

Immunchemische Methoden

Erstausgabe Mai 1998

INHALTSVERZEICHNIS

Allgemeiner Teil

Glossar

- 1 Einführung
- 2 Grundlagen von immunchemischen Methoden
 - 2.1 Antiseren und Antikörper
 - 2.2 Antikörper - IgG-Molekül
 - 2.3 Antigen-Antikörper-Reaktion - Immunkomplexe
- 3 Die gebräuchlichsten immunchemischen Methoden
 - 3.1 Testsysteme mit nicht markierten Immunreagenzien
 - Präzipitation
 - einfache Geldiffusion
 - doppelte Geldiffusion
 - radiale Geldiffusion
 - Immunelektrophorese: Elektrophorese und Geldiffusion
 - Aglutination
 - Immunaффinitätschromatographie
 - 3.2 Testsysteme mit markierten Immunreagenzien
 - 3.3 Immunchemische Analysenmethoden am Beispiel des Enzymimmunoassays
 - 3.4 Fliessschema von Enzymimmunoassays in Mikrotiterröhrchen
 - 3.5 Ablesen und Messen von Immunreaktionen
 - mit blosserem Auge
 - mit Messinstrument
 - Bestimmen der AK-Konzentration-Titer
 - 3.6 Bestimmen der Analytkonzentration
 - Matrixeffekt
 - 3.7 Hinweise für die EIA-Praxis
 - Empfindlichkeit
 - Spezifität
 - Wiederfindungsrate
 - Wiederholbarkeit
 - 3.8 Mögliche Fehler bei EIA

- 4 Literatur
 - Lehrbücher und Handbücher
 - Übersichtsartikel

Untersuchungsmethoden

- 1 Nachweis und Bestimmung des Prolamins (Gliadin, Hordein, Secalin)

Allgemeiner Teil

Glossar

Affinität: Ein Mass für die Bindungskonstante einer einzelnen antigenbindenden Stelle mit einer monovalenten antigenen Determinante.

Agglutination: Reaktion eines AK mit einem multivalenten Antigen, das in Partikelform vorliegt. Die Quervernetzung führt zu einer Verklumpung oder Agglutination.

Antigene (AG): Jede Substanz, die spezifisch durch Antikörper gebunden wird.

Antikörper (AK): Moleküle, die als Reaktion auf den Kontakt mit einem Antigen gebildet werden und an dieses Antigen spezifisch binden können.

Antiserum: Aufbereitetes oder rohes Serum mit spezifischen Antikörpern.

Carrier: Molekül, welches ein gekoppeltes Hapten befähigt, eine spezifische AK-Produktion zu stimulieren.

Coat: Beschichtung einer geeigneten Oberfläche.

Determinante: Teil eines Antigenmoleküls, das an die Antikörper-Bindungsstelle oder an einen Rezeptor auf T-Zellen bindet.

Enzymimmunoassay (EIA): Immunoassay bei dem der Analyt oder der Antikörper mit Enzym markiert ist.

Epitop: Ein anderer Begriff für antigene Determinante.

Fab: Antigenbindendes Fragment.

Fc: Kristallines Fragment.

Haptene: Niedermolekulare Verbindungen, gegen die das Immunsystem in konjugierter Form spezifische AK zu produzieren vermag. Es sind Antigene, die nicht immunogen wirken.

Immunoassay: Testsystem, das für den quantitativen Nachweis von Antigenen, Antikörpern oder Substanzen die Spezifität der Antigen-Antikörperreaktion benutzt.

Immunogene: Jede Substanz, die in der Lage ist eine Immunantwort auszulösen.

Immunglobulin: Oberbegriff für alle Antikörper-Moleküle. Jede Immunglobulineinheit besteht aus zwei schweren und zwei leichten Ketten und besitzt zwei Antigen-Bindungsstellen.

Immunkomplex: AG, das an AK gebunden ist, evtl. mit konjugiertem Anhängen.

IgY: Immunglobuline von Vögeln.

Klon: Nachkommenschaft einer einzigen Zelle. Ein Klon umfasst die durch Teilung aus einer Ursprungszelle hervorgegangenen Abkömmlinge.

Lymphozyten: Gruppe der weissen Blutzellen.

Monoklonale Antikörper (mAK): Hochspezifische Antikörper aus dem Überstand von Zellklonkulturen, die alle genau dieselbe Spezifität für ein Epitop besitzen. In der Immunologie beschreibt monoklonal gewöhnlich ein AK-Präparat das homogen ist, mit einer einzigen Spezifität.

Monoklonal: Aus einem Zellklon stammend.

Polyklonal: Von mehreren verschiedenen Zellklonen stammend.

pAK: polyklonale Antikörper.

Präzipitation: Bildung von AG-AK Komplexe in wässriger Lösung durch Quervernetzung von bivalenten AK mit multivalentem AG.

Präzipitine: Antigen-Antikörperkomplexe.

Semiquantitativ: Messverfahren, bei dem die Messwerte nicht kontinuierlich, sondern stufenartig angegeben werden. Keine absolute Konzentrationsbestimmung, sondern ein Vergleich mit einer vorgegeben Wertskala.

Serum: Flüssiger Bestandteil von koaguliertem Blut.

Titer: Die stärkste Verdünnung des Serums resp. des AK, die noch eine positive Reaktion im jeweiligen Testsystem aufweist.

Tracer: Markierte Form des AG, um Immunkomplex zu markieren.

Valenz: Anzahl Bindungsstellen eines Antikörpers. Der Begriff wird manchmal auch für Anzahl Determinanten pro Antigen verwendet.

1 Einführung

Zellen von Wirbeltieren sind fähig eine grosse Zahl Molekülstrukturen zu erkennen - "zu analysieren". Zu diesen Zellen gehören die weissen Blutkörperchen (*Leukozyten*). Sie vermögen Proteine - Antikörper (AK) - zu synthetisieren, die eine spezifische Affinität zu körperfremden Molekülstrukturen - Antigene (AG) - haben. Spezifische AK binden sich an entsprechende AG und bilden so Immunkomplexe. Die immunchemische Analytik macht sich die Affinität von spezifischen AK zu Nutze, um bestimmte Stoffe - Analyte - in Lebensmitteln zu analysieren.

Die Eigenschaften des AK bilden den Kern einer immunchemischen Analysenmethode. Je selektiver der AK den Analyten erkennen und binden kann, desto einfacher gestaltet sich die Probenaufbereitung und damit die immunchemische Analysenmethode.

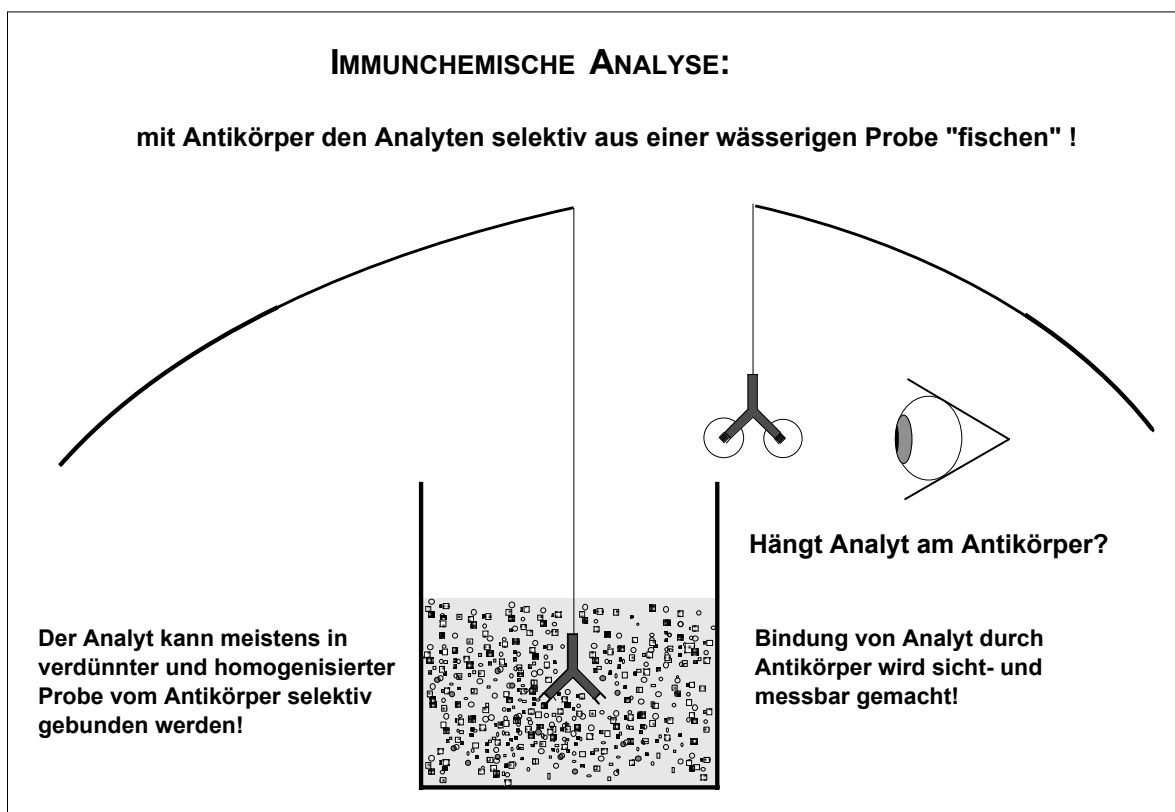


Abb. 52A.1
Prinzip der Immunchemischen Analyse

In der Analytik zeichnen sich immunchemische Methoden im allgemeinen durch folgende Eigenschaften aus:

- hohe Sensitivität (bis zu Picogramm pro Liter)
- einfache Probenvorbereitung
- geringer Lösungsmittelverbrauch
- hoher Probendurchsatz - Automatisierung möglich
- einfache Auswertung
- Ergebnisse nach sehr kurzer Zeit
- relativ niedrige Kosten

Sie werden deshalb häufig als Screeningmethoden eingesetzt.

2 Grundlagen von immunchemischen Methoden

2.1 Antiseren und Antikörper

Bei der Entwicklung einer immunchemischen Analysenmethode ist es das Ziel, Antikörper (AK) zu erzeugen, die gegen den Analyten gerichtet sind. Zahlreiche lebensmittelrelevante Analyte sind von den Eigenschaften her Immunogene und lösen eine Immunantwort aus, da sie für den tierischen Organismus fremd sind, eine hohe molekulare Masse (> 5000 D) und eine hohe chemische Komplexizität haben. Niedermolekulare Analyte (< 5000 D) aber lösen im tierischen Organismus keine oder eine ungenügende Immunantwort aus. Sie müssen zuerst mit einem Immunogen konjugiert werden, damit das Immunsystem gegen solche Analyte AK erzeugt. Solche niedermolekulare Verbindungen nennt man *Haptene*. Sie können mit AK einen Immunkomplex (siehe Abschnitt 2.3) bilden und sind damit immunchemisch ebenfalls analysierbar.

AK werden von differenzierten Lymphozyten (B-Zellen, Plasmazelle) gebildet, die ursprünglich aus dem Knochenmark stammen und über das Blut- und Lymphsystem im ganzen Organismus zirkulieren.

Kaninchen, Meerschweinchen, Mäuse und Hühner aber auch grössere Tiere, wie Schaf, Ziege und Pferd werden durch abgestimmte Injektionen von Immunogenen aktiv immunisiert. Die Immunisierung ist mit einer Schutzimpfung beim Menschen zu vergleichen. Das Potential für die Induktion von AK, besonders gegen konjugierte Haptene, ist nicht bei allen Tierarten gleich. Die Induktion von hochspezifischen und sensitiven AK ist eine komplexe Angelegenheit. Sie wird beeinflusst von der Art des Immunogens, von dem Träger (*Immunogen*) für das *Hapten*, von der Kopplung und Reinigung des Immunogens, von der Spezies sowie vom Individuum.

Serum ist der Bestandteil des Blutes, der die AK enthält. Zur Gewinnung des Serums müssen die zellulären Bestandteile und das gerinnbare Fibrinogen des Blutes abgetrennt werden. *Serum* mit Fibrinogen wird als Plasma bezeichnet. Normales *Serum* von Säugtieren besteht zu 90% aus Wasser und enthält 6 - 8% Proteine, davon sind 60 - 70% *Albumine* und 30% *Globuline*.

Die *Globuline* - wegen ihrer globulären Struktur so genannt - teilen sich auf in 3 - 4% α -1-Globuline, 4 - 8% α 2-Globuline, 8-13% β -Globuline und schliesslich 10 - 20% γ -Globuline. Die Fraktion der γ -Globuline enthält die spezifischen AK, die im Serum etwa 2,5 % des Gesamtproteins ausmachen.

Ein *Antiserum (AS)*, das von einem immunisierten Tier stammt, ist das Produkt von mehreren Lymphozytenklonen, wobei jeder Klon spezifische AK mit einer bestimmten Affinität zum AG produziert. Normales AS enthält also eine heterogene Mischung von AK mit leicht unterschiedlicher Affinität zu gleichen oder unterschiedlichen Oberflächenstrukturen (Epitopen, siehe später) des AG. Die AK solcher Seren werden, da sie von mehreren Plasmazellklonen stammen, *polyklonale Antikörper (pAK)* genannt. Häufige Quellen für polyklonale AK von immunisierten Tieren sind Blut (Antiserum z. B. von Kaninchen), Eier (IgY-Fraktion des Eidotters z. B. von Hühnern) und Milch (γ -Globulin-Fraktion z. B. von Rindern).

Bei der Produktion von *monoklonalen AK (mAK)* werden die antikörperproduzierenden B-Lymphozyten eines immunisierten Spendertieres mit Myelom-Zellen (krebsartig entartete B-Lymphozyten) fusioniert und in einem Zellkulturmedium kloniert. Aus den zahlreichen Klonen eines Fusionansatzes, werden diejenigen selektioniert, die bezüglich Spezifität und Sensivität die gewünschten Eigenschaften aufweisen. Der Aufwand zur Erzeugung eines spezifischen, sensitiven mAK ist erheblich grösser, als für einen ähnlichen pAK. Zudem ist das Potential für mAK auf diejenigen Tierarten beschränkt, die sich inzüchten lassen. Für analytische Zwecke werden meistens polyklonale AK eingesetzt, doch gewinnen die mAK für spezifische Aufgabenstellungen an Bedeutung.

2.2 Antikörper - Immunglobulin G-Molekül (IgG)

Für die Immunreaktion ist die Struktur der AK von Bedeutung (Abb.52A.2). Die beiden wichtigsten Eigenschaften der AK, die Spezifität und die biologische Aktivität, sind strukturgebunden. Das Immunglobulin G-Molekül weist die Form eines "Y" auf. Dieses "Y" besteht aus vier Peptidketten. Die vier Ketten sind so miteinander verknüpft, dass der AK zwei identische Hälften aufweist, die jeweils aus einer langen (schweren) und einer kurzen (leichten) Kette bestehen. Die vier Ketten werden durch Disulfidbindungen zwischen den Cysteineinheiten zusammengehalten. Der Stamm wird als Fc-Fragment und die beiden Schenkel werden als Fab-Fragmente bezeichnet. Diese Fab-Fragmente enthalten einen konstanten und einen hypervariablen Teil der für die AG-Bindung verantwortlich ist.

Das Fc-Fragment kann enzymatisch vom Fab-Fragment abgetrennt werden, ohne dass die Bindungsaktivität der einzelnen Fragmente beeinträchtigt wird.

AK weisen sehr individuelle Eigenschaften auf und reagieren deshalb auch sehr unterschiedlich auf Umgebungseinflüsse. Im allgemeinen sind sie jedoch sehr stabil. Temperaturen bis 56 °C während 30 min oder kurzzeitige Senkungen des *pH*-Werts auf 2 werden von den meisten AK überstanden.

Wird auf einige einfache Prinzipien zur Verhütung von Denaturierung und Proteolyse (*Proteinabbau*) geachtet, so können sie mit minimalem Schaden über längere Zeit gelagert werden.

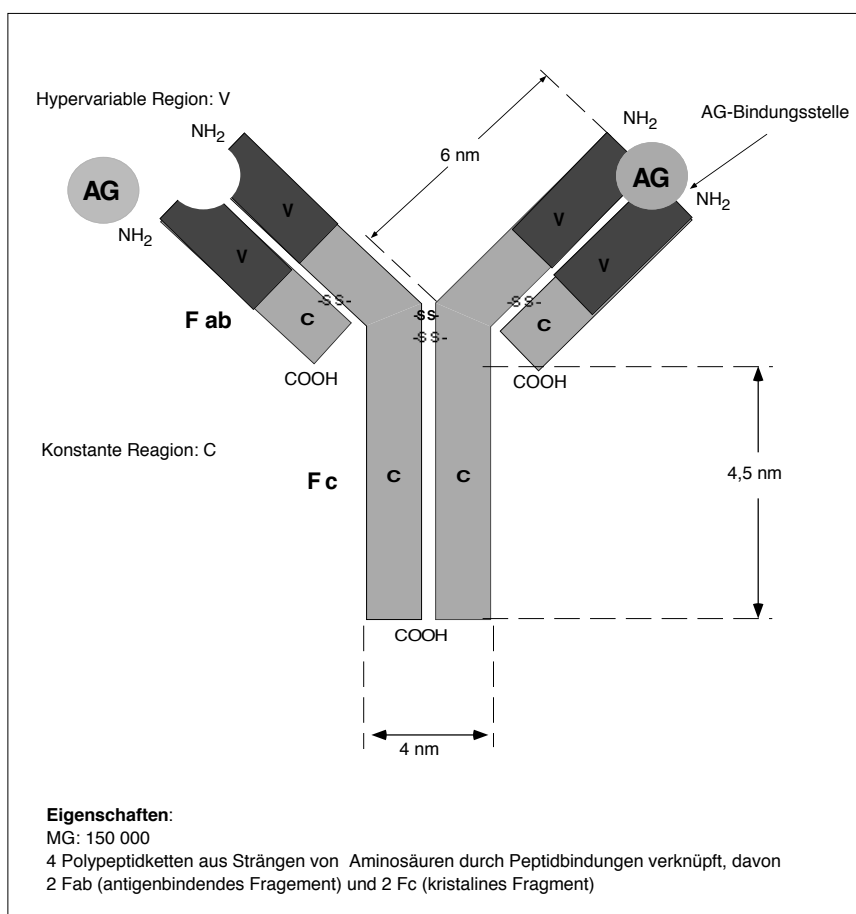


Abb. 52A.2
Y-Struktur des Antikörpers

Eine Denaturierung kann von leichter Schädigung der Konformation bis zu einem Verlust der Löslichkeit und einer massiven irreversiblen Aggregation führen. Massive Erwärmung, längere Lagerung über 8 °C und häufiges Auftauen und Gefrieren sollen vermieden werden. Proteasen für die Proteolyse von AK können vom Serum selber, aber auch von Mikroorganismen stammen, mit denen das Serum kontaminiert worden ist.

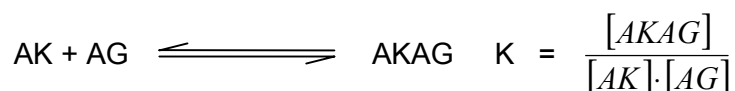
Serum enthält selber eine Anzahl von Proteasehemmern und kann normalerweise gut bei 4 °C über mehrere Monate ohne nennenswerte Aktivitätsverluste gelagert werden. Um AS vor Proteolyse und bakteriellem Verderb zu schützen werden sie mit Natriumazid (10 mM) oder Merthiolat (0,005 %) konserviert, in Portionen unter -20 °C (wenn möglich bei -70 °C) gelagert oder lyophilisiert. Beim Lyophilisieren muss oft ein deutlicher Aktivitätsverlust in Kauf genommen werden. Das Portionieren kann umgangen werden, wenn die AS in physiologischem Phosphatpuffer mit 50 % Glycerin oder Ethylenglycol gelagert werden, die das Einfrieren verhindern. AS sollen möglichst in konzentrierter Form gelagert werden.

Da AS unterschiedlich auf Umgebungseinflüsse reagieren, gibt es wenig publizierte Erfahrungen zur Stabilisierung von AK (1, 2, 3). Die Erfahrungen bei der Herstellung von Test-Kits werden als Firmengeheimnis streng gehütet.

2.3 Antigen-Antikörper-Reaktion - Immunkomplexe

Gelangt ein Immunogen in den Organismus z. B. eines Kaninchens, so wird es von speziellen Zellen aufgenommen und zerteilt. Den AK-produzierenden Zellen werden dann nur Bruchstücke des Immunogens zum Abtasten präsentiert. Diese, für ein bestimmtes AG charakteristischen Bruchstücke, enthalten die Bindungsorte, mit denen spezifische AK in einem Antiserum reagieren. Diese Bindungsorte auf einem Antigen werden Epitope oder antigene Determinanten genannt. Spezifische AK sind also nicht gegen die ganze immunogene Verbindung spezifisch, sondern nur gegen einzelne Epitope. Die AK der Immunglobulinklasse G sind bivalent, d.h. sie besitzen zwei identische AG-Bindungsstellen.

Die interagierenden Gruppen des AG und des AK müssen sich räumlich gut nähern können, damit es zu einer festen Bindung durch die intermolekularen Anziehungskräfte kommt. Die Bindungskräfte werden durch Wasserstoffbindungen, elektrostatische Bindungen, Van-der-Waals-Bindungen und hydrophobe Bindungen bewirkt. Obwohl die Kräfte dieser Bindungen im Vergleich zu kovalenten Bindungen schwach sind, ergibt sich aus ihrer Summe doch eine beachtliche Bindungsenergie. Die Reaktion eines AK mit einem univalenten AG (z.B. Hapten mit einer Bindungsstelle) kann durch folgende Gleichung dargestellt werden:



Die AK-AG-Bindung folgt den Regeln des Massenwirkungsgesetzes und ist prinzipiell reversibel.

Die Kraft einer einzelnen AG-AK-Bindung nennt man die *AK-Affinität*. Sie ist die Summe der anziehenden und abstossenden Kräfte. Eine hohe AK-Affinität zum AG setzt eine gute Passform voraus, umgekehrt passt ein AK mit einer niedrigen Affinität nur schlecht zu dem betreffenden AG. Einflüsse, die leichte Konfigurationsänderungen des AK oder AG bewirken, können die Affinität besonders von mAK erheblich schwächen. So kann die Adsorption der AK an eine feste Phase massive Aktivitätsverluste bewirken. Die Affinität bestimmt wesentlich die Qualität des AK's für einen immunchemischen Test, da sie die Festigkeit der AG-AK-Bindung bestimmt.

Im Allgemeinen bleibt die Affinität von pAK für ihre AG im *pH*-Bereiche 4 - 9 und Salzkonzentrationsbereich $c(\text{NaCl}) = 0-1 \text{ mol/l}$ konstant. mAK dagegen können, da sie oft nur an einem Epitop binden, sehr empfindlich auf Milieu-Änderungen reagieren. Eine *pH*-Änderung von 7,0 auf 8,0 oder eine Änderung der Anzahl mol/l von 100 auf 200 mmol/l kann die Bindungsfähigkeit bereits aufheben.

Die *Spezifität*, d.h. das Vermögen bestimmte Strukturen von hochmolekularen Verbindungen zu erkennen und sich mit ihnen zu einem *Immunkomplex* zu verbinden, ist die markanteste Eigenschaft der AK. Diese Eigenschaft wird in der klinischen Diagnostik und in der Analytik zur Identifikation oder zum Nachweis von verschiedenster AG und AK benutzt.

Die immunologische Reaktion eines AK mit strukturell unterschiedlichen AG, wird *Kreuzreaktion* genannt (Abb. 52A.3). Antigene Determinanten müssen dabei nicht völlig identisch sein, sondern strukturelle Ähnlichkeiten können genügen, dass sie von AK gebunden werden. Die Bindungskräfte für die einzelnen AG sind dann verschieden stark. Haben die strukturell unterschiedlichen AG gleiche, gemeinsame Determinanten, so handelt es sich um eine gemeinsame Reaktivität; die Bindungskräfte sind dann gleich stark.

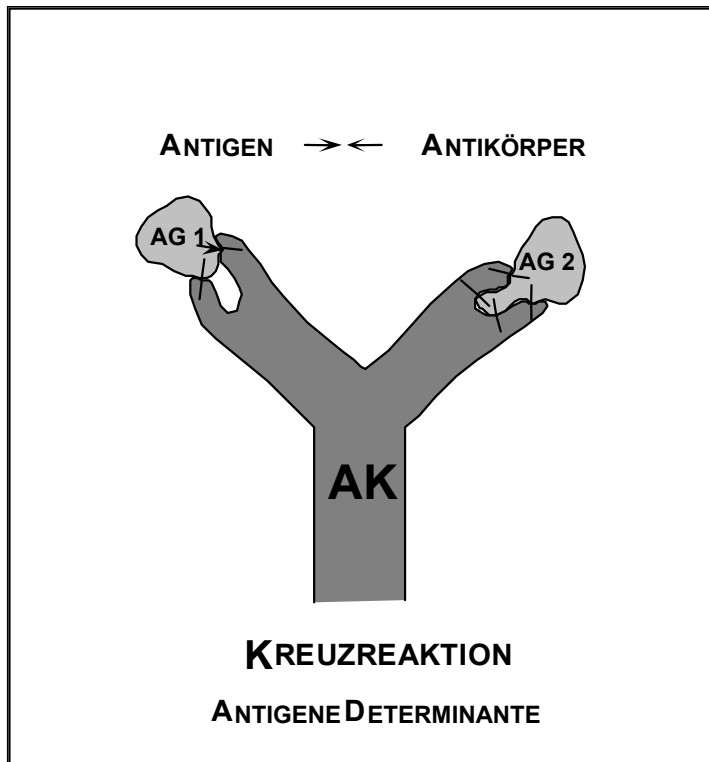


Abb. 52A.3

AG-AK-Bindung mit strukturell unterschiedlichen Antigenen (AG1 u. AG2)

Obwohl das Kennzeichen der immunochemischen Analyse die Spezifität ist, werden Kreuzreaktionen relativ häufig beobachtet. Wird mit Aflatoxin AFB₁, das mit einem Carrier konjugiert ist, immunisiert, so werden AK erzeugt, die auch AFB₂ und AFG₁ binden, d.h. mit ihnen kreuzreagieren. Als Maß für den Einfluss von AFB₂, AFG₁ und AFG₂ auf ein Testsystem für AFB₁, kann das Verhältnis der Konzentrationen (nmol/l) dienen, die 50% des markierten Referenzanalyts verdrängt, bzw. die maximale Extinktion (maximale Bindung des markierten Referenzanalyts) um 50% reduziert. Die relative Kreuzreaktion eines AK für ein definiertes Testsystem wird oft nach folgender Formel berechnet:

Kreuzreaktion von AFB₂, in Anzahl Teilen von 100 Teilen =

$$100 \cdot \frac{\text{Dosis des markierten AFB}_1, \text{ in } 50 \text{ von } 100 \text{ Teilen}}{\text{Dosis des AFB}_2, \text{ in } 50 \text{ von } 100 \text{ Teilen}}$$

Nebst den Kreuzreaktionen sind auch die sogenannten unspezifischen Reaktionen zu erwähnen. So reagiert z.B. Protein A unspezifisch mit dem Fc-Fragment eines Kaninchen-AK. Dies sind Gründe, weshalb eine positive Reaktion möglichst mit einer zweiten, unabhängigen Methode bestätigt werden muss. Für Screening-Methoden sind Kreuzreaktionen aber oft erwünscht, da mit einem Test eine breitere Palette von verwandten Verbindungen erfasst werden.

3 Die gebräuchlichsten immunchemischen Methoden

Die Immunkomplexe sind so klein, dass sie auch elektronenoptisch kaum sichtbar sind. Werden AK oder Analyte markiert, so können bereits wenige Immunkomplexe sichtbar und messbar gemacht werden. Es soll ein grober Überblick über die grundsätzlichen Methoden gegeben werden, mit denen Immunkomplexe nachgewiesen werden. Zu jeder Methode gibt es eine ganze Anzahl abgeleitete (modifizierte) Methoden, auf die, falls erforderlich, im methodischen Teil eingegangen wird.

Tabelle 52A.1

Nachweisempfindlichkeit bei verschiedenen Immunoassays (aus 4)

Methode	Abkürzung	Autor	Jahr	mg/l
Immunpräzipitationsanalyse	AG-AK-IP	Heidelberg	1932	10
Agargeldoppeldiffusion	ADD	Ouchterlony	1948	20
einfache radiale Immundiffusion	RID	Mancini	1965	5
Immunelektrophorese	IE	Scheidegger	1955	30
Latex-Agglutination	LA	Singer u. Plotz	1956	$< 10^{-2}$
Immunfluoreszenz	IF	Coons	1941	$< 10^{-3}$
Enzymimmunoassay	EIA	Engvall	1972	$< 10^{-9}$
Radioimmunoassay	RIA	Yalow et Berson	1958	$< 10^{-9}$

3.1 Testsysteme mit nicht markierten Immunreagenzien

PRÄZIPITATION

Bivalente AK reagieren mit multivalenten AG, wenn sie in geeigneten Konzentrationsverhältnissen vorliegen. Durch Vernetzung entstehen unlösliche Immunkomplexe (Präzipitine), die ausfallen und makroskopisch sichtbar werden. Das Präzipitat zeigt die Bindung des AK mit dem AG an. Ungeeignete Konzentrationsverhältnisse können diese Präzipitinreaktion stören oder gar verhindern.

Die Präzipitinanalyse kommt bei der Bestimmung von Proteinen zur Anwendung. Die Präzipitationsreaktion läuft nicht nur in Lösung ab, sondern auch in halbfesten Medien z. B. Agar-Gelen.

EINFACHE GELDIFFUSION (Abb.52A.4)

In Gele werden Löcher gestanzt, in welche auf der einen Seite AK-Verdünnungen und auf der anderen Seite AG-Lösungen gebracht werden. Die AK und AG diffundieren im Gel aufeinander zu. An einer bestimmten Zone zwischen den beiden Löchern liegen die AK und die AG in Mengen vor, die zu einem Präzipitat führen und damit die AG-AK-Reaktion sichtbar werden lassen.

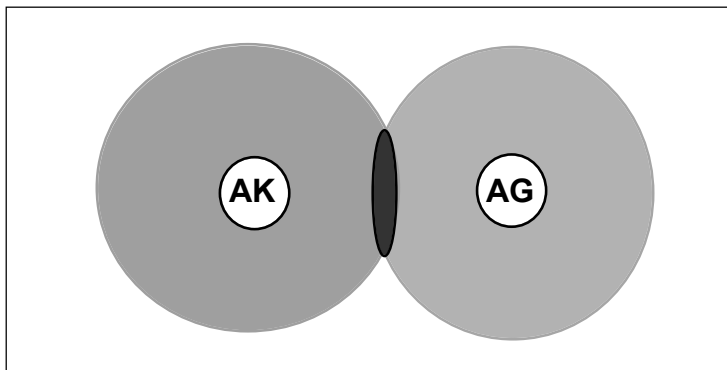


Abb. 52A.4
einfache Geldiffusion

DOPPELTE GELDIFFUSION

Für die Identitätsprüfung von zwei Antigenen kann die doppelte Geldiffusion angewendet werden. In eine Vertiefung wird die AK-Verdünnung gegeben und in zwei weitere die beiden AG-Lösungen. Der Verlauf der Präzipitationslinie zeigt, ob die beiden AG identisch, partiell identisch oder nicht identisch sind.

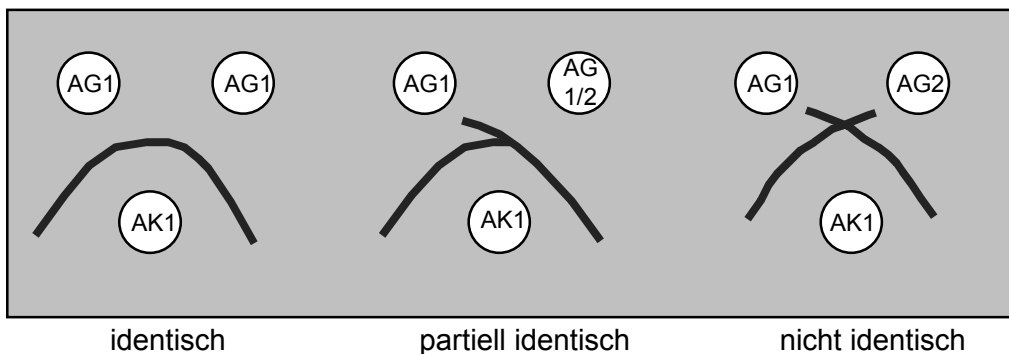


Abb. 52A. 5
Doppelte Geldiffusion mit 2 Antigenen und einem Gemisch gegen AK 1

RADIALE DIFFUSION

AK wird im Gel homogen verteilt, rund um die Vertiefung mit dem AG bildet sich ein Präzipitatring, dessen Durchmesser von der Antigenkonzentration abhängt.

IMMUNELEKTROPHORESE: ELEKTROPHORESE U. GELDIFFUSION

Komplexe Antigengemische werden zuerst in einem elektrischen Feld getrennt. Danach wird zwischen den Vertiefungen für die AG-Lösungen die AK-Lösung in eine Kerbe eingefüllt.

Durch Diffusion des AK gegen die Analytfraktionen bilden sich Präzipitatbögen, die einen Vergleich von zwei komplexen AG-Mischungen erlauben.

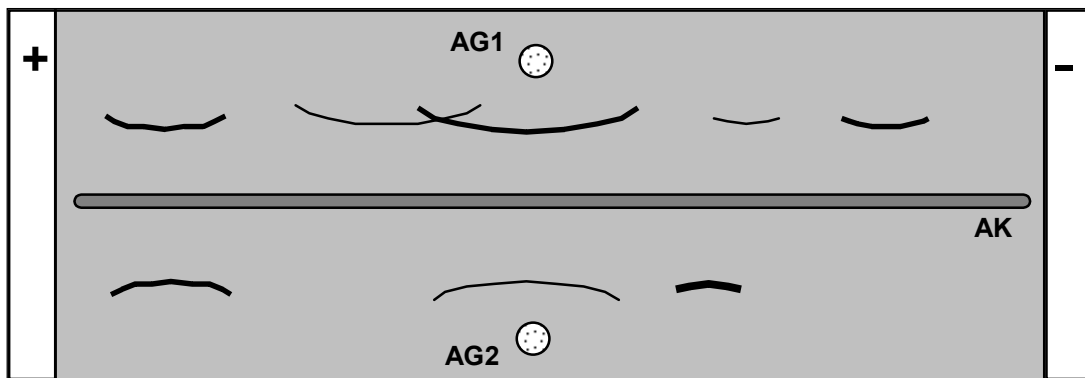


Abb. 52A. 6

Immunelektrophorese zur Identitätsprüfung von zwei Antigenen

Ergebnis: Antigen 1 ist nicht identisch mit Antigen 2

AGGLUTINATION

Die von der Serotypisierung der Bakterien abgeleitete Agglutinationsreaktion kann für partikuläre und für lösliche AG verwendet werden. Als unlösliches Stützmaterial zur Fixierung von nicht partikulären AG werden oft Latexkügelchen oder Schaf-Erythrozyten verwendet. Wird nun einer AG-Partikel-Suspension AK zugesetzt, so kommt es zur Vernetzung der Partikel - zur Agglutination. Ist das AG natürlicher Bestandteil des Partikels, so spricht man von direkter Agglutination, wird hingegen unlösliches Stützmaterial verwendet, so spricht man von passiver Agglutination.

IMMUNAFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

Die Affinitätschromatographie nutzt für die Trennung, im Gegensatz zu anderen chromatographischen Verfahren, besonders die spezifischen biologischen Funktionen bzw. die individuellen chemischen und sterischen Strukturen der Analyte. Mehr oder weniger spezifische Liganden, die kovalent an eine feste Matrix gebunden werden, erkennen und binden die gewünschten Moleküle oder Molekülgruppen in einer Mischung. Dadurch können die gewünschten Moleküle von den übrigen Substanzen durch einfaches Auswaschen getrennt werden. Werden als Liganden spezifische Antikörper verwendet, so spricht man von Immunaffinitätschromatographie. Die Antikörper werden dabei kovalent z. B. an Agarose gebunden, und zwar so, dass der Spezifitätsverlust möglichst gering bleibt. Das Trägermaterial muss dicht mit spezifischen Antikörpern beschichtet werden, was meistens nur mit monoklonalen Antikörpern möglich ist. Mit solchen Immunadsorbentien können Analyte hochspezifisch isoliert und gereinigt werden. Die Elution der Analyte versucht man so zu wählen, dass das Immunadsorbens dabei nicht irreversibel denaturiert, sondern mehrmals benutzt werden kann.

3.2 Testsysteme mit markierten Immunreagenzien

Beim Immunoassay (IA) werden geringe Mengen von Immunkomplexen durch eine Markierung des AK oder des Analyten sichtbar und messbar gemacht. Beim Radioimmunoassay (RIA) wird mit Isotopen (Tritium, Jod 125, Selen 75, Cobalt 57), beim Immunofluoreszenz-Assay (FIA) mit fluoreszierenden, beim Chemilumineszenz-Immunoassay (CIA) mit chemilumineszierenden Verbindungen und beim Enzymimmunoassay (EIA) mit Enzymen (Peroxidase, alkalischer Phosphatase, etc.) markiert. Die Analyse mit IA stützt sich auf den quantitativen Nachweis von markierten Immunkomplexen.

In der immunchemischen Analytik haben sich im Laufe der Entwicklung einige Methoden besonders bewährt und durchgesetzt. Die Kriterien sind Empfindlichkeit, Spezifität, einfache Handhabung, geringer Aufwand, breiter Anwendungsbereich, kurze Testzeit. In niedrigem Konzentrationsbereich sind vor allem der EIA und der RIA bevorzugte immunchemische Analysemethoden. Wegen der strengen Sicherheits- und Entsorgungsvorschriften beim Umgang mit radioaktiven Stoffen, wird dem EIA in Fällen, wo die Vorzüge des RIA nicht zum tragen kommen, den Vorzug gegeben. Bei qualitativem und quantitativem Nachweis im niedrigen Konzentrationsbereich sind RIA und EIA weitaus am empfindlichsten (siehe Tabelle 52A.1).

3.3 Immunochemische Analysemethoden am Beispiel des Enzymimmunoassays

Der ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) oder allgemeiner heterogener EIA genannt, ist ein sehr häufig verwendetes IA-System. Bei diesem System wird der eine Reaktionspartner an eine feste Phase gebunden. Der andere enzymmarkierte Reaktionspartner wird in wässriger Lösung zugegeben. Die entstandenen Reaktionsprodukte (Immunkomplexe) sind an die feste Phase gebunden. In einem Waschgang werden die überschüssigen, ungebundenen Reaktionspartner weggespült und damit von den gebundenen Immunkomplexen getrennt.

Im zugesetzten Substrat wird das Enzym, das über eine spezifische AG-AK-Bindung am Immunkomplex hängt, katalytisch aktiv und setzt farblose Chromogene zu farbigen Produkten um. Die Menge der farbigen Produkte kann spektrophotometrisch gemessen werden. Die Extinktion ist der Menge der Immunkomplexe proportional.

Als feste Phase oder Trägermaterial können Glas, Kunststoffe (Polystyrol, PVC, Nylon etc.), organische Substanzen (Cellulose, Agarose etc.) aber auch anorganische Substanzen (Kieselgel) in jeder beliebigen Form (Kugel, Röhrchen, Stäbchen, Folien, Mikrotiterplatten) verwendet werden. Die Bindung des AG oder des AK an die feste Phase (Coat) kann adsorptiver, kovalenter oder biologischer Art sein. Meistens haften die AK oder die AG aufgrund adsorptiver Kräfte an der festen Phase. Es handelt sich dabei um eine physikalische Adsorption, die aufgrund unterschiedlicher Ladungsverhältnisse von Coat und fester Phase (Wasserstoffbindungen, elektrostatische Bindungen, Van-der-Waals-Bindungen, hydrophobe Bindungen) zustande kommt. Zur Standardisierung der Adsorptionrate und damit der Aktivität des Testsystems ist ein standardisiertes Trägermaterial erforderlich.

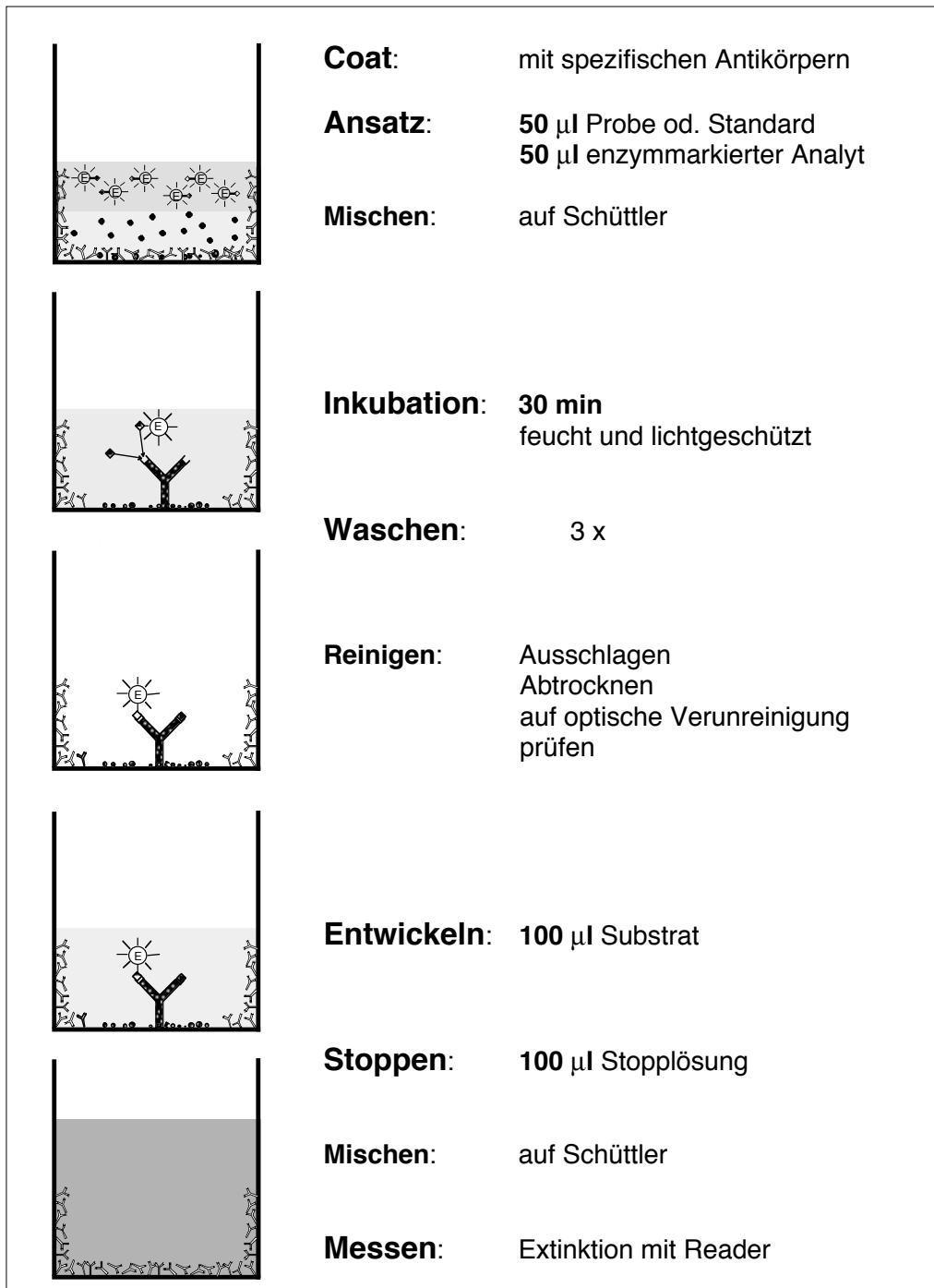
Tab. 52A.2
Varianten des Enzymimmunoassays

Immunoassays werden oft nach folgenden Kriterien eingeteilt:

<i>Testablauf</i>	
homogener EIA	Durch die immunologische Reaktionen eines AG mit einem AK wird unmittelbar auch die systemgekoppelte Enzymaktivität modifiziert. Da eine Abtrennung der gebildeten Immunkomplexe nicht erforderlich ist, können diese Art EIA in einer homogenen Phase durchgeführt werden.
heterogener EIA	Das freie enzymmarkierte AG oder der freie enzymmarkierte AK muss vom AG-AK-Enzymkomplex zuerst getrennt werden, bevor die Enzymaktivität bestimmt werden kann. Um diese Trennung einfach durchführen zu können, wird das AG oder der AK an eine feste Phase gebunden. Diese EIA-Variante wird für die Untersuchung von Lebensmitteln am meisten verwendet.
<i>AK-Konzentration</i>	
kompetitiver EIA	Das enzymmarkierte AG tritt mit dem Analyten um die begrenzte Anzahl Bindungsstellen des AK in Konkurrenz.
nicht kompetitiver EIA	Das AG kann mit einem Überschuss an AK reagieren.
<i>Herkunft des Mess-Signals</i>	
direkter EIA	Die Menge der Komplexe mit enzymmarkiertem AG wird direkt bestimmt.
indirekter EIA	Die Menge Analyt-AK-Komplexe wird indirekt über die Menge der enzymmarkierten, sekundären AK bestimmt, die den primären AK des Immunkomplexes markieren.
<i>zeitliche Anordnung der Inkubationsphasen</i>	
konsekutiver EIA	Freies und enzymmarkiertes AG wird konsekutiv (nacheinander) mit dem AK inkubiert
simultaner EIA	Freies und enzymmarkiertes AG wird simultan (gleichzeitig) mit dem AK inkubiert

3.4 Fließschema von Enzymimmunoassays

Beispiel eines direkten, kompetitiven Enzymimmunoassays



Beispiel eines indirekten Enzymimmunoassays - Sandwich-ELISA

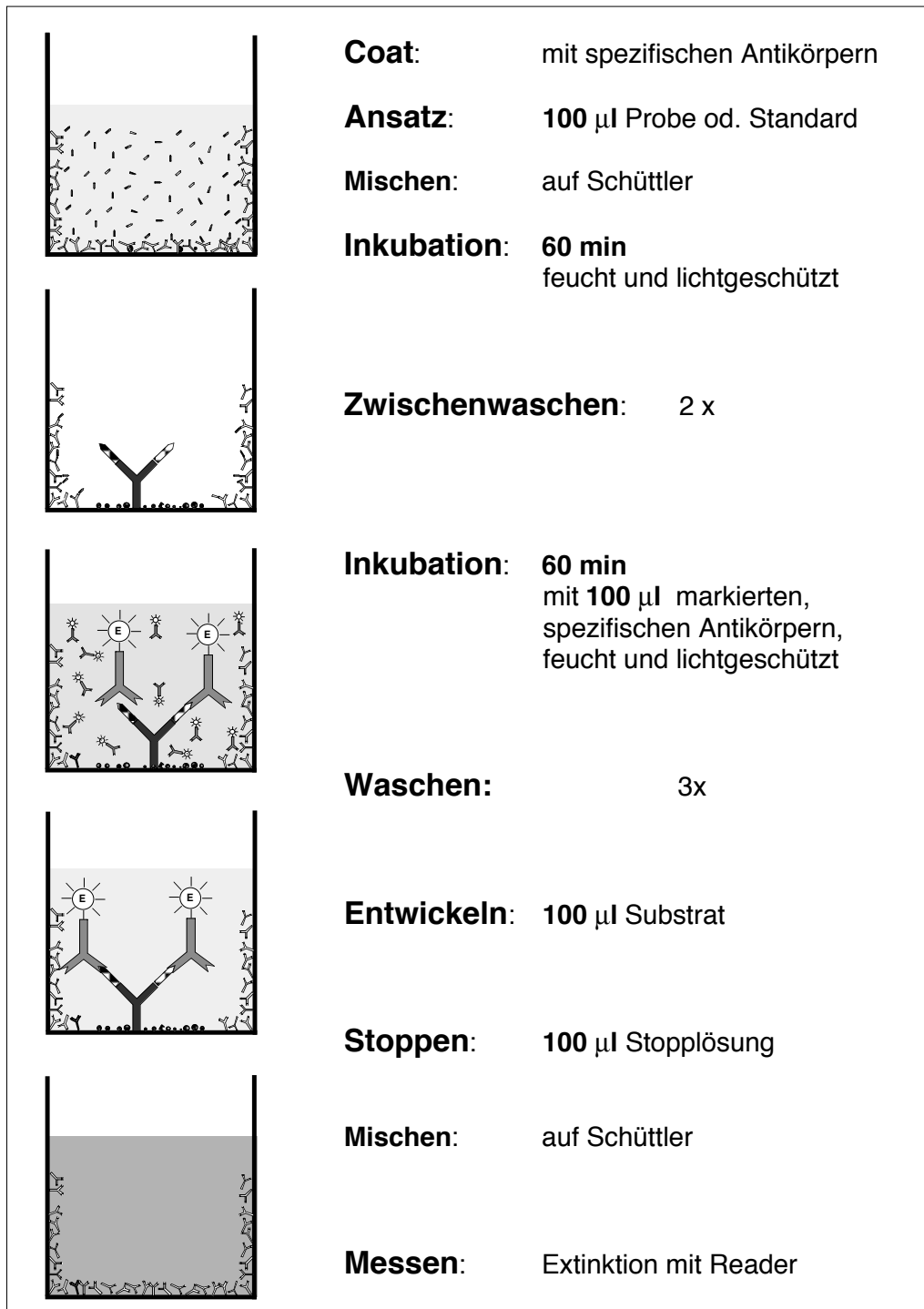


Abb. 52A.7

Fliessschemas von Enzymimmunoassays in Mikrotiterröhrchen

3.5 Ablesen und Messen von Immunreaktionen

MIT BLOSSEM AUGEN

Einige Reaktionen von AK-Analyt-Verbindungen oder von konjugierten Markierungssubstanzen sind mit bloßem Auge sichtbar, so z. B. Präzipitate ungefärbt oder gefärbt, Agglutinationsaggregate, Färbung des Substrats.

Das Ablesen ist abhängig von der Erfahrung und dem Geschick der Person, die den Test durchführt. Wenn die Ergebnisse mit vorgegebenen, visuell unterscheidbaren Werten verglichen werden, so sind sie für grobe Einstufungen akzeptabel (Ja / Nein-Bestimmungen, Schwellenwerte). Makroskopische Bestimmungen sind einfach, rasch und genügen in vielen Fällen.

MIT MESSINSTRUMENT

Dabei geht es um das Messen der direkten oder indirekten Signale von markierten Immunreagenzien. Beim EIA wird nach einer bestimmten Entwicklungszeit des Substrats die Menge der farbigen Produkte mit einem Spektrofotometer quantitativ gemessen. Für eine gleichzeitige Bestimmung der Enzymaktivität von mehreren Bestimmungen anhand des Substratumsatzes muss die Reaktion zu einem optimalen Zeitpunkt abgestoppt werden. Die Farbreaktion kann bei verschiedenen Extinktionen (0,25 - 1,25) gestoppt werden. Optimale Werte werden bei 0,75 erhalten. Diese gemessenen Extinktionswerte sind die Rohdaten für die Auswertung und die Bestimmung des Analytgehaltes von Proben. Für quantitative Messungen wird normalerweise der Mittelwert von mehreren Extinktionswerten für die gleiche Probe (meistens 3 - 4 Bestimmungen) verwendet.

BESTIMMEN DER AK-KONZENTRATION - TITER

Als Titer wird die höchste Serumverdünnung bezeichnet, die noch eine positive AG-AK-Reaktion zeigt. Der Titer ist keine absolute Konzentrationsangabe der AK (z. B. Gewicht/Volumen) im Serum. Der Titer eines Serums ist an die Bestimmungsmethode gebunden und ist nur der semiquantitative Ausdruck der im Serum anwesenden Antikörper. Titerwerte sind nützlich für den Vergleich der relativen Konzentration spezifischer AK in verschiedenen Seren oder Blutentnahmen. Der Titer ist eines der Qualitätsmerkmale eines AS.

3.6 Bestimmen der Analytkonzentrationen

Um die Analytkonzentrationen in Proben zu bestimmen, werden Standardkonzentrationen im Puffer mitgemessen und die Werte miteinander korreliert. Die relativen Extinktionswerte der Standards werden meistens auf der y-Achse eines Koordinatensystem normal und ihre Konzentration auf der x-Achse logarithmisch aufgetragen. Wird der Konzentrationsbereich grösser als 1 - 2 Dekaden, so verläuft die Standardkurve beim EIA in einem solchen Koordinatensystem nicht mehr linear, sondern normalerweise sigmoidal. Der quasi lineare Teil der Standardkurve, wo die Konzentration am zuverlässigsten berechnet werden kann, ist relativ kurz. Solche Kurven können annähernd auch durch mathematische Modelle beschrieben werden, z. B. durch Polynom 2. Grades, Spline-Funktionen oder lineare Regressionen zwischen Kalibrierpunkten. Mit den Gleichungen dieser Modelle können die Analytgehalte der Proben anhand der Extinktionswerte berechnet werden (4).

MATRIXEFFEKT

Wird verdünnte Probenmatrix im Test eingesetzt, so kann der Analytgehalt meistens nicht direkt aus der Kalibrationskurve im Puffer berechnet werden. Für quantitative Auswertungen muss der Einfluss der Probenmatrix berücksichtigt werden. Es gibt Probenmatrices, die das Testsystem nicht oder unwesentlich beeinflussen und solche, die es erheblich beeinflussen. Dieser sogenannte Matrixeffekt kann die Extinktion des Nullwerts in der Probenmatrix gegenüber dem Nullwert im Puffer erniedrigen oder erhöhen. Er kann sich je nach Testsystem sehr verschieden auswirken.

Ist bei gewissen Lebensmitteln ein wesentlicher Matrixeffekt zu erwarten, so können analytfreie Proben mit und ohne Zusatz im Test mitbestimmt werden. Mit Hilfe solcher Proben kann der Matrixeffekt abgeschätzt werden. Ist der Matrixeffekt bei einem definierten Testsystem bekannt, so können die Standardwerte in der Matrix aufgrund der Standardwerte im Puffer geschätzt werden. Anhand dieser Schätzwerte in der Matrix, kann eine abgeleitete Kalibrationskurve erstellt werden. Als Kontrolle dienen berechnete Werte von Nullproben mit Zusatz. Der Matrixeffekt muss bei jedem Lebensmittel zuverlässig reproduzierbar sein und die Extinktionen der Standardzusätze in der Matrix müssen sich proportional zu denjenigen im Puffer verhalten. Solche *quantitativen Bestimmungen* erlauben grössere Probenzahlen ohne aufwendige Probenvorbereitung in bestimmte Gehaltsklassen einzustufen oder diejenigen aus einer grösseren Anzahl positiver Proben zu erkennen, deren Gehalt einen bestimmten Wert übersteigt (6).

3.7 Hinweise für die EIA-Praxis

Die *Qualität eines EIA* wird primär durch die Qualität seiner Reagenzien (AK, AG, markierte AK, markierte AG) bestimmt, besonders aber durch die *Sensitivität* (kurze Bindungszeit) und *Spezifität* (wenige oder definierte Kreuzreaktionen) der AK. Ein Vergleich der Inkubationszeiten und der Nachweiszeiten kann Hinweise auf die Qualität des AK bei einzelnen EIA's geben. Durch Alterung oder unsachgemäße Lagerung kann die Reaktivität der Enzyme und AK abnehmen. Dies wirkt sich dann in einer Verlängerung der Entwicklungszeit des Substrats für eine normale Extinktion aus. Gute Lagerfähigkeit (lange Verfallzeit) und Stabilität bei möglichst normalen Lagerbedingungen (4 °C, -20 °C) sind ebenso wichtige Qualitätskriterien wie einfache Testdurchführung; d.h. keine oder geringe Probenvorbereitung, einfach herzustellende Puffer und Waschlösungen, wenige Testschritte. Eine gewisse Robustheit gegenüber leichten *pH*- und Salzkonzentrationsänderungen ist vorteilhaft.

Für die Beurteilung einer immunochemischen Methode können folgende Kriterien herangezogen werden:

EMPFINDLICHKEIT

Je sensitiver ein Test, desto besser kann ein eventueller Matrixeffekt durch Verdünnen reduziert werden und desto geringer der Aufwand für die Probenvorbereitung. Eine Standardkurve im Puffer veranschaulicht den Verlauf und gibt Auskunft über Steilheit der Kurve, den vernünftigen Arbeitsbereich und den 50 %-Wert. Innerhalb des Arbeitsbereichs sollten Standardwerte für Puffer und Matrices angegeben sein.

SPEZIFITÄT

Für einen Screening-Test ist eine Kreuzreaktivität mit gewissen Substanzen, z. B. Metaboliten erwünscht, da damit ein breiteres Spektrum erfasst wird. Die Kreuzreaktivitäten mit verwandten und anderen wichtigen Substanzen sollen in einer Liste aufgeführt sein.

WIEDERFINDUNGSRATE

Die Wiederfindungsraten in Proben mit Zusatz des Analyten sollten für die relevanten Matrices angegeben sein, und zwar mit Probenzahl pro Mess-Serie und Anzahl Mess-Serien.

WIEDERHOLBARKEIT

Im Intra-Assay-Präzisionsprofil sind Mittelwerte der Variationskoeffizienten gegen Analyt-Konzentrationen aufgetragen. Der Wiederholvariationskoeffizient von gut reproduzierbaren EIA liegt unter 10 %, nicht selten müssen bei einzelnen Tests bis zu 20 % in Kauf genommen werden.

Ein Qualitätssicherung-Zertifikat sollte mindestens enthalten:

Chargenbezeichnung, Verfalldatum, Standardkurve mit 5 Standards (mit Angabe der Anzahl Bestimmungen pro Standard, des Mittelwerts und des Variationskoeffizienten), Datum, Plot und Verantwortlichen.

3.8 Mögliche Fehler bei EIA

- Falsche Verdünnungen bei den Standards und Reagenzien
- Falsche oder nachlässige Aufbewahrung instabiler Standards und Reagenzien
- Bereitung und Aufbewahrung von Immunreagenzien und Standards in Gefäßen, die adsorbieren
- Schwankungen der Umgebungstemperatur während des Testablaufs
- Schwankungen des Matrixeffekts bei gleichen Lebensmitteln
- *pH*-Änderungen in der Matrix
- Optische Verunreinigung der Mikrotiterplatten durch Verunreinigung oder Ausfällungen in Testlösungen
- Berechnung von Konzentrationen mit Extinktionen ausserhalb des Beurteilungsbereiches.

4. Literatur

1. *Goding, J. W.*: Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Academic Press, London, New York, Paris, San Diego, San Francisco, Sao Paulo, Sydney, Tokyo, Toronto (1983).
2. *Campell, A. M.*: Monoclonal Antibody Technology. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford (1984).
3. *Deshpande, S.S.*: Enzyme Immunoassays from Concept to product development. International Thomson Publishing, New York, Albany, Bonn, Boston, Cincinnati, Detroit, London, Madrid, Melbourne, Mexico City, Pacific Grove, Paris, San Francisco, Singapore, Tokyo, Toronto, Washington, (1996).

4. *Baudner, S. und Dreher, R.M.:* Immunochemische Methoden in der Lebensmittelanalytik - Prinzip und Anwendung -. Lebensmittelchemie **45**, 53 - 69 (1991).
5. *Märtlbauer, E.:* Enzymimmuntests für antimikrobiell wirksame Stoffe. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart (1993).
6. *Strebel, K. und Schneider, N.:* Amtliche Kontrolle von Fleisch, Milch und Eiern auf Chloramphenicol und Sulfadimidin mit adaptierten Enzymimmunoassays, Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg. **86**, 191 - 212 (1995).

LEHRBÜCHER UND HANDBÜCHER

Kemeny, D. M.: ELISA Anwendung des Enzyme Linked Immunosorbent Assay im biologischen Labor. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York (1994).

Friemel, H.: Immunologische Arbeitsmethoden. Gustav Fischer Verlag, Jena (1991).

Roitt, I.M., Brostoff, J. und Male, K.: Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1991).

Blobel, H. und Schliesser, Th.: ELISA, in: Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren. Gustav Fischer Verlag, Jena (1991).

Tijssen, P.: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Practice and Theory of Enzyme Immunoassays. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford (1990).

Benjamini, E. und Leskowitz, S.: Immunologie, Schwer Verlag Stuttgart (1988).

Morris, B. A. and Clifford, M. N.: Immunoassays for Veterinary and Food Analysis - 1, Elsevier Applied Science, London and New York (1988).

Köhler, G. und Eichmann, K.: Immunsysteme in Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft (1988).

Unanue, M. D. and Benacerraf, B.: Immunologie. Walter de Gruyter, Berlin, New York (1987).

Morris, B.A. and Clifford, M.N.: Immunoassays in Food Analysis. Elsevier Applied Science, London and New York (1984).

ÜBERSICHTSARTIKEL

Dreher, R.M. und Märtlbauer, E.: Moderne Methoden in der Lebensmittelanalytik - Enzymimmunoassay und DNS-Hybridisierungstest. Lebensmittelchemie **49**, 1 - 6 (1995).

Märtlbauer, E.: Enzymimmunoassay in der Rückstandsanalytik: Entwicklung und Charakterisierung. Archiv für Lebensmittelhygiene **43**, 34 - 35 (1992).

Wittmann, Chr. und Hock, B.: Immunoassays zum Nachweis von Pestiziden und Umweltchemikalien. Nachr. Chem. Tech. Lab. **39**, 1 - 41 (1991).

Schweikert, Fr.A.: Immunchemische Verfahren zum Nachweis von niedermolekularen Substanzen als Rückstände in Lebens- und Futtermitteln - Eine Literaturübersicht. Dissertation aus tierärztlicher Fakultät der Universität München (1991).