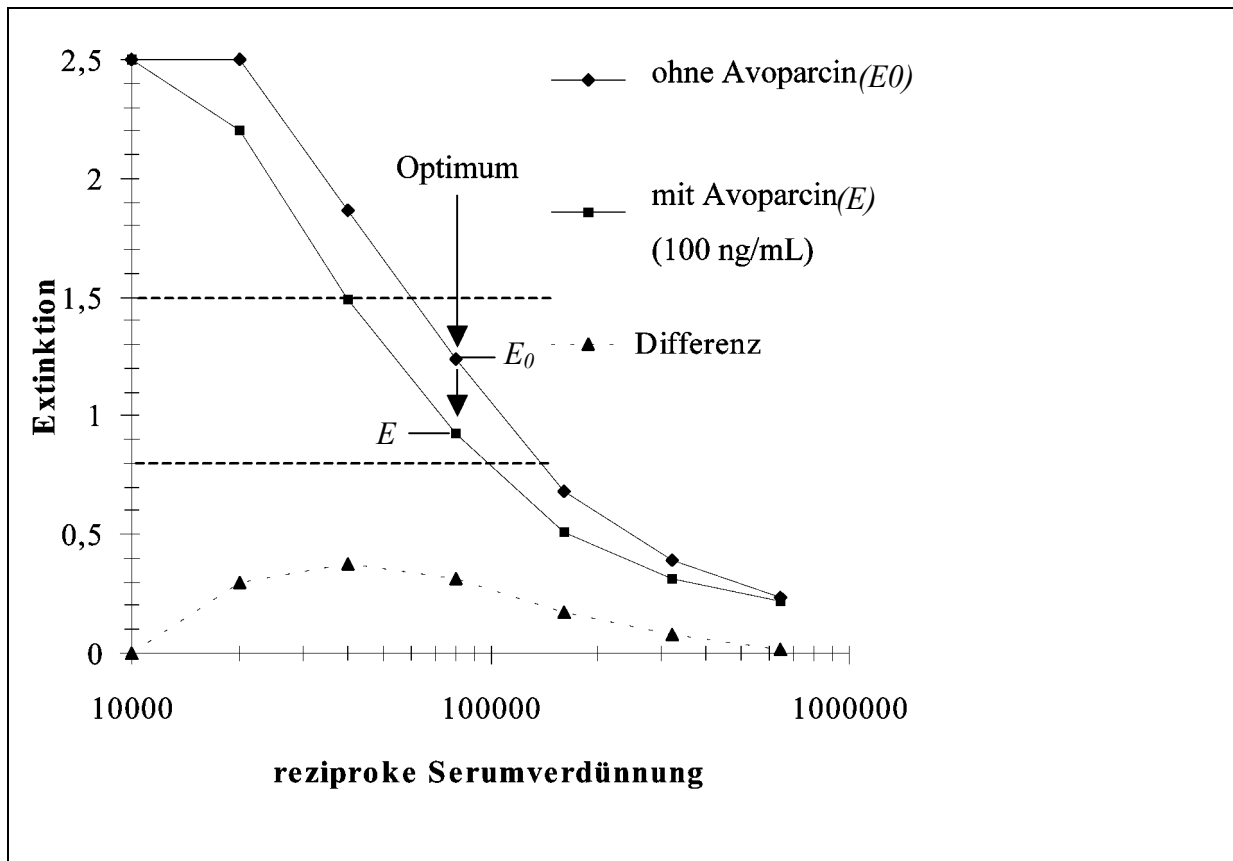


Abbildung 12-4: Beispiel für die Ermittlung der optimalen Serenverdünung (Titration mit Hemmung) im indirekten Avoparcin-ELISA (Tier 1/14. Woche) Das Optimum der jeweiligen Serumverdünung liegt dort, wo E_0 (= ungehemmte Reaktion) zwischen 0,8 und 1,5 liegt. Dies ist für das Tier 1/14. Woche beispielsweise die Verdünnung 1:80.000. Randbedingungen vergl. Tabelle 12-2

Tier/Woche	Serumverdünung	Extinktion (E_0)	Extinktion (E) (Avoparcin 100 ng/ml)	$E/E_0 \times 100$ [%]
1/14	1: 80.000	1,241	0,924	75
1/22	1:80.000	1,549	1,024	66
	1:160.000	0,906	0,685	75
2/14	1:40.000	1,127	0,835	74
2/22	1:20.000	1,508	0,932	62
	1:40.000	0,905	0,734	81
3/14	1:80.000	1,340	1,026	76
3/22	1:80.000	1,055	0,815	77

Tabelle 12-2: Ermittlung optimaler Testbedingungen; angegeben sind jeweils die Verdünnungen der Seren mit denen in Abwesenheit von Avoparcin Extinktionen zwischen 0,8–1,5 (+/- 0,05) Einheiten (E_0) erzielt wurden. Gleichzeitig sollte in Gegenwart von Avoparcin eine maximale Hemmung erzielt werden (E) (vergl. Beispiel Abb. 12-4)

Randbedingungen: Beschichtungsantigen (BSA-Lys-D-Ala-D-Ala): 5 ng/Kavität/12 h; Enzymreaktion: 20 min (TMB/ H_2O_2)

Die Ergebnisse der Optimierung sind in vorstehender Tabelle (12-2) zusammengestellt. Bei den jeweils angegebenen Serumverdünnungen, mit denen in Abwesenheit von Avoparcin Extinktionen zwischen 0,8 und 1,5 Einheiten erzielt wurden, führte eine konstante Avoparcinkonzentration von je 100 ng/ml zu einer Absenkung der Extinktion auf 62-81 % des Ausgangswertes.

Für eine weitere Charakterisierung dieses Testsystems, wurden neben Avoparcin auch N α -Ac-Lys-D-Ala-D-Ala und Vancomycin als Kompetitoren eingesetzt. Die zugehörigen Kurven sind in Abbildung 12-5 dargestellt.

Die relative Kreuzreaktivität¹ wurde aus der jeweiligen 50%-Dosis für die einzelnen Kompetitoren (Komp B) berechnet und auf das zur Immunisierung eingesetzte Hapten bezogen (Komp A = N α -Ac-Lys-D-Ala-D-Ala = 100 %).

$$\text{relative Kreuzreaktivität [\%]} = \frac{50\% - \text{Dosis Komp A}}{50\% - \text{Dosis Komp B}} \cdot 100 \quad \text{Gleichung 12-4}$$

<i>Kompetitor:</i>	N α -Ac-Lys-D-Ala-D-Ala	Avoparcin	Vancomycin
Tier/Woche: 1/14.; Serumverdünnung: 1:80.000 E ₀ : 0,709			
50%-Dosis [ng/ml]	5 (15)*	261 (137)	4763 (3197)
Kreuzreaktivität	100	2 (11)	0,1 (0,5)
Tier/Woche: 2/14.; Serumverdünnung: 1:40.000 E ₀ : 1,355			
50%-Dosis [ng/ml]	2,2 (6,6)	234 (123)	3370 (2261)
Kreuzreaktivität	100	0,9 (5,3)	0,06 (0,3)
Tier/Woche: 3/14.; Serumverdünnung: 1:80.000 E ₀ : 2,0			
50%-Dosis [ng/ml]	21 (63)	378 (198)	4514 (3029)
Kreuzreaktivität	100	6 (32)	0,5 (2)

Tabelle 12-3: Vergleich der „Kreuzreaktivitäten“ der Antikörper gegenüber N α -Ac-Lys-D-Ala-D-Ala (= 100 %), Avoparcin und Vancomycin unter optimierten Bedingungen (vergl. Tab. 12-2) *(die Werte in Klammern beziehen sich auf die molare Konzentrationen [pmol/ml], molare Massen N α -Ac-Lys-D-Ala-D-Ala, Avoparcin, Vancomycin : 330, 1909 und 1490 g/mol) (zugehörige Kurvenverläufe s. Abb. 12-5)

¹ Da Avoparcin und Vancomycin im vorliegenden ELISA-Test keine echten Kompetitoren im Sinne einer Antikörper/Antigen-Wechselwirkung darstellen, ist der Begriff Kreuzreaktivität nicht korrekt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit soll er aber im folgenden beibehalten werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass Avoparcin (50%-Dosen 123 bis 198 pmol/ml) bei allen Seren zu einer wesentlich stärkeren Konkurrenz führte als Vancomycin (50%-Dosen 2261 bis 3197 pmol/ml). Diese Beobachtung war zunächst überraschend. Da die Antikörper selbst keine Wechselwirkung mit den Glykopeptidantibiotika eingehen, sondern als Konkurrenten der Glykopeptidantibiotika/Lys-D-Ala-D-Ala-Wechselwirkung auftreten, sollten für ein gegebenes Serum in erster Näherung die notwendigen 50%-Dosen nur von den Assoziationskonstanten der gebildeten Glykopeptidantibiotika/Lys-D-Ala-D-Ala Komplexe abhängen. Erst kürzlich wurden vergleichende Assoziationskonstanten für Avoparcin- und Vancomycin/ $N\alpha,N\epsilon$ -Diacetyl-Lys-D-Ala-D-Ala Komplexe veröffentlicht, die für beide Antibiotika bei $K_{\text{ass}} = 500.000 \text{ l/mol}$ lagen [169].

Hingegen liegt für die 3 getesteten Seren (Tier 1, 2 und 3) das Verhältnis der molaren 50%-Dosen von Vancomycin zu Avoparcin bei 15, 18 und 23.

Diese signifikanten Unterschiede im Verhalten der beiden Antibiotika gegenüber den Testsystemen kann weder durch die Antikörper/Antigenreaktion noch durch strukturelle Unterschiede zwischen Beschichtungsligand (BSA- $N\alpha$ -Acetyl-Lys-D-Ala-D-Ala) und $N\alpha,N\epsilon$ -diacetyl-Lys-D-Ala-D-Ala erklärt werden. Wie in Kap. 12.4.2 / Tab. 12-4 gezeigt, weisen die Antibiotikakomplexe verschiedener substituierter D-Ala-D-Ala-Peptide zwar sehr unterschiedliche Assoziationskonstanten auf, doch unterscheiden sich diese Konstanten für die jeweiligen Avoparcin- und Vancomycin-Komplexe nur geringfügig.

Vielmehr weist die Abweichung darauf hin, dass neben einer 1:1 Komplexbildung von Glykopeptidantibiotikum und Peptid weitere Faktoren an der Konkurrenz beteiligt sein müssen. Hier könnten z.B. sekundäre Wechselwirkungen mit dem Carrierprotein (BSA) oder die Bildung von Vancomycin- bzw. Avoparcindimeren, die zu einer weiteren Stabilisierung der primär gebildeten Antibiotikum/Peptid-Komplexe führen [6], eine Rolle spielen.

Die Kreuzreaktivitäten der Antibiotika lagen bezogen auf $N\alpha$ Ac-Lys-D-Ala-D-Ala (=100 %) zwischen 5 und 32 % für Avoparcin bzw. 0,3 und 2 % für Vancomycin. Auch hierbei wird deutlich, dass die Hemmung des Testsystems nicht durch eine 1:1-Komplexierung (1 mol Glykopeptidantibiotikum / mol $N\alpha$ -Ac-Lys-D-Ala-D-Ala) zustande kommen kann, da ansonsten für Vancomycin und Avoparcin eine deutlich höhere Kreuzreaktivität zu erwarten gewesen wäre.

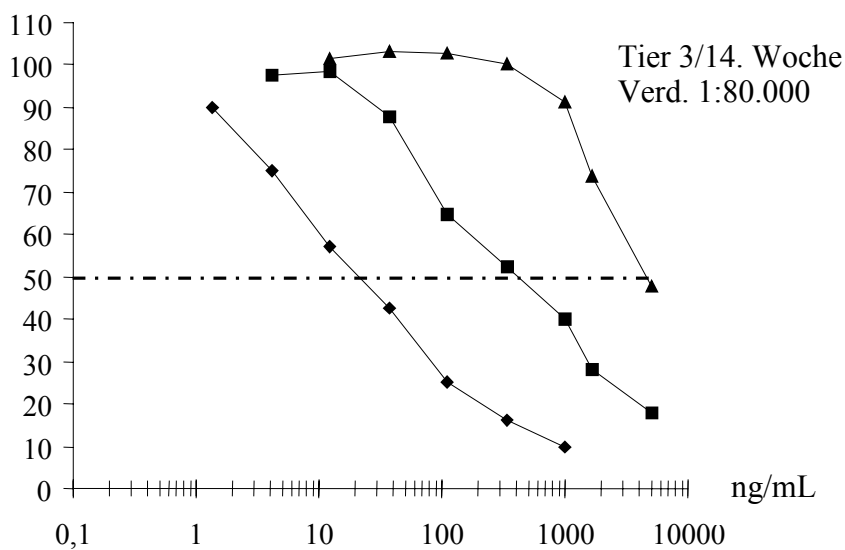
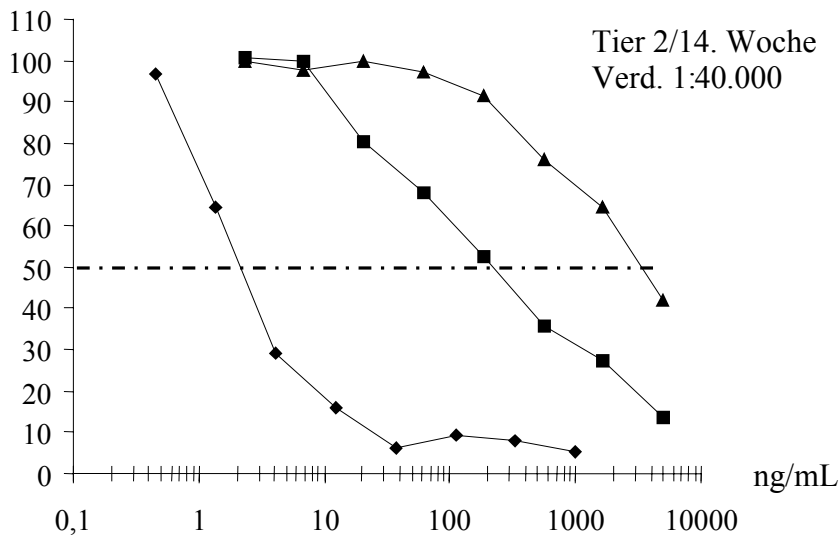
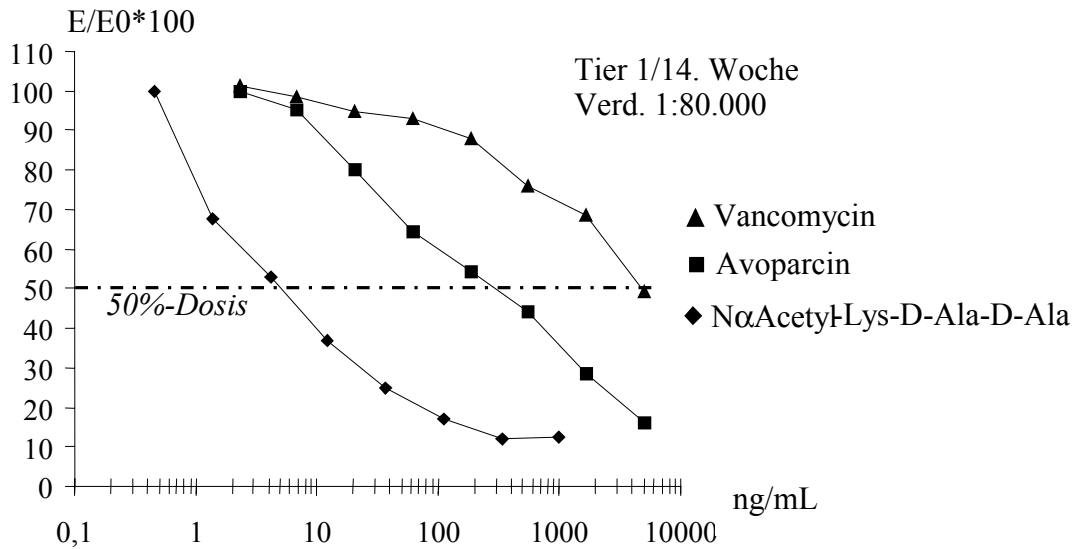


Abbildung 12-5: Konkurrenz durch NαAcLys-D-Ala-D-Ala, Avoparcin und Vancomycin im indirekten ELISA, Antiseren Tier 1,2 und 3 jeweils 14. Woche
Randbedingungen: vergl. Tab. 12-2

12.4 Weiterführende Charakterisierung der Antikörper-Bindestellen (Epitopmapping)

12.4.1 Vorbemerkungen

Wie in Kap. 6.2 beschrieben, können die antigenen Determinanten (Epitope) von Haptenen mit einer Größe von weniger als 6-7 Aminosäuren nur einen Teilbereich der gesamten Antikörperbindestelle ausfüllen und müssen daher als Teilepitope betrachtet werden. Entsprechend dem Immunisierungsprotokoll sollten die gemeinsamen strukturellen Merkmale von Penicillinen und D-Ala-D-Ala-terminierten Peptiden als ein solches Teilepitop fungieren. Nur wenn es gelänge die Immunantwort gegen dieses Teilepitop zu richten, welches die strukturelle Voraussetzung für die Bindung von D-Ala-D-Ala-terminierten Peptiden und Penicillinen an D,D-Transpeptidasen bzw. D,D-Carboxypeptidasen darstellt, bestünde die Chance, dass die gewonnenen Antikörper tatsächlich in der gewünschten Weise auch an Penicilline binden.

Wie die vorstehenden Experimente zeigen, konnten zwar Lys-D-Ala-D-Ala-spezifische Antikörper nachgewiesen werden, doch zeigten diese keine Kreuzreaktivität gegenüber Penicillinen. Das übereinstimmende Strukturmerkmal beider Moleküle stellte also nicht das durch die Antikörper erkannte Epitop dar. Daher sollten durch ein sogenanntes Epitopmapping die tatsächlichen strukturellen Anforderungen der Antikörper an das Epitop gefunden werden.

Zwar führt ein Epitopmapping nur bei monoklonalen Antikörpern, welche über identische Antikörperbindestellen verfügen, zu einer eindeutigen Identifizierung des relevanten Epitops. Für polyklonale Antikörper erlaubt diese Methode aber die Eingrenzung der für die Erkennung relevanten Strukturmerkmale. Im allgemeinen wird das Epitopmapping im Rahmen von Konkurrenzexperimenten durchgeführt. Bei Antikörpern gegen kleine Haptene können Teilbereiche des betreffenden Moleküls und kreuzreagierende Substanzen als Konkurrenten eingesetzt werden.

Ein Epitop wird durch die relative Kreuzreaktivität beschrieben, die sich mit Hilfe kompetitiver ELISA-Techniken ermitteln lässt. Hierbei wird als Bezugsgröße die 50%-Dosis eines gegebenen Kompetitors (Komp A) (i.d.R. das zur Immunisierung verwendete Hapten) ermittelt und die 50%-Dosis für den zu testenden Kompetitor (Komp B) auf diesen Wert bezogen (vergl. Gl. 12-4).

Je größer die relative Kreuzreaktivität, d.h. je niedriger die Konzentration der 50 %-Dosis im Vergleich zur eingesetzten Standardsubstanz ausfällt, desto besser erfüllt ein getesteter Kompetitor die strukturellen Anforderungen der Antikörperbindestellen. Durch Vergleich der relativen Kreuzreaktivitäten verschiedener Kompetitoren lassen sich so Aussagen über die Spezifität der entsprechenden Antikörperbindestellen machen.

12.4.2 Durchführung des Epitopmappings

Das Epitopmapping wurde mit Hilfe des in Kap. 12.3.2 beschriebenen indirekten Testsystems durchgeführt. Dazu wurden Seren der drei Kaninchen aus der 6., 14., 18. und 22. Woche im Rahmen eines Screenings auf ihr Verhalten gegenüber verschiedenen Kompetitoren getestet (vergl. Tab. 12-2).

Nε,Nα-Diacetyl-Lys-D-Ala-D-Ala sowie Acetyl-D-Ala-D-Ala wurden durch Acetylierung von NαAcetyl-Lys-D-Ala-D-Ala bzw D-Ala-D-Ala (je 1 mg/ml in Carbonatpuffer) mit Essigsäureanhydrid (molares Verhältnis Peptid : Acetanhydrid: 1:10) in Anlehnung an die in Kap. 8.3.2 beschriebenen Bedingungen (Synthese von NεTFA,NαAcetyl-Lysin) hergestellt.

Für das Screening wurden alle Kompetitoren ohne weitere Aufarbeitung in Konzentrationen von 7.600 ng/ml (Acetyl-Lys-D-Ala-D-Ala-Petide) bzw. 10.000 ng/ml (übrige Kompetitoren) eingesetzt. Zur Überprüfung der Stereospezifität wurde NαAcetyl-Lys-L-Ala-L-Ala als Kompetitor eingesetzt (10.000 ng/ml). Die Ergebnisse dieses Screenings sind in Tab. 12-4 zusammengefasst.

Im Screening wurden keine wesentlichen Unterschiede im Verhalten der verschiedenen Seren gegenüber den einzelnen Kompetitoren festgestellt, daher wurden nur noch für ein Serum (Kaninchen 2, 14. Woche) Standardkurven aufgenommen (vergl. Abb. 12-6).

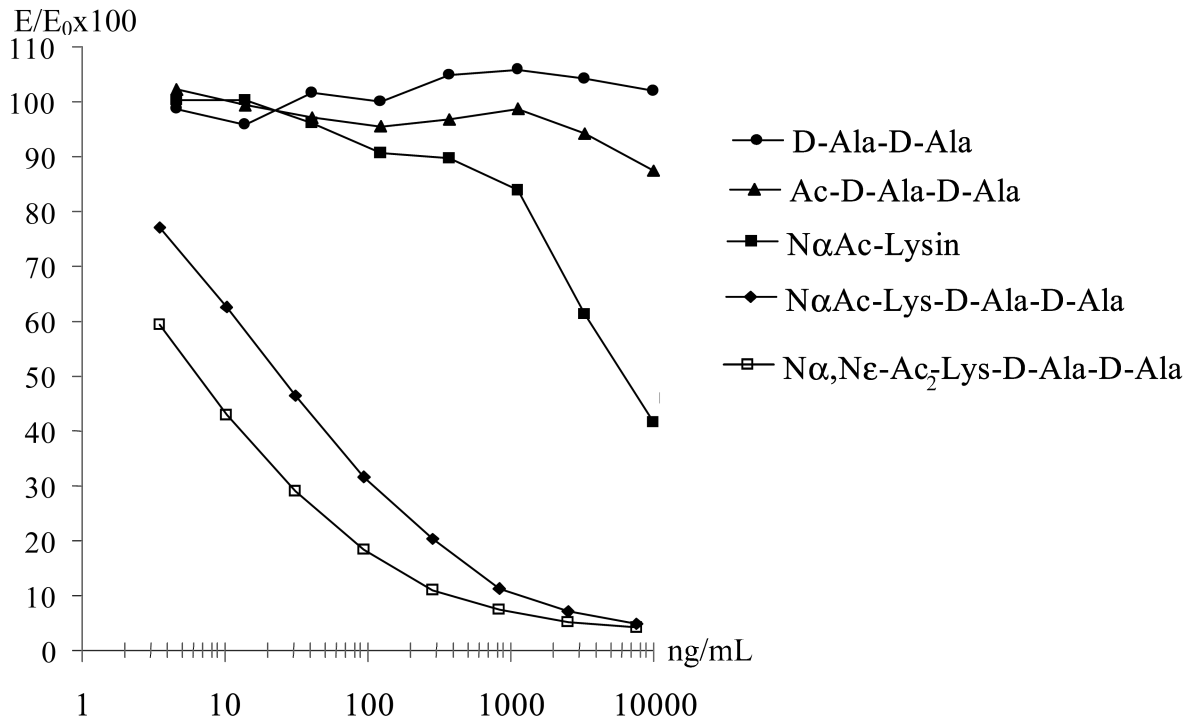


Abbildung 12-6: Standardkurven der im Epitopmapping eingesetzten Kompetitoren (nicht dargestellt: N α Acetyl-Lys-L-Ala-L-Ala), (indirekter ELISA, Tier 2/14. Woche, Verdünnung 1:80.000, E₀=1,105/20 min)

Mit beiden Acetyl-Lys-D-Ala-D-Ala-Peptiden und mit N α -Acetyl-Lysin konnte eine signifikante Hemmung erzielt werden.

Der Immunresponse aller Tiere war eindeutig gegen das vollständige N α -AcLys-D-Ala-D-Ala-Peptid gerichtet und weist zudem eine hohe Stereospezifität auf (s. Tab. 12-4). Weder das L-Ala-Diastereomer des N α Acetyl-Lys-Peptids noch NH₂-D-Ala-D-Ala zeigen eine Hemmung der Antikörper/Antigenreaktion in den getesteten Seren. Die geringfügige Hemmung (< 0,2 % Kreuzreaktivität) durch das N α Ac-D-Ala-D-Ala-Dipeptid, weist auf den Einfluss der N-terminalen Peptidbindung hin. N α Acetyl-Lysin zeigt eine nachweisbare Hemmung (0,4 % Kreuzreaktivität), die deutlich über derjenigen von N α Ac-D-Ala-D-Ala liegt. Dies zeigt, dass dem N α Acetyl-Lysin-Rest im N α Acetyl-Lys-D-Ala-D-Ala eine besondere Bedeutung für die Antikörper/Hapten-Wechselwirkung zukommt.

Die stärkere Hemmung der Antikörper/Antigenreaktion bei Verwendung des N α ,N ϵ -Diacetyl-Lys-D-Ala-D-Ala-Peptids (Kreuzreaktivität 357 %) spricht für eine weitere Stabilisierung der Antikörper/Hapten-Wechselwirkung durch den zusätzlich eingeführten N ϵ -Acetyl-Rest.

Diese Befunde zeigen, dass das Teilepitop D-Ala-D-Ala, dessen Erkennung durch die Antikörper als essentielle Grundvoraussetzung für eine Kreuzreaktivität gegen Penicilline anzusehen ist, in isolierter Form keine Affinität zu den gewonnen Antikörpern zeigt. Dieses Ergebnis wird bei den vorliegenden Seren als Ursache für die fehlende Kreuzreaktivität gegenüber Penicillinen angesehen.

Anders verhält es sich mit den getesteten Glykopeptidantibiotika. Wie unter 12.3.1 beschrieben sind diese ebenfalls als spezifische Rezeptoren aufzufassen, die mit den Antikörpern um einen gemeinsamen Liganden konkurrieren. Bei der Komplexbildung durch den Rezeptor und den Liganden spielt weniger die Struktur des Rezeptors (Vancomycin/Avoparcin/Antikörper) sondern vielmehr die Stereochemie und weitere Substitution des Alanyl-Alanin-Dipeptids eine große Rolle. Dies zeigt sich in der guten Übereinstimmung zwischen hoher Assoziationskonstante und hoher Hemmung der Immunreaktion im indirekten ELISA (Tabelle 12-5).

Das durch die Antikörper weniger gut erkannte Teilepitop $N\alpha$ -Ac-D-Ala-D-Ala (< 0,05 % Kreuzreaktivität) hat auch eine geringe Assoziationskonstante im Glykopeptidkomplex. Freies NH_2 -D-Ala-D-Ala, welches im ELISA zu keiner Hemmung führt, wird ebenfalls auch nur schwach von Glykopeptidantibiotika gebunden, das entsprechende L-Ala-L-Ala-Diastereomer hingegen praktisch gar nicht mehr.

Dies legt den Schluss nahe, dass Glykopeptidantibiotika und Antikörper in einigen grundlegenden Eigenschaften bezüglich Stereospezifität und der Fähigkeit zur Unterscheidung verschiedener D-Ala-D-Ala-Peptide große Analogien aufweisen.

Kompetitor (eingesetzte Konzentration)	Verhalten der Seren im Screeningtest ¹ (E/E0)	Tier 2/14. Woche ² 50%-Dosis [ng/ml] (Kreuzreaktivität [%])
N α Ac-Lys-D-Ala-D-Ala (7,6 μ g/ml)	vollständige Hemmung (< 10%)	25 (100)
N α ,N ϵ Ac ₂ -Lys-D-Ala-D-Ala (7,6 μ g/ml)	vollständige Hemmung (< 10%)	7 (357)
N α Ac-Lys-L-Ala-L-Ala (10 μ g/ml)	keine Hemmung (> 90 %)	--
NH ₂ -D-Ala-D-Ala (7,6 μ g/ml)	keine Hemmung (> 90 %)	--
N α Ac-D-Ala-D-Ala (7,6 μ g/ml)	schwache Hemmung (85-90 %)	>>10.000 (<< 0,25)
Ac-Lys (10 μ g/ml)	deutliche Hemmung (40-50 %)	6300 (0,4)

Tabelle 12-4: Zusammenfassung der Ergebnisse des Epitopmappings

¹ Ergebnisse des Screenings für die Seren aller Kaninchen aus der 6., 14., 18. und 22. Woche (Serumverdünnung je 1:80.000);

² Werte ermittelt durch Aufnahme von Standardkurven (vergl. Abb. 12-6)

Peptid	Assoziationskonstanten		50%-Dosis
	a) K _{ass} [l/mol]		[pmol/ml]
	b) K _{ass} (relativ) [%]		(Kreuzreaktivität [%])
	Avoparcin	Vancomycin	Tier 2/14. Woche ²
N α Ac-Lys-D-Ala-D-Ala (330 g/mol)	k.A.	k.a.	76 (25)
N α ,N ϵ Ac ₂ -Lys-D-Ala-D-Ala (372,4 g/mol)	a) 500.000 b) (100)	500.000 (100)	19 (100)
N α Ac-Lys-L-Ala-L-Ala (330 g/mol)	a) <500 b) (< 0,1)	< 500 (< 0,1)	keine Hemmung
NH ₂ -D-Ala-D-Ala (160,2 g/mol)	a) 1500 b) (0,3)	600 (0,12)	keine Hemmung
N α Ac-D-Ala-D-Ala (202 g/mol)	a) 10.000 b) (2)	20.000 (4)	>> 49000 (<< 0,05)

Tabelle 12-5: Gegenüberstellung der Assoziationskonstanten von verschiedenen Vancomycin/- und Avoparcin/D-Ala-Peptid-Komplexen [169] mit den molaren 50%-Dosen der entsprechenden Peptide für das Serum 2, 14. Woche

K_{ass} (relativ) stellt das Verhältnis der Assoziationskonstanten für einzelne Antibiotika/Peptidkomplexe bezogen auf N α ,N ϵ Ac₂-Lys-D-Ala-D-Ala dar und entspricht näherungsweise einer Kreuzreaktivität berechnet auf Grundlage der 50%-Dosen

13 Screening von Avoparcin in Futtermitteln

13.1 Ziel

Die nachfolgenden Untersuchungen sollten aufklären, inwieweit das unter Punkt 12.3.2. dargestellte ELISA-System für ein Screening zum Nachweis des unzulässigen Zusatzes von Avoparcin zu Futtermitteln geeignet ist. Die wichtigsten Anforderungen, die ein solcher Screeningtest erfüllen muss sind im Anhang in der Kommissionsentscheidung 93/256/EWG [61] definiert und lassen sich auf den eigenen Test wie folgt übertragen:

1) *Nachweisgrenze:*

Bei Stoffen, die nicht für Lebensmittel-liefernde Tiere zugelassen sind, muss die Nachweisgrenze so niedrig wie möglich sein.

Für das eigene Testsystem folgt daraus, dass die vor dem Avoparcin-Verbot übliche Mindestkonzentration von 5 mg Avoparcin / kg Futter, die gleichzeitig die Mindestkonzentration an Avoparcin zur Erzielung leistungsfördernder Wirkungen darstellt, sicher nachzuweisen sein sollte.

2) *Genauigkeit und Präzision:*

Screeningmethoden können quantitativ oder qualitativ sein, je nachdem, ob ein Stoff verboten oder zugelassen ist. Falsch-positive Ergebnisse können akzeptiert werden, falsch-negative Ergebnisse hingegen sollten bei der interessierenden Konzentration sehr selten sein.

3) *Probendurchsatz:*

Erwünscht ist ein hoher Probendurchsatz bei geringen Kosten. Daher sollten Arbeitsaufwand bei der Probenaufarbeitung und Testdurchführung möglichst gering gehalten werden.

13.2 Auswahl von Probenmaterial und Extraktionsbedingungen

13.2.1 Probenmaterialien

Die ausgewählten Probenmaterialien bzw. Mastfuttermittel sollten möglichst ein breites Spektrum in der Masttierhaltung üblicher Futtermittel abdecken, in denen Avoparcin bis zu seinem Verbot sein potentiell Einsatzfeld fand. Avoparcin-haltige reale Proben sind seit 1997 auf dem europäischen Markt nicht mehr zugänglich und standen somit für die nachfolgenden Untersuchungen nicht zur Verfügung.

Ausgenommen waren zwei reale Avoparcin-haltige Geflügelmastfutter, die zusammen mit einem Avoparcinstandard von Herrn Dr. Johannsen, (Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt (LUFÄ) Kiel) zur Verfügung gestellt wurden. Bei den übrigen Mastfuttermitteln handelte es sich um handelsübliche Avoparcin-freie Mastfuttermittel eines namhaften Futtermittelherstellers, denen im eigenen Labor Avoparcin in den relevanten Konzentrationen (5-40 mg/kg) zugesetzt wurden.

13.2.2 Extraktion von Avoparcin aus Futtermitteln

Um den Aufwand für die Probenvorbereitung möglichst gering zu halten, sollten im Rahmen der Methodenentwicklung einfache Bedingungen für die Extraktion von Avoparcin aus den betreffenden Futtermitteln gefunden werden. Diese Bedingungen sollten zum einen eine vollständige Extraktion ermöglichen, gleichzeitig aber durfte aus diesen Extraktionsbedingungen keine Störungen des Testsystems resultieren.

Avoparcin allerdings hat die Eigenschaft von Futtermittelbestandteilen wie z.B. Glykoproteinen adsorbiert zu werden. Da sich diese unspezifische Matrix/Analyt-Bindung allein durch rein wässrige Extraktionsmittel nicht lösen lässt, wurde bei den in der Literatur beschriebenen Methoden [108,109,170] ausschließlich auf Aceton/Salz-säuregemische zurückgegriffen. Diese Extraktionsbedingungen erschienen für die eigenen Belange zunächst als unvorteilhaft, da die hiermit erhaltenen Rohextrakte sowohl aufgrund ihres hohen Anteils an Aceton als auch aufgrund ihres niedrigen pH-Wertes nicht ohne weitere Behandlung zum Screening eingesetzt werden konnten. Aus diesem Grund wurde zunächst versucht sowohl pH-neutrale als auch salzsaure (pH 1) wässrige Systeme (PBS-Puffer) mit geringen Zusätzen (5-10 %) von Acetonitril als „releasing solvent“ zur Extraktion einzusetzen, wobei verschiedene Verhältnisse von Probeneinwaage zum Volumen an Extraktionsmittel (1:5 - 1:20 (w/v)) getestet wurden. Bereits im Vorfeld dieser Untersuchungen traten mit diesen Extraktionsmitteln jedoch generelle Probleme bei der Extraktgewinnung auf. Entweder verhinderte eine starke Quellung (pelletierte Futtermittel) bzw. die Bildung gelartiger Emulsionen (Milchpulver-haltige Futtermittel) die Gewinnung ausreichender Extraktmengen, oder aber die erhaltenen Extrakte (Futter auf Basis von Getreideschrot) führten selbst zu unspezifischen Störungen des Testsystems. Letztere äußerten sich in unreproduzierbaren Messergebnissen, wobei entweder die verdünnten Rohextrakte der Leerproben bereits selbst zu einer starken Hemmung ($E/E_0 < 100\%$) des Testsystems führten oder auch umgekehrt Messergebnisse deutlich oberhalb des Avoparcin-Leerwertes ($E/E_0 < 100\%$) beobachtet wurden.

Alles in allem erschien daher die Gewinnung der Rohextrakte auf Basis rein wässriger Extraktionsbedingungen wenig aussichtsreich, so dass im weiteren Verlauf dieser Untersuchung trotz der oben genannten Nachteile auf die Extraktion mit einem Aceton/Salzsäure-Gemisch in Anlehnung an die offizielle EU-Methode [109] zurückgegriffen wurde. Der Ablauf der Probenaufarbeitung ist in Abb. 12-1 zusammengefasst.

Tatsächlich traten bei Verwendung dieses Extraktionsmittels keine der oben beschriebenen Probleme während der Extraktgewinnung auf. Allerdings mussten die Extrakte aufgrund des niedrigen pH-Wertes und des hohen Acetonanteils zunächst mit Natronlauge neutralisiert und anschließend mit Puffer weiter verdünnt werden, bevor sie zum Test eingesetzt werden konnten. In Vorversuchen mit PBS-Puffer/Aceton-Gemischen zeigte sich, dass Acetongehalte unterhalb von 5% zu keiner Beeinträchtigung des ELISA führten, weshalb zunächst für die (neutralisierten) Rohextrakte (Aceton-Gehalt ca. 65 %) eine Mindestverdünnung um den Faktor 13 ausreichend erschien. Die Untersuchung eines Avoparcin-freien Probenextrakts zeigte jedoch, dass dieser in Abhängigkeit von der Verdünnung selbst zu einer deutlichen Hemmung des Testsystems führt. Ziel war es nun, eine Extraktverdünnung zu finden, bei der Störungen durch die Probenmatrix weitgehend unterdrückt werden konnten, ohne dass durch die zusätzliche Verdünnung gleichzeitig die als Ziel gesteckte Nachweisgrenze von 5 mg Avoparcin/kg Futtermittel überschritten wurde. Im Fall des untersuchten Avoparcin-freien Rohextraktes lag bei einer 1:30 Verdünnung die relative Extinktion ($E/E_0 \cdot 100$) bei ca. 80 %, was einer „scheinbaren“ Avoparcin-Konzentration von 18 ng/ml bzw. 4 mg Avoparcin/kg Futtermittel entsprach (vergl. Abb. 12-2). Mit dieser Extrakt-Verdünnung und der dabei erzielten unspezifischen Hemmung von 20 % ($E/E_0 = 80 \%$), entsprechend einer Nachweisgrenze von ca. 4 mg/kg, konnten die vorstehend genannten Randbedingungen erfüllt werden.

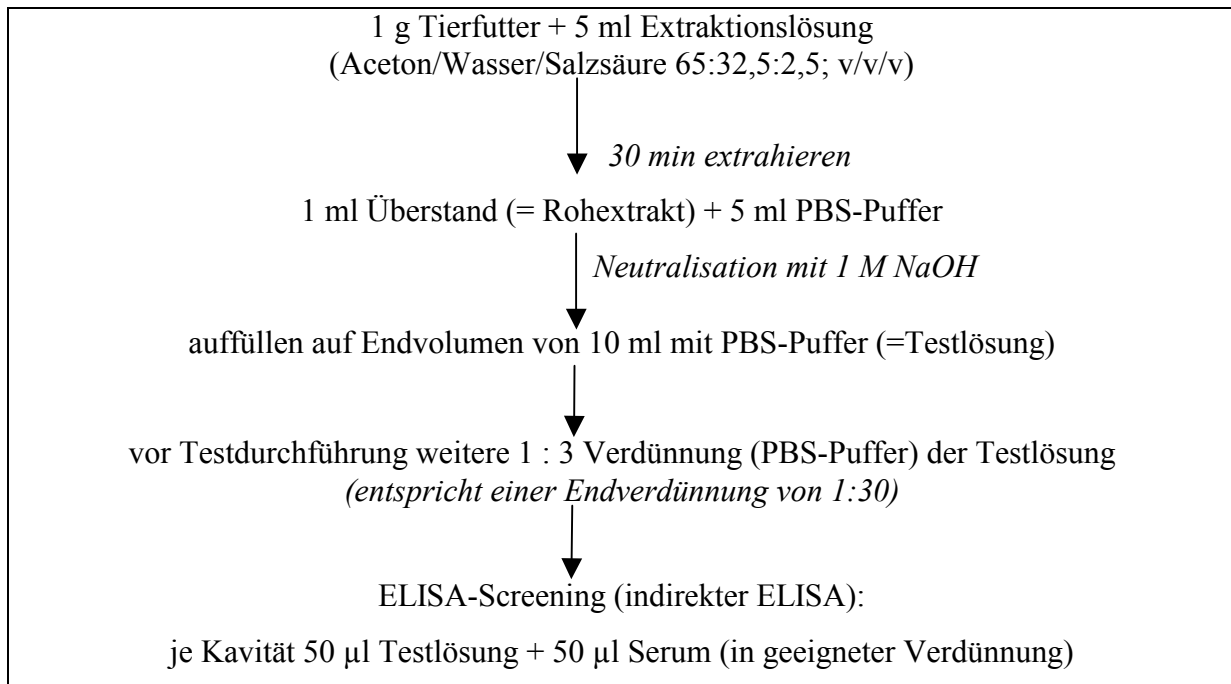


Abbildung 13-1: Ablauf der Extraktion von Avoparcin aus Futtermitteln und Vorbereitung für das Avoparcin-Screening im ELISA

13.3 Avoparcin-Screening an 50 Futterproben unter verdeckten Bedingungen

13.3.1 Qualitatives Screening

Die Untersuchung von 50 Futterproben sollte ein hohes Maß an Information bezüglich der Einflüsse verschiedener Probenmatrices auf die Nachweisgrenze, Präzision und Richtigkeit von quantitativen und qualitativen Bestimmungen liefern. Um eine objektive Beurteilung der Leistungsfähigkeit des Testsystems zu gewährleisten, erfolgte die Analyse unter „verdeckten“ Bedingungen. Dem Analytiker lagen während der Analyse keine Informationen über die Art der Proben bzw. ihre Avoparcinergehalte vor, da die Zusammenstellung der Probenserie sowie die erste Überprüfung der qualitativen Testergebnisse von einer anderen Person durchgeführt wurden.

Die Gewinnung der Probenextrakte und die Durchführung des Screenings erfolgten wie vorstehend beschrieben. Alle Probenextrakte wurden jeweils in einer Dreifachbestimmung untersucht und die Proben bis zu einer relativen Extinktion ($E/E_0 \cdot 100$) von ≤ 80 % als positiv (Avoparcin-haltig) bewertet.

Eine Zusammenstellung aller Ergebnisse befindet sich am Ende dieses Kapitels (Tabelle 13-4).

Die erste Auswertung der qualitativen Ergebnisse (Tabelle 13-1) zeigte, dass für das gesamte Probenkollektiv von 50 Proben mit Avoparcin-Konzentrationen von 3 – 45 mg/kg Futtermittel 22 % der Avoparcin-haltigen Proben (n=36) nicht richtig erkannt wurden, während gleichzeitig nur eine von 14 Avoparcin-freien Proben (7 %) fälschlicherweise einen positiven Befund ergab. Eine nach Konzentrationsniveaus gewichtete Auswertung zeigte jedoch, dass bei Proben mit Avoparcin-Konzentrationen ab 10 mg/kg nur eine Probe (n=29) zu einem falsch negativen Befund führte.

mg/kg	Anzahl der Proben	Falsch-negativ	Falsch-positiv	zweifelhaft
<i>gesamtes Probenkollektiv</i>				
0-45	50	8 (22 %; n=36)	1 (7 %, n=14)	1 (2 %, n=50)
<i>Auswertung gewichtet nach Konzentrationsniveaus</i>				
0	14	-	1 (7 %)	-
3-9	7	5 (71 %)	-	-
10-45	29	1 (3,4 %)	-	1 (3,4 %)

Tabelle 13-1: Ergebnisse des qualitativen Screenings (negativ/positiv-Entscheidung) von 50 Futtermittelproben, die unter verdeckten Bedingungen analysiert wurden (vergl. Text). Entscheidungskriterium für einen positiven Avoparcinnachweis war eine relative Extinktion (E/E0*100) von ≤ 80 %.

13.3.2 Vergleich verschiedener Verfahren zur Ermittlung der Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze (NWG) bzw. die kleinste nachweisbare Analytkonzentration, ist die Konzentration, die von negativen Proben mit einer vorgegebenen statistischen Sicherheit unterschieden werden kann. Für kompetitive ELISA-Techniken wird die Nachweisgrenze häufig über eine relative Extinktion $E/E_0 \cdot 100$ (in %) definiert. Eine in der Praxis weit verbreitete Vorgehensweise (z.B. [126, 178]) legt eine Nachweisgrenze von $E/E_0 = 80 \%$ zugrunde, d.h. Proben, mit denen im kompetitiven ELISA relative Extinktionen $\geq 80 \%$ erzielt werden, gelten als negativ. Diese Vorgehensweise orientiert sich am charakteristischen sigmoiden Verlauf typischer Standardkurven, wobei die relative Extinktion von $E/E_0 = 80 \%$ i.d.R. in unmittelbarer Nähe des oberen tangentialen Bereichs der Standardkurve liegt. In den oberen und unteren tangentialen Bereichen der Standardkurve ist eine Auswertung der Standardkurve mit einem großen Fehler behaftet und i.d.R. nicht mehr zweifelsfrei möglich.

Andere Konzepte legen einen sog. „Extinktionsmittelwert an der Nachweisgrenze“ (\bar{y}_{NWG}) zugrunde, der mittels statistischer Methoden aus den relativen Extinktionen für Analyt-freie Probenmatrices (Leerproben) abgeleitet wird ($E/E_{0(\text{Leerprobe})} [\%] = \bar{y}_0$).

So entspricht \bar{y}_{NWG} z.B. in Anlehnung an das Konzept der EU-Kommission [60, 61] dem Extinktionsmittelwert der Leerproben abzüglich der dreifachen Standardabweichung (Gleichung 13-1).¹

$$\bar{y}_{\text{NWG}} = \bar{y}_0 - 3 \cdot s \quad \text{Gleichung 13-1}$$

Da die Standardabweichung i.d.R. nur auf wenigen Messwerten beruht, empfiehlt MÄRTLBAUER [145] die Ableitung der Nachweisgrenze aus dem Extinktionsmittelwert der untersuchten Leerproben über die t-Verteilung entsprechend Gleichung 13-2, wobei \bar{y}_0 , s_0 und n_0 den Extinktionsmittelwert, die Standardabweichung und die Anzahl der Leerproben darstellen.

$$\bar{y}_{\text{NWG}} = \bar{y}_0 - t \cdot \sqrt{\frac{2 \cdot s_0^2}{n_0}} \quad \text{Gleichung 13-2}$$

Im Gegensatz zu den vorgenannten Konzepten, in denen die Nachweisgrenze aus einer relativen Extinktion abgeleitet wird, schlagen SANTARIUS und PETZ [179] die Ermittlung der Nachweisgrenze über die „scheinbare Konzentration“ in den untersuchten Leerproben vor.

Dieses Konzept orientiert sich an den praktischen Belangen der Routine-Rückstandsanalytik auf pharmakologisch wirksame Stoffe und geht unter anderem von der Tatsache aus, dass es sich bei der Untersuchung von Stichproben im Rahmen des Rückstandskontrollplanes bei über 98 % der zu untersuchenden Proben um rückstandsfreie, also Leerproben handelt. Aus dem mittleren Gehalt für diese „Leerproben“, die pro Versuchsreihe in großer Zahl vorliegen, kann deshalb für jeden Test die aktuelle Nachweisgrenze relativ einfach neu berechnet werden und ermöglicht so u.a. das Führen von Qualitätsregelkarten.

Auffällig höhere Messwerte werden als potentiell positive Proben leicht erkannt, da sie deutlich über dem Bereich der Nachweisgrenze liegen.

¹ Die Definition der Nachweisgrenze nach dem EU-Konzept gilt streng genommen nur für physikalisch-chemische Messverfahren (z.B. chromatographische Verfahren)

Im folgenden sollen die verschiedenen Konzepte zur Ermittlung der Nachweisgrenze anhand der Ergebnisse des unter 13.2.1 durchgeführten Screenings miteinander verglichen und auf ihre Anwendbarkeit auf das eigene Testsystem hin überprüft werden.

Für die erste Auswertung des Screeningtests (vergl. Tab. 13-1) wurde eine auf die relative Extinktion bezogene Nachweisgrenze (y_{NWG} : $E/E_0 = 80\%$) zugrundegelegt (im folgenden als „ \bar{y}_{NWG} (empirisch)“ bezeichnet).

In Anlehnung an die von MÄRTLBAUER [145] beschriebene Vorgehensweise wurde anhand der 14 Avoparcin-freien Proben (\bar{y}_0) der Extinktionsmittelwert der Nachweisgrenze \bar{y}_{NWG} bestimmt. Für „t“ wurden die tabellierten Werte (zweiseitige Fragestellung) [171] für $n-1$ Freiheitsgrade (f) und eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($P_{0,95}$) bzw. 1% ($P_{0,99}$) in Gleichung 13-2 eingesetzt.

Zusätzlich wurde der Extinktionsmittelwert der Nachweisgrenze nach dem EU-Konzept ($\bar{y}_{\text{NWG}} = \bar{y}_0 - 3 \cdot s$) ermittelt [60].

Da das Screening der 50 Proben auf zwei separaten Mikrotiterplatten durchgeführt werden musste, wurde für jede Mikrotiterplatte eine eigene Standardkurve aufgenommen. Die entsprechenden Nachweisgrenzen wurden für jede Platte mit den oben berechneten Werten für \bar{y}_{NWG} durch Interpolation aus der jeweiligen Standardkurve ermittelt (vergl. Abb. 13-2).

Zur Berechnung der Nachweisgrenze nach dem Konzept von SANTARIUS und PETZ [179] wurden die scheinbaren Avoparcin-Konzentrationen in den 14 Leerproben, d.h. Proben für die kein Gehalt an Avoparcin deklariert war, bestimmt. Konzentrationen unterhalb des kleinsten Messwertes der Standardkurven lagen ($c < 7,6 \text{ ng/ml}$ bzw. $< 1,2 \text{ mg/kg}$) wurden als Avoparcin-frei ($c = 0 \text{ mg/kg}$) bewertet. Die Nachweisgrenze in ng/ml Standardlösung bzw. mg/kg entspricht dem Mittelwert der scheinbaren Konzentrationen zuzüglich der dreifachen Standardabweichung (vergl. Abb. 13-2).

Die nach MÄRTLBAUER [145] ermittelten Extinktionsmittelwerte der Nachweisgrenze lagen sowohl für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % als auch von 1 % ($E/E_0 = 90\%$ bzw. 88%) deutlich oberhalb der dem Screening als Entscheidungskriterium zugrundegelegten relativen Extinktion von $E/E_0 = 80\%$ (vergl. Tab. 13-3).

Legt man die nach MÄRTLBAUER ermittelten Nachweisgrenzen einer Auswertung des Screeningtests zugrunde, so nimmt zwar die Anzahl der falsch-negativen Ergebnisse deutlich ab, gleichzeitig werden aber für ca. 21 % bzw. 14 % der Avoparcin-freien Proben falsch-positive Befunde erhalten.

Umgekehrt verhält es sich bei Zugrundelegung des in Anlehnung an das EU-Konzept ermittelten Extinktionsmittelwertes der Nachweisgrenze. Einzig für diesen Extinktionsmittelwert lag die Nachweisgrenze auf beiden untersuchten Mikrotiterplatten oberhalb von 5 mg/kg. In diesem Fall wurde zwar für Avoparcin-freie Proben kein falsch-positives Ergebnis erhalten, allerdings stieg der Anteil falsch-negativer Proben deutlich an (vergl. Tabelle 13-4).

Aufgrund dieser Zusammenhänge erwiesen sich für das qualitative Screening sowohl das ursprünglich zugrundegelegte Entscheidungskriterium von $E/E_0 = 80\%$ als auch die nach SANTARIUS und PETZ [179] ermittelte Nachweisgrenze am geeignetsten. In beiden Fällen wurden im Konzentrationsbereich von 10–40 ng bei einer geringen Anzahl falsch-positiver Proben über 90 % der positiven Proben richtig erkannt. Gleichzeitig lag die Nachweisgrenze für Avoparcin in Futtermitteln bei etwa 4 mg/kg, was theoretisch auch den Nachweis von Avoparcin-Konzentrationen unterhalb von 10 mg/kg ermöglichen sollte. Tatsächlich wurden in diesem Konzentrationsbereich die Mehrzahl der Proben jedoch nicht als Avoparcin-positiv erkannt.

Da jedoch die Variationskoeffizienten (VK) der Messwerte für den betrachteten Konzentrationsbereich zwischen 5-10 mg/kg mit einer Ausnahme deutlich unterhalb von 10 % lagen, können in diesem Konzentrationsbereich falsch-negative Befunde weder auf eine unzureichende Präzision noch auf eine zu hohe Nachweisgrenze des Testsystems an sich zurückgeführt werden. Vielmehr erscheint eine unvollständige Extraktion des Analyten aus den Futtermittelproben Ursache für das Auftreten falsch-negativer Befunde verantwortlich zu sein, insbesondere da ähnliche Beobachtungen für Konzentrationen < 10 mg/kg auch für das mikrobiologische Verfahren beschrieben wurden, dessen Extraktionsprinzip mit dem der eigenen Methode vergleichbar ist [108, 109, 170].

Extinktionsmittelwert (E/E0) der Probenleerwerte: $\bar{y}_0 = 95,4 \%$ Standardabweichung : $s = 7,1$ (n=14) <i>Extinktionsmittelwert (E/E0) der Nachweisgrenze</i>	Nachweisgrenze (NWG)			
	Platte 1		Platte 2	
\bar{y}_{NWG} (t-test)	[ng/ml]	[mg/kg]	[ng/ml]	[mg/kg]
\bar{y}_{NWG} (P _{0,95}), t = 2,16: 90 %	10	1,5	9	1,4
\bar{y}_{NWG} (P _{0,99}), t = 3,01: 88 %	12	1,8	12	1,8
\bar{y}_{NWG} (empirisch) : 80 %	25	3,8	27	4,1
$\bar{y}_{NWG} = \bar{y}_0 - 3 \cdot s$: 74 %	39	5,9	43	6,5
NWG nach SANTARIUS und PETZ	29 ng/ml bzw. 4,3 mg/kg			

Tabelle 13-2: links: Extinktionsmittelwerte der Nachweisgrenzen \bar{y}_{NWG} auf Grundlage der relativen Extinktion von 14 Probenleerwerten. Die Berechnung erfolgte a) anhand des t-Tests (zweiseitige Fragestellung), wobei sowohl eine 5%ige (P_{0,95}) als auch eine 1%ige (P_{0,99}) Irrtumswahrscheinlichkeit zugrundegelegt wurde sowie b) nach dem EU-Konzept [60, 61]. rechts: Durch Interpolation aus den jeweiligen Standardkurven ermittelte Nachweisgrenzen für die jeweiligen Extinktionsmittelwerte der Nachweisgrenze. Zum Vergleich wurde ebenfalls die nach SANTARIUS und PETZ [179] ermittelte Nachweisgrenze aufgeführt (vergl Abb. 13-3)

Extinktionsmittelwert der Nachweisgrenze	Falsch-positiv	Falsch-negativ	
	n=14 0 mg/kg	n= 36 3-45 mg/kg	n = 29 10-45 mg/kg
\bar{y}_{NWG} (P _{0,95}) = 90 %	3 (21 %)	6 (17 %)	1 (3 %)
\bar{y}_{NWG} (P _{0,99}) = 88 %	2 (14 %)	6 (17 %)	1 (3 %)
\bar{y}_{NWG} (empirisch) 80 %	1 (7 %)	8 (22 %)	1 (3 %)
NWG nach SANTARIUS und PETZ [179]	1 (7 %)	8 (22 %)	1 (3 %)
\bar{y}_{NWG} ($\bar{y}_0 - 3 \cdot s$) = 74 %	0 %	11 (30 %)	2 (7 %)

Tabelle 13-3: Verhältnis von falsch-positiven zu falsch-negativen Ergebnissen unter Zugrundelegung verschiedener Extinktionsmittelwerte für die Nachweisgrenze bzw. der Nachweisgrenzenermittlung nach SANTARIUS und PETZ. Die prozentualen Werte (Werte in Klammern) für falsch-positiv Entscheidungen beziehen sich auf 14 Avoparcin-freie Proben, diejenigen der falsch-negativen Entscheidungen auf alle 36 Avoparcin-haltigen Proben bzw. auf 29 positive Proben mit Avoparcingehalten im Bereich von 10–45 mg/kg. Zweifelhafte Befunde wurden als positive Proben gewertet.

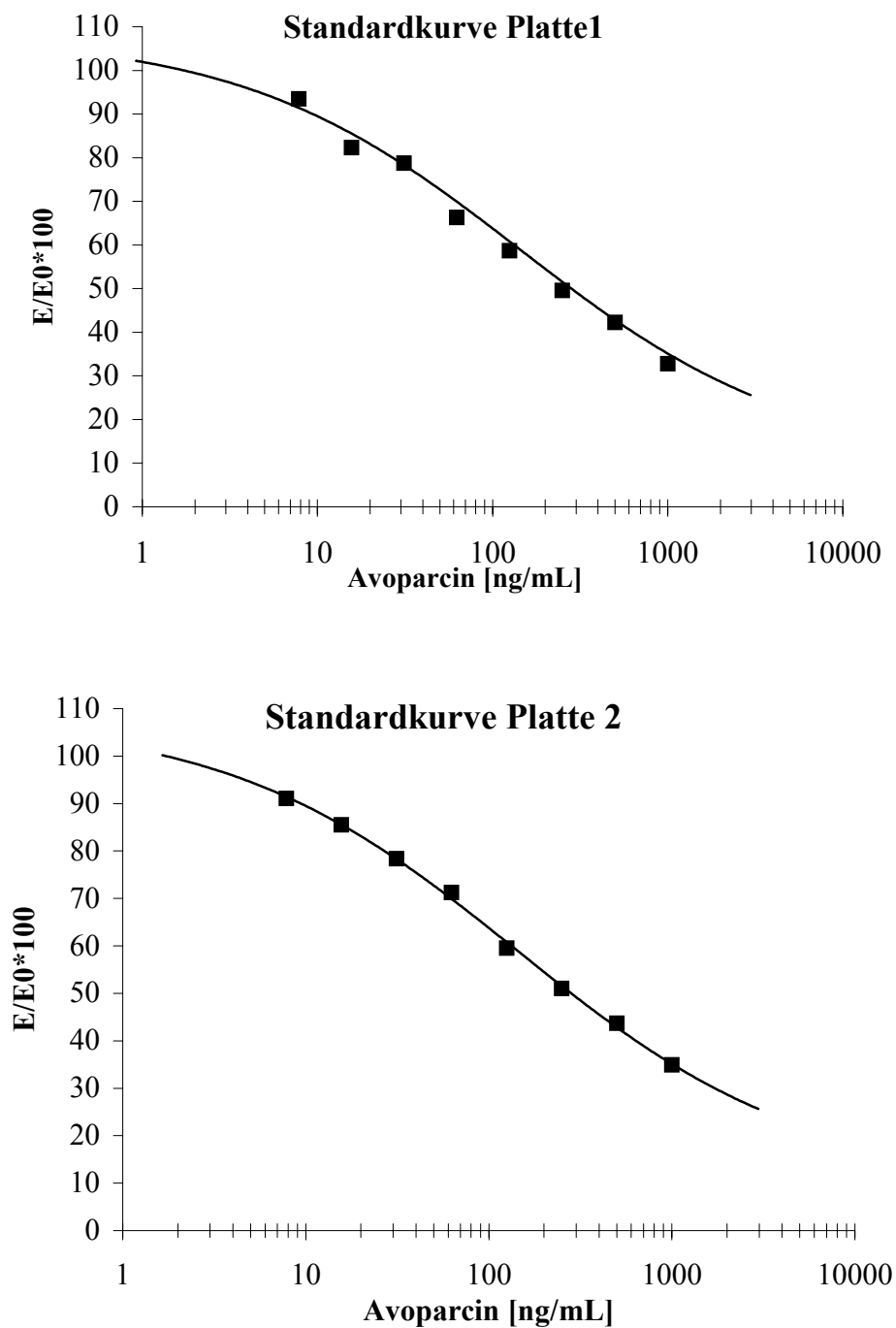


Abbildung 13-2: Standardkurven für Avoparcin für die beiden im Screening eingesetzten Mikrotiterplatten

Standardkurve Platte 1: E0 = 1,160, n = 3; 50 %-Dosis 253 ng/ml

Standardkurve Platte 2: E0 = 1,125, n = 3; 50 %-Dosis 275 ng/ml

Randbedingungen (Tier 2, Serenverdünnung 1: 45.000, TMB-Detektion: 20 min)

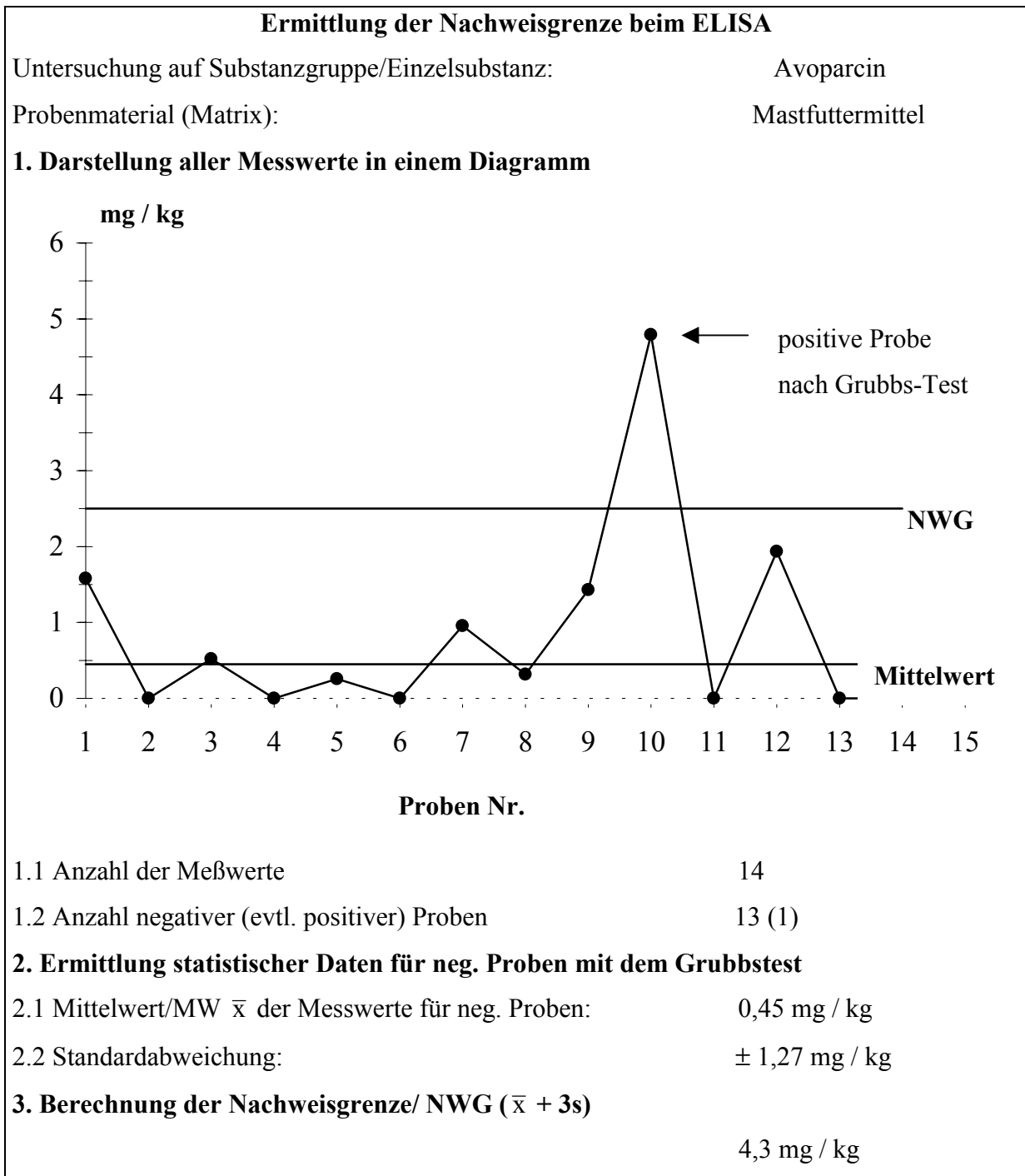


Abbildung 13-3: Ermittlung der Nachweisgrenze für den Avoparcin-ELISA nach SANTARIUS und PETZ [179] anhand der „scheinbaren Konzentrationen“ für 14 Proben, für die kein Gehalt an Avoparcin deklariert. Proben mit „scheinbaren Konzentrationen“ die unter dem kleinsten Messwert der Avoparcin-Standardkurve lagen wurden als Avoparcin-frei betrachtet ($c = 0$ mg/kg). Eine Probe (Nr. 10) musste nach dem Grubbs-Test [180] aus dem Probenkollektiv der Leerproben entfernt werden und wurde nicht zur Berechnung der Nachweisgrenze mit einbezogen. Eine solche Probe müsste als potentiell positive Probe nachuntersucht werden.

13.3.3 Präzision und Richtigkeit der Quantifizierung

Da Avoparcin als ein in der Produktion tierischer Lebensmittel verbotener Zusatzstoff nicht quantifiziert werden muss, ist nach der Kommissionsentscheidung 93/256/EWG [61] ein qualitativ-positiver Befund zum Nachweis der illegalen Verwendung ausreichend, wobei das Ergebnis des Screenings allerdings durch eine unabhängige Bestätigungsmethode verifiziert werden muss. Die Kenntnis der zu erwartenden Konzentrationen ist bei Vorbereitung und Planung der Bestätigungsmethoden hilfreich. Deshalb ist es wünschenswert durch den Screeningtest möglichst eine Abschätzung des Konzentrationsbereich zu erhalten.

Der Avoparcingehalt der im Screening als positiv befundenen Proben wurde durch Interpolation aus den entsprechenden Standardkurven ermittelt (vergl. Tabelle 13-4 am Ende des Kapitels). Die Präzision der Quantifizierung lässt sich mit Hilfe des Variationskoeffizienten (VK %) beschreiben. Nach DUDLEY [172] hängt der Variationskoeffizient der Konzentration ($VK_{(Konz)} \%$) von der Standardabweichung $s_{(E/E0)}$ der für die jeweilige Konzentration erhaltenen Einzelmesswerte (E/E0), der Anzahl der Messungen sowie dem Betrag der Steigung der Standardkurve (m_c) ab (Gleichung 13-3).

$$VK(konz)\% = \frac{s_{(E/E0)}}{c * |m_c| * \sqrt{n}} \cdot 100 \quad \text{Gleichung 13-3}$$

Aus Gleichung 13-3, folgt dass die Variationskoeffizienten der Konzentration $VK(konz)$ umso stärker zunehmen, je mehr sich die Werte dem oberen oder unteren Plateau der Standardkurve nähern, d.h. desto ungenauer wird die Konzentrationsbestimmung.

Für die während des Screenings erhaltenen Standardkurven wurden die nach Gleichung 13-3 berechneten Variationskoeffizienten $VK(konz)$ gegen die zugehörige Avoparcinkonzentration aufgetragen (Abb. 13-4), wobei die Steigung $|m_c|$ näherungsweise durch lineare Regression im betreffenden Bereich der Standardkurven berechnet wurde.

Obwohl die Variationskoeffizienten der Einzelmesswerte $VK(E/E0)$ über den gesamten Messbereich der Standardkurven maximal 5% (Platte 1) bzw. 6 % (Platte 2) betragen, ist aus Abb. 13-4 ersichtlich, dass trotz der guten Präzision der Einzelmesswerte (E/E0) im unteren Bereich der Standardkurve (5-10 mg Avoparcin/ kg Futtermittel) bei Konzentrationsbestimmungen Variationskoeffizienten von bis zu 60 % in Kauf genommen werden müssen.

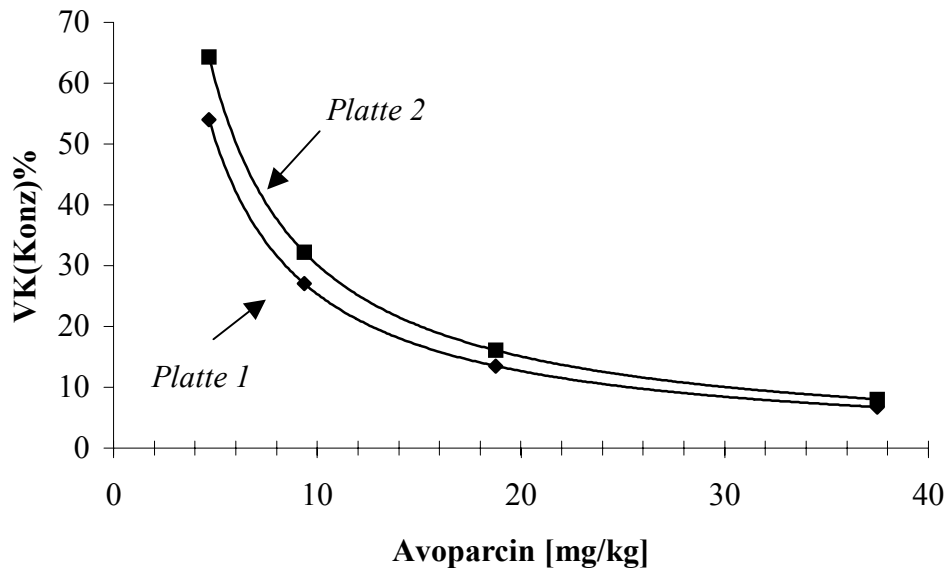


Abbildung 13-4: Abhängigkeit der nach Dudley [172] berechneten Variationskoeffizienten der Konzentrationsbestimmung VK(konz) von der jeweiligen Avoparcin-Konzentration.

Die geringe Präzision, die bei der Quantifizierung gerade im unteren Konzentrationsbereich in Kauf genommen werden muss, hat direkte Auswirkungen auf die Ermittlung der Richtigkeit der Messung. In Abb. 13-5 und Abb. 13-6 sind die Richtigkeit der Avoparcinbestimmung aus Standardlösungen bzw. die tatsächliche Wiederfindung für Avoparcin in Futterproben zusammen mit der Präzision für Avoparcinkonzentrationen zwischen 5 und 45 mg/kg graphisch dargestellt.

Die Richtigkeit der Avoparcinbestimmung für Standardlösungen lag innerhalb der oberen bzw. unteren Grenzen der berechneten „Präzisionsprofile“. Im Gegensatz dazu streuen die Wiederfindungen für Avoparcin aus Futtermitteln willkürlich von 12 % bis 170 %, wobei sich anhand der vorliegenden Daten keine Abhängigkeit weder von der Konzentration noch von der Art des Futtermittels ausmachen lässt.

In diesem Zusammenhang sei angemerkt, dass die Präzision der Messwerte für einzelne Proben ($n = 3$) bzw. für die daraus abgeleiteten E/E₀-Werte mit zwei Ausnahmen (11,7 % u. 14 %) jeweils deutlich unter 10 % lagen (vergl. Tab. 13-4). Dies muss was für ELISA-Techniken als zufriedenstellendes Ergebnis angesehen werden. Die Ursache für die starken Abweichungen der Wiederfindungen von den erwarteten Werten muss also primär in der Probenvorbereitung gesucht werden.

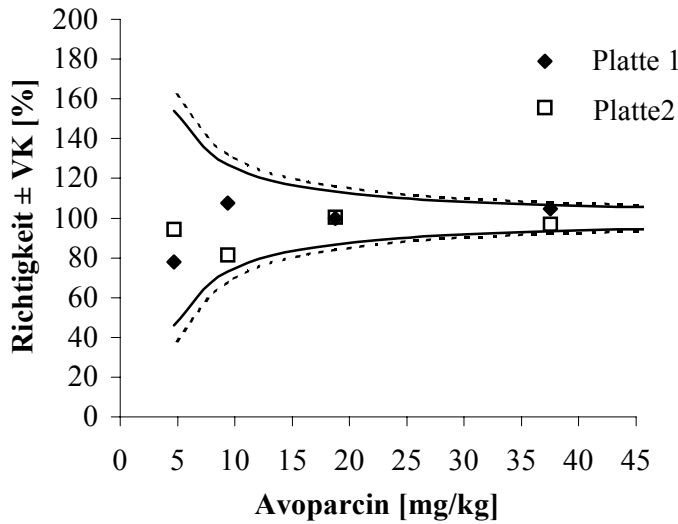


Abbildung 13-5: Vergleich der Richtigkeit und Präzision von zwei Avoparcin-Standardkurven (durchgezogene Linie: Platte 1, gestrichelte Linie: Platte 2). Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich bereits auf den entsprechenden Gehalt im Futtermitteln (1 ng/ml = 0,15 mg/kg, vergl. Aufarbeitungsschema Abb. 13-1)

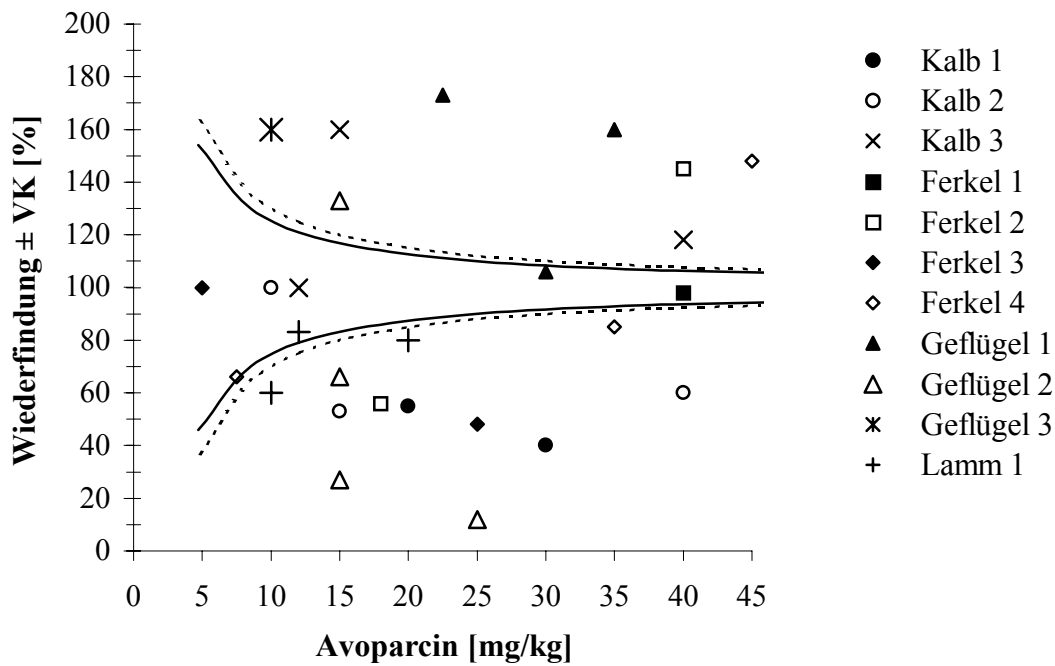


Abbildung 13-6: Vergleich von erwarteter Richtigkeit aufgrund der Untersuchung von Standardlösungen (vergl. Abb. 13-5) mit der tatsächlichen Wiederfindungen für die im Screening als positiv befundenen Futtermittel

13.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Untersuchung an 36 Avoparcin-haltigen und 14 Avoparcin-freien Futterproben zeigte, dass die Mehrzahl der positiven Proben richtig erkannt wurde, wobei ein falsch-positiver Befund auftrat. Die meisten richtigen ja/nein-Entscheidungen wurden jedoch erst für Konzentrationen von 10 mg/kg Futtermittel an aufwärts erhalten (7 % falsch-positiv; 3% falsch-negative Ergebnisse), wobei als Entscheidungskriterium für positive Befunde eine relative Extinktion von $E/E_0 \leq 80 \%$ entsprechend einer Nachweisgrenze von ca. 4 mg/kg zugrunde gelegt wurde. Eine vergleichbare Nachweisgrenze wurde auch mit dem von SANTARIUS und PETZ [178] vorgeschlagenen Konzept erhalten. Verschiedene andere Modelle zur statistischen Ableitung der Nachweisgrenze aus dem Extinktionsmittelwert für die untersuchten Leerproben, ergaben je nach Berechnungsmodell sowohl niedrigere (ca. 2 mg/kg; t-Test) als auch höhere Nachweisgrenzen (ca. 7 mg/kg; EU-Konzept) führten jedoch gleichzeitig zu einer deutlichen Verschlechterung des Verhältnisses von falsch-negativen zu falsch-positiven Proben. Mit der dem Testsystem zugrundegelegten Nachweisgrenze von 4 mg/kg sollte zwar theoretisch, wie in der Zielsetzung gefordert, 5 mg/kg Avoparcin in Futtermitteln qualitativ nachzuweisen sein, doch zeigten die Ergebnisse, dass die reale Nachweisgrenze der gesamten Methode bei ca. 10 mg/kg liegt. Dies diskreditiert nicht die Ergebnisse der Nachweisgrenzen-Ermittlung aufgrund von Matrixblindwerten sondern weist auf Analytverluste bei der Probenaufarbeitung hin.

Die in Tabelle 2-2 aufgeführten Mindestkonzentrationen entsprechen der letzten Fassung der bis 1997 gültigen Futtermittelzusatzstoffverordnung [57] und lagen mit Ausnahme von Mastschwein- und Masthuhnfutter bei 10-15 mg/kg. Diese Konzentrationen waren auch als Qualitätsmerkmal aufzufassen, das sich an den minimal erforderlichen Konzentrationen zur Erzielung einer verbesserten Mastleistung orientierte. Aufgrund dieser Tatsache kann davon ausgegangen werden, dass die Konzentrationen gegebenenfalls illegal verabreichter Avoparcin-haltiger Mastschwein- und Masthuhnfutter deutlich über den früheren Mindestwerten von 5 mg/kg bzw. 7,5 mg/kg liegen sollten.

Eine zuverlässige quantitative Bestimmung von Avoparcin in Futtermitteln ist auch bei relativ hohen Konzentrationen (20-40 mg/kg) nur unter Vorbehalt möglich. Im Screening streuten die Wiederfindungen der als positiv erkannten Proben zwischen 12 % und 170 %.

Da die zur Verfügung stehenden Daten für eine Eingrenzung möglicher Fehlerquellen nicht ausreichend waren, müsste im Zuge einer weiteren Methodenoptimierung verstärkt auf die Auswirkungen einzelner Aufarbeitungsschritte auf die quantitativen Ergebnisse hin geprüft werden. Auch müssten die Wiederfindungen für einzelne Futtermittel und Konzentrationen in eigens angelegten Studien ermittelt werden, da in der Literatur besonders für den unteren Konzentrationsbereich starke Auswirkungen der Probenmatrix auf die Wiederfindung beschrieben wurden [170]. Dies sollte auch für ein rein qualitatives Screening überprüft werden. Da eine weitere Optimierung des Testsystems nicht das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit war, wurden keine weiteren Untersuchungen mehr durchgeführt und erschienen auch aufgrund der Tatsache, dass die einzige Herstellerfirma (HOFFMANN-LAROCHE) die Produktion und den Vertrieb von Avoparcin vor kurzem eingestellt hat, als wenig sinnvoll [181]. Prinzipiell konnte aber gezeigt werden, dass sich auf Basis der gewonnenen Antikörper ein funktionsfähiger Screeningtest für den qualitativen Nachweis von Avoparcin in Futtermitteln aufbauen lässt.

Futtermittel	Gehalt mg/kg	Platte	E/E0*100	VK [%]	Gefunden mg/kg	Wiederfindung %
Milchreplacer-Alleinfuttermittel I (Kalb)	0	1	88	10	-	-
	5	2	91 fn	2,6	-	0
	20	1	67	0,9	11	55
	30	1	66	3,4	12	40
Milchreplacer-Alleinfuttermittel II (Kalb)	0	2	77 fp	3,4	5	-
	0	2	99	2,5	-	-
	10	2	69	0,6	10	100
	15	1	72	4,5	8	53
	40	2	57	0,6	24	60
Milchreplacer-Alleinfuttermittel II (Kalb)	0	1	99	2,4	-	-
	12	2	66	1,4	12	100
	15	2	58	2,8	24	160
	40	2	49	2,7	47	118
Alleinfutter I (Ferkel)	0	1	106	0,1	-	-
	3	2	95 fn	1,1	0	0
	3	2	99 fn	0,6	0	0
	5	2	95 fn	6,0	0	0
	5	2	90 fn	5	0	0
	5	2	88 fn	0,6	0	0
	8	1	110 fn	2,6	0	0
	40	2	52	6,0	39	98
Alleinfutter II (Ferkel)	0	1	105	5,5	-	-
	5	2	90 fn	1,1	0	0
	18	1	69	1,0	10	56
	40	2	47	5,0	58	145

Tabelle 13-4: Zusammenstellung der Ergebnisse des Avoparcin Screenings an 50 Futterproben fn = falsch-negativ, fp = falsch-positiv, z = zweifelhaft

Futtermittel	Gehalt mg/kg	Platte	E/E0*100	VK [%]	Gefunden mg/kg	Wiederfindung [%]
Alleinfutter III (Ferkel)	0	1	93	2,2	-	-
	0	2	104	2,3	-	-
	5	2	78	1,5	5	100
	10	1	102 fn	7,8	0	0
	25	1	66	5,1	12	48
Ergänzungsfuttermittel (Ferkel)	0	1	89	8,8	-	-
	7,5	2	78	4,3	5	66
	35	1	55	1,0	30	85
	45	2	44	8,0	67	148
Geflügelmastfutter I (reale Probe mit 15 mg/Avoparcin kg) + weiterer Avoparcinzusatz	+7,5 (22,5)	1	52	2,8	28	120
	+15 (30)	1	53	6,8	33	110
	+20 (35)	1	47	3,3	56	160
Geflügelmastfutter II (reale Probe) (reale Probe mit 15 mg/Avoparcin kg) + weiterer Avoparcinzusatz	+ 0 (15)	1	81	11,7	4	27
	+0 (15)	2	68	0,5	10	66
	+0 (15)	2	60	4,3	20	133
	+10 (25)	1	80z	1,9	4	12
Alleinfuttermittel für Hühner	0	2	99	1,6	-	-
	0	2	97	2,5	-	-
	10	2	62	1,5	16	160
Milchreplacer (Lamm)	0	1	86	0,7	-	-
	0	2	103	3,0	-	-
	10	1	76	5,3	6	60
	12	1	68	2,0	10	83
	20	1	61	14	16	80

Tabelle 13-4 (Fortsetzung)

14 Diskussion

Aus der Gruppe der β -Lactamantibiotika sind es vor allem die Penicilline, die in der Veterinärmedizin weit verbreitet eingesetzt werden. Bei Lebensmittel-liefernden Tieren kann dies zu Rückständen z.B. in Fleisch und Milch führen. Dementsprechend wurden in der EU Höchstmengen für Penicillin-Rückstände festgesetzt, deren Einhaltung von den zuständigen Behörden überprüft wird. Die Glykopeptidantibiotika Vancomycin und Teicoplanin kommen praktisch ausschließlich in der Humanmedizin zur Behandlung Penicillin-resistenter Krankheitserreger zum Einsatz. Das strukturanaloge Glykopeptidantibiotikum Avoparcin hingegen diente bis zu seinem EU-weiten Verbot 1996 in großem Umfang als Futterzusatzstoff zur Leistungssteigerung in der Tiermast.

Die vorliegende Arbeit widmet sich primär der Gewinnung eines Antiserums gegen eine bakterielles Peptid, das eine essentielle Rolle in der bakteriellen Zellwandsynthese spielt. Dieses intermediär auftretende D-Alanyl-D-Alanin-terminierte Zellwandpeptid stellt den Angriffspunkt sowohl der β -Lactam- als auch der Glykopeptidantibiotika dar.

Trotz ihrer grundlegend unterschiedlichen chemischen Struktur beruht der Wirkmechanismus beider Antibiotikaklassen auf einer Störung im Zusammenspiel des Peptids D-Alanyl-D-Alanin (D-Ala-D-Ala) mit bakteriellen D,D-Peptidasen.

D-Alanyl-D-Alanin ist Bestandteil eines bakteriellen Zellwandprecursors, dem Acetylmuramylpentapeptid. D,D-Transpeptidasen katalysieren im letzten Schritt der bakteriellen Zellwandsynthese eine Transpeptidierung, wobei ein terminales D-Alanin-Molekül aus dem Carboxy-terminalen D-Alanyl-D-Alanin-Rest des Acetylmuramylpentapeptid abgespalten wird. Gleichzeitig wird der verbleibende Peptidrest auf eine benachbarte Peptidkette übertragen. Diese Reaktion ist für Bakterien essentiell, da sie zur Quervernetzung und somit zur Stabilisierung der bakteriellen Zellwand führt. D,D-Carboxypeptidasen hingegen führen keine Transpeptidierung durch, sondern spalten lediglich das Carboxy-terminale D-Alanin aus D-Ala-D-Ala-terminierten Peptiden ab. Ihre biologische Funktion ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt.

Aufgrund von Struktur analogien zwischen D-Alanyl-D-Alanin und den β -Lactamantibiotika, werden letztere ebenfalls von D,D-Peptidasen als Substrat akzeptiert. Im Gegensatz zur Hydrolyse von D-Alanyl-D-Alanin-terminierten Peptiden werden β -Lactamantibiotika nach Hydrolyse des β -Lactamringes kovalent im aktiven Zentrum der D,D-Peptidasen gebunden. Dies führt zur irreversiblen Hemmung dieser Enzyme, die nun für die weitere Zellwandsynthese nicht mehr zur Verfügung stehen.

Während β -Lactamantibiotika als „molekulare Mimikry“ von D-Alanyl-D-Alanin zu einer irreversiblen Hemmung der D,D-Peptidasen führen, bilden die Glykopeptidantibiotika äußerst stabile Komplexe mit D-Alanyl-D-Alanin-terminierten Peptiden. Auf diese Weise wird den D,D-Peptidasen der Zugang zu ihrem Substrat verwehrt. Auch in diesem Fall unterbleibt die Quervernetzung der Zellwand von wachsenden Bakterien, was wie bei den β -Lactamantibiotika zum Tod der betroffenen Zellen führt.

Da das Dipeptid D-Ala-D-Ala die eigentliche Zielsequenz der D,D-Peptidasen darstellt, sollte es prinzipiell möglich sein, durch Immunisierung mit einem D-Alanyl-D-Alanin-Immunogen einen Antikörper zu erhalten, der ähnliche Bindungseigenschaften zu diesem Dipeptid wie eine D,D-Transpeptidase bzw. -Carboxypeptidase besitzt. Er sollte dementsprechend sowohl an D-Alanyl-D-Alanin als auch an Penicilline binden, während die Wechselwirkung mit D-Alanyl-D-Alanin-terminierten Peptiden in Gegenwart von Glykopeptidantibiotika unterbleibt. Ein solcher multispezifischer Antikörper wäre gleichermaßen in immunologischen Testsystemen sowohl zum gruppenspezifischen Nachweis der β -Lactamantibiotika als auch der Glykopeptidantibiotika einsetzbar.

14.1 Auswahl und Synthese eines geeigneten D-Alanyl-D-Alanin-Haptens

Um eine möglichst enge Homologie der Bindestelle der Antikörper mit der entsprechenden „active-site“ von Transpeptidasen zu gewährleisten sollte das verwendete Hapten selbst ein gutes Substrat für D,D-Transpeptidasen bzw. Carboxypeptidasen sein. Des Weiteren sollte es ein guter Ligand für Glykopeptidantibiotika sein und definiert an ein Trägerprotein gekoppelt werden können. Als gute D,D-Carboxypeptidasesubstrate und Komplexbildner für Glykopeptidantibiotika wurden u.a. $N\alpha$ -Acetyl-L-Lysyl-D-Alanyl-D-Alanin und $N\alpha,N\epsilon$ -Diacetyl-L-Lysyl-D-Alanyl-D-Alanin beschrieben [114, 150]. Aufgrund der erwiesenen Reaktivität gegenüber den betreffenden Enzymen sowie seiner freien und somit für Kopplungsreaktionen verfügbaren ϵ -Aminofunktion, bot sich insbesondere $N\alpha$ -Acetyl-L-Lys-D-Ala-D-Ala als Hapten bei der Immunogensynthese an wobei der Acetyl-Lysin-Rest hierbei gleichzeitig als Spacer zum Carrierprotein fungiert. Auf diese Weise soll erreicht werden, dass dem Immunsystem überwiegend der D-Ala-D-Ala-Anteil des Peptids präsentiert wird. Sowohl $N\alpha$ -Acetyl-L-Lys-D-Ala-D-Ala- als auch $N\alpha$ -Acetyl-L-Lys-L-Ala-L-Ala, letzteres sollte für die spätere Charakterisierung der gewonnenen Antikörper verwendet werden, wurden in mehrstufigen Synthesen ausgehend von L-Lysin und den Dipeptiden D-Alanyl-D-Alanin bzw. L-Alanyl-L-Alanin hergestellt.

Zunächst wurde Lysin selektiv mit S-Ethyl-trifluoro-thioacetat zum entsprechenden Nε-Trifluoracetyl-Lysin (NεTFA-Lys) umgesetzt und anschließend in einem weiteren Syntheseschritt die freie α-Aminofunktion des Lysins mit Essigsäureanhydrid acetyliert.

Das so vollständig N-geschützte Lysin wurde mit Dicyclohexylcarbodiimid und N-Hydroxy-succinimid zum reaktiven NεTFA-NαAcetyl-Lys-NHS-Ester umgesetzt, welcher wiederum mit den entsprechenden kommerziell erhältlichen Alanyl-Alanin-Peptiden zu NεTFA-NαAcetyl-Lys-D(L)-Alanyl-D(L)-Alanin umgesetzt wurde. Aus diesen Peptiden wurden abschließend die TFA-Schutzgruppe durch konz. Ammoniak abgespalten und das fertige Peptid mit Hilfe eines Anionenaustauschers isoliert. Nach der Umkristallisation aus wässrigem Ethanol konnten die betreffenden Peptide in zufriedenstellender Ausbeute (57 %) und Reinheit (> 95 %) isoliert werden.

Neben der Charakterisierung mittels chromatographischer und IR-spektroskopischer Methoden wurde auch das Komplexbildungsverhalten der synthetisierten Peptide untersucht, welches mit der biologischen Aktivität korrelieren sollte. Hier bot sich vor allem ein dünnschichtchromatographisches Verfahren an, das auf der Komplexbildung von D-Alanyl-D-Alanin-terminierten Peptiden durch Vancomycin beruht, was zu einer drastischen Abnahme der chromatographischen Mobilität im Vergleich zu den freien Komplexpartnern führt. Dieses erstmals von NIETO und PERKINS [151] beschriebene Experiment wurde mit den eigenen Peptiden nachvollzogen. Tatsächlich konnte auch hier die Komplexbildung des NαAcetyl-Lys-D-Alanyl-D-Alanins durch Vancomycin eindeutig nachgewiesen werden. Für das ebenfalls in einem Kontrollexperiment getestete L-Alanyl-Diastereomer konnte im Einklang mit der Literatur keine entsprechende Komplexbildung nachgewiesen werden.

14.2 Herstellung und Charakterisierung der Immunreagenzien

Niedermolekulare Substanzen mit einem Molekulargewicht < 10.000 Da sind i.d.R. zu klein um eine Immunantwort auszulösen und müssen zur Herstellung sogenannter Vollantigene oder Immunogene an Trägerproteine gekoppelt werden.

Des Weiteren kann die Bindung niedermolekularer Substanzen an Antikörper nur kompetitiv nachgewiesen werden, weshalb ebenfalls die Synthese von Enzym-Hapten-Konjugaten erforderlich war.

Als Trägerprotein für die Immunogensynthesen wurde eine Glucoseoxidase (GOD) aus *Aspergillus niger* verwendet, welche von BÜRK et al [162] als hochimmunogenes Trägerprotein beschrieben wurde. Zur Synthese von Enzym-Hapten-Konjugaten wurde ausschließlich auf Meerrettichperoxidase (HRP) zurückgegriffen. Des Weiteren wurde ein N α Ac-Lys-D-Ala-D-Ala-Rinderserumalbumin-Konjugat (BSA-Lys-D-Ala-D-Ala-) als Beschichtungsantigen für einen indirekten ELISA hergestellt.

Für die Synthesen der für die Immunisierung benötigten N α Ac-Lys-D-Ala-D-Ala- bzw. Ampicillin-GOD-Immunogene wurde auf die Natriumperiodatmethode nach WILSON und NAKANE [163] zurückgegriffen. Nach Aktivierung der Glucoseoxidase mittels Natriumperiodat, wurden hierbei die Haptene kovalent über ihre jeweils freien Aminogruppen an die nach der Periodatspaltung an der Glucoseoxidase verbliebenen kopplunsfähigen Aldehydgruppen kovalent gebunden. Die hierbei intermediär entstandenen Schiff'schen Basen wurden anschließend durch Natriumborhydrid zu stabilen sekundären Aminen reduziert.

Nach dem gleichen Prinzip wurde zusätzlich ein Vancomycin-Meerrettichperoxidasekonjugat hergestellt, das später zum Nachweis Protein-gebundenem N α Lys-D-Ala-D-Ala verwendet wurde.

Zur Detektion der Antikörper/Antigen-Wechselwirkung und zum Aufbau verschiedener kompetitiver ELISA-Techniken wurde sowohl ein N α Ac-Lys-D-Ala-D-Ala-Rinderserumalbumin-Konjugat (BSA-Lys-D-Ala-D-Ala) als auch ein N α Ac-Lys-D-Ala-D-Ala-Meerrettichperoxidase-Konjugat (HRP-Lys-D-Ala-D-Ala) hergestellt.

Da das BSA-Konjugat ausschließlich zur Beschichtung von Mikrotiterplatten eingesetzt werden sollte, wurde es in einer einfachen und schnell durchzuführenden Eintopfreaktion synthetisiert.

Hierzu wurden Rinderserumalbumin (BSA), Peptid und Glutardialdehyd gemeinsam zur Reaktion gebracht. Prinzipiell kann bei es bei dieser Kopplungsmethode zur Quervernetzung einzelner Proteinmoleküle kommen. Für den Einsatz als Beschichtungsantigen ist eine solche partielle Vernetzung jedoch ohne Bedeutung [140].

Bei Enzymkonjugaten, die zum Nachweis der Antikörper/Antigen-Bindung eingesetzt werden, soll hingegen prinzipiell eine Quervernetzung vermieden werden. Eine solche Vernetzung kann zu inhomogenen Konjugaten und schließlich zu unreproduzierbaren Ergebnissen in ELISA-Techniken führen [140, 141]. Um bei der Synthese des HRP-Konjugats eine Quervernetzung zu vermeiden, wurde dieses durch eine zweistufige Kopplungsreaktion hergestellt. Hierbei wurde zunächst die Meerrettichperoxidase durch Lösen in einer gepufferten Glutardialdehydlösung aktiviert. Durch den im Vergleich zum Protein hohen molaren Überschuss an Glutardialdehyd werden praktisch alle kopplungsfähigen primären Aminogruppen am Protein mit Glutardialdehyd umgesetzt, bevor es zu einer Quervernetzung kommen kann [141]. Nach Entfernung ungebundenen Glutardialdehyds durch eine Dialyse wurde das aktivierte Enzym mit dem Peptid vereinigt. Durch Ausbildung stabiler Schiff'scher Basen zwischen den Aldehydgruppen des aktivierten Proteins und den freien Nε-Aminogruppen des Peptids wird das Peptid kovalent gebunden. Sowohl bei der einfachen Kopplungsmethode als auch bei zweistufigen Synthese brauchen bei Glutardialdehydkopplungen die entstandenen Schiff'schen Basen nicht zu Aminen reduziert werden, da sie durch Mesomerie stabilisiert werden [141].

Zur Charakterisierung der Konjugate wurden sowohl chromatographische als auch immunochemische, enzym-chemische und Rezeptortestverfahren eingesetzt.

Da D-Alanin als nicht-proteinogene Aminosäure in den verwendeten Trägerproteinen bzw. Enzymen natürlicherweise nicht enthalten ist, sollte zunächst die Menge an Protein-gebundenem NαAcetyl-Lys-D-Ala-D-Ala über den D-Alaninanteil in den NαAcetyl-Lys-D-Ala-D-Ala-Protein-Konjugaten bestimmt werden. Entsprechend einem von CSAPÓ et al. [161] beschriebenen chromatographischen Verfahren, das eine Trennung von D- u. L. Aminosäuren ermöglichen soll, wurden sowohl die freien Peptide als auch die NαAc-Lys-D-Ala-D-Ala-Konjugate zunächst einer sauren Totalhydrolyse unterzogen. Durch die bei der Hydrolyse angewandte hohe Temperatur (170 °C) und die kurzen Hydrolysezeiten (45 min), soll im Gegensatz zur klassischen sauren Hydrolyse (120 °C / 24 h) praktisch keine Racemesierung auftreten.

Die auf diese Weise aus den Konjugaten freigesetzten Aminosäuren wurden daraufhin mit einer enantiomerenreinen, chiralen tetraacetyl-Thio-Glucose in Gegenwart von ortho-Phthalaldehyd zu fluoreszierenden diastereomeren Verbindungen umgesetzt und mittels isokratischer RP- HPLC getrennt. Tatsächlich konnten die diastereomeren Derivate von D- und L-Alanin sowohl aus Standardlösungen als auch aus den Hydrolysaten der Tripeptide sehr gut voneinander getrennt werden. Ebenfalls wurde in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von CSAPÓ et al. [161] nur eine geringfügige Racemesierung (< 4%) festgestellt.

Die Chromatogramme der Proteinhydrolysate waren hingegen nur unter Vorbehalt auswertbar, da es zu Interferenzen kam, welche die Auswertung der interessierenden Peaks beeinträchtigten. Als Ursache für diese Interferenzen wäre zu diskutieren, ob z.B. nicht-hydrolysierbare vernetzte Proteinbausteine oder im Zuge der Hydrolyse entstandene Retroprodukte für diese Effekte verantwortlich waren.

Einzig für das N α Ac-Lys-D-Ala-D-Ala-BSA-Konjugat konnte mit dieser Methode die erfolgreiche Konjugatsynthese nachgewiesen werden, während die Chromatogramme für das N α AcLys-D-Ala-D-Ala-GOD-Konjugat diesbezüglich nicht zweifelsfrei auszuwerten waren.

An dieser Stelle sei daraufhingewiesen, dass CSAPÓ et al. [161] in ihrer Originalveröffentlichung eine HPLC mit Gradientenelution anwandten, während zum Zeitpunkt der eigenen Analysen nur unter isokratischen Bedingungen gearbeitet werden konnte. Prinzipiell ist es daher denkbar, dass auch für die eigenen Proteinhydrolysate bei Anwendung einer Gradientenelution deutlich bessere Trennungen möglich gewesen wären. Zudem hätten darüber hinaus auch die Probleme bezüglich der rapiden Abnahme der Säulentrennleistung, die ausschließlich bei der Untersuchung von Proteinhydrolysaten auftraten, bei Verwendung eines Gradienten möglicherweise minimiert werden können.

Der eindeutige Beweis der erfolgreichen Synthese von BSA-N α Acetyl-Lys-D-Ala-D-Ala und GOD-N α Acetyl-Lys-D-Ala-D-Ala- gelang durch den Einsatz dieser Konjugate in einem von CORTI et al. beschriebenen Solid-Phase-Enzyme-Rezeptor-Assay (SPERA).

In Analogie zur indirekten ELISA-Technik wurden die Konjugate zur Beschichtung von Mikrotiterplatten verwendet. Anschließend wurde ein Vancomycin-HRP-Konjugat zugegeben. Aufgrund der hohen Affinität von Vancomycin zu D-Alanyl-D-Alanin-terminierten Peptiden konnte die Bindung des Vancomycin-HRP-Konjugat an das jeweils zur Beschichtung verwendete N α Acetyl-Lys-D-Ala-D-Ala-Protein-Konjugat nach einem Waschschrift durch eine nachgeschaltete Enzymreaktion nachgewiesen werden.

Die Spezifität der Bindung wurde durch Konkurrenzexperimente mit freiem Vancomycin und freiem N α -Acetyl-Lys-D-Ala-D-Ala erfolgreich überprüft. Gleichzeitig wurde durch den erfolgreichen Ablauf dieses Experiments die erfolgreiche Synthese des Vancomycin-HRP-Konjugats belegt, das zuvor nicht näher charakterisiert worden war.

Das Ampicillin-GOD-Konjugat wurde sowohl als Beschichtungsantigen in einem indirekten Penicillin-ELISA als auch im PENZYMTTEST® überprüft.

Der deutliche Nachweis der Bindung von anti-Ampicillin-Antikörpern an das Ampicillin-GOD-Konjugat konnte in Verbindung mit dem gleichzeitig durchgeführten Konkurrenzexperiment mit freiem Ampicillin als Hinweis auf eine erfolgreiche Konjugatsynthese angesehen werden. Da allerdings mit einer, wenn auch geringen, Kreuzreaktivität der verwendeten anti-Ampicillin-Antikörper gegenüber hydrolysiertem Penicillin gerechnet werden musste, reichten diese Experimente nicht aus um auch das Vorhandensein von intaktem Ampicillin im Konjugat zweifelsfrei zu beweisen.

Zum Nachweis von intaktem Ampicillin wurde das Konjugat im PENZYMTTEST® eingesetzt, welcher ausschließlich auf Penicilline mit einem intaktem β -Lactamsystem anspricht. Zwar musste das Konjugat noch mehrmals dialysiert werden, um Störungen des PENZYMTTEST durch nicht-proteingebundenes Ampicillin auszuschließen, doch konnte abschließend ein deutlicher Nachweis von proteingebundenem Ampicillin mit intaktem β -Lactamsystem geführt werden.

14.3 Gewinnung und Charakterisierung der Seren sowie Aufbau immun-chemischer Testverfahren

Zur Gewinnung spezifischer Antiseren wurden drei Kaninchen zunächst mit dem N α -Ac-Lys-D-Ala-D-Ala-GOD-Konjugat immunisiert und in der 14. Woche mit dem Ampicillin-GOD-Konjugat restimuliert. Dieser ungewöhnliche Ablauf des Immunisierungsprotokolls sollte eine Verstärkung der Immunantwort gegen die gemeinsamen strukturellen Merkmale von N α -Ac-Lys-D-Ala-D-Ala und Ampicillin bewirken.

Bereits sechs Wochen nach der Erstimmunisierung konnte bei allen Kaninchen eine spezifische Immunantwort ausgelöst werden. Bei allen Tieren waren spezifische Antikörper gegen das Lys-D-Ala-D-Ala-Konjugat nachweisbar. Die Restimulierung mit dem Ampicillin-GOD-Konjugat in der 14. Woche führte bei keinem Kaninchen zu einer Erhöhung der Serentiter. Des Weiteren waren keine signifikanten Unterschiede im individuellen Verhalten der Tiere gegen die Immunogene zu beobachten.

Entsprechend der Zielsetzung dieser Arbeit mussten die verwendeten ELISA-Testsysteme derart modifiziert werden, dass ein sicherer Nachweis von Penicillin-spezifischen Antikörpern bzw. mit Penicillinen kreuzreagierenden Antikörpern neben ausschließlich Lys-D-Ala-D-Ala-spezifischen Antikörpern erfolgen konnte.

Mit dem zur Titerbestimmung verwendeten direkten ELISA (HRP-Lys-D-Ala-D-Ala als Enzymmarkiertes Antigen) und auch später im indirekten ELISA (BSA-Lys-D-Ala-D-Ala als Beschichtungsantigen) führten Penicilline weder vor noch nach der Restimulierung mit dem Ampicillin-GOD-Immunogen zu einer Hemmung der Bindung der anti-Lys-D-Ala-D-Ala-Antikörper an die in beiden Testsystemen eingesetzten N α Ac-Lys-D-Ala-D-Ala-Konjugate.

Allerdings war der kompetitive Testaufbau nur bedingt für den Nachweis von Penicillin-bindenden Antikörpern geeignet. In diesem Testsystem hätte freies Penicillin nur dann zu einer kompetitiven Hemmung der Bindung der Antikörper an die Lys-D-Ala-D-Ala-Konjugate geführt, wenn die Stabilität der gebildeten Penicillin/Antikörper-Komplexe in einer vergleichbaren Größenordnung gelegen hätten, wie die Stabilität der entsprechenden Protein-Lys-D-Ala-D-Ala/Antikörper-Komplexe.

Um aus der prinzipiellen Vielzahl von unterschiedlichen Lys-D-Ala-D-Ala-spezifischen Antikörpern selektiv diejenigen Antikörper mit einer Affinität zu Penicillinen nachzuweisen, wurden die Seren in einem direkten ELISA (DASP-Technik) unter Verwendung verschiedener Penicillin-HRP-Konjugate näher untersucht. Allerdings konnte auch mit diesem Testsystem weder vor noch nach der Restimulierung mit keinem der vier Penicillin-Konjugate die gewünschte Affinität der Antikörper zu Penicillinen nachgewiesen werden.

Die nicht vorhandene Kreuzreaktivität der Antikörper gegenüber Penicillinen könnte mehrere Ursachen haben. Prinzipiell ist es durchaus denkbar, dass die strukturanaloge Bereiche von Penicillinen und D-Ala-D-Ala-terminierten Peptiden in beiden Fällen primär von den Antikörpern erkannt wurden. Im Gegensatz zum D-Alanyl-D-Alanin-Peptid hätten jedoch nach diesem Modell die nach der primären Erkennung ablaufenden Wechselwirkungen im Fall des Penicillins nicht zu einer ausreichenden Stabilisierung der primär gebildeten Penicillin/Antikörper-Komplexe geführt. Die im Rahmen eines Epitopmappings durchgeführten Experimente zeigten aber, dass die übereinstimmenden Strukturmerkmale beider Moleküle nicht tatsächlich dem für die Antikörpererkennung relevanten Epitop entsprachen. In Konkurrenzexperimenten konnte eindeutig belegt werden, dass der Immunresponse aller Tiere ausschließlich gegen das vollständige N α Ac-Lys-D-Ala-D-Ala-Peptid gerichtet war und zudem eine hohe Stereospezifität aufwies.

Sowohl das entsprechende L-Diastereomer des Peptids als auch NH₂-D-Ala-D-Ala allein führten zu keiner Kompetition der Antikörper/Antigenreaktion. Einzig mit freiem N α -Acetyl-Lysin konnte eine messbare Kompetition nachgewiesen werden, wobei die Kreuzreaktivität im Vergleich zum vollständigen Peptid jedoch nur ca. 0,4 % betrug. Diese Befunde ließen den Schluss zu, dass das gewünschte Zielepitop D-Ala-D-Ala, dessen Erkennung und Bindung durch die Antikörper als essentielle Grundvoraussetzung für eine Kreuzreaktivität gegen Penicilline anzusehen ist, in isolierter Form praktisch keine Affinität zu den gewonnenen Antikörpern zeigt. Diese Tatsache musste im Fall der vorliegenden Seren als Ursache für die fehlende Kreuzreaktivität gegenüber Penicillinen angesehen werden, da den Antikörpern diese Grundvoraussetzung für die Kreuzreaktion gegenüber Penicillinen fehlt.

An dieser Stelle müsste nun primär überlegt werden, ob sich Immunisierungsstrategien entwickeln lassen, die zu Antikörpern mit einer nachweisbar hohen Affinität zum D-Ala-D-Ala-Dipeptid führen sollten. Da ein Dipeptid prinzipiell aber immer nur ein Teilepitop eines wesentlich größeren Epitops sein kann, wird dieser Fall niemals vollständig realisiert werden können. Allerdings ist durch diese Arbeit nicht wiederlegt, dass z.B. durch Verwendung anderer Spacer und Kopplungsmethoden oder auch einfach nach einer Immunisierung von deutlich mehr als nur drei Kaninchen doch noch von einzelnen Individuen Antikörper gebildet werden, die näherungsweise bezüglich ihrer Affinität zum D-Ala-D-Ala-Dipeptid den gewünschten Anforderungen entsprechen. Ein weiterer Ansatzpunkte könnte z.B. auch in der Verwendung eines D-Ala-D-Ala-D-Ala-Tripeptids als Hapten liegen. Prinzipiell wäre zu diskutieren, ob eine Umkehrung der gewählten Immunisierungsstrategie zum Erfolg führen könnte. In diesem Fall würde z.B. die Erstimmunisierung mit einem Penicillin-Konjugat durchgeführt und erst nach Bildung Penicillin-spezifischer Antikörper würde durch die Restimulierung mit einem D-Ala-D-Ala-Immunogen der Immunresponse gegen das gemeinsame Strukturelement beider Moleküle verstärkt.

Erst anhand solcher Antikörper könnten Aussagen getroffen werden, ob die Strukturhomologien von D-Alanyl-D-Alanin und Penicillinen tatsächlich für die Gewinnung eines multispezifischen Antikörpers ausreichen.

Anders verhielt es sich mit dem Verhalten der Seren gegenüber den Glykopeptidantibiotika Avoparcin und Vancomycin. Entsprechend der in der Zielsetzung definierten Erwartung führten diese Antibiotika sowohl im direkten als auch im indirekten ELISA zu einer deutlichen Hemmung der Testsysteme.

Allerdings handelte es sich bei dieser Hemmung nicht um eine Konkurrenz der Antikörper/Antigen-Wechselwirkung im Sinne klassischer ELISA-Techniken. Vielmehr muss davon ausgegangen werden, dass in Analogie zur Hemmung von D,D-Carboxypeptidasen bzw. D,D-Transpeptidasen durch Glykopeptidantibiotika auch in diesem Fall die Bildung äußerst stabiler Glykopeptidantibiotika/Lys-D-Ala-D-Ala-Komplexe und somit die Maskierung des eigentlichen Lys-D-Ala-D-Ala-Epitops für die Unterdrückung der Antikörper/Antigen-Reaktion verantwortlich war.

Weiterführende Untersuchungen im indirekten, kompetitiven ELISA unter optimierten Bedingungen (s.u.) zeigten deutliche Unterschiede bezüglich der Sensitivität der Testsystem gegenüber den einzelnen Glykopeptidantibiotika auf. Während in Abhängigkeit vom Serum die 50%-Dosen für Avoparcin zwischen 261 und 378 ng/ml lagen, waren für Vancomycin zur Erreichung der 50%-Dosis zwischen 3373-4514 ng/ml erforderlich.

Da die in der Literatur beschriebenen Dissoziationskonstanten [169] von Avoparcin- bzw. Vancomycin/Diacetyl-Lys-D-Ala-D-Ala-Komplexen in vergleichbaren Größenordnungen liegen, sollten im ELISA für beide Antibiotika ähnliche 50%-Dosen erwartet werden. Dieser Widerspruch konnte weder durch die Antikörper/Antigenreaktion selbst noch durch die unterschiedlichen Lys-D-Ala-D-Ala-Liganden (Komplexe von freiem Lys-D-Ala-D-Ala-Komplexen *versus* BSA-N α -Acetyl-Lys-D-Ala-D-Ala) erklärt werden.

Zwar weisen die Antibiotikakomplexe verschiedener D-Ala-D-Ala-Peptide individuell sehr unterschiedliche Dissoziationskonstanten auf, doch unterscheiden sich die in der Literatur beschriebenen Konstanten für die jeweiligen Avoparcin und Vancomycin-Komplexe nur geringfügig [169]. Auch der Vergleich der im ELISA erhaltenen molaren Kreuzreaktivitäten der Antibiotika gegenüber N α Ac-Lys-D-Ala-D-Ala (=100 %), die zwischen 5 und 32 % für Avoparcin bzw. 0,3 und 2 % für Vancomycin lagen, macht deutlich, dass die Hemmung des Testsystems nicht allein durch eine 1:1-Komplexierung (1 mol Glykopeptidantibiotika / mol N α Ac-Lys-D-Ala-D-Ala) zustande kommen kann. Daher muss davon ausgegangen werden, dass neben den Dissoziationskonstanten bzw. der Stabilität der Antibiotika/Peptid-Komplexe weitere Faktoren an der Konkurrenz beteiligt sein müssen. Hierbei können neben kinetischen Einflüssen wie z.B. einer unterschiedlichen Dauer der Gleichgewichtseinstellungen für die einzelnen Antibiotika/Peptid-Komplexe auch unspezifische sekundäre Wechselwirkungen mit dem immobilisierten Carrierprotein (BSA) ebenso eine Rolle spielen, wie die Bildung von Vancomycin- bzw. Avoparcindimeren, die zu einer weiteren Stabilisierung der primär gebildeten Antibiotikum/Peptid-Komplexe führen soll [6].

Zur Aufnahme von Standardkurven allgemein wie auch später für quantitative Bestimmungen wurden kompetitive ELISA-Tests für einzelne Seren bezüglich Serenverdünnung und der Menge an Beschichtungsantigen bzw. der Konzentration an Enzym-markiertem Antigen derart optimiert, dass für das verwendete Detektionssystem Meerrettichperoxidase/Tetramethylbenzidin/H₂O₂ nach 20minütigem Substratumsatz für das ungehemmte Testsysteme eine Extinktion von 0,8-1,5 Extinktionseinheiten und gleichzeitig in Gegenwart des jeweiligen Kompetitors (N α Acetyl-Lys-D-Ala-D-Ala bzw. Avoparcin) eine maximale Hemmung erzielt wurden.

Für den auf N α Acetyl-Lys-D-Ala-D-Ala hin optimierten direkten kompetitiven ELISA (DASP-Technik) konnten je nach Serum mit Serumverdünnungen von zwischen 1:4000 und 1:8000 sowie Konzentrationen von enzymmarkiertem Antigen zwischen 62-400 ng/ml Testsysteme mit 50%-Dosen zwischen 8 und 20 ng/ml aufgebaut werden. Zwar konnten bezüglich der zur Optimierung notwendigen Kombinationen von Serumverdünnung und Enzym-markiertem Antigen deutliche Unterschiede zwischen individuellen Seren festgestellt werden, doch ließ sich anhand der 50%-Dosen zeigen, dass unter optimierten Bedingungen mit allen Systemen ähnliche Testempfindlichkeiten erzielt wurden.

Insbesondere im Hinblick auf eine Futtermittelanalytik wurden analog direkte ELISA-Systeme auf Avoparcin hin optimiert, wobei die besten Ergebnisse je nach Serum mit jeweils 5 ng BSA-Lys-D-Ala-D-Ala/Kavität und Serenverdünnungen von 1:40.000 bzw. 1:80.000 erzielt wurden. Obwohl dieses Testsystem speziell auf Avoparcin hin optimiert worden war, konnten auch hiermit für N α Acetyl-Lys-D-Ala-D-Ala 50%-Dosen zwischen 2 und 20 ng/ml und somit befriedigende bis gute Testempfindlichkeiten erzielt werden. Die entsprechenden Konzentrationen für Avoparcin lagen zwischen 234 ng/ml und 378 ng/ml. Zwar erscheinen diese Zahlen für Avoparcin relativ hoch, doch ist zu berücksichtigen das die molare Masse von Avoparcin nahezu um das 6fache größer ist als die von N α Acetyl-Lys-D-Ala-D-Ala, so dass sich diese Zahlen etwas relativieren.

14.4 Avoparcin-Screening in Futtermitteln

Das Testsystem, welches gegenüber Avoparcin die größte Empfindlichkeit aufwies, wurde für ein Avoparcin-Screening von 50 Futtermitteln eingesetzt. Mit diesem Testsystem sollten die vor dem Avoparcin-Verbot üblichen Mindestkonzentrationen von 5 mg Avoparcin/kg Futtermittel sicher nachzuweisen und zugleich eine semi-quantitative Bestimmung möglich sein.

Von besonderer Wichtigkeit für alle Screeningtests ist aber, dass falsch-positive Proben zwar in bestimmten Grenzen toleriert werden können, der Anteil falsch-negative Proben jedoch äußerst gering sein sollte.

In Vorversuchen wurden zunächst verschiedene Bedingungen für die Extraktion von Avoparcin aus Futtermitteln getestet. Ungeachtet der Tatsache, dass in der Literatur für rein wässrige Extraktionsmittel prinzipiell schlechte Wiederfindungen für Avoparcin in Futtermitteln beschrieben wurden [108, 170], sollte in eigenen Vorversuchen zunächst dennoch versucht werden, ausgehend von rein wässrigen Systemen Extraktionsbedingungen zu finden, die möglichst keine negativen Einflüsse wie z.B. eine irreversible Denaturierung auf die Serumantikörper ausüben.

Allerdings mussten diese Versuche bald eingestellt werden, da mit wässrigen bzw. nicht-denaturierend wirkenden Extraktionsmitteln je nach Art des Futtermittels verschiedene Phänomene, wie ein starkes Aufquellen der Probenmatrix bis hin zur Bildung gelartiger Emulsionen eine Extraktgewinnung erschwerten bzw. unmöglich machten.

Aus diesem Grund wurde für die weiteren Untersuchungen auf die Extraktion mit Aceton-Salzsäure-Gemischen zurückgegriffen, wie sie für die mikrobiologische Avoparcinbestimmung entsprechend der offiziellen EU-Methode [109] eingesetzt wird.

Aufgrund des hohen Anteils an Aceton sowie des niedrigen pH-Wertes konnten die so gewonnen Rohextrakte erst nach einer Neutralisation sowie einer entsprechenden Verdünnung zum Test eingesetzt werden. Wie sich im weiteren Verlauf der Untersuchungen zeigte, führten auch nicht näher definierte Matrixkomponenten zu einer unspezifischen Hemmung des Testsystems und machten eine weitere Verdünnung des Extrakts notwendig. Für die tatsächlich notwendige Endverdünnung war letztendlich nicht die Restkonzentration an Aceton in der Testlösung sondern vielmehr die Konzentration der mitextrahierten Matrixbestandteile für die tatsächlich notwendige Endverdünnung der Testlösungen bestimmend. Das absolute Verhältnis an Probeneinwaage zu resultierendem Volumen der ELISA-Testlösung betrug letztendlich 1:150.

Nachweisgrenze und Qualitatives Screening

Die Nachweisgrenze (NWG) bzw. die kleinste nachweisbare Analytkonzentration, ist die Konzentration, die von negativen Proben mit einer vorgegebenen statistischen Sicherheit unterschieden werden kann. Leider gibt es zur Zeit kein allgemein verbindliches Verfahren die Nachweisgrenze eines ELISA-Systems zu ermitteln. Für kompetitive ELISA-Techniken wird die Nachweisgrenze häufig über eine relative Extinktion $E/E_0 \cdot 100$ definiert.

Eine in der Praxis weit verbreitete Vorgehensweise (z.B. [126, 178]) legt eine „relative Extinktion an der Nachweisgrenze“ von $E/E_0 = 80\%$ zugrunde, d.h. Proben, mit denen im kompetitiven ELISA relative Extinktionen $\geq 80\%$ erzielt werden, gelten als negativ. Zunächst mag diese Definition willkürlich erscheinen. Allerdings ist zu beachten, dass dieser Vorgehensweise der charakteristische sigmoide Verlauf typischer Standardkurven zugrunde liegt. Typischer Weise liegt in kompetitiven ELISA-Techniken die relative Extinktion von $E/E_0 = 80\%$ in unmittelbarer Nähe des oberen tangentialen Bereichs der Standardkurve. In diesem Bereich aber ist eine Auswertung der Standardkurve mit einem großen Fehler behaftet und i.d.R. nicht mehr zweifelsfrei möglich.

Die obige Festlegung der Nachweisgrenze setzt voraus, dass die Probenmatrix nicht selbst zu einer signifikanten Beeinflussung des Testverfahrens führt. Um mögliche Störungen der Probenmatrix zu erkennen bzw. in die Nachweisgrenze mit einzubeziehen, wird empfohlen die Nachweisgrenze anhand von Untersuchungen an Analytfreien-Proben (Leerproben) zu ermitteln und statistisch abzusichern [145, 179].

Mit dem Ziel die Einflüsse verschiedener Probenmatrixen auf die Nachweisgrenze, Präzision und Richtigkeit von quantitativen und qualitativen Bestimmungen des eigenen Testsystems zu ermitteln wurden 50 Futterproben mit Avoparcingehalten zwischen 0 und 45 mg/kg unter „verdeckten“ Bedingungen analysiert.

Als Nachweisgrenze wurde in Anlehnung an die Literatur [126, 178] zunächst eine relative Extinktion $E/E_0 = 80\%$ zugrundegelegt. Die für diese Hemmung aus den Standardkurven ermittelte Nachweisgrenze für Avoparcin betrug ca. 4 mg/kg Futtermittel. Unter Zugrundelegung dieser Nachweisgrenze sollten die ehemals in Futtermitteln als Mindestmengen eingesetzten Avoparcin-Konzentrationen von 5 mg/kg theoretisch nachweisbar sein. Allerdings zeigte das Screening, dass Avoparcingehalte unterhalb von 10 mg/kg nicht sicher erfasst werden konnten. Erst oberhalb von 10 mg/kg wurde nur eine von 29 positiven Proben als falsch-negativ (3%) und eine von 14 Avoparcin-freien Proben als falsch-positiv (7%) bewertet.

Die statistische Ermittlung der Nachweisgrenze anhand der „scheinbaren Konzentrationen“ in den 14 Avoparcin-freien Proben nach dem Konzept von SANTARIUS und PETZ [179] führte zum gleichen Ergebnis. Neben der Tatsache, dass die nach diesem Verfahren ermittelte Nachweisgrenze (ebenfalls ca. 4 mg/kg) auf statistischen abgesicherten Daten beruht, liegt der Vorteil dieses Konzepts darin begründet, dass es sich stark an den Belangen der Routineanalytik auf Rückstände von pharmakologisch wirksamen Substanzen orientiert.

So lässt sich mit diesem Verfahren die aktuelle Nachweisgrenze anhand der in der Praxis in großer Anzahl anfallenden negativen Proben für jede Testserie relativ einfach neu berechnen. Weitere Verfahren, wie die Berechnung eines sogn. „Extinktionsmittelwertes an der Nachweisgrenze“ über den t-test nach MÄRTLBAUER [145] oder in Anlehnung an das EU-Konzept [61] waren nicht geeignet eine realistische Nachweisgrenze für den Screeningtest zu ermitteln. Die nach MÄRTLBAUER auf Basis der t-Verteilung (Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 %) berechneten „Extinktionsmittelwerte an der Nachweisgrenze“ täuschten eine zu niedrige Nachweisgrenze vor ($E/E_0 = 88\%$ bzw. ca. 2 mg/kg), was zu einem hohen Anteil falsch-positiver Befunde (14 %) führte. Im Gegensatz dazu führte die Berechnung des „Extinktionsmittelwertes an der Nachweisgrenze“ in Anlehnung an das EU-Konzept zu einer sehr hohen Nachweisgrenze ($E/E_0 = 74\%$ bzw. ca. 6 mg/kg) und somit zu einem hohen Anteil falsch-negativer Befunde (7%). Das EU-Konzept berücksichtigt jedoch in erster Linie physikalisch-chemische Messverfahren (z.B. chromatographische Verfahren).

Da für physikalisch-chemische Messverfahren im Gegensatz zu kompetitiven ELISA-Techniken ein linearer Zusammenhang zwischen gemessenem Signal und Konzentration besteht, wäre an dieser Stelle zu diskutieren, inwieweit sich das EU-Konzept überhaupt auf die sigmoiden Kurvenverläufe in ELISA-Techniken übertragen lässt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass von den statistischen Methoden einzig das Konzept nach SANTARIUS und PETZ [179] für einer realistische Beurteilung der Nachweisgrenze des Avoparcin-ELISA geeignet war. Der hohe Anteil falsch-negativer Befunde im unteren Konzentrationsbereich (< 10 mg/kg) kann mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine unvollständige Extraktion des Analyten zurückgeführt werden und diskreditiert daher nicht die Konzepte der Nachweisgrenzenermittlung aufgrund von Matrixblindwerten. Zwar wird die Nachweisgrenze für Avoparcin entsprechend der offiziellen EU-Methode [109] mit 2 mg/kg Futtermittel angegeben, doch zeigten verschiedene Autoren an einer Vielzahl von Probenmaterialien, dass auch nach dem mikrobiologischen Verfahren im unteren Konzentrationsbereich aufgrund schlechter Wiederfindungen ebenfalls falsch-positive

Befunde auftreten können [170, 182]. Die in der bis zum Avoparcinverbot gültigen Fassung der Futtermittelzusatzstoffverordnung [57] aufgeführten Mindestkonzentrationen an Avoparcin lagen mit Ausnahme von Mastschwein- und Masthuhnfutter bei 10-15 mg/kg und waren ursprünglich auch als Qualitätsmerkmal aufzufassen, das sich an den minimal erforderlichen Konzentrationen zur Erzielung einer verbesserten Mastleistung orientierte. Aufgrund dieser Tatsache kann davon ausgegangen werden, dass auch für Avoparcin-haltige Mastschwein- und Masthuhnfutter die bei missbräuchlicher Anwendung zu erwartenden Konzentrationen deutlich über den Mindestwerten von 5 mg/kg bzw. 7,5 mg/kg liegen und mit dem Testsystem erfasst werden können.

Quantitative Bestimmungen

Eine zuverlässige quantitative Bestimmung von Avoparcin in Futtermitteln war auch bei relativ hohen Avoparcin-Konzentrationen (20-40 mg/kg) nur unter Vorbehalt möglich. Trotz der guten Richtigkeit für Standardlösungen und der guten Präzision (i.d.R. < 5%) für die jeweiligen Extinktionsmittelwerte der Probenmesswerte, streuten die Wiederfindungen der im Screening als positiv erkannten Proben zwischen 12 % und 170 %.

Eine weitere Optimierung des Testsystems war jedoch nicht primäres Ziel dieser Arbeit und erschien auch aufgrund der Tatsache dass die einzige Herstellerfirma die Produktion und den Vertrieb von Avoparcin vor kurzem eingestellt hat, als wenig sinnvoll [181]. Prinzipiell konnte jedoch gezeigt werden, dass die vorgestellten Strategien zur Gewinnung von Antikörpern auf Grundlage des natürlichen Wirkmechanismus von Glykopeptidantibiotika und ein ebenfalls auf diesen Grundlagen basierendes ELISA-System zu einem brauchbaren Screeningtest für Avoparcin geführt haben.

14.5 Schlussbetrachtung und Ausblick

Für die Rückstandsanalytik von Tierarzneimitteln in Lebensmitteln stehen für zahlreiche relevante Substanzklassen kommerzielle Screeningtests zur Verfügung, die einen hohen Probendurchsatz erlauben und gleichzeitig neben einer ja/nein-Entscheidung die Eingrenzung eines positiven Befundes auf bestimmte Wirkstoffgruppen ermöglichen. Damit kann die Zahl der Proben deutlich reduziert werden, die für eine eindeutige Identifizierung und Quantifizierung von Rückständen mit zeit- und personalintensiven physikalisch-chemischen Methoden untersucht werden müssen.

Bei diesen Screeningtests handelt es sich vornehmlich um mikrobiologische, Rezeptortest- oder immun-chemische Verfahren. Trotz der Unterschiede in Aufbau und Durchführung liegt diesen Testsystemen ein universelles Prinzip spezifischer Rezeptor/Ligand-Wechselwirkungen zugrunde. So sind in zahlreichen kommerziellen Rezeptortests auf Antibiotika die verwendeten Rezeptoren identisch mit bakteriellen Proteinen bzw. Enzymen, die mit dem betreffenden Wirkstoff stabile Komplexe bilden. Die entsprechenden Rezeptor/Ligand-Wechselwirkungen werden durch Konkurrenzexperimente z.B. mit Enzym- oder radioaktiv-markierten Analoga des betreffenden Wirkstoffes nachgewiesen. Immun-chemische Testverfahren entsprechen in Durchführung und Aufbau prinzipiell den Rezeptortestverfahren, nur dass hier die genannten Rezeptorproteine durch spezifische Antikörper ersetzt sind, die nach einer gezielten Immunisierung von Versuchstieren mit dem betreffenden Wirkstoff gewonnen werden.

In mikrobiologischen Testsystemen hingegen wird die Bindung z.B. eines Antibiotikums an ein spezifisches Rezeptorprotein bzw. Enzym durch ein vermindertes Wachstum des Testkeims oder eine Änderung der Stoffwechsellistung angezeigt.

Leider stehen bei weitem nicht für alle Rückstands-relevanten Substanzklassen entsprechende Testkeime oder Rezeptoren zur Verfügung. Ebenfalls sind der Gewinnung spezifischer Antikörper Grenzen gesetzt, was verschiedene Gründe haben kann, wie mangelnde chemische Stabilität oder Immunogenität des Wirkstoffes oder schlichtweg eine zu große Toxizität, welche die notwendigen Tierexperimente verbietet.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es prinzipiell möglich ist, Antikörper für die Analytik eines Antibiotikums zu gewinnen, obwohl die Immunantwort der immunisierten Kaninchen nicht direkt gegen dieses Antibiotikum gerichtet war.

Durch die Immunisierung mit dem intermediären Zellwandpeptid Lys-D-Ala-D-Ala gelang es Antikörper zu generieren, die sich, zumindest gegenüber einer der beiden betrachteten Antibiotikaklassen, den Glykopeptidantibiotika, ähnlich wie bakterielle D,D-Transpeptidasen verhalten, deren Wechselspiel mit D-Ala-D-Ala-terminierten Peptiden für die bakterielle Zellwandsynthese essentiell ist.

Die Glykopeptidantibiotika treten selbst als Rezeptoren für D-Alanyl-D-Alanin-terminierte Peptide auf und stimmen mit dieser Eigenschaft sowohl mit den gewonnenen Antikörpern als auch, zumindest vordergründig betrachtet, mit bakteriellen D,D-Transpeptidasen überein.

Mit diesen Antikörpern ließ sich ein funktionierendes ELISA-Testsystem für den Nachweis von Avoparcin in Futtermitteln aufbauen, in dem der Antikörper im Gegensatz zu klassischen ELISA-Techniken nicht selbst an den Analyten bindet, sondern der Analyt selbst als Rezeptor mit dem Antikörper in Konkurrenz tritt. Bisher wurde in der gesichteten Fachliteratur zur Lebensmittel- oder Futtermittelanalytik kein vergleichbares Testsystem beschrieben.

Dieses positive Ergebnis der vorliegenden Arbeit zeigt einen völlig neuen Wege zur Gewinnung spezifischer Rezeptoren für die Rückstandsanalytik auf, auch wenn das weitere Ziel dieser Arbeit, welches zu einem multi-spezifischen Rezeptor für die Analytik von β -Lactamantibiotika führen sollte, nicht erreicht werden konnte.

Die prinzipielle Richtigkeit dieser Strategie in Bezug auf die β -Lactamantibiotika konnte jedoch anhand der gewonnenen Antikörper weder belegt noch widerlegt werden. Zwar wurde das zur Immunisierung verwendete Hapten N α -Acetyl-Lys-D-Ala-D-Ala mit hoher Affinität von den gewonnenen Antikörpern gebunden, doch konnte für das eigentlich interessierende Strukturmerkmal D-Alanyl-D-Alanin keine Affinität gegenüber den Antikörpern festgestellt werden konnte. Aus diesem Grund war schlichtweg die strukturellen Voraussetzung für eine Kreuzreaktivität der Antikörper gegenüber Penicillinen von vornherein nicht gegeben.

In der Futtermittelanalytik geht der Trend verstärkt zu multispezifischen mikrobiologischen Screeningtests, mit denen sich eine Vielzahl verschiedener Antibiotikaklassen nebeneinander nachweisen lassen. Diese Testsysteme lassen jedoch oftmals keine Identifizierung einzelner Substanzklassen zu. Aufgrund der hohen Spezifität des eigenen Testsystems gegenüber Glykopeptidantibiotika, die durch den außergewöhnlichen Testaufbau gewährleistet wird, könnte der vorgestellte ELISA als sinnvolle Ergänzung der mikrobiologischen Methoden eingesetzt werden. An dieser Stelle sollte auch überlegt werden, die Antikörper zur Entwicklung eines Stäbchenschnelltests zu nutzen, welcher bei geringerem Probenaufkommen oder im Rahmen einer Feldanalytik als Alternative zum ELISA-Verfahren eingesetzt werden könnte.

Weiterführende Arbeiten mit diesen Antikörpern sollten auch die Möglichkeit ihres Einsatzes in der klinischen Chemie berücksichtigen. Aufgrund der schmalen therapeutischen Breite der Glykopeptidantibiotika wird die parenterale Therapie stets von einer ständigen Überwachung des Serumlevels begleitet. Hier sollte auf jeden Fall geprüft werden, ob sich in Analogie zum vorgestellten ELISA Testsysteme entwickeln lassen, die zur Überwachung der Glykopeptidantibiotika-Konzentration in Patientenserum geeignet sind. In den zur Zeit auf dem Markt erhältlichen immun-chemischen Bestimmungsmethoden für Vancomycin werden Antikörper eingesetzt, die direkt gegen den Analyten gerichtet sind. Allerdings wird für einige dieser Antikörper eine Kreuzreaktivität gegen mikrobiell inaktive Vancomycin-Abbauprodukte beschrieben. Da diese Abbauprodukte auch unter physiologischen Bedingungen entstehen, können sie u.U. bei nierengeschädigten Patienten zu einer Fehleinschätzung des tatsächlichen Vancomycinlevels führen. Bei Verwendung des in dieser Arbeit vorgestellten ELISA-Prinzips sollten solche Probleme prinzipiell nicht erwartet werden, da ausschließlich nur die mikrobiell aktiven Formen der Glycopeptidantibiotika erfasst werden. Aufgrund seines außergewöhnlichen Funktionsprinzips wäre das Testsystem darüber hinaus nicht auf einzelne Glycopeptidantibiotika beschränkt. Vielmehr könnte es universell zur Bestimmung sowohl der zur Zeit gebräuchlichen Glycopeptidantibiotika Vancomycin und Teicoplanin als auch darüber hinaus für zukünftig in der Medizin eingesetzte Glycopeptidantibiotika genutzt werden.

15 Material und Methoden

15.1 Synthese der N α Ac-Lys-Ala-Ala-Peptide

15.1.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Rundkolben 50 ml/100 ml/ 250 ml mit Schliff und Glasstopfen

Glasfilterfritte G5

Filterpapiere diverse Größen

Pasteurpipetten

Scheidetrichter 250 ml

Bechergläser div. Größen

Spitzkolben 25 ml

Voll- und Messpipetten in div. Größen

Messzylinder

Zentrifugengläser mit Schraubgewinde und PTFE-Dichtung, 13 ml (Corning, Wiesbaden)

Ultraschallbad Sonorex RK 100 (Bandelin, Berlin)

Vibrationsmischer für Reagenzgläser Ika-Vibro VF 2 (Janke & Kunkel, Staufen)

15.1.2 Synthese von N ϵ Trifluoracetyl-Lysin (nach Schallenberg und Calvin)

Zu einer Lösung von 1,83 g (10 mmol) von L-Lysin-Monohydrochlorid (Sigma, L 5626) in 10 ml 1 N NaOH wurden 2 ml (16 mmol) S-Ethyltrifluoro-thioacetat (Sigma, E 4380) gegeben. Die heterogene Lösung wurde 6 Stunden gerührt, wobei sich langsam ein voluminöses Präzipitat abschied, welches schließlich die Lösung vollständig ausfüllte. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend im Eisbad 30 min gekühlt und das Rohprodukt durch Filtration abgetrennt. Das Rohprodukt wurde daraufhin in 10 ml heißem Wasser gelöst und mit 15 ml heißem Ethanol versetzt. Beim Abkühlen schied sich das Produkt in Form weißer Kristalle ab.

Ausbeute: 53 %; Schmelzpunkt: 227 -230°C dc. (Lit: 226-231°C dc.)

15.1.3 Synthese von N ϵ -Trifluoracetyl,N α -Acetyl-Lysin

N ϵ -Trifluoracetyl,N α -Acetyl-Lysin wurde durch Acetylierung des unter 10.1.1 hergestellten N ϵ -Trifluoracetyl-Lysins mit Essigsäureanhydrid hergestellt:

Eine Lösung von 1,0 g (4,14 mmol) N ϵ -Trifluoracetyl Lysin in 20 ml Wasser wurde mit einer Lösung von 0,75 g (7,5 mmol) Essigsäureanhydrid in 8 ml Acetonitril versetzt und der pH-Wert unter ständigem Rühren mit 10%iger (w/v) NaHCO₃-Lösung auf pH 8-9 eingestellt.

Dieser Reaktionsansatz wurde unter Kontrolle des pH-Wertes (pH-Papier) solange gerührt, bis mit Ninhydrin-Reagenz keine freien Aminogruppen mehr detektiert wurden (Tüpfeltest auf DC-Folien). Daraufhin wurde das Reaktionsgemisch in einen Schütteltrichter überführt und 5 mal mit jeweils 40 ml MIBK (Methylisobutylketon, Sigma M 8795) ausgeschüttelt, die vereinigten MIBK-Phasen 30 min über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und anschließend am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt.

Der zurückbleibende ölige Rückstand wurde mit 10 ml Diethylether versetzt und im verschlossenen Kolben solange im Ultraschallbad behandelt, bis sich langsam ein feiner weißer Niederschlag abschied. Nach zweistündiger Tiefkühlung (-20 °C) wurde der Niederschlag durch einen Glasfiltertiegel (Porosität 5) abfiltriert, mit 1 ml eiskaltem Ether getrocknet und anschließend in einem evakuierten Excikkator über Silikagel bis zur Massenkonstanz getrocknet. Ausbeute: (73 %)

15.1.4 Synthese von N ϵ -TFA,N α -Acetyl-Lysinyl-NHS-Ester (nach Anderson [158])

900 mg (3,15 mmol) N ϵ -Trifluoracetyl,N α -Acetyl-Lysin wurden zusammen mit 543 mg (4,73 mmol) NHS (N-Hydroxysuccinimid; Sigma H 7377) unter Erwärmung im Wasserbad (40 °C) in einem 50 ml Rundkolben gelöst und anschließend im Wasserbad auf 0 °C abgekühlt.

In einem zweiten Gefäß wurden 715 mg (3,46 mmol) DCCI (N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid Sigma D 3128) in 2 ml Acetonitril gelöst, und diese Lösung wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette zügig in die gerührte N ϵ -Trifluoracetyl,N α -Acetyl-Lysin/NHS-Lösung überführt. Bereits nach wenigen Sekunden zeigte die Bildung eines weißen Niederschlags von Dicyclohexylharnstoff das Einsetzen der Reaktion an. Das Reaktionsgemisch wurde weitere 4 Stunden unter Eiskühlung gerührt, anschließend filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt, wobei sich das Produkt i.d.R. als weißes kristallines Pulver niederschlug. Dieses wurde daraufhin in 5 ml Isopropanol suspendiert und anschließend durch Filtration über einen Büchnertrichter (doppeltes Filterpapier) isoliert und im Vakuumexsikkator bei 50 °C über Silikagel getrocknet.

Bei einigen Ansätzen blieb die Kristallisation aus. In diesen Fällen wurde der ölige Rückstand mit 1 ml Diethylether versetzt und mit Hilfe eines Glasstabs bis zum Einsetzen der Kristallisation gerührt. Anschließend wurde das Produkt wie vorstehend beschrieben isoliert. Ausbeute: 85 %; Schmelzpunkt: 119 °C

15.1.5 Kopplung des Nε-TFA,Nα-Acetyl-Lysin-NHS-Esters an Alanyl-Alanin

500 mg (3,1 mmol) L-Alanyl-L-Alanin (Sigma A 9502) oder D-Alanyl-D-Alanin (Sigma A 0912) und 263 mg (3,13 mmol) NaHCO₃ wurden gemeinsam in 6 ml Wasser gelöst. In einem zweiten Gefäß werden 800 mg (2,1 mmol) Nε-TFA,Nα-Acetyl-Lysin-NHS in 10 ml Acetonitril gelöst und diese Lösung wird mit Hilfe einer Pasteurpipette zügig in die gerührte Alanyl-Alanin-Lösung überführt. Der Reaktionsansatz wird 90 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 50 ml Wasser versetzt. Diese Lösung wurde am Rotationsverdampfer bei 40 °C von überschüssigem Acetonitril befreit. Um hierbei Verluste durch Siedeverzüge zu vermeiden, durfte der Druck in der Apparatur nur langsam und unter ständiger Überwachung herabgesetzt werden. Sobald sich ca. 10 ml Acetonitril im Auffanggefäß gesammelt hatten, wurde der Reaktionsansatz auf Raumtemperatur gebracht, filtriert, auf einen vorbereitete Kationenaustauscher-Säule (s.u.) gegeben und mit 100 ml Wasser bei einer Tropfgeschwindigkeit von 1 Tropfen pro Minute „eluiert“. Das Eluat wurde in 5 ml Fraktionen gesammelt, die im Lowry-Test positiven Fraktionen (s.u.) gepoolt und am Vakuum-Rotationsverdampfer bei 40 °C vorsichtig bis zur Trockene eingengt.

Die Umkristallisation erfolgte durch Lösen des Rohproduktes in 5 ml heißem Methanol und anschließender Zugabe mit 15 ml Diethylether. Nach 12stündigem Stehen bei 4 °C wurde der kristalline Niederschlag des jeweiligen TFA-Tripetids über einen Büchnertrichter abfiltriert und im Vakuumexsikkator über Silikagel bei Raumtemperatur getrocknet. Ausbeute: 80 %

Vorbereitung des Kationenaustauschers

10 g Austauscherharz (Amberlite IRA 400) wurden für mind. 2 Tage in dest. Wasser gequollen, wobei das Wasser mehrmals gewechselt wurde (mind. 5x). Anschließend wurde das Austauscherharz in eine Chromatographiesäule mit Hahn (Innendurchmesser 1 cm) überführt und nochmals mit 500 ml Wasser waschen. Daraufhin wurden 50 ml 2 mol/l Salzsäure mit einer Tropfgeschwindigkeit von 1 Tropfen pro Sekunde über die Säule gegeben und anschließend bei doppelter Tropfgeschwindigkeit zunächst mit 250 ml kaltem Wasser und weiter mit 70 °C heißem Wasser bis zur neutralen Reaktion gewaschen.

Der vorbereitete Ionenaustauscher wurde innerhalb von 12 Stunden verwendet.

Lowry-Test im Mikrotiterplattenformat (nach [140])

Reagenzien:

Lösung A: 100 g Natriumcarbonat in 1 L NaOH 0,5 mol/l lösen

Lösung B: 1 g Kupfer(II)-sulfat Pentahydrat in 100 ml Wasser lösen

Lösung C: 2 g Kaliumhydrogentartrat in 100 ml Wasser lösen

Arbeitslösung 1 (unmittelbar vor Gebrauch herstellen):

15 ml Lsg. A, 0,75 ml Lsg. B und 0,75 ml Lsg. C in einem Erlenmeyerkolben gut mischen

Folin-Reagenz

Arbeitslösung 2: 5 ml Folin-Phenol-Reagenz mit 50 ml Wasser verdünnen

Durchführung:

20 µl der Testlösung werden in die Kavitäten Mikrotiterplatten pipettiert und mit 200 µl Arbeitslösung 1 versetzt. Nach 10 min werden 40 µl Folin-Reagenz (Arbeitslösung 2) zugefügt. Eine intensive Blaufärbung zeigt das Vorhandensein des Tripeptids in den betreffenden Fraktionen an.

15.1.6 Abspaltung der TFA- Schutzgruppe durch konzentrierte Ammoniaklösung

700 mg des TFA-Peptids wurden in 25 ml eisgekühltem 25%igem Ammoniak gelöst und fünf Stunden bei 0°C gerührt. Anschließend wurde überschüssiges Ammoniak am Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur vorsichtig entfernt, bis die Lösung nur noch schwach alkalisch reagierte (pH ca. 7,5). Der Reaktionsansatz wurde daraufhin über einen vorbereiteten Anionenaustauscher (s.u.) gegeben und mit 50 ml Wasser bei einer Tropfgeschwindigkeit von 1 Tropfen/s eluiert. Das Eluat wurde in 5 ml-Fractionen gesammelt, die im Lowry-Test positiven Fraktionen gepoolt und am Vakuum-Rotationsverdampfer bei 40 °C vorsichtig bis zur Trockene eingeengt. Anschließend wurde das Rohprodukt in siedendem Wasser gelöst (0,82 g Wasser /100 mg Rohprodukt) und daraufhin mit siedendem Ethanol versetzt (1,9 g Ethanol/100 mg Rohprodukt).

Innerhalb von 12 Stunden bei 4 °C fiel N α -Acetyl-Lysino-Alanyl-Alanin in Form farbloser, nadelförmiger Kristalle aus. Ausbeute: 75 %

Vorbereitung des Anionenaustauschers

10 g Austauscherharz (Amberlite IRA 400) mind. 2 Tage in dest. Wasser quellen lassen, Wasser in dieser Zeit mehrmals wechseln (mind. 5mal). Ionenaustauscherharz anschließend in eine Chromatographiesäule (Innendurchmesser 1 cm) überführen und nochmals mit 500 ml Wasser waschen. Daraufhin 50 ml 2 mol/l Natronlauge mit einer Tropfgeschwindigkeit von 1 Tropfen pro Sekunde durch die Säule laufen lassen und anschließend mit Wasser bis zur neutralen Reaktion waschen. Zur Überführung des Austauschers in die Carbonatform 150 ml Natriumcarbonatlösung (20 g/150 ml) mit einer Tropfgeschwindigkeit von 1 Tropfen/s über die Säule geben und anschließend mit Wasser bei doppelter Tropfgeschwindigkeit bis zur neutralen Reaktion waschen.

15.2 Analytik der Syntheseprodukte

15.2.1 Schmelzpunkte

Die angegebenen Schmelzpunkte wurden in offenen Kapillaren gemessen (Büchi 5109) und sind nicht korrigiert.

15.2.2 IR-Spektroskopie

Alle gezeigten IR-Spektren wurden mit dem Infrarotspektrometer PU 9706 (Fa. Philips, Kassel) gemessen (1% Substanz in KBr).

15.2.3 Chromatographische Methoden

15.2.3.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Für die analytische Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel 60 beschichtete Kunststofffolien verwendet (Polygram SilG/UV 254, (Macherey-Nagel, 805023).

Je nach Trennproblem und Substanz (Syntheseprodukt) wurden die im folgenden aufgeführten Trennbedingungen und Detektionsreagenzien verwendet.

Trennsystem I:

Analyten: Lysin, Nε-Trifluoracetyl-Lysin, Alanyl-Alanin, Nα-Acetyl-Lys-Alanyl-Alanin
sowie TFA-Peptide nach Abspaltung der TFA-Schutzgruppe

Laufmittel: n-Butanol/Aceton/Wasser/Eisessig 35 + 35 + 23 + 7 (v+v+v+v)

Konzentration der Probenlösung: ca. 10 mg/ml

Auftragsmenge: ca. 5-10 µl

Detektion: Ninhydrin-Reagenz:

0,2 g Ninhydrin in einem Gemisch aus 95 ml n-Butanol und 5 ml 10%iger Essigsäure (w/v) lösen. Die entwickelte DC-Platte mit diesem Reagenz besprühen und anschließend für 10 min im Trockenschrank bei 135 °C erhitzen. Substanzen mit freien Aminogruppen ergeben rot-violette Flecke auf weißem Grund.

Abspaltung der TFA-Schutzgruppe für DC-Analytik:

10 mg der TFA-Aminosäure mit 1 ml 1 mol/l NaOH versetzen, 3 Stunden bei RT inkubieren, mit anschließend mit 2 mol/l HCl neutralisieren.

Lösung direkt auf DC-Folie auftragen (ca. 10 µl)

Trennsystem II

Analyten: „Universalmethode“ geeignet für alle aufgeführten Aminosäuren und Peptide

Laufmittel: Chloroform/Methanol/ /Eisessig 95 + 25 + 25 (v+v+v)

Konzentration der Probenlösung: ca. 10 mg/ml

Auftragsmenge: ca. 5 µl

Detektion : Chlor-Kaliumjodid-Stärke-Reagenz:

a) Chlorkammer: 0,5 g Kaliumpermanganat werden in ein kleines Becherglas eingewogen und dieses in eine dicht schließende DC-Kammer gestellt. Alsdann werden einige Tropfen konz. Salzsäure auf in das Becherglas gegeben und die DC-Kammer verschlossen.

b) KI/Stärke-Reagenz (Tauchlösung): 200 mg Kaliumiodid werden in 50 ml einer 1%igen Stärkelösung (w/v) gelöst.

Durchführung:

Die vom Fließmittel befreiten Chromatogramme werden für 10 min in die Chlorkammer gestellt. Anschließend wird überschüssiges Chlor im Kaltluftstrom von der Trennschicht entfernt (Dauer: mind. 20 min). Daraufhin wird das Chromatogramm für 1 s in die KI/Stärkelösung getaucht. Verbindungen mit Peptid bzw. Amidbindungen ergeben blaue Spots auf weißem Grund.

Trennsystem III (nach NIETO und PERKINS et al. [151])

(Nachweis von Vancomycin und Vancomycin/Lys-D-Ala-D-Ala-Komplexen):

Laufmittel: Ethanol/Wasser/konz. Ammoniak , 75 + 25 + 0,5 (v+v+v)

Konzentration der Probenlösung:

Vancomycin: 1,6 mg (1 μ mol) in 1 ml Ethanol/Wasser 50 +50 (v+v) lösen

N α -Lys-D-Ala-D-Ala: 0,33 mg (1 μ mol) in 1 ml Ethanol/Wasser 50 +50 (v+v) lösen

N α -Lys-L-Ala-L-Ala: 0,33 mg (1 μ mol) in 1 ml Ethanol/Wasser 50 +50 (v+v) lösen

Zur Komplexbildung jeweils 0,5 ml Vancomycin- und N α -Lys-D-Ala-D-Ala-Lösung bzw. N α -Lys-L-Ala-L-Ala-Lösung (Negativkontrolle) mischen und 20 min bei RT inkubieren

Auftragsmenge: jeweils ca. 10 μ l

Detektion : Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz:

1 ml Anisaldehyd und 2 ml konz. Schwefelsäure mit Eisessig auf 100 ml auffüllen

Durchführung:

Die vom Fließmittel befreiten DC-Folien werden für 1 Sek. in die Detektionslösung getaucht und anschließend im Trockenschrank bei 130 °C 5 min erhitzt.

Vancomycin erscheint als violetter Spott auf rosafarbenem Hintergrund

R_f-Werte:

Vancomycin R_f = 0,43

Vancomycin im Mischung mit N α -Lys-L-Ala-L-Ala : R_f = 0,42

Vancomycin im Mischung mit N α -Lys-D-Ala-D-Ala: R_f < 0,03

15.2.3.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

15.2.3.2.1 Ausrüstung:

isokratische HPLC-Pumpe L-6000 A (Merck-KGaA, Darmstadt)

UV-VIS-Detektor L-4000 A (Merck-KGaA, Darmstadt)

Fluoreszenz-Detektor F-1050 (Merck-KGaA, Darmstadt)

Integrator D-2500 (Merck-KGaA, Darmstadt)

6-Wege-Injektionsventil (Rheodyne)

Probenschleifen 20 μ l (Rheodyne)

Autosampler (Merck KGaA, Darmstadt)

analytische Trennsäulen:

LiChrospher RP-18, endcapped 250-4

LiChrospher RP-18, endcapped 125-4

Kromasil RP-18, 125-4,6

Lösemittel und Puffer für die HPLC-Analytik

Acetonitril HPLC-grade (Merck KGaA 1.00030.2500)

Ethanol p.a. (Fluka Chemie AG 02860)

Isopropanol p.a. (Merck KGaA 109634)

Methanol HPLC-grade (Merck KGaA 1.06012.2500)

bidestilliertes Wasser („Bidest“): vollentsalztes Wasser, destilliert in einer
Destillationskolonne aus Quarzglas

tridestilliertes Wasser („Tridest“): bidestilliertes Wasser, destilliert über Kaliumpermanganat

15.2.3.2.2 Puffer

a) 0,2 M Phosphatpuffer pH 3:

2,72 g KH_2PO_4 in 100 ml Wasser (Tridest) lösen,
mit 0,2 mol/l ortho-Phosphorsäure auf pH 3 einstellen

b) 9,5 mM Phosphatpuffer pH 7,0

1,14 g NaH_2PO_4 in 800 ml Wasser (Tridest) lösen,
mit 1 mol/l Natronlauge auf pH 7,0 einstellen; mit Wasser (Tridest) auf 1000 ml auffüllen

c) Ionenpaarpuffer:

2 g Heptansulfonsäure-Natrium und 6,8 g KH_2PO_4 in 800 ml Wasser (Tridest) lösen,
pH-Wert mit konz. ortho-Phosphorsäure auf 3,5 einstellen

c) 0,4 M Boratpuffer pH 9,6:

17,37 g Borsäure in 400 ml bidestilliertem Wasser lösen, pH-Wert mit 5 mol/l NaOH auf pH
9,6 einstellen, mit bidestilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 500 ml auffüllen

15.2.3.2.3 Überwachung der Synthesereaktionen

Analytische Säule: LiChrospher RP-18, 5 μm 125-4,

Eluent: 0,2 M Phosphatpuffer (pH 3) /Acetonitril 90 +10 (v+v)

Probenmenge: ca. 0,1 mg/ml des interessierenden Analyten

Injektionsvolumen: 20 μl

Fluss: 1 ml/min, Detektion: UV 220 nm

15.2.3.2.4 Ionenpaarchromatographie

(Überprüfung von Reinheit und Grad der Racemisierung der N α -Acetyl-Lys-Ala-Ala-Peptide;
Kap. 8.5.1)

Analytische Säule: Kromasil RP-18, 125-4,6

Eluent: Ionenpaarpuffer/Acetonitril 85+15 (v+v)

Fluss: 1 ml/min

Injektionsvolumen: 20 μ l

Detektion: UV 220 nm

Musterchromatogramme: vergl. Abb. 8-13

15.2.3.2.5 Chromatographie von Peptid- und Proteinhydrolysaten nach Derivatisierung mit TATG zu fluoreszierenden Verbindungen (Kap.8.5.2)

(Vergleiche auch Chromatographie der Proteinhydrolysate in Kap. 9)

A: Hydrolyse

Ca. 0,5 - 1 mg Peptid oder Protein wurden in ein Hydrolyseröhrchen (8 mm i.D. mit PTFE-Verschlusskappe (z.B. Pierce, Rockford, IL) eingewogen und 1 ml 6 mol/l Salzsäure zugeben. Mit Hilfe einer Glaskapillare wurde daraufhin für ca. 1 min Stickstoff durch die Protein/HCl-Lösung geleitet, anschließend das Röhrchen sofort fest verschlossen und für genau 45 min in einem 170 °C heißen Laborofen erhitzt. Nach Entnahme aus dem Ofen wurde der Reaktionsansatz unter fließendem Wasser abgekühlt, und das Hydrolysat im Stickstoffstrom bei ca. 45 °C zur Trockenen eingeeengt.

Der Rückstand wurde in 0,4 mol/l Boratpuffer (pH 9,5) gelöst und die Lösung vor der Derivatisierung durch einen Membranfilter filtriert (Celluloseacetat, Porengröße 0,4 μ m)

B: Derivatisierung

Derivatisierungsreagenz:

8 mg OPA (o-Phthaldialdehyd, Sigma P 0657) und 44 mg TATG (2,3,4,6-tetra-O-Acetyl-1-thio- β -D-Glucopyranose, Sigma T 8388) gemeinsam in 1 ml Methanol (HPLC grade) lösen. Die Reagenzlösung ist aufgrund eigener Erfahrung max. 3 Stunden ohne Einschränkungen zu verwenden.

Durchführung:

200 µl des boratgepufferten Hydrolysats in einem 1,5 ml Vial oder Eppendorftube mit 30 µl OPA/TATG-Reagenz versetzen und gründlich mischen (Vortex). Genau 6 min später wird die derivatisierte Lösung in die HPLC-Anlage injiziert.

Da die Reaktion zeitabhängig ist und die gebildeten Derivate nicht über einen längeren Zeitraum stabil sind, dürfen die Ansätze erst unmittelbar vor der Chromatographie derivatisiert werden. Das Injektionssystem der HPLC-Anlage ist unmittelbar nach der Injektion mehrmals mit 100 µl eines Aceton/Wasser-Gemisches (70+30; (v+v)) zu spülen.

Trennbedingungen (optimiert für Trennung von D,L-Alanin)

Analytische Säule: LiChrospher RP-18 endcapped, 5 µm 125-4; mit Vorsäule 4-4
(gleiches Füllmaterial wie analytische Säule)

Eluent: 9,5 mmol/l Phosphatpuffer pH 7,0 / MeOH ca. 60+40 (v+v) (s. Anmerkung)

Injektionsvolumen: 20 µl

Fluss: 1 ml/min, Detektion: Fluoreszenz Ex 325 nm, Em 420 nm

Anmerkung: Die optimale Zusammensetzung des Eluenten schwankte ohne ersichtlichen Grund um bis zu 10 Volumenanteile (30 + 70 bzw. 50 + 50). Des Weiteren mussten die derivatisierten Hydrolysate häufig vor der Injektion in die HPLC mit dem Eluent weiter verdünnt werden. Prinzipiell waren daher zur Erzielung optimaler Trennergebnisse stets Testläufe mit dem betreffenden Hydrolysat erforderlich, wonach i.d.R eine Nachoptimierung vorgenommen werden musste.

15.3 Herstellung der Immunoreagenzien

15.3.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Dialyseschläuche: Visking Dialysis Tubing 8/32

6 mm Durchmesser, MWCO 12-19 kDa (Serva 44104)

pH-Papier: (Merck 9532 u. 9531)

digitales pH-Meter mit Mikro-Glaselektrode: (Knick, Berlin)

variable Kolbenhubpipetten 10-100 µl, 100 –1000 µl (Eppendorf)

Ultrafiltrationsrührzelle mit Membran aus regenerierter Cellulose, low-protein-binding
MWCO 30.000 Da (Millipore, Eschborn)

Centricon-30 Mikrokonzentrationssystem (Amicon, Witten)

Einmal-Reaktionsgefäße (Eppendorftubes), 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg)

Tischzentrifuge Z 2000 A (Hermle, Wehingen)

15.3.2 Chemikalien und Biochemika

Ampicillin, Natriumsalz (Sigma, A 9518)

N α Acetyl-Lysinyl-D-Alanyl-D-Alanin (eigene Herstellung)

Glucoseoxidase (Boehringer Ingelheim 737 194)

Glutardialdehyd, 25% in H₂O (Sigma, D 3128)

L-Lysin-Monohydrochlorid (Sigma, L 5626)

Meerrettichperoxidase (Sigma, P 6782)

Natriumborhydrid (Sigma, S 9125)

Natriumperiodat p.a. (Sigma, S 1147)

Rinderserumalbumin (Sigma, B 2518)

Vancomycin-hydrochlorid Tetrahydrate (Fluka Biochemica, 94747)

Komponente	Menge
<u>0,1 mol/l Natriumacetatpuffer pH 4,4</u>	
Natriumacetat wasserfrei	8,204 g
destilliertes Wasser	1000 ml
pH Wert mit 1 mol/l Essigsäure auf pH 4,4 einstellen	
<u>0,13 mol/l Bicarbonatpuffer pH 9,6</u>	
NaHCO ₃	11 g
destilliertes Wasser	800 ml
pH-Wert mit 1 mol/l auf pH 9,6 einstellen mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen	
<u>0,01 mol/l PBS-Puffer (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung) pH ca. 7,2</u>	
NaCl	6,79 g
Na ₂ HPO ₄	1,47 g
KH ₂ PO ₄	0,43 g
mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen	1000 ml
<u>0,01 mol/l PBS-Puffer (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung) pH 6,5</u>	
0,01 mol/l PBS-Puffer pH 7,2-7,5 mit 1 mol/l o-Phosphorsäure auf pH 6,5 einstellen	
<u>0,1 M Natriumperiodatlösung</u>	
NaIO ₄	21,4 mg
in 1 ml bidestilliertem Wasser lösen	
<u>1,25 % bzw. 2 % Glutardialdehyd-Lösung</u>	
Glutardialdehyd, 25% in H ₂ O	0,5 ml bzw. 0,8 ml
mit PBS-Puffer (pH 7,2-7,5) auf 10 ml auffüllen	
<u>0,2 mol/l Lysin-Lösung</u>	
L-Lysin-monohydrochlorid	36,5 mg
in 1 ml PBS-Puffer (pH 7,2-7,5) lösen	
<u>Natriumborhydridlösung-Lösung</u>	
NaBH ₄	4 mg
in 1 ml bidest. Wasser lösen	

Tabelle 15-1: Puffer und Reagenzlösungen für die Konjugatsynthesen

15.3.3 Arbeitsvorschriften zu den Konjugatsynthesen

Anmerkung: Die jeweils eingesetzten Mengen an Protein, Hapten und sonstigen Reagenzien sind Tabelle 15-2 zu entnehmen.

15.3.3.1 Natriumperiodatmethode

Glucoseoxidase (GOD) bzw. Meerrettichperoxidase (HRP) wurden in destilliertem Wasser gelöst, mit einer wässrigen Natriumperiodatlösung versetzt und anschließend 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen. Daraufhin wurde der Reaktionsansatz über Nacht bei 4 °C gegen 1 mol/l Natriumacetatpuffer dialysiert.

Die dialysierte Enzymlösung wurde mit der wässrigen Lösung des betreffenden Haptens (s. Tab.15-2) vereinigt, der pH-Wert durch vorsichtige Zugabe von 0,5 mol/l NaOH auf pH 7-9 eingestellt (pH-Wertkontrolle an pH-Elektrode) und 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden die Konjugate mindestens 2 mal über Nacht gegen jeweils 5 L PBS-Puffer (Ampicillin-GOD-Konjugat pH 6,5 alle übrigen pH 7,2) dialysiert. Das Vancomycin-HRP-Konjugat wurde zur weiteren Aufreinigung einer Ultrafiltration unterzogen. Die fertigen Konjugatlösungen wurden bei - 20 °C gelagert.

15.3.4 Glutardialdehydmethode

(Herstellung von Rinderserumalbumin- und Meerrettichperoxidase-Konjugaten)

A: Einstufige Kopplungsreaktion (nach Harlow [140])

Rinderserumalbumin (BSA) und N α Ac-Lys-D-Ala-D-Ala wurden gemeinsam in PBS pH 7,2 gelöst, mit dem gleichen Volumen einer frisch hergestellten 2%igen Glutardialdehydlösung versetzt und der Reaktionsansatz 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zur Reduktion nicht umgesetzter Aldehydgruppen wurde anschließend NaBH₄ in kleinen Portionen bis zu einer Endkonzentration von 10 mg NaBH₄/ml Reaktionslösung zugeben und der Ansatz eine weitere Stunde bei 4 °C gerührt.

Daraufhin wurde der Reaktionsansatz 2 mal über Nacht gegen jeweils 5 L PBS-Puffer (pH 7,2) dialysiert und die fertige Konjugatlösung bei - 20 °C gelagert.

B: Zweistufige Kopplung [nach MÄRTLBAUER [145])

Meerrettichperoxidase (HRP) wurde in einer frisch hergestellten 2%igen Glutardialdehydlösung gelöst und 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz 2 mal über Nacht gegen jeweils 5 L PBS-Puffer (pH 7,2) dialysiert. Zur dialysierten Lösung des aktivierten Proteins wurden dann das in PBS gelöste Hapten und sofort im Anschluss 0,1 M Natriumhydrogencarbonatpuffer zugegeben. Daraufhin wurde der Reaktionsansatz 18 Stunden bei 4 °C gerührt. Zur Absättigung nicht umgesetzter Aldehydgruppen wurde eine 0,2 M Lysinlösung zugegeben und der Reaktionsansatz für weitere 4 h gerührt.

Daraufhin wurde der Reaktionsansatz 3mal über Nacht gegen jeweils 5 L PBS-Puffer (pH 7,2) dialysiert und die fertige Konjugatlösung bei - 20 °C gelagert.

Hapten				Carrierprotein/Enzym			
Substanz	Menge (mg)	Lösungsmittel	ml	Bezeichnung	Menge [mg]	Lösungsmittel und Zusätze	ml
<u>Natriumperiodatmethode</u>							
N α -Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala	2,2	dest. H ₂ O	1	GOD	22	dest. H ₂ O	4
						NaIO ₄	1,2
						0,5 M NaOH (bis pH 7-8)	-
						0,1 M NaBH ₄	0,4
Ampicillin	1,1	dest. H ₂ O	1	GOD	10	dest. H ₂ O	2
						NaIO ₄	0,6
						0,5 M NaOH (bis pH 7)	-
						0,1 M NaBH ₄	0,2
Vancomycin	12	dest. H ₂ O	0,5	HRP	10	dest. H ₂ O	2
						NaIO ₄	0,6
						0,5 M NaOH (bis pH 9)	-
						0,1 M NaBH ₄	0,2
<u>Glutardialdehyd (einstufig)</u>							
N α -Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala	2,5	PBS (pH 7,2)	10	BSA	10	2 % Glutardialdehyd in PBS NaBH ₄ (kristallin)	10 20 mg
<u>Glutardialdehyd (zweistufig)</u>							
N α -Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala	6,6	dest. H ₂ O	1	HRP	20	1,25 % Glutardialdehyd in PBS NaHCO ₃ 0,2 M Lysin	1 0,1 0,1

Tabelle 15-2: Arbeitsbedingungen für die Kopplung von N α -Ac-Lys-D-Ala-D-Ala, Ampicillin und Vancomycin an Rinderserumalbumin (BSA), Glucoseoxidase(GOD) und Meerrettichperoxidase (HRP)

15.4 Charakterisierung der Konjugate

15.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford [165]

15.4.1.1 Reagenzien, Materialien, Geräte

Coomassie[®]-Brilliantblau G 250 (Merck 115444)

Ethanol p.a. (Fluka 02860)

Phosphorsäure (85%ig) (Fluka AG 796200)

Proteinstammlösungen: 10 mg des zu untersuchenden Proteins / 20 ml PBS-Puffer

Kunststoffküvetten

Rührspatel

UV-Spektrophotometer

15.4.1.2 Arbeitsvorschrift: Proteinbestimmung

Protein-Reagenz nach Bradford [165]

Komponente	Menge
Coomassie Brilliant Blue G-250	100 mg
in Ethanol lösen	50 ml
Zugabe von Phosphorsäure (85 %ig)	100 ml
mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen	

Stammlösung [μ l]	PBS-Puffer [μ l]	Protein [μ g]	Coomassie-Reagenz
X	100-X		
0	100	Blindwert	
20	80	10	
40	60	20	je 2,5 ml
60	40	30	
80	20	40	
100	0	50	

Tabelle 15-2: Pipettierschema zur Aufnahme von Kalibriergeraden von (Proteinbestimmung)

Proteinbestimmung:

1. Entsprechend des Pipettierschemas Stammlösung und Puffer in 3 ml Küvette pipettieren
2. 2,5 ml Reagenzlösung zugeben
3. Mischen (Rührspatel)
4. Nach 10 min Extinktion bei 595 nm gegen den Reagenzienblindwert messen

15.4.2 Nachweis von Protein-gebundenen Haptenen (Kap. 9)

Anmerkung:

Die Durchführung der in Kap. 9 beschriebenen immun-chemischen Nachweisverfahren sowie der Vancomycin-Rezeptortest sind im Kap. 15.5. (ELISA-Techniken) gesondert aufgeführt

*15.4.2.1 Chromatographischer Nachweis von D-Alanin in den
N α -Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala-BSA und GOD-Konjugaten*

Vor der Analyse wurden jeweils 1 ml der N α -Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala-BSA und GOD-Konjugatlösung in ein Hydrolyseröhrchen pipettiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Die Lyophilisate wurden wie unter Punkt 15.2.3.2.5 beschrieben einer Totalhydrolyse unterzogen, derivatisiert und mittels HPLC untersucht.

(Musterchromatogramme vergl. Abb. 10-1)

*15.4.2.2 Nachweis des intakten β -Lactamsystems im Ampicillin-GOD
Konjugat im PENZYMTTEST® (Kap. 10.3.2.)*

Die Ampicillin-GOD-Konjugatlösungen und die zur Dialyse als Akzeptorlösung eingesetzten Dialyse-Puffer wurden nach jedem Dialyseschritt sowohl unverdünnt als auch in verschiedenen Verdünnungsstufen im PENZYMTTEST® 50 (UCB BIOPRODUCTS [112]) analysiert.

Die Testdurchführung und Auswertung erfolgten entsprechend den Herstellerangaben für den Nachweis von Penicillinen in Milch.

1. 50 μ l Testlösung (Ampicillin-GOD-Konjugat bzw. Dialysepuffer) in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettieren, mit 10 μ l D,D-Carboxypeptidase-Lösung versetzen, mischen und 5 min bei 47 °C in einem abgedunkelten Wasserbad stehen lassen.
2. Jedem Reaktionsansatz eine Reagenztablette zufügen und bei 47 °C im Dunkeln stehen lassen.
3. Nach genau 8 min kann die erste Farbreaktion um die Reagenztablette herum abgelesen werden. (Der Reaktionsansatz sollte zum Ablesen nicht länger als 15 sek. aus dem Wasserbad entnommen werden)
4. Weitere 7 min erwärmen und anschließend das Testergebnis entsprechend der dem Test beiliegenden Farbskala auswerten.

15.5 ELISA-Techniken*15.5.1 Materialien und Geräte*

Chemikalien und Biochemika

Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus Ziegenantiserum (Fluka, 10760)

Peroxidase-markierte Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper monoclonal (Maus) (Sigma, A 2074)

Casein (Natriumsalz) (Sigma C 8654)

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (Sigma, T 2885)

Tween 20 (Sigma, P 1379)

Wasserstoffperoxid (30 %ig) (Fluka 95295)

N α -Acetyl-Lys-D-Ala-D-Ala-HRP (eigene Herstellung)

Diverse Ampicillin-, Cloxacillin-, Benzylpenicillin-, Pencilloyl-HRP-Konjugate
(Geschenke von Herrn Prof. Dr. E. Usleber, LMU München)

Standardsubstanzen

Ampicillin, Natriumsalz (Sigma, A-9518)

Benzylpenicillin, Kaliumsalz (Sigma, Pen-K)

Cloxacillin, Natriumsalz (Sigma, C-9393)

Dicloxacillin, Natriumsalz (Sigma, D-9016)

Oxacillin, Natriumsalz (Sigma, O-1002)

Avoparcin (Geschenk von Herrn Dr. Johannsen, LUFA, Kiel)

Vancomycin-hydrochlorid Tetrahydrate (Fluka Biochemica, 94747)

Geräte

Variable Kolbenhubpipetten: 0,5–10 μ l, 10–100 μ l, 100-1000mL (Eppendorf, Hamburg)

Variable 12-Kanalpipette: 25-250 ml

Mikrotiterplatten (Immunoplate I, Nunc GmbH)

Verschließbares Wasserbad mit Schüttleinrichtung für Mikrotiterplatten (GFL, Burgwedel))

Mikrotiterplatten-Lesegerät (Modell 450, BioRad, München)

Puffer und Reagenzlösungen

Komponente	Menge
<u>1. Beschichtungspuffer: Bicarbonatpuffer pH 9,4-9,8</u>	
Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g
mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen	
<u>0,01 mol/l PBS-Puffer (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung), ca. pH 7,2</u>	
NaCl	6,79 g
Na ₂ HPO ₄	1,47 g
KH ₂ PO ₄	0,43 g
mit bidestilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen	
<u>Blockpuffer (2% Casein/PBS)</u>	
Casein	4 g
0,01 mol/l PBS-Puffer pH 7,2	200 ml
<u>Verdünnungspuffer (1% Casein/PBS)</u>	
Casein	2 g
in 200 ml PBS-Puffer, pH ca. 7,2 lösen	
<u>Waschlösung (NaCl/Tween 20)</u>	
NaCl	8,55 g
Tween 20	0,25 ml
mit bidestilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen	
<u>0,21 mol/l Citratpuffer pH 3,9-4,0 mit 3,15 mmol/l H₂O₂</u>	
Citronensäure-Monohydrat	8,81 g
1 mol/l KOH	40 ml
mit bidestilliertem Wasser auf 160 ml auffüllen	
Zugabe von H ₂ O ₂	65 µl
<u>3,3',5,5'-Tetramethylbenzidinlösung</u>	
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	50,4 mg
Aceton	1,0 ml
Methanol	9,0 ml
<u>Substratlösung für Meerrettichperoxidase</u>	
0,21 mol/l Citratpuffer	20 ml
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidinlösung	1 ml
(ausreichend für zwei 96 well-Platten, erst unmittelbar vor Gebrauch herstellen !)	
<u>Stopplösung: 1 mol/l H₂SO₄</u>	

Tabelle 15-3: Puffer und Reagenzlösungen für ELISA-Techniken

15.5.2 Allgemeine Arbeitsanweisung zu den verwendeten ELISA-Techniken

15.5.2.1 Indirekter ELISA

Genaue Angaben zu den verwendeten Mengen an Beschichtungsantigenen, Verdünnungen von Seren, sek. Antikörpern etc. sind bei den jeweiligen Einzelexperimenten angeben

15.5.2.1.1 Beschichtung der Mikrotiterplatten

Für das indirekte Testsystem wurde das jeweilige Beschichtungsantigen (Hapten-Protein-Konjugat) mit Beschichtungspuffer (Bicarbonatpuffer pH 9,5) auf die gewünschte Konzentration eingestellt und von dieser Lösung je 100 µl in die Kavitäten der Mikrotiterplatten pipettiert. Daraufhin wurden die Mikrotiterplatten abgedeckt und entweder 3 h bei 37 °C oder über Nacht bei RT stehen gelassen. Anschließend wurden die Kavitäten entleert und Platte einmal mit PBS-Puffer gewaschen und auf Papiertüchern ausgeschlagen. Zur Blockierung verbleibender unspezifischer Bindungsstellen auf den Mikrotiterplatten wurde anschließend in jede Kavität 200 µl Blockpuffer (2% Casein in 0,01 mol/l PBS pH 7,5) pipettiert. Die Platten wurde weitere 30 min bei RT stehen gelassen, und anschließend wie oben beschrieben entleert, gewaschen und auf Papiertüchern ausgeschlagen.

15.5.2.1.2 Testdurchführung

1. Antiserum bzw. Antikörper mit Verdünnungspuffer (1% Casein/PBS) verdünnen und in die mit Antigen beschichteten Mikrotiterplatten geben

a) *Titerbestimmungen:* 100 µl jeder zu testenden Serumverdünnung

b) *Titration mit Hemmung, Competitionsexperimente:*

50 µl Serumverdünnung (in Verdünnungspuffer)

+ 50 µl Kompetitor-Lösung (in PBS-Puffer, pH ca. 7,2))

bzw. + 50 µl PBS-Puffer ohne Kompetitor (Kontrollexperiment zur Bestimmung von E_0)

Gesamt-Testvolumen immer 100 µl

c) Reagenzienleerwert zur Ermittlung der unspezifischer Bindung des Enzym-markierten Antikörpers an die Mikrotiterplatte: Bei der Ermittlung des Reagenzienleerwertes wird das spezifische Serum durch die entsprechende Menge PBS-Puffer ersetzt, sonst wird er wie eine normale Probe behandelt.

2. 2 h bei RT inkubieren

3. Platte entleeren und einmal mit PBS waschen

4. 100 µl des HRP-markierten tierartspezifischem anti-Immunglobulin- Antikörper in geeigneter Verdünnung zugeben

Bei den verwendeten kommerziellen Peroxidase-markierten Anti-Kaninchen-IgG-Antikörpern erwies sich unter diesen Testbedingungen eine Verdünnung von 1: 3000 als zweckmäßig

(Ausgangskonzentration nach Herstellerangabe: 1 mg/ml)

5. 45 min bei RT inkubieren
6. Platte 3x gründlich mit Waschlösung (NaCl/Tween) waschen, nach dem letzten Waschen Platte gründlich auf saugfähigem Papier ausschlagen.
7. Zugabe von 100 µl Peroxidase Substratlösung, in Abhängigkeit von der erreichten Farbintensität 15-30 min im Dunkeln reagieren lassen
8. Reaktion durch Zugabe von 100 µl Stopplösung (1 mol/l Schwefelsäure) stoppen
9. Extinktion nach 10 min bei 450 nm messen

15.5.2.2 Direkter ELISA

15.5.2.2.1 Beschichtung der Mikrotiterplatten

Für das direkte Testsystem wurden die betreffende Antikörperlösungen (tierartspezifischer anti-IgG-Antikörper (DASP-Technik) oder aufgereinigte, spezifischen Antiseren (direkte Beschichtung mit spezifischen Antikörpern) mit Beschichtungspuffer (Bicarbonatpuffer pH 9,5) verdünnt und von dieser Lösung je 100 µl in die Kavitäten der Mikrotiterplatten pipettiert. Daraufhin wurden die Mikrotiterplatten abgedeckt und entweder 3 h bei 37 °C oder über Nacht bei RT stehen gelassen, anschließend entleert und Platte einmal mit PBS-Puffer gewaschen und auf Papiertüchern ausgeschlagen. Zur Blockierung verbleibender unspezifischer Bindungsstellen wurden anschließend in jede Kavität 200 µl Blockpuffer (2% Casein in 0,01 mol/l PBS pH ca. 7,2) pipettiert und die Platten weitere 30 min bei RT stehen gelassen und anschließend wie oben beschrieben entleert, gewaschen und auf Papiertüchern ausgeschlagen.

15.5.2.2.2 Testdurchführung

A: simultane DASP-Technik (nach MÄRTLBAUER [145])

1. spezifisches Antiserum und enzymmarkiertes Antigen mit Verdünnungspuffer verdünnen und gemeinsam in die mit dem tierspezifischen Antikörper vorbeschichteten Mikrotiterplatten (1 µg/Kavität) pipettieren

a) *Titerbestimmungen:*

50 µl der testenden Serumverdünnung + 50 µl Hapten-HRP-Konjugat

b) *Titration mit Hemmung und Konkurrenzexperimente:*

33 µl der zu testenden Serumverdünnung

+ 33 µl Hapten-HRP-Konjugat

+ 33 µl Kompetitor-Lösung (in PBS-Puffer)

bzw. + 33 µl PBS-Puffer (Kontrollexperiment zur Bestimmung von E0)

Gesamt-Testvolumen immer 100 µl

c) Reagenzienleerwert zur Ermittlung der unspezifischen Bindung des Enzymmarkierten Antigens an die Mikrotiterplatte:

Bei der Ermittlung des Reagenzienleerwertes wird das zu testende spezifische Antiserum durch die entsprechende Menge PBS-Puffer ersetzt, sonst wird er wie eine normale Probe behandelt.

2. 2 h bei RT inkubieren

3. Platte 3x gründlich mit Waschlösung (NaCl/Tween) waschen, nach dem letzten Waschen Platte gründlich auf saugfähigem Papier ausschlagen.

4. Zugabe von 100 µl Peroxidase Substratlösung, in Abhängigkeit von der erreichten Farbintensität 15-30 min im Dunkeln reagieren lassen

5. Reaktion durch Zugabe von 100 µl Stopplösung (1 mol/l Schwefelsäure) stoppen

6. Extinktion nach 5 min bei 450 nm messen

B: Direkte Beschichtung mit Hapten-spezifischen Antikörpern

1. enzymmarkiertes Antigen mit Verdünnungspuffer verdünnen und gemeinsam in die mit den Hapten-spezifischen Antikörpern vorbeschichteten Mikrotiterplatten pipettieren

a) *Titerbestimmungen:*

100 µl Hapten-HRP-Konjugat-Lösung

b) *Titration mit Hemmung und Konkurrenzexperimente:*

50 µl Hapten-HRP-Konjugat-Lösung

+ 50 µl Kompetitor-Lösung (in PBS-Puffer)

bzw. 50 µl PBS-Puffer (Kontrollexperiment zur Bestimmung von E_0)

Gesamt-Testvolumen immer 100 µl

c) Reagenzienleerwert zur Ermittlung der unspezifischen Bindung des Enzym-markierten Antigens an die Mikrotiterplatte:

Bei der Ermittlung des Reagenzienleerwertes wird das zu testende spezifische Antiserum durch die entsprechende Menge PBS-Puffer ersetzt, sonst wird er wie eine normale Probe behandelt

Schritte 2.-6. wie oben (DASP-Technik)

15.5.2.2.3 Durchführung des kompetitiven Rezeptorassay auf Vancomycin

Anmerkung: Zwar handelt es sich bei diesem Testsystem nicht um ein immun-chemisches Verfahren, doch weist es große Analogien in Bezug auf Prinzip, Aufbau und Durchführung zu den vorstehend genannten ELISA-Testsystemen auf.

1. Vancomycin-HRP-Konjugat mit PBS-Puffer verdünnen und 50 µl dieser Lösung zusammen mit der entsprechenden Kompetitorlösung bzw. PBS-Puffer pH7,2 (je 50 µl) in die mit dem Protein-BSA-Lys-D-Ala-D-Ala-Konjugat vorbeschichteten Kavitäten (1 µg/Kavität = 1 µg/100 µl Beschichtungspuffer) der Mikrotiterplatte pipettieren. Zur Ermittlung des Reagenzienleerwertes wurden auf jeder Mikrotiterplatte drei Kavitäten mit BSA statt mit BSA-Lys-D-Ala-D-Ala beschichtet. (Durchführung von Beschichtung und Nachbeschichtung vergl. 15.5.2.1.1)

2. 2 h bei RT inkubieren

3. Platte dreimal gründlich mit PBS-Puffer, pH ca. 7,2 waschen, nach dem letzten Waschen Platte sorgfältig auf saugfähigem Papier ausschlagen.

4. Zugabe von 100 µl Peroxidase Substratlösung, in Abhängigkeit von der erreichten Farbintensität 15-30 min im Dunkeln reagieren lassen

5. Reaktion durch Zugabe von 100 µl Stopplösung (1 M Schwefelsäure) stoppen

5. Extinktion nach 5 min bei 450 nm messen

15.5.3 Erläuterungen zu speziellen Arbeitstechniken

15.5.3.1 Herstellen von Verdünnungsreihen

Alle Verdünnungsreihen von Immunreagenzien (Beschichtungsantigene, Seren, Enzymkonjugate etc) werden, wenn nicht anders angegeben, ausgehend von der höchsten Konzentrationsstufe der im Test eingesetzten Lösung durch sukzessive Verdünnung aus der jeweils nächsthöheren Verdünnungsstufe hergestellt.

15.5.3.2 Titerbestimmung

Die in dieser Arbeit angegebenen Serentiter wurden alle mit der DASP-Technik nach *MÄRTLBAUER* bestimmt. Als Titer wurde hierbei die Serenverdünnung definiert die unter den angegebenen Bedingungen zu einer Extinktion von 0,3 Einheiten führte. Der Titer wurde jeweils aus den Titrationskurven abgelesen bzw. mit Hilfe einer Tabellenkalkulation (EXCEL™) rechnerisch durch logarithmische Regression im betreffenden Bereich der Titrationskurve ermittelt.

Die Belegung der Mikrotiterplatten bei der Titerbestimmung ist beispielhaft in Abb. 15-1 dargestellt.

Seren- verdünnung		Tier 1				Tier2				Tier3			
		0. Woche		7. Woche		0. Woche		7. Woche		0. Woche		7. Woche	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1: 1000	A												
1: 3000	B												
1: 9000	C												
1: 27.000	D												
1: 81.000	E												
1:243.000	F												
1:729.000	G												
Leerwerte	H												

Abbildung 15-1: Beispiel der Belegung einer Mikrotiterplatte zur Ermittlung der Serentiter verschiedener Blutentnahmen von 3 Tieren (jeweils 0. und 7. Woche) Die Serenverdünnungen wurden in diesem Fall ausgehend von einer 1:1000 Verdünnung durch serielle 1:3 Verdünnungen hergestellt (1:3 = 1 Teil Serum bzw. Serumverdünnung + 2 Teile Verdünnungspuffer). Das gezeigte Schema ist sowohl auf den indirekten als auch den direkten ELISA anwendbar.

15.5.3.3 Titration mit Hemmung

Entsprechend der eigentlichen Titerbestimmung wurde für verschiedene Seren eine sog. „Titration mit Hemmung“ durchgeführt, d.h. es wurde bei der Titration zusammen mit der entsprechenden Serenverdünnung eine Kompetitorlösung mit konstanter Konzentration in die Kavitäten pipettiert. Diese Technik diente in erster Linie zur Überprüfung der Spezifität der Antikörper/Antigenbindung d.h. unspezifische Protein/Antikörper-Wechselwirkung sollten durch entsprechende Kompetitionsexperimente mit dem freien, homologen Antigen ausgeschlossen werden. Des Weiteren sollten durch diese Experimente mögliche Kreuzreaktivitäten gegenüber anderen interessierenden Substanzen, die zum Teil auch als Gemische eingesetzt wurden, frühzeitig erkannt werden. Die Kompetitor-Konzentrationen wurden in diesem Fall z.T. sehr hoch angesetzt (1000-5000 ng/ml), um z.B. auch schwache Kreuzreaktivitäten der Antiseren gegen mutmaßliche Kompetitoren zu erfassen.

15.5.3.4 Zweidimensionale ELISA-Techniken

Zweidimensionale ELISA-Techniken sollten bereits zu Beginn der immun-chemischen Arbeiten Aussagen über die notwendigen Arbeitsverdünnungen (engl: working dilutions) der Antiseren und übrigen Immunreagenzien ermöglichen und wurden sowohl zur Vorbereitung der Serentitration als auch im Hinblick auf die Entwicklung semi-quantitativer ELISA-Techniken eingesetzt.

Zu diesem Zweck wurden gleichzeitig verschiedene Kombinationen von Serenverdünnungen und verschiedene Mengen an Beschichtungsantigen (indirekter ELISA) bzw. verschiedene Verdünnungen an enzymmarkiertem Antigen auf einer Mikrotiterplatte eingesetzt und nach der Testdurchführung die optimalen Kombinationen der entsprechenden Immunreagenzien ermittelt. Gleichzeitig konnten die Einflüsse von Kompetitoren bzw. Kompetitorgemischen auf das Testsystem ermittelt werden (vergl. Abb.15-2). Für das Detektionssystem Peroxidase/H₂O₂/Tetramethylbenzidin wurden für das ungehemmte Testsystem nach 20minütiger Enzymreaktion Extinktionswerte zwischen 0,8-1,5 Einheiten als Optimum angesehen.

Gleichzeitig sollten Kompetitoren bzw. der interessierende Analyt unter diesen Bedingungen zu einer maximalen Hemmung des Testsystems führen.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12							
A	X= Y=	n.b	n.b	n.b	n.b	n.b	n.b	n.b	n.b	n.b	n.b	n.b	n.b							
B	X= Y=	n.b	1→ 1↓	1:3 1	1:9 1	1:27 1	blank	1→ 1↓	1:3 1	1:9 1	1:27 1	blank	n.b							
C	X= Y=	n.b	1 1:3	1:3 1:3	1:9 1:3	1:27 1:3	blank	1 1:3	1:3 1:3	1:9 1:3	1:27 1:3	blank	n.b							
D	X= Y=	n.b	1 1:9	1:3 1:9	1:9 1:9	1:27 1:9	blank	1 1:9	1:3 1:9	1:9 1:9	1:27 1:9	blank	n.b							
E	X= Y=	n.b	1 1:27	1:3 1:27	1:9 1:27	1:27 1:27	blank	1 1:27	1:3 1:27	1:9 1:27	1:27 1:27	blank	n.b							
F	X= Y=	n.b	1 1:81	1:3 1:81	1:9 1:81	1:27 1:81	blank	1 1:81	1:3 1:81	1:9 1:81	1:27 1:81	blank	n.b							
G	X= Y=	n.b	1 1:244	1:3 1:244	1:9 1:244	1:27 1:244	blank	1 1:244	1:3 1:244	1:9 1:244	1:27 1:244	blank	n.b							
H		n.b	n.b	n.b	n.b	n.b	n.b	n.b	n.b	n.b	n.b	n.b	n.b							
							ohne Kompetitor							mit Kompetitor (c = konst.)						

Abbildung 15-2: Beispiel zur Belegung einer 96 well-Mikrotiterplatte in der zweidimensionalen ELISA-Technik. Y stellt verschiedene Serenverdünnungen dar (1. Dimension), X steht für verschiedene Mengen eines zur Beschichtung eingesetzten Antigens (indirekter ELISA) oder Verdünnungen eines Hapten-Protein-Konjugats (direkter ELISA) (2. Dimension).

X=1 bzw. Y=1 symbolisieren die entsprechenden Ausgangsverdünnungen, welche nach serienzunehmender 1:3 Verdünnung jeweils von links nach rechts (→) bzw. von oben nach unten (↓) in die entsprechenden Kavitäten pipettiert werden. Das gezeigte Experiment wurde sowohl ohne (linke Hälfte) als auch mit Kompetitor durchgeführt. Nach der Testdurchführung können so die optimalen Kombinationen von X und Y ermittelt werden, welche unter den Testbedingungen eine Extinktion von 0,8 bis 1,5 Einheiten geben. Gleichzeitig können aufgrund des Konkurrenzexperimentes (rechte Hälfte) Aussagen in Bezug auf die auf die Nachweisempfindlichkeit des Testsystems getroffen werden. n.b. =nichtbelegte Kavitäten (nur Puffer), Blank = Reagenzienleerwert, 1:3 Verdünnung = 1 Teil Serum bzw. -verdünnung + 2 Teile Verdünnungspuffer

15.5.3.5 Aufnahme von Standardkurven in kompetitiven ELISA-Systemen

Standardkurven zur Ermittlung von Testparametern (50%-Dosen, Kreuzreaktivitäten etc.) sowie für quantitative Screeningtests wurden ausschließlich für optimierte Testsysteme aufgenommen. Die einzelnen Kalibrierlösungen der entsprechenden Kompetitoren wurden ausgehend aus von einer Stammlösung durch serielle 1:2 oder 1:3 Verdünnung hergestellt (1 : 2 = 1 Volumenteil Kompetitorlösung + 1 Volumenteil Puffer bzw. 1 : 3 = 1 Volumenteil Kompetitorlösung + 2 Volumenteil Puffer). Diese Kalibrierlösungen wurden wie beschrieben in den betreffenden ELISA-Techniken eingesetzt.

Allen aufgenommenen Standardkurven lagen mindestens 5 Konzentrationsstufen des Kompetitors zugrunde, die jeweils im Rahmen einer Dreifachbestimmung im ELISA-Test eingesetzt wurden. Die Kompetitor-Konzentrationen wurden nach Möglichkeit so gewählt, dass die mit ihnen erzielten relativen Extinktionen (E/E₀) zwischen 20 % und 80 % lagen.

Zur Ermittlung der maximalen Extinktion (E_0) wurde statt der Kompetitorlösungen reiner PBS-Puffer im Test eingesetzt.

Prinzipiell wurden bei der Aufnahme von Standardkurven die Randkavitäten der Mikrotiterplatten nicht mit einbezogen, da für die Randbereiche der Mikrotiterplatten häufig größere Abweichungen der Extinktionen festzustellen waren.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	n.b.	blank	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
B	n.b.	S 1	P1	P1	P1	S 1	P7	P7	P7	P13	S 1	n.b.
C	n.b.	S 2	P2	P2	P2	S 2	P8	P8	P8	P13	S 2	n.b.
D	n.b.	S 3	P3	P3	P3	S 3	P9	P9	P9	P13	S 3	n.b.
E	n.b.	S 4	P4	P4	P4	S 4	P10	P10	P10	E0	S 4	n.b.
F	n.b.	S 5	P5	P5	P5	S 5	P11	P11	P11	E0	S 5	n.b.
G	n.b.	S 6	P6	P6	P6	S 6	P12	P12	P12	E0	S 6	n.b.
H	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	blank	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	blank	n.b.

Abbildung 15-3: Beispiel zur Belegung einer 96 well-Mikrotiterplatte für quantitative ELISA-Techniken. S1-S6: von oben nach unten seriell-abnehmende Standardkonzentration, P =Proben, E₀: PBS-Puffer statt Kompetitorlösung, Blank = Reagenzienleerwert, n.b.: nicht belegte Kavitäten (werden nur mit Puffer befüllt)

15.6 Immun-chemischer Nachweis von Avoparcin in Futtermitteln

15.6.1 Materialien und Geräte

Zusätzlich zu den unter Punkt 15.5.1 genannten Materialien wurden verwendet:

Graduierte Polypropylen-Röhrchen mit Schraubverschluss 15 ml (Greiner, Labortechnik)

pH-Mikroelektrode für Digital-pH-Meter (Knick, Berlin)

Schüttelmaschine SM 25 (Bühler, Tübingen)

Zentrifugenröhrchen aus Glas 15 ml (KMF, Sankt-Augustin)

Tischzentrifuge Z 2000 A (Hermle, Wehingen)

Extraktionsmittel

Aceton/Wasser/konz. HCl (65 + 32,5 +2,5) (v+v+v)

15.6.2 Dotierung der Futterproben (verdeckte Analysen)

1 g ± 0,05g Futtermittel wurden in ein Polypropylen-Röhrchen eingewogen und entsprechend dem Dotierungsschema mit der jeweiligen Dotierlösung versetzt. Die Probe wurde daraufhin zur Verdunstung des Dotierunglösemittels (Methanol) über Nacht unverschlossen im Abzug stehen gelassen und die dotierte Probe nach Verschließen der Röhrchen durch kräftiges Schütteln gemischt.

Dotierungsschema:

Dotierung	Zugabe Dotierlösung [μ l] zu 1 g Probe
0 mg/kg	100 μ l Methanol
3 mg/kg	30 μ l Dotierlösung II
5 mg/kg	50 μ l Dotierlösung II
7,5 mg/kg	75 μ l Dotierlösung II
10 mg/kg	50 μ l Dotierlösung I
12 mg/kg	60 μ l Dotierlösung I
15 mg/kg	75 μ l Dotierlösung I
20 mg/kg	100 μ l Dotierlösung I
25 mg/kg	125 μ l Dotierlösung I
30 mg/kg	150 μ l Dotierlösung I
35 mg/kg	175 μ l Dotierlösung I
40 mg/kg	200 μ l Dotierlösung I

Dotierungslösung I: 200 μ g Avoparcin/ml; Dotierlösung II : 100 μ g Avoparcin/ml

15.6.3 Extraktion von Avoparcin aus Futtermitteln

Jeweils 1 g des in ein Polypropylen-Röhrchen eingewogenen Futtermittels wurden mit 5 ml Extraktionsmittel versetzt, durch kräftiges Schütteln gemischt und anschließend 30 min auf einem Tischschüttler extrahiert. Anschließend wurden die Rohextrakte zentrifugiert, jeweils mit Hilfe einer Kolbenhubpipette vorsichtig 1 ml des klaren Überstand entnommen und in einem weiteren Zentrifugenröhrchen mit 5 ml PBS-Puffer versetzt, durchmischt, an einer pH-Elektrode mit 1 mol/l NaOH vorsichtig auf pH 7 (+/- 0,5) eingestellt und mit PBS-Puffer (pH ca. 7,2) auf ein Volumen von 10 ml gebracht.

Diese Lösung wurde, falls nötig, nochmals zentrifugiert, und vor der Verwendung im ELISA nochmals 1:3 mit PBS-Puffer verdünnt (1 ml Extrakt + 2 ml PBS-Puffer).

15.6.4 Durchführung des Screenings

Die vorbereiteten Futtermittlextrakte wurden in einem optimierten indirekten ELISA-System (s.u.) in einer Dreifachbestimmung untersucht. Für die quantitative Auswertung wurde für jede Platte eine Standardkurve mit 6 verschiedenen Konzentrationen im Bereich von 7,5 ng/ml bis 1000 ng/ml aufgenommen. Die entsprechenden Kalibrierlösungen wurden ausgehend von der höchsten Avoparcin-Konzentration (1000 ng/ml) durch serielle 1:2 Verdünnung hergestellt ((1 Volumenteil Avoparcinlösung + 1 Volumenteil PBS-Puffer, pH ca. 7,2).

Der Test wurde entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift für den indirekten ELISA durchgeführt (s. 15.5.2.1.2, Konkurrenzexperimente).

Optimiertes ELISA-Testsystem für das Avoparcin-Screening (indirekter ELISA):

Plattenbeschichtung:

50 ng BSA-Lys-D-Ala-D-Ala / ml Beschichtungspuffer = 5 ng / 100 µl = 5 ng/ Kavität

Anti-Lys-D-Ala-D-Ala-Antiserum:

(Kaninchen 2, 14. Woche) Verdünnung 1 : 45.000, 50 µl-Kavität

Standard- bzw. Testlösung: 50 µl Kavität

Peroxidase-markierte Anti-Kaninchen-IgG-Antikörpern, Verdünnung 1:3000

Enzymreaktion: 20 min im Dunkeln, dann Abbruch der Reaktion durch Zugabe von Stopplösung

16 Literaturverzeichnis

- 1 Fleming A (1929) "On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenza" *Brit J Exp Pathol* 10: 226-228
- 2 Joklik WK (1996) "The Story of Penicillin: The View from Oxford in the early 1950s" *FASEB J* 10: 525-528
- 3 Clarke HT, Johnson JR, Robinson R (1949) "The Chemistry of Penicillin" Princeton University Press, Princeton, S. 3-9
- 4 Süss O (1950) "Synthetische Versuche in der Penicillinreihe VI: Über eine Bildungsweise des Benzyl-penicillins (Penicillin G) aus Benzyl-penicilloinsäure" *Liebigs Anal Chem* 571: 201-225
- 5 Hoffmann H, Söder A, Schacht U, Weidenmüller HL (1972) "Antibiotika" In: Erhardt G und Ruschig H: *Arzneimittel: Entwicklung Wirkung Darstellung*, Bd.4 Verlag Chemie, Weinheim
- 6 Nicas TI, Cooper RDG (1997) "Vancomycin and other Glykopeptides", In: Strohl WR: *Biotechnology of antibiotics*, 2. Aufl. Marcel Dekker Inc, New York, S: 363-392
- 7 Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P (1988) "Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*" *N Engl J Med* 319: 157-161
- 8 Bates J, Jordens JZ, Griffiths DT (1994) "Farm animals as putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man" *J Antimicrob Chemother* 34: 507-514.
- 9 Richtlinie 96/66/EG Der Kommission vom 14. Oktober 1996 zur Änderung der Richtlinie 70/524/EWG des Rates über Zusatzstoffe in der Tierernährung (Abl EG Nr. L 272/32-35)
- 10 Hou JP, Poole JW (1971) "β-lactam antibiotics: their physicochemical properties and biological activities in relation to structure" *J Pharm Sci* 60: 503-532
- 11 van Krimpen PC, Van Bennekom WP, Bult A (1987) "Penicillins and cephalosporins. Physicochemical properties and analysis in pharmaceutical and biological matrices" *Pharm Weekbl Sci Ed* 9: 1-23
- 12 McGregor DN (1984) "Penicillins", In: Katritzky AR und Rees CW: *The structure, reactions, synthesis and the use of heterocyclic compounds*, Bd 7, Pergamon Press, Oxford, UK, S. 299-339
- 13 Page MI (1984) "The mechanism of reactions of beta-Lactam antibiotics" *Acc Chem Res* 17: 144-151
- 14 Finholdt P, Jürgensen G, Kristiansen H (1965) "Catalytic Effect of Buffers on Degradation of Penicillin G in Aqueous Solution" *J Pharm Sci* 54: 387-393
- 15 Boison JO (1995) "Chemical Analysis of beta-Lactam Antibiotics" In: Oka H, Nakazawa H, Harada K und Mc Neil JD: *Chemical Analysis for Antibiotics Used in Agriculture*, AOAC International, Arlington, USA
- 16 Degelaen JP, Loukas SL, Freeney J, Roberts GCK, Burgen ASV (1979) "A nuclear Magnetic Resonance Study of the Degradation of Penicillin G in Acidic solution", *J Chem Soc II*: 86-90

- 17 Parenti F, Cavalleri B (1989) "Proposal to name the vancomycin-ristocetin like glycopeptides as dalbaheptides" *J Antibiot* 42: 1882-1883
- 18 van de Kerk-van Hoof A, Heck AJ (1999) "Interactions of alpha- and beta-avoparcin with bacterial cell-wall receptor-mimicking peptides studied by electrospray ionization mass spectrometry" *J Antimicrob Chemother* 44: 593-599
- 19 Backes DW, Aboleneen HI, Simpson JA (1998) "Quantitation of vancomycin and its crystalline degradation product (CDP-1) in human serum by high performance liquid chromatography" *J Pharm Biomed Anal* 16: 1281-1287
- 20 Boeck LD, Mertz FP (1986) "A47934, a novel Glykopeptide-aGlykone antibiotic produced by a strain of *Streptomyces toyocaensis* taxonomy and fermentation studies" *J Antibiot (Tokyo)* 39 :1533-1540
- 21 Boeck LD, Mertz FP, Clem GM J (1985): "A41030, a complex of novel Glykopeptide antibiotics produced by a strain of *Streptomyces virginiae*. Taxonomy and fermentation studies" *J Antibiot (Tokyo)*: 38: 1-8
- 22 Schneider G (1985) *Pharmazeutische Biologie*, B.I.-Wissenschaftsverlag, Mannheim S. 484-494
- 23 Mandell GL, Petri WA (1996) "Penicillins, Cephalosporins, and other β -Lactam Antibiotics" In: Hardman JG et al.: *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9. Aufl., McGraw-Hill Company, New York, S. 1073-1101
- 24 Rimpler H (1990) *Pharmazeutische Biologie II: Biogene Arzneistoffe*, Thieme Verlag, Stuttgart, S. 564-593
- 25 Tipper DJ, Strominger JL (1965) "Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine" *Proc Natl Acad Sci USA* 54: 1133-1141
- 26 Lee B (1971) "Conformation of penicillin as a transition-state analog of the substrate of peptidoglycan transpeptidase" *J Mol Biol* 61: 463-469
- 27 Kelly JA, Moews PC, Knox JR, Frere JM, Ghuysen JM (1982) "Penicillin target enzyme and the antibiotic binding site" *Science* 218: 479-481
- 28 Kelly JA, Knox JR, Zhao H, Frere JM, Ghuysen JM (1989) "Crystallographic mapping of β -lactams bound to a D-alanyl-D-alanine peptidase target enzyme" *J Mol Biol* 209: 281-295
- 29 Kelly JA, Kuzin AP, Charlier P, Fozzy E (1998) "X-ray studies of enzymes that interact with penicillins" *Cell Mol Life Sci* 54: 353-358
- 30 Lamotte-Brasseur J, Dive G, Ghuysen JM (1991) "Conformational analysis of β and γ -lactam antibiotics" *Eur J Med Chem* 26: 43-50
- 31 Philippon A, Dusart J, Joris B, Frere JM (1998) "The diversity, structure and regulation of beta-lactamases" *Cell Mol Life Sci* (1998) 54: 41-346
- 32 Ghuysen JM (1991) "Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins" *Annu Rev Microbiol* 45: 37-67
- 33 Prescott JF, Baggot JD (1988) "Penicillins, Cephalosporins and newer Antibiotics" *Antimicrobial Therapie in Veterinary Medicine*, Blackwell Scientific Publications, Boston, UK, S. 71 -109
- 34 Hakenbeck R, Coyette J (1998) "Resistant penicillin-binding proteins" *Cell Mol Life Sci* 54: 332-340
- 35 Nakae T (1986) "Outer-membrane permeability of bacteria" *Crit Rev Microbiol* 13: 1-62

- 36 Youjun Yang, Beth A. Rasmussen, David M. Shlaes Pestka (1999) "Class A β -lactamases enzyme-inhibitor interactions and resistance" *Pharmacology & Therapeutics* 83: 141-151
- 37 Williams DH, Waltho JP (1988) "Molecular basis of the activity of antibiotics of the vancomycin group" *Biochem Pharmacol* 37: 133-141
- 38 Arthur M, Reynolds P, Courvalin P (1996) "Glykopeptide resistance in enterococci" *Trends Microbiol* 4: 401-407
- 39 Endtz HP, van den Braak N, Verbrugh HA, van Belkum A (1999) "Vancomycin resistance: status quo and quo vadis" *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18: 683-690
- 40 Levine BB, Ovary Z (1961) "Studies on the mechanism of formation of the penicillin anti-gen III. The N-(D- α -benzylpenicilloyl) group as an antigenic determinant responsible for hypersensitivity to penicillin G" *J Exp Med* 114: 875-1153
- 41 Schwartz MA (1969) "Chemical Aspects of Penicillin Allergy" *J Pharm Sci* 58: 643-661
- 42 Ahlstedt S, Kristofferson A (1982) "Immune mechanisms for induction of penicillin allergy" *Prog Allergy* 30: 67-134
- 43 Miles AM, Bain B (1992) "Penicillin anaphylaxis: a review of sensitization, treatment, and prevention" *Assoc Acad Minor Phys* 3: 50-56
- 44 Blanca M, Garcia J, Vega JM, Miranda A, Carmona MJ, Mayorga C, Moreno F, Juarez C (1996) "Anaphylaxis to penicillins after non-therapeutic exposure: an immunological investigation" *Clin Exp Allergy* 26: 335-340
- 45 Woodward KN (1991) "Hypersensitivity in humans and exposure to veterinary drugs" *Vet Hum Toxicol* 1991 33: 168-72
- 46 Lindemayr H, Knobler R, Kraft D, Baumgartner W (1981) "Challenge of penicillin-allergic volunteers with penicillin-contaminated meat" *Allergy* 1981 36: 471-478
- 47 Kuschinsky G, Lüllmann H (1989) *Pharmakologie und Toxikologie* S. 436-450 Thieme, Stuttgart
- 48 Dewdney JM, Maes L, Raynaud JP, Blanc F, Scheid JP, Jackson T, Lens S, Verschueren C (1991) "Risk assessment of antibiotic residues of beta-lactams and macrolides in food products with regard to their immuno-allergic potential" *Food Chem Toxicol* 29: 477
- 49 Janata O "Antibiotika", pm-Verlag, PWG Pharma Werbegesellschaft mbH, Kössen 3. Auflage (ISBN 3-900961-91-3) S. 36
- 50 Klinger W "Arzneimittel" In: Marquardt H und Schäfer SG, *Lehrbuch der Toxicologie Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin* S. 350-368
- 51 Petrusch R (Hrsg.) *Delta Index, - Das Wirkstoffverzeichnis der deutschen Arzneimittel* 13. Jahrgang, 6. Aufl. Delta -Verlag GmbH 1996
- 52 *Monographie Benzylpenicillin* (1988) *Bundesanzeiger* Nr. 60 vom 28 März 1988, S. 1436-1437
- 53 Kroker R (1991) *Pharmaka zur Behandlung und Verhütung bakterieller Infektionen* In: Löscher W, Ungemach FR, Kroker R: *Grundlagen der Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*, Verlag Paul Parey, Berlin
- 54 Wegener HC, Aarestrup FM, Jensen LB, Hammerum AM, Bager F (1999) "Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe" *Emerg Infect Dis* 5: 329-335
- 55 Siewert E (1989) "Zusatzstoffe in Futtermitteln" In: Grossklaus D und Kaul A: *Rückstände in von Tieren stammenden Lebensmitteln* Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, S. 75-103

- 56 Menke KH, Huss W (1987) Tierernährung und Futtermittelkunde
Verlag Eugen Ulmer GmbH, 3. Aufl.
- 57 Futtermittelverordnung i.d.F. vom 11. November 1992 (BGBl. I S. 1898), ÄndV vom 19.5.1993
(BGBl. S. 711), berichtigt 9.7. 1993 (BGBl. I S. 1126)VO
- 58 Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates vom 26. Juni 1990 zur Schaffung eines
Gemeinschaftsverfahrens für die Festlegung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände
in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs (Abl. EG Nr. L 244/1)
- 59 Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (Gesetz über den Verkehr mit Lebensmitteln,
Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und sonstigen Bedarfsgegenständen) i.d.F. der Bek.
vom 8. Juli 1993, (BGBl. I S. 1169)
- 60 Entscheidung der Kommission (93/256/EWG) vom 14. April 1993 über die Verfahren zum
Nachweis von Stoffen mit hormonaler bzw. thyreostatischer Wirkung (Abl. EG Nr. L 118/64)
- 61 Entscheidung der Kommission (93/257/EWG) vom 15. April 1993 über die Referenzmethoden
und das Verzeichnis der staatlichen Referenzlaboratorien für Rückstandsuntersuchungen
(Abl. EG Nr. L 118/75)
- 62 Institute of Reference Materials and Measurements,
European Commission - JRC, B 2440 - Geel, Belgium
- 63 Meetschen U, Petz M (1991) "Gas chromatographic method for the analysis of residues of seven
penicillins in food of animal origin" *Z Lebensm Unters Forsch* 193: 337-343
- 64 Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG (1997)
- 65 Ishida M, Kobayashi K, Awata N, Sakamoto F (1999) "Simple high-performance liquid
chromatography determination of ampicillin in human serum using solid-phase extraction disk
cartridges" *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 727: 245-248
- 66 Takeba K, Fujinuma K, Miyazaki T, Nakazawa H (1998) "Simultaneous determination of beta-
lactam antibiotics in milk by ion-pair liquid chromatography" *J Chromatogr A* 812: 205-211
- 67 Perez B, Prats C, Castells E, Arboix M (1997) "Determination of cloxacillin in milk and blood of
dairy cows by high-performance liquid chromatography"
J Chromatogr B 698: 155-160
- 68 Moats WA, Harik-Khan R (1995) "Liquid chromatographic determination of beta-lactam
antibiotics in milk: a multiresidue approach" *J AOAC Int* 78: 49-54
- 69 Lihl S, Petz M (1994) "HPLC determination of oxacillin, cloxacillin and dicloxacillin in bovine
muscle with automated cleanup by on-line solid phase extraction"
Z Lebensm Unters Forsch 199: 229-234
- 70 Heller DN, Ngoh MA (1998) "Electrospray ionization and tandem ion trap mass spectrometry for
the confirmation of seven beta-lactam antibiotics in bovine milk"
Rapid Commun Mass Spectrom 12: 2031-2040
- 71 Tyczkowska KL, Voyksner RD, Straub RF, Aronson AL (1994) "Simultaneous multiresidue
analysis of beta-lactam antibiotics in bovine milk by liquid chromatography with ultraviolet
detection and confirmation by electrospray mass spectrometry" *J AOAC Int* 77: 1122-1131
- 72 Straub RF, Voyksner RD (1993) "Determination of penicillin G, ampicillin, amoxicillin,
cloxacillin and cephapirin by high-performance liquid chromatography-electrospray mass
spectrometry" *J Chromatogr* 647: 167-181
- 73 Shah AJ, Adlard MW (1988) "Determination of beta-lactams and their biosynthetic intermediates
in fermentation media by pre-column derivatisation followed by fluorescence detection"
J Chromatogr 424: 325-336

- 74 Mascher HJ, Kikuta C (1998) "Determination of amoxicillin in human serum and plasma by high-performance liquid chromatography and on-line postcolumn derivatisation" *J Chromatogr A* 812: 221-226
- 75 Iwaki K, Okumura N, Yamazaki M, Nimura N, Kinoshita T (1990) "Precolumn derivatization technique for high-performance liquid chromatographic determination of penicillins with fluorescence detection". *J Chromatogr* 5042: 359-367
- 76 Munns RK, Shimoda W, Roybal JE, Vieira C (1985) "Multiresidue method for determination of eight neutral beta-lactam penicillins in milk by fluorescence-liquid chromatography". *J Assoc Off Anal Chem* 68: 968-971
- 77 Ang CYW, Luo W, Hansen EB Jr, Freeman JP, Thompson HC jr (1996) "Determination of amoxicillin in catfish and salmon tissues by liquid chromatography with precolumn formaldehyde derivatization" *J AOAC Int* 79: 389-396
- 78 Luo W, Ang CY, Thompson HC Jr (1997) "Rapid method for the determination of ampicillin residues in animal muscle tissues by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection" *J Chromatogr B* 694: 401-407
- 79 Verdon E, Couedor P (1999) "Multiresidue analytical method for the determination of eight penicillin antibiotics in muscle tissue by ion-pair reversed-phase HPLC after pre-column derivatization" *J AOAC Int* 82: 1083-1095
- 80 Boison JO, Keng LJ (1998) "Multiresidue liquid chromatographic method for determining residues of mono- and dibasic penicillins in bovine muscle tissues" *J AOAC Int* 81: 1113-1120
- 81 Sorensen LK, Rasmussen BM, Boison JO, Keng L (1997) "Simultaneous determination of six penicillins in cows' raw milk by a multiresidue high-performance liquid chromatographic method." *J Chromatogr B* 694: 383-391
- 82 Boison JO, Korsrud GO, MacNeil JD, Keng L, Papich M (1992) "Determination of penicillin G in bovine plasma by high-performance liquid chromatography after pre-column derivatization" *J Chromatogr* 576: 315-320
- 83 Berger K, Petz M (1991) "Fluorescence HPLC Determination of Penicillins using 4-Bromomethyl-7-methoxy-coumarin as pre-column labelling agent" *Dtsch Lebensm Rdsch* 87: 137-141
- 84 Ibach A, Petz M, Heer A, Mencke N, Krebber R (1998) "Oxacillin residues in milk after drying off with Stapenor Retard TS" *Analyst* 123: 2763-2765
- 85 Chen S, Yan G, Schwartz MA, Perrin JH, Schulman SG (1991) "Penicillin-enhanced chemiluminescence of the luminol-H₂O₂-Co²⁺ system" *J Pharm Sci* 80: 1017-1019
- 86 Nakashima K, Kawaguchi S, Akiyama S, Schulman SG (1993) "High performance liquid chromatography of penicillins with penicillin-enhanced luminol chemiluminescence detection" *Biomed Chromatogr* 7: 217-219
- 87 Boison JO, MacNeil JD (1995) " Chemical analysis of beta-lactam antibiotics"
In: Oka H, Nakazawa H, Harada K und Mac Neil JD: *Chemical Analysis for Antibiotics used in Agriculture*, AOAC International, Arlington, USA, S. 235-306
- 88 Lingemann H, McDowall RD, Brinkmann UAT (1991) "Guidelines for bioanalysis using column liquid chromatography", *Trends Anal Chem* 10: 48-58
- 89 Petz M (1992) "Comparison of chromatographic procedures for determining residues of penicillins", In : Agarwal VK: *Analysis of Antibiotic Drug residues in food products of animal origin*, Plenum Press, New York, USA, S. 147-163
- 90 Gafner JL (1999) "Identification and semiquantitative estimation of antibiotics added to complete feeds, premixes, and concentrates" *J AOAC Int* 82: 1-8

- 91 Fagan SVB, Gombatz C, Abdel-Kader H, Menon G (1995) "Determination of ardacin in various silage feed diets by a rapid liquid chromatographic assay" *J AOAC Int* 78: 16-21
- 92 The Ministry of Agriculture Fisheries and Food. A technical report for MAFF: A review of Antimicrobial Resistance in the Food Chain. London, July 1998
- 93 Farin D, Piva GA, Gozlan I, Kitzes-Cohen R (1998) "A modified HPLC method for the determination of vancomycin in plasma and tissues and comparison to FPIA (TDX)" *J Pharm Biomed Anal* 18: 367-372
- 94 Coco RM, Lopez MI, Pastor JC, Nozal MJ (1998) "Pharmacokinetics of intravitreal vancomycin in normal and infected rabbit eyes" *J Ocul Pharmacol Ther* 14: 555-563
- 95 Wood MJ, Lund R, Beavan M (1995) "Stability of vancomycin in plastic syringes measured by high-performance liquid chromatography" *J Clin Pharm Ther* 20: 319-325
- 96 Rouan MC (1985) "Antibiotic monitoring in body fluids" *J Chromatogr* 340: 361-400
- 97 Boison JO, MacNeil JD (1995) "New Kits Technology" In: Oka H, Nakazawa H, Harada K und Mac Neil JD: *Chemical Analysis for Antibiotics used in Agriculture* AOAC International, Arlington, USA, S. 77-119
- 98 Böhm HJ, Klebe G, Kubinyi H (1996) "Wirkstoffdesign"" Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg S.95
- 99 Kraak J, Tolle A (1967) "Brilliant-schwarz-Reduktionstest mit *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis* zum Nachweis von Hemmstoffen in Milch" *Milchwissenschaft* 22: 669-673
- 100 Produktinformationen (DELVOTEST-Serie, BR-Test) : Gist-Brocades Germany, Giselherstr. 12, 44319 Dortmund (<http://www.gist-brocades.nl>)
- 101 Produktinformationen (SWAB TEST ON PREMISES (STOP), LIVE ANIMAL SWAB TEST (LAST)) Solar Biologicals Inc., 826 Proctor Ave, Ogdensburg NY 13669 (<http://solarbiologicals.com/index.htm>)
- 102 ATCC - American Type culture collection, 10801 University Boulevard, Manassas VA 20110 (<http://www.atcc.org>)
- 103 DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Mascheroder Weg 1 b, 38124 Braunschweig (<http://www.dsmz.de>)
- 104 Lund (1986) *Proceedings 2nd World Congress Foodborne Infections and Intoxications Berlin 1986* S. 819-824
- 105 deLeuw P (1996) *Gewinnung und Einsatz multispezifischer Antikörper als Hilfsmittel zur Probenvorbereitung in der Rückstandsanalytik von Penicillinen* Diss. Universität-GH Wuppertal
- 106 Korsrud GO, Boison JO, Nouws JF, MacNeil JD (1998) "Bacterial inhibition tests used to screen for antimicrobial veterinary drug residues in slaughtered animals" *J AOAC Int* 81: 21-24
- 107 Cullor JS (1996) "Dilemmas associated with antibiotic residue testing in milk" In: *ACS Symposium Series: Veterinary Drug Residues*, Washington DC USA, S. 44-57
- 108 Report prepared by the Antibiotics in Animal Feedingstuffs Sub-Committee (1979) "Microbiological assay of avoparcin in animal feeds and pre-mixes" *Analyst* 104(1244):1075-1082
- 109 Neunte Richtlinie 81/715/EWG der Kommission vom 31. Juli 1981 zur Festlegung gemeinschaftlicher Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln *Abl EG Nr. L 257*
- 110 Produktinformationen (CHARM-Test): Charm Sciences Inc, Franklin Street, Malden, MA 02148 In Europa: MCS Diagnostics, Oudeweg 67, NL-6071 KP Swalen(<http://www.charm.com>)

- 111 Produktinformation (SNAP Test, CITE Probe, LacTek):
IDEXX Laboratories, Inc, One IDEXX Drive, Westbrook, Maine 04092 USA
In Deutschland: IDEXX GmbH, Ober-Saulheimer Str. 23, 55286 Wörrstadt
(<http://www.idexx.com>)
- 112 Produktinformationen (Penzym-Test) UCB-BIOPRODUCTS, Chemin du Lorient,
B-1420 Braine-L'Alleud, Belgium; In Deutschland Vertrieb durch: Chr. Hansen GmbH, Große
Drakenburger Str. 93-97, 31582 Nienburg
- 113 Frere JM, Klein D, Ghuysen JM (1980) "Enzymatic method for rapid and sensitive determination
of beta-lactam antibiotics." *Antimicrob Agents Chemother* 18: 506-510
- 114 Ghuysen JM, Reynolds PE, Perkins HR, Frere JM, Moreno R (1974) "Effects of donor and
acceptor peptides on concomitant hydrolysis and transfer reactions catalyzed by the exocellular
DD-carboxypeptidase-transpeptidase from *Streptomyces R39*" *Biochemistry* 13: 2539-2547
- 115 Corti A, Rurati C, Borghi A, Cassani G (1985) "Solid-phase enzyme-receptor assay (SPERA): a
competitive-binding assay for Glycopeptide antibiotics of the vancomycin class"
Clin Chem 31: 1606-1610
- 116 Levine BB, Ovary Z (1961) "Studies on the mechanism of formation of the penicillin antigen III.
The N-(D- α -benzylpenicilloyl) group as an antigenic determinant responsible for
hypersensitivity to penicillin G" *J Exp Med* 114, 875-1153
- 117 Ley AB, Harris JP, Brinkley M Liles B, Jack JA, Cahan A (1958) "Circulating antibodies
directed against Penicillin" *Science* 127, 1118
- 118 Kraft DA, Berglund A, Rumpold H, Roth A, Ebner H, (1981) "Radioallergosorbent test with
conjugates specific for „minor“ haptenic determinants in the diagnosis of IgE-mediated
penicillin allergy in man" *Clinical allergy* 11: 579-587
- 119 Elsasser TH, Munns RK, Shimoda W, (1987) "Methodological Considerations for Penicillin
Radioimmunoassay" *J Immunoassay* 8: 73-96
- 120 Harle DG, Baldo BA (1990) "Identification of penicillin allergenic determinants that bind IgE
antibodies in the sera of subjects with penicillin allergy" *Mol Immunol* 27: 1063-1071.
- 121 Harle DG, Baldo BA (1990) "Drugs as allergens: an immunoassay for detecting IgE antibodies
to cephalosporins" *Int Arch Allergy Appl Immunol* 92: 439-444
- 122 de Haan P, Boorsma DM, Kalsbeek GL (1979) "Penicillin hypersensitivity. Determination and
classification of anti-penicillin antibodies by the enzyme-linked immunosorbent assay"
Allergy 34: 111-119
- 123 Christie G, Coleman JW, Newby S, McDiarmid-Gordon A, Hampson JP, Breckenridge AM,
Park BK (1988) "A survey of the prevalence of penicillin-specific IgG, IgM and IgE antibodies
detected by ELISA and defined by hapten inhibition, in patients with suspected penicillin allergy
and in healthy volunteers" *Br J Clin Pharmacol* 25: 381-386.
- 124 Stanzl U, Fritsch PO, Varga JM Klein GF (1993) "Enzyme-linked immunosorbent assay for
detection of antibodies to the unmodified beta-lactam ring" *Allergy* 48: 151-157
- 125 Parker CW (1967) "Conjugation of Penicillin and its derivatives"
In: Chase NW, Williams CA (Hrsg.): *Methods in Immunology and Immunochemistry*
Academic Press, New York
- 126 Usleber E, Lorber M, Straka M, Terplan G, Maertlbauer E (1994) "Enzyme immunoassay for the
detection of isoxazolyl penicillin antibiotics in milk" *Analyst* 119: 2765-2768
- 127 de Leuw P, Kapa G, Petz M, Schreurs FJ, Kan CA (1997) "Induction and characterization of
multianalyte antibodies against penicillins in egg yolk" *AOAC Int* 80: 1220-1228

- 128 Rose BG, Kamps-Holtzapfle C, Stanker LH (1995) "Competitive indirect ELISA for ceftiofur sodium and the effect of different immunizing and coating antigen conjugates" *Bioconjug Chem* 6: 529-535
- 129 Usleber E, Litz S, Maertlbauer E (1998) "Production and Characterization of Group-Specific Antibodies against Penicillin Antibiotics" *Food agric Immunol* 10: 317
- 130 Mitchell JM, Yee AJ, McNab WB, Griffiths MW, McEwen SA (1999) "Validation of the LacTek test applied to spiked extracts of tissue samples: determination of performance characteristics" *J AOAC* 82: 79-83
- 131 Produktinformation (FLUOROPHOS BETASCREEN): Advanced Instruments, Inc., Advanced Instruments Technology Way, Norwood, MA 02062 (USA) (<http://www.aitests.com>)
- 132 Sternesjo A, Johnsson G (1998) "A novel rapid enzyme immunoassay (Fluorophos BetaScreen) for detection of beta-lactam residues in ex-farm raw milk" *J Food Prot* 61: 808-811
- 133 Produktinformationen (FPIA): In Deutschland: Abbott GmbH Diagnostika and MediSense; Postfach 1303, D-65003 Wiesbaden (<http://www.abbottdiagnostics.com>)
- 134 Produktinformation Innofluor (FPIA): OXIS International, Inc., 6040 N. Cutter Circle, Suite 317, Portland, OR 97217-3935, USA; In Europa: Z.A. des Petits Carreaux, 2 Av. des Coquellcots, 94385 Bonneuil-Sur-Marne Cedex, France (<http://www.oxis.com>)
- 135 Adamczyk M, Brate EM, Chiappetta EG, Ginsburg S, Hoffman E, Klein C, Perkowski MM, Rege SD, Chou PP, Costantino AG (1998) "Development of a quantitative vancomycin immunoassay for the Abbott AxSYM analyzer" *Ther Drug Monit* 20: 191-200
- 136 Somerville AL, Wright DH, Rotschafer JC (1999) "Implications of vancomycin degradation products on therapeutic drug monitoring in patients with end-stage renal disease" *Pharmacotherapy* 19: 702-708
- 137 Azzazy HM, Chou PP, Tsushima JH, Troxil S, Gordon M, Avers RJ, Chiappetta E, Duh SH, Christenson RH (1998) "Abbott AxSYM Vancomycin II assay: multicenter evaluation and interference studies" *Ther Drug Monit* 20: 202-7
- 138 Dietrich R, Usleber E, Märtlbauer E (1998) "The potential of monoclonal antibodies against ampicillin for the preparation of a multi-immunoaffinity chromatography for penicillins" *Analyst* 123: 2749-2754
- 139 Stryer L (1996), "Biochemie" Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg
- 140 Harlow E, Lane D (1988): "Antibodies : a laboratory manual" Cold Spring Harbor, New York
- 141 van Regenmortel MHV, Briand JP, Muller S, Plaué SE (1988) "Synthetic Polypeptides as Antigens" In: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* Vol. 19; Elsevier, Amsterdam/New York/Oxford
- 142 Linke R (1998) "Immunologische Techniken" In: Lottspeich F, Zorbas H (Hrsg.): *Bioanalytik*; Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg S. 67 - 102
- 143 Szurdoki F, Bekheit HKM, Marco MP, Goodrow MH, Hammock BD (1995) "Important Factors in Hapten Design and Enzym-Linked Immunosorbent Assay Development" In : Kurtz DA, Skeritt JH, Stanker L (Hrsg.) *New Frontiers in Agrochemical Immunoassay*, AOAC International, Arlington, USA
- 144 Newman DJ, Price CP (1996) " Molecular aspects of design of immunoassays for drugs" *Ther Drug Monit* 18: 493-497
- 145 Märtlbauer EP (1993): "Enzymimmuntests für antimikrobiell wirksame Stoffe" Ferdinand Enke Verlag Stuttgart

- 146 Peters JH Baumgarten (1990): "Monoklonale Antikörper"
Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, 2. Aufl.
- 147 Holtzapfle CK, Carlin RJ, Rose BG, Kubena LF, Stanker LH (1996) "Characterization of monoclonal antibodies to aflatoxin M1 and molecular modeling studies of related aflatoxins"
Mol Immunol 33: 939-945
- 148 Carlin RJ, Kamps-Holtzapfle C, Stanker LH (1994) "Characterization of monoclonal anti-furosemide antibodies and molecular modeling studies of cross-reactive compounds"
Mol Immunol 31: 153-163
- 149 Tramontano A, Schloeder D (1989) "Production of antibodies that mimic enzyme catalytic activity" Methods Enzymol 178: 531-550
- 150 Pratt RF, Govardhan CP (1984) "beta-Lactamase-catalyzed hydrolysis of acyclic depsipeptides and acyl transfer to specific amino acid acceptors" Proc Natl Acad Sci USA 81: 1302-1306
- 151 Nieto M, Perkins HR (1971) "Modifications of the acyl-D-alanyl-D-alanine terminus affecting complex-formation with vancomycin" Biochem J 123: 789-803
- 152 Rao J, Whitesides GM (1997) "Tight binding of a dimeric derivative of vancomycin with dimeric L-Lys-D-Ala-D-Ala" J Am Chem Soc 119: 10286-10290
- 153 Wilchek M, Bayer EA (1990) "Introduction to avidin-biotin technology"
Methods Enzymol 184:5-13
- 154 Schallenberg EE, Calvin M (1955) "Ethyl thioltrifluoroacetate as an acetylating agent with particular reference to peptide synthesis" J Am Chem Soc 77: 2779-2783
- 155 Hesse M, Meier H, Zeeh B (1991) „Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie“
Georg Thieme Verlag Stuttgart NY, 4. Aufl.
- 156 Jones J (1994): "The Chemical Synthesis of Peptides" Clarendon Press, Oxford
- 157 Weygand F, Hoffmann D, Wunsch E (1966): "Peptidsynthesen mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von N-Hydroxysuccinimid" Z Naturforsch 21: 426-428
- 158 Anderson GW, Zimmerman JE, Callahan FM (1964) "The use of esters of N-hydroxy-succinimide in peptide synthesis" J Am Chem Soc 86: 1839-1842
- 159 Jork H, Funk W, Fischer W, Wimmer H: Dünnschicht-Chromatographie Reagenzien und Nachweis Methoden Band 1b, VCH Weinheim S. 169-173
- 160 Goldberger RF, Anfisen CB (1962): "The reversible masking of amino groups in ribonuclease and its possible usefulness in the synthesis of the proteins" Biochemistry 1: 401-405
- 161 Csapó J, Csapó-Kiss Z, Wágner L, Tálos T, Truman GM, Folestad S, Tivesten A, Nemethy S (1997) "Hydrolysis of proteins at high temperatures and for short times with reduced racemization, in order to determine the enantiomers of D- and L-amino acids"
Analytica Chimica Acta 339: 99-107
- 162 Bürk E, Usleber E, Diertrich R, Märklbauer E (1995) "Production and Characterisation of antibodies against neosaxitoxin utilizing a novel immunogen synthesis procedure"
Food Agric Immun 7: 315-322
- 163 Wilson MB, Nakane PK (1978) "Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies" In: Knapp W (Hrsg.): "Immunofluorescence and related staining techniques". Elsevier, Amsterdam 215-224.
- 164 Avrameas S (1969) "Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies." Immunochemistry 6: 43-52
- 165 Bradford M (1976) "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding"
Anal Biochem 72: 248-254

- 166 Litz S (1995): „Entwicklung und Charakterisierung enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von Penicillinen" Diss. Universität München
- 167 Aminosäuresequenz: glucose oxidase precursor-aspergillus niger
Proteindatenbank: National Center of Biotechnology Information (NCBI)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- 168 Aminosäuresequenz: serum albumin precursor-bovine (bos taurus)
Proteindatenbank: National Center of Biotechnology Information (NCBI)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- 169 van der Kerk-van Hoof A, Heck AJ (1999) “Covalent and non-covalent dissociations of gas-phase complexes of avoparcin and bacterial receptor mimicking precursor peptides studied by collisionally activated decomposition mass spectrometry”
J Mass Spectrom 34: 813-819
- 170 Fagan NP, McEvoy JDG, Lynas L, Fitzpatrick DA, McCaughey JW (1999):
”A study of the effect of individual feed constituents on the recovery of avoparcin from compound animal feedingstuffs”
Analyst 124: 949-952
- 171 Doerffel K, Eckschlager K (1981) ”Optimale Strategien in der Analytik“
Verlag Harri Deutsch, Frankfurt a. M.
- 172 Dudley RA, Edwards P, Ekins RP, Finney DJ, McKenzie IG, Raab GM, Rodbard D, Rodgers RP (1985) ”Guidelines for immunoassay data processing“
Clin Chem : 1264-1271
- 173 Persönliche Auskunft Dr. Deagelean, Fa. UCB Bioproducts
- 174 Evaluation of certain veterinary drug residues in food: thirty-six report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 1990
World Health Organization technical report series 799; ISBN 92 4 120799 X
- 175 EMEA/CVMP “Penicillins-Summary Report” The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products/Committee for Veterinary Medicinal Products (<http://www.eudra.org>)
- 176 Bally RW, Gribnau TC (1989): Some aspects of the chromogen 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as hydrogen donor in a horseradish peroxidase assay” J Clin Chem Clin Biochem 27: 791-796
- 177 Frey A, Meckelein B, Externest D, Schmidt MA (2000): “A stable and highly sensitive 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays”
Journal Immunol Methods 233: 47-56
- 178 Mumford JL, Williams K, Wilcosky TC, Everson RB, Young TL, Santella RM (1996)
“A sensitive color ELISA for detecting polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human tissues” Mutation Research 359: 171-177
- 179 Santarius K, Petz M (1998) “Zur Qualitätssicherung bei der Routine-Rückstandsanalytik auf Pharmakologisch wirksame Stoffe” Deutsche Lebensmittel-Rundschau 94: S. 245-251
- 180 Funk W, Dammann V, Donnevert G (1990): Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie
VCH-Verlagsgesellschaft Weinheim, NY, Basel, Cambridge, 1. Auflage
- 181 Persönliche Auskunft Dr. Wiemann, Fa. Hoffmann-Laroche,
Marketing Tierernährung und Gesundheit
- 182 Gliddon MJ, Poole CA, Johannsen FH, Bucher E, Thalman A, Dresbach C, Abramowski B (1992) “Microbiological Assay of Avoparcin in Animal Feeds and Pre-mixes –Co-operative Study” Analyst 117: 1401-1405

17 Anhang

17.1 Auswertung von Standardkurven

Verwendete Programme

1: Tabellenkalkulation: MICROSOFT® EXCEL 2000, Microsoft Cooperation

2. Datenanalyse und Graphische Darstellung von Standardkurven:

MICROCAL™ ORIGIN™, Microcal Software Inc,

One Roundhouse Plaza, Northampton MA, 01060 USA

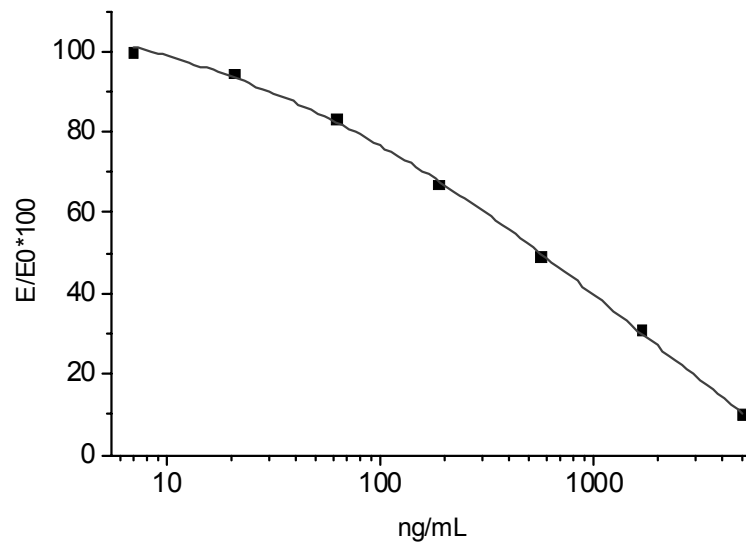
Vorgehensweise:

- 1) Berechnung von relativen Extinktionen (E/E0 [%]) und statistischer Daten unter MICROSOFT® EXCEL

Rohdaten				$E/E0 [\%] = \frac{(E - E_{blank})}{(E0 - E_{blank})} * 1000$					
ng/ml	Extinktion (E)			Mittelwert			S(E/E0)	VK(E/E0) [%]	
	1	2	3	1	2	3			
5000,0	0,200	0,179	0,216	10,34	9,12	11,27	10,25	0,88	8,59
1666,7	0,548	0,52	0,594	30,56	28,94	33,24	30,91	1,77	5,73
555,6	0,807	0,864	0,939	45,61	48,93	53,28	49,27	3,14	6,37
185,2	1,190	1,127	1,213	67,87	64,21	69,20	67,09	2,11	3,15
61,7	1,433	1,415	1,524	81,99	80,94	87,27	83,40	2,77	3,32
20,6	1,528	1,686	1,740	87,51	96,69	99,83	94,67	5,23	5,52
6,9	1,798	1,654	1,777	103,20	94,83	101,98	100,00	3,69	3,69
E0	1,745	1,729	1,787						
blank	0,02	0,017	0,03						
Messung unbekannter Proben									
Probe 1	0,563	0,49	0,544	31,44	27,19	30,33	29,65	1,80	6,06
Probe 2	0,89	0,832	0,905	50,44	47,07	51,31	49,60	1,83	3,69
Probe 3	1,134	1,098	1,179	64,61	62,52	67,23	64,79	1,93	2,97

- 2) Berechnung der Standardkurven unter MICROCAL™ ORIGIN™, (Tool: „Creating a Standard Curve“)
 - a) Datenpaare (Konzentration:Extinktion) aus Excel kopieren und in ein Origin-Tabellenblatt (Tool: “assay worksheet”) einfügen
 - b) Auswahl des Kalibrierungsmodells: “logistic fit“
 - c) Berechnung und graphische Darstellung der Standardkurve durch die Befehle „simulation“ und „fit“
 - d) Eingabe der relativen Extinktionen (E/E0) für die Proben in das Tabellenblatt (Spalte: Ynew)
 - e) Berechnung der Konzentrationen für die unbekannte Probe (Ergebnis erscheinen in Spalte Xnew)
 - f) Für eine weitere Bearbeitung unter Excel kann das Tabellenblatt als Excel-Tabellenblatt exportiert werden.

(für ausführliche Informationen zur Auswertung von Standardkurven unter Microcal Origin sei auf das zugehörige Handbuch und auf die on-line Hilfe verwiesen)



Graphische Darstellung der Standardkurve (logistic fit) unter MICROCAL™ ORIGIN™,

3. Kontrolle der Standardkurven

E/E0 [%]	VK(E/E0)	Konz. gegeben [ng/ml]	Konz. berechnet	Abweichung (%)
94,68	1,77	20,6	17,94	12,91
83,40	3,14	61,7	58,85	4,63
67,09	2,11	185,2	197,63	6,71
49,27	2,77	555,6	571,92	2,94
30,91	5,23	1666,7	1566,06	6,04
10,24	3,69	5000	5134,31	2,69

4. Berechnung der Konzentrationen für unbekannte Proben aus der Standardkurve unter MICROCAL™ ORIGIN™ (Messwerte E/E0 siehe Rohdaten.)

	Werte aus Einzelmessungen [ng/ml]			Mittel [ng/ml]	VK(konz)
Probe 1	1521,54	1922,26	1616,96	1686,92	10,13
Probe 2	535,64	646,70	509,97	564,10	10,52
Probe 3	231,62	263,82	195,88	230,44	12,04

17.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl
Ag	Antigen
AK	Antikörper
Ala	Alanin
Ampi	Ampicillin
AS	Aminosäure
BSA	Bovine serum albumin (Rindereserumalbumin)
CDP	Cristalline Degradation Product
const.	konstant
d.h.	das heißt
Da	Dalton
DASP	Double Antibody Solid Phase
DC	Dünnschichtchromatographie
dc.	decomposition
DCCI	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
dest	destilliert
E	Extinktion
EIA	Enzym-Immuno-Assay
ELISA	Enzyme-linked-Immuno-Sorbent-Assay
EMEA	The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
EtOH	Ethanol
EU	Europäische Union
EWG	Europäisches Wirtschaftsgebiet
f	Freiheitsgrad (Statistik)
FIA	Fluorescence-Immuno-Assay
FPIA	Fluoreszenz-Polarisations-Immuno-Assay
GA	Glutardialdehyd
GC	Gaschromatographie
Gl	Gleichung
GOD	Glucoseoxidase
h	Stunde
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
i.d.R	In der Regel
IR	Infrarot
JECFA	The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
Kap.	Kapitel
kass	Assoziationskonstante
Kd	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton (1 kDa = 1000 Da)
Konz.	Konzentration
λ	Lambda, Synonym für Wellenlänge
l	Liter
LC	Liquid chromatographie (Flüssigchromatography)
LUFA	Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt
Lys	Lysin
μg	Mikrogramm

µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
mark.	markiert
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minute
Mind.	mindestens
ml	Milliliter
MRL	Maximum Residue Limit (Rückstandshöchstmenge)
MS	Massenspektrometrie
MWCO	Molecular Weight Cut-off
n	Anzahl (Statistik)
ng	Nanogramm
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
NWG	Nachweisgrenze
OPA	o-Phthaldialdehyd
PBP	Penicillin-Binding Proteine
PBS	Phosphate-buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
Pen G	Penicillin G, Benzylpenicillin
RIA	Radio-Immuno-Assay
RP	Reversed phase (Umkehrphase)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
sogn.	sogenannt
SPERA	Solid-Phase-Enzyme-Rezeptor-Assay
SPE	Solid Phase Extraction
Tab	Tabelle
TATG	2,3,4,6-tetra-O-Acetyl-1-thio-β-D-Glucopyranose
TFA	Trifluoressigsäure (Trifluoressigsäure)
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
UV	Ultraviolett
v	Volumen
Vergl.	vergleiche
VK	Variationskoeffizient
w	Weight (Masse)
x	Synonym für Konzentration (Statistik)
y	Synonym für Messwert (Statistik)
z.B.	zum Beispiel

17.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1:	Einteilung der Glykopeptidantibiotika	11
Tab. 2-2:	Bis 1997 in Deutschland zulässige Avoparcin-Konzentrationen	24
Tab. 3-3:	Maximal zulässige Penicillinrückstände in Lebensmitteln	27
Tab. 9-1:	Übersicht über die Konjugatsynthesen	76
Tab. 10-1:	Untersuchung von Retenaten und Dialysaten im Penzymtest	92
Tab. 12-1:	Bestimmung der 50%-Dosis unter optimierten ELISA-Bedingungen	103
Tab. 12-2:	Ermittlung optimaler Testbedingungen	109
Tab. 12-3:	Vergleich der „Kreuzreaktivitäten“ der Antikörper gegenüber N α Ac-Lys-D-Ala-D-Ala, Avoparcin und Vancomycin	110
Tab. 12-4:	Zusammenfassung der Ergebnisse des Epitopmappings	117
Tab. 12-5:	Gegenüberstellung der Assoziationskonstanten von verschiedenen Vancomycin/-und Avoparcin/D-Ala-Peptid-Komplexen	122
Tab. 13-2:	Extinktionsmittelwerte der Nachweisgrenzen auf Grundlage der relativen Extinktion von 14 Probenleerwerten	126
Tab. 13-3:	Verhältnis von falsch-positiven zu falsch-negativen Ergebnissen unter Zugrundelegung verschiedener Extinktionsmittelwerte für die Nachweisgrenze	126
Tab. 13-4:	Zusammenstellung der Ergebnisse des Avoparcin-Screenings	134
Tab. 15-1:	Puffer und Reagenzlösungen für die Konjugatsynthesen	165
Tab. 15-2:	Kopplung von Na-Ac-Lys-D-Ala-D-Ala, Ampicillin und Vancomycin an Rinderserumalbumin (BSA), Glucoseoxidase(GOD) und Meerretichperoxidase (HRP)	168
Tab. 15-3:	Pipettierschema zur Aufnahme vom Kalibriergerade von Proteine	169
Tab. 15-4:	Puffer und Reagenzlösungen für ELISA-Techniken	172

17.4 Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 2-1:</i>	Strukturen veterinärmedizinisch relevanter Penicilline	7
<i>Abb. 2-2:</i>	Abbaureaktionen durch nucleophilen Angriff	8
<i>Abb. 2-3:</i>	Abbaureaktion durch elektrophile Substitution	8
<i>Abb. 2-4:</i>	Strukturen der wichtigsten Glykopeptidantibiotika	10
<i>Abb. 2-5 :</i>	Grundgerüst der Glykopeptidantibiotika	11
<i>Abb. 2-6:</i>	Abbau von Vancomycin zum "crystalline degradation product"	12
<i>Abb. 2-7:</i>	Aufbau der Zellwand grampositiver und gramnegativer Bakterien	13
<i>Abb. 2-8:</i>	Quervernetzung zweier Mureinstränge	14
<i>Abb. 2-9:</i>	Modell der Penicilline und des D-Alanyl-D-Alanin-Endes eines Pentapeptidstranges (rechts).	14
<i>Abb. 2-10:</i>	Interaktion einer D,D-Carboxypeptidase mit D-Alanyl-D-Alanin und Penicillinen	16
<i>Abb. 2-11:</i>	Koplanare binding-entity von Benzylpenicillin und dem stabilsten, gestreckten Konformer von Ac ² -L-Lys-D-Ala-D-Ala	17
<i>Abb. 2-12:</i>	β -Lactamaseinhibitoren: Clavulansäure und Sulbactam	18
<i>Abb. 2-13:</i>	Komplex von Avoparcin mit N α -Ac-Lys-D-Ala-D-Ala	19
<i>Abb. 6-1:</i>	Vergleich von direktem und indirektem ELISA	47
<i>Abb. 8-1:</i>	Synthese von N ϵ -Trifluoracetyl-Lysin	53
<i>Abb. 8-2:</i>	Infrarotspektrum von N ϵ -Trifluoracetyl-L-Lysin (KBr)	54
<i>Abb. 8-3:</i>	Acetylierung von N ϵ -Trifluoracetyl-Lysin	54
<i>Abb. 8-4:</i>	Dünnschichtchromatographische Kontrolle der Synthese von N ϵ TFA-N α Ac-Lysin	55
<i>Abb. 8-5:</i>	Infrarotspektrum von N ϵ -Trifluoracetyl-N α -Acetyl-L-Lysin	55
<i>Abb. 8-6:</i>	Knüpfung einer Peptidbindung mittels DCCI	56
<i>Abb. 8-7:</i>	Synthese des N ϵ TFA-N α Acetyl-Lysin-NHS-Esters	58
<i>Abb. 8-8:</i>	IR-Spektrum des N ϵ -TFA,N α -Acetyl-Lysin-NHS-Esters	58
<i>Abb. 8-9:</i>	Kopplung von N ϵ TFA-N α Ac-Lys-NHS an Alanyl-Alanin	59
<i>Abb. 8-10:</i>	Dünnschichtchromatographische Überprüfung der Kopplungsreaktion	60
<i>Abb. 8-11:</i>	IR-Spektrum von N ϵ -TFA,N α -Acetyl-L-Lysyl-L-Alanyl-L-Alanin	61
<i>Abb. 8-12:</i>	IR-Spektrum von N ϵ -TFA,N α -Acetyl-L-Lysyl-D-Alanyl-D-Alanin	61
<i>Abb. 8-13:</i>	HPLC-Chromatogramme (Ionenpaarchromatographie)	64
<i>Abb. 8-14:</i>	Derivatisierung von D,L-Aminosäuren zu diastereomeren Verbindungen	65
<i>Abb. 8-15:</i>	HPLC-Chromatogramme nach saurer Hydrolyse und Derivatisierung mit OPA/TATG	66
<i>Abb. 8-16:</i>	IR-Spektrum des N α -Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala-Standards	68
<i>Abb. 8-17:</i>	IR-Spektrum von N α -Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala (eigenes Produkt)	68
<i>Abb. 8-18:</i>	IR-Spektrum von N α -Ac-L-Lys-L-Ala-L-Ala (eigenes Produkt)	68
<i>Abb. 8-19:</i>	Nachweis der Komplexbildung von N α Ac-Lys-D-Ala-D-Ala durch Vancomycin	69
<i>Abb. 9-1:</i>	Reaktion von Glutardialdehyd mit primären Aminen	73

Abb. 10-1:	Ermittlung der Kopplungseffizienz von Lys-D-Ala-D-Ala an Glucoseoxidase und Rinderserumalbumin	81
Abb. 10-2:	Oxidation von 3,3',5,5'-TMB durch H ₂ O ₂ und Meerrettichperoxidase	83
Abb. 10-3:	Ablauf des Solid-Phase-Rezeptor-Assay auf Glykopeptidantibiotika	84
Abb. 10-4:	Bindung des Vancomycin-Konjugats an festphasengebundenes BSA-Lys-D-Ala-D-Ala	85
Abb. 10-5:	Standardkurven (Kompetitionsexperiment) mit dem GOD-Lys-D-Ala-D-Ala-Konjugat und dem Vancomycin-HRP-Konjugat	86
Abb. 10-6:	Überprüfung des GOD-Ampicillin-Konjugates im indirekten Penicillin-ELISA	89
Abb. 10-7:	Ablauf des indirekten ELISA	90
Abb. 11-1:	Titerbestimmung im direkten ELISA (DASP-Technik)	97
Abb. 11-2:	Durchführung der Titerbestimmung bzw. der Kompetitionsexperimente mittels DASP-Technik (direkter ELISA)	98
Abb. 11-3:	Zeitlicher Verlauf der Serentiter (DASP-Technik)	99
Abb. 11-4:	Beispiel einer Titrationskurve zur Ermittlung des Serumtiters im direkten ELISA (DASP-Technik)	100
Abb. 12-1:	Mögliche Bildungswege von anti-Lys-D-Ala-D-Ala- und anti-Penicillin-Antikörpern im Zuge des angewandten Immunisierungsprotokolls	105
Abb. 12-2:	schematische Darstellung der zur Detektion penicillinspezifischer Antikörper eingesetzten Penicillin-Meerrettichperoxidase-Konjugate	106
Abb. 12-4:	Beispiel für die Ermittlung der optimalen Serenverdünnung	109
Abb. 12-5:	Kompetition durch N α AcLys-D-Ala-D-Ala, Avoparcin und Vancomycin im indirekten ELISA,	112
Abb. 12-6:	Standardkurven der im Epitopmapping eingesetzten Kompetitoren	115
Abb. 13-1:	Ablauf der Extraktion von Avoparcin aus Futtermitteln	121
Abb. 13-2:	Standardkurven für Avoparcin für die beiden im Screening eingesetzten Mikrotiterplatten	127
Abb. 13-3:	Ermittlung der Nachweisgrenze für den Avoparcin-ELISA nach SANTARIUS und PETZ anhand von „scheinbaren Konzentrationen“	128
Abb. 13-4:	Abhängigkeit der berechneten Variationskoeffizienten der Konzentrationsbestimmung VK(konz) von der jeweiligen Avoparcin-Konzentration.	130
Abb. 13-5:	Vergleich der Wiederfindungsprofile für die quantitative Avoparcinbestimmung	131
Abb. 13-6:	Erwartete Wiederfindungsprofile für die quantitative Avoparcinbestimmung und tatsächliche Wiederfindungen	131
Abb. 15-1:	Belegung einer Mikrotiterplatte zur Ermittlung der Serentiter	177
Abb. 15-2:	Beispiel zur Belegung einer 96 well-Mikrotiterplatte in der zweidimensionalen ELISA-Technik	179
Abb. 15-3:	Beispiel zur Belegung einer 96 well-Mikrotiterplatte für quantitative ELISA-Techniken.	180