

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität

München

**Entwicklung und Anwendung von generischen monoklonalen
Antikörpern zum Nachweis von Chinolon-Antibiotika in
Lebensmitteln**

von

Ulaş Acaröz

aus Milas

München 2015

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch

Arbeit angefertigt unter der Leitung von

Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. E. Märtlbauer

Mitbetreuung durch

Dr. R. Dietrich

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. J. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. E. Märtlbauer

Korreferent/en: Priv.-Doz.Dr. Karin Schwaiger

Tag der Promotion: 18. Juli 2015

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG.....	1
2.	SCHRIFTTUM.....	3
2.1	(Fluor)chinolon-Antibiotika	3
2.1.1	Historischer Überblick	3
2.1.2	Aufbau, Einteilung und Wirkspektrum	4
2.2	Chinolon-Rückstände in Lebensmitteln tierischen Ursprungs	9
2.3	Nachweisverfahren	13
2.3.1	Chemisch-physikalische Nachweisverfahren.....	13
2.3.2	Immunologische Nachweisverfahren	20
2.3.2.1	Substanzspezifische Antikörper zum Nachweis von Chinolonen	21
2.3.2.2	Generische Antikörper zum Nachweis von Chinolonen.....	24
2.3.2.3	Rekombinante Antikörper.....	26
2.3.2.4	Probenaufbereitungsverfahren beim enzymimmunologischen Nachweis von Chinolonen	29
2.3.2.5	Alternative auf Antikörpern basierende Nachweisverfahren.....	34
2.4	Immunaффinitätschromatographie	37
3.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	39
3.1	Materialien und Geräte	39
3.1.1	Chemikalien und Biochemika	39
3.1.2	Chinolon-Antibiotika	40
3.1.3	Puffer und Lösungen	41
3.1.4	Geräte	42
3.1.5	Sonstige Materialien.....	43

3.2	Methodik und Ergebnisse	43
3.2.1	Herstellung der Protein Konjugate	43
3.2.1.1	Carbodiimid-Methode	44
3.2.1.2	Aktive Estermethode	45
3.2.1.3	Perjodat-Methode	45
3.2.1.4	Überprüfung der Konjugate	46
3.2.2	Immunisierung	48
3.2.3	Immunisierungsverlauf	48
3.2.4	Generierung monoklonaler Antikörper	51
3.2.5	Etablierung kompetitiver Enzymimmuntests zum Nachweis von Chinolonen. 51	
3.2.5.1	Auswahl der geeigneten Enzyme-Konjugate	51
3.2.5.2	Untersuchungen zur Spezifität des monoklonalen Antikörpers.....	53
3.2.6	Anwendung des EIA- Verfahrens zum Nachweis von Chinolonen in künstlich und natürlich kontaminierten Lebensmitteln.....	66
3.2.6.1	Untersuchung von Milchproben	66
3.2.6.2	Untersuchung von Fleischproben	71
3.2.6.3	Vergleichsuntersuchung natürlich kontaminierter Fleischproben	76
3.2.7	Herstellung von Immunoaffinitätsäulen	78
3.2.7.1	Kopplung von mAk an CNBr-aktivierte Sepharose 4b	78
3.2.7.2	Ermittlung der Antigenbindungskapazität	79
3.2.7.3	Immunoaffinitätschromatographische Reinigung von Milchproben	81
4.	DISKUSSION	83
4.1	Herstellung des monoklonalen Antikörpers und Etablierung des EIAs	84
4.2	Untersuchung von Lebensmitteln tierischen Ursprungs mittels EIA	92

4.3	Immunaﬃnittschromatographische Reinigung	93
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	95
6.	SUMMARY	96
7.	LITERATURVERZEICHNIS	97
8.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	114
9.	TABELLENVERZEICHNIS	116
10.	DANKSAGUNG.....	118

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid	EDC
50 %-Dosis (50 % inhibition concentration)	IC ₅₀
Acetonitril	ACN
Aktiver Ester	aE
Alkalische Phosphatase	ALP
Beschleunigte Lösemittelextraktion (Accelerated solvent extraktion)	ASE
Bovine Serumalbumin	BSA
Brillantschwarz-Reduktionstest	BRT
Capillary liquid chromatography	cLC
Carbodiimid	c
Chemilumineszierender Immunoassay	CLIA
Diodenarraydetektor	DAD
Double Antibody Solid Phase Technik	DASP
Elektrospray-Ionisation	ESI
Enzymimmuntest (Enzyme immunoassay)	EIA
Festphasenextraktion (Solid phase extraction)	SPE
Fluorchinolone	FQ
Fluoreszenzdetektion (Fluorescence detector)	FLD
Flüssig-Flüssig-Extraktion (Liquid-liquid extraction)	LLE
Flüssigkeitschromatographie (Liquid chromatography)	LC
Gelatine	GEL
Gemischter Anhydrid	gA
Glucose-Oxidase	GclOX
Hochdruckflüssigkeitschromatographie (High pressure liquid chromatography)	HPLC
Immunaффinitätschromatographie	IAC
Kapillarelektrophorese (Capillary electrophoresis)	CE
Keyhole limpet hemocyanin	KLH
Massenspektrometrie	MS
Meerrettichperoxidase (Horseradish peroxidase)	HRP

Methanol	MeOH
Micellar electrokinetic capillary chromatography	MEKC
Micellar liquid chromatography	MLC
Molecularly imprinted polymers	MIP
Monoklonale Antikörper	mAk
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid	DCC
Nachweisgrenze	NWG
Oberflächenplasmonresonanz (Surface plasmon resonance)	SPR
Ovalbumin	OVA
Perjodat	Pj
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung	PBS
Polyklonale Antikörper	pAks
Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)	PCR
Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe	QuEChERS
Rückstandshöchstmenge (Maximum residue limit)	MRLs
Salting-out assisted liquid-liquid extraction	SALLE
Salting-out supported liquid-liquid extraction	SOSLE
Single-chain variable fragment	scFv
Tandem-Massenspektrometrie	MS/MS
Trichloressigsäure	TCA
Tris-gepufferte Kochsalzlösung (Tris-buffered saline)	TBS
Ultra-performance liquid chromatography	UPLC
Variationskoeffizient	VK
Wiederfindungsrate	WFR
γ -Aminobuttersäure	ABA

Abkürzungen für Chinolon-Antibiotika

Cinoxacin	CIN
Ciprofloxacin	CIP
Ciprofloxacin-Ethylendiamin	CIP-ED
Clinafloxacin	CLN

Danofloxacin	DAN
Difloxacin	DIF
Enoxacin	ENO
Enrofloxacin	ENR
Fleroxacin	FLR
Flumequin	FLU
Gatifloxacin	GAT
Ibafloxacin	IBA
Levofloxacin	LEV
Lomefloxacin	LOM
Marbofloxacin	MAR
Moxifloxacin	MOX
Nadifloxacin	NAD
Nalidixinsäure	NA
Norfloxacin	NOR
Ofloxacin	OFL
Orbifloxacin	ORB
Oxolinsäure	OA
Pazufloxacin	PAZ
Pefloxacin	PEF
Pipemidsäure	PA
Pradofloxacin	PRA
Prulifloxacin	PRU
Rufloxacin	RUF
Sarafloxacin	SAR
Sparfloxacin	SPA
Tosufloxacin	TOS
Trovafloxacin	TRO

1. EINLEITUNG

Chinolone sind synthetisch hergestellte Antibiotika, die eine breite antimikrobielle Aktivität gegen grampositive und gramnegative Mikroorganismen haben. Wegen des breiten Wirkspektrums spielen Chinolone eine wichtige Rolle in der Behandlung von verschiedenen Krankheiten sowohl in der Humanmedizin als auch in der Tiermedizin. Der breite Einsatz dieser Antibiotika in der Tiermedizin kann aber zu Rückständen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs führen, die die Gesundheit der Verbraucher bedrohen.

Die Europäische Union (EU) hat für einige Chinolone (Enrofloxacin, Danofloxacin, Difloxacin, Flumequin, Marbofloxacin, Oxolinsäure und Sarafloxacin) Rückstandshöchstmengen [sog. Maximum Residue Limits (MRLs)] festgelegt, um die Verbraucher zu schützen. Die üblicherweise zum Nachweis von antimikrobiellen Rückständen in Lebensmitteln eingesetzten mikrobiologischen Hemmstofftests wie der Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT) für Milch bzw. der Dreiplattentest für Fleisch(erzeugnisse) ermöglichen keine Identifizierung und Quantifizierung der verschiedenen Antibiotikagruppen. Der BRT-Test weist zudem für Chinolone nur eine geringe Sensitivität auf. Daher werden zur Überwachung der Grenzwerte vorzugsweise physikalisch-chemische Verfahren wie die Flüssigkeitschromatographie (liquid chromatography, LC) in Kombination mit verschiedenen Detektionsprinzipien wie Fluoreszenz (fluorescence detector, FCD) bzw. Massenspektrometrie (MS) eingesetzt. Diese instrumentellen Verfahren weisen eine hohe Sensitivität und Spezifität auf, erfordern aber z.T. eine zeitaufwändige Probenvorbehandlung, teure Instrumente und qualifiziertes Personal.

Immunoassays bieten hingegen die Vorteile einer einfachen Handhabung und Durchführbarkeit bei gleichzeitiger hoher Sensitivität und Spezifität. Voraussetzung zur Etablierung entsprechender Nachweisverfahren ist die Verfügbarkeit von spezifischen Antikörpern, wobei im Hinblick auf die Nachhaltigkeit monoklonale Antikörper (mAk) Vorteile aufweisen. Das vorrangige Ziel dieser Arbeit war es daher, einen monoklonalen Antikörper mit generischen Eigenschaften zu etablieren, mit dem alle derzeit zur Behandlung von lebensmittelliefernden Tieren zugelassenen Chinolon-Wirkstoffe (Enrofloxacin, Danofloxacin, Difloxacin, Flumequin, Marbofloxacin, Oxolinsäure und Sarafloxacin) unterhalb der festgelegten MRLs in verschiedenen Lebensmitteln tierischen Ursprungs

detektiert werden können. Basierend auf diesem mAk sollte zudem ein sensitiver Enzymimmunttest (EIA) etabliert werden und dessen Einsetzbarkeit für die Untersuchung von verschiedenen Lebensmitteln (Fleisch, Fisch, Garnelen, Milch) überprüft werden. Des Weiteren wurden auch überprüft, inwieweit die mAk zur Herstellung einer Immunoaffinitätssäule eingesetzt werden können, umso die bei Einsatz von physikalisch-chemischen Nachweisverfahren aufwändige Probenvorbereitung von schwierigen Lebensmittelmatrices zu vereinfachen.

Die im Rahmen dieser Arbeit am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch durchgeführten Eingriffe und Behandlungen an Tieren wurden der Regierung von Oberbayern gemäß § 10a des Tierschutzgesetzes mit dem Vorhaben „Herstellung monoklonaler Antikörper zum Nachweis lebensmittelhygienisch relevanter Substanzen“ angezeigt und unter dem Aktenzeichen 55.2-1-54.2532.6-2-12 genehmigt.

2. SCHRIFTTUM

2.1 (Fluor)chinolon-Antibiotika

2.1.1 Historischer Überblick

Das erste Chinolon-Antibiotikum, Nalidixinsäure (NA), wurde zufälligerweise im Jahre 1962 von Leshar et al. während der Synthese der Antimalaria-Substanz Chloroquin als Nebenprodukt entdeckt und beim Menschen für die Behandlung von nicht komplizierten Harnwegsinfektionen eingesetzt. NA hatte nur eine geringe Wirkung gegen Gram-negative Bakterien und wies eine geringe intestinale Absorption auf. Zur Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften und zur Verbreiterung des Wirkspektrums wurden im Laufe der Jahre tausende Chinolon-Verbindungen synthetisiert, aber aus verschiedenen Gründen gelangten nur einige wenige davon bis zur Marktreife (Andersson & MacGowan, 2003; Leshar et al., 1962; Mitscher, 2005; De Sarro & De Sarro, 2001).

In der Geschichte der Chinolon-Antibiotika gibt es einige wichtige Durchbrüche, die die strukturellen Eigenschaften dieser Antibiotika-Gruppe entscheidend verbessert haben. Eine davon ist die Einführung einer Piperazin-Gruppe an der C-7 Position der Grundstruktur (**Abbildung 1**). Diese Modifikation führte zu einer deutlichen Verbesserung der Aktivität gegen gramnegative Organismen einschließlich *Pseudomonas aeruginosa*. Des Weiteren konnte durch die Substitution eines Fluoratoms an der C-6 Position der Grundstruktur die Aktivität gegen grampositive Bakterien deutlich erhöht werden (Andriole, 2005).

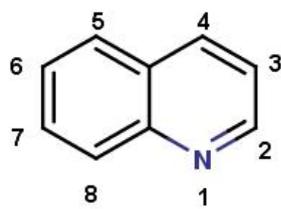
Norfloxacin (NOR) als erster Vertreter dieser 2. Generation der Chinolone wies signifikante Unterschiede zu den früheren Chinolon-Wirkstoffen im Hinblick auf antibakterielle Aktivitäten und Pharmakokinetik auf (Andriole, 2005; Emmerson & Jones, 2003). Trotzdem beschränkte sich wegen der niedrigen erreichbaren Serumspiegel und der schlechten Gewebepenetration seine Nutzung auf die Behandlung von Harnwegsinfektionen und sexuell übertragbare Krankheiten. Ciprofloxacin (CIP), das als weitere Modifikation an der N-1 Position des Grundgerüsts einen Cyclopropylring besitzt, war das erste Chinolon-Antibiotikum, das auch bei anderen, bakteriell bedingten Erkrankungen eingesetzt wurde (Aldred et al., 2014; Andriole, 2005). Im Lauf der Jahre wurden viele weitere Chinolone mit breiterer antibakterieller Aktivität wie Levofloxacin (LEV), Moxifloxacin (MOX) und

Gatifloxacin (GAT) zum Einsatz bei einer Infektion der Atemwege mit Grampositiven Erregern entwickelt (Asif, 2015).

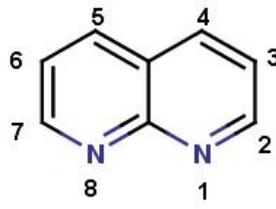
In einem Zeitraum von einigen Jahrzehnten haben sich die Chinolone somit von einer unwichtigen Antibiotikaklasse, die sporadisch bei der Behandlung von Harnwegsinfektionen eingesetzt wurde, zu den am häufigsten verschriebenen Antibiotika - 17 % der weltweiten Verkaufserlöse für Antibiotika werden durch Chinolone erzielt - entwickelt, neue Strukturanaloga mit verbesserter Pharmakokinetik und reduziertem toxikologischem Potential werden nach wie vor entwickelt (Emmerson & Jones, 2003; Linder et al., 2005; Van Doorslaer et al., 2014; Wiles et al., 2010).

2.1.2 Aufbau, Einteilung und Wirkspektrum

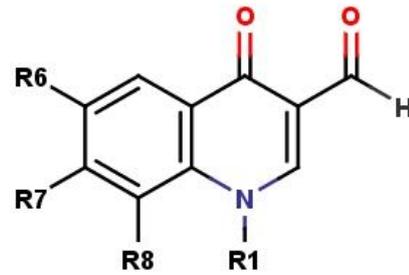
Als Grundstruktur der meisten Chinolone dient die bicyclische Ringstruktur Chinolon (Abbildung 1), einige Verbindungen wie z.B. Enoxacin (ENO) und die nicht mehr in Handel befindlichen Wirkstoffe Nalidixinsäure (NA), Tosufloxacin (TOS) und Trovafloxacin (TRO) basieren auf 1,8-Naphthyridin. Bei allen Chinolonen findet sich eine Carboxylgruppe an der C-3 Position und eine Ketogruppe an der Position C-4, eine Konfiguration die auch als β -Ketocarbonsäure bezeichnet wird. Die β -Ketocarbonsäure ist essentiell für die antibakterielle Aktivität der Chinolone, um an die DNA-Gyrase binden zu können. Eine Modifikation der Carbonsäure wird in der Regel nicht toleriert, die entsprechenden Strukturanaloga stellen inaktive Verbindungen dar. Ebenso resultiert ein Austausch des Stickstoffs in Position 1 durch Kohlenstoff oder Sauerstoff in einem Wirkungsverlust. Gängige Substituenten an der N-1 Position stellen Methyl- oder Ethylgruppen bzw. Ringstrukturen wie Cyclopropyl oder Fluorophenyl dar. Prinzipiell verändern Modifikationen an N-1, C-6, C-7 und C-8 der Ringstruktur von Chinolonen deren antimikrobielle Aktivität, sowie pharmakokinetische und metabolische Eigenschaften, z.T. mit negativen Effekten. So wiesen Verbindungen, bei denen ein Halogen an C-8 eingeführt wurde, ein deutlich höheres Potential an unerwünschten Nebenwirkungen auf. Dies führte dazu, dass Sparfloxacin (SPA) aufgrund seiner sehr hohen Phototoxizität Ende der 90er Jahre vom Markt genommen wurde. Mit Ausnahme der Oxolinsäure (OA) ist bei allen derzeit eingesetzten Chinolonen an der C-6 Position ein Fluor substituiert, so dass sich - wenn auch chemisch nicht ganz korrekt - als Überbegriff für diese Antibiotikagruppe der Name Fluorchinolone (fluorquinolones, FQ) eingebürgert hat.



Chinolin



1,8- Naphthyridin



Chinolon-Antibiotika-Grundstruktur

Einsatzgebiet	Wirkstoff (Generation)	R ₁	R ₈	R ₇	R ₆
Humanmedizin					
	Enoxacin	Ethyl-	H(N)	Piperazin	F
	Levofloxacin	Ringstruktur		Piperazin	F
	Ciprofloxacin	Cyclopropyl-	H	Piperazin	F
	Moxifloxacin	Cyclopropyl-	Methoxy-	Heterocyklischer Ring	F
	Norfloxacin	Ethyl-	H	Piperazin	F
	Ofloxacin	Ringstruktur		Piperazin	F
Veterinärmedizin					
Lebensmittel- liefernde Tiere	Danofloxacin	Cyclopropyl-	H	Diazabicyclo	F
	Difloxacin	Fluorbenzol-	H	Piperazin	F
	Enrofloxacin	Cyclopropyl-	H	Piperazin	F
	Flumequin	Ringstruktur			F
	Marbofloxacin	Ringstruktur		Piperazin	F
	Oxolinsäure	Ethyl-		Ringstruktur	
	Sarafloxacin	Fluorbenzol-	H	Piperazin	F
Klein/Heimtiere	Orbifloxacin	Cyclopropyl-	N	Piperazin	F
	Pradofloxacin	Cyclopropyl-	F	Piperazin	F

Abbildung 1: Grundstrukturen der Chinolon-Antibiotika sowie tabellarische Auflistung derzeit zu medizinischen Zwecken eingesetzter Wirkstoffe.

Wie bereits erwähnt stellte die Einführung eines Piperazin-Substituenten an der C-7 Position eine wesentliche Verbesserung dar. Bei einer ganzen Reihe von wichtigen FQ ist dieser Ring-Substituent zudem durch eine oder mehrere Methylgruppen oder auch durch die Anlagerung anderer heterozyklischer Verbindungen wie z.B. Pyrrol bei Moxifloxacin modifiziert. Bei einigen FQ wurden zur Steigerung der antimikrobiellen Aktivität auch Substituenten an der C-8 Position eingefügt wie z.B. ein Fluoratom bei Sparfloxacin. Bei anderen in der Human- [Levofloxacin (LEV), Ofloxacin (OFL)] bzw. Veterinärmedizin [Flumequin (FLU), Marbofloxacin (MAR)] eingesetzten FQ wurde zwischen den R1- und R8-Substituenten eine zusätzliche Ringstruktur kreiert (Andersson & MacGowan, 2003; Andriole, 2005; Mehlhorn & Brown, 2007; Rádl, 1990; De Sarro & De Sarro, 2001; Wiles et al., 2010).

Prinzipiell können die Chinolone basierend auf ihrer antibakteriellen Aktivität in 4 Generationen eingeteilt werden, wobei die Übergänge fließend sind. Die erste Generation hatte nur eine begrenzte Aktivität gegen gramnegative Keime und wies eine minimale systemische Verteilung auf. Die zweite Generation zeigte verbesserte gramnegative Aktivität, einschließlich gegen *Pseudomonas aeruginosa*, aber eine nach wie vor begrenzte grampositive Aktivität. Außerdem ist diese Generation auch effektiv gegen intrazellulär sich vermehrende Organismen wie Mykoplasmen und Chlamydien. Bei der dritten Generation konnte das Wirkspektrum im Vergleich zur 1. und 2. Generation um verschiedene grampositive Bakterien wie z.B. *S. pneumoniae* erweitert werden. Wirkstoffe der vierten Generation sind zusätzlich in der Lage grampositive *Bacillus* spp. und anaerobe Bakterien zu eliminieren (**Abbildung 2**) (Bradley & Jackson, 2011; Catherine & Gary, 2002; Emmerson & Jones, 2003; WHO, 2011a).

Chinolone wirken grundsätzlich bakterizid, der Effekt beruht auf einer Hemmung der bakteriellen Topoisomerase II (DNA-Gyrase) und Topoisomerase IV. Diese Enzyme sind verantwortlich für die Topologie von DNA-Molekülen in Bakterien und sind an der bakteriellen Replikation und Zellteilung beteiligt. Beide Topoisomerasen II und IV besitzen tetramere Strukturen und bestehen aus jeweils 2 Untereinheiten (Aldred et al., 2014; Andriole, 2005; Cheng et al., 2013).

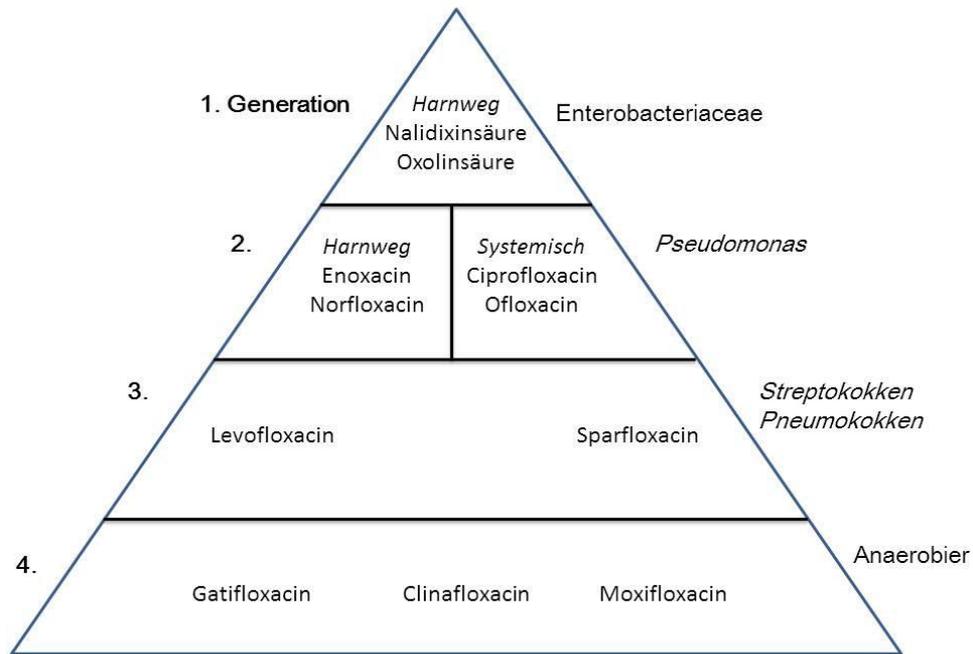


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Wirkspektrums der vier Generationen von Chinolon-Antibiotika

Chinolone zeigen unterschiedliche pharmokinetische Eigenschaften, wie es aufgrund der heterogenen physikochemischen Natur der Gruppe zu erwarten ist. Chinolone ab der 2. Generation zeichnen sich durch eine mittlere bis hervorragende Resorption bei oraler Applikation, hohe Plasmaspiegel und sehr gute Penetration in viele Gewebe aus. Chinolone weisen zudem ein hohes Verteilungsvolumen auf, ein Hinweis darauf, dass sie sich in besonderem Maße intrazellulär befinden können (Sörgel et al., 1989). Maximale Blutkonzentrationen der meisten Chinolone werden ca. 1 Stunde nach einer oralen Dosis erreicht (Andriole, 2005; Catherine & Gary, 2002; Choi et al., 2013; Emmerson & Jones, 2003). Die Biotransformation der Chinolone ist substanzabhängig, einige Chinolone werden unverändert ausgeschieden (z.B. Ofloxacin), einige werden teilweise abgebaut [z.B. Cinoxacin (CIN), Ciprofloxacin, Enrofloxacin (ENR)], einige werden vollständig abgebaut [z.B. Pefloxacin (PEF)] (Catherine & Gary, 2002; Scholar, 2002; WHO, 2011a).

Unter rückstandsanalytischen Gesichtspunkten bedeutsam ist, dass Enrofloxacin durch Deethylierung zu Ciprofloxacin abgebaut wird. So konnte bei Kühen gezeigt werden, dass ca. 60 % einer i.v. verabreichten Enrofloxacin-Dosis zu Ciprofloxacin abgebaut werden, in der Milch waren 17 h nach Applikation nur mehr Ciprofloxacin-Metabolite nachweisbar. Prozentual gesehen waren nur 0,04 % der Dosis als Enrofloxacin in Milch zu finden, hingegen bis zu 1,7 % als Ciprofloxacin (Idowu et al., 2010).

Eine ganze Reihe von Chinolonen werden aufgrund unerwünschter Nebenwirkungen wie Hepatotoxizität (Tosufloxacin, Trovafloxacin), Kardiotoxizität (Grepafloxacin), Phototoxizität (Clinafloxacin, Sparfloxacin) bzw. Induktion einer hämolytischen Anämie (Temafoxacin) nicht mehr als Theurapeutika eingesetzt (Asif, 2015; Blum et al., 1994; Owens & Ambrose, 2005; Rubinstein, 2001; Roden, 2004)

2.2 Chinolon-Rückstände in Lebensmitteln tierischen Ursprungs

Chinolone werden weltweit für die Behandlung von verschiedenen Krankheiten bei Nutztieren und Geflügel sowie in Aquakulturen eingesetzt. Da bis zu 70 % der verabreichten Chinolon-Antibiotikadosis als nicht metabolisierte aktive Muttersubstanz, vorzugsweise über die Nieren, ausgeschieden wird, können Chinolone regelmäßig auch in Umfeld- und Wasserproben nachgewiesen werden, die mittlere Verweildauer liegt hierbei zwischen 10 d in Oberflächenwasser und bis zu 580 d in Böden (Van Doorslaer et al., 2014).

Die EU hat mit der Verordnung Nr. 37/2010 Rückstandshöchstmengen für einige Chinolone in Lebensmitteln festgelegt, die entsprechenden Werte sind in **Tabelle 1** zusammengefasst. Einige neuere Arbeiten zur derzeitigen Rückstandssituation werden im Folgenden kurz vorgestellt.

Er et al. (2013) untersuchten in der Türkei 231 Fleischproben (Geflügel, Rind) auf Rückstände von Chinolonen, 51,1 % davon waren positiv in einem Bereich zwischen 6-30 µg/kg. In einer anderen Untersuchung in der Türkei wurden 50 Leberproben (Huhn) kontrolliert, wobei 34 % positiv waren; eine dieser Proben wies eine Konzentration von 147,9 µg/kg auf (Nizamlioğlu & Aydın, 2012). Bei beiden Untersuchungen wurde ein kommerziell erhältlicher Enzymimmuntest (EIA) zum generischen Nachweis der Chinolon-Antibiotika eingesetzt, eine Wirkstoffidentifizierung war somit nicht möglich. Im Iran wurden 90 Proben (Hühnerbrust, -schenkel und -leber) mittels EIA spezifisch auf ENR Rückstände kontrolliert; 91 % der untersuchten Proben waren für ENR in einem Bereich von 5,30 - 122,7 µg/kg positiv (Ebrahimzadeh Attari et al., 2014).

In Korea wurden 269 Milchproben auf Sulfonamid- und Chinolon-Rückstände kontrolliert, 21 davon waren im Screeningverfahren positiv, mittels HPLC konnte bei einer Probe die Belastung mit CIP bestätigt werden (Chung et al., 2009). In Kroatien wurden 1259 Rohmilchproben über einen Zeitraum von 3 Jahren auf Antibiotikarückstände kontrolliert, 382 davon enthielten FLU zwischen 0,06 und 72,0 ng/ml, 353 Proben davon enthielten ENR zwischen 0,272 und 24,3 ng/ml (Bilandžić et al., 2011). In einer durchgeführten Studie in der Türkei konnten hingegen keine Chinolon-Rückstände in 50 untersuchten Milchproben gefunden werden (Nizamlioğlu & Aydın, 2012).

Tabelle 1: Rückstands-Höchstmengen für Chinolon-Antibiotika in Lebensmitteln tierischen Ursprungs, nach Verordnung (EU) 37/2010

Pharmakologisch wirksame(r) Stoff(e)	Tierart(en)	MRL ($\mu\text{g}/\text{kg}$)				
		Muskel	Fett	Leber	Nieren	Milch
Danofloxacin (DAN)	Rinder, Schafe, Ziegen	200	100	400	400	30
	Geflügel ^{4,5}	200	100	400	400	-
	Alle anderen zur Zur Lebensmittelerzeugung genutzte Arten ^{1,2,3}	100	50	200	200	-
Diflofloxacin (DIF)	Rinder, Schafe, Ziegen ⁶	400	100	1400	800	-
	Schweine ³	400	100	800	800	-
	Geflügel ^{4,5}	300	400	1900	600	-
	Alle anderen zur Zur Lebensmittelerzeugung genutzte Arten ^{1,2,6}	300	100	800	600	-
Enrofloxacin (ENR)*	Rinder, Schafe, Ziegen	100	100	300	200	100
	Schweine ³ , Kaninchen	100	100	200	300	-
	Geflügel ^{4,5}	100	100	200	300	-
	Alle anderen zur Zur Lebensmittelerzeugung genutzte Arten ^{1,2}	100	100	200	200	-
Flumequin (FLU)	Rinder, Schafe, Ziegen	200	300	500	1 500	50
	Schweine ³	200	300	500	1 500	-
	Geflügel ^{4,5}	400	250	800	1 000	-
	Fisch ¹	600	-	-	-	-
	Alle anderen zur Zur Lebensmittelerzeugung genutzte Arten	200	250	500	1 000	-
Marbofloxacin (MAR)	Rinder	150	50	150	150	75
	Schweine ³	150	50	150	150	-
Oxolinsäure (OA)	Zur Lebensmittelerzeugung genutzte Arten ^{1,2,3,4,5,6}	100	50	150	150	-
Sarafloxacin (SAR)	Hühner ^{4,5}	-	10	100	-	-
	Salmoniden ¹	30	-	-	-	-

Erläuterungen zur Tabelle1

* Gesamtsumme von ENR und CIP

¹ Der Rückstandshöchstmengenwert für Muskel von Fisch betrifft „Muskel und Haut in natürlichen Verhältnissen“.

² Die Rückstandshöchstmengenwerte für Fett, Leber und Nieren gelten nicht für Fisch.

³ Der Rückstandshöchstmengenwert für Fett von Schweinen betrifft „Haut und Fett in natürlichen Verhältnissen“.

⁴ Der Rückstandshöchstmengenwert für Fett von Geflügel betrifft „Haut und Fett in natürlichen Verhältnissen“.

⁵ Nicht zur Anwendung bei Tieren, deren Eier für den menschlichen Verzehr bestimmt sind

⁶ Nicht zur Anwendung bei Tieren, deren Milch für den menschlichen Verzehr bestimmt ist

In 10 chinesischen Provinzen wurden 199 Rohmilchproben auf verschiedene Antibiotikarückstände untersucht, 47,2 % davon waren für Chinolone positiv. Die höchste detektierte Konzentration lag bei 23 µg/kg (Zheng et al., 2013).

Im asiatischen Raum, insbesondere China, Vietnam, Thailand wurden bei der Aufzucht von Garnelen unter Aquakulturbedingungen regelmäßig Chinolon-Antibiotika, v.a. NOR, ENR und CIP eingesetzt (Hoang et al., 2012). Dementsprechend häufig wurden Rückstände in den entsprechenden Produkten (Garnelen, aber auch Froschbeine, Schnecken etc.) gefunden; die Konzentrationen lagen meist im Bereich von 1 - 30 µg/kg, in anderen Untersuchungen wurden aber auch Gehalte von bis zu 370 µg/kg gefunden (Übersicht Van Doorslaer et al., 2014). In Vietnam wurden bei in Süßwasseraquakultur-Produkten durchgeführten Untersuchungen 104 Fisch- und Garnelenproben auf Antibiotikarückstände kontrolliert, 26,9 % davon reagierten im Screening-Verfahren positiv, bei sechs dieser Proben konnte mittels LC-MS die Anwesenheit von ENR und CIP in einem Konzentrationsbereich von <12 - 66 ng/g verifiziert werden (Pham et al., 2015). Zwischen 1993 und 2004 wurden in Kanada 30 Aquakulturproben auf Rückstände von Tierarzneimitteln kontrolliert, fünf davon enthielten niedrige Konzentrationen von ENR (0,3 bis 0,73 µg/kg) und OA (0,3 zu 4,3 µg/kg) (Tittlemier et al., 2007). In einer Studie von Li et al. (2012) bei der wildlebende Garnelen, Krabben, und Fischen gefangen in einem Süßwasser-See in China untersucht wurden, konnten bis zu acht verschiedene Chinolone [NOR, CIP, DIF, ENR, Fleroxacin (FLR), OFL, Lomefloxacin

(LOM) und SAR] in durchschnittlichen Konzentrationen von 1,8 - 24 µg/kg Trockenmasse gefunden werden. Auch in von iranischen Forellenzuchtbetrieben stammenden 138 Regenbogenforellen konnten bei 19,6 % Chinolone detektiert werden, die gefundenen Konzentrationen lagen in einem Bereich von 6,75 bis 99,8 µg/kg (Barani & Fallah, 2014).

Da Chinolon-Antibiotika auch in der Bienenhaltung eingesetzt werden, ist prinzipiell auch in diesem Lebensmittel mit Rückständen zu rechnen. Zhou et al. (2009) fanden beispielsweise in sieben von 57 untersuchten chinesischen Proben Chinolon-Rückstände, die Konzentrationen lagen in einem Bereich von 11 - 56 µg/kg. Als Wirkstoffe wurde OFL, NOR, CIP und DIF identifiziert.

2.3 Nachweisverfahren

Zum Nachweis von Chinolon-Rückständen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs wurde im Laufe der Jahre eine breite Palette an verschiedenen chemisch-physikalischen und immunologischen Nachweisverfahren entwickelt. Eine Auswahl neuerer, momentan zur Verfügung stehender Analyseverfahren wird im Folgenden präsentiert.

2.3.1 Chemisch-physikalische Nachweisverfahren

Die eingesetzten Trennverfahren umfassen diverse Varianten der Flüssigkeitschromatographie (LC) oder Kapillarelektrophorese (CE), gekoppelt mit Detektionsprinzipen wie Ultraviolett-Absorption (UV), Diodenarray (DAD), Fluoreszenz (FLD), Massenspektrometrie (MS) oder Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS). Aufgrund der fluoreszierenden bzw. UV-Eigenschaften der Chinolon-Antibiotika stellte die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) gekoppelt einem Fluoreszenzdetektor bzw. UV- oder Diodenarraydetektor für lange Zeit die Methode der Wahl zum Nachweis dieser Verbindungen dar. Die „Capillary Liquid Chromatography“ (cLC) liefert im Vergleich zur konventionellen HPLC eine bessere Auflösung und niedrigere Nachweisgrenzen bei geringerem Lösungsmittelverbrauch (Lombardo-Agüí et al., 2011; Ruiz-Viceo et al., 2012). Auch die „Ultra-performance Liquid Chromatography“ (UPLC) bietet im Vergleich zur klassischen HPLC verschiedene Vorteile wie kürzere Analysenzeiten, höhere Effizienz und Empfindlichkeit (Herrera-Herrera et al., 2011). Die Trennung der strukturell sehr ähnlichen Verbindungen erfolgte meist mittels Gradienten, wobei als Laufmittel häufig Acetonitril und Ameisensäure (0,1 %) (Arroyo-Manzanares et al., 2015; Díaz-Alvarez et al., 2009; Galarini et al., 2015; Stoilova et al., 2013; Zhang et al., 2010) bzw. Oxalsäure eingesetzt wurden (Cho et al., 2010; Gajda et al., 2012; Jiménez et al., 2011).

Um den unterschiedlichen spektrophotometrischen bzw. fluoreszierenden Eigenschaften der Chinolone Rechnung zu tragen und die Sensitivität des Analyseverfahrens zu optimieren, wurden zudem häufig Multiwellenlängen-Detektoren verwendet. Die Exzitations-/Emissionswellenlänge für die meisten FQ liegt hierbei bei 278/476 nm, für Flumequin bzw. Oxolinsäure hingegen bei 325/366 nm (Arroyo-Manzanares et al., 2015; Lombardo-Agüí et al., 2015). Auch Marbofloxacin und Ofloxacin werden oft bei anderen Wellenlängen, z.B. 290/495 nm detektiert (Cho et al., 2010; Jiménez et al., 2011).

Neben dem FLD-Verfahren wurde eine ganze Reihe von massenspektrometrischen Detektionsverfahren beschrieben, eine Auswahl einiger neuerer Arbeiten und deren Anwendung in verschiedenen Lebensmitteln wie z.B. Milch, Fleisch, Fisch und Honig ist in **Tabelle 2** dargestellt. Als Ionisationsverfahren wird üblicherweise die Elektrosprayionisation (ESI) unter positiver Spannung eingesetzt (Blasco & Picó, 2012; Herrera-Herrera et al., 2011; Junza et al., 2014; Ruiz-Viceo et al., 2012). Massenspektrometrische Chinolon-Nachweise sind oft in Multi-Analyt-Verfahren integriert. So wurde mit den von Galarini et al. (2015) beschriebenen Verfahren parallel auch Sulfonamide und Nitroimidazole, bei Junza et al. (2014) β -Lactam Antibiotika und bei Kaufmann et al. (2014) eine ganze Reihe von verschiedenen Antibiotika-Gruppen (β -Lactam, Makrolide, Nitroimidazole, Sulfonamide und Tetrazykline) parallel detektiert.

Neben den chromatographischen Verfahren wurde in den letzten Jahren auch verstärkt die Kapillarelektrophorese zur Analyse von Chinolon-Antibiotika eingesetzt. Die Kapillarelektrophorese (CE) benötigt keine teuren Instrumente, und zeichnet sich durch eine hohe Trennleistung und kurze Analysezeiten bei geringem Proben- und Lösungsmittelverbrauch aus (Ibarra et al., 2012). „Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography“ (MEKC) gekoppelt mit einem laserinduzierten Fluoreszenzdetektor wurde für den Nachweis von 5 Chinolonen verwendet, wobei die Auftrennung der Analyten innerhalb von 8 min abgeschlossen wurde und die linearen Dynamikbereiche bei 0,01-10 ppb lagen (Meng et al., 2014).

Lebensmittel enthalten diverse Bestandteile wie Lipide, Kohlenhydrate und Proteine, die die eingesetzten Nachweisverfahren stören können. Die Probenvorbehandlung spielt bei chromatographischen Methoden daher eine besondere Rolle, die oft entscheidend für die Spezifität und Sensitivität der Analysen ist. Chinolon-Antibiotika werden meistens aus Lebensmitteln mittels organischer Lösungsmittel wie Methanol (MeOH) und insbesondere Acetonitril (ACN) extrahiert (**Tabelle 2**), zur weiteren Aufreinigung der Rohextrakte wurde häufig eine Festphasenextraktion (SPE) eingesetzt, wobei die Anwendung von Kationen-Galarini et al. (2015) bzw. Anionenaustauscher-Sorbentien (Díaz-Alvarez et al., 2009) oder sehr häufig auch die sog. HLB Umkehrphasen-Sorbentien mit hydrophilen und lipophilen Anteilen beschrieben wurde (Evaggelopoulou & Samanidou, 2013; Herrera-Herrera et al., 2011; Meng et al., 2014; Stoilova et al., 2013; Yu et al., 2012).

Alternativ zu den verhältnismäßig teuren und zeitaufwändigen SPE-Aufreinigungsverfahren wurde eine ganze Reihe von Flüssig-Flüssig Extraktionsverfahren (liquid-liquid extraction, LLE) beschrieben, bei der im einfachsten Fall wässrige Extrakte durch Zusatz von Lösungsmittel wie Ethylacetat oder Chloroform ausgeschüttelt werden.

Bei der dispersen LL-Mikroextraktion werden geringe Volumina von organischen Lösungsmitteln wie Chloroform in wässrige Proben bzw. Extrakte injiziert, gemischt und abschließend zentrifugiert. Junza et al. (2014) setzten dieses Verfahren bei der Analyse von β -Laktam und Chinolon-Rückständen in Milch ein. Nach Fällung der Milchproteine mit ACN wurde der Extrakt mit Wasser 1:10 verdünnt und schließlich im Verhältnis 1:6 mit Chloroform/ACN extrahiert. Für Chinolone wurden Wiederfindungsraten von 72 - 110 % erhalten, bei den β -Laktamen lagen die Werte bei 62 - 97 %.

Arroyo-Manzanares et al. (2015) konnten durch eine Variation dieser Technik der sog. „Salting-out“ LLE (SOSLE), Urin und Milchproben mittels ACN unter Zusatz von Salzen (NaCl und MgSO₄) einfach und effizient extrahieren. Ein ähnliches, einfaches und schnelles Verfahren setzten Kaufmann et al. (2014) ein: verdünnte Milchproben wurden mit ACN extrahiert und der durch Zentrifugation gewonnene Überstand mit Ammoniumsulfat versetzt. Dies resultierte in einer Phasentrennung, das so gewonnene ACN wurde über Kieselgel weiter gereinigt. Die Endextrakte führen im Vergleich zu den mittels SPE- und Ultrafiltration gewonnenen Präparationen zu keiner Beeinträchtigung des MS-basierten Nachweises. Ähnlich saubere Extrakte wurden mittels QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)-Ansätzen erhalten, wobei hierbei allerdings die Wiederfindungsraten für polare und zwitterionische Verbindungen wie Penicilline, Tetracykline und auch Chinolone niedriger lagen. Das QuEChERS-Verfahren wurde ursprünglich für die Pestizid-Analytik entwickelt und später auf andere Analyten übertragen. Das Verfahren umfasst einen Extraktionsschritt mit organischen Lösungsmitteln (bei Chinolonen mit ACN nach Ansäuerung der Probe), anschließender salzinduzierter Phasenseparation und Reinigung durch dispersive SPE, bei der das organische Lösungsmittel mit einem C18-Sorbens versetzt wird. Lombardo-Agüí et al. (2015) konnten mit diesem Verfahren acht Chinolone effizient aus Fischproben mit hoher Wiederfindungsrate extrahieren.

Ein weiteres Aufreinigungsverfahren stellen die „Molecularly Imprinted Polymers“ (MIP) dar, die hochspezifisch für die jeweiligen Analyten gestaltet sind. Bei der Herstellung werden

Polymere unter Anwesenheit eines Templates (bei den Chinolonen meist Ciprofloxacin) vernetzt. Das hochgradig vernetzte Polymergerüst bildet letztlich einen Abdruck des Mustermoleküls und ermöglicht so die selektive Analytenextraktion aus komplexen Matrices (Lombardo-Agüí et al., 2010). In einer Publikation wurden MIP und Ionenaustauscher verglichen, um Chinolone aus Säuglingsnahrung zu extrahieren. Mit MIP wurden deutlich sauberere Extrakte erhalten. Dies resultierte in einer deutlich höheren Sensitivität. Díaz-Alvarez et al. (2009), Lombardo-Agüí et al. (2011) verglichen die Effizienz von QuEChERS und MIP, bei der Reinigung von Milchproben, wobei nach MIP-Cleanup in der LC-FLD störende Probenpeaks dazu führten, dass die Wirkstoffe OA, FLU, und DIF nicht eindeutig nachzuweisen waren. Beim QuEChERS-Ansatz traten diese Probleme nicht auf.

Um die Wiederfindungsrate von Chinolon-Antibiotika aus Fleisch (Schwein, Rind, Geflügel) bzw. Organproben (Leber, Niere) zu verbessern, setzten Yu et al. (2012) die sogenannte „Accelerated Solvent Extraktion“ (ASE) ein. Im optimierten Verfahren wurde ACN als Lösungsmittel zusammen mit erhöhtem Druck (6 bar) und Temperatur (65°C) verwendet. Die Extraktionszeit lag bei 5 min, das Verfahren ermöglicht einen hohen Probendurchsatz, sowie eine Automatisierung.

Ein detaillierter Überblick zu weiteren, in früheren Jahren etablierten analytischen Verfahren für die Aufreinigung und den Nachweis von Chinolonen in verschiedenen Lebensmittelmatrices findet sich in einer von Andreu et al. (2007) publizierten Übersichtsarbeit.

Tabelle 2: Ausgewählte chromatographische Verfahren zum Nachweis von Chinolon-Antibiotika in Lebensmitteln

Analyseverfahren	Matrix	Extraktionsmittel/ Aufreinigung	NWG- Bereich (ppb)	Anzahl nach- gewiesener Chinolone	Wiederfindung (%)	Literatur
UPLC-FLD	Milch	ACN/HCOOH (95/5) SALLE (NaCl+MgSO ₄)	0,1 - 29	13	80 - 98	ARROYO- MANZANARES et al. (2015)
LC-ESI-MS/MS	Eier	NaH ₂ PO ₄ MIP	0,1 - 0,9	11	90 - 106	BLASCO et al. (2012)
LC-FLD	Schweinefleisch, Eier, Milch	ACN/2,5 % TCA (4/1) Entfetten mit Hexan	0,1 - 5	10	61 - 116	CHO et al. (2010)
HPLC-UV	Säuglingsnahrung	MeOH SAX (Anionenaustauscher) bzw. MIP	30-110 10-50	9	87 - 100 93 - 105	DÍAZ-ALVAREZ et al. (2009)
HPLC-DAD	Lachs	Citratpuffer SPE (Oasis HLB)	1,9 - 12	7	96 - 103	EVAGGELOPOULOU et al. (2013)
LC-FLD LC-MS/MS	Eier	ACN SPE (C18)	3 - 10 0,5 - 1	9	85 - 93 92 - 99	GAJDA et al. (2012)
LC-MS/MS	Honig	Säurehydrolyse (2M HCl) Entfetten mit Hexan SPE (Strata-X-C)	0,2 - 2,0	8	75 - 117	GALARINI et al. (2015)

Fortsetzung von Tabelle 2:

Analyseverfahren	Matrix	Extraktionsmittel/ Aufreinigung	NWG- Bereich (ppb)	Anzahl nach- gewiesener Chinolone	Wiederfindung (%)	Literatur
UPLC-MS/MS	Milchpulver	ACN mit TCA (20 %) SPE (Oasis HLB)	0,04 - 0,5	15	84 - 118	HERRERA-HERRERA et al. (2011)
LC-FLD	Eier	ACN/H ₃ PO ₄ -Puffer (1/1) bei 70 °C	1 - 75	9	58 - 96	JIMÉNEZ et al. (2011)
UPLC-MS/MS	Milch	ACN CHCl ₃	0,3 - 2,0	17	72 - 110	JUNZA et al. (2014)
LC-MS	Milch	ACN (50 %) SOSLE (NH ₄) ₂ SO ₄	0,2 - 2,0	17	45 - 97	KAUFMANN et al. (2014)
CE-FLD	Schweineniere	NaH ₂ PO ₄ (50mM) MIP	1 - 11	4	86 - 99	LOMBARDO-AGÜÍ et al. (2010)
UPLC-FLD	Fisch	NaH ₂ PO ₄ (30 mM) ACN/HCOOH (95/5) QuEChERS-Kit	0,1 - 4,7	8	72 - 108	LOMBARDO-AGÜÍ et al. (2015)
MEKC-FLD	Milch Honig	ACN SPE (HLB)	3 - 8	5	81 - 95	MENG et al. (2014)

Fortsetzung von Tabelle 2:

Analyseverfahren	Matrix	Extraktionsmittel/ Aufreinigung	NWG- Bereich (ppb)	Anzahl nach- gewiesener Chinolone	Wiederfindung (%)	Literatur
CE-MS	Milch	Proteinfällung mit CH ₃ COOH Entfetten mit n-Hexan MIP (in-line)	1,0 - 1,4	8	70 - 102	MORENO-GONZALEZ et al. (2014)
LC-MS	Milch	TCA (15 %)	2,4 - 6	6	64 - 96	RUIZ-VICEO et al. (2012)
HPLC-FLD	Eier, Fisch, Milch, Hühnerfleisch, Schaffleisch, Schweineniere	ACN SPE (HLB)	3 - 50	9	77 - 120	STOILOVA et al. (2013)
HPLC-UV LC-MS/MS	Schwein, Rind (Fleisch, Leber, Niere) Geflügel (Huhn) (Fleisch, Leber) Fisch	ACN (ASE) SPE (Oasis HLB)	3 0,3	15	71 - 111	YU et al. (2012)
LC-FLD	Fisch	McIlvaine Puffer SPE (Bond Elut Plexa)	0,9 - 50,3	11	71 - 98	ZHANG et al. (2010)

2.3.2 Immunologische Nachweisverfahren

Das Prinzip der immunologischen Nachweisverfahren basiert auf der Interaktion zwischen Antigen und Antikörper. Diese Interaktion ist abhängig davon, wie gut der Antikörper das entsprechende Antigen erkennt. Verschiedene immunologische Nachweisverfahren wie Enzymimmuntest (EIA), Chemilumineszenz-Immunoassay (CLIA) und Schnelltests wurden nach diesem Prinzip entwickelt. In ihnen wird diese Interaktion mit Hilfe von verschiedenen Markern wie Enzymen, fluoreszierende Substanzen oder Nanopartikeln sichtbar gemacht.

Substanzen wie Chinolone bezeichnet man aufgrund ihrer geringen molekularen Masse als niedermolekular. EIA ist das meistgenutzte immunologische Verfahren um niedermolekulare Substanzen zu detektieren. Niedermolekulare Stoffe besitzen, im Vergleich zu Proteinen mit vielen potentiellen Epitopen, nur eine Antikörperbindungsstelle. Deswegen können sie nur mit einem Testsystem nachgewiesen werden, das auf Konkurrenz beruht. In einem solchen System konkurrieren freie und markierte Antigene um die Antikörperbindungsstelle. Diese als kompetitiv bezeichneten Verfahren kann man in zwei Techniken unterteilen, die man als direkt beziehungsweise indirekt bezeichnet (Märtlbauer, 1993).

Beim direkten Verfahren werden die spezifischen Antikörper als Festphase entweder an tierartsspezifische Antikörper oder direkt an ein Trägermaterial gebunden. Freies und enzymgebundenes Antigen konkurriert um die freien Antikörperbindungsstellen. Danach werden ungebundene Substanzen gewaschen. Anschließend wird ein enzymspezifisches Substrat hinzugefügt und das Substrat wird umgekehrt proportional zur Menge des freien Antigens durch das gebundene Enzymkonjugat umgesetzt.

Beim indirekten Verfahren dient proteingebundenes Antigen als Festphase, gebundenes und freies Antigen konkurriert um die freien Antikörperbindungsstellen. Anschließend wird zum Nachweis gebundener, spezifischer Antikörper ein enzymmarkierter, tierartsspezifischer Sekundärantikörper hinzugefügt. Nach der Inkubation werden ungebundene Substanzen gewaschen. Danach wird ein enzymspezifisches Substrat zugegeben, das durch das gebundene Enzymkonjugat katalysiert wird.

Die etablierten EIA-Methoden basieren auf polyklonalen, monoklonalen oder rekombinanten Antikörpern.

Polyklonale Antikörper (pAks) sind Antikörper, die durch verschiedene B-Zell-Linien im Körper produziert werden. Die Sensitivität von pAks ist der Durchschnitt aller Antikörper, die sich im Serum befinden. Polyklonale Antikörper können nicht mit identischen Eigenschaften reproduziert werden.

Monoklonale Antikörper werden von einzelnen antikörperproduzierenden Zellen abgeleitet. Dafür werden B-Lymphozyten mit einer Tumor-Zelllinie fusioniert, um unsterbliche Hybridomaklone zu bilden. Der sekretierte Antikörper ist monospezifisch und hat somit eine stabile Affinität für ein bestimmtes Epitop. Nach der Etablierung eines stabilen Hybridomas, können bei Bedarf jederzeit Antikörper mit definierter Sensitivität und Spezifität nachproduziert werden.

Die rekombinante Antikörper-Technologie spielt im Bereich der Rückstandanalytik nur eine untergeordnete Rolle. Meist werden aus vorhandenen Hybridomen durch Klonierung die Sequenzen für die variablen Bereich der leichten und schweren Kette eines Antikörpers in ein *E.coli*-Expressionssystem überführt und als „single-chain“ Antikörperfragmente (scFv) exprimiert. Durch das Einbringen von Mutationen besteht ferner die Möglichkeit, die Affinität bzw. Spezifität des Antikörpers zu modifizieren.

2.3.2.1 Substanzspezifische Antikörper zum Nachweis von Chinolonen

Bislang beschriebene monoklonale und polyklonale Antikörper gegen Chinolone, die hochspezifisch für Einzelwirkstoffe sind bzw. nur eine sehr begrenzte Kreuzreaktivität mit strukturverwandten Verbindungen aufweisen, sind in **Tabelle 3** aufgeführt. Alle Immunogene wurden hergestellt, indem die an C-3 substituierte Carboxylgruppe der Chinolone an Proteine mittels aktivem Ester (aE), gemischtem Anhydrid (gA) oder Carbodiimid (c) gekoppelt wurde. Einige Autoren behandelten die Proteine mit Ethylendiamin, um die Kopplungseffizienz zu erhöhen bzw. um die Haptene dem Immunsystem durch den eingefügten Spacerarm besser zu präsentieren. Wang et al. (2010) modifizierte die Carboxylgruppe (C-3) von Flumequin durch Anlagerung von γ -Aminobuttersäure (ABA), die gewonnenen Antikörper waren hochspezifisch für Flumequin. Im Lauf der Jahre wurden so für eine Vielzahl von Chinolon-Wirkstoffen [CIP, DAN, ENR, FLU, GAT, LOM, MAR, Nadifloxacin (NAD), NOR, OFL, PEF] Antikörper entwickelt. Sowohl poly- als auch monoklonale Antikörper gegen diese Wirkstoffe zeichneten sich durch hohe Affinitäten aus, die Nachweisgrenze der EIA-Systeme lag oft im ppt-Bereich.

Tabelle 3: Übersicht über Substanzspezifische monoklonale und polyklonale Antikörper zum Nachweis von Chinolonen

Immunogen	Markiertes Antigen	Antikörper	50 %-Dosis (ng/ml)	Spezifität (relative Kreuzreaktivität, %)	Referenz
CIP-aE-BSA	CIP-aE-HSA	pAk	50,0	ENR (70), NOR (45)	DUAN und YUAN (2001)
CIP-aE-BSA	CIP-aE-OVA	mAk	1,47	ENR (29), FLR (23), PEF (20), OFL (13), NOR (11), ENR (85)	HUANG et al. (2010)
CIP-c-BSA	CIP-c-OVA	mAk	246		HU et al. (2010)
DAN-aE-cBSA	DAN-aE-cOVA	pAk	2,00	PEF (22), FLR (21)	LIU et al. (2009)
DAN-gA-BSA	DAN-gA-OVA	pAk	5,40		SHENG et al. (2009b)
ENR-(k.A.)-BSA	ENR-aE-HRP	mAk	1,99		MANASPONG et al. (2013)
ENR-aE-HSA	ENR-aE-HRP	mAk	1,20		WATANABE et al. (2002)
FLU-ABA-aE-BSA	FLU-aE-OVA	mAk	26,3		WANG et al. (2010)
FLU-c-cBSA	FLU-c-cOVA	pAk	500		VAN COILLIE et al. (2004)
GAT-aE-cBSA	GAT-aE-cOVA	pAk	2,60	LOM (3)	ZHAO et al. (2007)
LOM-aE-BSA	LOM-aE-OVA	mAk	0,18	CIP (16)	XINYAO et al. (2011a)

Fortsetzung von Tabelle 3:

Immunogen	Markiertes Antigen	Antikörper	50 %-Dosis (ng/ml)	Spezifität (relative Kreuzreaktivität, %)	Referenz
LOM-gA-cBSA	LOM-aE-cOVA	pAk	0,35	NOR (18), FLR (9)	CAO et al. (2011a)
MAR-(k.A.)-BSA	MAR-(k.A.)-OVA	mAk	0,16	OFL (13)	JUNJIE et al. (2011)
MAR-aE-BSA	MAR-aE-OVA	pAk	4,60	OFL (148)	SHENG et al. (2009a)
MAR-aE-cBSA	MAR-aE-cOVA	pAk	6,20	OFL (16)	XINYAO et al. (2011b)
NAD-aE-KLH	NAD-aE-OVA	mAk	0,72		SURYOPRABOWO et al. (2014a)
NOR-aE-BSA	NOR-aE-OVA	pAk	0,48	CIP (38), SAR (33)	JINQING et al. (2011a)
NOR-(k.A.)-BSA	NOR-(k.A.)-OVA	mAk	0,16	PEF (34), LOM (22)	JINQING et al. (2011b)
NOR-aE-BSA	NOR-aE-OVA	pAk	2,20		CUI et al. (2011)
OFL-aE-BSA	MAR-aE-HRP	pAk	0,20	MAR (71), FLR (38)	SHENG et al. (2011)
PEF-aE-cBSA	PEF-aE-cOVA	pAk	6,70	FLR (116), ENR (88), OFL (10)	LU et al. (2006)

2.3.2.2 Generische Antikörper zum Nachweis von Chinolonen

Eine ganze Reihe von Publikationen beschreibt Ansätze für die Induzierung von Antikörpern mit sog. generischen Eigenschaften, d.h. Antikörper mit breiter Spezifität, die mit allen bzw. sehr vielen Vertretern dieser Antibiotika-Klasse reagieren. Publikationen zu polyklonalen Antikörpern (pAks) sind in **Tabelle 4**, zu monoklonalen Antikörpern (mAks) in **Tabelle 5** vergleichend dargestellt. In der Regel wurde als Hapten NOR, SAR oder CIP gewählt, um generische Antikörper herzustellen.

Prinzipiell wurden dabei drei verschiedene Vorgehensweisen zur Herstellung der immunogenen Chinolon-Protein Konjugate beschrieben.

Basierend auf den grundlegenden Arbeiten von Bucknall et al. (2003) wurde von vielen Autoren das an C-7 substituierte Piperazin als Kopplungsstelle benutzt, wobei entweder die vorhandene sekundäre Aminogruppe direkt oder nach einer Modifikation für die Kopplung verwendet wurde. Bucknall et al. (2003) verwendeten eine Variation der Carbodiimid-Methode, um Norfloxacin direkt über die sekundäre Aminogruppe des Piperazin-Rings an Protein (Ovalbumin) zu koppeln. Die generierten pAk waren in der Lage, verschiedene Chinolone zu erkennen, die relativen Kreuzreaktionen lagen im Bereich von 6 % (FLU, ENR) bis 143 % (ENO). Burkin (2008) verwendeten einen identischen Ansatz, um CIP an BSA zu koppeln. Mit den gewonnenen Antikörpern konnten 10 Chinolone in einem Bereich von 0,89 (CIP) bis 100 (NA) ng/ml nachgewiesen werden. Daneben wurde von verschiedenen Autoren vor der Kopplung an das Protein ein Linker an der sekundären Aminogruppe des Piperazin-Rings eingeführt. Tittlemier et al. (2008) verwendeten dafür beispielweise 6-Bromhexansäure, die pAk zeigten im EIA bei Verwendung eines Brücken-heterologen Norfloxacin-Konjugates jedoch keine Reaktivität mit den MRL-belegten Chinolonen FLU und OA. Mit einem identischen Ansatz wurden von Huet et al. (2006) anti-SAR pAk generiert, unter Verwendung eines Hapten-heterologen markierten Antigens (NOR-HRP) konnten im EIA 15 Chinolone in einem Bereich von 0,20 ng/ml (NOR) bis 25 ng/ml (CIN) nachgewiesen werden. Unklar blieb allerdings, ob es sich beim eingesetzten Immunogen um eine Mischung aus verschiedenen gekoppelten Antigenen handelte, da SAR auch über die originäre Carboxylgruppe an C-3 an den Proteinträger gekoppelt worden sein könnte. (Liu et al., 2013a,b) verwendeten daher in zwei verschiedenen Publikationen N-Acetylsulfanylchlorid bzw. 2-Chloroethylamin, um eine primäre freie Aminogruppe am

Piperazin-Ring von SAR bzw. CIP einzufügen. Dies ermöglichte mittels Glutaraldehyd eine zielgerichtete Kopplung an das Trägerprotein. In einer anderen Publikation wurde 2-Bromoethylamin zur Modifikation des Piperazin-Rings von NOR verwendet. Die generierten pAk zeigten Reaktivität mit 18 Chinolonen, die IC₅₀-Dosen lagen in einem Bereich von 0,54 ng/ml (NA) bis 30 ng/ml (SPA) (Li et al., 2008a).

Ein zweiter, fundamental anderer Ansatz zur Herstellung von generischen Antikörpern gegen Chinolone basierte auf einer Arbeit von Cao et al. (2009) in der Computer-basiert 3D Konformations-Ähnlichkeiten von 27 verschiedenen Chinolonen errechnet wurden. Unter Berücksichtigung der sterischen und elektrostatischen Eigenschaften wurden für die Entwicklung generischer Antikörper MAR, Benofloxacin, PEF, und NOR als geeignete Haptene eingestuft. Da Unterschiede zwischen den jeweiligen Chinolonen v.a. auf den N-1 und C-7 Substituenten beruhen, wurde zudem die N-1 Position der Chinolone als Kopplungsstelle empfohlen, da so die großen Strukturunterschiede in dieser Region dann für die induzierten Antikörper nur eine untergeordnete Rolle spielen. Dieser theoretische Ansatz wurde von Pinacho et al. (2012) aufgegriffen, die ein Chinolon-Derivat mit einer reaktiven Thiolgruppe an der N1-Position herstellten. Die Reaktivität der mit dem entsprechenden BSA-Konjugat in Kaninchen induzierten Antikörper wurde v.a. durch die Substituenten an C-6 (Fluor Atom), an C-7 (Piperazin-Ring) und der β -Ketocarbonsäure geprägt. Im optimierten EIA-System wurden 10 Chinolone im Bereich von 0,35 (CIP) bis 23,5 (OA) ng/ml nachgewiesen.

Verschiedentlich - und dies nur im Zusammenhang mit der Generierung von mAk - wurde auch berichtet, dass mit Immunogenen, bei denen Chinolone über die C-3 positionierte Carboxylgruppe gekoppelt worden waren, generische Antikörper induziert werden konnten. Wie in 2.3.2. dargestellt, resultierte dieser Ansatz bei den meisten Arbeiten in hochspezifischen Antikörpern. Bei Wang et al. (2007) wurden 4 verschiedene Haptene (CIP, ENR, OFL, NOR) mit der gemischten Anhydridmethode ans Trägerprotein gekoppelt. Fünf von neun der generierten Antikörper zeigten wie erwartet substanzspezifische Eigenschaften, ein anti-CIP mAk konnte jedoch 12 von 14 getesteten Chinolone in einem Bereich von 8,9 (CIP) bis 25,5 (FLU) ng/ml erkennen. In einer späteren Publikation (Wen et al., 2012), bei der ein heterologes, markiertes Antigen (NOR-OVA) eingesetzt wurde, wurden für diesen Antikörper 50 %-Dosen von 0,25 (CIP) bis 0,67 ng/ml (FLU) angegeben. DIF und SAR -

beide an N-1 mit einem Fluorbenzol-Substituenten - zeigten nur eine geringe Reaktivität. Kato et al. (2007) modifizierten die Carboxyl-Gruppe von ENR mit einem Spacer (Undecansäure) und koppelten das Derivat mittels aktivem Ester an das als Trägerprotein verwendete Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH). Der gewonnene mAk zeigte mit sechs von acht MRL-belegten Chinolonen Kreuzreaktionen. In einer weiteren Publikation wurde CIP mittels aktivem Ester an KLH ohne Spacer gekoppelt und zur Immunisierung von Mäusen verwendet. Chinolone der 1. Generation [NA, CIN, Pipemidsäure (PA), OA, FLU] zeigten keine Kreuzreaktion (<0,01 %) CIP, ENR, NOR und DAN konnten sensitiv nachgewiesen werden (Suryoprabowo et al., 2014b)

2.3.2.3 Rekombinante Antikörper

Zur Optimierung des Spezifitätsmusters von vorhandenen generischen mAk gegen Chinolon-Antibiotika wurden von verschiedenen Autoren zuerst scFv hergestellt, deren Antigenbindungsstelle dann durch Einfügen von Mutationen („site directed mutagenesis“) verändert wurde. Basierend auf dem von Wang et al. (2007) beschriebenen generischen mAk entwickelten Wen et al. (2012) einen scFv mit identischen Bindungseigenschaften: breite Kreuzreaktivität mit FQs, aber Wirkstoffe, die an N-1 einen Fluorbenzol-Substituenten aufweisen (DIF, SAR), werden etwa um der Faktor 1000 schlechter erkannt. Durch Austausch von Aminosäuren in der CDR3-Region der Bindungsstelle konnte die Affinität für diese Chinolone zwar deutlich gesteigert werden, die relativen Kreuzreaktionen lagen aber trotzdem nur bei 1,5 %. Leivo et al. (2011) arbeitete auf Basis eines mAk gegen SAR, der Schwächen beim Nachweis von FLU bzw. MAR hatte, die relative Kreuzreaktionen lagen bei 0,71 bzw. 0,29 %. Durch error-prone PCR hergestellte scFv-Mutanten zeigten z.T. eine höhere Affinität als der originäre mAk, die geringe Kreuzreaktivität mit FLU und MAR konnte jedoch nicht beseitigt werden.

Tabelle 4: Übersicht über polyklonale Antiseren mit breiter Reaktivität gegen Chinolon-Antibiotika. Die Reaktivität der Antikörper mit den MRL-belegten Antibiotika ist hervorgehoben.

Immunogen	Markiertes Antigen	Bereich IC₅₀, ng/ml	Spezifität (relative Kreuzreaktivität, %)	Referenz
NOR-c-OVA	NOR-aE-HRP	k.A.	ENO (143), NOR (100), OA (40) , PA (18), OFL (17), NA (15), CIP (9) , ENR (6) , FLU (6) , CIN (1)	BUCKNALL et al. (2003)
SAR-COOH-gA-TP	NOR-COOH-aE-HRP	0,21 (SAR) - 25,0 (CIN)	NOR (105), SAR (100) , DAN (88) , ENR (66) , DIF (64) , OFL (55), MAR (45) , PEF (30), ENO (27), LOM (24), CIP (17) , NA (14), FLU (4) , OA (3) , CIN (1)	HUET et al. (2006)
CIP-c-BSA	CIP-aE-GEL	0,86 (CIP) - 100 (NA)	ENR (126) , CIP (100) , GEM (51), PEF (43), NOR (32), LEV (15), LOM (15), OFL (10), SPA (4), NA (0,9)	BURKIN (2008)
NOR-COOH-gA-cBSA	NOR-aE-HRP	k.A.	NOR (100), ENR (68) , CIP (19) , DIF (18) , SAR (9) , OFL (0,6)	TITTELMIER et al. (2008)
NOR-NH ₂ -g-BSA	NOR-NH ₂ -g-OVA	0,54 (NA) - 30,0 (SPA)	NA (112), NOR (100), ENO (80), PA (69), PEF (60), CIP (56) , ENR (42) , DAN (30) , FLU (20) , DIF (19) , MAR (19) , SAR (18) , OFL (16), LOM (5), CIN (4), OA (3) , ORB (3), SPA (2)	LI et al. (2008a)
PEF-(aE)-cBSA	PEF-(aE)-OVA	94,8 (PEF) - 3870 (SAR)	PEF (100), ENR (95) , CIP (89) , NOR (87), DAN (78) , OFL(69), PA (46), SPA (39), LOM (25), SAR (2,4)	CAO et al. (2011b)
18-IA-HCH	18-BSA	0,35 (CIP) - 23,5 (OA)	ENR (127) , DIF (101) , CIP (100) , NOR (94), SAR (93) , MAR (19) , FLU (15) , DAN (11) , OFL (45), OA (3)	PINACHO et al. (2012)
NOR-aE-cBSA	NOR-gA-cOVA	2,70 (NOR) - 24,1(OFL)	NOR (100), ENO (87), CIP (79) , PEF (66), ENR (30) , LOM (23), SAR (18) , AMI (14), OFL (11)	FAN et al. (2012)

Tabelle 5: Übersicht über bislang beschriebene monoklonale Antikörper mit generischen Eigenschaften zum Nachweis von Chinolon-Antibiotika. Die Reaktivität der Antikörper mit den MRL-belegten Antibiotika ist hervorgehoben.

Immunogen	Markiertes Antigen	Bereich IC₅₀, ng/ml	Spezifität (relative Kreuzreaktivität, %)	Referenz
SAR-aE-cBSA	SAR-aE-cOVA	7,30 (SAR) - 698 (NA)	DIF, ENR, NA, NOR, SAR, TRO	HOLTZAPPLE et al. (1997)
CIP-gA-BSA	CIP-aE-OVA	8,90 (CIP) - 307 (SAR)	CIP (100), ENR (82), NOR (71), OFL (54), DAN (54), AMI (51), PEF (49), ENO (45), LOM (40), MAR (41), OA (40), FLU (35), DIF (3), SAR (3)	WANG et al. (2007)
ENR-aE-KLH	ENR-aE-KLH	k.A.*	CIP (100), ENR (100), NOR (100), DAN (80), ENO (20), CIN (18), SAR (16), OA (5), FLU (1,4), OFL (1,4), NA (0,9)	KATO et al. (2007)
SAR2-NH ₂ -g-BSA	SAR1-NH ₂ -G-OVA	5,80 (DIF) - 36,1 (MAR)	DIF (113), SAR (100), CIP (75), ENR (72), AMI (51), PEF (49) NOR (47), ENO (42), DAN (24), LOM (39), MAR (18), OFL (19)	LIU et al. (2013a)
CIP1-NH ₂ -g-BSA	CIP2-NH ₂ -G-OVA	7,60 (ENR) - 39,5 (SAR)	ENR (120), CIP (100), NOR (84), PEF (83), AMI (81), LOM (75), ENO (75) DAN (46), OFL (32), MAR (31), DIF (24), SAR (23)	LIU et al. (2013b)
CIP-aE-KLH	CIP-aE-BSA	0,57 (CIP) - 17,7 (SAR)	CIP (100), ENR (74), NOR (74), NAD (67), DAN (53), PEF (50), LOM (36), ENO (12), SAR (3)	SURYOPRABOWO et al. (2014b)

* Nachweisgrenze 0,7 ng/ml

2.3.2.4 Probenaufbereitungsverfahren beim enzymimmunologischen Nachweis von Chinolonen

Eine Übersicht zur Anwendbarkeit einiger bislang beschriebener EIAs zum Nachweis von Chinolon-Antibiotika in Lebensmitteln tierischen Ursprungs gibt **Tabelle 6**.

Da Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen in Immunoassays durch Probenmatrix-Bestandteile, insbesondere Fett und Proteine, beeinflusst werden können, muss abhängig von der Probenart eine Aufarbeitung des Lebensmittels erfolgen. Die Probenaufarbeitung ist aber in der Regel deutlich weniger aufwändig, als das bei den physikalisch-chemischen Verfahren (2.3.1) der Fall ist.

Bei Milchproben beschränkte sich die Probenvorbereitung meist auf das Entfetten der Probe durch Zentrifugation und das anschließende Verdünnen der Magermilch - meist im Verhältnis 1:10 - in PBS mit oder ohne Tween-Zusatz (Cao et al., 2011a; Suryoprabowo et al., 2014b; Zhao et al., 2007). Von Fan et al. (2012) bzw. Manaspong et al. (2013) wurden MeOH/PBS Mischungen zum Verdünnen der Probe eingesetzt. Ein verhältnismäßig aufwändiges Verfahren, bestehend aus dem Entfetten der Probe, Proteinfällung mit Trichloressigsäure und Verdünnen in PBS (im Verhältnis 1:70) wurde von Sheng et al. (2011) beschrieben.

Zum Nachweis von Chinolonen in Fleischmatrices mittels EIA wurden die Proben meist mit Assaypuffer (Holtzapple et al., 1997; Sheng et al., 2009a,b) oder MeOH/PBS Mischungen homogenisiert, zentrifugiert und nach Verdünnung in die EIAs eingesetzt. Das Verhältnis von Probenmenge zu eingesetztem Volumen des Extraktionsmittels lag zwischen 1:2 (Suryoprabowo et al., 2014b) bis 1:10 (Watanabe et al., 2002), die Extraktionszeiten betragen 5 min (Liu et al., 2009), bis zu 30 min (Jinqing et al., 2011a; Li et al., 2008a). Zum Entfernen der Probenmatrix wurde in der Regel ein Zentrifugationsschritt (3.000 – 14.000 x g) eingesetzt, die Zeitdauer lag hierbei zwischen 10 min bis zu 1 h (Liu et al., 2009). Die verwendete Methanol-Konzentration zur Extraktion der Chinolone umfasst den Bereich von 20 % (Lu et al., 2006) bis zu 80 % (Watanabe et al., 2002). In den Arbeiten von Liu et al. (2013b) und Wang et al. (2007), die die jeweiligen EIA-Testsysteme mit einer breiten Palette an verschiedenen Chinolon-Antibiotika überprüften, wurde zur Extraktion eine Mischung aus ACN und 0,1 molarer NaOH verwendet; die Rohextrakte wurde mittels LLE unter Verwendung von Dichlormethan weiter aufgereinigt, nach Abdampfen des Lösungsmittels

und Aufnahmen in wässrigem Puffer mit Hexan entfettet. (Li et al., 2008a) verwendeten ebenfalls in einem Multi-Analyt-Ansatz Ethylacetat zur Extraktion.

Auch bei der Analyse von Fisch(produkten) und Schalentieren wurden ähnliche Extraktionsmittel eingesetzt; Kato et al. (2007) verwendeten MeOH bei Aal, Hu et al. (2010) angesäuertes ACN bei Fischereiprodukten und Tittlemier et al. (2008) eine Ethanol/Essigsäure-Mischung (99/1) bei Garnelen.

Grundsätzlich konnten mit allen Verfahren hohe Wiederfindungsraten (i.d.R. $\geq 80\%$) in den verschiedenen Lebensmitteln erreicht werden. Aufgrund der hohen Sensitivität der verwendeten EIA-Systems lagen die Nachweisgrenzen üblicherweise im unteren ppb-Bereich.

Tabelle 6: Anwendbarkeit von Enzymimmuntests zum Nachweis von Chinolonen in Lebensmitteln

Probenmatrix	Extraktionsmittel/ Aufreinigung	Kontaminations- bereich (ppb)	Analyte	WFR¹ (%)	Referenz
Milch	Entfetten, verdünnen in PBS (1:10)	1 - 10	LOM	85 - 120	CAO et al. (2011a)
Aal	MeOH/PBS (1/1) Verdünnen in PBS	10, 20	CIP, DAN, ENR, NOR, OFL, PEF	69 - 98	CAO et al. (2011b)
Milch	Entfetten, verdünnen 1:10 in MeOH/PBS (1/4)	5 - 50	CIP, ENO, PEF, NOR	84 - 106	FAN et al. (2012)
Geflügelleber	Assaypuffer (TBS, 0,05 % Tween 20, 1 % BSA)	10 - 100	SAR	78 - 132	HOLTZAPPLE et al. (1997)
Fischereiprodukte	ACN/HCl (100/1) Entfetten mit Hexan	50 - 1250	CIP	81 - 95	HU et al. (2010)
Geflügelleber	MeOH/PBS (1/5) Verdünnen in PBS	8 - 50	NOR	90 - 118	JINQING et al. (2011a)
Aal	MeOH	10 - 100	ENR	91 - 102	KATO et al. (2007)

¹ WFR, Wiederfindungsrate

Fortsetzung von Tabelle 6:

Probenmatrix	Extraktionmittel/ Aufreinigung	Kontaminations- bereich (ppb)	Analyte	WFR ¹ (%)	Referenz
Schweinefleisch, Geflügelfleisch	Ethylacetat	1 - 5	CIN, CIP, DAN, DIF, ENO, ENR, FLU, LOM, MAR, NA, NOR, OA, OFL,ORB, PA, PEF, SAR, SPA	62 - 95	LI et al. (2008a)
Geflügelleber	PBST	5 - 50	DAN	84 - 110	LIU et al. (2009)
Geflügelfleisch	ACN/NaOH (10/1) Ausschütteln in CH ₂ Cl ₂ Entfetten mit Hexan	50, 100	CIP, DAN, ENR, DIF, MAR, NOR, OFL, SAR	62 - 83	LIU et al. (2013b)
Geflügelleber	MeOH/PBS (1/5) Verdünnen in PBS	5 - 500	PEF	86 -106	LU et al. (2006)
Milch	Entfetten, 1:5 verdünnen in MeOH/PBS (35/65)	5 - 100	ENR	80 - 125	MANASPONG et al. (2013)
Schweinefleisch, Rindfleisch, Geflügelfleisch	KH ₂ PO ₄ -Puffer	10 - 1000	MAR, DAN	84 - 105	SHENG et al. (2009a,b)

¹ WFR, Wiederfindungsrate

Fortsetzung von Tabelle 6:

Probenmatrix	Extraktionsmittel/ Aufreinigung	Kontaminations- bereich (ppb)	Analyte	WFR ¹ (%)	Referenz
Milch	Proteinfällen mit 7,5 % TCA Verdünnen in PBS (1:70)	10 - 200	FLR, MAR, OFL	78 - 113	SHENG et al. (2011)
Milch Geflügelfleisch	Verdünnen in PBS (1:10) MeOH/PBS (1/1)	10 - 50	CIP, ENR	94 - 104 93 - 108	SURYOPRABOWO et al. (2014b)
Garnelen	EtOH/CH ₃ COOH (99/1)	1 bzw. 2	NOR	74 - 91	TITTELMIER et al. (2008)
(Geflügelfleisch, Geflügelleber, Garnele)	ACN/NaOH (10/1) Ausschütteln mit CH ₂ Cl ₂ Entfetten mit Hexan	50 - 200	CIP, DAN, ENR, FLU, NOR, OFL	60 - 93	WANG et al. (2007)
Honig	Verdünnen in PBS Ausschütteln mit CH ₂ Cl ₂				
Eier	ACN Entfetten mit Hexan				
(Geflügelfleisch, Geflügelleber)	MeOH/PBS (4/1)	50 - 800	ENR	72 - 96	WATANABE et al. (2002)
Milch	Entfetten durch Zentrifugieren Verdünnen in PBST (0,05 %)	0,5 - 10	GAT	86 - 106	ZHAO et al. (2007)

¹ WFR, Wiederfindungsrate

2.3.2.5 Alternative auf Antikörpern basierende Nachweisverfahren

Einen Überblick zu alternativen immunchemisch-basierten Methoden zum Nachweis von Chinolon-Antibiotika gibt **Tabelle 7**.

In auf Chemilumineszenz basierenden Immunoassays (CLIA) benutzt man anstelle des chromogenen Substrates ein lumineszierendes Substrat, meist Luminol. Dies resultiert in einer deutlichen Steigerung der Testsensitivität, da die emittierten Photonen sehr sensitiv nachgewiesen werden können. Ding et al. (2009) konnten so die Empfindlichkeit eines Gatifloxacin-spezifischen EIA deutlich steigern, mit dem optimierten System waren 50 pg GAT pro ml Milch reproduzierbar nachweisbar. Auch Wen et al. (2012) und Tao et al. (2013) beschrieben die Etablierung eines CLIA, basierend auf einem breit reagierenden rekombinanten scFv-Antikörper. Die Steigerung der Sensitivität betrug ca. Faktor 3, es konnten 20 Chinolone in einem Bereich von 0,2 – 2,1 ppb detektiert werden (Tao et al., 2013).

Im Vergleich zum EIA erfordern Lateral Flow Tests keine Geräteausrüstung, weniger Probenvorbereitung und liefern schnelle Ergebnisse. Entsprechende Verfahren wurden von Zhu et al. (2008), Zhao et al. (2008) und Liu et al. (2014) beschrieben, je nach eingesetzten Antikörpern konnten Chinolone substanzspezifisch oder als Multi-Analyt-Test nachgewiesen werden. Chinolon-Rückstände wurden sowohl in flüssigen Proben (z.B. Milch) als auch in festen Proben (Geflügelfleisch, -leber) mittels Lateral Flow Test nachgewiesen. Mit Hilfe von generischen Antikörpern konnten bis zu 12 Chinolone in weniger als zehn Minuten in einem auf kolloidalem Gold basierenden Assay detektiert werden (Zhu et al., 2008).

Das Fluoreszenzpolarisations-Verfahren ist ebenfalls ein alternatives Schnelltest-Verfahren, in dem Fluorophor-markierte Antigene mit spezifischen Antikörpern vorinkubiert werden und einen Komplex bilden, wobei freie Antigene in der Probe Fluorophor-markierte Antigene aus dem Komplex verdrängen, was zu der Änderung des Messwerts führt. Mi et al. (2013) entwickelten ein entsprechendes Verfahren, basierend auf dem von Wang et al. (2007) beschriebenen breit kreuzreagierenden monoklonalen Antikörper. Die Wiederfindungsraten für diverse Chinolone in Milch und Geflügelfleisch lagen bei 77,8 bis 116 %, wobei die relative Standardabweichung weniger als 17,4 % betrug.

Biosensoren, wie die auf dem Prinzip der Oberflächenplasmonresonanz (surface plasmon resonance, SPR) beruhenden Systeme, wandeln ein biologisches Signal in ein physikalisches Signal um und ermöglichen den markerfreien Nachweis von niedermolekularen Antigenen wie z.B. Antibiotika. Haasnoot et al. (2007) etablierten ein SPR-System, in dem FLU mittels aktivem Ester auf einem CM5 Biosensorchip gebunden wurde. Ein ähnliches System wurde von Huet et al. (2008) beschrieben. Zur Generierung des eingesetzten polyklonalen Serums mit breiter Kreuzreaktivität (13 Chinolone wurden erkannt) wurde ein parallel mit NOR und FLU gekoppeltes Protein eingesetzt. Die Biochips wurden mit einem Hapten beladen, das der Grundstruktur der FQs entsprach (inklusive Fluoratom am C-6, aber ohne C-7 Substituenten). Das so optimierte System wurde für die Matrices Fisch- und Geflügelfleisch sowie Eier validiert, die Nachweisgrenzen lagen in einem sehr niedrigem Bereich von 0,1 - 0,3 µg/kg.

Zusätzlich zu den in Tabelle 7 zusammengefassten Nachweisverfahren sind auch Hybrid-Immunoassays als alternative Methoden zu erwähnen, mit denen man mehrere Antibiotika-Klassen oder andere Analyte simultan auf einer Mikrotiterplatte mit Hilfe von verschiedenen Auslesemethoden detektieren kann. Jiang et al. (2013) kombinierten zwei generische Antikörper gegen Chinolon-Antibiotika und Sulfonamide in einem EIA-Test, wobei zum Nachweis parallel die beiden Enzyme alkalische Phosphatase (ALP) und HRP verwendet wurden. Die Nachweisgrenzen des optimierten Verfahrens betragen 2,4 (Chinolone) bzw. 5,8 ng/ml (Sulfonamide). In einer anderen Publikation wurden HRP und Quantum-Dots erfolgreich kombiniert, was den sensitiven parallelen Nachweis von Chinolonen (0,18 ng/ml), Sulfonamiden (0,17 ng/ml) und Melamin (7,5 ng/ml) ermöglichte (Zhu et al., 2011).

Tabelle 7: Auf Antikörpern basierende alternative Nachweisverfahren für Chinolone

Etabliertes Verfahren	Matrix	Nachgewiesene Wirkstoffe	Nachweisgrenze (ppb)	Literatur
Chemilumineszenz-Immunoassay	Milch	GAT	0,001	DING et al. (2009)
Chemilumineszenz-Immunoassay	Fisch Garnelen	CIP, DAN, DIF, ENO, ENR,FLR, AMI, FLU, LEV, LOM, MAR, NOR, OFL, ORB, PAZ, PEF, PRU, SAR, SPA, TRO	0,23 - 2,1	TAO et al. (2013)
Fluoreszenzpolarisation	Milch, Geflügelfleisch	CIP, DAN, ENR, FLU, DIF, OA, MAR	0,72 - 4,4	MI et al. (2013)
Lateral Flow Test	Geflügelfleisch Geflügelleber	AMI, CIP, DAN, ENO, ENR, FLU, LOM, MAR, NOR, OA, OFL, PEF	25 - 50	ZHU et al. (2008)
Lateral Flow Test	Geflügelfleisch	ENR	0,14	ZHAO et al. (2008)
Lateral Flow Test	Milch	CIP	2,5	LIU et al. (2014)
Oberflächenplasmonresonanz Biosensor-Assay	Geflügelfleisch	FLU	24	HAASNOOT et al. (2007)
Oberflächenplasmonresonanz Biosensor-Assay	Ei, Fisch, Geflügelfleisch	NOR	0,1 - 0,3	HUET et al. (2008)
Oberflächenplasmonresonanz Biosensor-Assay	Milch	ENR	2	FERNANDEZ et al. (2011)

2.4 Immunoaffinitätschromatographie

Immunoaffinitäts(IA)-säulen, bei denen spezifische Antikörper - aus Gründen der nachhaltigen Verfügbarkeit meist monoklonale Antikörper - kovalent an Trägermatrices gekoppelt sind, dienen seit Jahren als wichtiges Verfahren, um verschiedene Substanzen wie Mykotoxine, Antibiotika und Pestizide aus unterschiedlichen Matrices effizient anzureichern bzw. rein darzustellen (Dietrich et al., 1998; Heering et al., 1998; Rejeb et al., 2001). Im Vergleich zur Festphasenextraktion, die in der Regel auf polaren, unpolaren oder ionischen Wechselwirkungen zwischen Analyt und Festphase beruht, liefern Immunoaffinitätssäulen eine hochspezifische Erkennung von Analyten durch den Einsatz substanzspezifischer Antikörper. Eine schematische Darstellung des IAC-Prinzips ist in **Abbildung 3** skizziert. Zuerst wird die Säule z.B. mit PBS konditioniert, im nächsten Schritt erfolgt der Probenauftrag. Flüssige Proben wie z.B. Milch können direkt bzw. nach Entfetten und Verdünnen in PBS aufgetragen werden. Von festen Proben müssen Rohextrakte hergestellt werden, organische Lösungsmittel wie MeOH oder ACN müssen auf Konzentrationen, die die Antikörper-Antigen Bindungen nicht stören (meist ≤ 20 Vol. %), verdünnt werden. Nachdem die Probe auf die Säule gegeben wurde erfolgt ein Waschschriff, um die Matrix zu entfernen. In einem letzten Schritt werden die Analyten mit geeigneten Elutionsmitteln, meist organische Lösungsmittel wie MeOH, ACN oder entsprechende wässrige Mischungen, eluiert (Abi-Ghanem & Berghman, 2012; Şenyuva & Gilbert, 2010).

Holtzapfle et al. (1999) koppelten monoklonale Anti-SAR Antikörper, die Reaktivität mit SAR, DIF, ENR, CIP zeigten, an Protein G, um eine Immunoaffinitätssäule zu etablieren. Die IA-Säule wurde zur Anreicherung der oben angegebenen Chinolone aus Geflügelleber bzw. in einer anderen Publikation aus Milch (Holtzapfle et al., 1998) in einem automatisierten on-line Extraktionsverfahren eingesetzt. Der Nachweis der Wirkstoffe erfolgte mittels HPLC-FLD, die Wiederfindungsraten lagen bei 72 bis 90 %, die Standardabweichungen lagen bei ≤ 8 %.

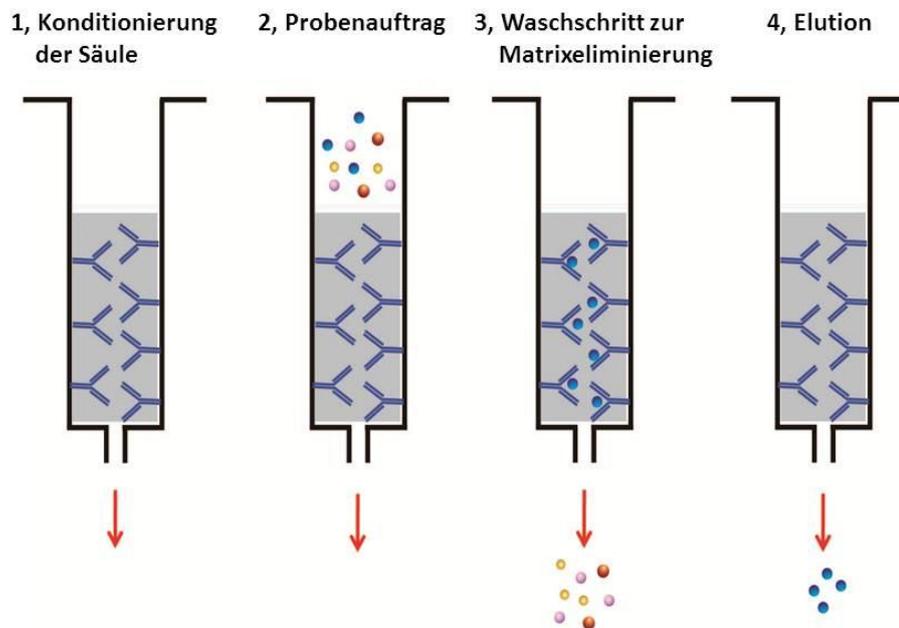


Abbildung 3: Prinzipielle Durchführung der immunoaffinitätschromatographischen Reinigung

Li et al. (2008b) verwendeten den von Wang et al. (2007) beschriebenen generischen mAk zur Etablierung eines IAC-Cleanup Verfahrens für Chinolone aus Fleisch (Schwein bzw. Geflügel). Nach Kopplung der mAk an CNBr-aktivierte Sepharose 4B (8 mg/ml Gel) konnten Säulenkapazitäten von 1,4 - 2,5 μg Chinolon-Antibiotika pro ml Gel bestimmt werden. Zur Extraktion wurden die Fleischproben mit MeOH/Wasser (4:1, v/v) versetzt, in PBS auf MeOH Gehalte von 20 % (v/v) verdünnt und anschließend auf die Säule gegeben. Die Elution der gebundenen Chinolone erfolgte mit MeOH/Wasser/Ammoniak (90:9,8:0,2). Mittels LC-MS/MS konnten nach IAC-Reinigung der künstlich kontaminierten Fleischproben in einem Konzentrationsbereich von 1 - 90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Wiederfindungsraten von 73 - 104 % für 13 verschiedene Chinolone erzielt werden. In einer weiteren Publikation wurde ebenfalls ein generischer mAk für die Etablierung einer Immunoaffinitätssäule eingesetzt. Das Verfahren erlaubte die effiziente und reproduzierbare Anreicherung von 10 Chinolonen, - darunter alle MRL-regulierten Wirkstoffe - aus Geflügelfleisch. Als Eluat wurde MeOH/PBS (7:3, v/v) eingesetzt, die Verwendung von reinem Methanol als Elutionsmittel resultierte in geringen Wiederfindungsraten (Zhao et al., 2009).

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien und Biochemika

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, T2885
Aktivierte Peroxidase	Roche Diagnostics GmbH, 11 428 861 001
Aminopterin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, A5159
Casein-Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, C8654
Clioquinol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 33931
CNBr-aktivierte Sepharose™ 4B	GE Healthcare, 17-0430-01
Dulbecco's Medium	Biochrom GmbH, F 0435
Fötales Bovines Serum	Biochrom GmbH, S 0115
Glucose-Oxidase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, G2133
Hypoxanthin/Thymidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, H0137
Kaninchen-Anti-Maus-IgG-Antikörper	Dako, Z 0259
L-Glutamin	Biochrom GmbH, K 0282
Magermilchpulver	Oxoid Ltd., LP0031
Meerrettichperoxidase (HRP)	Roche Diagnostics GmbH, 10 814 407 001
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid (EDC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, E7750
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D80002
Na-Pyruvat	Biochrom GmbH, L 0473
N-Hydroxysuccinimid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 130672
Polyethylenglycol 1500	Roche Diagnostics GmbH, 10 783 641 001
Protein A-Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, P3476
Triethanolamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, T58300
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, P1379
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck, 108597

Alle weiteren nicht eigens aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich bzw. Merck in p.a.-Qualität bezogen.

3.1.2 Chinolon-Antibiotika

Ciprofloxacin	(CIP)	Sequoia Research Products Ltd, SRP03565c
Ciprofloxacin- Ethylendiamin	(CIP-ED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 1134324
Clinafloxacin	(CLN)	LKT Laboratories, Inc., c4535
Danofloxacin	(DAN)	Sequoia Research Products Ltd, SRP00900d
Difloxacin	(DIF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 33984
Enoxacin	(ENO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, E3764
Enrofloxacin	(ENR)	Sequoia Research Products Ltd, SRP01088e
Fleroxacin	(FLR)	LKT Laboratories, Inc., F4518
Flumequin	(FLU)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 45735
Gatifloxacin	(GAT)	LKT Laboratories, Inc., St. Paul, USA, G0278
Ibafloxacin	(IBA)	(Ibaflin®), Intervet International GmbH
Levofloxacin	(LEV)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 28266
Lomefloxacin	(LOM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, L2906
Marbofloxacin	(MAR)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 34039
Moxifloxacin	(MOX)	LKT Laboratories, Inc., St. Paul, USA, M5794
Nadifloxacin	(NAD)	LKT Laboratories, Inc., St. Paul, USA, N0114
Nalidixinsäure	(NA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 97023
Norfloxacin	(NOR)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, N9890
Ofloxacin	(OFL)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, O8757
Orbifloxacin	(ORB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 34041
Oxolinsäure	(OA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, O0877
Pazufloxacin	(PAZ)	Sequoia Research Products Ltd, SRP010775p
Pefloxacin	(PEF)	LKT Laboratories, Inc., St. Paul, USA, P1622
Pipemid säure	(PA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, P7903
Pradofloxacin	(PRA)	(Veraflox®), Bayer HealthCare AG
Prulifloxacin	(PRU)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, P0079
Rufloxacin	(RUF)	LKT Laboratories, Inc., St. Paul, USA, R8122

Sarafloxacin	(SAR)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 33497
Sparfloxacin	(SPA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 56968
Tosufloxacin	(TOS)	Sequoia Research Products Ltd, SRP02535t
Trovafoxacin	(TRO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, PZ0015

Stammlösungen (1 mg/ml) der Chinolon-Antibiotika wurden bei Bedarf frisch in MeOH hergestellt. Falls nötig, wurde pro ml MeOH 20 µl NaOH (1 mol/l) zugegeben, um die Löslichkeit der entsprechenden Antibiotika zu erhöhen. Standardlösungen wurden durch Verdünnen der Stammlösungen entweder in PBS (pH 7,3) oder in rekonstituiertem Magermilchpulver (100 g/l A.dest) angesetzt.

3.1.3 Puffer und Lösungen

Enzymimmuntest (EIA)

Bicarbonat-Puffer:	0,05 mol/l (pH 9,6)
Casein-PBS:	1 % bzw. 3 % (w/v) Casein in PBS
Citrat-Puffer:	0,21 mol/l mit 3,13 mmol/l H ₂ O ₂ (pH 3,95)
PBS (pH 7,3) :	0,013 mol/l Phosphatpuffer mit 0,12 mol/l NaCl
Chromogen:	0,021 mol/l TMB gelöst in 10 ml Aceton/MeOH (1/9)
Substrat/Chromogen-Lösung:	Citratpuffer mit H ₂ O ₂ -Zusatz/TMB-Lösung(20/1)
Stopplösung:	1 mol/l H ₂ SO ₄
Waschlösung:	0,15 mol/l NaCl-Lösung mit 0,025 % (v/v) Tween 20

Immunaффinitätssäule (IAC)

Kopplungspuffer:	0,1 mol/l NaHCO ₃ mit 0,5 mol/l NaCl (pH 8,3)
Blockierungspuffer:	0,1 mol/l Tris-HCl (pH 8,0)
Waschpuffer 1:	0,1 mol/l Na-Acetatpuffer mit 0,5 mol/l NaCl (pH 4,0)
Waschpuffer 2:	0,1 mol/l Tris – HCl mit 0,5 mol/l NaCl (pH 8,0)
Konservierungslösung:	PBS mit 0,1 % NaN ₃

Kopplung an aktivierte Peroxidase (Perjodat-Verfahren)

Na₂CO₃-Lösung (0,5 mol/l; pH ca. 11,5)

NaHCO₃-Lösung (0,13 mol/l; pH 8,1)

Triethanolamin-Lösung: 2,66 ml Triethanolamin gemischt mit 3 ml A. dest.; mit 5 mol/l HCl auf pH 8 eingestellt; abschließend A. dest. auf 10 ml zugegeben.

Natriumborhydrid-Lösung: 8 mg NaBH₄ in 1 ml A. dest.; frisch hergestellt und auf Eis gelagert.

Glycin-Lösung: 0,75 g Glycin in 6 ml A.dest. gelöst; mit 0,1 mol/l NaOH auf pH 7 eingestellt; auf 10 ml mit A.dest. auffüllen

PBS/Glycin: 5 l PBS mit Zusatz von 3,7 g Glycin

3.1.4 Geräte

Brutschrank	Heracell 240 i CO2 Incubators, Thermo Scientific
ELISA-Reader	Tecan
Kühlzentrifuge	Multifuge 1 S-R, Heraeus
Magnetrührer mit Heizung	Typ Arex, Velp Scientifica
MiniPerm Bioreactor	Sarstedt
pH-Meter	pH/Cond 720, WTW GmbH
Präzisionswaage	Sartorius
Homogenisiersystem	ULTRA-TURRAX® Tube Drive, Ika
Rotationsverdampfer	Heidolph
Spektrophotometer	Specord 200 plus, Analytik Jena AG
Taumelgerät	Polymax 1040, Heidolph
Vortex	RS-VA 10, Phoenix
Zellkultur-Mikroskop	DM IL LED, Leica

3.1.5 Sonstige Materialien

Datenverarbeitung	R-Biopharm AG, Ridawin
Dialyseschlauch	Serva Electrophoresis GmbH, 44104
Filter für Minisäulen	MoBiTec GmbH, M2290
Filterpapier (ø 125 mm)	GE Healthcare, 10311844
Mikrotiterplatten	Nunc GmbH, 439454
Minisäulen	MoBiTec GmbH, M1002
Mischgefäße (BMT-20-S Tube) mit Edelstahlkugeln	IKA, 3703200
Variable Pipetten, 0,5 - 10 µl, 10 - 100 µl, 100 - 1000 µl	Eppendorf
Zwölfkanalpipette 30 - 300 µl	Eppendorf

3.2 Methodik und Ergebnisse

3.2.1 Herstellung der Protein Konjugate

Chinolone wirken aufgrund ihres geringen Molekulargewichts per se nicht immunogen und müssen daher an ein Trägerprotein ausreichender Größe gekoppelt werden, um in Versuchstieren eine spezifische Immunantwort hervorrufen zu können. Daneben benötigt man für die Etablierung der EIAs markierte Antigene. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Chinolon-Antibiotika (CIP-ED, CLN, NOR) mit HRP markiert.

3.2.1.1 Carbodiimid-Methode

Die Immunogene wurden mittels Carbodiimid-Methode in Anlehnung an Bucknall et al. (2003) hergestellt. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf der Reaktion der sekundären Aminogruppen im Piperazinring des Norfloxacin mit Carboxylgruppen des Trägerproteins, Glucose-Oxidase (GlcOX), in Gegenwart von wasserlöslichem Carbodiimid. Zur Kopplung (**Abbildung 4**) wurden 5 mg Glucose-Oxidase (0,0313 μmol) in 2,5 ml PBS über Nacht gegen A.dest dialysiert, anschließend mit 1 mg Norfloxacin (3,13 μmol , gelöst in 500 μl Dimethylformamid) gemischt. Zu dieser Mischung wurde 7,2 mg EDC (37,6 μmol , gelöst in 500 μl PBS) gegeben und der Ansatz für 24 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurde der Ansatz für 3 Tage gegen 3x5 l PBS (pH 7,3) dialysiert.

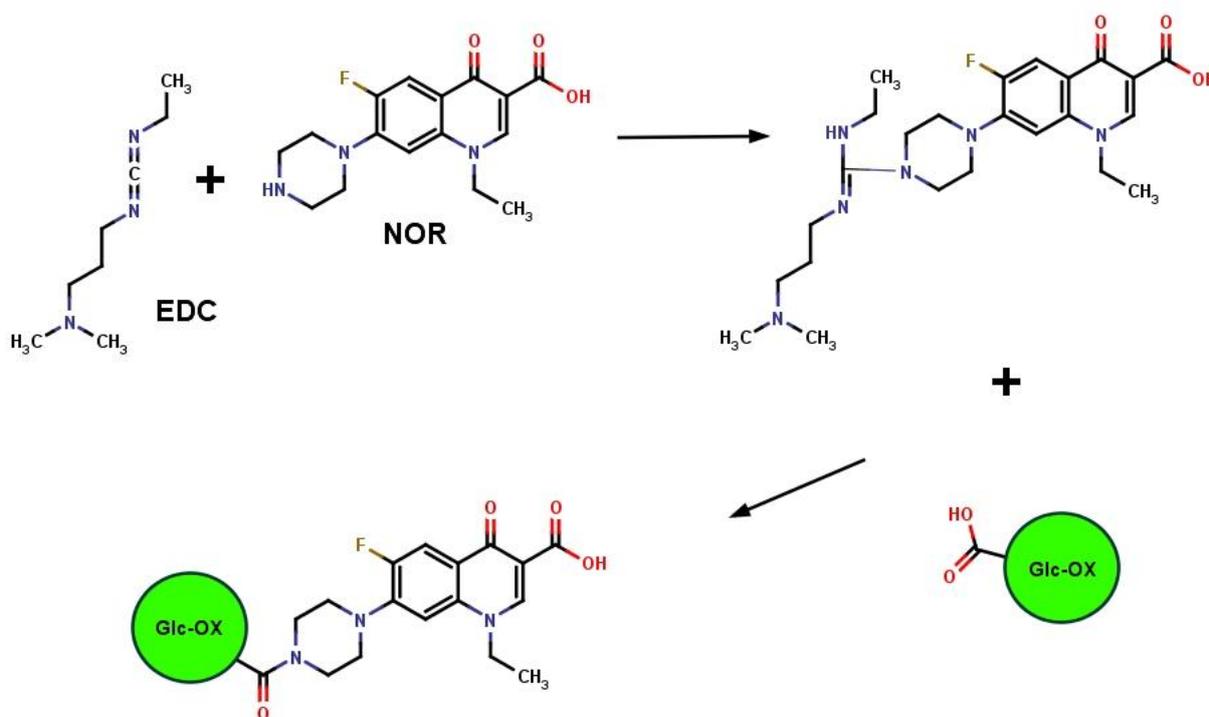


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Carbodiimid-Kopplungsverfahrens

3.2.1.2 Aktive Estermethode

Mit diesem Verfahren wurde Norfloxacin an HRP gebunden. Dazu wird im wasserfreien Medium durch Reaktion der Carboxylgruppe des Norfloxacins mit N-Hydroxysuccinimid unter Vermittlung von Dicyclohexylcarbodiimid ein Intermediärprodukt (aktiver Ester) gebildet. Danach kann Norfloxacin im wässrigen Medium unter Spaltung des Esters kovalent an die freien Aminogruppen des Proteins binden.

Norfloxacin, N-Hydroxysuccinimid und Dicyclohexylcarbodiimid wurden in einem molaren Verhältnis von 1:5:10 in Dimethylformamid gelöst und bei Raumtemperatur lichtgeschützt 16 h gerührt. Anschließend wurde der Ansatz zu einer HRP-Lösung (in 0,13 mol/l NaHCO₃) gegeben, zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und abschließend gegen 3 x 5 l PBS dialysiert.

3.2.1.3 Perjodat-Methode

Zur Herstellung eines heterologen, Peroxidase-markierten Antigens (**Abbildung 5**) wurde Clinafloxacin (3,6 mg, 8,95 µmol) in Bicarbonatpuffer (pH 9,6) unter leichtem Erwärmen gelöst und mit aktivierter HRP (8 mg, 0,2 µmol; gelöst in 0,5 ml A. dest) versetzt, wobei der pH-Wert der Mischung mit 0,5 mol/l Na₂CO₃ auf 9,5 bis 9,8 eingestellt wurde. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde 200 µl Triethanolamin-Lösung, sowie zur Reduktion der Schiffschen Basen 250 µl Natriumborhydrid-Lösung hinzugefügt. Nach der Inkubation (30 min bei 4 °C) wurde erneut 100 µl Triethanolamin-Lösung zum Ansatz hinzugegeben und weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde 50 µl Glycin-Lösung zugegeben und der Ansatz unmittelbar gegen 3 x 5 l PBS (pH 7,3) mit Zusatz von Glycin dialysiert.

Die Kopplung von CIP-ED an HRP erfolgte ebenfalls mittels Perjodat-Methode (Pj), wie von Gärtner (2006) beschrieben.

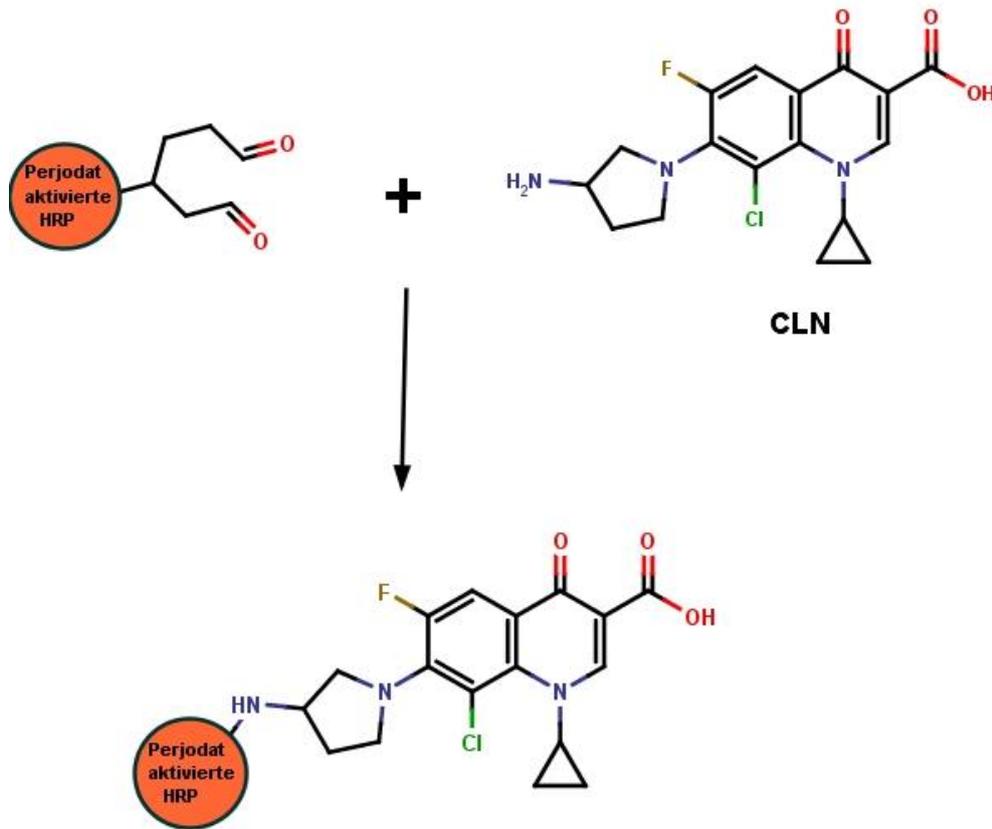


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Perjodat-Kopplungsverfahrens

3.2.1.4 Überprüfung der Konjugate

Die Effizienz der Kopplung der Chinolon-Antibiotika an GlcOX bzw. HRP wurde spektrophotometrisch überprüft. Da die Absorptionsmaxima von Norfloxacin (227, 281 und 319 nm) zum Teil mit denen des Trägerproteins überlappten - dies gilt insbesondere für den Hauptpeak bei 281 nm -, konnte die Kopplungsrate nicht quantitativ bestimmt werden. Bei Vergleich des Spektrums des Protein-Konjugates mit denen der Ausgangssubstanzen (**Abbildung 6**) fällt auf, dass das Konjugat im Gegensatz zum Originärprotein im Spektrumbereich von 310 - 350 nm eine Absorption aufweist, ein eindeutiger Peak wie bei Norfloxacin zeigte sich aber nicht. Es ist aber nicht auszuschließen, dass sich durch die Kopplung an den Piperazin-Ring die spektralen Eigenschaften des Antibiotikums verändert haben.

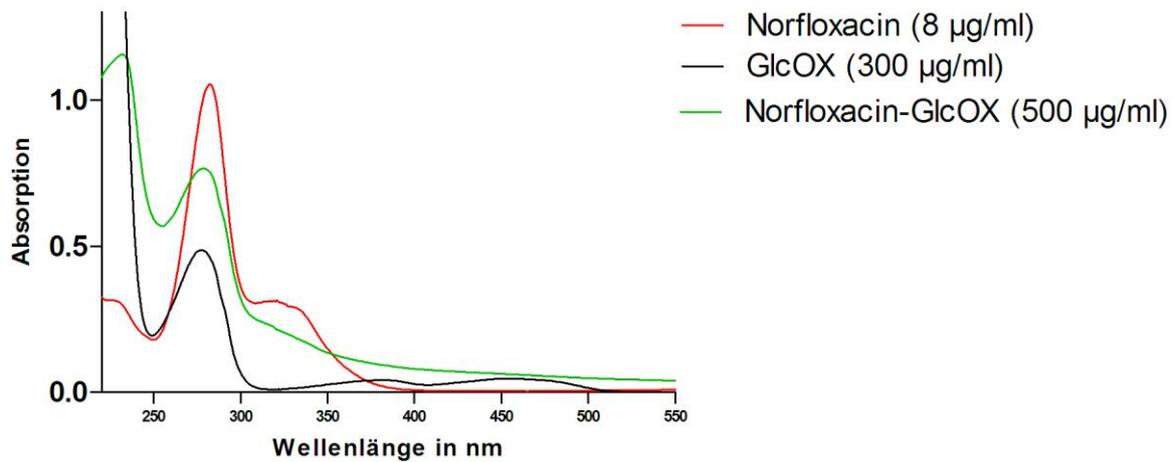


Abbildung 6: UV-Spektren von Norfloxacin-GlcOX-Konjugat bzw. nicht konjugierten Ausgangssubstanzen.

Beim Peroxidase-Konjugat von Clinafloxacin konnte hingegen spektrophotometrisch eindeutig die erfolgreiche Kopplung bestätigt werden. Bei annähernd gleicher Ausgangskonzentration des HRP bzw. CLN-Konjugates (siehe Peak bei 403 nm in **Abbildung 7**) wies das Konjugat bei 288 nm ein ausgeprägtes Absorptionsmaximum auf, sowie einen flachen Peak bei 354 nm. Beide Maxima sind auch beim freien Clinafloxacin, allerdings bei etwas unterschiedlichen Wellenlängen, nämlich 294 und 345 nm, zu finden.

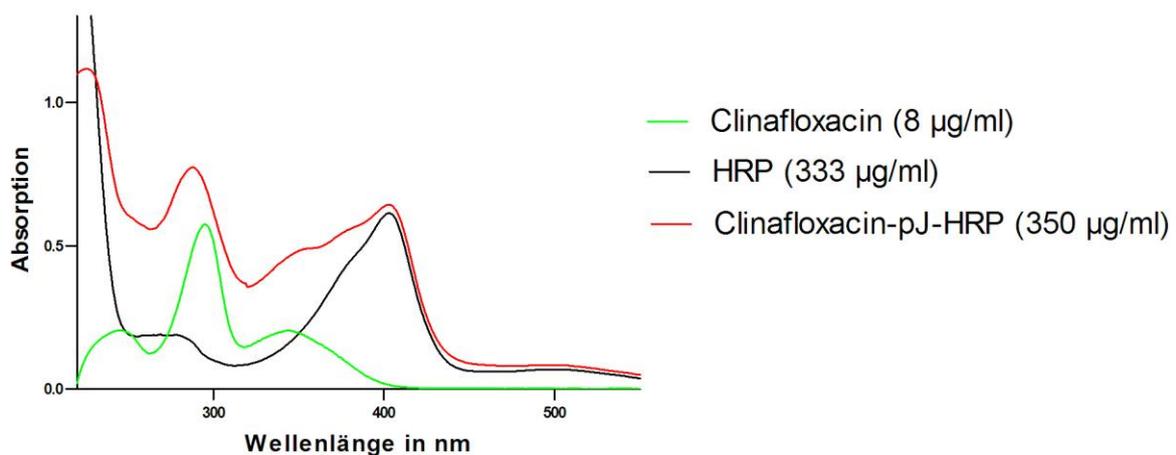


Abbildung 7: UV-Spektren von Clinafloxacin-Konjugat bzw. nicht konjugierten Ausgangssubstanzen.

3.2.2 Immunisierung

Zur Immunisierung von sechs weiblichen Mäusen im Alter von ca. 20 Wochen [(Balb/c und ein Hybridstamm Balb/c x (NZB x NZW)] wurde das in 3.2.1.1 beschriebene NOR-GlcOX-Konjugat verwendet. Hierzu wurden 300 µg des Immunogens in 0,6 ml PBS im Verhältnis 1:2 mit Freund'schen Adjuvans emulgiert und jeder Maus von der Präparation 300 µl intraperitoneal injiziert. Eine Restimulierung mit 50 µg Immunogen bei identischer Zubereitung erfolgte in der 14. Woche nach der Erstimmunisierung. Die Mäuse mit dem höchsten Serumtiter und der höchsten Sensitivität für freies Antigen wurden für die Zellfusion ausgewählt und drei Tage vor der Fusion erneut mit 75 µg Immunogen (in 300 µl PBS) intraperitoneal restimuliert.

3.2.3 Immunisierungsverlauf

Zur Überprüfung des Immunisierungserfolges wurde den Mäusen nach Grundimmunisierung und Restimulierung Blut abgenommen und mittels einer „Double Antibody Solid Phase“ (DASP)-Technik wurden die spezifischen Antikörpertiter, sowie die relative Reaktivität der nachweisbaren Antikörper mit freiem Antigen ermittelt. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit Kaninchen-Anti-Maus-IgG in einer Konzentration von 5 µg/ml in Bicarbonatpuffer beschichtet (100 µl/Kavität) und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ausschlagen der Platte wurden unbesetzte Bindungsstellen mit 3 % Casein/PBS-Lösung (150 µl/Kavität) 30 min abgesättigt. Daraufhin wurden serielle Verdünnungsreihen (in PBS, pH 7,3) der zu testenden Antiseren 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Platten gewaschen, ausgeschlagen und die enzymmarkierten Antigene (50 µl/Kavität) simultan mit 50 µl PBS bzw. Ciprofloxacin in PBS hinzugefügt und wiederum 1 h inkubiert. Abschließend wurden die Platten gewaschen und die Substrat/Chromogen-Lösung (100 µl/Kavität) zugegeben. Die Umsetzungsreaktion wurde nach 20 min mit 1 mol/l Schwefelsäure gestoppt und die Extinktion bei 450 nm gemessen. Die Serumverdünnung, die unter diesen Reaktionsbedingungen einen Extinktionswert von 1 ergab, wurde als Titer definiert.

In den Seren aller immunisierten Mäuse konnten spezifische Antikörper nachgewiesen werden, die Titer nach der Grundimmunisierung lagen im Bereich von 1:8.000 bis 1:250.000 d.h. die verwendeten NOR-GlcOX Konjugate erwiesen sich als hoch immunogen. Zur

Kontrolle der Reaktivität der gewonnenen Seren mit freiem Antibiotikum wurde Ciprofloxacin in einer Konzentration von 10 ng/ml in den oben beschriebenen EIA eingesetzt. Die dadurch resultierenden Hemmungen der Signalintensitäten lagen zwischen 10 % und 55 % (Ergebnisse nicht dargestellt) und bestätigten, dass mit dem Konjugat Chinolon-spezifische Antikörper in Mäusen induziert werden können. Nach der Restimulierung der Mäuse wurde bei fast allen Mäusen ein moderater bis hoher Titeranstieg beobachtet; die höchsten Werte (1:280.000) wurden bei Maus V erreicht (**Abbildung 8**). Im Hinblick auf die Sensitivität der induzierten Antikörper konnte im Verlauf der Immunisierung eine deutliche Steigerung beobachtet werden. Die Seren von Maus I, II und V wurden genauer im Hinblick auf Sensitivität und Spezifität charakterisiert. Dazu wurden mittels Schachbrettitration die optimale Kombination der beiden Immunoreagenzien, nämlich spezifische Antiseren und Peroxidase-markiertes Chinolon-Antibiotikum, ermittelt. Prinzipiell zeigten nach der Restimulierung alle drei Seren sehr gute 50 %-Werte zwischen 0,04 und 0,18 ng/ml für freies Norfloxacin. Auch alle weiteren 15 getesteten Chinolone darunter die acht mit einem MRL-belegten Chinolone, sowie weitere Verbindungen, die die Heterogenität der verschiedenen Chinolone repräsentieren, konnten mit den gewonnen Seren sensitiv nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Bezüglich Spezifität der Seren wurden somit die Erwartungen erfüllt, die gewonnenen Seren zeigten die gewünschten Kreuzreaktivitäten mit den MRL-belegten Chinolonen.

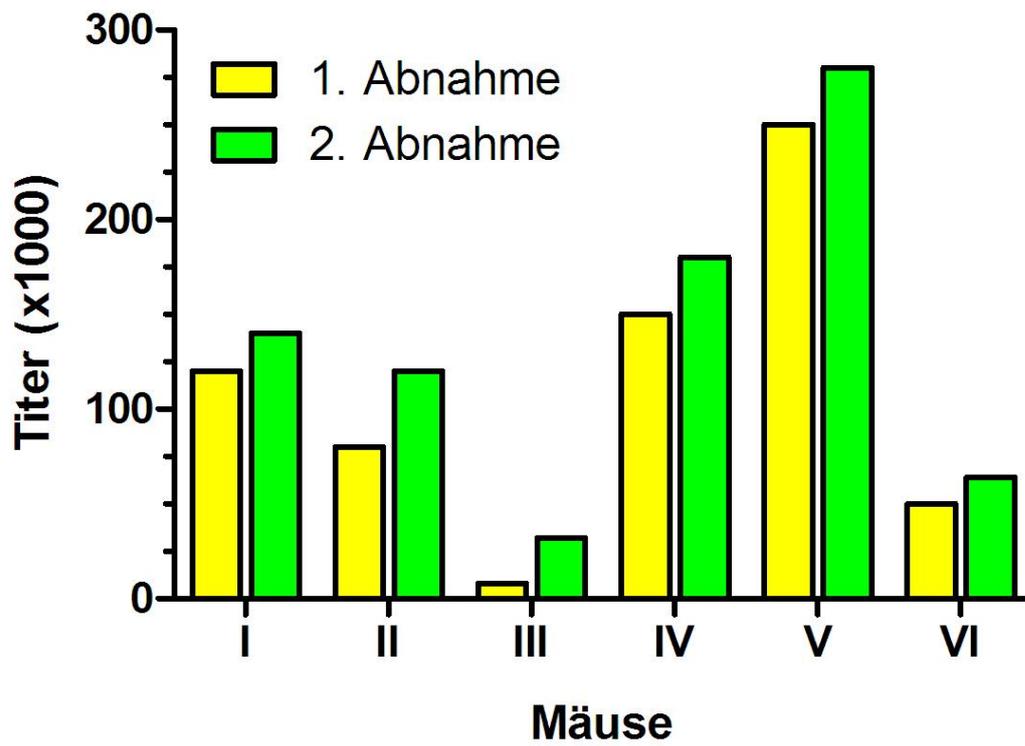


Abbildung 8: Mittels EIA nachweisbare Antikörper-Titer in den mit NOR-GlcOX immunisierten Mäusen

3.2.4 Generierung monoklonaler Antikörper

Die Herstellung der mAk wurde wie von Bremus et al. (2012) beschrieben, durchgeführt. Dazu wurden Einzelzellsuspensionen der Milzen mit Myelom-Zellen (X63-Ag8.653) unter Verwendung von Polyethylenglycol 1500 fusioniert. Zwölf Tage nach der Fusion wurden Kulturüberstände auf die Anwesenheit von Chinolon-spezifischen Antikörpern in einem nicht kompetitiven direkten EIA untersucht. Positiv reagierende Klone wurden selektiert und nachfolgend mindestens dreimal kloniert. Schlussendlich konnte zum Nachweis der Chinolone von Maus II eine stabile Hybridomzelllinie, 5H8, etabliert werden. Der gewonnene mAk wurde in einem Mini-Perm Bioreaktor massenproduziert und anschließend mittels Affinitätschromatographie über Protein-A-Säulen gereinigt.

3.2.5 Etablierung kompetitiver Enzymimmuntests zum Nachweis von Chinolonen

3.2.5.1 Auswahl der geeigneten Enzyme-Konjugate

Die optimale Konzentration der Immunreagenzien wurde durch Schachbretttitration ermittelt, bei der die mAk gegen HRP-markierte Antigene zweidimensional titriert werden. Die Enzym-Konjugate wurden unter kompetitiven Bedingungen im Parallelansatz einmal mit PBS bzw. mit Norfloxacin (in PBS) inkubiert. Die besten Kombinationen bei denen Extinktionswerte zwischen 1,0 - 1,5 erreicht wurden und gleichzeitig die größten Extinktionsunterschiede zwischen Norfloxacin-haltigem und Norfloxacin-freiem Ansatz gemessen wurden, wurden für die weiteren Versuche ausgewählt.

Zur Optimierung des enzymimmunologischen Nachweises wurde in einem ersten Schritt der Einfluss verschiedener Chinolon-HRP Konjugate (3.2.2.1 und 3.2.2.3) auf die Sensitivität des Testverfahrens überprüft.

Nach Erstellung von Standardkurven im Vierfachansatz zeigte sich, dass mit dem Hapten-heterologen Clinafloxacin-Pj-HRP die höchste Sensitivität (Tabelle 8 bzw. Abbildung 9) erreicht werden kann. Im Vergleich zum homologen Peroxidase-Konjugat (NOR-HRP) konnte eine Sensitivitätssteigerung um ca. Faktor 7 beobachtet werden.

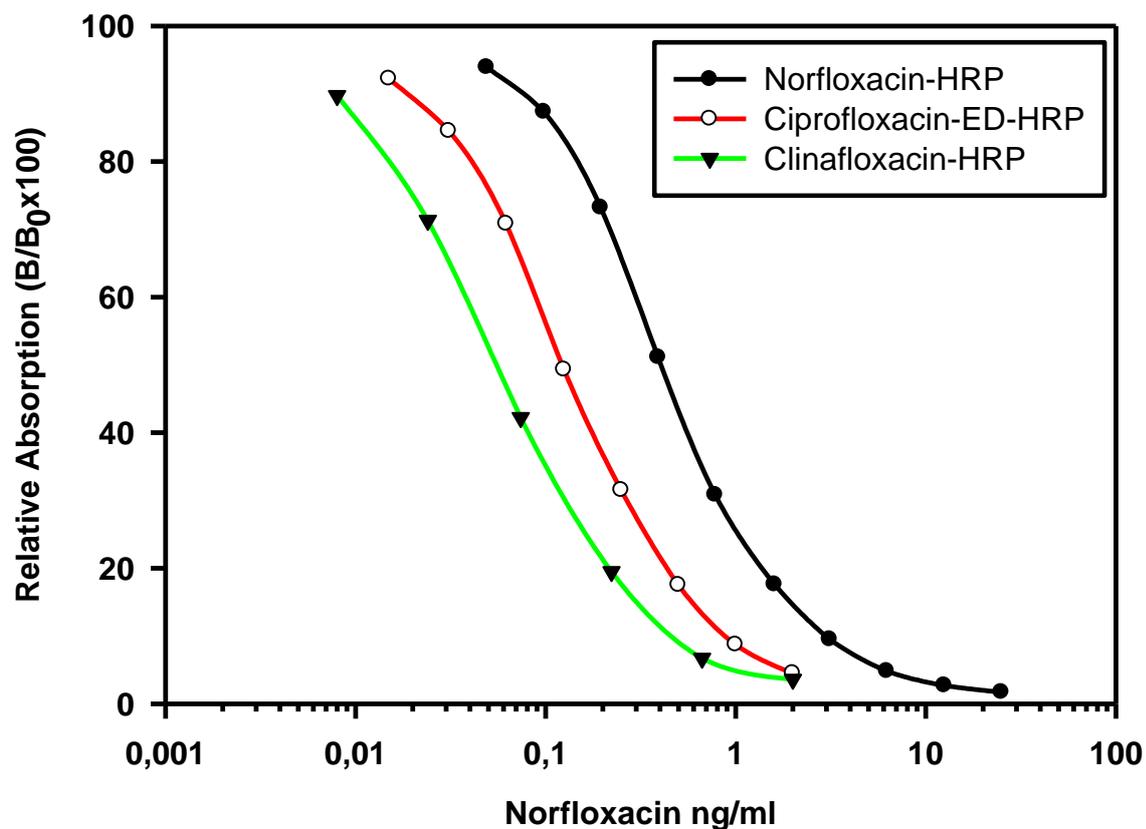


Abbildung 9: Einfluss verschiedener Chinolon-HRP Konjugate auf die Empfindlichkeit des direkten EIA

Tabelle 8: EIA-Charakteristika bei Einsatz verschiedener HRP-Konjugate

mAk 5H8 (ng/ml)	HRP Konjugat (Verdünnung)	Absorption ¹	IC ₅₀ (pg NOR/ml)
250	NOR-aE-HRP (1:8.000)	1,016	404
30	CIP-ED-HRP (1:25.000)	1,045	122
20	CL-Pj-HRP (1:80.000)	1,410	60

¹Absorption des antigenfreien Kontrollansatzes

3.2.5.2 Untersuchungen zur Spezifität des monoklonalen Antikörpers

Zur Überprüfung der Spezifität des gewonnenen mAK gegen Chinolon-Antibiotika wurde der EIA unter folgenden optimierten Bedingungen durchgeführt, wobei die „Double Antibody Solid Phase“ (DASP)-Technik verwendet wurde (**Abbildung 10**). Hierzu wurden Mikrotiterplatten mit Kaninchen anti-Maus-IgG beschichtet (5 µg/ml Bicarbonatpuffer; 100 µl/Kavität) und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden mit 150 µl einer 3 % igen Casein/PBS-Lösung abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen wurde der mAk (20 ng/ml in PBS) zugegeben (100 µl/Kavität) und eine Stunde inkubiert. Danach folgte ein weiterer Waschschrift, anschließend wurden pro Kavität 50 µl Standard- bzw. Probenlösung, sowie 50 µl Clinafloxacin-HRP-Konjugat (CLN-HRP) in einer Verdünnung von 1:80.000 in 1 % Casein/PBS zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurde wiederum gewaschen und abschließend Substrat/Chromogen-Lösung hinzugefügt, die Farbentwicklung nach ca. 20 min mit 1 mol/l Schwefelsäure gestoppt und die Absorption bei 450 nm gemessen. Standardlösungen und Proben wurden im Vierfach-Ansatz eingesetzt. Die Sensitivität des Testsystems wurde anhand der 50 %-Hemmdosis (IC₅₀) bestimmt, d.h. die Chinolon-Antibiotika Konzentration, die unter kompetitiven Testbedingungen in einer um 50 % reduzierten Bindung des enzymmarkierten Antigens (CLN-HRP) an mAk 5H8 resultiert. Der Bereich zwischen 10 % und 70 % (B/B₀ x 100) entspricht dem linearen Bereich der Standardkurven und stellt somit den Arbeitsbereich des EIA-Systems dar. Die IC₃₀ wurde als Nachweisgrenze (NWG) der Enzymimmuntests definiert. Insgesamt 30 Chinolon-Antibiotika und das die Chinolin-Ringstruktur enthaltende Clioquinol wurden mit dem gewonnenen Antikörper getestet. Für jedes einzelne Antibiotikum wurden Standardkurven erstellt und ihre relativen Kreuzreaktivitäten zu Norfloxacin auf molarer Basis mit der unten dargestellten Formel berechnet.

$$\text{relative Kreuzreaktion (\%)} = \frac{\text{50 \% -Dosis Norfloxacin (in mol/l)}}{\text{50 \% -Dosis Testchinolone (in mol/l)}} \times 100$$

Der mAk war in der Lage alle getesteten 30 Chinolon-Antibiotika zu erkennen, die 50 %-Dosen lagen in einem Bereich von 0,05 ng/ml (Rufloxacin, Nadifloxacin) bis zu 72,3 ng/ml

(Pradofloxacin). Die unteren Nachweisgrenzen (IC_{30}) bewegten sich von 0,02 ng/ml (Rufloxacin, Nadifloxacin) bis zu 32,0 ng/ml (Pradofloxacin).

Clioquinol, das der heterozyklischen Grundstruktur der Chinolon-Antibiotika ähnelt, aber keine β -Ketocarbonsäure aufweist (Struktur siehe **Tabelle 12**), zeigte - wie erwartet - nur eine sehr geringe Kreuzreaktivität, die IC_{50} lag bei 9.640 ng/ml.

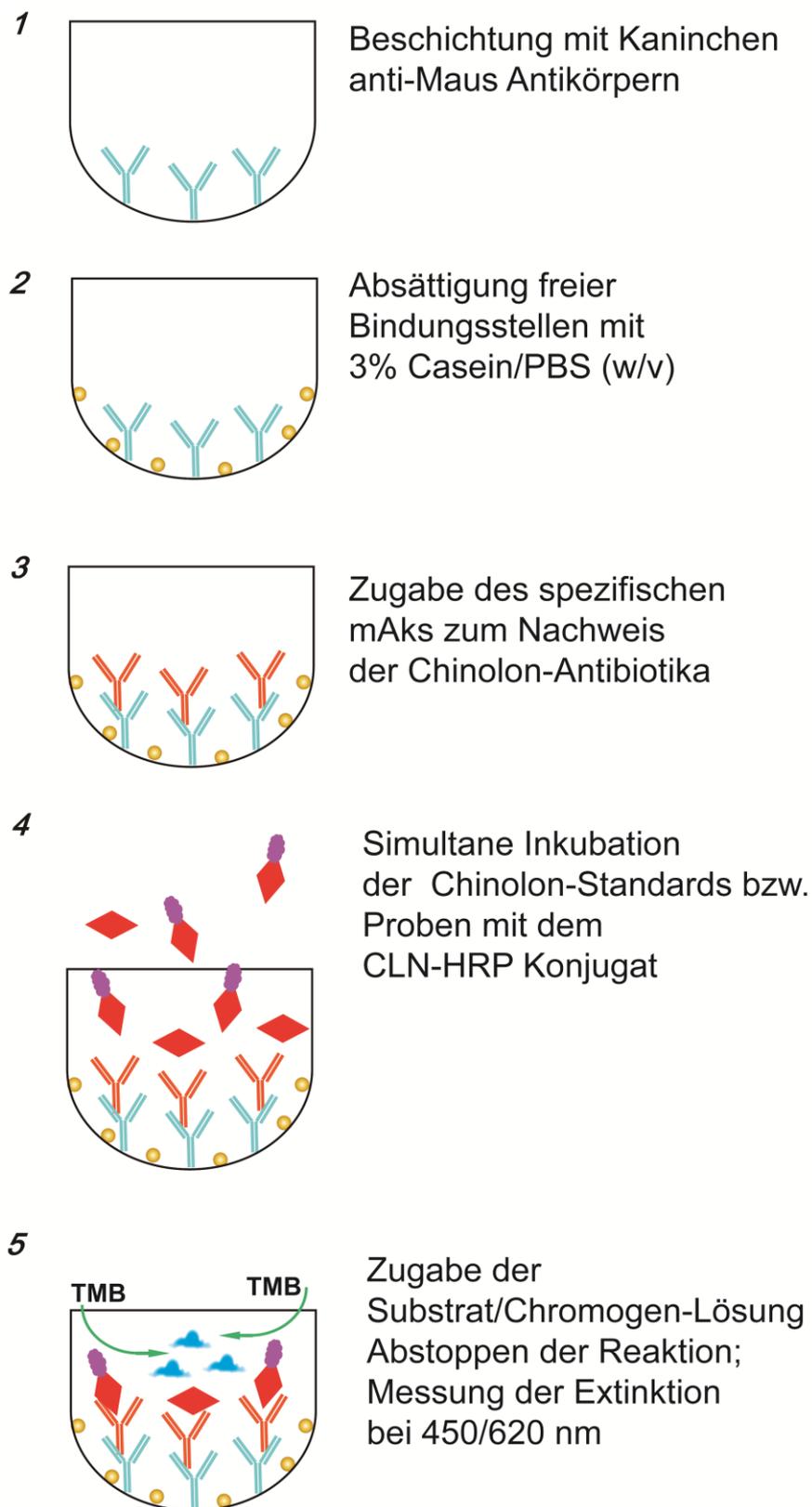


Abbildung 10: Schematische Darstellung des direkten EIA-Systems zum Nachweis von Chinolon-Antibiotika

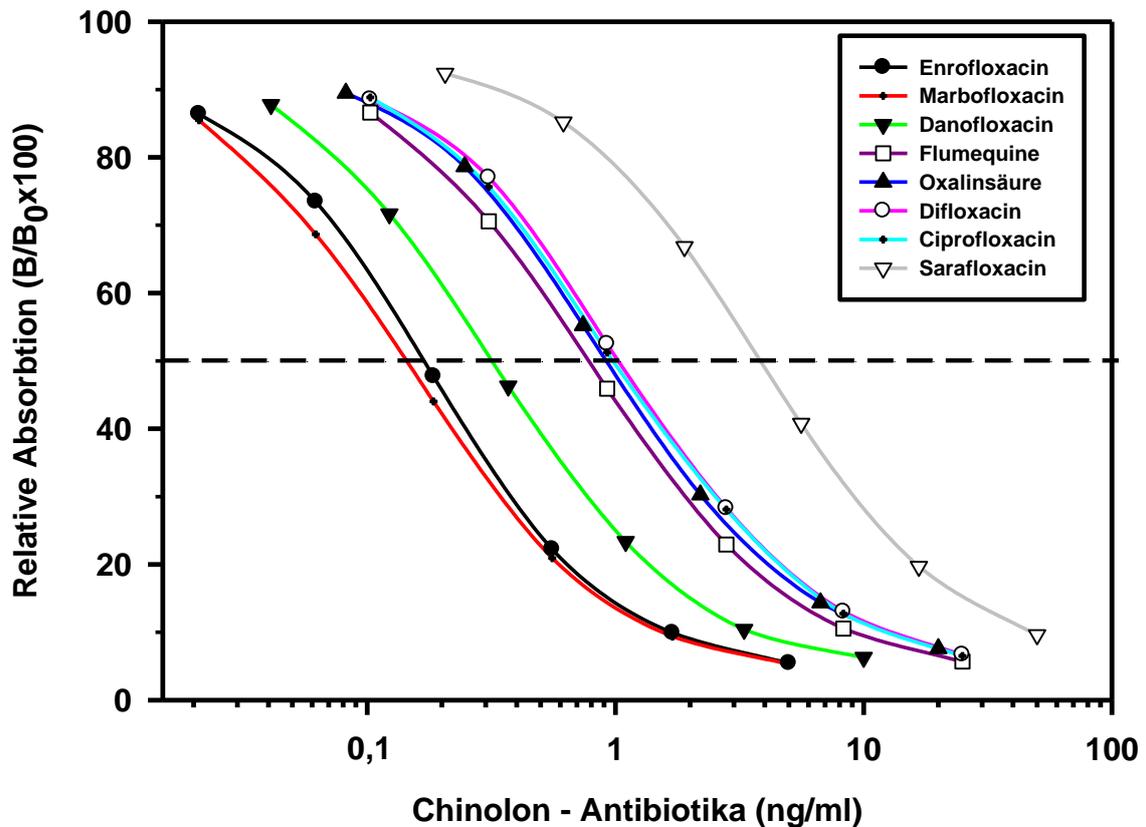


Abbildung 11: Standardkurven für den Nachweis von Chinolone-Antibiotika mit mAk 5H8

Wie eingangs erwähnt ist innerhalb der Europäischen Union eine ganze Reihe von Wirkstoffen aus der Gruppe der Chinolon-Antibiotika für die Behandlung lebensmittel liefernder Tiere zugelassen. Demzufolge wurden für diese Vertreter in der Verordnung 37/2010 Rückstandshöchstmengen (MRL) für verschiedene Lebensmittel festgelegt (**Tabelle 1**). Bei der Überprüfung des Spezifitätsmusters des generierten mAks standen daher zuallererst diese Wirkstoffe, nämlich Ciprofloxacin, Danofloxacin, Difloxacin, Enrofloxacin, Flumequin, Marbofloxacin, Oxolinsäure, Sarafloxacin im Vordergrund.

Mit dem hergestellten EIA-System können alle diese Hemmstoffe deutlich unterhalb der festgelegten Grenzwerte nachgewiesen werden: Die 50 %-Dosen lagen in einem Bereich von 0,16 ng/ml (Marbofloxacin) bis 3,82 ng/ml (Sarafloxacin), unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes betragen somit die relativen Kreuzreaktionen 42,6 % (Marbofloxacin)

bzw. 2,08 % (Sarafloxacin). Die Standardkurven sind in **Abbildung 11** dargestellt, die jeweiligen 50 %-Werte bzw. relativen Kreuzreaktionen (%) zusammen mit den Strukturformeln der jeweiligen Wirkstoffe sind in **Tabelle 9** zusammengefasst.

Im Gegensatz zu allen bislang publizierten mAk gegen Chinolon-Antibiotika zeigte der mAk 5H8 tatsächlich generische Eigenschaften. Vom Antikörper wurden sowohl Wirkstoffe der 1. Chinolon-Generation wie Flumequin und Oxolinsäure als auch Chinolone mit einen Fluorbenzol-Substituenten wie Sarafloxacin und Difloxacin erkannt. Mit Ausnahme von Sarafloxacin lagen bei allen MRL-regulierten Chinolon-Antibiotika die 50 %-Werte zudem unter 1 ng/ml.

Tabelle 9: Reaktivität des mAk 5H8 mit Chinolon-Antibiotika, die zur Behandlung von Lebensmittel-liefernden Tieren zugelassen sind.

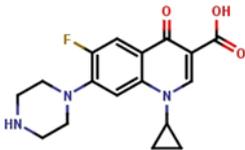
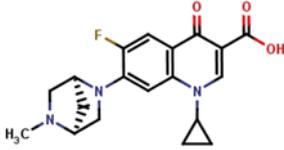
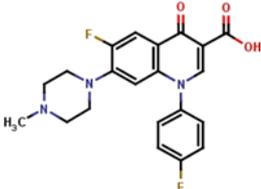
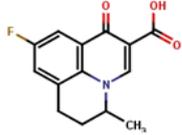
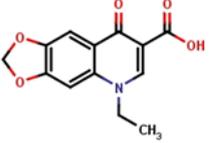
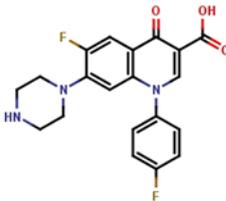
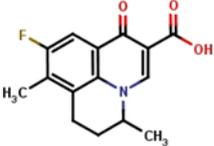
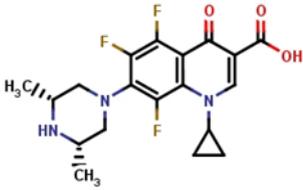
Chinolone	Strukturformel	IC ₅₀ , ng/ml	Relative Kreuzreaktion zu NOR (%)
Ciprofloxacin (2. Generation)		0,99	6,30
Danofloxacin		0,32	21,0
Difloxacin		0,97	8,44
Enrofloxacin		0,17	40,0
Flumequin (1. Generation)		0,74	6,63
Marbofloxacin		0,16	42,6
Oxolinsäure (1. Generation)		0,93	5,28
Sarafloxacin		3,82	2,08

Tabelle 10: Reaktivität des mAk 5H8 mit Chinolon-Antibiotika, die in der Tiermedizin zur Behandlung von Klein-/Heimtieren eingesetzt werden.

Chinolone	Strukturformel	IC ₅₀ , ng/ml	Relative Kreuzreaktion zu NOR (%)
Ibafloxacin		0,20	25,9
Orbifloxacin		7,67	0,97
Pradofloxacin		72,3	0,10

Neben den in der VO 37/2010 aufgeführten Chinolon-Antibiotika werden in der Veterinärmedizin auch andere Wirkstoffe (Ibafloxacin, Orbifloxacin, Pradofloxacin) bei der Behandlung von Klein- und Heimtieren eingesetzt, wobei die Zulassung von Ibafloxacin 2012 nicht erneuert wurde. Diese Antibiotika sind mit dem mAk in einem Bereich von 0,20 ng/ml (Ibafloxacin) bis 72,3 ng/ml (Pradofloxacin) detektierbar, wobei die relativen Kreuzreaktionen zwischen 25,9 % (Ibafloxacin) und 0,1 % (Pradofloxacin) lagen. Die entsprechenden Standardkurven sind in **Abbildung 12** dargestellt, die jeweiligen 50 %-Werte bzw. relativen Kreuzreaktionen (%), sowie Strukturformeln der Verbindungen sind in **Tabelle 10** zusammengestellt. Von allen untersuchten Chinolon-Antibiotika zeigte Pradofloxacin die geringste Reaktivität. Die quantitativen Angaben sind allerdings unter Vorbehalt zu sehen, da Pradofloxacin nicht als Reinsubstanz erhältlich ist und deswegen für die Analysen aus einem veterinärmedizinischen Präparat (Veraflox für Hunde und Katzen, 15 mg) extrahiert werden musste.

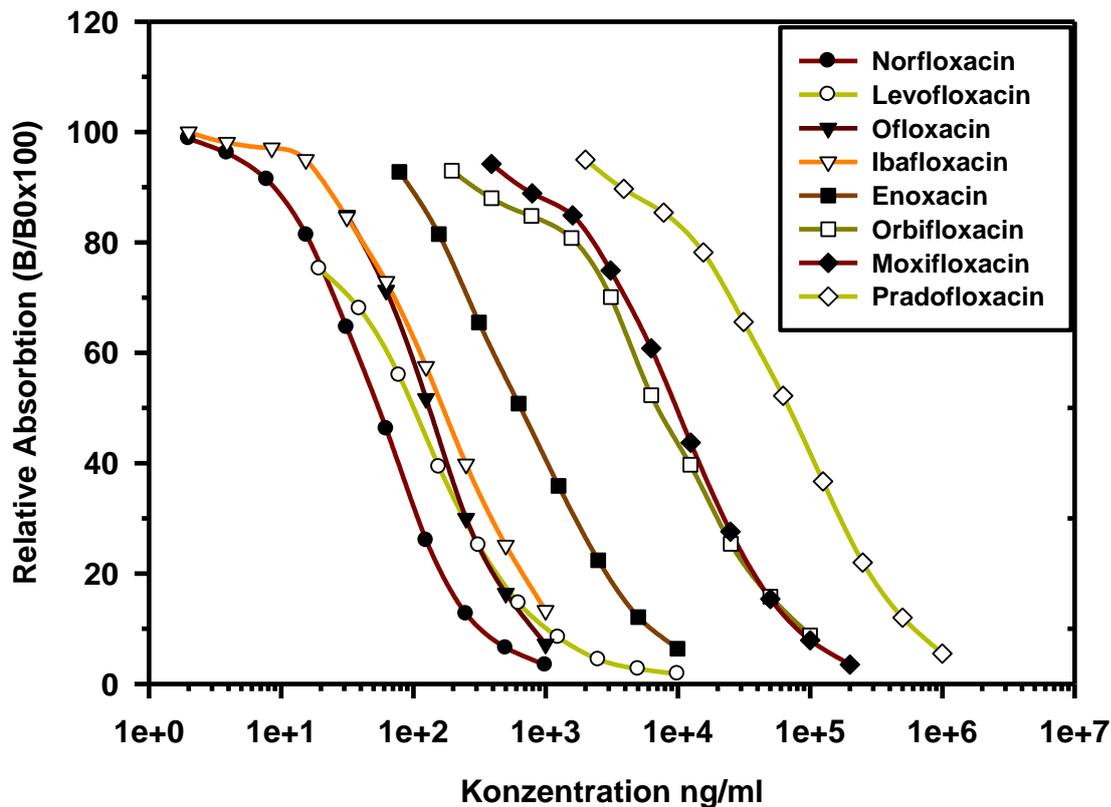


Abbildung 12: Standardkurven der in Humanmedizin bzw. Tiermedizin eingesetzten Chinolone

Zur weiteren Abklärung des Spezifitätsmusters des mAk wurde auch die Reaktivität aller lt. "Roter Liste" derzeit in der Humanmedizin eingesetzten Chinolon-Antibiotika (Ciprofloxacin, Enoxacin, Levofloxacin, Moxifloxacin, Norfloxacin, Ofloxacin) überprüft. Auch hier konnten alle Verbindungen mit dem mAk nachgewiesen werden (**Tabelle 11**). Neben den als Immunogen eingesetzten NOR zeigte der mAk auch für Levofloxacin und Ofloxacin eine sehr hohe Affinität, die Nachweisgrenzen lagen hierbei unter 0,1 ng/ml (**Abbildung 12**). Auch Enoxacin, dessen Grundgerüst sich im Gegensatz zu den der meisten anderen Chinolon-Antibiotika von Naphthyridin ableitet, konnte mit hoher Sensitivität (IC_{50} 0,74 ng/ml) nachgewiesen werden. Insgesamt lag der 50 %-Dosisbereich zwischen 0,06 ng/ml (Norfloxacin) und 11,6 ng/ml (Moxifloxacin), wobei die relativen Kreuzreaktionen 100 % (Norfloxacin) und 0,65 % (Moxifloxacin) betragen.

Tabelle 11: Reaktivität des mAk 5H8 mit Chinolon-Antibiotika, die derzeit in der Humanmedizin in Deutschland eingesetzt werden. Die Werte für Ciprofloxacin wurden bereits in **Tabelle 9** aufgeführt.

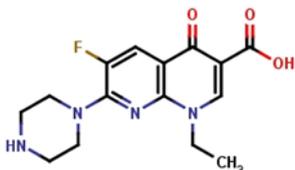
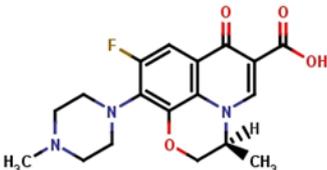
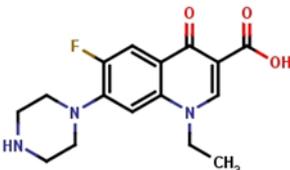
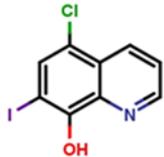
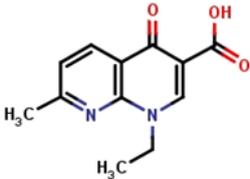
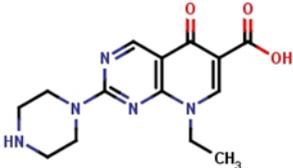
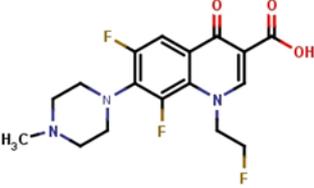
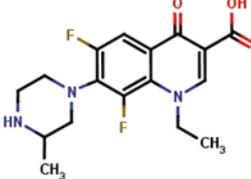
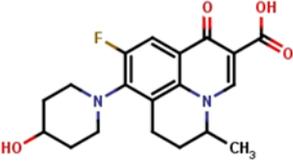
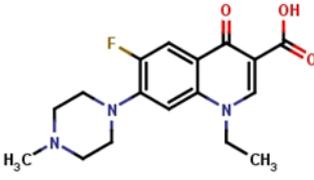
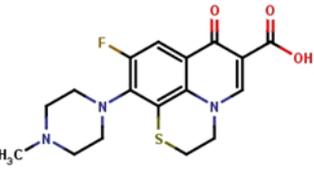
Chinolone	Strukturformel	IC ₅₀ , ng/ml	Relative Kreuzreaktion zu NOR (%)
Enoxacin (2. Generation)		0,74	8,13
Levofloxacin (3. Generation)		0,11	61,7
Moxifloxacin (4. Generation)		11,6	0,65
Norfloxacin (2. Generation)		0,06	100
Ofloxacin (2. Generation)		0,14	48,5

Tabelle 12: Kreuzreaktivität von Chinolonen der ersten Generation bzw. von Clioquinol mit dem mAk 5H8. Werte für Flumequin und Oxolinsäure sind in **Tabelle 9** aufgeführt.

Chinolone	Strukturformel	IC ₅₀ , ng/ml	Relative Kreuzreaktion zu NOR (%)
Clioquinol		9636	0,0006
Nalidixinsäure		26,8	0,16
Pipemidsäure		9,89	0,58

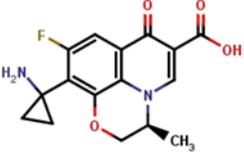
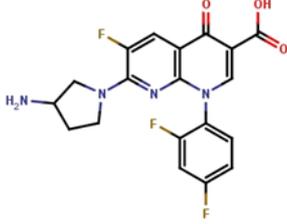
Da Chinolon-Antibiotika relativ einfach und kostengünstig chemisch synthetisiert werden können, ist v.a. bei aus Asien importierten Lebensmitteln ein illegaler Einsatz von „unüblichen“ Wirkstoffen nicht auszuschließen. Daher wurde im Rahmen der Arbeit auch die Reaktivität des mAk mit anderen strukturell heterogenen Vertretern dieser Antibiotika-Klasse überprüft. Die erhaltenen Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt, wobei die überprüften Chinolone den in 2.1 beschriebenen 4 Wirkstoffgenerationen zugeordnet wurden. Die ab 1962 entwickelten Chinolon-Antibiotika der ersten Generation wurden in einem Bereich von 0,74 ng/ml (Flumequin) bis 26,8 ng/ml (Nalidixinsäure) nachgewiesen (**Tabelle 12**), die relativen Kreuzreaktionen betragen zwischen 6,63 % (Flumequin) und 0,16 % (Nalidixinsäure). Da die Werte von Flumequin und Oxolinsäure bereits bei den mit einem MRL belegten Chinolonen präsentiert wurden, sind sie hier nicht erneut wiedergegeben.

Tabelle 13: Kreuzreaktivität von Chinolonen der zweiten Generation mit dem mAk 5H8

Chinolone	Strukturformel	IC ₅₀ , ng/ml	Relative Kreuzreaktion zu NOR (%)
Fleroxacin		1,25	5,55
Lomefloxacin		0,91	8,01
Nadifloxacin		0,05	135
Pefloxacin		0,10	87,5
Rufloxacin		0,05	150

Die im Gegensatz zu Chinolonen der ersten Generation zum Großteil auch systemisch einsetzbaren, überprüften Chinolone der zweiten Generation wurden in einem Bereich von 0,05 ng/ml (Rufloxacin) bis 1,25 ng/ml (Fleroxacin) nachgewiesen. Der mAk zeigte insbesondere für Nadifloxacin und Rufloxacin eine sehr hohe Affinität, die sogar höher lag als die für das als Immunogen eingesetzte Norfloxacin. Beide Verbindungen weisen einen Piperazin-Substituenten an C-7 und eine zusätzliche Ringstruktur zwischen N-1 und C-8 auf. Insgesamt lagen die relativen Kreuzreaktionen zwischen 150 % (Rufloxacin) und 5,55 % (Fleroxacin). Die einzelnen 50 %-Werte bzw. Kreuzreaktionen (%) sowie die chemischen

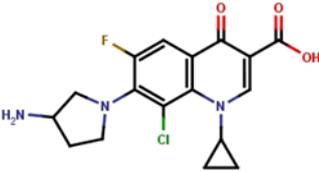
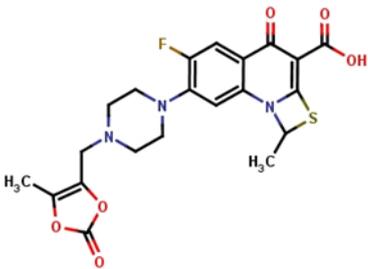
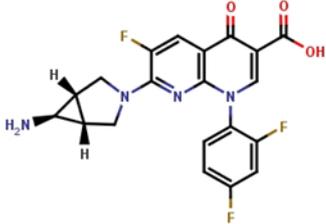
Tabelle 14: Kreuzreaktivität von Chinolonen der dritten Generation mit dem mAk 5H8

Chinolone	Strukturformel	IC ₅₀ , ng/ml	Relative Kreuzreaktion zu NOR (%)
Pazufloxacin		0,60	9,97
Sparfloxacin		40,1	0,18
Tosufloxacin		47,1	0,23

Strukturformeln sind in **Tabelle 13** aufgeführt. Angaben für weitere Vertreter der zweiten Generation wie Ciprofloxacin, Enoxacin, Norfloxacin und Ofloxacin sind in der **Tabelle 9** und **Tabelle 11** aufgeführt.

Mit der dritten Generation der Chinolone (**siehe auch Tabelle 9 und Tabelle 11**) erweiterte sich die Einsatzmöglichkeit auf Grampositive Erreger wie Pneumokokken und Streptokokken. Chinolon-Antibiotika dieser Generation konnten mit dem entwickelten mAk in einem Bereich von 0,11 ng/ml (Levofloxacin) bis 47,1 ng/ml (Tosufloxacin) nachgewiesen werden. Bei den Kreuzreaktionen wurden Werte zwischen 61,7 % (Levofloxacin; **Tabelle 11**) und 0,23 % (Tosufloxacin) ermittelt (**Tabelle 14**).

Tabelle 15: Strukturformeln von Chinolonen der vierten Generation mit dem mAk 5H8

Chinolone	Strukturformel	IC ₅₀ , ng/ml	Relative Kreuzreaktion zu NOR (%)
Clinafloxacin		2,29	3,30
Gatifloxacin		31,3	0,20
Prulifloxacin		55,4	0,16
Trovafloxacin		4,60	2,09

Die Entwicklung der vierten Generation erweiterte das Spektrum der mit Chinolonen behandelbaren Erkrankungen um durch anaerobe Erreger hervorgerufene Infektionen. Die getesteten Vertreter dieser Generation wurden in einem Bereich von 2,29 ng/ml (Clinafloxacin) bis 55,4 ng/ml (Prulifloxacin) detektiert, wobei die relativen Kreuzreaktionen zwischen 61,7 % (Clinafloxacin) und 0,23 % (Prulifloxacin) lagen (**Tabelle 15**). Die Daten für Moxifloxacin, ein in der Humanmedizin eingesetzter Wirkstoff, sind in **Tabelle 11** aufgeführt.

3.2.6 Anwendung des EIA- Verfahrens zum Nachweis von Chinolonen in künstlich und natürlich kontaminierten Lebensmitteln

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit des entwickelten EIA-Systems zum Nachweis von Chinolon-Antibiotika in Lebensmittelmatrices, für die in der VO 37/2010 Höchstmenge festgelegt sind, wurden für Milch- und Rindfleischproben, sowie aus Aquakultur stammenden Lachsfischen und Garnelen Probenvorbereitungsverfahren entwickelt und anhand von künstlich kontaminierten Proben überprüft. Zur Validierung des Verfahrens standen zudem einige Hemmstoff-positive Fleischproben zur Verfügung.

3.2.6.1 Untersuchung von Milchproben

Um unspezifische Einflüsse der Probenmatrix auf das Testsystem zu vermeiden, wurden die Standardkurven in rekonstituiertem, Chinolonantibiotika-freiem Magermilchpulver angesetzt. Dazu wurden 10 g Magermilchpulver in 100 ml A.dest. unter leichtem Erwärmen und Rühren gelöst und als Verdünnungspuffer für die Standards bzw. Proben verwendet.

Die Durchführung des kompetitiven EIA erfolgte identisch wie in 3.2.5.2 beschrieben, wobei bei Verwendung des rekonstituierten Magermilchpulvers mittels Schachbrett-titration (3.2.5.1) als optimale Konzentration der Immunreagenzien 20 ng/ml (mAk) bzw. eine Verdünnung von 1:70000 des CLN-HRP Konjugates in Vorversuchen ermittelt wurden. Mit diesem EIA-Verfahren wurden künstlich kontaminierte Milchproben analysiert, dafür wurde Vollmilch (3,5 % Fettgehalt) mit den entsprechenden Chinolonen in Konzentrationen von 5 ng/ml, 10 ng/ml bzw. 20 ng/ml versetzt und anschließend durch Zentrifugieren (3000 x g, 15 min, 4 ° C) entfettet. Die so vorbereiteten Proben wurden direkt in den EIA eingesetzt bzw. es wurden zur quantitativen Bestimmung geeignete Verdünnungen der Proben in rekonstituiertem Magermilchpulver angelegt.

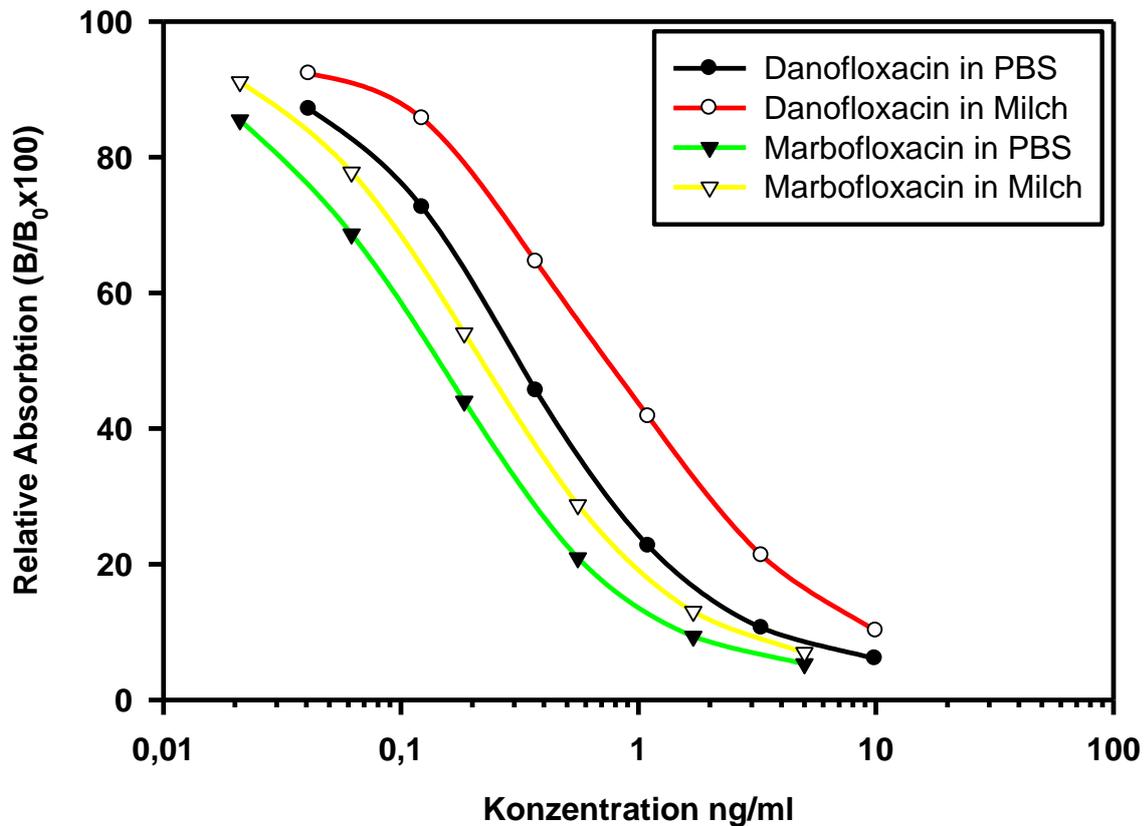


Abbildung 13: Vergleichende Darstellung von Standardkurven für Danofloxacin und Marbofloxacin in PBS bzw. rekonstituiertem Magermilchpulver

Tabelle 16 gibt einen Überblick zu den Charakteristika von Standardkurven für verschiedene Chinolone angelegt in PBS bzw. rekonstituiertem Magermilchpulver (10 % g/v). Abgesehen von Danofloxacin wurden für beide Verdünnungspuffer ähnliche Werte erhalten, insbesondere die 50 %-Dosen lagen eng beieinander. Die in Milchpulver angelegten Standardkurven für Danofloxacin (**Tabelle 13**) zeigten jedoch tendenziell einen flacheren Verlauf, sowie einen deutlich erhöhten IC_{50} -Wert (0,77 vs. 0,32 ng/ml). Prinzipiell war bei allen parallel getesteten Antibiotika für die in PBS angelegten Standardkurven eine bessere Reproduzierbarkeit zu beobachten: der durchschnittliche Variationskoeffizient bei den IC_{50} -Werten betrug für PBS 12,4 %, für Magermilch hingegen 23,1 %.

Tabelle 16: Vergleich der Charakteristika von Chinolon-Standardkurven angelegt in rekonstituiertem Milchpulver ($n \geq 6$) bzw. PBS ($n \geq 5$)

Parameter	Matrix	Ciprofloxacin	Danofloxacin	Enrofloxacin	Flumequin	Marbofloxacin
50 %-Dosis, ng/ml	Milch	1,23	0,77	0,26	0,52	0,22
	PBS	n.d.	0,32	0,17	0,74	0,16
Standardabweichung, ng/ml	Milch	0,35	0,19	0,06	0,11	0,05
	PBS	n.d.	0,07	0,02	0,09	0,01
Variationskoeffizient, %	Milch	28,1	24,9	22,6	21,2	23,8
	PBS	n.d.	20,9	10,9	12,1	5,83
Maximalwert, ng/ml	Milch	1,60	0,95	0,33	0,68	0,32
	PBS	n.d.	0,43	0,19	0,86	0,18
Minimalwert, ng/ml	Milch	0,69	0,43	0,17	0,44	0,18
	PBS	n.d.	0,25	0,15	0,60	0,15

¹ n.d, nicht durchgeführt

Die Wiederfindungsraten in Milchproben wurden für alle MRL-belegten und zur Behandlung von milchliefernden Tieren zugelassenen Chinolone bestimmt, die Ergebnisse sind in **Tabelle 17** zusammengestellt. Aufgrund der hohen Sensitivität des EIA-Verfahrens für diese Chinolone wurden die Analysen nicht auf MRL-Niveau, sondern im Bereich von 5 - 20 ng/ml durchgeführt. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate im überprüften Konzentrationsbereich lag bei 88,9 %, der Variationskoeffizient betrug 9,3 %. Für die Einzelsubstanzen lagen die durchschnittlichen Wiederfindungsraten bei 86,4 % (Ciprofloxacin), 92,3 % (Danofloxacin), 89,3 % (Enrofloxacin), 88,6 % (Flumequin) bzw. 88,0 % (Marbofloxacin), wobei die Variationskoeffizienten 11,7 % (Ciprofloxacin), 8,5 % (Danofloxacin), 9,6 % (Enrofloxacin) 9,5 % (Flumequin) bzw. 7,4 % (Marbofloxacin) betragen.

Tabelle 17: Wiederfindungsraten von Chinolonen in künstlich kontaminierten Milchproben
(n ≥ 4)

Antibiotika (MRL-Wert)	Zusatz (ng/ml)	Mittelwert (ng/ml)	s (ng/ml)	VK (%)	Wiederfindung (%)
Ciprofloxacin (100 ¹)	5	4,21	0,61	14,6	84,1
	10	8,96	0,99	11,1	89,6
	20	17,1	1,60	9,35	85,6
Danofloxacin (30)	5	4,63	0,46	9,85	92,5
	10	9,68	0,35	3,57	96,8
	20	17,5	2,13	12,2	87,6
Enrofloxacin (100 ¹)	5	4,92	0,43	8,64	98,5
	10	9,05	1,02	11,2	90,5
	20	15,8	1,41	8,96	78,8
Flumequin (50)	5	4,26	0,42	9,83	85,3
	10	9,36	0,81	8,62	93,6
	20	17,4	1,74	10,0	87,0
Marbofloxacin (75)	5	4,60	0,41	8,96	92,0
	10	8,83	0,79	8,92	88,3
	20	16,8	0,71	4,23	83,8

s: Standardabweichung; VK: Variationskoeffizient

¹Gesamtsumme von ENR und CIP

3.2.6.2 Untersuchung von Fleischproben

Als Probenmatrices wurden Rind-, Lachs- und Garnelenfleisch überprüft. Zur einfachen und schnellen Extraktion der Proben wurde ein Einweg-Homogenisiersystem (ULTRA-TURRAX® Tube Drive) verwendet; eingesetzt wurden hierbei verschließbare Probengefäße, die zur besseren Zerkleinerung der Proben Edelstahlkugeln enthielten. Proben von jeweils 2 g wurden mit 10 ml PBS (pH 7,3) versetzt und für 10 Sekunden (6000 rpm) homogenisiert. Das Homogenisat wurde dann zur Bestimmung der Wiederfindungsraten mit der halben, der einfachen und der doppelten Konzentration der jeweiligen MRL-Werte versetzt und erneut für 30 Sekunden homogenisiert. Anschließend wurden die Proben filtriert und die Extrakte direkt in den in 3.2.5.2 beschriebenen kompetitiven EIA eingesetzt. Die natürlich kontaminierten Proben wurden identisch behandelt. Als Verdünnungspuffer für die Standards bzw. der Extrakte wurde PBS (pH 7,3) verwendet.

Zur Ermittlung des Matrixeffektes von Chinolon-negativen Fleisch-, Lachs- und Garnelenproben auf den EIA wurden in Vorversuchen Chinolonfreie Proben wie oben beschrieben homogenisiert (entspricht einem Probenverdünnungsfaktor von 5) und in seriellen Verdünnungen in den EIA eingesetzt. Es zeigte sich, dass bei Lachs- und Garnelenproben nach einer 1:2 Verdünnung in PBS (Endverdünnung 1:10) im EIA keine Probenmatrices-Interferenzen auftraten, für Rindfleischproben war eine 1:3 Verdünnung nötig. Die bei der Untersuchung von mindestens 5 negativen Lachs-, Garnelen-, und Rindfleischproben im EIA erhaltenen relativen Extinktionswerte sind in **Abbildung 14** dargestellt, die Standardabweichungen lagen zwischen 3,78 % (Garnelen) und 7,33 % (Lachs).

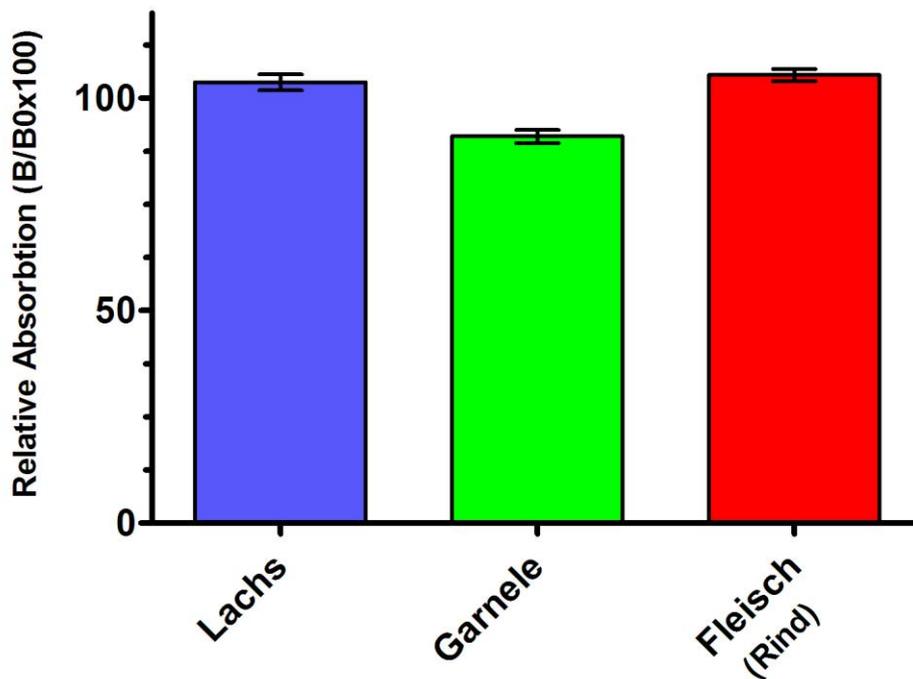


Abbildung 14: Relative EIA-Absorptionswerte nach Einsatz von Chinolon-freien Lachs-, Garnelen- und Fleischextrakten in den EIA

Für Rindfleischproben wurden die Wiederfindungsraten von vier Chinolonen nämlich Danofloxacin, Enrofloxacin, Marbofloxacin und Oxolinsäure bestimmt (**Tabelle 19**). Die durchschnittliche Wiederfindungsrate lag bei 76,2 %, der durchschnittliche Variationskoeffizient betrug 7,9 %. Für die Einzelsubstanzen lagen die durchschnittlichen Wiederfindungsraten bei 70,4 % (Danofloxacin), 79,5 % (Enrofloxacin), 83,3 % (Marbofloxacin) und 71,5 % (Oxolinsäure), wobei die Variationskoeffizienten sich in einem Bereich von 2,2 bis 16,2 % bewegten.

Die Charakteristika der in PBS angelegten Standardkurven für Danofloxacin, Enrofloxacin, Flumequin, Marbofloxacin wurden bereits in 3.2.6.1 vorgestellt. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde auch für die häufiger in der Aquakultur eingesetzten Wirkstoffe, Difloxacin, Oxolinsäure und Sarafloxacin eine hohe Reproduzierbarkeit festgestellt. Die 50 %-Werte der drei Nachweise lagen im Bereich von 0,93 (Oxolinsäure) bis 3,82 (Sarafloxacin) ng/ml. Die Variationskoeffizienten bewegten sich von 10,6 % (Difloxacin) bis 17,1 % (Oxolinsäure) (**Tabelle 18**), beides für EIA-Verfahren übliche Größenbereiche.

Tabelle 18: Charakteristika von in PBS angelegten EIA-Standardkurven für Difloxacin, Oxolinsäure und Sarafloxacin ($n \geq 5$)

Parameter	Difloxacin	Oxolinsäure	Sarafloxacin
50 %-Dosis, ng/ml	0,97	0,93	3,82
Standabweichung, ng/ml	0,10	0,16	0,42
Variationskoeffizient, %	10,6	17,1	10,9
Maximalwert, ng/ml	1,10	1,20	4,10
Minimalwert, ng/ml	0,79	0,66	3,00

Tabelle 19: Wiederfindungsraten von Chinolonen in künstlich kontaminierten Rindfleischproben ($n=5$). Die eingesetzten Konzentrationen entsprechen dem halben, einfachen und zweifachen MRL-Wert.

Antibiotika	Zusatz (ng/ml)	Mittelwert (ng/ml)	s (ng/ml)	VK (%)	Wiederfindung (%)
Danofloxacin	100	68,3	5,30	7,76	68,3
	200	145	15,0	10,3	72,6
	400	281	45,4	16,2	70,2
Enrofloxacin	50	38,3	1,26	3,30	76,6
	100	78,9	6,86	8,69	78,9
	200	166	6,49	3,91	83,1
Marbofloxacin	75	61,2	7,65	12,5	81,6
	150	122	7,56	6,19	81,5
	300	260	20,1	7,70	86,8
Oxolinsäure	50	35,2	2,36	6,72	70,4
	100	72,4	7,15	9,88	72,4
	200	144	3,18	2,21	71,8

s: Standardabweichung; VK: Variationskoeffizient

In Lachsproben wurden beispielhaft die Wiederfindungsraten von drei für die Behandlung von Salmoniden zugelassenen Chinolonen bestimmt (**Tabelle 20**). Die durchschnittliche Wiederfindungsrate lag hierbei bei 74,4 %, der Variationskoeffizient betrug 9,7 %. Für die Einzelsubstanzen lagen die durchschnittlichen Wiederfindungsraten für alle drei Chinolone im überprüften Konzentrationsbereich (1/2-, 1-, 2-facher MRL-Wert) in einem ähnlichen Größenbereich von 73,4 % (Difloxacin), 70,1 % (Flumequin) bzw. 79,5 % (Sarafloxacin), wobei die Variationskoeffizienten 13,3 % (Difloxacin), 11,1 % (Flumequin) und 4,6 % (Sarafloxacin) betragen.

Tabelle 20: Wiederfindungsraten von Chinolonen in künstlich kontaminierten Lachsproben ($n \geq 4$). Die eingesetzten Konzentrationen entsprechen dem halben, einfachen und zweifachen MRL-Wert.

Antibiotika	Zusatz (ng/ml)	Mittelwert (ng/ml)	s (ng/ml)	VK (%)	Wiederfindung (%)
Difloxacin	150	109	13,0	12,0	72,4
	300	220	29,7	13,5	73,2
	600	448	65,0	14,5	74,7
Flumequin	300	205	28,8	14,1	68,3
	600	423	31,8	7,52	70,4
	1200	859	99,6	11,6	71,6
Sarafloxacin	15	13,4	0,97	7,28	89,2
	30	23,3	0,59	2,53	77,6
	60	43,1	1,71	3,98	71,8

s: Standardabweichung; VK: Variationskoeffizient

Ähnliche Ergebnisse wurden schließlich auch bei der Bestimmung der Wiederfindungsraten für Difloxacin und Flumequin in Garnelenproben erhalten (**Tabelle 21**). Die durchschnittlichen Wiederfindungsraten lagen hier geringfügig höher, nämlich bei 76,5 % für Difloxacin bzw. 79,2 % für Flumequin.

Tabelle 21: Wiederfindungsraten von Chinolonen in künstlich kontaminierten Garnelenproben (n = 3). Die eingesetzten Konzentrationen entsprechen dem halben, einfachen und zweifachen MRL-Wert.

Antibiotika	Zusatz (ng/ml)	Mittelwert (ng/ml)	s (ng/ml)	VK (%)	Wiederfindung (%)
Difloxacin	150	118	2,35	2,00	78,4
	300	230	26,8	11,6	76,7
	600	446	26,6	5,97	74,3
Flumequin	100	76,4	9,90	13,0	76,4
	200	157	14,3	9,11	78,7
	400	331	36,9	11,2	82,6

s: Standardabweichung; VK: Variationskoeffizient

3.2.6.3 Vergleichsuntersuchung natürlich kontaminierter Fleischproben

Um die bei der Entwicklung der Extraktionsverfahren erhaltenen Ergebnisse abzusichern, wurden mit dem etablierten Verfahren auch einige natürlich belastete Fleischproben (n=6) untersucht. Als Referenzverfahren wurde ein LC-MS Verfahren eingesetzt, die Analysenwerte wurden vom Hemmstofflabor des LGL Erlangen (Frau Dr. Götz-Schmidt) zur Verfügung gestellt.

Für die Untersuchungen wurden die Proben wie in 3.2.6.2 beschrieben extrahiert und danach im EIA unter Screening-Bedingungen analysiert. Hierbei wurden die Extrakte in niedrigen Verdünnungsstufen in den EIA eingesetzt und anhand einer Enrofloxacin-Standardkurve wurde qualitativ geschätzt, in welcher Höhe eine Kontamination mit Chinolon-Antibiotika vorliegt. Bei allen sechs Proben wurden im EIA positive Ergebnisse erhalten: zwei Proben wurden als gering, zwei als mittelgradig und zwei als hochgradig belastet eingestuft. In einem zweiten Schritt erfolgte basierend auf der Wirkstoff-Identifizierung mittels LC-MS eine quantitative Bestimmung mittels EIA anhand einer Marbofloxacin- (Probe # 1 und 2) bzw. für die mit Enrofloxacin und dessen Abbauprodukt Ciprofloxacin kontaminierten Proben eine semiquantitative Bestimmung anhand einer Enrofloxacin-Standardkurve (Probe # 3-6).

Bei sehr hoch kontaminierten Proben wurden im Vergleich zur LC-MS deutlich niedrigere Werte gefunden. Die im EIA gemessenen Werte betragen nur 34,4 bzw. 45,5 % der LC-MS Analysenergebnisse. Bei Proben mit einem Rückstandsgehalt von wenig unter bzw. über MRL-Niveau (MAR 150 µg/kg; ENR 100 µg/kg) zeigte sich auch unter quantitativen Gesichtspunkten eine gute Korrelation mit den LC-MS Ergebnissen (**Tabelle 22**), während für die beiden nur gering belasteten Proben im EIA wiederum deutlich niedrigere Messwerte erhalten wurden. Insgesamt konnte zwischen den beiden Verfahren eine hohe Übereinstimmung gefunden werden, der Korrelationskoeffizient lag bei $r^2 = 0,9799$ (**Abbildung 15**).

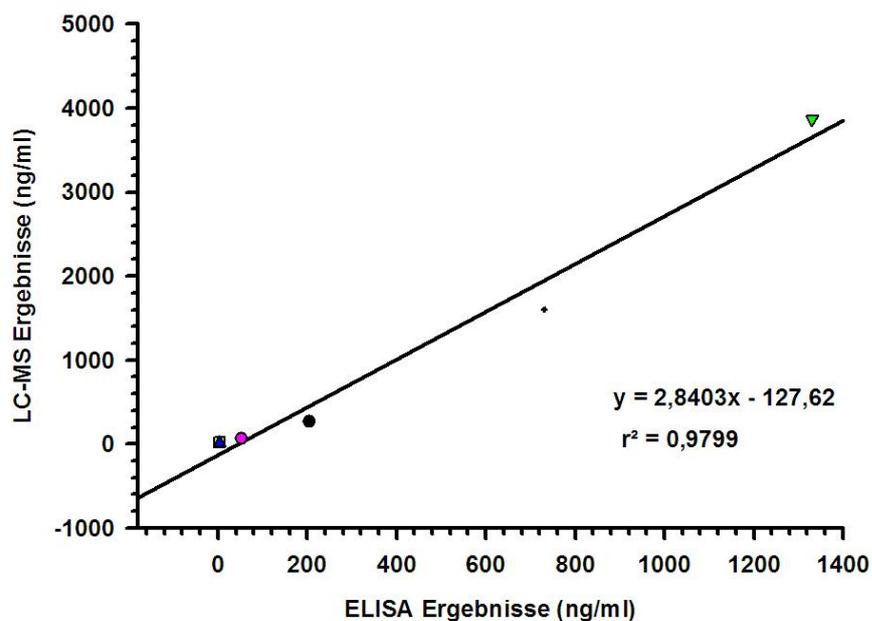


Abbildung 15: Vergleich der Messergebnisse für Chinolone (n=6) in Fleischproben nach Bestimmung mittels EIA bzw. LC-MS

Tabelle 22: Vergleich der Ergebnisse von EIA und LC-MS für Chinolon-positive Fleischproben

		EIA-Analysen		LC-MS Analysen	
		Screening	Quantitativ (ng/g)	ng/g	Identifizierter Wirkstoff
Probe 1	(Rind)	+	204	270	MAR
Probe 2	(Rind)	++	731	1600	MAR
Probe 3	(Kalb)	++	1330	3867	ENR/CIP (3,1:1)
Probe 4	(Rind)	±	4,24	21,0	ENR/CIP (2:1)
Probe 5	(Rind)	±	2,82	13,0	ENR/CIP (2,3:1)
Probe 6	(Kalb)	+	52,6	66,0	ENR/CIP (21:1)

±: geringgradige, +: mittelgradige, ++: hochgradige Belastung

3.2.7 Herstellung von Immunoaffinitätsäulen

In den Untersuchungen zur Spezifität des entwickelten mAk wurden alle eingesetzten Chinolon-Antibiotika erkannt. Der Antikörper weist somit generische Eigenschaften auf. Daher schien es interessant zu überprüfen, ob der mAk für die Immunoaffinitätschromatographie einsetzbar ist, da mit solchen Immunoaffinitätsäulen für eine anschließende physikalisch-chemische Analyse alle - auch illegal eingesetzte - Chinolon-Antibiotika einfach auch aus schwierigen Probenmatrices gereinigt werden könnten.

3.2.7.1 Kopplung von mAk an CNBr-aktivierte Sepharose 4b

Die Kopplung des anti-Chinolon mAk an CNBr-aktivierte Sepharose wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dafür wurde Norfloxacin-GlcOX III mAk 5H8 mit einer Ausgangskonzentration von 0,58 mg/ml (ca. 17,2 ml) gegen PEG dialysiert, um das Volumen einzuengen. Anschließend wurde der mAk gegen Kopplungspuffer dialysiert und die Konzentration des Antikörpers wurde mittels Spektrometrie bei 280 nm bestimmt. Durch Zugabe von Kopplungspuffer wurde das Gesamtvolumen auf 7 ml (entspricht dem doppelten Gelvolumen von 1 g CNBr aktivierter Sepharose 4B, 3,5 ml) eingestellt, die mAk-Konzentration lag bei 1,4 mg/ml.

CNBr-aktivierte Sepharose 4B (1 g) wurde in 50 ml 1 mM HCl suspendiert, nach 10 min auf eine Nutsche überführt und mit 200 ml 1 mM HCl ca. 15 min gewaschen. Anschließend wurde das Gel mit 100 ml Kopplungspuffer gewaschen. Daraufhin wurde mAk 5H8 (in 7 ml Kopplungspuffer) zugegeben und 1 h bei RT auf einem Schwenkschüttler inkubiert. Zur Überprüfung der Kopplung wurde danach etwas Überstand abgenommen und im Spektrometer bei 280 nm gemessen (**Abbildung 16**). Da kein Protein mehr im Überstand nachzuweisen war, der mAk also vollständig an das Gel gekoppelt hatte, wurde das Gel zum einen mit 200 ml Kopplungspuffer gewaschen und danach für 2h bei RT mit 100 ml Blockierungspuffer inkubiert, um noch vorhandene aktive Gruppen des Gels zu blockieren. Daraufhin wurde es in insgesamt drei Zyklen abwechselnd mit 200 ml Waschpuffer 1 (0,1 mol/l Na-Acetatpuffer, mit 0,5 mol/l NaCl, pH 4,0) bzw. Waschpuffer 2 (0,1 mol/l Tris-HCl, mit 0,5 mol/l HCl, pH 8,0) gespült. Schließlich wurde das Gel zur Konservierung mit 200 ml PBS mit Zusatz von 0,1 % NaN_3 gewaschen und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

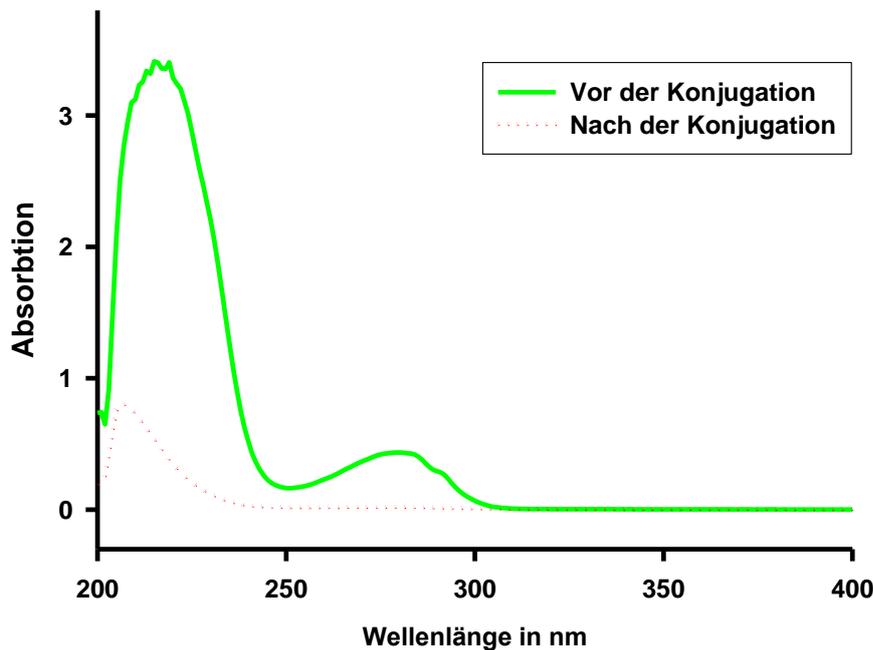


Abbildung 16: Überprüfung der Kopplung des mAk 5H8 an CNBr-aktivierte Sepharose

Wie in **Abbildung 16** dargestellt, wurden die zugegebenen Antikörper (9,9 mg) an die CNBr-aktivierte Sepharose vollständig gekoppelt, d.h. pro ml Gel sind 2,82 mg mAk bzw. 17,9 nmol mAk gebunden.

3.2.7.2 Ermittlung der Antigenbindungskapazität

Zur Bestimmung der Antigenbindungskapazität des hergestellten Gelmaterials wurden Minisäulen (100 μ l Gel) eingesetzt. Zum Entfernen des Konservierungsstoffes Natriumazid wurde die Säule zuerst mit 10 ml PBS gespült, danach wurde eine Gesamtdosis von 2 μ g Enrofloxacin (20 ml à 100 ng/ml) mittels Einzelspritzen mit einer Flussrate von ca. 1 ml/min aufgetragen. Der Durchlauf wurde in 2 Fraktionen à 10 ml gesammelt. Daraufhin wurde die Säule mit 10 ml PBS gespült, um nicht gebundene Chinolone zu entfernen. Zur Elution des gebundenen Enrofloxacins wurden verschiedene Elutionsmittel getestet. Da eine Wiederverwendung der Säulen wünschenswert erschien, wurde zuerst als antikörperschonender Puffer 3 ml eines 0,1 mol/l Glycin/HCl-Puffers (pH 2,5) eingesetzt,

gefolgt von 3 ml eines Glycin/HCl-Puffers mit Zusatz von 30 % MeOH. Als letztes, sehr harsches Elutionsmittel wurde reines MeOH (3 ml) eingesetzt, eine Wiederverwendung der Säule war damit aber nicht mehr möglich. Wie in **Abbildung 17** dargestellt, konnte mit den milden Elutionsmitteln, die eine Wiederverwendbarkeit der Säule ermöglichen würden, nur ein geringer Prozentsatz (13,9 %) des gebundenen Enrofloxacins eluiert werden, der Zusatz von 30 % MeOH verbesserte deutlich die Eluierbarkeit. Eine vollständige Elution war aber nur mit reinem MeOH möglich.

Die experimentell bestimmte Bindungskapazität der Säule lag bei 676 ng Enrofloxacin (1,88 nmol). Wie in 3.2.7.1 beschrieben sind pro Säule (100 µl Gel) 1,79 nmol mAk gebunden. Da jeder Antikörper zwei Bindungsstellen für die Antigene besitzt, liegt somit die theoretische Antigenbindungskapazität bei 1287 ng (3,58 nmol) Enrofloxacin pro Säule. Beim Vergleich der beiden Werte ergibt sich, dass ca. 52,6 % der kovalent gekoppelten Antikörper noch aktiv sind.

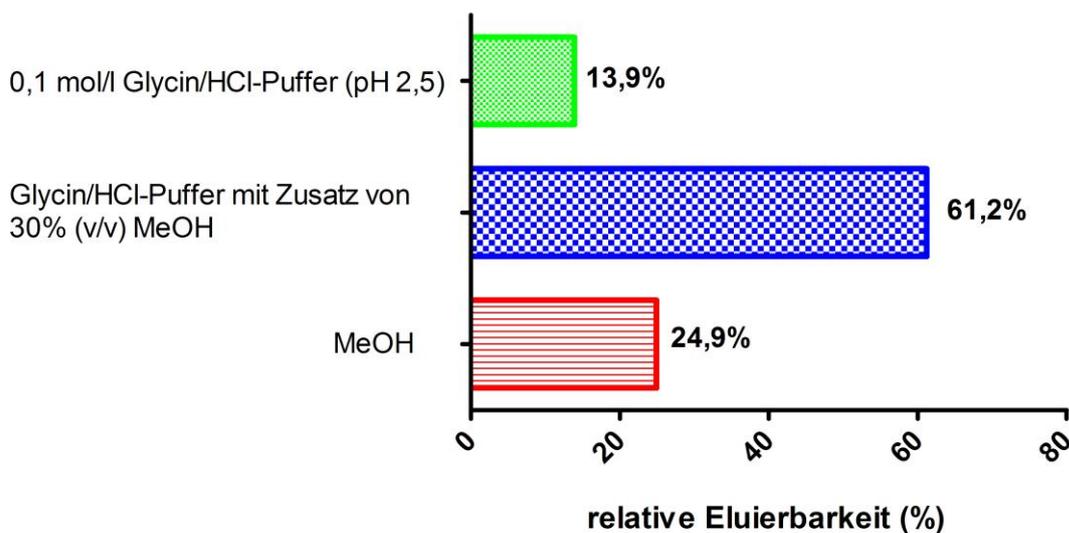


Abbildung 17: Sequenzielle Eluierung von Enrofloxacin mittels dreier verschiedener Elutionsmittel

3.2.7.3 Immunaffinitätschromatographische Reinigung von Milchproben

Zur Überprüfung die Anwendbarkeit der Säule wurden Vollmilchproben mit verschiedenen Chinolon-Antibiotika künstlich kontaminiert und anschließend entfettet. Um die breite Einsetzbarkeit der IA-Säule zu demonstrieren, wurden hierbei Chinolone verwendet, für die der mAk eine sehr hohe (Marbofloxacin: IC_{50} -Wert im EIA 0,16 ng/ml), hohe (Ciprofloxacin: IC_{50} 0,99 ng/ml; Clinafloxacin IC_{50} 2,29 ng/ml) bzw. vergleichsweise geringe Affinität (Moxifloxacin IC_{50} 11,6 ng/ml; Gatifloxacin 31,3 ng/ml) aufweist. Um zudem mittels EIA das Verfahren quantitativ überprüfen zu können, wurden in Abhängigkeit von IC_{50} -Wert des jeweiligen Chinolons Milch mit unterschiedlichen Konzentrationslevels (2 - 50 ng/ml) über die Säule gegeben.

Die Durchführung der Reinigung erfolgte wie oben beschrieben, mit 100 µl Gel befüllte Minisäulen wurden zuerst mit 10 ml PBS vorgespült, daraufhin wurden die vorbereiteten Milchproben (5 ml) auf die Säule aufgetragen. Die Durchlaufgeschwindigkeit betrug ca. 1 ml/min. Um gebundene Bestandteile wegzuwaschen, wurde die Säule anschließend mit 10 ml 10 % MeOH/PBS (v/v) gespült. Die Elution der gebundenen Chinolone erfolgte durch Zugabe von 3 ml Methanol. Das gewonnene Eluat wurde dann im Rotationsverdampfer bei 60 °C eingedampft, der Rückstand in 1 ml PBS aufgenommen und der so hergestellte Endextrakt in verschiedenen Verdünnungsstufen mit dem in 3.2.5.2 beschriebenen EIA analysiert. Die Standardkurven wurden ebenfalls in PBS angelegt.

Die Ergebnisse sind in **Tabelle 23** aufgeführt. Die Wiederfindungsraten lagen unabhängig von der Affinität des mAk für das jeweilige Chinolon in einem Bereich von 72,8 % bis 90,8 %. Die hohe Reproduzierbarkeit des Verfahrens zeigte sich in den für EIA-Analysenverfahren sehr niedrigen Variationskoeffizienten von 2,39 - 8,47 %.

Tabelle 23: Wiederfindungsraten von verschiedenen Chinolonen in künstlich kontaminierter Milch nach IAC-Aufreinigung (n=3). Die Anordnung der Ergebnisse erfolgte analog zur Affinität des mAks (in abnehmender Reihenfolge).

	Marbofloxacin	Ciprofloxacin	Clinafloxacin	Moxifloxacin	Gatifloxacin
Kontaminationslevel (ng/ml)	2	2	20	20	50
Probenauftrag (gesamt), ng	10	10	100	100	250
Wiederfindung, ng	7,37	9,07	72,8	90,8	226
Standardabweichung	0,23	0,47	6,17	2,17	17,5
Variationskoeffizient	3,13	5,21	8,47	2,39	7,75
Maximalwert	7,50	9,60	79,9	93,3	243
Minimalwert	7,10	8,70	68,7	89,2	208
Wiederfindungsrate (%)	73,7	90,7	72,8	90,8	90,5

4. DISKUSSION

Das breite Wirkspektrum von Chinolon-Antibiotika insbesondere gegen intrazellulär wachsende Gram-negative Mikroorganismen wie *Campylobacter* spp., Salmonellen, Shigellen und invasive *E. coli*, sowie die weltweit hohe Inzidenz entsprechender Erkrankungen führten dazu, dass diese Antibiotika-Gruppe von der WHO (2011b) für die Humanmedizin in die wichtigste Kategorie antimikrobiell wirksamer Substanzen, den sog. „highest priority critically important antimicrobials“ eingestuft wurde. Trotz dieser Einstufung in die in Deutschland auch als Reserveantibiotika bezeichnete Gruppe ist seit Jahren eine stetig steigende Abgabe dieser Antibiotika in der Tiermedizin zu verzeichnen. Im Zeitraum von 2011 bis 2013 wurden z.B. 50 % mehr Chinolone abgegeben, im Vergleich zu Penicillinen und Tetracyclinen (473 bzw. 454 t) ist die Gesamtabgabemenge von 12 t im Jahr 2013 aber trotzdem überschaubar (BVL, 2014). Die Steigerung wird v.a. darauf zurückgeführt, dass nach Ablauf der patentrechtlichen Schutzfrist zunehmend kostengünstige Generika für den Wirkstoff Enrofloxacin angeboten werden (Hauck et al., 2015). In den USA ist der Einsatz von Enrofloxacin bei der Behandlung von Lebensmittel-liefernden Tieren hingegen bereits seit längerem verboten (Nelson et al., 2007).

Der zunehmende Einsatz von Chinolonen in der Behandlung von Tieren erhöht natürlich auch die Gefahr von Rückständen in Lebensmitteln. Zur Überwachung der in der Verordnung 37/2010 festgelegten MRLs für einige Vertreter dieser Antibiotika-Klasse (Enrofloxacin, Danofloxacin, Difloxacin, Flumequin, Marbofloxacin, Oxolinsäure und Sarafloxacin) wurden viele Screening- und Bestätigungsverfahren entwickelt (Übersicht siehe 2.3). Bei auf Antikörpern beruhenden Screeningverfahren fällt auf, dass - im Gegensatz zu polyklonalen Antisera (Huet et al., 2006; Li et al., 2008a; Pinacho et al., 2012) - bislang in der Literatur beschriebene, auf monoklonalen Antikörpern basierende EIAs nicht in der Lage sind, gleichzeitig alle Chinolone unterhalb des MRL-Niveaus in Lebensmitteln nachzuweisen (**Tabelle 5**). Um diese analytische Lücke zu schließen, sollten im Rahmen dieser Arbeit generische monoklonale Antikörper zum Nachweis der für Lebensmittel-liefernde Tiere zugelassenen Chinolon-Antibiotika entwickelt werden, und deren Anwendbarkeit in immunchemischen Verfahren überprüft werden.

4.1 Herstellung des monoklonalen Antikörpers und Etablierung des EIAs

Da Chinolon-Antibiotika aufgrund ihrer niedrigen Molekularmasse in Versuchstieren keine Immunreaktion hervorrufen können, muss zur Immunogen-Herstellung ein geeigneter Kandidat dieser Antibiotikagruppe an ein Trägerprotein gekoppelt werden. Wie in 2.3.4 detailliert dargestellt, lassen sich prinzipiell die bislang beschriebenen Ansätze zur Herstellung generischer Antikörper gegen Chinolone in drei Gruppen einteilen: Immunogen-Synthese (i) über die sekundäre Aminogruppe des Piperazin-Substituenten an C-7, wobei in der Regel die Fluorchinolone NOR, CIP oder SAR verwendet werden (ii) über Einfügen von reaktiven Gruppen an der originären N-1 Position der Chinolon-Grundstruktur (Pinacho et al., 2012) und (iii) über die an C-3 positionierte Carboxylgruppe, wobei im letzteren Ansatz unklar bleibt, ob das verwendete Immunogen nicht eine Mischung aus an unterschiedlichen Stellen (C-3 und C-7) gekoppelten Fluorchinolonen darstellte. Für diese These spricht, dass bei diesen Ansätzen häufig CIP oder ENR – beide weisen einen Piperazin-Substituenten auf – als Antigen eingesetzt wurden (Suryoprabowo et al., 2014b), dieser Ansatz nur bei der Herstellung von mAk zu breit reagierenden Antikörpern führte und dass neben den breit reagierenden mAk ein Großteil der gewonnenen mAk spezifisch nur mit dem zur Herstellung des Antigens verwendeten Chinolon reagierte (Wang et al., 2007).

Gegen den von Pinacho et al. (2012) verwendeten Ansatz, die chemische Grundstruktur der Chinolon-Antibiotika von Grund auf neu zu synthetisieren, um so geeignete aktive Gruppen zur Kopplung einzufügen, sprach der hohe Synthese-Aufwand und die Tatsache, dass die generierten polyklonalen Antikörpern über keine substantiell breitere Kreuzreaktivität verfügten als andere Antiseren (Li et al., 2008a), bei denen mit einfachen Kopplungsverfahren hergestellte Immunogene eingesetzt wurden. In den eigenen Arbeiten wurde daher das ursprünglich von Bucknall et al. (2003) beschriebene Konzept, Norfloxacin mittels Carbodiimid über die sekundäre Aminogruppe an das Trägerprotein zu koppeln, eingesetzt. Da so die Kopplungsstelle gegenüber der bei allen Chinolonen zu findenden bicyclischen Grundstruktur, sowie der für die antibakterielle Aktivität wichtigen β -Ketocarbonsäure liegt, können diese gemeinsamen Strukturen als immundominantes Epitop fungieren. Obwohl Norfloxacin-Proteinkonjugate relativ häufig zur Herstellung von breit kreuzreagierenden polyklonalen Kaninchen-Antiseren eingesetzt wurden (Fan et al., 2012; Li et al., 2008a; Tittlemier et al., 2008), wurden mit diesem Immunogen bislang keine mAk generiert. Bei der

Immunisierung von Mäusen mit dem hergestellten NOR-GlcOX-Konjugat konnte die bekannt hohe Immunogenität von Chinolon-Proteinkonjugaten (Holtzapfle et al., 1997; Li et al., 2008a; Sheng et al., 2011) bestätigt werden, bei allen immunisierten Mäusen wurde eine spezifische Immunantwort gegen NOR induziert. Nach der Restimulierung wurden bei vier von sechs immunisierten Mäusen Titer von $> 1:100.000$ gemessen.

Für die Generierung von mAk wurden drei Mäuse ausgewählt, in deren Seren hochaffine und breit reagierende Antikörper nachweisbar waren. Letztendlich konnte eine stabile Hybridomzelllinie, 5H8, etabliert werden, die Charakteristika des mAk, insbesondere dessen Sensitivität und Spezifität wurden mittels direktem EIA ermittelt. Der generierte mAk zeigte eine außergewöhnlich hohe Affinität für das als Immunogen verwendete NOR. Unter homologen EIA-Bedingungen wurden IC_{50} -Werte von 0,4 ng/ml erreicht, die Sensitivität liegt damit im oberen Bereich der bislang zum Nachweis von Chinolonen beschriebenen Antikörper (für einen Überblick siehe Tabellen 3 – 5). Unter ähnlichen EIA-Bedingungen wurde von den von (Jinqing et al., 2011a,b) beschriebenen hochspezifischen polyklonalen bzw. monoklonalen Antikörpern gegen NOR IC_{50} -Werte von 0,48 bzw. 0,16 ng/ml erreicht. Die Sensitivität anderer spezifischer mAk gegen Chinolon-Antibiotika liegt im Bereich von 0,16 ng/ml (MAR; Junjie et al., 2011) bzw. 0,18 ng/ml (LOM; Xinyao et al., 2011a) bis zu 26,3 ng/ml (FLU; Wang et al., 2010) bzw. 246 ng/ml (CIP; Hu et al., 2010). Breit kreuzreagierende mAk gegen Chinolon-Antibiotika weisen hingegen meist deutlich geringere Affinitäten auf, die IC_{50} -Werte für die als Immunogen verwendeten Wirkstoffe liegen hier im Bereich von 6 - 9 ng/ml (Holtzapfle et al., 1997; Liu et al., 2013a,b; Wang et al., 2007).

In den eigenen Untersuchungen konnte zudem durch den Einsatz eines Hapten-heterologen (CLN), HRP-markierten Antigens die Empfindlichkeit nochmals deutlich um etwa Faktor 7 gesteigert werden, mit einem IC_{50} -Wert von 0,06 ng NOR pro ml gehört der etablierte EIA zu empfindlichsten bislang beschriebenen immunchemischen Nachweissystemen für Chinolon-Antibiotika. Der Einsatz von Hapten-heterologen Konjugaten zur Steigerung der Sensitivität von EIA-Systemen ist ein seit langem bekanntes Prinzip, wurde im Bereich der EIA-basierten Chinolon-Nachweise aber bislang nur von Sheng et al. (2011) beim spezifischen Nachweis von OFL-Strukturanaloga (MAR-markiertes Antigen), sowie von Huet et al. (2006) bei einem generischen Nachweis (NOR-markiertes Antigen und pAk gegen SAR) eingesetzt. Letztere Autoren berichteten von einer massiven Verbesserung der Empfindlichkeit um bis zu

Faktor 100, sowie einer beträchtlichen Verbreiterung der Spezifität bei Einsatz des heterologen Konjugates im Vergleich zum homologen SAR-HRP. Für die Herstellung des in den eigenen Untersuchungen eingesetzten markierten Antigens wurde erstmals als Antigen CLN und als Kopplungsverfahren die Perjodat-Methode eingesetzt. CLN weist als C-7 Substituenten einen Pyrrolidin-Ring samt primärer Aminogruppe auf und kann somit einfach, schnell und effizient an Enzyme und andere Trägerproteine gekoppelt werden.

Mit dem optimierten heterologen kompetitiven direkten Immunoassay wurde die Spezifität des generierten mAk evaluiert, wobei 30 verschiedene Chinolon-Antibiotika - darunter alle in der Human- und Veterinärmedizin zu therapeutischen Zwecken eingesetzten Wirkstoffe -, sowie das strukturähnliche Clioquinol überprüft wurden. Zum besseren Verständnis der Untersuchungen zur Spezifität des mAk sind in **Abbildung 18** nochmals - in absteigender Reihenfolge entsprechend der relativen Kreuzreaktion mit dem mAk - die Strukturformeln der getesteten Chinolon-Antibiotika dargestellt. Clioquinol, dem die für Chinolone typische β -Ketocarbonsäure fehlt, zeigte praktisch keine Reaktion, ein Hinweis darauf, dass diese Struktur in Verbindung mit der bicyclischen Grundstruktur als antigene Determinante fungiert. Dementsprechend konnten für mAk 5H8 mit allen Chinolon-Antibiotika eine Reaktivität bei Antibiotika-Konzentrationen von < 100 ng/ml – für die mit einem MRL versehenen Wirkstoffe mit Ausnahme von Sarafloxacin sogar < 1 ng/ml - nachgewiesen werden. Die relativen Kreuzreaktionen waren aber sehr variabel und lagen in einem Bereich von 0,1 % (PRA) bis zu 150% (RUF) und waren damit deutlich heterogener als bei anderen generischen Antikörpern. Bei dem von (Wang et al., 2007) beschriebenen mAk lagen für die meisten Chinolone die Kreuzreaktionen in einem sehr engen Bereich von 40 – 100%, nach Optimierung der Sensitivität bei 46 – 128 % (Wen et al., 2012), wobei allerdings SAR, TRO und DIF vom Antikörper nur sehr schlecht (IC_{50} 250 – 300 ng/ml) erkannt wurden. Diese Wirkstoffe besitzen an N-1 einen Fluorbenzol-Ring als Substituenten der laut Konformationsberechnungen von Wang et al. (2007) und Wen et al. (2012) senkrecht zur planaren bicyclischen Grundstruktur der Chinolone angeordnet ist und so für den Antikörper ein massives sterisches Hindernis darstellt. Geringe Kreuzreaktionen mit SAR wurden auch von Cao et al. (2011b); Tittlemier et al. (2008) und Suryoprabowo et al. (2014b) berichtet. In den eigenen Untersuchungen lagen die relativen Kreuzreaktionen für die beiden Verbindungen bei 2 bzw. 8 %, was einem IC_{50} -Wert von 3,8 bzw. 0,97 ng/ml entspricht.

FQs	Formel	IC ₅₀ (%)	FQs	Formel	IC ₅₀ (%)	FQs	Formel	IC ₅₀ (%)
RUF 2		0,05 150	DIF M		0,97 8,44	MOX 4		11,6 0,65
NAD 2		0,05 135	ENO 2		0,74 8,13	PA 1		9,89 0,58
NOR 2		0,06 100	LOM 2		0,91 8,01	TOS 3		47,1 0,23
PEF 2		0,10 87,5	FLU M		0,74 6,63	GAT 4		31,3 0,20
LEV 3		0,11 61,7	CIP 2		0,99 6,30	SPA 3		40,1 0,18
OFL 2		0,14 48,5	FLR 2		1,25 5,55	NA 1		26,8 0,16
MAR M		0,16 42,6	OA M		0,93 5,28	PRU 4		55,4 0,16
ENR M		0,17 40,0	CLN 4		2,29 3,30	PRA T		72,3 0,1
IBA T		0,20 25,9	TRO 4		4,60 2,09	ClIq		9636 0,0006
DAN M		0,32 21,0	SAR M		3,82 2,08			
PAZ 3		0,60 9,97	ORB T		7,67 0,97			

Abbildung 18: Kreuzreaktivität des mAk mit Chinolon-Antibiotika. Die Wirkstoffe wurden entsprechend der relativen Kreuzreaktivität in absteigender (von Spalte 1 zu Spalte 3) Reihenfolge angeordnet.

Die Bedeutung des N-1 Substituenten für die Reaktivität des im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten mAk ergibt sich aus einem Vergleich der ansonsten strukturidentischen Verbindungen NOR, CIP und SAR, die sich nur an der N-1 Position durch unterschiedliche Substituenten, nämlich eine Ethylgruppe (NOR), einen Cyclopropylring (CIP) bzw. Fluorbenzolring (SAR) voneinander unterscheiden. Diese Unterschiede resultieren in einer um Faktor 16 bzw. 50 reduzierten Affinität des mAk für CIP (relative Kreuzreaktion 6,3 %) bzw. SAR (2,08 %). Aufgrund der extrem hohen Affinität des mAk für NOR entsprechen diese geringen prozentualen Kreuzreaktionen aber noch IC₅₀-Werten von 3,8 bzw. 0,99 ng/ml, die um Größenordnungen niedriger liegen als bei allen anderen bislang beschriebenen, generischen mAk gegen Chinolon-Antibiotika (**Tabelle 24**). Die Bedeutung des N-1 Substituenten zeigt sich schließlich auch bei Prulifloxacin (PRU). Wegen der ungewöhnlichen Ringstruktur zwischen N-1 und C-2 und den deutlichen Strukturunterschieden am Piperazin-Ring zeigte – wie erwartet – die Verbindung nur eine sehr niedrige Kreuzreaktivität von 0,16 %.

Überraschenderweise spielte hingegen die bei einer ganzen Reihe von Chinolon-Wirkstoffen existierende zusätzliche Ringverbindung zwischen N-1 und C-8 für die Reaktivität des mAk nur eine untergeordnete Rolle, eventuell fördert diese meist heterocyclische Struktur sogar die Bindung des mAk. So besitzen sowohl RUF als auch NAD, die Kreuzreaktionen von >100 % zeigen, einen entsprechenden Ring. Auch weitere ansonsten strukturidentische Verbindungen mit unterschiedlichen zusätzlichen Ringstrukturen, wie das Benoxazinderivat OFL sowie dessen S-Enantiomer LEV oder das in der Veterinärmedizin eingesetzte Benzoxadiazin MAR zeigten hohe Kreuzreaktionen von 43 bis 62 %. Auch IBA und FLU – beide zudem ohne Piperazin-Substituenten an C-7 – zeigten noch Kreuzreaktionen von 26 bzw. 6,6 %. Dass dieser zusätzliche Ring die Antikörperbindung offensichtlich nicht behindert, zeigt sich auch darin, dass PEF, das an N-1 wie NOR eine Ethylgruppe besitzt und ansonsten strukturidentisch mit LEV ist, nur eine geringfügig höhere Kreuzreaktivität (87,5 %) aufweist.

Eventuell bedingt durch Änderungen der intramolekularen Ladungsverteilung oder ausgeprägte Konformationsänderungen spielen hingegen der Ersatz des C-8 durch ein N-Atom (bei ENO) bzw. zusätzliche Substituenten an C-8 wie ein Fluor-Atom (LOM) oder eine Methoxy-Gruppe (MOX, GAT) eine große Rolle für die Spezifität des mAk. ENO, ansonsten strukturidentisch mit NOR, zeigt nur 8 % Kreuzreaktion. Auch LOM, das mit Ausnahme des

Tabelle 24: Vergleichende Darstellung der IC₅₀-Werte (ng/ml) von generischen Antikörpern gegen Chinolon-Antibiotika

Referenz	Antikörper	CIP	DAN	DIF	ENR	FLU	MAR	OA	SAR
WANG et al. (2007)	mAk	8,90	16,5	284	10,9	25,5	21,5	22,0	307
WEN et al. (2012) ¹	mAk	0,25	0,45	266	0,28	0,67	0,59	k.A.	257
LIU et al. (2013a)	mAk	8,70	27,1	5,80	9,00	k.A.	36,1	k.A.	6,50
LIU et al. (2013b)	mAk	9,10	19,8	37,9	7,60	k.A.	29,4	k.A.	39,5
SURYOPRABOWO et al. (2014b)	mAk	0,57	1,07	k.A.	0,78	> 10.000	k.A.	> 10.000	17,65
HUET et al. (2006)	pAk	1,22	0,24	0,33	0,32	5,09	0,47	6,26	0,21
BURKIN (2008)	pAk	0,86	k.A.	k.A.	0,68	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
LI et al. (2008a)	pAk	1,10	2,00	3,20	1,40	3,00	3,20	20,0	3,30
PINACHO et al. (2012)	pAk	0,35	7,31	0,91	0,65	3,91	4,30	23,53	0,96
FAN et al. (2012)	pAk	3,40	k.A.	k.A.	9,00	k.A.	k.A.	k.A.	15,4
Eigene Arbeit	mAk	0,99	0,32	0,97	0,17	0,74	0,16	0,93	3,82

¹ Verwendung des von Wang et al. (2007) beschriebenen mAks unter modifizierten EIA-Bedingungen

F-Atoms an C-8 ansonsten dem hoch kreuzreaktiven PEF (88 %) stark ähnelt, zeigt nur 8 % Kreuzreaktion. Wirkstoffe wie GAT, das sich mit Ausnahme der Methoxy-Gruppe an C-8 nicht fundamental von hoch-reaktiven Cyclopropyl-Verbindungen wie ENR und DAN unterscheidet, werden vom mAk noch sehr viel schlechter erkannt, die Kreuzreaktionen liegen dann nur mehr bei 0,2 %.

Das als Immunogen verwendete NOR weist an C-7 einen Piperazin-Substituenten auf, über den auch die Kopplung an das Trägerprotein erfolgte. Prinzipiell spielen Strukturen, die relativ nah an der Kopplungsstelle liegen, nur eine untergeordnete Rolle für die Reaktivität des Antikörpers. Dies war auch hier der Fall, auffällig war aber, dass einige Verbindungen mit einem N-Methyl- oder N-Ethylpiperazin-Substituenten deutlich höhere Reaktivitäten als die jeweiligen Kongenere ohne zusätzliche Methyl- bzw. Ethyl-Gruppe zeigten. Besonders deutlich wird das beim Vergleich von ENR und dessen deethyliertem Abbauprodukt CIP, da deren Reaktivitäten sich um etwa Faktor 6 unterscheiden. Auch für die Kongenere DIF (mit einem N-Methylpiperazin) und SAR ergibt sich ein ähnliches Bild, der Unterschied beträgt hier etwa Faktor 4 (8,4 % zu 2,1 % Kreuzreaktion). Offensichtlich wird durch die Methyl- bzw. Ethylgruppen ein Teil der bei der Kopplung des NOR an das Protein entstehenden Brücke simuliert, was in einer höheren Affinität des Antikörpers resultiert. Andererseits zeigen Verbindungen trotz eines nicht veränderten Piperazin-Rings aber anderen strukturellen Unterschieden wie das Naphthyridin-Analog ENO, die Cyclopropyl-Verbindung CIP oder das Fluorbenzol-Chinolon SAR deutlich geringere Reaktivitäten. Andere reaktive Verbindungen wie IBA, FLU oder OA (Kreuzreaktionen von 26, 6,6 bzw. 6,6 %) besitzen gar keinen Substituenten an C-7. Der fehlende Substituent an C-7 ist auch der Grund, warum viele der bislang beschriebenen generischen Antikörper nur eine geringe Affinität mit FLU aufweisen (Bucknall et al., 2003; Burkin, 2008; Huet et al., 2006; Kato et al., 2007) bzw. von vielen Autoren keine Angaben zur Reaktivität der hergestellten Antikörper mit diesem Wirkstoff gemacht werden (Burkin, 2008; Cao et al., 2011b; Liu et al., 2013a,b; Tabelle 24).

Die Bedeutung des Fluor-Substituenten an C-6 für die Reaktivität des Antikörpers zeigt sich am besten beim Vergleich der relativen Kreuzreaktionen des Fluorchinolons ENO und des etwa um Faktor 14 schwächer reagierenden Pyrimidinanalogs PA. ENO und PA unterscheiden sich nur an der C-6 Position, wobei bei PA C-6 gegen ein N-Atom ausgetauscht wurde. Auch das auf einer 1,8-Naphthyridin-Ringstruktur basierende erste Chinolon-

Antibiotikum Nalidixinsäure (NA) zeigt nur eine geringe Reaktivität, neben dem fehlenden Fluor-Atom an der C-6 Position wurde im Vergleich zu PA der Piperazin-Ring an C-7 durch eine Methylgruppe ersetzt. Mit dieser Änderung verringerte sich die Reaktivität im Vergleich zu PA nur mehr um etwa Faktor 3. Dies zeigt erneut, dass der Piperazinring im Vergleich zum Fluor-Atom an C-6 bei der Erkennung durch den mAk nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Bei der Bewertung der relativen Kreuzreaktionen und dem Vergleich mit anderen publizierten generischen Antikörpern sind im Hinblick auf die praktische Anwendbarkeit der EIAs als Screeningverfahren auch die unterschiedlichen Sensitivitäten der jeweiligen Antikörper zu berücksichtigen. In Tabelle 26 wurden daher die IC_{50} -Werte von MRL-regulierten Chinolonen bislang publizierter generischer Antikörper mit denen des im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten mAk verglichen. Für diese Wirkstoffe lagen die relativen Kreuzreaktionen im Bereich von 2,1 bis 42,6 %, was IC_{50} -Werten von 0,16 bis 3,82 ng/ml entspricht. Damit liegt die Sensitivität des EIAs um etwa eine Größenordnung höher als alle anderen bislang publizierten mAks. Eine Ausnahme stellen hier die von (Wen et al., 2012) angegebenen Werte für den von Wang et al. (2007) publizierten mAk dar. Dieser Antikörper ist allerdings nicht in der Lage, FQs mit einem Fluorbenzol-Substituenten im relevanten Konzentrationsbereich zu detektieren. Auch im Vergleich zu den meisten polyklonalen Antisera ermöglicht der vorgestellte mAk eine deutlich sensitivere Detektion einiger Chinolone. Dies gilt insbesondere für FLU und OA, die aufgrund ihrer strukturellen Sonderstellung (keine Substituenten an C-7 bzw. kein FQ) von fast allen bislang publizierten Antikörpern nur unzureichend erfasst werden.

Zusammenfassend zeigten die Untersuchungen zur Spezifität des mAk, dass im Wesentlichen die Chinolonstruktur mit Fluor-Atom an C-6 und die β -Ketocarbonsäure als antigene Determinanten fungieren. Größere strukturelle Unterschiede im Vergleich zu dem als Immunogen eingesetzten NOR an der N-1 Position resultieren in einer um etwa Faktor 10 bis 50 (SAR) verringerten Kreuzreaktivität, ebenso wie Änderungen an der C-8-Position. Ein Piperazin-Substituent an C-7 hat positive Auswirkungen auf die Reaktivität, ist aber nicht essentiell, da auch Chinolone mit völlig anderen Ringstrukturen an dieser Stelle oder auch ohne C-7 Substituenten Kreuzreaktion mit dem mAk zeigen.

4.2 Untersuchung von Lebensmitteln tierischen Ursprungs mittels EIA

Immunologische Nachweisverfahren benötigen, im Vergleich zu chromatographischen Methoden, keine komplizierte Probenvorbereitung. Es muss lediglich sichergestellt sein, dass die Probenmatrix weder die Aktivität des Detektionsenzym noch die Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen negativ beeinflusst. Aufgrund der sehr heterogenen Kreuzreaktivität mit den verschiedenen Chinolon-Antibiotika ist der EIA grundsätzlich nicht zur quantitativen Bestimmung dieser Wirkstoffe in Lebensmitteln geeignet, die breite Spezifität des mAk ist aber die ideale Voraussetzung für die Etablierung eines sensitiven Screeningverfahrens für diese Antibiotikaklasse. Zur grundsätzlichen Überprüfung der Eignung des etablierten EIAs zu diesem Zweck wurden für verschiedene Lebensmittel tierischen Ursprungs Aufarbeitungsverfahren entwickelt und für diverse Chinolone anhand von künstlich kontaminierten bzw. gewachsenen Proben (Fleisch) überprüft.

Eine Zusammenfassung der bisher in der Literatur beschriebenen Extraktionsverfahren für Lebensmittel tierischen Ursprungs zur Detektion von Chinolon-Antibiotika findet sich in **Tabelle 6**. Für die Vorbereitung von Milchproben war meistens ein Entfettungs-, sowie weitere Verdünnungsschritte ausreichend (Cao et al., 2011a; Suryoprabowo et al., 2014b; Zhao et al., 2007). Auch in den eigenen Arbeiten reichte eine einfache Zentrifugation als Probenvorbereitung. Die so entfetteten Milchproben konnten im Gegensatz zu bislang publizierten immunchemischen Nachweisen (**Tabelle 6**) ohne weitere Behandlung oder Verdünnungsschritte in den EIA eingesetzt werden, da wie bereits in anderen EIA-basierten Nachweisverfahren für Antibiotika in Milch Probenmatrix-assistierte Kontrollansätze mitgeführt wurden (Bremus et al., 2012; Strasser et al., 2003). Dies resultierte bei allen getesteten und für die Behandlung von Milchtieren zugelassenen Chinolonen in hohen durchschnittlichen Wiederfindungsraten von 88,9 %, die Nachweisgrenzen für die zur Behandlung von milchliefernden Tieren zugelassenen Chinolone bewegten sich im Bereich von 0,08 (MAR) zu 0,4 (CIP).

Für die Extraktion von Chinolonen aus festen Proben wurden meist MeOH/PBS-Lösungen verwendet (Übersicht in **Tabelle 6**), zur weiteren Aufarbeitung der wässrigen Extrakte wurde zudem häufig Hexan als Entfettungsschritt eingesetzt und/oder eine LLE-Aufarbeitung unter Verwendung von organischen Lösungsmitteln durchgeführt (Liu et al., 2013b; Wang et al., 2007). Um den für eventuelle Vor-Ort Analysen problematischen Einsatz von Lösungsmitteln

zu vermeiden, wurde in den eigenen Untersuchungen PBS als Extraktionsmittel eingesetzt. Auch Sheng et al. (2009a,b) verwendeten zur Extraktion einen wässrigen Phosphatpuffer (KH_2PO_4 -Puffer) und erzielten gute Wiederfindungsraten (84 – 105 %) in Fleischmatrices für MAR bzw. DAN. Zur Homogenisierung und Extraktion der Proben wurde in den eigenen Untersuchungen ein Einweg-Homogenisiersystem eingesetzt, die Extraktion und die anschließende Filtration waren innerhalb von wenigen Minuten durchführbar. Dies stellt im Vergleich zu anderen bislang beschriebenen Extraktionsverfahren eine deutliche Zeitersparnis dar, in der Literatur wird über Zeitspannen von 5 bis 30 min (Jinqing et al., 2011a; Li et al., 2008a; Liu et al., 2009; Suryoprabowo et al., 2014b) berichtet, meist gefolgt von Zentrifugationsschritten, die bis zu 1 h in Anspruch nahmen (Lu et al., 2006). Zur Vermeidung von unspezifischen Einflüssen der Probenmatrix auf das Testsystem war eine einfache Verdünnung der Rohextrakte ausreichend. Bei den dotierten Proben konnten für verschiedene Chinolon-Antibiotika hohe durchschnittliche Wiederfindungsraten von 76,2 % (Fleisch), 74,4 % (Fisch) und 77,9 % (Garnelen) bestimmt werden.

Zusammenfassend konnte somit für die Untersuchung von Fleischproben ein einfaches, effizientes, Lösungsmittel-freies und im Prinzip laborunabhängiges Extraktionsverfahren entwickelt werden. Die LC-MS/MS Vergleichsuntersuchungen anhand von gewachsenen kontaminierten Fleischproben bestätigten die grundsätzliche Eignung des Gesamtpaketes (Extraktion, EIA-Analyse) für Screening-Untersuchungen. Die vergleichsweise niedrigen EIA-Analysenwerte für hoch-kontaminierte Proben sind wahrscheinlich auf eine unvollständige Extraktion bedingt durch den Verzicht auf Lösungsmittel zurückzuführen. Dies spielt aber für den Einsatz des EIA-Systems als Screening-Verfahren zur Unterscheidung von belasteten und unbelasteten Proben keine große Rolle.

4.3 Immunaффinitätschromatographische Reinigung

Chromatographische Verfahren benötigen saubere Extrakte, um reproduzierbare und sensitive Nachweise von Hemmstoffrückständen zu ermöglichen. Ein sehr effizientes Aufbereitungsverfahren stellt hierbei die IAC dar, die z.B. in der Mykotoxin-Analytik bei der Analyse von schwierigen Proben wie Gewürzen häufig eingesetzt wird (Şenyuva & Gilbert, 2010; Zhao et al., 2014). Wahrscheinlich bedingt durch das Fehlen von gruppenspezifischen Antikörpern spielt dieses Verfahren im Bereich der Rückstandsanalytik von Antibiotika hingegen bislang nur eine untergeordnete Rolle. Aufgrund der Gruppenspezifität des

hergestellten mAks wurde dessen Eignung für die IAC überprüft, wobei CNBr-aktivierte Sepharose als Festphase diente. Die Ergebnisse zeigten, dass mehr als die Hälfte (52,6 %) der mAk auch nach Kopplung an das Gel Aktivität aufweist, die Antigenbindungskapazität des Immunosorbens lag bei 18,8 nmol Enrofloxacin/ml Gel. Diese Werte liegen damit deutlich höher als von Li et al. (2008b) bzw. Zhao et al. (2009) für IAC-Gele angegebenen Daten: hier lag die Restaktivität des gekoppelten mAk bei nur 11,5 bzw. 5,6 %, die Antigenbindungskapazitäten betragen 5,73 bzw. 4,98 nmol pro ml Gel. In den eigenen Untersuchungen konnte allerdings - wahrscheinlich aufgrund der hohen Affinität des eingesetzten mAk - eine vollständige Elution nur mit reinem Methanol erreicht werden, in vergleichbaren Arbeiten wurden 2 % Essigsäure (Holtzapple et al., 1999) bzw. wässrige MeOH-Mischungen (70 bzw. 90 %) als Elutionsmittel verwendet (Li et al., 2008b; Zhao et al., 2009).

Die Einsetzbarkeit des Gelmaterials wurde anhand von dotierten Milchproben überprüft, die verwendeten Chinolon-Antibiotika deckten das ganze Affinitätsspektrum des mAk ab. Die mittlere Wiederfindungsrate für diese fünf Chinolone lag bei 83,7 %. Auch von Holtzapple et al. (1998) wurde basierend auf einem mAk gegen SAR (Holtzapple et al., 1997) die IAC zur Reinigung von Chinolonen aus Milch eingesetzt, die Wiederfindungsraten lagen in einem ähnlichen Bereich (72 - 90 %). Prinzipiell zeigen die Ergebnisse, dass der hergestellte generische mAk in IAC-Verfahren eingesetzt werden kann, die Gruppenspezifität des Antikörpers erlaubt theoretisch die Extraktion aller Chinolon-Antibiotika aus den verschiedensten Matrices.

Zusammenfassend konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein hochaffiner generischer mAk entwickelt und dessen Einsetzbarkeit in verschiedenen immunchemischen Verfahren (EIA, IAC) demonstriert werden. Für die Herstellung eines generischen mAk wurde erstmals ein NOR-Proteinkonjugat als Immunogen bei Mäusen eingesetzt. Auch die Einsetzbarkeit der einfachen Perjodat-Methode für die schnelle und effiziente Herstellung eines heterologen Enzymkonjugates konnte erstmals gezeigt werden. Zudem wurden einfache und im Prinzip laborunabhängige Probenaufbereitungsverfahren entwickelt. Das etablierte Analysenverfahren erlaubt somit den Nachweis aller Chinolon-Antibiotika weit unterhalb der festgelegten Rückstandshöchstmengen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde ein auf einem hochsensitiven, generischen, monoklonalen Antikörper basierender Enzymimmuntest (EIA) entwickelt, der den gleichzeitigen Nachweis aller für die Behandlung von Lebensmittel-liefernden Tieren zugelassenen Chinolone ermöglicht. Zur Generierung des gruppenspezifischen Antikörpers wurde Norfloxacin mittels Carbodiimid an das Trägerprotein Glucose-Oxidase gekoppelt und zur Immunisierung von Mäusen eingesetzt. Das hergestellte Konjugat erwies sich als hoch immunogen, bei allen immunisierten Tieren konnten spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Nach einer Restimulierung zeigten die Mäuseseren eine hohe Sensitivität und breite Spezifität gegen Chinolon-Antibiotika.

Zur Etablierung und Optimierung des EIA wurden Clinafloxacin und Ciprofloxacin-Ethylendiamin mittels Perjodat- bzw. Norfloxacin mittels aktivem Ester an Peroxidase (HRP) gekoppelt. Mit dem Hapten-heterologen Enzymkonjugat (Clinafloxacin-HRP) konnte im EIA die höchste Sensitivität erreicht werden, die Nachweisgrenze für Norfloxacin lag bei 0,02 ng/ml.

Diejenigen Chinolone, für die Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln festgelegt sind, konnten mit dem etablierten EIA hoch sensitiv nachgewiesen werden, die 50 %-Dosen lagen in einem Bereich von 0,16 ng/ml (Marbofloxacin) bis 3,82 ng/ml (Sarafloxacin). Zusätzlich ermöglicht der EIA die Detektion von 22 weiteren Chinolonen in einem Nachweisbereich von 0,02 ng/ml (Nadifloxacin) bis zu 32,0 ng/ml (Pradofloxacin). Somit könnten mit diesem EIA auch Rückstände von illegal eingesetzten Chinolonen in Lebensmitteln detektiert werden.

Die Anwendbarkeit des EIA wurde mit dotierten Milch-, Garnelen-, Fleisch- und Fischproben, sowie natürlich gewachsenen Fleischproben (Rind und Kalb) überprüft, wobei die durchschnittlichen Wiederfindungsraten für dotierte Proben bei 88,9 % (Milch), 76,2 % (Fleisch), 74,4 % (Fisch) bzw. 77,9 % (Garnelen) lagen. Der Vergleich der Ergebnisse von EIA und LC-MS/MS für natürlich kontaminierte Proben zeigte eine hohe Übereinstimmung.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der entwickelte hochaffine mAk zur immunaffinitätschromatographischen Anreicherung und Reinigung von Chinolonen aus Milch geeignet ist. Die durchschnittlichen Wiederfindungsraten lagen bei fünf überprüften Chinolon-Antibiotika in einem Bereich von 72,8 % bis 90,8 %.

6. SUMMARY

Development and application of generic monoclonal antibodies for the detection of quinolone antibiotics in food

In this study, an enzyme immunoassay (EIA) was developed based on a highly sensitive, generic monoclonal antibody, which allows the simultaneous detection of all quinolones approved for the treatment of food-producing animals. To generate the group-specific antibody, norfloxacin was conjugated to the carrier protein glucose oxidase using carbodiimide and the resulting conjugate was used for immunization of mice. The produced conjugate was found to be highly immunogenic, specific antibodies could be detected in all immunized animals. After a restimulation, the mice sera showed high sensitivity and broad specificity against quinolone antibiotics.

To establish and optimize the EIA, clinafloxacin and ciprofloxacin-ethylenediamine were conjugated to peroxidase (HRP) using a periodate method. Norfloxacin was conjugated to HRP using an active ester method. With the hapten-heterologous enzyme conjugate (clinafloxacin-HRP) the highest assay sensitivity was achieved, the detection limit for norfloxacin was at 0.02 ng/ml.

All quinolones, for which maximum residue limits in food have been set within the EU, could be detected with high sensitivity in the established EIA. The IC_{50} values ranged from 0.16 ng/ml (marbofloxacin) to 3.82 ng/ml (sarafloxacin). In addition, the EIA shows reactivity with 22 other quinolones, the detection limits ranged from 0.02 ng/ml for nadifloxacin to 32.0 ng/ml for pradofloxacin. Thus, the established EIA could be potentially applied for the detection of illegally used quinolones in food.

The applicability of the EIA was checked with spiked milk, shrimp, meat and fish samples as well as samples of naturally contaminated meat (beef and calf meat). The mean recovery of quinolones in spiked samples were 88.9 % (milk), 76.2 % (meat), 74.4 % (fish) and 77.9 % (shrimp). A high correlation was observed between EIA and LC-MS/MS when analyzing contaminated beef and calf meat.

In addition, it was shown that the developed high-affinity mAb is suitable for immunoaffinity chromatography enrichment and purification of quinolones in milk. The mean recovery rates for five quinolone antibiotics ranged from 72.8 % to 90.8 %.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Abi-Ghanem, D. A., & Berghman, L. R. (2012). Immunoaffinity chromatography: a review, Affinity Chromatography, Dr. Sameh Magdeldin (Ed.), ISBN: 978-953-51-0325-7, InTech, <http://www.intechopen.com/books/affinity-chromatography/immunoaffinity-chromatography-a-review> (abgerufen 23.03.2014).

Aldred, K. J., Kerns, R. J., & Osheroff, N. (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, 53(10), 1565-1574.

Andersson, M. I., & MacGowan, A. P. (2003). Development of the quinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(suppl 1), 1-11.

Andreu, V., Blasco, C., & Pico, Y. (2007). Analytical strategies to determine quinolone residues in food and the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(6), 534-556.

Andriole, V. T. (2005). The quinolones: past, present, and future. *Clinical Infectious Diseases*, 41(Supplement 2), S113-S119.

Arroyo-Manzanares, N., Huertas-Pérez, J. F., Lombardo-Agüí, M., Gámiz-Gracia, L., & García-Campaña, A. M. (2015). A high-throughput method for the determination of quinolones in different matrices by ultra-high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical Methods*, 7(1), 253-259.

Asif, M. (2015). Role of quinolones and quinoxaline derivatives in the advancement of treatment of tuberculosis. *International Journal of Scientific World*, 3(1), 18-36.

Barani, A., & Fallah, A. A. (2014). Occurrence of tetracyclines, sulfonamides, fluoroquinolones and florfenicol in farmed rainbow trout in Iran. *Food and Agricultural Immunology*, 1-10. 26(3), 420-429

Bilandžić, N., Kolanović, B. S., Varenina, I., Scortichini, G., Annunziata, L., Brstilo, M., & Rudan, N. (2011). Veterinary drug residues determination in raw milk in Croatia. *Food Control*, 22(12), 1941-1948.

Blasco, C., & Picó, Y. (2012). Development of an improved method for trace analysis of quinolones in eggs of laying hens and wildlife species using molecularly imprinted polymers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(44), 11005-11014.

Blum, M. D., Graham, D. J., & McCloskey, C. A. (1994). Temafloxacin syndrome: review of 95 cases. *Clinical infectious diseases*, 18(6), 946-950.

Bradley, J. S., & Jackson, M. A. (2011). The use of systemic and topical fluoroquinolones. *Pediatrics*, 128(4), e1034-e1045.

Bremus, A., Dietrich, R., Dettmar, L., Usleber, E., & Martlbauer, E. (2012). A broadly applicable approach to prepare monoclonal anti-cephalosporin antibodies for immunochemical residue determination in milk. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(2), 503-515.

Bucknall, S., Silverlight, J., Coldham, N., Thorne, L., & Jackman, R. (2003). Antibodies to the quinolones and fluoroquinolones for the development of generic and specific immunoassays for detection of these residues in animal products. *Food Additives and Contaminants*, 20(3), 221-228.

Burkin, M. A. (2008). Enzyme-linked immunosorbent assays of fluoroquinolones with selective and group specificities. *Food and Agricultural Immunology*, 19(2), 131-140.

BVL (2014). Dritte Datenerhebung zur Antibiotikaabgabe in der Tiermedizin, http://www.bvl.bund.de/DE/08_PresseInfothek/01_FuerJournalisten/01_Presse_und_Hintergrundinformationen/05_Tierarzneimittel/2014/2014_08_01_pi_Abgabemengen_korrigiert_29_08_2014.html (abgerufen 20.03.2015).

Cao, L., Kong, D., Sui, J., Jiang, T., Li, Z., Ma, L., & Lin, H. (2009). Broad-specific antibodies for a generic immunoassay of quinolone: development of a molecular model for selection of haptens based on molecular field-overlapping. *Analytical Chemistry*, 81(9), 3246-3251.

Cao, Z., Lu, S., Liu, J., Zhan, J., Meng, M., & Xi, R. (2011a). Preparation of anti-lomefloxacin antibody and development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of lomefloxacin residue in milk. *Analytical Letters*, 44(6), 1100-1113.

Cao, L., Sui, J., Kong, D., Li, Z., & Lin, H. (2011b). Generic immunoassay of quinolones: production and characterization of anti-pefloxacin antibodies as broad selective receptors. *Food Analytical Methods*, 4(4), 517-524.

Catherine, M. O., & Gary, M. G. (2002). Quinolones: a comprehensive review. *American Family Physician*, 65(3), 455-465.

Cheng, G., Hao, H., Dai, M., Liu, Z., & Yuan, Z. (2013). Antibacterial action of quinolones: from target to network. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 66, 555-562.

Cho, H. J., Yi, H., Cho, S. M., Lee, D. G., Cho, K., Abd El-Aty, A. M., Shim, J. H., Lee, S. H., Jeong, J. Y., & Shin, H. C. (2010). Single-step extraction followed by LC for determination of (fluoro) quinolone drug residues in muscle, eggs, and milk. *Journal of Separation Science*, 33(8), 1034-1043.

Choi, S. H., Kim, E. Y., & Kim, Y. J. (2013). Systemic use of fluoroquinolone in children. *Korean Journal of Pediatrics*, 56(5), 196-201.

Chung, H. H., Lee, J. B., Chung, Y. H., & Lee, K. G. (2009). Analysis of sulfonamide and quinolone antibiotic residues in Korean milk using microbial assays and high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 113(1), 297-301.

Cui, J., Zhang, K., Huang, Q., Yu, Y., & Peng, X. (2011). An indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for determination of norfloxacin in waters using a specific polyclonal antibody. *Analytica Chimica Acta*, 688(1), 84-89.

De Sarro, A., & De Sarro, G. (2001). Adverse reactions to fluoroquinolones. An overview on mechanistic aspects. *Current Medicinal Chemistry*, 8(4), 371-384.

Díaz-Alvarez, M., Turiel, E., & Martín-Esteban, A. (2009). Selective sample preparation for the analysis of (fluoro) quinolones in baby food: molecularly imprinted polymers versus anion-exchange resins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(3), 899-905.

Dietrich, R., Usleber, E., & Martlbauer, E. (1998). The potential of monoclonal antibodies against ampicillin for the preparation of a multi-immunoaffinity chromatography for penicillins. *Analyst*, 123(12), 2749-2754.

Ding, K., Zhao, C., Cao, Z., Liu, Z., Liu, J., Zhan, J., Ma, C., & Xi, R. (2009). Chemiluminescent detection of gatifloxacin residue in milk. *Analytical Letters*, 42(3), 505-518.

Duan, J., & Yuan, Z. (2001). Development of an indirect competitive ELISA for ciprofloxacin residues in food animal edible tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1087-1089.

Ebrahimzadeh Attari, V., Mesgari Abbasi, M., Abedimanesh, N., Ostadrahimi, A., & Gorbani, A. (2014). Investigation of enrofloxacin and chloramphenicol residues in broiler chickens carcasses collected from local markets of tabriz, northwestern iran. *Health Promotion Perspectives*, 4(2), 151-157.

Emmerson, A. M., & Jones, A. M. (2003). The quinolones: decades of development and use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51 Suppl 1, 13-20.

Er, B., Onurdağ, F., Kaynak-Demirhan, B., Özgacar, S. Ö., Öktem, A. B., & Abbasoğlu, U. (2013). Screening of quinolone antibiotic residues in chicken meat and beef sold in the markets of Ankara, Turkey. *Poultry Science*, 92(8), 2212-2215.

Evangelopoulou, E. N., & Samanidou, V. F. (2013). HPLC confirmatory method development for the determination of seven quinolones in salmon tissue (*Salmo salar* L.) validated according to the European Union Decision 2002/657/EC. *Food Chemistry*, 136(2), 479-484.

Fan, G., Yang, R., Jiang, J., Chang, X., Chen, J., Qi, Y., Wu, S., & Yang, X. (2012). Development of a class-specific polyclonal antibody-based indirect competitive ELISA for detecting fluoroquinolone residues in milk. *Journal of Zhejiang University Science B*, 13(7), 545-554.

Fernandez, F., Pinacho, D. G., Sanchez-Baeza, F., & Marco, M. P. (2011). Portable surface plasmon resonance immunosensor for the detection of fluoroquinolone antibiotic residues in milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), 5036-5043.

Gajda, A., Posyniak, A., Zmudzki, J., Gbylik, M., & Bladdek, T. (2012). Determination of (fluoro) quinolones in eggs by liquid chromatography with fluorescence detection and confirmation by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 135(2), 430-439.

Galarini, R., Saluti, G., Giusepponi, D., Rossi, R., & Moretti, S. (2015). Multiclass determination of 27 antibiotics in honey. *Food Control*, 48, 12-24.

Gärtner, A. (2006). Entwicklung und Charakterisierung von Enzymimmuntests für den Nachweis von Fluorchinolonen. *Diss.med.vet.*, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Haasnoot, W., Gercek, H., Cazemier, G., & Nielen, M. W. (2007). Biosensor immunoassay for flumequine in broiler serum and muscle. *Analytica Chimica Acta*, 586(1-2), 312-318.

Hauck, R., Wallmann, J., & Heberer, T. (2015). Antibiotikaresistenz: Eine sachliche Auseinandersetzung nach der Artikelserie in "die Zeit". Deutsches Tierärzteblatt, 63(3), 332-337.

Heering, W., Usleber, E., Dietrich, R., & Märtlbauer, E. (1998). Immunochemical screening for antimicrobial drug residues in commercial honey. Analyst, 123(12), 2759-2762.

Herrera-Herrera, A. V., Hernández-Borges, J., Rodríguez-Delgado, M. A., Herrero, M., & Cifuentes, A. (2011). Determination of quinolone residues in infant and young children powdered milk combining solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1218(42), 7608-7614.

Hoang, T. T. T., Tu, L. T. C., Le, N. P., Dao, Q. P., & Trinh, P. H. (2012). Fate of fluoroquinolone antibiotics in Vietnamese coastal wetland ecosystem. Wetlands Ecology and Management, 20(5), 399-408.

Holtzapple, C. K., Buckley, S. A., & Stanker, L. H. (1997). Production and characterization of monoclonal antibodies against sarafloxacin and cross-reactivity studies of related fluoroquinolones. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45(5), 1984-1990.

Holtzapple, C., Buckley, S., & Stanker, L. H. (1998). Determination of four fluoroquinolones in milk by on-line immunoaffinity capture coupled with reversed-phase liquid chromatography. Journal of AOAC International, 82(3), 607-613.

Holtzapple, C. K., Buckley, S. A., & Stanker, L. H. (1999). Immunosorbents coupled on-line with liquid chromatography for the determination of fluoroquinolones in chicken liver. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(7), 2963-2968.

Hu, K., Huang, X., Jiang, Y., Fang, W., & Yang, X. (2010). Monoclonal antibody based enzyme-linked immunosorbent assay for the specific detection of ciprofloxacin and enrofloxacin residues in fishery products. Aquaculture, 310(1), 8-12.

Huang, B., Yin, Y., Lu, L., Ding, H., Wang, L., Yu, T., Zhu, J., Zheng, X., & Zhang, Y. (2010). Preparation of high-affinity rabbit monoclonal antibodies for ciprofloxacin and development of an indirect competitive ELISA for residues in milk. *Journal of Zhejiang University-Science B*, 11(10), 812-818.

Huet, A. C., Charlier, C., Tittlemier, S. A., Singh, G., Benrejeb, S., & Delahaut, P. (2006). Simultaneous determination of (fluoro)quinolone antibiotics in kidney, marine products, eggs, and muscle by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(8), 2822-2827.

Huet, A. C., Charlier, C., Singh, G., Godefroy, S. B., Leivo, J., Vehniainen, M., Nielen, M. W. F., Weigel, S., & Delahaut, P. (2008). Development of an optical surface plasmon resonance biosensor assay for (fluoro)quinolones in egg, fish, and poultry meat. *Analytica Chimica Acta*, 623(2), 195-203.

Ibarra, I. S., Rodriguez, J. A., Páez-Hernández, M. E., Santos, E. M., & Miranda, J. M. (2012). Determination of quinolones in milk samples using a combination of magnetic solid-phase extraction and capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 33(13), 2041-2048.

Idowu, O. R., Peggins, J. O., Cullison, R., & von Bredow, J. (2010). Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in lactating dairy cows and beef steers following intravenous administration of enrofloxacin. *Research in Veterinary Science*, 89(2), 230-235.

Jiang, W., Wang, Z., Beier, R. C., Jiang, H., Wu, Y., & Shen, J. (2013). Simultaneous determination of 13 fluoroquinolone and 22 sulfonamide residues in milk by a dual-colorimetric enzyme-linked immunosorbent assay. *Analytical Chemistry*, 85(4), 1995-1999.

Jiménez, V., Companyó, R., & Guiteras, J. (2011). Validation of a method for the analysis of nine quinolones in eggs by pressurized liquid extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *Talanta*, 85(1), 596-606.

Jinqing, J., Haitang, Z., Junwei, L., Junmin, L., & Ziliang, W. (2011a). Development and optimization of an indirect competitive ELISA for detection of norfloxacin residue in chicken liver. *Procedia Environmental Sciences*, 8, 128-133.

Jinqing, J., Haitang, Z., Yonghua, Q., Yongyao, C., & Ziliang, W. (2011b). Production and characterization of monoclonal antibodies against norfloxacin. *Procedia Environmental Sciences*, 8, 529-535.

Junjie, C., Ping, C., & Jinqing, J. (2011). Production and characterization of monoclonal antibodies against marbofloxacin. *International Conference on Human Health and Biomedical Engineering* 19 - 22. 08. 2011, Institute of Electrical and Electronics Engineers Xplore Digital Library, 1204-1207,

<http://ieeexplore.ieee.org/xpl/articleDetails.jsp?arnumber=6029044> (abgerufen 23.03.2015).

Junza, A., Dorival-García, N., Zafra-Gómez, A., Barrón, D., Ballesteros, O., Barbosa, J., & Navalón, A. (2014). Multiclass method for the determination of quinolones and β -lactams, in raw cow milk using dispersive liquid-liquid microextraction and ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1356, 10-22.

Kato, M., Ihara, Y., Nakata, E., Miyazawa, M., Sasaki, M., Kodaira, T., & Nakazawa, H. (2007). Development of enrofloxacin ELISA using a monoclonal antibody tolerating an organic solvent with broad cross-reactivity to other newquinolones. *Food and Agricultural Immunology*, 18(3-4), 179-187.

Kaufmann, A., Butcher, P., Maden, K., Walker, S., & Widmer, M. (2014). Multi-residue quantification of veterinary drugs in milk with a novel extraction and cleanup technique: Salting out supported liquid extraction (SOSLE). *Analytica Chimica Acta*, 820, 56-68.

Leivo, J., Chappuis, C., Lamminmaki, U., Lovgren, T., & Vehniainen, M. (2011). Engineering of a broad-specificity antibody: detection of eight fluoroquinolone antibiotics simultaneously. *Analytical Biochemistry*, 409(1), 14-21.

Lesher, G. Y., Froelich, E. J., Gruett, M. D., Bailey, J. H., & Brundage, R. P. (1962). 1, 8-Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 5(5), 1063-1065.

Li, Y., Ji, B., Chen, W., Liu, L., Xu, C., Peng, C., & Wang, L. (2008a). Production of new class-specific polyclonal antibody for determination of fluoroquinolones antibiotics by indirect competitive ELISA. *Food and Agricultural Immunology*, 19(4), 251-264.

Li, C., Wang, Z., Cao, X., Beier, R. C., Zhang, S., Ding, S., Li, X., & Shen, J. (2008b). Development of an immunoaffinity column method using broad-specificity monoclonal antibodies for simultaneous extraction and cleanup of quinolone and sulfonamide antibiotics in animal muscle tissues. *Journal of Chromatography A*, 1209(1), 1-9.

Li, W., Shi, Y., Gao, L., Liu, J., & Cai, Y. (2012). Occurrence of antibiotics in water, sediments, aquatic plants, and animals from Baiyangdian Lake in North China. *Chemosphere*, 89(11), 1307-1315.

Linder, J. A., Huang, E. S., Steinman, M. A., Gonzales, R., & Stafford, R. S. (2005). Fluoroquinolone prescribing in the United States: 1995 to 2002. *The American Journal of Medicine*, 118(3), 259-268.

Liu, Z., Lu, S., Zhao, C., Ding, K., Cao, Z., Zhan, J., Ma, C., Liu, J., & Xi, R. (2009). Preparation of anti-danofloxacin antibody and development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of danofloxacin residue in chicken liver. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(7), 1115-1121.

Liu, Y. Z., Zhao, G. X., Wang, P., Liu, J., Zhang, H. C., & Wang, J. P. (2013a). Production of the broad specific monoclonal antibody against sarafloxacin for rapid immunoscreening of 12 fluoroquinolones in meat. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 48(2), 139-146.

Liu, Y., Zhao, G., Liu, J., Zhang, H., Wang, P., & Wang, J. (2013b). Synthesis of novel haptens against ciprofloxacin and production of generic monoclonal antibodies for immunoscreening of fluoroquinolones in meat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(6), 1370-1377.

Liu, L., Luo, L., Suryoprabowo, S., Peng, J., Kuang, H., & Xu, C. (2014). Development of an immunochromatographic strip test for rapid detection of ciprofloxacin in milk samples. *Sensors*, 14(9), 16785-16798.

Lombardo-Agüí, M., García-Campaña, A. M., Gámiz-Gracia, L., & Blanco, C. C. (2010). Laser induced fluorescence coupled to capillary electrophoresis for the determination of fluoroquinolones in foods of animal origin using molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography A*, 1217(15), 2237-2242.

Lombardo-Agüí, M., Gámiz-Gracia, L., Cruces-Blanco, C., & García-Campaña, A. M. (2011). Comparison of different sample treatments for the analysis of quinolones in milk by capillary-liquid chromatography with laser induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1218(30), 4966-4971.

Lombardo-Agüí, M., García-Campaña, A. M., Cruces-Blanco, C., & Gámiz-Gracia, L. (2015). Determination of quinolones in fish by ultra-high performance liquid chromatography with fluorescence detection using QuEChERS as sample treatment. *Food Control*, 50, 864-868.

Lu, S., Zhang, Y., Liu, J., Zhao, C., Liu, W., & Xi, R. (2006). Preparation of anti-pefloxacin antibody and development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of pefloxacin residue in chicken liver. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), 6995-7000.

Manaspong, C., Wongphanit, P., Palaga, T., Puthong, S., Sooksai, S., & Komolpis, K. (2013). Production and characterization of a monoclonal antibody against enrofloxacin. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(1), 69-75.

Märtlbauer, E. (1993). Enzymimmuntests für antimikrobiell wirksame Stoffe. Enke Verlag, Stuttgart.

Mehlhorn, A. J., & Brown, D. A. (2007). Safety concerns with fluoroquinolones. *Annals of Pharmacotherapy*, 41(11), 1859-1866.

Meng, H., Chen, G., Guo, X., Chen, P., Cai, Q., & Tian, Y. (2014). Determination of five quinolone antibiotic residues in foods by micellar electrokinetic capillary chromatography with quantum dot indirect laser-induced fluorescence. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(13), 3201-3208.

Mi, T., Wang, Z., Eremin, S. A., Shen, J., & Zhang, S. (2013). Simultaneous determination of multiple (fluoro) quinolone antibiotics in food samples by a one-step fluorescence polarization immunoassay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(39), 9347-9355.

Mitscher, L. A. (2005). Bacterial topoisomerase inhibitors: quinolone and pyridone antibacterial agents. *Chemical Reviews*, 105(2), 559-592.

Moreno-Gonzalez, D., Lara, F. J., Gamiz-Gracia, L., & Garcia-Campana, A. M. (2014). Molecularly imprinted polymer as in-line concentrator in capillary electrophoresis coupled with mass spectrometry for the determination of quinolones in bovine milk samples. *Journal of Chromatography A*, 1360, 1-8.

Nelson, J. M., Chiller, T. M., Powers, J. H., & Angulo, F. J. (2007). Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* species and the withdrawal of fluoroquinolones from use in poultry: a public health success story. *Clinical Infectious Diseases*, 44(7), 977-980.

Nizamlioglu, F., & Aydın, H. (2012). Quinolone antibiotic residues in raw milk and chicken liver in Konya. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, 28(3), 154-158.

Owens, R. C., & Ambrose, P. G. (2005). Antimicrobial safety: focus on fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases*, 41(Supplement 2), S144-S157.

Pham, D. K., Chu, J., Do, N. T., Brose, F., Degand, G., Delahaut, P., De Pauw, E., Douny, C., Van Nguyen, K., Vu, T. D., Scippo, M.-L., & Wertheim, H. F. L. (2015). Monitoring Antibiotic Use and Residue in Freshwater Aquaculture for Domestic Use in Vietnam. *EcoHealth*

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10393-014-1006-z> (abgerufen 23.03.2015)

Pinacho, D. G., Sanchez-Baeza, F., & Marco, M. P. (2012). Molecular modeling assisted hapten design to produce broad selectivity antibodies for fluoroquinolone antibiotics. *Analytical Chemistry*, 84(10), 4527-4534.

Rádl, S. (1990). Structure-activity relationships in DNA gyrase inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics*, 48(1), 1-17.

Rejeb, S. B., Cléroux, C., Lawrence, J. F., Geay, P. Y., Wu, S., & Stavinski, S. (2001). Development and characterization of immunoaffinity columns for the selective extraction of a new developmental pesticide: Thifluzamide, from peanuts. *Analytica Chimica Acta*, 432(2), 193-200.

Roden, D. M. (2004). Drug-induced prolongation of the QT interval. *New England Journal of Medicine*, 350(10), 1013-1022.

Rubinstein, E. (2001). History of quinolones and their side effects. *Chemotherapy*, 47(Suppl. 3), 3-8.

Ruiz-Viceo, J. M., Rosales-Conrado, N., Guillen-Casla, V., Pérez-Arribas, L. V., León-González, M. E., & Polo-Díez, L. M. (2012). Fluoroquinolone antibiotic determination in bovine milk using capillary liquid chromatography with diode array and mass spectrometry detection. *Journal of Food Composition and Analysis*, 28(2), 99-106.

Scholar, E. M. (2002). Fluoroquinolones: past, present and future of a novel group of antibacterial agents. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 66(2), 164-171.

Şenyuva, H. Z., & Gilbert, J. (2010). Immunoaffinity column clean-up techniques in food analysis: a review. *Journal of Chromatography B*, 878(2), 115-132.

Sheng, W., Xia, X., Wei, K., Li, J., Li, Q., & Xu, T. (2009a). Determination of marbofloxacin residues in beef and pork with an enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(13), 5971-5975.

Sheng, W., Xu, T., Ma, H., Wang, X., Li, Q., & Li, J. (2009b). Development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of danofloxacin residues in beef, chicken and pork meats. *Food and Agricultural Immunology*, 20(1), 35-47.

Sheng, W., Li, Y., Xu, X., Yuan, M., & Wang, S. (2011). Enzyme-linked immunosorbent assay and colloidal gold-based immunochromatographic assay for several (fluoro) quinolones in milk. *Microchimica Acta*, 173(3-4), 307-316.

Sörgel, F., Metz, R., Morgenroth, A., & Naber, K. (1989). Enoxacin—Pharmakokinetik und Gewebepenetration im Vergleich. *Infection*, 17(1), S14-S18.

Stoilova, N. A., Surleva, A. R., & Stoev, G. (2013). Simultaneous determination of nine quinolones in food by liquid chromatography with fluorescence detection. *Food Analytical Methods*, 6(3), 803-813.

Strasser, A., Dietrich, R., Usleber, E., & Märtlbauer, E. (2003). Immunochemical rapid test for multiresidue analysis of antimicrobial drugs in milk using monoclonal antibodies and hapten–glucose oxidase conjugates. *Analytica Chimica Acta*, 495(1), 11-19.

Suryoprabowo, S., Liu, L., Peng, J., Kuang, H., & Xu, C. (2014a). Antibody for the development of specific immunoassays to detect nadifloxacin in chicken muscles. *Food and Agricultural Immunology*, 26(3), 317-324.

Suryoprabowo, S., Liu, L., Peng, J., Kuang, H., & Xu, C. (2014b). Development of a Broad Specific Monoclonal Antibody for Fluoroquinolone Analysis. *Food Analytical Methods*, 7(10), 2163-2168.

Tao, X., Chen, M., Jiang, H., Shen, J., Wang, Z., Wang, X., Wu, X., & Wen, K. (2013). Chemiluminescence competitive indirect enzyme immunoassay for 20 fluoroquinolone residues in fish and shrimp based on a single-chain variable fragment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(23), 7477-7484.

Tittlemier, S. A., Van de Riet, J., Burns, G., Potter, R., Murphy, C., Rourke, W., Pearce, H., & Dufresne, G. (2007). Analysis of veterinary drug residues in fish and shrimp composites collected during the Canadian Total Diet Study, 1993-2004. *Food Additives & Contaminants*, 24(1), 14-20.

Tittlemier, S. A., Gélinas, J.-M., Dufresne, G., Haria, M., Querry, J., Cleroux, C., Ménard, C., Delahaut, P., Singh, G., Fischer-Durand, N., & Godefroy, S. B. (2008). Development of a direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of fluoroquinolone residues in shrimp. *Food Analytical Methods*, 1(1), 28-35.

Van Coillie, E., De Block, J., & Reybroeck, W. (2004). Development of an indirect competitive ELISA for flumequine residues in raw milk using chicken egg yolk antibodies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(16), 4975-4978.

Van Doorslaer, X., Dewulf, J., Van Langenhove, H., & Demeestere, K. (2014). Fluoroquinolone antibiotics: an emerging class of environmental micropollutants. *Science of The Total Environment*, 500-501, 250-269.

Verordnung (EU) 37/2010, Der Kommission vom 22. Dezember 2009 über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs (ABl. L 15 vom 20.1.2010, S. 1)

Wang, Z., Zhu, Y., Ding, S., He, F., Beier, R. C., Li, J., Jiang, H., Feng, C., Wan, Y., Zhang, S., Kai, Z., Yang, X., & Shen, J. (2007). Development of a monoclonal antibody-based broad-specificity ELISA for fluoroquinolone antibiotics in foods and molecular modeling studies of cross-reactive compounds. *Analytical Chemistry*, 79(12), 4471-4483.

Wang, Y., Shen, Y., Xu, Z., Lei, H., Wang, H., & Sun, Y. (2010). Production and identification of monoclonal antibody against flumequine and development of indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 38(3), 313-317.

Watanabe, H., Satake, A., Kido, Y., & Tsuji, A. (2002). Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for enrofloxacin in biological matrices. *Analyst*, 127(1), 98-103.

Wen, K., Nolke, G., Schillberg, S., Wang, Z., Zhang, S., Wu, C., Jiang, H., Meng, H., & Shen, J. (2012). Improved fluoroquinolone detection in ELISA through engineering of a broad-specific single-chain variable fragment binding simultaneously to 20 fluoroquinolones. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(9), 2771-2783.

WHO (2011a). Fluoroquinolone use in paediatrics: focus on safety and place in therapy. http://www.who.int/selection_medicines/committees/expert/18/applications/fluoroquinolone_review.pdf (abgerufen 21.03.2015).

WHO (2011b). Critically important antimicrobials for human medicine, 3rd Revision. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77376/1/9789241504485_eng.pdf (abgerufen 20.03.2015)

Wiles, J. A., Bradbury, B. J., & Pucci, M. J. (2010). New quinolone antibiotics: a survey of the literature from 2005 to 2010. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 20(10), 1295-1319.

Xinyao, C., Jinqing, J., Zhixing, A., Junwei, L., & Guoying, F. (2011a). Development of monoclonal immunoassays for the determination of lomefloxacin residue. *International Symposium on the Water Resource and Environmental Protection*, Institute of Electrical and Electronics Engineers Xplore Digital Library, 2891-2895
<http://ieeexplore.ieee.org/xpl/articleDetails.jsp?arnumber=5893481> (abgerufen: 23.03.2015).

Xinyao, C., Jinqing, J., Junwei, L., Zhixing, A., & Guoying, F. (2011b). Development of a Polyclonal Antibody Based iCELISA Method for Detecting Marbofloxacin Residue. The 3rd International Workshop on Intelligent Systems and Applications, Institute of Electrical and Electronics Engineers Xplore Digital Library, 1-4

<http://ieeexplore.ieee.org/xpl/articleDetails.jsp?arnumber=5873405> (abgerufen: 23.03.2015).

Yu, H., Tao, Y., Chen, D., Pan, Y., Liu, Z., Wang, Y., Huang, L., Dai, M., Peng, D., Wang, X., & Yuan Z. (2012). Simultaneous determination of fluoroquinolones in foods of animal origin by a high performance liquid chromatography and a liquid chromatography tandem mass spectrometry with accelerated solvent extraction. *Journal of Chromatography B*, 885, 150-159.

Zhang, H., Chen, S., Lu, Y., & Dai, Z. (2010). Simultaneous determination of quinolones in fish by liquid chromatography coupled with fluorescence detection: Comparison of sub-2 μm particles and conventional C18 columns. *Journal of Separation Science*, 33(13), 1959-1967.

Zhao, C., Liu, W., Ling, H., Lu, S., Zhang, Y., Liu, J., & Xi, R. (2007). Preparation of anti-gatifloxacin antibody and development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of gatifloxacin residue in milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(17), 6879-6884.

Zhao, Y., Zhang, G., Liu, Q., Teng, M., Yang, J., & Wang, J. (2008). Development of a Lateral Flow Colloidal Gold Immunoassay Strip for the Rapid Detection of Enrofloxacin Residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(24), 12138-12142.

Zhao, S., Li, X., Ra, Y., Li, C., Jiang, H., Li, J., Qu, Z., Zhang, S., He, F., Wan, Y., Feng, C., Zheng, Z., & Shen, J. (2009). Developing and optimizing an immunoaffinity cleanup technique for determination of quinolones from chicken muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(2), 365-371.

Zhao, X., Yuan, Y., Zhang, X., & Yue, T. (2014). Identification of ochratoxin A in Chinese spices using HPLC fluorescent detectors with immunoaffinity column cleanup. *Food Control*, 46, 332-337.

Zheng, N., Wang, J., Han, R., Xu, X., Zhen, Y., Qu, X., Sun, P., Li, S., & Yu, Z. (2013). Occurrence of several main antibiotic residues in raw milk in 10 provinces of China. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 6(2), 84-89.

Zhou, J., Xue, X., Chen, F., Zhang, J., Li, Y., Wu, L., Chen, L., & Zhao, J. (2009). Simultaneous determination of seven fluoroquinolones in royal jelly by ultrasonic-assisted extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Separation Science*, 32(7), 955-964.

Zhu, K., Li, J., Wang, Z., Jiang, H., Beier, R. C., Xu, F., Shen, J., & Ding, S. (2011). Simultaneous detection of multiple chemical residues in milk using broad-specificity antibodies in a hybrid immunosorbent assay. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(5), 2716-2719.

Zhu, Y., Li, L., Wang, Z., Chen, Y., Zhao, Z., Zhu, L., Wu, X., Wan, Y., He, F., & Shen, J. (2008). Development of an immunochromatography strip for the rapid detection of 12 fluoroquinolones in chicken muscle and liver. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5469-5474.

8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Grundstrukturen der Chinolon-Antibiotika sowie tabellarische Auflistung derzeit zu medizinischen Zwecken eingesetzter Wirkstoffe.	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Wirkspektrums der vier Generationen von Chinolon-Antibiotika	7
Abbildung 3: Prinzipielle Durchführung der immunoaffinitätschromatographischen Reinigung	38
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Carbodiimid-Kopplungsverfahrens	44
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Perjodat-Kopplungsverfahrens	46
Abbildung 6: UV-Spektren von Norfloxacin-GlcOX-Konjugat bzw. nicht konjugierten Ausgangssubstanzen.....	47
Abbildung 7: UV-Spektren von Clinafloxacin-Konjugat bzw. nicht konjugierten Ausgangssubstanzen.....	47
Abbildung 8: Mittels EIA nachweisbare Antikörper-Titer in den mit NOR-GlcOX immunisierten Mäusen	50
Abbildung 9: Einfluss verschiedener Chinolon-HRP Konjugate auf die Empfindlichkeit des direkten EIA	52
Abbildung 10: Schematische Darstellung des direkten EIA-Systems zum Nachweis von Chinolon-Antibiotika	55
Abbildung 11: Standardkurven für den Nachweis von Chinolone-Antibiotika mit mAk 5H8	56
Abbildung 12: Standardkurven der in Humanmedizin bzw. Tiermedizin eingesetzten Chinolone	60
Abbildung 13: Vergleichende Darstellung von Standardkurven für Danofloxacin und Marbofloxacin in PBS bzw. rekonstituiertem Magermilchpulver	67

Abbildung 14: Relative EIA-Absorptionswerte nach Einsatz von Chinolon-freien Lachs-, Garnelen- und Fleischextrakten in den EIA	72
Abbildung 15: Vergleich der Messergebnisse für Chinolone (n=6) in Fleischproben nach Bestimmung mittels EIA bzw. LC-MS	77
Abbildung 16: Überprüfung der Kopplung des mAk 5H8 an CNBr-aktivierte Sepharose	79
Abbildung 17: Sequenzielle Eluierung von Enrofloxacin mittels dreier verschiedener Elutionsmittel	80
Abbildung 18: Kreuzreaktivität des mAk mit Chinolon-Antibiotika. Die Wirkstoffe wurden entsprechend der relativen Kreuzreaktivität in absteigender (von Spalte 1 zu Spalte 3) Reihenfolge angeordnet.....	87

9. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Rückstands-Höchstmengen für Chinolon-Antibiotika in Lebensmitteln tierischen Ursprungs, nach Verordnung (EU) 37/2010	10
Tabelle 2: Ausgewählte chromatographische Verfahren zum Nachweis von Chinolon-Antibiotika in Lebensmitteln.....	17
Tabelle 3: Übersicht über Substanzspezifische monoklonale und polyklonale Antikörper zum Nachweis von Chinolonen	22
Tabelle 4: Übersicht über polyklonale Antiseren mit breiter Reaktivität gegen Chinolon-Antibiotika. Die Reaktivität der Antikörper mit den MRL-belegten Antibiotika ist hervorgehoben.....	27
Tabelle 5: Übersicht über bislang beschriebene monoklonale Antikörper mit generischen Eigenschaften zum Nachweis von Chinolon-Antibiotika. Die Reaktivität der Antikörper mit den MRL-belegten Antibiotika ist hervorgehoben.....	28
Tabelle 6: Anwendbarkeit von Enzymimmuntests zum Nachweis von Chinolonen in Lebensmitteln	31
Tabelle 7: Auf Antikörpern basierende alternative Nachweisverfahren für Chinolone.....	36
Tabelle 8: EIA-Charakteristika bei Einsatz verschiedener HRP-Konjugate.....	52
Tabelle 9: Reaktivität des mAk 5H8 mit Chinolon-Antibiotika, die zur Behandlung von Lebensmittel-liefernden Tieren zugelassen sind.	58
Tabelle 10: Reaktivität des mAk 5H8 mit Chinolon-Antibiotika, die in der Tiermedizin zur Behandlung von Klein-/Heimtieren eingesetzt werden.	59
Tabelle 11: Reaktivität des mAk 5H8 mit Chinolon-Antibiotika, die derzeit in der Humanmedizin in Deutschland eingesetzt werden. Die Werte für Ciprofloxacin wurden bereits in Tabelle 9 aufgeführt.....	61
Tabelle 12: Kreuzreaktivität von Chinolonen der ersten Generation bzw. von Clioquinol mit dem mAk 5H8. Werte für Flumequin und Oxolinsäure sind in Tabelle 9 aufgeführt.....	62

Tabelle 13: Kreuzreaktivität von Chinolonen der zweiten Generation mit dem mAk 5H8....	63
Tabelle 14: Kreuzreaktivität von Chinolonen der dritten Generation mit dem mAk 5H8.....	64
Tabelle 15: Strukturformeln von Chinolonen der vierten Generation mit dem mAk 5H8	65
Tabelle 16: Vergleich der Charakteristika von Chinolon-Standardkurven angelegt in rekonstituiertem Milchpulver ($n \geq 6$) bzw. PBS ($n \geq 5$)	68
Tabelle 17: Wiederfindungsraten von Chinolonen in künstlich kontaminierten Milchproben	70
Tabelle 18: Charakteristika von in PBS angelegten EIA-Standardkurven für Difloxacin, Oxolinsäure und Sarafloxacin ($n \geq 5$)	73
Tabelle 19: Wiederfindungsraten von Chinolonen in künstlich kontaminierten Rindfleischproben ($n=5$). Die eingesetzten Konzentrationen entsprechen dem halben, einfachen und zweifachen MRL-Wert.	73
Tabelle 20: Wiederfindungsraten von Chinolonen in künstlich kontaminierten Lachsproben ($n \geq 4$). Die eingesetzten Konzentrationen entsprechen dem halben, einfachen und zweifachen MRL-Wert.	74
Tabelle 21: Wiederfindungsraten von Chinolonen in künstlich kontaminierten Garnelenproben ($n = 3$). Die eingesetzten Konzentrationen entsprechen dem halben, einfachen und zweifachen MRL-Wert.	75
Tabelle 22: Vergleich der Ergebnisse von EIA und LC-MS für Chinolon-positive Fleischproben	77
Tabelle 23: Wiederfindungsraten von verschiedenen Chinolonen in künstlich kontaminierter Milch nach IAC-Aufreinigung ($n=3$). Die Anordnung der Ergebnisse erfolgte analog zur Affinität des mAks (in abnehmender Reihenfolge).	82
Tabelle 24: Vergleichende Darstellung der IC_{50} -Werte (ng/ml) von generischen Antikörpern gegen Chinolon-Antibiotika	89

10. DANKSAGUNG

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich,

bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Märtlbauer für die Aufnahme im Institut, die Bereitstellung des Themas und der ausgezeichneten Arbeitsumgebung,

bei Herrn Assistenz Prof. Dr. Zeki Gürler für seine andauernde Unterstützung,

bei Herrn Dr. R. Dietrich, dessen wissenschaftliche Erfahrung für diese Arbeit von unschätzbarem Wert war, dafür, dass er mir die Grundlage für weiteres, eigenständiges wissenschaftliches Arbeiten vermittelt hat und mir unermüdlich mit Erklärungen und Hilfestellungen zur Seite stand,

bei Frau Dr. Götz-Schmidt und Herrn Dr. Holtmannspötter vom LGL Erlangen für die Überlassung der Hemmstoff-positiven Fleischproben

bei Herrn C. Kunas für seine Freundschaft und kollegiale Unterstützung,

bei Frau B. Minich und bei Herrn M. Djefall für die technische Ausbildung und Hilfe bei Arbeiten im Labor und für die darüberhinausgehende freundschaftliche Unterstützung im alltäglichen Leben,

bei Frau A. Tischler für ihre Hilfe in allen organisatorischen Dingen,

bei Herr K. Zhu für seine Freundschaft und Unterstützung,

bei dem gesamten Team der Milchhygiene, insbesondere bei Frau G. Acar, bei Frau F. Witzko, bei Frau Dr. M. Knauer, bei Herrn Dr. D. Doyscher, Herrn W. Yu, für die freundschaftliche Aufnahme, Hilfsbereitschaft und gute Atmosphäre

bei der Afyon Kocatepe Universität und dem türkischen Staat für die finanzielle Unterstützung,

sowie bei meiner Mutter, meinem Vater und meinem Bruder für ihre andauernde Unterstützung.

Schließlich bei meiner Frau für Ihre Geduld, Unterstützung und Liebe.