



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie
Lehrstuhl für Analytische Chemie und Wasserchemie

**Etablierung von regenerierbaren Chemilumineszenz-
Mikroarray-basierten Immuno- und Rezeptor-Assays für den
Nachweis von Antibiotika in flüssigen (Umwelt-)Proben**

Verena Katharina Meyer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Priv.-Doz. Dr. Michael Seidel

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Reinhard Nießner

2. Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer

Die Dissertation wurde am 25.01.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 23.02.2021 angenommen.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Meyer, V. K.; Chatelle, C. V.; Weber, W.; Niessner, R.; Seidel, M., *Flow-based regenerable chemiluminescence receptor assay for the detection of tetracyclines*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2020**, *412*, 3467-3476.

Meyer, V. K.; Meloni, D.; Olivo, F.; Märtlbauer, E.; Dietrich, R.; Niessner, R.; Seidel, M., *Validation procedure for multiplex antibiotic immunoassays using flow-based chemiluminescence microarrays*, in: *Small Molecule Microarrays – Methods and Protocols* (Uttamchandani, M.; Yao, S. Q., Hrsg.) aus der Serie *Methods in Molecular Biology*. Springer, New York **2017**, *1518*, 195-212.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde durch ein Promotionsstipendium der Hanns-Seidel-Stiftung unterstützt. Für die umfassende ideelle und finanzielle Förderung der Hanns-Seidel-Stiftung bin ich sehr dankbar. Sie ermöglichte mir, meine wissenschaftliche Forschung unbeschwert neben der Verantwortung für meine Tochter zu betreiben, viele interessante Veranstaltungen aus dem Bildungsangebot zu besuchen und zahlreiche spannende Menschen kennenzulernen.

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Reinhard Nießner für die Arbeit an diesem äußerst interessanten Thema sowie den großen Einsatz bei der Stipendiumsbewerbung und den Verlängerungsanträgen. Auch schätze ich mich überaus glücklich, dass ich Familie und Promotion gut miteinander vereinbaren konnte und mein gesundheitlicher Genesungsprozess stets mitfühlend und unterstützend begleitet wurde.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. Michael Seidel für die konstruktive und zielführende Zusammenarbeit und die stete Diskussionsbereitschaft, die maßgeblich zum guten Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, sowie für die warmherzige Betreuung, das außerordentliche Vertrauen und die große Wertschätzung, die mir stets entgegengebracht wurden.

Außerdem danke ich dem neuen Lehrstuhlinhaber Prof. Dr. Martin Elsner für die Unterstützung und die Möglichkeit, in professioneller und hervorragend ausgestatteter Atmosphäre zu forschen und zu arbeiten.

Besonders dankbar bin ich auch Herrn Prof. Dr. Dietmar Knopp für die stete Hilfsbereitschaft und die sehr herzlichen Begegnungen, Herrn Prof. Dr. Klaus Köhler für die motivierende Unterstützung bei der Stipendiumsbewerbung sowie Herrn Prof. Wilfried Weber für die konstruktive Zusammenarbeit bei der gemeinsamen Publikation. Ferner danke ich Dr. Rani Bakkour für die hilfreichen Ratschläge zur Festphasenextraktion sowie Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer und Dr. Richard Dietrich für die Bereitstellung von Antikörpern.

Für die vielen netten Gespräche, die gute Zusammenarbeit und die stete Hilfsbereitschaft möchte ich mich ganz herzlich bei Anika Wunderlich, Katharina Sollweck, Jonas Bemetz,

Katharina Stutzer, Catharina Kober, Dennis Elsäßer, Andreas Kunze, Lisa Göpfert, Jessica Beyerl, Julia Neumair und Susanna Mahler bedanken.

Meinen Studenten Laura Sánchez Pàmies, Joel-Benedict Britschgi, Carolin Feyerabend, Sabrina Schönberger, Rilette Cirlem Tierra Bautista, Julian Weng und Andreas Auernhammer danke ich für ihre Mitarbeit, die für meine eigene Forschung sehr hilfreich war.

Ferner danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für die gute Arbeitsatmosphäre.

Meinen wunderbaren Eltern Martina und Sigi und meinem lieben Opa Josef kann ich gar nicht genug danken für die große Wertschätzung gegenüber meiner Arbeit sowie für die immer liebevolle und kompromisslose Unterstützung in allen Lebenslagen.

Für das große Engagement bei der Betreuung meiner kleinen Linda danke ich auch ganz herzlich ihren lieben Großeltern Martina, Sigi, Gabi und Peter sowie ihrer Tante Magdalena, ihrem Onkel Christian und ihrer Uroma Rosemarie.

Meinem Partner Johannes bin ich unermesslich dankbar für seine große Unterstützung meiner Promotion und die gemeinsame liebevolle Betreuung unserer Tochter. Wir haben in den letzten Jahren gemeinsam so viel geschafft!

Zuletzt danke ich dir, meiner lieben, süßen, klugen Linda, für dein Verständnis und deine Geduld mit Mamas häufigen Fahrten nach München und langen Tagen am Computer. Es war und ist immer eine große Freude, wenn du Interesse an meiner Laborarbeit und auch an dabei auftretenden technischen Problemen zeigst und alles genau erklärt haben möchtest. Du warst mir eine stetige Motivation und bist mir so unglaublich wichtig!

Für meinen Opa Josef

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Motivation	2
2 Zielsetzungen	9
3 Theoretische Grundlagen	11
3.1 In dieser Arbeit adressierte Antibiotika	11
3.1.1 Cefalexin und Kanamycin	11
3.1.2 Tetracycline	12
3.1.3 Sulfonamide	13
3.2 Antibiotika-Belastung in Lebensmittel- und Umweltproben	14
3.2.1 Lebensmittel tierischen Ursprungs	14
3.2.2 Kuhmilch und tierische Exkremente	16
3.2.3 Böden und Agrarerzeugnisse	17
3.2.4 Abwasser und Kläranlagenablauf.....	18
3.2.5 Oberflächenwasser und Grundwasser	18
3.2.6 Persistenz der verschiedenen Antibiotikaklassen in der Umwelt.....	19
3.3 Etablierte Nachweisverfahren für die Antibiotika-Analytik	20
3.3.1 Mikrobiologische (Hemmstoff-)Tests	21
3.3.2 HPLC-MS als quantitative Bestätigungsmethode	22
3.3.3 Immunochemische Methoden	24
3.3.3.1 Statisch inkubierte ELISAs in der Mikrotiterplatte	26
3.3.3.2 Fluss-basierte (Mikroarray-)Testsysteme	27
Regenerierbarer Chemilumineszenz-Mikroarray-Immunoassay am MCR 3.....	27
a) Herstellung der Mikroarray-Durchflusszelle.....	27
b) Prinzip der Mikroarray-Messungen am MCR 3	29

Inhaltsverzeichnis

3.3.4	Weitere Rezeptor-basierte Testsysteme	32
3.3.4.1	Aptamere	32
3.3.4.2	Molekular geprägte Polymere (MIPs)	33
3.3.4.3	Proteine als biologische Rezeptoren	33
a)	Resistenz gegen Tetracycline: Bakterielltes TetR- <i>tetO</i> -System	34
b)	Adaption für die Analytik von Tetracyclinen	35
3.4	Methoden zur Extraktion und Aufkonzentrierung	38
3.4.1	Festphasenextraktion (<i>solid phase extraction</i> , SPE)	39
3.4.2	Anwendung der SPE für die Analytik von Sulfonamid-Antibiotika	40
4	Experimentelle Durchführung	44
4.1	Laborausstattung und Verbrauchsgüter	44
4.1.1	Geräte und Materialien	44
4.1.2	Software	47
4.1.3	Chemikalien und Reagenzien	47
4.1.3.1	Chemikalien	47
4.1.3.2	Puffer	48
4.1.3.3	Antibiotika	49
4.1.3.4	DNA-Oligonukleotide	50
4.1.3.5	Antikörper	51
4.1.3.6	TetR und Streptavidin-HRP	52
4.1.3.7	Realproben	52
4.2	Mikroarray-Experimente	54
4.2.1	Funktionalisierung der Glaschip-Oberflächen	54
4.2.2	Herstellung der Mikroarray-Chips	55
4.2.3	Messungen am MCR 3	56
4.3	Aufkonzentrierung von Oberflächenwasser-Realproben	59
4.3.1	SPE mittels Extraktionssäulen	59
4.3.2	Aufreinigung der Extrakte mittels Anionenaustauscher-Säulen	59

5	Ergebnisse und Diskussion.....	61
5.1	Regenerierbare Mikroarray-basierte Immunoassays für die Detektion von Cefalexin und Kanamycin.....	61
5.1.1	Signalintensität und -Stabilität in Abhängigkeit von den Kontaktdruck-Konzentrationen der Antibiotika.....	61
5.1.2	Ermittlung von Kalibrierkurven und Wiederfindungen.....	64
5.1.3	Messungen in menschlichen und tierischen Realproben.....	67
5.2	Regenerierbarer Mikroarray-basierter Rezeptor-Assay für die Detektion von Tetracyclin.....	70
5.2.1	Entwicklung des Assay-Prinzips.....	70
5.2.1.1	Medium zum Hybridisieren und Kontaktdrucken der Oligonukleotide.....	73
5.2.1.2	Abhängigkeit der Signalintensität von der DNA-Kontaktdruck-Konzentration.....	74
5.2.2	Untersuchungen zur Regenerierbarkeit.....	75
5.2.2.1	Regenerierbarkeit bei einer Messtemperatur im MCR 3 von 18 °C.....	76
5.2.2.2	Regenerierbarkeit bei einer Messtemperatur im MCR 3 von 39 °C.....	77
5.2.3	Einfluss von Inkubationstemperatur und -Dauer.....	78
5.2.3.1	Variation der Inkubationstemperatur.....	78
5.2.3.2	Variation der Inkubationsdauer.....	79
5.2.4	Ermittlung von Kalibrierkurven und Wiederfindungen.....	81
5.2.5	Voruntersuchung zur Analyse von Oberflächenwasser-Realproben.....	82
5.2.6	Ausblick: Gleichzeitige Durchführung von Tetracyclin-Rezeptor-Assay und Immunoassays für andere Antibiotika.....	83
5.3	Aufkonzentrierung und Mikroarray-Immunoassay-basierter Nachweis von Sulfonamiden in Oberflächenwasser.....	85
5.3.1	Chip-Belegung mit Sulfonamiden und Antikörper-Reaktivitäten.....	85
5.3.2	Regenerierbarkeit.....	87
5.3.3	Ermittlung von Kalibrierkurven mit verschiedenen Sulfonamiden.....	88
5.3.4	Vorversuche zur Extraktion mittels SPE-Säule.....	92

Inhaltsverzeichnis

5.3.5	Störung der Mikroarray-Immunoassay-Messung durch (aufkonzentrierte) Matrixbestandteile	96
5.3.6	Entwicklung einer Methode zur Aufkonzentrierung von Sulfonamiden und Abtrennung von störenden Matrixbestandteilen	98
5.3.7	Ermittlung von Kalibrierkurven und Wiederfindungen für das kombinierte Verfahren aus SPE und Mikroarray-Immunoassay.....	102
5.3.8	Anwendung der entwickelten Methode für die Analyse von Oberflächenwasser-Realproben	112
6	Zusammenfassung und Ausblick	116
6.1	Relevanz eines umfassenden Antibiotika-Monitorings.....	116
6.2	Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Forschungsarbeit	116
6.2.1	Mikroarray-Immunoassay-Verfahren zur Detektion von Cefalexin und Kanamycin in flüssigen menschlichen und tierischen Proben	117
6.2.2	Fluss-basierter regenerierbarer Chemilumineszenz-Rezeptor-Assay für den Nachweis von Tetracyclinen	118
6.2.3	SPE-Aufkonzentrierung und Mikroarray-Immunoassay-Messung von Sulfonamiden in Oberflächenwasser.....	119
6.3	Fazit und Ausblick	122
7	Summary and Outlook	124
7.1	Relevance of Comprehensive Antibiotic Monitoring	124
7.2	Summary of the Present Research Work.....	124
7.2.1	Microarray Immunoassay Method for the Detection of Cefalexin and Kanamycin in Liquid Human and Animal Samples.....	124
7.2.2	Flow-based Regenerable Chemiluminescence Receptor Assay for the Detection of Tetracyclines	125
7.2.3	SPE Concentration and Microarray Immunoassay Measurement of Sulfonamides in Surface Water.....	127
7.3	Results and Future Perspectives	129
	Literaturverzeichnis.....	131

Abkürzungsverzeichnis

Sulfonamide:

		SMA	Sulfamethazin
SDA	Sulfadiazin	SMX	Sulfamethoxazol
SDM	Sulfadimethoxin	SMZ	Sulfamerazin
SDX	Sulfadoxin	STZ	Sulfathiazol

Allgemein:

CCD	<i>Charge-coupled device</i> (ladungsgekoppeltes elektronisches Bauelement)
CL	Chemilumineszenz
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest)
His ₆ /His ₅	Hexa/Pentahistidin
HLB	<i>Hydrophilic-lipophilic balance</i> (Balance zwischen Hydrophilie und Lipophilie)
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
IgG	Immunglobulin G
MCR 3	<i>Microarray Chip Reader 3</i> (Mikroarray-Chip-Auslesegerät 3)
MeOH	Methanol
MIPs	<i>Molecularly imprinted polymers</i> (molekular geprägte Polymere)
MS	Massenspektrometrie
n	Anzahl der Messwiederholungen
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PEG	Polyethylenglycol
PMMA	Polymethylmethacrylat
SAX	<i>Strong anion exchange</i> (starker Anionenaustausch)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SPE	<i>Solid phase extraction</i> (Festphasenextraktion)
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i> (Oberflächenplasmonenresonanz)
SSC	<i>Saline sodium citrate</i> (Kochsalzlösung-Natriumcitrat)
<i>tetO</i>	Tetracyclin-Operator-DNA-Sequenz
TetR	Tetracyclin-Repressor-Protein
TetA	Tetracyclin-Efflux-Protein
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
WHO	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)

1 Motivation

Die Entwicklung von Antibiotika hat dazu geführt, dass die meisten bakteriellen Infektionen bei Mensch und Tier heute gut behandelbar sind. Allerdings bilden immer mehr Bakterienstämme gegenüber diversen Therapeutika Resistenzen aus, die die Heilung erschweren oder gar unmöglich machen können. Laut einer Studie des Europäischen Zentrums für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten (ECDC, eine Agentur der EU) infizierten sich allein im Jahr 2015 fast 700.000 Menschen im Europäischen Wirtschaftsraum mit multiresistenten Keimen, davon etwa zwei Drittel in Krankenhäusern, und mehr als 33.000 starben infolge einer solchen Erkrankung [1]. Zu dieser Problematik war 2017 auf Spiegel Online zu lesen [2]:

„Dieses Fiasko der Infektionsmedizin ist zwar nach wie vor sehr selten. Aber weltweit nehmen solche Versagensfälle zu – und markieren den Eintritt ins postantibiotische Zeitalter, eine Ära, in der Antibiotika nichts mehr bewirken.“

Daher ist es wichtig, sich im Sinne der öffentlichen Gesundheit mit dem Einsatz von Antibiotika kritisch auseinanderzusetzen.

Die Verbreitung antimikrobieller Wirkstoffe geht vornehmlich auf eine Entdeckung Alexander Flemings zurück. So publizierte er im Jahr 1929 seine Untersuchungen zur antibakteriellen Wirksamkeit von *Penicillium*-Schimmelpilzkulturen auf grampositive Bakterienstämme und bezeichnete sein Isolat als „Penicillin“ [3]. Seither wurde eine Vielzahl antimikrobieller Wirkstoffe aus Pilzen oder Bakterien isoliert (sogenannte Antibiotika). Ferner konnten diverse hochwirksame Substanzen synthetisch hergestellt werden (sogenannte Chemotherapeutika) [4]. Allgemein wird jedoch meist die Bezeichnung Antibiotika für alle antimikrobiellen Wirkstoffe verwendet – so auch in dieser Arbeit.

Die Wirksamkeit von Antibiotika beruht darauf, dass sie bestimmte lebenswichtige Strukturen in Bakterien angreifen. So werden die Zielorganismen entweder an ihrer Vermehrung gehindert (Bakteriostatika, z. B. Tetracycline, Sulfonamide und Makrolide) oder abgetötet (Bakterizide, z. B. Aminoglycoside, Chinolone), teilweise unter Zersetzung der Zellwand (Bakteriolytika, z. B. β -Lactame) [4].

Durch die große Bandbreite an potenten Antibiotika haben viele über lange Zeit gefürchtete Erkrankungen, wie zum Beispiel Tuberkulose und andere bakterielle Lungenentzündungen,

1 Motivation

Typhus, Syphilis und Malaria, zumindest in Ländern mit umfassender Gesundheitsversorgung ihren Schrecken verloren. (Allerdings ist der Zugang zu Antibiotika in vielen anderen Ländern der Welt für bestimmte Gruppen oder sogar die Gesamtbevölkerung deutlich erschwert [5]).

In Industrieländern werden Antibiotika auch häufig bei sehr verbreiteten Erkrankungen angewendet, wie Harnwegsentzündungen oder bakteriellen Infektionen der oberen Atemwege. Daher zählen Antibiotika in Deutschland seit vielen Jahren zu den verordnungstärksten Wirkstoffklassen in der Humanmedizin mit etwa gleichbleibenden Gesamtmengen [6], wie beispielsweise 666 t im Jahr 2016 [7].

Am häufigsten kommen β -Lactame (Penicilline, Amino-Penicilline und Cephalosporine) zum Einsatz, gefolgt von Tetracyclinen und Makroliden [6, 7].

Auch in der Veterinärmedizin werden viele Infektionen mit Antibiotika behandelt. Dabei ist in der Massentierhaltung etwa bei Schwein und Huhn immer noch die sogenannte Metaphylaxe gängige Praxis, bei der die gesamte Population eines Stalls behandelt wird, sobald bei einzelnen Tieren eine Erkrankung auftritt [8].

Insgesamt ist die von den Pharmaherstellern an tierärztliche Apotheken abgegebene Antibiotikamenge seit Einführung der gesetzlich verpflichtenden Erfassung im Jahr 2011 um 58 % auf 722 t im Jahr 2018 zurückgegangen [9]. Die Anteile der verschiedenen Wirkstoffe an dieser Gesamtmenge zeigt Abbildung 1.

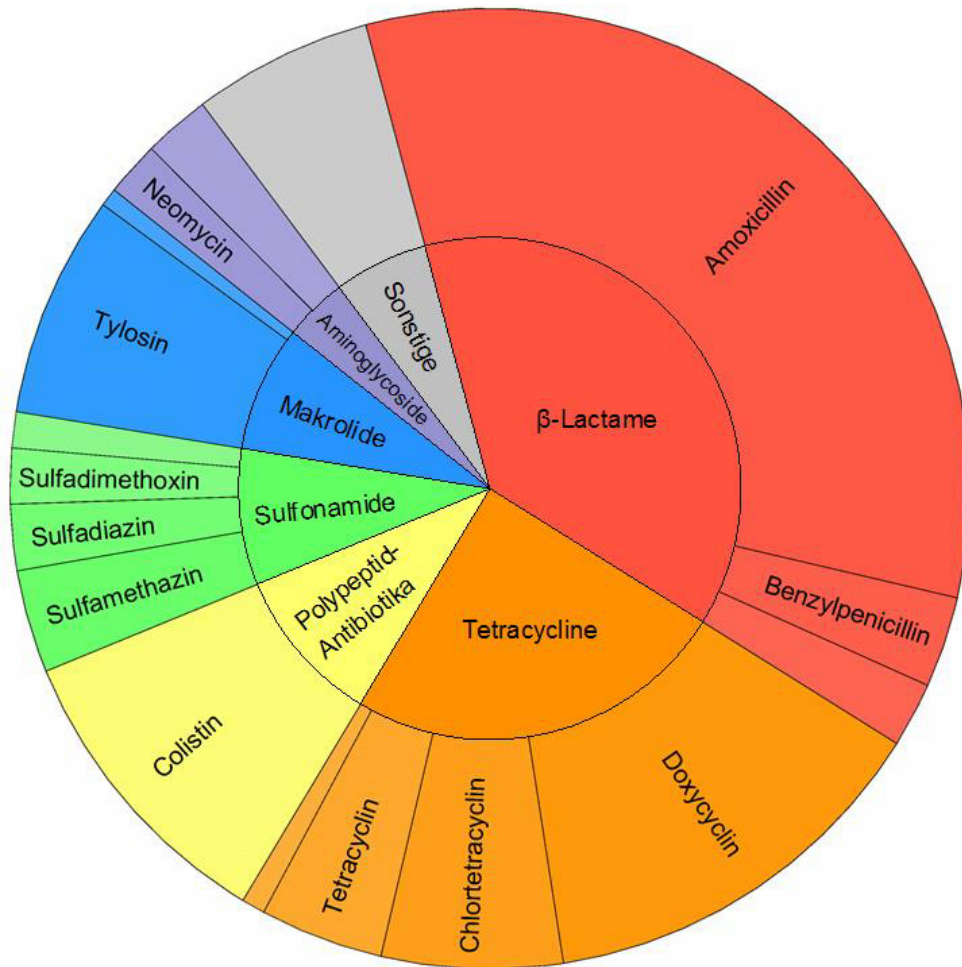


Abbildung 1. Anteile der häufigsten Wirkstoffe an der von Pharmaherstellern an tierärztliche Apotheken abgegebenen Antibiotikamengen in Deutschland im Jahr 2018; Werte entnommen aus [9].

Überwiegend werden in der Veterinärmedizin demnach β-Lactame und Tetracycline eingesetzt, wobei Amoxicillin den mit großem Abstand am häufigsten verabreichten Wirkstoff darstellt. Weitere in großen Mengen abgegebene Antibiotikaklassen sind Polypeptid-Antibiotika, Sulfonamide und Makrolide.

Sowohl diese Anteile als auch die absoluten Verbrauchsmengen differieren jedoch deutlich zwischen den verschiedenen Nutztierarten (siehe Abbildung 2) [10].

1 Motivation

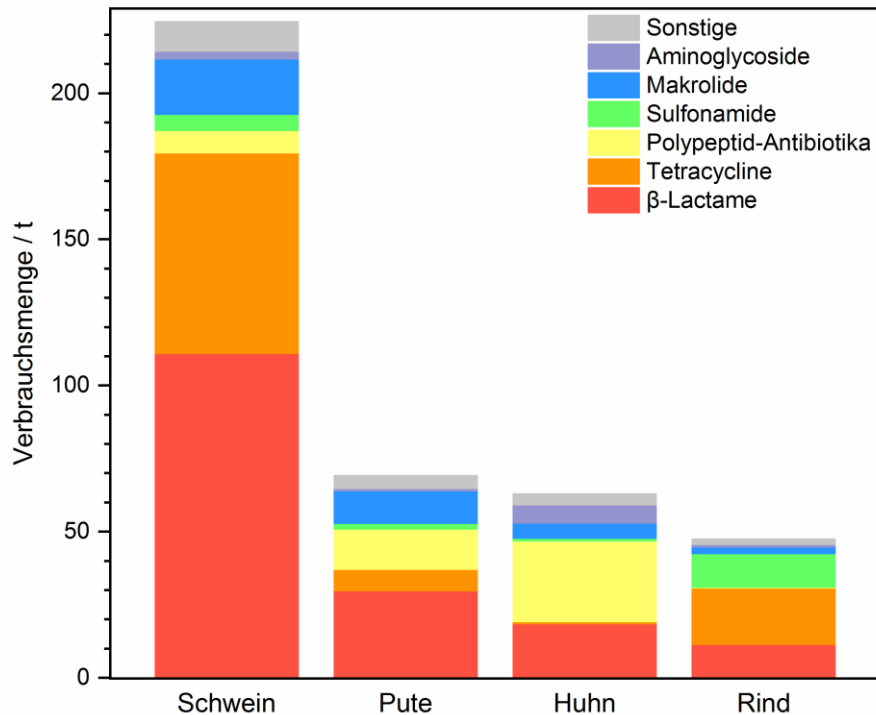


Abbildung 2. Verbrauchsmengen nach Lebensmittel-liefernden Nutztierarten und Antibiotikaklassen in Deutschland im Jahr 2017; Daten von den Betrieben an die Behörden gemeldet gemäß 16. Novelle des Arzneimittelgesetzes; entnommen aus [10].

Demnach werden in der Schweinemast mit großem Abstand die meisten Antibiotika eingesetzt. In einer Studie zum weltweiten Antibiotikaeinsatz in der intensiven Nutztierhaltung wurde überdies berechnet, dass jährlich in der Schweinemast etwa 172 mg, in der Hähnchenmast etwa 148 mg und in der Rindermast nur etwa 45 mg (jeweils bezogen auf 1 kg Biomasse des Lebensmittel liefernden Tiers) Antibiotika verabreicht werden [11].

Zeigt eine antibiotische Behandlung bei einem Zielorganismus keine Wirkung, so ist dieser gegen den eingesetzten Stoff resistent. Das kann zum einen daran liegen, dass die entsprechende Zielstruktur in diesem Organismus nicht vorhanden oder so modifiziert ist, dass das Antibiotikum nicht angreifen kann. Zum anderen kann der Zielorganismus die Fähigkeit besitzen, das Antibiotikum aufgrund einer Permeabilitätsbarriere nicht eindringen zu lassen, es aktiv aus der Zelle hinaus zu transportieren oder enzymatisch zu metabolisieren und damit unschädlich zu machen [4, 8, 12]. Während intrinsische (Primär-)Resistenzen gegen bestimmte Antibiotikaklassen bei einigen Bakterienarten grundsätzlich vorhanden und inzwischen weithin bekannt sind, sodass sie bei der Behandlung berücksichtigt werden können, stellen erworbene (Sekundär-)Resistenzen, die bei ursprünglich empfindlichen Keimen auftreten, ein erhebliches Problem dar [8, 12].

1 Motivation

Häufig ist eine Resistenz gegen alle Vertreter einer Antibiotikaklasse gleichermaßen wirksam, da diese chemisch verwandt sind und die gleichen relevanten funktionellen Gruppen aufweisen. Solche Kreuzresistenzen können allerdings auch bei verschiedenen Wirkstoffklassen auftreten, wenn sie auf die gleiche Zielstruktur ausgerichtet sind (z. B. Makrolide und Lincosamide) [8].

Der Entstehung von Resistenzen liegen natürliche evolutorische Prozesse wie spontane Genmutationen zugrunde. Die Resistenzgene können einerseits auf dem Chromosom liegen und über vertikalen Gentransfer an die Tochterzelle weitergegeben werden [8, 12]. Andererseits treten Resistenzgene häufig extrachromosomal auf, beispielsweise auf Plasmiden oder Transposons, und können schnell über horizontalen Gentransfer auf andere Bakterien(-Arten) übertragen werden [4, 8, 12]. Die größte Relevanz hat die Plasmid-vermittelte Resistenz durch Konjugation [4]. Oftmals sind dabei sogar mehrere Resistenzgene gegen verschiedene nicht wirkungsähnliche Antibiotikaklassen auf einem Plasmid co-lokalisiert (sogenannte Multi- oder Parallelresistenz) [8]. Zu den verbreiteten Erregern, die teilweise merkt auftreten und daher medizinisch besonders kritisch sind, zählen:

- MRSA (Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*, oftmals gleichzeitig resistent gegen eine Vielzahl anderer Antibiotika neben β -Lactamen) [6-8].
- ESBL-Bildner (hauptsächlich *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae*, die Breitspektrum- β -Lactamasen produzieren und teilweise noch weitere Resistenzen aufweisen) [6-8].
- MDR-TB (*multidrug-resistant tuberculosis*, meist *Mycobacterium tuberculosis* mit mehreren Resistenzen) [6].

Resistenzgene entstehen zwar auf natürliche Weise, jedoch wird die Ausbreitung resistenter Bakterienstämme durch den Selektionsdruck in Gegenwart von Antibiotika deutlich begünstigt [4, 5]. Zusätzlich wird die Problematik noch durch unsachgemäßen Gebrauch von Antibiotika verschärft [13]. So fördern Verordnungen bei nicht-bakteriellen Infektionen, die Wahl eines nicht für den Bakterienstamm geeigneten Wirkstoffes, eine fehlerhafte Dosierung, eine zu kurze Behandlungsdauer, zu lange Dosisintervalle sowie ein unpassender Verabreichungsweg die Entwicklung und Verbreitung von Resistenzen [5, 8].

Antibiotikaresistenzen sind nicht nur in menschlichen und tierischen Organismen relevant. Vielmehr werden nicht metabolisierte Anteile der verabreichten Wirkstoffe (etwa 10 – 90 %) und die Metaboliten sowie auch die resistenten Keime ausgeschieden [7]. Zahlreiche Studien haben bereits in Gewässer- und Umweltproben aus vielen Ländern der Welt verschiedene

1 Motivation

Antibiotikaklassen sowie resistente Bakterienstämme beziehungsweise deren Resistenzgene nachgewiesen [14-17]. Eine Übersicht über wichtige Eintragswege in Umwelt und Nahrungskette ausgehend von human- und veterinärmedizinisch eingesetzten Antibiotika ist in Abbildung 3 dargestellt.

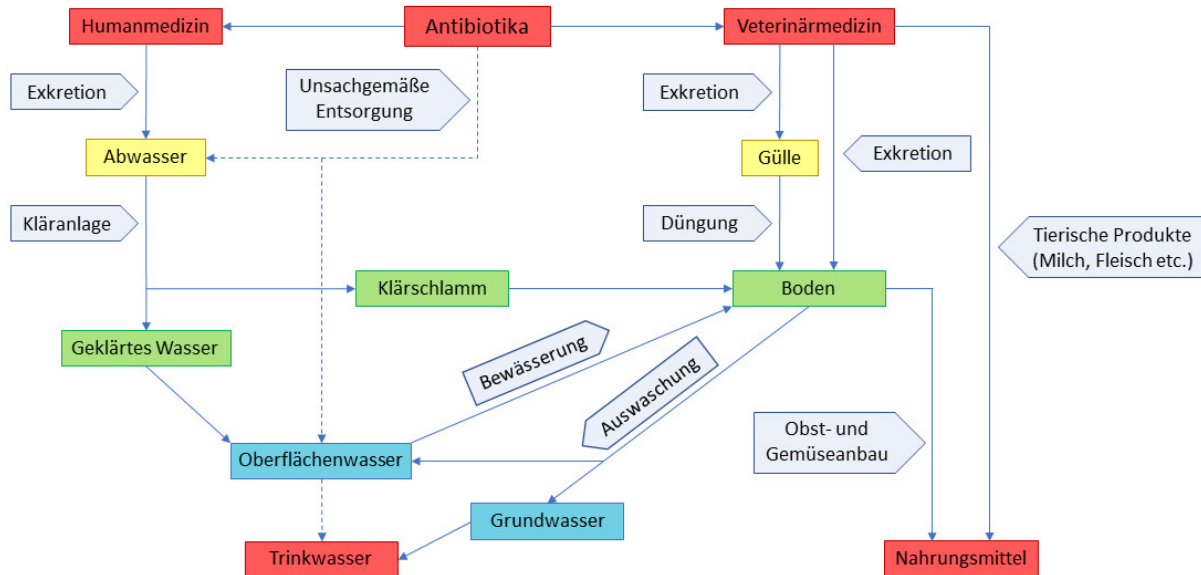


Abbildung 3. Wichtige Eintragswege von Antibiotika und resistenten Keimen in Umwelt und Nahrungskette.

Über das Abwassersystem werden menschliche Exkreme zwar in Kläranlagen geleitet, jedoch können Antibiotika dort bislang nur zu einem geringen Teil abgebaut werden und gelangen somit in die Umwelt [7, 17]. Die Exkreme von Nutztieren werden in Form von Gülle als Wirtschaftsdünger auf Ackerböden ausgebracht (oder gelangen bei Freilandhaltung direkt auf die Weide) und können durch Regengüsse in Grundwasser oder angrenzende Oberflächengewässer ausgewaschen werden [17, 18]. Denkbar ist auch ein durch unsachgemäße Entsorgung bedingter direkter Eintrag von Antibiotika aus Produktions- oder Verarbeitungsstätten in das Abwassersystem oder in Oberflächengewässer [7, 18]. Über diese Wege werden auch die in Kläranlagen, Böden und Gewässern vorkommenden Keime mit (geringen) Konzentrationen von Antibiotika konfrontiert, was die Entwicklung von Resistenzen weiter begünstigt [7, 18, 19].

Folglich können Antibiotika oder resistente Keime über pflanzliche [20] oder tierische Nahrungsmittel [21] sowie über Trinkwasser [22, 23], das meist aus Grundwasser oder teilweise auch aus Oberflächenwasser gewonnen wird, von Mensch und Tier wieder aufgenommen werden.

1 Motivation

Die Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*, WHO) hat im Jahr 2015 einen globalen Aktionsplan gegen Antibiotikaresistenzen auf den Weg gebracht, der darauf zielt, dass bakterielle Infektionen auch weiterhin mit Antibiotika behandelbar bleiben sollen und die Staaten eigene Programme auflegen, um dies zu unterstützen [24]. Die Europäische Kommission hat dazu im Jahr 2017 einen EU-weiten Aktionsplan verabschiedet, der im Sinne des Konzepts „One Health“ („eine Gesundheit“) die komplexen Zusammenhänge zwischen Mensch- und Tiergesundheit sowie Umweltaspekten interdisziplinär untersuchen lassen möchte [7, 25]. In Deutschland wurde mit dieser Zielrichtung bereits im Jahr 2008 die Deutsche Antibiotikaresistenzstrategie (DART) beschlossen und im Jahr 2015 als DART 2020 fortgeführt [26].

Neben den medizinisch-infektiologischen Aspekten und den Maßnahmen zur Optimierung und Reduzierung von Antibiotikaverordnungen spielt ein umfassendes Monitoring von Antibiotika und resistenten Keimen beziehungsweise Resistenzgenen in diversen Matrices eine zentrale Rolle [26]. Diese Arbeit leistet dazu einen wichtigen Beitrag durch die Etablierung von Mikroarray-basierten regenerierbaren Immuno- und Rezeptor-Assays für den Nachweis besonders relevanter Antibiotika in Exkreten, tierischen Erzeugnissen (Milch) und Umweltproben (Oberflächenwasser). Für ein kontinuierliches und effizientes Monitoring sollte eine Screening-Methode für den Außeneinsatz im Gegensatz zu etablierten HPLC-MS-basierten Bestätigungsmethoden portabel und vergleichsweise einfach aufgebaut sein. Mit dieser Zielrichtung wurde die automatisierte Fluss-basierte Mikroarray-Analyseplattform MCR 3 für die Prozessierung der Assay-Schritte und die Chemilumineszenz-Detektion eingesetzt. Um auch die besonders geringen Konzentrationen in Oberflächenwasser zu erfassen, wurde die Methode für diesen Einsatzbereich mit einer vorgeschalteten Festphasenextraktion zur Aufkonzentrierung kombiniert.

2 Zielsetzungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Fluss-basierte Chemilumineszenz-Mikroarrays für den Nachweis von diversen Antibiotika entwickelt. Mit drei Prinzipstudien wurden dabei verschiedene Fragestellungen adressiert.

Im ersten Projekt sollte der bereits etablierte Mikroarray für die Immunoassay-Detektion von diversen Antibiotika in Milch [27] um die beiden Wirkstoffe Cefalexin und Kanamycin erweitert werden, die gemeinsam in Form eines Kombinationspräparats bei Milchkühen häufig eingesetzt werden. Mit Realproben (Milch und Urin einer mit dem Kombinationspräparat behandelten Kuh, Urin und Dünndarm-Sekret eines mit Cefalexin behandelten Menschen) wurde die grundsätzliche Anwendbarkeit untersucht. Dabei war von Interesse, ob die Quantifizierung mittels Mikroarray auch dazu genutzt werden kann, um Unterschiede in der Exkretion von gemeinsam verabreichten Wirkstoffen aufzuzeigen oder den jeweils überwiegenden Ausscheidungsweg zu ermitteln, was Rückschlüsse auf die Metabolisierungspfade zulassen könnte.

Das zweite Projekt hatte zum Ziel, neben den regenerierbaren kompetitiven Immunoassays einen vergleichbaren Assay mit einem spezifischen Rezeptor-Protein anstelle eines Antikörpers auf dem Mikroarray-Chip zu etablieren. Da aufgrund der komplexen Funktionalität und der hohen Reaktivität des Tetracyclin-Moleküls [28] eine stabile und regenerierbare Immobilisierung von Tetracyclin als Kompetitor bislang nicht gelungen war, sollte für diese Antibiotikaklasse ein geeigneter Rezeptor-basierter Assay entwickelt werden, der einen anderen Kompetitor nutzt. Die Grundlage dafür ist ein verbreiteter Resistenzmechanismus gegen Tetracycline und beruht auf dem Repressor-Protein TetR, das in resistenten Bakterien an einem spezifischen DNA-Operator *tetO* lokalisiert ist. Durch die allosterische Bindung von Tetracyclin an das Repressor-Protein durchläuft dieses eine Konformationsänderung und wird dadurch von *tetO* abgelöst. Basierend auf diesem Mechanismus wurde ein DNA-Oligonukleotid, das die *tetO*-Sequenz enthielt, als Kompetitor immobilisiert. An *tetO* gebundenes TetR-Biotin wurde mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) markiert, um eine Chemilumineszenz-Detektion zu ermöglichen. Die Regenerierbarkeit dieses neu entwickelten Assays durch Ablösung des TetR-Proteins von dem immobilisierten DNA-Oligonukleotid, die Nachweisstärke, die gleichzeitige Durchführung mit Immunoassays auf demselben Mikroarray-Chip und die Robustheit gegenüber der Matrix in Oberflächenwasser-Realproben wurden im Rahmen einer Prinzipstudie untersucht.

2 Zielsetzungen

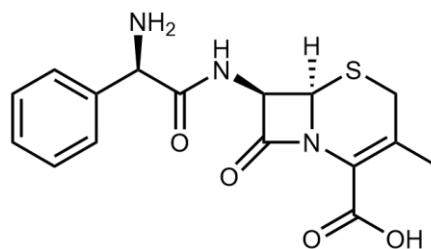
Im dritten Projekt sollte ein konkretes Messverfahren für das Antibiotika-Monitoring in Oberflächenwasser entwickelt werden, das die dort meist äußerst geringen Konzentrationen der Pharmaka erfassen kann. Dazu sollte eine Festphasenextraktion zur möglichst selektiven Aufkonzentrierung der Analyten vorgeschaltet werden, die sich prinzipiell vollautomatisiert mit der Mikroarray-Detektion verbinden lässt. Als umweltrelevante Antibiotika wurden die Sulfonamide beispielhaft für diese Experimente herangezogen. Mit drei verschiedenen zur Verfügung stehenden monoklonalen Antikörpern, die unterschiedliche Selektivitäten für die jeweiligen Vertreter dieser Antibiotikaklasse aufweisen, sollte ein möglichst umfassendes Screening nach Sulfonamiden sichergestellt werden. Anhand von diversen kommerziell erhältlichen SPE-Säulen und verschiedenen Oberflächenwasser-Realproben wurde die Aufkonzentrierung der Analyten und eventueller störender Matrixbestandteile umfassend untersucht und schließlich eine taugliche Methode entwickelt.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 In dieser Arbeit adressierte Antibiotika

3.1.1 Cefalexin und Kanamycin

Cefalexin ist ein β -Lactam-Antibiotikum und wird den Cephalosporinen der ersten Generation zugeordnet. Cephalosporine werden aus dem Stoff Cephalosporin C synthetisiert, der in dem Schimmelpilz *Cephalosporium acremonium* vorkommt [29]. Die chemische Struktur von Cefalexin zeigt Abbildung 4.



Cefalexin

Abbildung 4. Chemische Struktur des Antibiotikums Cefalexin (Cephalosporin der 1. Generation).

Cefalexin hemmt das Enzym Peptidoglycan-Transpeptidase, sodass die Bildung einer Murein-Schicht verhindert wird, die insbesondere bei grampositiven Bakterien entscheidend für die Stabilität der Bakterienhülle ist [30]. Somit wird die Teilung der Bakterien behindert und ihre Lyse wird begünstigt.

Cefalexin wirkt unter anderem gegen Staphylokokken (auch Penicillinase-bildende) und Streptokokken. Da Cefalexin anfällig gegenüber den meisten β -Lactamasen ist, wird die Therapie mitunter durch Resistenzen beeinträchtigt [29].

Kanamycin zählt zur Antibiotikaklasse der Aminoglycoside, deren Wirksamkeit auf der Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese beruht [30]. Der Wirkstoff Kanamycin wird aus der Bakterienart *Streptomyces kanamyceticus* isoliert und enthält die Derivate A, B und C (siehe Abbildung 5) mit Kanamycin A als Hauptbestandteil [31].

3 Theoretische Grundlagen

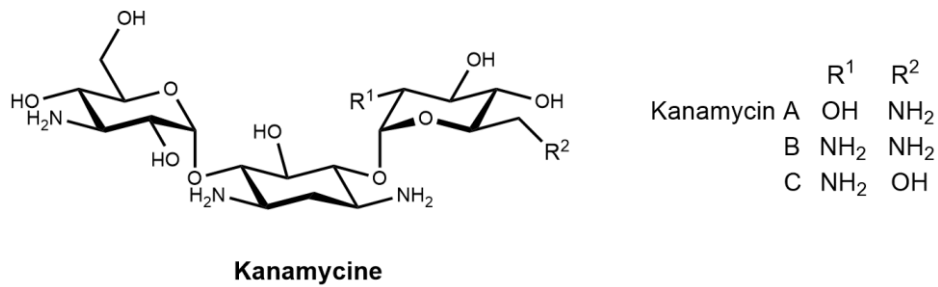


Abbildung 5. Chemische Strukturen der Kanamycine A, B und C.

Kanamycin wirkt gegen eine Vielzahl gramnegativer Bakterienstämme und beispielsweise auch gegen Staphylokokken [30].

Die beiden Wirkstoffe Cefalexin und Kanamycin sind im Kombinationspräparat Ubrolexin des Herstellers Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH im Verhältnis 1,5:1 enthalten. Ubrolexin ist in Deutschland seit dem Jahr 2008 für die Behandlung von Mastitis bei laktierenden Milchkühen zugelassen und wird als Suspension direkt in das Euter injiziert. Die Wirksamkeit erstreckt sich auf die typischen Mastitis-Erreger, wie *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* und *Escherichia coli* [32], sofern keine Resistenzen vorliegen.

3.1.2 Tetracycline

Tetracyclin-Antibiotika können aus einigen Arten der Bakteriengattung *Streptomyces* isoliert oder darauf basierend halbsynthetisch hergestellt werden [29, 33]. Wichtige Vertreter sind in Abbildung 6 dargestellt.

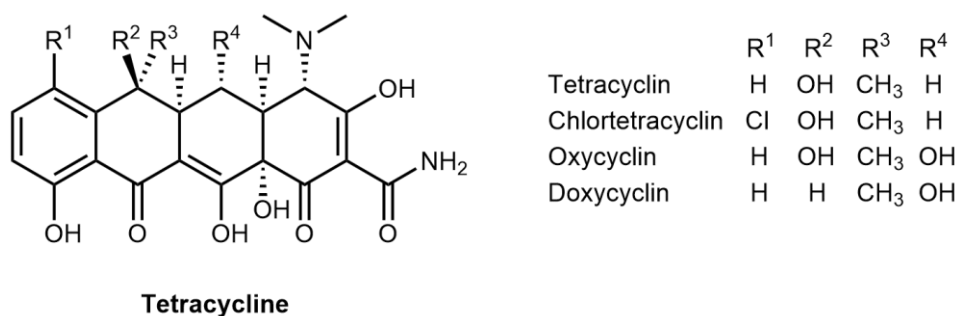


Abbildung 6. Chemische Strukturen wichtiger Tetracyclin-Antibiotika.

Tetracycline hemmen die Proteinsynthese der Zielorganismen und wirken damit gegen ein breites Spektrum von grampositiven und gramnegativen Bakterien sowie auch gegen andere Mikroorganismen [8, 29, 33, 34].

3 Theoretische Grundlagen

Sie sind weltweit die häufigsten veterinärmedizinisch eingesetzten Antibiotika [23]. Verschiedene Nutztierassen wie Geflügel, Rinder, Schweine und Schafe sowie Aquakulturen werden mit Tetracyclinen behandelt und in vielen Ländern (außerhalb der EU) dienen sie in niedrigeren Konzentrationen noch immer als Wachstumsförderer [16, 17, 34].

In der Humanmedizin werden Tetracycline vor allem zur Behandlung von atypischen Lungenentzündungen, Chlamydieninfektionen, akutem Q-Fieber, Malaria und Akne vulgaris eingesetzt [33]. Aufgrund der relativ günstigen Herstellungskosten sind Tetracycline besonders für wirtschaftlich schwache Regionen der Welt relevant [34].

In den letzten Jahren hat die Zahl der Tetracyclin-resistenten Bakterienstämme jedoch drastisch zugenommen, sodass eine Therapie heute in der Regel nur mit vorgeschaltetem Antibiogramm zu empfehlen ist [8, 34, 35]. Resistenzen erstrecken sich in der Regel auf alle Vertreter der Gruppe und es treten häufig Parallelresistenzen mit anderen Antibiotikaklassen auf [8].

3.1.3 Sulfonamide

Der therapeutische Nutzen von synthetischen Sulfonamid-Verbindungen wurde 1935 von Gerhard Domagk anhand des Azofarbstoffs Prontosil entdeckt, der – wie man heute weiß – im menschlichen Organismus zu der eigentlich wirksamen Substanz Sulfanilamid reduziert wurde [4, 8]. Durch eine zügige Markteinführung waren die Sulfonamide noch vor den Penicillinen die ersten Antibiotika, die ab Mitte der 1930er Jahre erhältlich waren [8]. Die Grundstruktur sowie einige häufig eingesetzte Derivate sind in Abbildung 7 dargestellt.

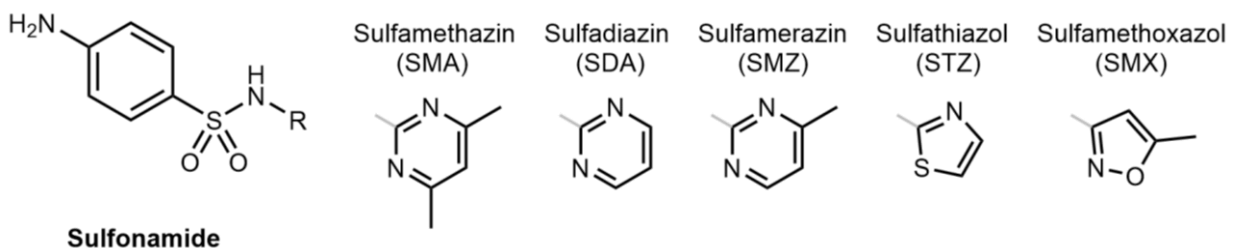


Abbildung 7. Chemische Strukturen wichtiger Sulfonamid-Antibiotika.

Sulfonamide hemmen im Zielorganismus durch Substratkonkurrenz zur strukturanalogen *p*-Aminobenzoesäure die Folsäuresynthese, die wiederum eine essenzielle Voraussetzung für die DNA-, RNA- und Proteinsynthese ist [8, 30]. Heute werden häufig Kombinationspräparate mit einem Diaminopyrimidin (meist Trimethoprim) verabreicht, da dieses einen folgenden Schritt der Folsäuresynthese hemmt und damit die Wirksamkeit verstärkt [8, 30].

Sulfonamide können grundsätzlich gegen eine Vielzahl von Bakterien und Protozoen eingesetzt werden [8, 28, 36]. Aufgrund ihrer relativ geringen Herstellungskosten sind Sulfonamide in der Veterinärmedizin weit verbreitet [36]. An Menschen werden Sulfonamide jedoch nur noch selten verabreicht, da mitunter allergische Reaktionen auftreten und insbesondere Sulfamethazin darüber hinaus im Verdacht steht, krebserregend zu sein [37, 38].

Einige Bakterienstämme können wie menschliche oder tierische Zellen Folsäure aus der Umgebung aufnehmen und besitzen somit eine natürliche Resistenz gegenüber Sulfonamiden [8, 30, 36]. Ferner begegnen manche Erreger der kompetitiven Hemmung beispielsweise auch durch eine verstärkte Produktion von *p*-Aminobenzoesäure [8]. Diese Resistenzen haben sich in den letzten Jahrzehnten durch gängige Übertragungsmechanismen weithin verbreitet [8, 36].

3.2 Antibiotika-Belastung in Lebensmittel- und Umweltproben

Wie in Abbildung 3 (Seite 7) gezeigt, können Antibiotika über verschiedene Eintragswege in Nahrungskette und Umwelt gelangen. Um die Relevanz zu verdeutlichen, werden im Folgenden exemplarisch Studienergebnisse beziehungsweise ermittelte Antibiotikagehalte zusammengefasst.

3.2.1 Lebensmittel tierischen Ursprungs

Für die Konsumenten unmittelbar relevant ist die Unbedenklichkeit von Lebensmitteln tierischen Ursprungs wie etwa Fleisch, Milch, Eiern oder Honig, da eventuell vorhandene Antibiotika direkt inkorporiert werden und somit nicht nur zu einer Resistenzbildung im Allgemeinen beitragen, sondern auch konkrete nachteilige Effekte auf die individuelle Gesundheit haben können.

Die WHO hat in ihrem *Codex Alimentarius* Standards für die Lebensmittelsicherheit veröffentlicht, die für eine Vielzahl von Pharmaka unter anderem die akzeptable Tageshöchstdosis und Rückstandshöchstmengen (*maximum residue limits*, MRLs) in diversen Lebensmitteln tierischen Ursprungs beinhalten. Innerhalb der EU sind zulässige Rückstandshöchstmengen für pharmakologisch wirksame Stoffe, so auch für eine Vielzahl von Antibiotika, im Anhang der Verordnung 37/2010 der Kommission festgelegt. Im Rahmen des Zulassungsverfahrens für ein Tierarzneimittel werden auf Grundlage von Studien Wartezeiten

3 Theoretische Grundlagen

festgelegt, die bis zur Gewinnung des jeweiligen tierischen Lebensmittels einzuhalten sind, um mit hoher statistischer Sicherheit die definierte Rückstandshöchstmenge nicht zu überschreiten.

Bei einer Studie des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (Zeitraum 2008 – 2012) waren in 11 % der Hähnchenfleisch-, 62 % der Putenfleisch-, 45 % der Schweinefleisch- und 0,6 % der Rindfleischproben aus dem bayerischen Einzelhandel Antibiotika nachweisbar (hauptsächlich Tetracycline), Rohmilch aus milchproduzierenden Betrieben wurde zu 2 % positiv getestet [39]. Die ermittelten Konzentrationen lagen in allen Proben unterhalb der zulässigen Rückstandshöchstmenge. Allerdings sind auch geringe Spuren von Antibiotika in Lebensmitteln auf die Dauer problematisch, da sie Allergien auslösen können und die Resistenzbildung begünstigen. Eine Untersuchung von Rohmilchproben in Kroatien ergab ebenfalls keine Überschreitung der zulässigen Rückstandshöchstmenge, allerdings zahlreiche positive Nachweise von Tetracyclinen, Sulfonamiden und weiteren Antibiotika [40]. Sogar in verarbeiteter Vollmilch (ultraheiß) aus dem Einzelhandel wurden in der Türkei unter anderem Tetracycline in 66,8 % der Proben in geringen Konzentrationen nachgewiesen [41].

In anderen Regionen der Welt finden sich teilweise deutlich höhere Antibiotikabelastungen in tierischen Lebensmitteln. So wurden beispielsweise in einer algerischen Studie 85,5 % der Hähnchenfleischproben positiv getestet [42]. Eine Untersuchung von Hühnereiern in Iran ergab eine Belastung bei 12,5 % der Proben (immer Makrolide) [43]. Ebenfalls in Iran wurden verschiedene Schlachterezeugnisse von Rindern auf lokalen Märkten hinsichtlich ihres Gehalts an Tetracyclinen analysiert, wobei in 25,8 % der Muskelfleisch-, 31,8 % der Leber- und 22,7 % der Nierenproben sogar eine Überschreitung der im *Codex Alimentarius* empfohlenen Rückstandshöchstmenge festgestellt wurde. In Vietnam wurde Hähnchenfleisch zu 11 % und Schweinefleisch zu 39 % positiv auf Antibiotika getestet (überwiegend Tetracycline) [44]. Eine Studie in Indien, die Rohmilch auf ihren Gehalt an Tetracyclinen hin untersuchte, ergab bei 2,3 % der Proben eine Überschreitung der im *Codex Alimentarius* empfohlenen Rückstandshöchstmenge und einen positiven Nachweis in insgesamt 13,5 % der Proben [45]. Untersuchungen von verarbeiteter Milch (ultraheiß oder pasteurisiert) aus dem Einzelhandel in China wiesen unter anderem Tetracycline und Sulfonamide in geringen Konzentrationen nach [46, 47].

Auch in Aquakulturen zur Produktion von Fisch und Meeresfrüchten werden Antibiotika in großer Menge eingesetzt. So ergab beispielsweise eine Studie in Nigeria, dass 95 % der befragten Betreiber von Fischfarmen Antibiotika häufig auch ohne tierärztliche Verschreibung

verabreichten und keine Wartezeiten vor der Schlachtung einhielten. Damit erklärt sich, dass 52,5 % der untersuchten Filets des Afrikanischen Raubwelses *Clarias gariepinus* positiv auf Antibiotika getestet wurden. In 18,8 % der Proben wurde die im *Codex Alimentarius* empfohlene Rückstandshöchstmenge für Oxytetracyclin überschritten [48].

Anhand der vorgestellten Studien lässt sich ableiten, dass für die Gewährleistung der Lebensmittelsicherheit die Einhaltung von Wartezeiten, bevor Produkte von einem behandelten Tier gewonnen werden, äußerst wichtig ist und Stichproben tierischer Erzeugnisse unbedingt regelmäßig untersucht werden sollten. Gerade in weniger entwickelten Regionen der Welt muss dazu erst ein Bewusstsein für die Problematik in der Bevölkerung geschaffen werden. Ferner müssen Rückstandshöchstmenge und Wartezeiten auch dort gesetzlich normiert und staatlich kontrolliert werden.

3.2.2 Kuhmilch und tierische Exkremente

Während in vielen Ländern die Einbringung tierischer Erzeugnisse in die Nahrungskette während oder kurz nach einer antibiotischen Behandlung untersagt ist, dürfen die Exkrete von Tieren wie Urin und Kot sowie auch antibiotisch belastete Milch – mangels Alternativen – als gesammelte Gülle oder direkt der Umwelt zugeführt werden. Dabei ist zu beachten, dass etwa 10 – 90 % der inkorporierten Wirkstoffmengen unverändert wieder ausgeschieden werden [7].

Untersuchungen von Gülle aus einer Schweinemast in Norddeutschland zeigten Tetracyclin-, Sulfamethazin- und Sulfadiazin-Gehalte von bis zu 41,2 mg kg⁻¹, 7,2 mg kg⁻¹ und 11,3 mg kg⁻¹ (jeweils bezogen auf die Trockenmasse) [49]. In Österreich wurden in Schweinedung Tetracycline und Sulfamethazin mit Konzentrationen von bis zu 46 mg kg⁻¹ beziehungsweise 20 mg kg⁻¹ nachgewiesen [50]. Eine dänische Studie bestimmte ebenfalls in Schweinedung die Maximalgehalte von Tetracyclinen und Sulfadiazin zu 30 mg kg⁻¹ und 2 mg kg⁻¹ (jeweils bezogen auf die Trockenmasse) [51]. In spanischen Untersuchungen enthielt die Gülle von Milchkühen, Hähnchen und Schweinen Tetracycline in Konzentrationen von bis zu 3 mg kg⁻¹, 14 mg kg⁻¹ und 106 mg kg⁻¹ [52]. Gülle aus Enten- und Schweinemastbetrieben in China enthielt hauptsächlich Tetracycline und Sulfonamide in Konzentrationen von bis zu 184 µg kg⁻¹ beziehungsweise 33 µg kg⁻¹ [20]. Im Kot von Milchkühen, Hähnchen und Schweinen wurden ebenfalls in China unter anderem Tetracycline mit Konzentrationen von bis zu 10 mg kg⁻¹, 13 mg kg⁻¹ und 57 mg kg⁻¹ sowie Sulfonamide mit Konzentrationen von bis zu 1 mg kg⁻¹, 7 mg kg⁻¹ und 5 mg kg⁻¹ nachgewiesen [53]. Eine sehr umfassende Auswertung einer Vielzahl

von Gülle-Analysen findet sich in [54]. Demnach sind im Allgemeinen sowohl die Nachweishäufigkeit als auch die gemessenen Antibiotikagehalte in den gesammelten Exkrementen von Mastschweinen und -Hähnchen deutlich höher als bei Rindern [54, 55], was mit der geringeren Verabreichungshäufigkeit und -Menge pro kg Biomasse bei Rindern [11] im Einklang steht.

3.2.3 Böden und Agrarerzeugnisse

Wird Gülle auf Ackerböden ausgebracht und eingepflügt, so können enthaltene Kontaminanten durch Umwelteinflüsse abgebaut, von Pflanzen aufgenommen, an Bodenbestandteile adsorbiert oder von Regenwasser in tiefere Bodenschichten oder nahe gelegenes Oberflächenwasser ausgewaschen werden [56].

Da Tetracycline als Chelat-Liganden fungieren und damit an Mineralen adsorbieren können, werden sie bevorzugt in Böden oder im Sediment akkumuliert [57, 58]. Bemerkenswert hohe Maximalkonzentrationen in Ackerböden wurden z.B. in Nordchina (Chlortetracyclin: 11 mg kg⁻¹ [55]; Oxytetracyclin: 2,7 mg kg⁻¹ [20]), Norddeutschland (Tetracyclin: 307 µg kg⁻¹) [59] und Südkorea (Tetracyclin: 178 µg kg⁻¹) [60] gefunden. Auch Sulfonamide werden häufig in Böden nachgewiesen. So wurde der SMA-Gehalt einer mit Schweinegülle gedüngten Ackerfläche in Nordrhein-Westfalen zu 15 µg kg⁻¹ bestimmt [61].

Eine Gewächshaus-Studie mit Mais, Frühlingszwiebeln und Kohl zeigte, dass alle Pflanzen das im Dung enthaltene Chlortetracyclin aufwiesen (2 – 17 µg kg⁻¹), nicht aber das ebenfalls enthaltene Makrolid Tylosin, das aufgrund seines hohen Molekulargewichts vermutlich weniger mobil ist [62]. Auch im Gewächshaus kultivierte Karotten, die über die Bewässerung dauerhaft mit definierten Mengen von Amoxicillin und Tetracyclin versetzt wurden, nahmen diese bis zu Maximalkonzentrationen von 45 µg kg⁻¹ beziehungsweise 37 µg kg⁻¹ auf [63].

In Nordchina angebaute Agrarerzeugnisse enthielten ebenfalls hauptsächlich die im Boden akkumulierten Tetracycline, wobei die höchste Konzentration für Chlortetracyclin mit 532 µg kg⁻¹ in Korianderblättern bestimmt wurde [20]. Eine spanische Studie mit grünem Salat, Tomaten, Ackerbohnen und Blumenkohl ergab, dass Fluorchinolone und Sulfamethoxazol häufig nachweisbar waren, mit Maximalgehalten von 38 µg kg⁻¹ beziehungsweise 11 µg kg⁻¹ in grünem Salat (Tetracycline wurden nicht analysiert) [64].

3.2.4 Abwasser und Kläranlagenablauf

Im Abwasser werden die menschlichen Exkreme mit Frischwasser deutlich verdünnt und dann üblicherweise zu einer Kläranlage geleitet. Untersuchungen von Krankenhausabwässern in der Türkei ergaben, dass besonders die Makrolid-Antibiotika Azithromycin und Clarithromycin sowie das Fluorchinolon Ciprofloxacin mit Maximalgehalten von $163 \mu\text{g L}^{-1}$, $160 \mu\text{g L}^{-1}$ und $20 \mu\text{g L}^{-1}$ enthalten waren, während aber auch Sulfonamide und Tetracycline mit bis zu $0,37 \mu\text{g L}^{-1}$ und $0,06 \mu\text{g L}^{-1}$ nachgewiesen werden konnten; im Zulauf der entsprechenden städtischen Kläranlage fanden sich hingegen deutlich geringere Antibiotika-Konzentrationen, die die Krankenhausabwässer mit Haushaltsabwässern gemischt wurden [65].

Da die Klärprozesse üblicherweise noch nicht für den Abbau von Antibiotika optimiert sind, enthält der Ablauf, der dann in Oberflächengewässer eingeleitet wird, meist ähnliche Mengen wie der Zulauf. So wurden beispielsweise in Dresden unter anderem Doxycyclin und Sulfamethoxazol mit Maximalkonzentrationen von $2,4 \mu\text{g L}^{-1}$ und $2,2 \mu\text{g L}^{-1}$ im Zulauf zur Kläranlage und $1,1 \mu\text{g L}^{-1}$ und $8,3 \mu\text{g L}^{-1}$ im Ablauf der Kläranlage nachgewiesen [66]. Ferner ergab eine Metastudie durchschnittliche Sulfamethoxazol-Gehalte von $0,32 \mu\text{g L}^{-1}$ im Zulauf und $0,26 \mu\text{g L}^{-1}$ im Ablauf von Kläranlagen und auch für die meisten anderen Antibiotika wurden kaum Verringerungen durch den Klärprozess festgestellt [67]. In Australien wurde eine außergewöhnlich hohe Konzentration des β -Lactams Cefalexin von $64 \mu\text{g L}^{-1}$ in einem Kläranlagenzulauf bestimmt [68]. Eine aktuelle umfassende Studie zur Erfassung von 53 Antibiotika im Ablauf von Kläranlagen in Deutschland, Finnland, Irland, Norwegen, Portugal, Spanien und Zypern ermittelte beispielsweise die höchste Cefalexin-Konzentration in Finnland mit $1,05 \mu\text{g L}^{-1}$ und die höchste Tetracyclin-Konzentration in Portugal mit $0,61 \mu\text{g L}^{-1}$, wobei insgesamt die höchsten Antibiotika-Gehalte in Irland, Portugal und Spanien gemessen wurden [69].

3.2.5 Oberflächenwasser und Grundwasser

Auch Oberflächenwasser und Grundwasser können mit Antibiotika belastet sein. Der Eintrag erfolgt dabei entweder über die Einleitung von (ungeklärtem oder geklärtem) Abwasser oder durch Auswaschungen aus landwirtschaftlich genutzten Böden, die mit belasteter Gülle gedüngt wurden.

In Oberflächengewässern wurden hohe Konzentrationen von Tetracyclinen in Südkorea (Tetracyclin: $255 \mu\text{g L}^{-1}$) [60], China (Oxytetracyclin: $73 \mu\text{g L}^{-1}$) [70], Japan (Oxytetracyclin: $68 \mu\text{g L}^{-1}$) [71] und den USA (Oxytetracyclin: $1,3 \mu\text{g L}^{-1}$) [72] nachgewiesen.

Sulfonamide wurden beispielsweise in Flüssen in Nordrhein-Westfalen gefunden (SMX: bis zu 98 ng L^{-1} ; SMA: bis zu 7 ng L^{-1}) [61].

Eine Studie des Umweltbundesamts zur Belastung des oberflächennahen Grundwassers in Nordwestdeutschland ergab an zwei Messstellen hohe SMX-Gehalte (maximal 950 ng L^{-1}), die auf den Eintrag aus nahe gelegenen Kleinkläranlagen zurückgeführt werden konnten [18].

Eine detaillierte Übersicht zu veterinärmedizinischen Arzneimittel-Rückständen in Gewässern findet sich in [23].

3.2.6 Persistenz der verschiedenen Antibiotikaklassen in der Umwelt

Für die Entwicklung von Nachweisverfahren für die Antibiotika-Analytik in Umweltproben ist von großer Bedeutung, welche Antibiotikaklassen überhaupt über einen längeren Zeitraum unter den vorherrschenden Bedingungen stabil und damit potenziell auffindbar sind.

Obwohl β -Lactam-Antibiotika in besonders großen Mengen eingesetzt werden, finden sich diese kaum oder nur in sehr niedrigen Konzentrationen in der Umwelt [7, 17, 18]. Dies liegt an einer geringen Persistenz aufgrund der Hydrolyse-Anfälligkeit des β -Lactam-Rings [73]. β -Lactam-resistente Bakterien sind allerdings trotzdem weit verbreitet [7, 18, 21].

Die Persistenz von Sulfonamiden und Tetracyclinen ist deutlich höher als die von β -Lactamen [74]. Sulfonamide sind vollsynthetische chemische Verbindungen und daher kaum biologisch abbaubar [18]. So wurde die hohe Stabilität von Sulfonamiden anhand eines mit SMA-belasteter Gülle gedüngten Ackerbodens gezeigt, in dem sieben Monate nach der Düngung noch immer etwa der theoretisch errechnete SMA-Gehalt nachgewiesen werden konnte [61]. Auch Tetracycline sind offenbar relativ inert gegenüber Umwelteinflüssen. In einem ähnlichen Experiment wurde ein Acker mit Gülle gedüngt, die Tetracyclin enthielt. Im Boden war einen Monat nach der Düngung etwa genauso viel Tetracyclin nachweisbar wie nach weiteren sechs Monaten [59].

Anhand dieser Erkenntnisse sowie den in Kapitel 3.2.5 aufgeführten zahlreichen Nachweisen von Sulfonamiden und Tetracyclinen in Gewässern lässt sich ableiten, dass insbesondere für

diese beiden Antibiotikaklassen effiziente Analysemethoden für Umweltproben benötigt werden.

3.3 Etablierte Nachweisverfahren für die Antibiotika-Analytik

Für den Nachweis von Antibiotika existiert eine Vielzahl von analytischen Methoden, die auf unterschiedlichsten Messprinzipien beruhen und daher eine sehr große Bandbreite an Sensitivität, Selektivität, Dauer, Kosten und apparativem Aufwand umfassen.

Am häufigsten kommen mikrobiologische, massenspektrometrische und immunochemische Nachweisverfahren zum Einsatz. Deren Vor- und Nachteile sind in Tabelle 1 gegenübergestellt und werden im Folgenden weiter ausgeführt.

Tabelle 1. Vor- und Nachteile der gängigsten Nachweisverfahren für die Antibiotika-Analytik.

Nachweisverfahren	Vorteile	Nachteile
Mikrobiologische Hemmstoff-Tests	<ul style="list-style-type: none">• Einfach• Kostengünstig• Screening-Methode	<ul style="list-style-type: none">• Unspezifisch• Zeitaufwendig• Keine Quantifizierung möglich
HPLC-MS	<ul style="list-style-type: none">• Eindeutige Identifizierung• Quantitative Bestätigungsmethode	<ul style="list-style-type: none">• Matrix-sensibel, daher Probenaufbereitung notwendig• Hoher apparativer Aufwand• Kostenintensiv• An Laborstandort gebunden
Immunoassays	<ul style="list-style-type: none">• Gruppen-spezifisch oder sogar selektiv für einzelne Analyte• Effiziente Screening-Methode• Quasi-kontinuierliches Monitoring möglich	<ul style="list-style-type: none">• Keine eindeutige Identifizierung möglich

Mikrobiologische Hemmstoff-Tests werden zum unspezifischen Screening auf antimikrobiell wirksame Substanzen eingesetzt. Dazu wird versucht, einen Bakterienstamm in Gegenwart der Probe zu kultivieren. Gelingt dies innerhalb von einigen Stunden nicht, so wird die Probe positiv befundet und mit einer Bestätigungsmethode weiter untersucht.

Üblicherweise dient die HPLC-MS als quantitative Bestätigungsmethode. Hierfür werden die Analyten zunächst aus der Matrix extrahiert, dann mittels HPLC chromatographisch

aufgetrennt und schließlich massenspektrometrisch eindeutig identifiziert und quantifiziert. Diese Methode liefert verlässliche Resultate, ist allerdings sowohl hinsichtlich der Anschaffung der Geräte als auch im Unterhalt sehr kostenintensiv und nicht mobil einsetzbar.

Immunoassays (und andere Methoden, die mit selektiven Rezeptoren arbeiten) bilden schließlich für viele analytische Fragestellungen einen geeigneten Kompromiss zwischen Spezifität und Effizienz. So sind die verwendeten Antikörper oder anderen Rezeptoren speziell für die Bindung an charakteristische chemische Strukturen von Antibiotikaklassen oder einzelnen Antibiotika ausgerichtet und ermöglichen damit ein hinreichend selektives Screening. Die eindeutige Identifizierung der Substanzen durch eine Bestätigungsmethode wird durch die mögliche Eingrenzung anhand der Screening-Ergebnisse erleichtert. Auch eine Quantifizierung (zumindest der Größenordnung, deswegen oftmals die Bezeichnung *semi-quantitativ*) ist in der Regel möglich. Sofern das Messverfahren so konzipiert ist, dass der Immuno- oder Rezeptor-Assay Fluss-basiert und innerhalb von wenigen Minuten abläuft, kann die Methode überdies für ein quasi-kontinuierliches Monitoring eingesetzt werden.

Im Folgenden werden die angesprochenen Methoden eingehender erläutert. Dabei werden etablierte Messverfahren für die in dieser Arbeit adressierten Antibiotika vorgestellt.

3.3.1 Mikrobiologische (Hemmstoff-)Tests

Mikrobiologische Methoden nutzen grundsätzlich bestimmte Bakterienarten, um anhand von Wechselwirkungen mit dem Ziel-Analyt dessen Anwesenheit in der Probe nachzuweisen. Hemmstoff- oder Inhibitionstests beruhen dabei auf der Behinderung der Bakterienkultivierung durch antimikrobielle Wirkstoffe [75, 76].

Grundsätzlich werden diese Verfahren entweder in Teströhrchen oder in Petrischalen (Platten) durchgeführt, jeweils gefüllt mit Nährmedium und angeimpft mit dem Testkeim. Dazu wird eine definierte Menge der Probe gegeben und es erfolgt eine Inkubation mit für den Testkeim idealen Kultivierungsbedingungen [77]. Bei den Teströhrchen ist üblicherweise ein pH- oder Redox-Indikator enthalten, der aufgrund von bakteriellen Stoffwechselprodukten einen Farbwechsel durchläuft, sofern keine Antibiotika in der Probe vorhanden sind, die antimikrobiell wirksam werden. Bei den Plattentests wird hingegen meist optisch analysiert, ob in der Umgebung der Probe das bakterielle Wachstum ausbleibt.

3 Theoretische Grundlagen

Diese Tests werden beispielsweise im Bereich der Lebensmittelkontrolle als Screening-Methode eingesetzt, um neben einer Vielzahl von nicht zu beanstandenden Proben wenige möglicherweise belastete Proben zu ermitteln [77-80]. Einige Vorteile sind die Einfachheit und die geringen Kosten sowie die grundsätzliche Möglichkeit, jede Substanz mit antimikrobieller Wirkung in einer Analyse zu erfassen [38, 75]. Allerdings sind Inhibitionstests mit mehreren Stunden immer sehr zeitaufwendig und können nicht oder zumindest nicht verlässlich zwischen verschiedenen Antibiotikaklassen unterscheiden. Außerdem sind falsch-negative Ergebnisse durchaus keine Seltenheit, da sich die verschiedenen Antibiotikaklassen beispielsweise hinsichtlich ihres pH-Optimums und ihres passenden Testkeims deutlich unterscheiden [77]. Daher werden in der Praxis häufig mehrere Platten mit verschiedenen pH-Werten und/oder Testkeimen kombiniert, um ein möglichst breites Spektrum der Antibiotika zu erfassen. So gelingt beispielsweise der Nachweis von Sulfonamiden, wenn einer Platte (pH 7,2 und *Bacillus subtilis* BGA als Testkeim) Trimethoprim zugesetzt ist, das die Wirkung von Sulfonamiden verstärkt [77, 78]. Verbreitet ist der sogenannte 4-Platten-Test, der neben der eben beschriebenen Platte noch zwei weitere Platten mit *Bacillus subtilis* BGA (pH 6 und 8) sowie eine Platte mit *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 (pH 8) umfasst [42, 43, 77, 78].

Für die Routine-Analytik in der Lebensmittel-Überwachung sind verschiedene Test-Kits kommerziell erhältlich, wie z. B. Premi Test (R-Biopharm), Delvotest (DSM) oder Charm Blue Yellow II Test (Charm Sciences) [75, 77, 81].

Bei einer Weiterentwicklung der Methode in Form eines Biosensors wurde die antimikrobielle Wirkung von Tetracyclinen und Chinolonen auf *E. coli* anhand einer abnehmenden CO₂-Produktion detektiert. Als Nachweisgrenze wurden 25 µg L⁻¹ in Milch ermittelt und die als „sehr kurz“ bezeichnete Analysendauer betrug immer noch 120 min [82].

3.3.2 HPLC-MS als quantitative Bestätigungsmethode

Die HPLC-MS ist die übliche quantitative Bestätigungsmethode für den Nachweis von Antibiotika [35, 75]. Der Gang der Analyse umfasst dabei die Extraktion der Analyten aus der Probe (z. B. durch SPE oder LLE, siehe Kapitel 3.4) gefolgt von der chromatographischen Trennung und der massenspektrometrischen Detektion [39, 80].

Bei der HPLC beruht die Zeit-aufgelöste Elution von verschiedenen Substanzen auf deren Adsorption am Material der Chromatographie-Säule beziehungsweise auf der Verteilung zwischen dem die stationäre Phase benetzenden Lösungsmittel und dem verwendeten

3 Theoretische Grundlagen

Laufmittel (mobile Phase). Je intensiver eine Substanz dabei mit der stationären Phase wechselwirkt, desto länger ist ihre Retentionszeit. Typische Kombinationen von stationärer und mobiler Phase sind entweder ein polares Säulenmaterial, z. B. Silica-Gel, und ein unpolares Laufmittel(gemisch), z. B. Hexan, oder ein unpolares Säulenmaterial, z. B. C₁₈-modifiziertes Silica-Gel, und ein relativ polares Laufmittel(gemisch), z. B. Methanol. Für die Antibiotika-Analytik wird üblicherweise die zweite Variante (sogenannte Umkehrphasen-Chromatographie) eingesetzt.

Für die massenspektrometrische Analyse werden die eluierten Analyten mit einer geeigneten Ionisationsmethode, z. B. ESI (Elektrospray-Ionisation), in stabile Ionen überführt und mittels elektrischer Spannung in das Vakuum des Analysators hinein beschleunigt. Gemäß dem Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) werden die Ionen entweder räumlich (z. B. im Sektorfeld-Analysator) oder zeitlich (z. B. im Flugzeit-Analysator) sehr empfindlich aufgetrennt und schließlich durch den Detektor (z. B. einen Sekundärelektronen-Vervielfacher) registriert. Anhand seines genauen m/z -Wertes kann für jedes detektierte Ion mithilfe einer Datenbank die Summenformel ermittelt werden.

Durch Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) wird die Identifizierung noch verbessert [83]. Dabei wird zunächst ein Molekül-Ion selektiert (üblicherweise mit einem Quadrupol-Analysator) und in einem weiteren Quadrupol durch Kollisionen fragmentiert. Die Fragment-Ionen werden dann schließlich in einem dritten Quadrupol detektiert. Somit stehen für die Identifizierung eines Analyten sowohl Molekül-Ionen als auch charakteristische Fragment-Ionen zur Verfügung, die neben der Summenformel auch Hinweise auf die Struktur geben [84].

Mit HPLC-MS-Methoden können Substanzen häufig schon im Konzentrationsbereich von wenigen ng L^{-1} auch ohne vorherige Aufkonzentrierung eindeutig identifiziert und verlässlich quantifiziert werden. Nachteile sind die hohen Kosten für Apparaturen und Verbrauchsmaterialien, der Bedarf an Fachpersonal und die aufwendige Probenvorbereitung zur Matrix-Abtrennung [38, 75, 80]. Des Weiteren ist es bei der Antibiotika-Analytik aufgrund der Heterogenität der zu untersuchenden Wirkstoff-Gruppen nicht möglich, alle interessierenden Substanzen mit einer analytischen Methode zu erfassen. Vielmehr müssen für ein umfassendes Screening sowohl positive als auch negative Ionen erzeugt und detektiert werden und auch die chromatographische Trennung muss unter Umständen variiert werden [83, 85]. Somit kann die HPLC-MS nicht effizient als Screening-Methode eingesetzt werden und als Bestätigungsmethode ist ein zumindest Gruppen-selektives Vor-Screening empfehlenswert, das natürlich ebenfalls möglichst niedrige Nachweisgrenzen gewährleisten sollte [75, 86].

Grundsätzlich kann statt des Massenspektrometers auch ein einfacher UV/Vis-Detektor oder ein Fluoreszenz-Detektor mit der HPLC gekoppelt werden [36, 87]. Damit sind die Substanzen jedoch nur anhand ihrer Retentionszeiten bestimmbar, sodass diese Methoden nicht als Bestätigungsmethoden geeignet sind, weil das Kriterium der direkten und zweifelsfreien Substanz-Identifizierung nicht erfüllt ist.

3.3.3 Immunochemische Methoden

Immunochemische Verfahren sind aufgrund ihrer Nachweisstärke und Selektivität bei gleichzeitiger Kosteneffizienz und einfacher Handhabung in der Routineanalytik als Screening-Methoden weit verbreitet [38, 75]. Dabei werden bestimmte Substanzen oder Substanzklassen (in diesen Kontext als Antigene bezeichnet) anhand ihrer charakteristischen chemischen Gruppen oder Strukturen durch dafür selektive Antikörper nachgewiesen [75, 86].

In der Regel werden heterogene Assay-Formate eingesetzt, bei denen einer der beteiligten Stoffe an einer Festphase, wie z.B. einer Mikrotiterplatte oder einem Mikroarray-Chip, immobilisiert ist. Somit baut sich der Assay an der Festphase auf und nicht gebundene Substanzen können leicht durch Waschschrte entfernt werden.

Niedermolekulare Analyten wie Antibiotika werden üblicherweise durch kompetitive Immunoassays nachgewiesen, bei denen gezielt zugesetzte Kompetitor-Antigene mit den Analyten in der Probe um die Antikörper konkurrieren. Dabei sind entweder die Antikörper immobilisiert und die markierten Kompetitor-Antigene werden mit der Probe vermischt (direkter Assay) oder die Kompetitor-Antigene sind immobilisiert und die markierten Antikörper werden mit der Probe gemischt (indirekter Assay). Die Detektion erfolgt schließlich anhand der jeweiligen Markierung von Kompetitor-Antigenen oder Antikörpern, wobei das Messsignal generell umso höher ausfällt, je niedriger die Analyt-Konzentration in der Probe ist. Damit bieten kompetitive Assay-Formate den Vorteil von tendenziell niedrigen Nachweisgrenzen, da gerade bei geringen Analyt-Konzentrationen hohe Signalintensitäten (mit geringeren relativen Schwankungen) auftreten.

Bei kompetitiven Assays kann die Kalibrierfunktion mittels logistischer Regression aus den Kalibriermessungen erhalten werden. Die allgemeine Formel dafür lautet:

$$B/B_0 = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x/x_0)^p} + A_2 \quad (3.1)$$

3 Theoretische Grundlagen

mit B/B_0 als relative Signalintensität bezogen auf die jeweils höchste Signalintensität in einer Kalibrierreihe (in %), x als der relativen Signalintensität zugewiesene Konzentration (in $\mu\text{g L}^{-1}$), A_1 als obere Asymptote (in %), A_2 als untere Asymptote (in %, in dieser Arbeit immer festgelegt auf 0 %), x_0 als Testmittelpunkt (Konzentration bei 50 % relativer Signalintensität in $\mu\text{g L}^{-1}$) und p als Steigung der Kurve am Testmittelpunkt. Bei halblogarithmischer Darstellung zeigen die Kalibrierkurven einen sigmoidalen Verlauf.

Die Nachweisgrenze und die Bestimmungsgrenze lassen sich aus der Kalibrierfunktion (mit $A_2 = 0$ %) mithilfe eines mehrfach gemessenen Leerwerts (Probenmatrix ohne Analyten) und der dabei ermittelten Standardabweichung nach den Formeln (3.2) und (3.3) berechnen:

$$x_{\text{Nachweisgrenze}} = x_0 \sqrt[p]{\frac{A_1}{B/B_0(\text{Leerwert}) - 3 \sigma_{B/B_0(\text{Leerwert})}} - 1} \quad (3.2)$$

$$x_{\text{Bestimmungsgrenze}} = x_0 \sqrt[p]{\frac{A_1}{B/B_0(\text{Leerwert}) - 6 \sigma_{B/B_0(\text{Leerwert})}} - 1} \quad (3.3)$$

Dabei sind $x_{\text{Nachweisgrenze}}$ und $x_{\text{Bestimmungsgrenze}}$ die Konzentrationswerte der Nachweisbeziehungsweise Bestimmungsgrenze (in $\mu\text{g L}^{-1}$), x_0 der Testmittelpunkt (Konzentration bei 50 % relativer Signalintensität in $\mu\text{g L}^{-1}$), p die Steigung der Kurve am Testmittelpunkt, A_1 die obere Asymptote (in %), $B/B_0(\text{Leerwert})$ der Mittelwert der relativen Signalintensitäten der Leerwert-Messungen bezogen auf die jeweils höchste Signalintensität in einer Kalibrierreihe (in %) und $\sigma_{B/B_0(\text{Leerwert})}$ die zugehörige Standardabweichung (in %).

In der Praxis haben sich insbesondere indirekt kompetitive Assay-Formate bewährt, bei denen die (Primär-)Antikörper nicht direkt markiert sind, sondern in einem weiteren Assay-Schritt ein universeller Sekundärantikörper mit Markierung zugegeben wird, der gegen eine charakteristische Region der Primärantikörper gerichtet ist, nämlich die typische Sequenz der Spezies, in der die Antikörper ursprünglich erzeugt wurden. So kann also beispielsweise für sämtliche Primärantikörper, die aus der Spezies Maus stammen, immer derselbe markierte anti-Maus-Sekundärantikörper eingesetzt werden, der wiederum in einer anderen Spezies, wie zum Beispiel Ziege oder Kaninchen, gegen die typische Maus-Antikörper-Sequenz hergestellt wurde. Dieser Assay-Aufbau ist schematisch in Abbildung 8 dargestellt.

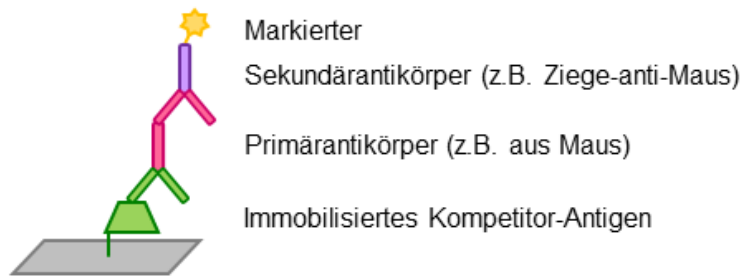


Abbildung 8. Schematischer Aufbau eines indirekt kompetitiven Immunoassays mit markiertem Sekundärantikörper.

Für die Markierung und damit die Detektion kommen unterschiedliche Konzepte infrage, wie radioaktive Isotope (Radio-Immunoassays), fluoreszierende Substanzen (Fluoreszenz-Immunoassays) oder Enzyme, die in einem weiteren Schritt eine Farb- oder Chemilumineszenz-Reaktion katalysieren (Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest, *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) [38, 80].

Daneben sind auch markierungsfreie Assays möglich, bei denen die Detektion in der Regel auf Oberflächenplasmonenresonanz (*surface plasmon resonance*, SPR) beruht [75].

Im Folgenden werden sowohl statisch inkubierte als auch Fluss-basierte Immunoassay-Testsysteme für die Antibiotika-Analytik vorgestellt.

3.3.3.1 Statisch inkubierte ELISAs in der Mikrotiterplatte

Sehr nachweisstark und dabei äußerst simpel und günstig sind die klassischen statisch inkubierten ELISAs, bei denen die einzelnen Assay-Schritte in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte durchgeführt werden.

So wurden beispielsweise für verschiedene Sulfonamide Nachweisgrenzen in Fischextrakt von $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$ bis $1 \mu\text{g L}^{-1}$ erreicht [88]. Auch eine Vielzahl von kommerziell erhältlichen ELISA-Testkits, wie z. B. RIDASCREEN Tetracyclin (R-Biopharm) [40, 45, 47] oder RIDASCREEN Sulfonamide (R-Biopharm) [36, 47] stehen für die Routine-Analytik zur Verfügung.

Die Nachteile von statisch inkubierten ELISAs in der Mikrotiterplatte sind die längeren Inkubationszeiten jedes Assay-Schritts, die zu einer Analysedauer von mehreren Stunden führen, und die fehlende Möglichkeit einer Integration in ein kontinuierliches Messsystem. Daher werden zunehmend auch Fluss-basierte Testsysteme entwickelt, die im Folgenden näher beschrieben werden.

3.3.3.2 Fluss-basierte (Mikroarray-)Testsysteme

Bei den Fluss-basierten Testsystemen ist zunächst die markierungsfreie SPR-Technik zu nennen, die häufig auf Biacore-Plattformen (Cytiva) ausgeführt wird. Mit diesem System können im Mikroarray-Format mehrere Immunoassays an verschiedenen definierten Stellen des Chips gleichzeitig ausgeführt werden. So wurden beispielsweise verschiedene Antibiotika(klassen), unter anderem Kanamycin und Sulfonamide, parallel in verdünnten Milchproben gemessen [89].

Eine weitere vielversprechende Methode ist der Fluss-basierte Chemilumineszenz-Mikroarray aufgrund der allgemein hohen Sensitivität der Chemilumineszenz-Detektion, die für Immunoassays belegt ist [90, 91].

Regenerierbarer Chemilumineszenz-Mikroarray-Immunoassay am MCR 3

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein bereits für den gleichzeitigen Nachweis von 13 Antibiotika in Milch etabliertes Fluss-basiertes Mikroarray-Verfahren mit regenerierbaren indirekt kompetitiven Chemilumineszenz-Immunoassays auf der Mikroarray-Analyse-Plattform MCR 3 [27] genutzt und erweitert. Daher werden die Grundlagen dieses Verfahrens hier im Detail erläutert.

a) Herstellung der Mikroarray-Durchflusszelle

Für die Herstellung der Mikroarray-Chips werden Oberflächen-modifizierte Glasobjektträger eingesetzt, auf denen die für den jeweiligen Assay passenden Kompetitoren in einzelnen Punkten aufgebracht und kovalent immobilisiert werden. Die Glasobjektträger werden zunächst gereinigt und angeätzt, daraufhin mittels 3-Glycidyoxypropyltrimethoxysilan (GOPTS) silanisiert und mit Jeffamine ED-2003 (einem Block-Copolymer aus Ethylenglycol und Propylenglycol mit terminalen Amino-Gruppen) beschichtet. Die Aktivierung dieser Oberfläche für die anschließende Anbindung der Kompetitoren erfolgt mit Poly(ethylenglykol)diglycidylether (Polyethylenglycol mit terminalen Epoxy-Gruppen) [92].

Als Kompetitoren werden entsprechende Antibiotika-Moleküle in Lösung mittels Kontaktdruck-Verfahren auf der aktivierten Chip-Oberfläche aufgebracht. Das Prinzip dieses automatisch durchgeführten Vorgangs zeigt Abbildung 9.

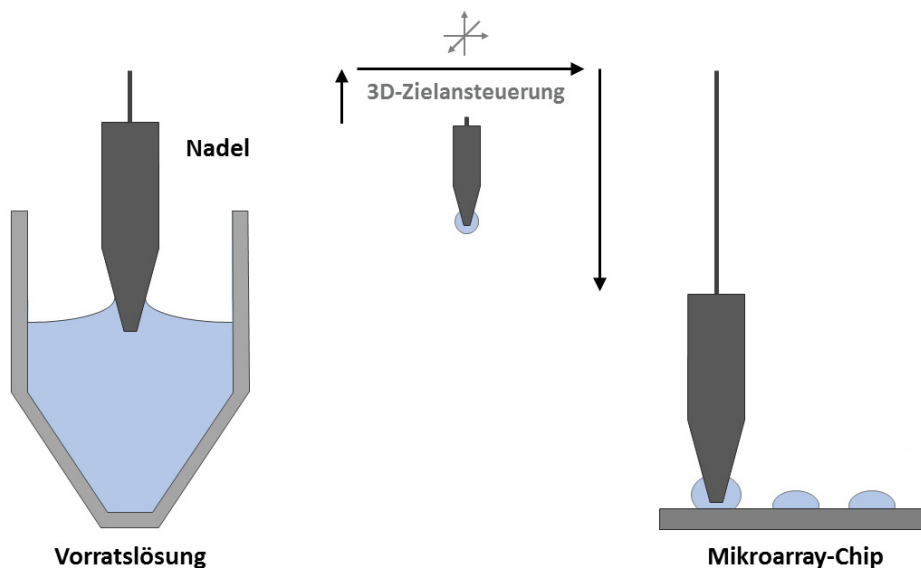


Abbildung 9. Prinzip des Kontaktdruck-Verfahrens mittels Nadel (*solid pin*); Aufnahme der Vorratslösung, dreidimensionale Ansteuerung der Zielstelle auf dem funktionalisierten Glasobjektträger und Absetzen des Tropfens.

Dabei wird ein Tropfen der zu übertragenden Lösung mittels einer metallischen Nadel aus dem Vorratsgefäß (einer Mikrotiterplatte) entnommen. Durch die programmierte Zielansteuerung wird die beladene Nadel über die gewünschte Stelle des Mikroarray-Chips gefahren und dann abgesenkt, sodass der Tropfen auf der Chip-Oberfläche abgesetzt wird.

Mit jeder Lösung werden üblicherweise fünf äquidistante Punkte generiert, die eine Reihe bilden. Die belegten Mikroarray-Chips werden für einige Stunden inkubiert, damit die kovalenten Bindungen zwischen den gelösten Kompetitoren und den Epoxy-Gruppen der aktivierten Oberfläche ausgebildet werden können. Daraufhin wird die verbliebene Oberfläche mittels Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) wieder inaktiviert, um unspezifische Bindungen während der Messung zu vermeiden.

Aus dem so funktionalisierten Glasobjektträger wird schließlich die Mikroarray-Durchflusszelle gefertigt (siehe Abbildung 10).

3 Theoretische Grundlagen

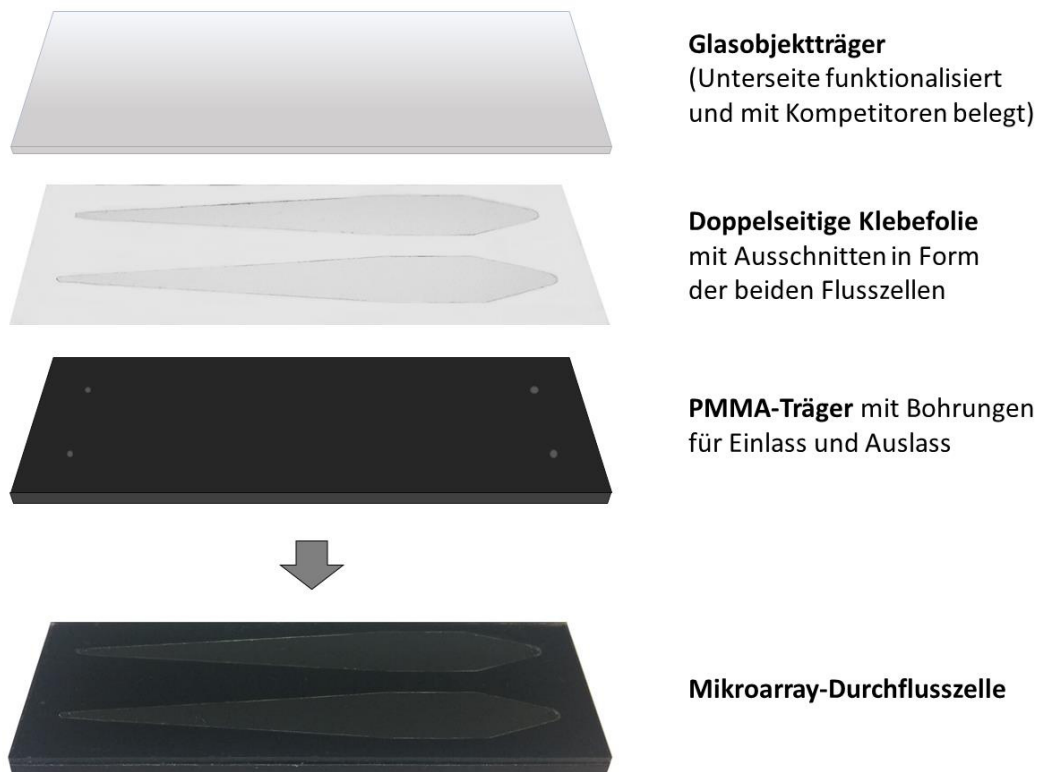


Abbildung 10. Dreiteiliger Aufbau der Zweikanal-Mikroarray-Durchflusszelle.

Dazu wird der Glasobjektträger mithilfe einer doppelseitigen Klebefolie (mit Aussparungen in Form der beiden Flusszellen) so auf einen PMMA-Träger aufgebracht, dass die funktionalisierte und mit den Kompetitoren belegte Seite zum Träger hin gerichtet ist. So liegen die Reihen der Kompetitoren-Punkte in den Ausschnitten der Klebefolie und somit innerhalb der Flusszellen, die über die passenden Einlass- und Auslass-Bohrungen mit Flüssigkeiten durchspült werden können. Für die Messungen wird jeweils eine so hergestellte Mikroarray-Durchflusszelle in die entsprechende Schublade des MCR 3 eingelegt.

b) Prinzip der Mikroarray-Messungen am MCR 3

In Abbildung 11 ist das etablierte Messprinzip des regenerierbaren indirekt kompetitiven Chemilumineszenz-Mikroarray-Immunoassays zum parallelen Nachweis verschiedener Antibiotika dargestellt, das mithilfe der Fluss-basierten Mikroarray-Analyse-Plattform MCR 3 durchgeführt werden kann.

3 Theoretische Grundlagen

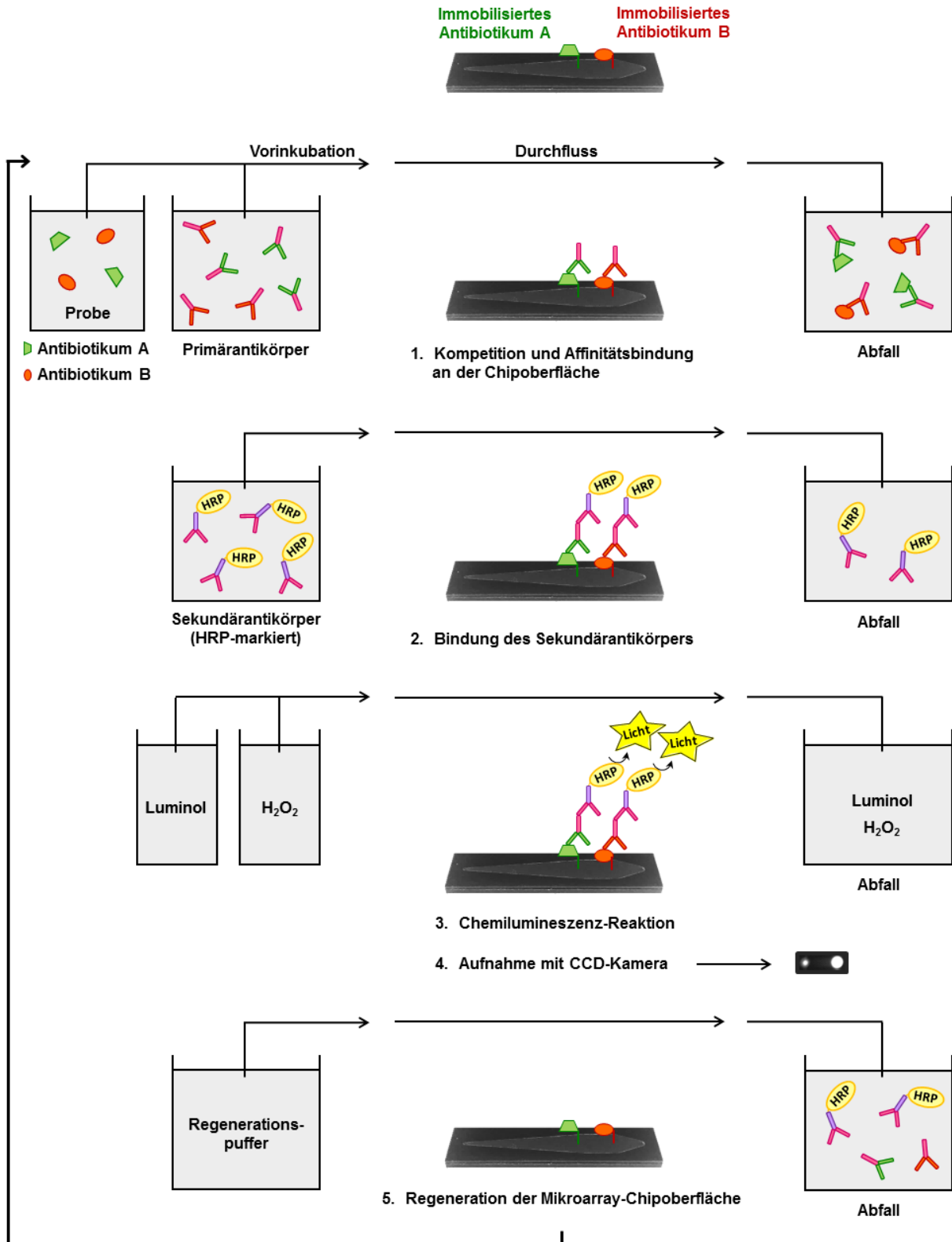


Abbildung 11. Prinzip des regenerierbaren indirekt kompetitiven Chemilumineszenz-Mikroarray-Immunoassays zum parallelen Nachweis verschiedener Antibiotika (nach [27]).

3 Theoretische Grundlagen

Bei der automatisierten Fließinjektionsanalyse am MCR 3 wird die flüssige Probe zunächst mit einer Lösung von Primärantikörpern, die für die nachzuweisenden Antibiotika jeweils spezifisch sind, vorinkubiert. Die Mischung wird anschließend langsam durch die Flusszelle geleitet (1). Dabei konkurrieren die immobilisierten Antibiotika-Moleküle und die eventuell in der Probe vorhandenen entsprechenden Antibiotika um die jeweiligen Primärantikörper. Demzufolge werden umso mehr Primärantikörper spezifisch an die Festphase gebunden, je geringer die entsprechende Analyt-Konzentration in der Probe ist.

Die gebundenen Primärantikörper werden mittels HRP-markierter Sekundärantikörper gekennzeichnet (2). Das Enzym HRP katalysiert schließlich die Chemilumineszenz-Reaktion von Luminol mit H_2O_2 (3), wobei das emittierte Licht für einen bestimmten Zeitraum (meist 60 s) mittels CCD-Kamera aufgezeichnet wird (4). Je höher der jeweilige Antibiotikagehalt in der Probe ist, desto geringer ist dabei die entsprechende Signalintensität.

Nach erfolgter Messung wird die Mikroarray-Chip-Oberfläche regeneriert, indem die Antikörper durch einen Regenerationspuffer (100 mM Glycin, pH 3) denaturiert und dadurch von den kovalent immobilisierten Kompetitoren abgelöst werden (5). Auf diese Weise können mit demselben Chip zahlreiche Proben in schneller Folge analysiert werden (Messdauer ca. 9 min).

Die Chemilumineszenz-Messbilder werden zunächst automatisch um die Intensitäten eines zu Beginn jedes Messtages aufgenommenen Leerbildes bereinigt und können dann mittels des Programms MCRImageAnalyzer (ODEVIS, Burghausen) ausgewertet werden. Für jeden Spot werden dabei die zehn hellsten Pixel berücksichtigt. Die so erhaltenen Werte der fünf äquivalenten Punkte einer Reihe werden gemittelt, wobei maximal zwei Punkte dabei ausgeschlossen werden, sofern ihre Intensität mehr als 20 % von diesem Mittelwert abweicht.

Für diese Arbeit wurde von dem Mittelwert einer Kontaktdruck-Reihe stets noch die Hintergrund-Intensität der Messung abgezogen. Diese wurde von der Software nach dem gleichen Prinzip anhand von fünf äquidistanten Stellen innerhalb der Flusszelle, an denen jedoch keine Punkte aufgebracht worden waren, bestimmt. Somit konnte den von Messung zu Messung mitunter leicht schwankenden Intensitäten Rechnung getragen werden.

3.3.4 Weitere Rezeptor-basierte Testsysteme

Neben Antikörpern können noch eine Reihe anderer Rezeptoren für analytische Testsysteme eingesetzt werden. Bei den Rezeptoren handelt es sich in der Regel um Makromoleküle, die eine bestimmte Tertiär-Struktur einnehmen und damit eine Bindungsregion beziehungsweise Bindungstasche zur selektiven Analyt-Erkennung aufweisen.

Solche Rezeptoren sind beispielsweise Aptamere (einzelsträngige Oligonukleotide, deren Nuklein-Basen mit dem Analyten in Wechselwirkung treten) oder molekular geprägte Polymere, die um die Zielstruktur herum polymerisiert wurden und damit passende Bindungstaschen beinhalten [86]. Außerdem existieren für eine Vielzahl von Analyten bereits natürliche Proteine (z. B. Bindungsproteine oder Enzyme), die isoliert oder künstlich hergestellt und dann als Rezeptoren eingesetzt werden können [93].

Im Folgenden werden diese drei Rezeptor-Arten näher vorgestellt. Das Tetracyclin-Repressor-Protein, das im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz kam, wird schließlich detailliert erläutert.

3.3.4.1 Aptamere

Aptamere sind kurze einzelsträngige Oligonukleotide (ca. 40 – 70 Basenpaare, RNA oder einzelsträngige DNA), die aufgrund ihrer entsprechenden Tertiär-Struktur in der Lage sind, ihre Zielmoleküle mit hoher Selektivität zu binden [36, 94]. Sie werden künstlich hergestellt mithilfe der sogenannten systematischen Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung (*selection of ligands by exponential enrichment*, SELEX) [93]. Dabei wird eine umfangreiche Zufallsbibliothek mit einzelsträngigen Oligonukleotiden (etwa $10^{14} - 10^{15}$ unterschiedliche) zu den immobilisierten Zielmolekülen gegeben. Diejenigen Oligonukleotide, die eine besondere Affinität zu der Struktur des Zielmoleküls haben, werden über zwischenmolekulare Wechselwirkungen gebunden und damit bei dem anschließenden Waschschriff nicht entfernt. So können sie kontrolliert eluiert, mithilfe von PCR vermehrt und anschließend wiederum mit den immobilisierten Zielmolekülen einer Selektion unterzogen werden. Nach mehreren Durchgängen bleiben nurmehr etwa ein bis zwei Oligonukleotid-Sorten übrig, die die höchste Affinität zu der Zielstruktur haben. Diese werden als Aptamere bezeichnet und können von nun an z. B. für analytische Zwecke eingesetzt werden. Die Affinität zu ihrer Zielstruktur ist in der Regel vergleichbar mit der von Antikörpern. Manche sind allerdings so selektiv, dass sie anstelle einer Gruppe von strukturell ähnlichen Substanzen nur einen ganz bestimmten Vertreter binden [94]. Dies ist im Sinne eines möglichst umfassenden

Screening-Verfahrens eher von Nachteil, kann aber für eine Anwendung, bei der eine bestimmte Substanz mit hoher Selektivität nachgewiesen werden soll, auch vorteilhaft sein.

3.3.4.2 Molekular geprägte Polymere (MIPs)

Molekular geprägte Polymere (*molecularly imprinted polymers*, MIPs) sind künstliche Erkennungsstrukturen, die durch Polymerisation von funktionellen Monomeren und Vernetzern um ein gewünschtes Zielmolekül (Templat) herum hergestellt werden. Anschließend wird das Templat entfernt, sodass das Polymer in seinem Inneren nun eine zum Zielmolekül passende Bindungstasche aufweist und demnach für analytische Zwecke eingesetzt werden kann. MIPs zeigen oftmals eine hohe Affinität und Selektivität für bestimmte Gruppen von strukturell ähnlichen Zielmolekülen [35]. Vorteilhaft ist überdies, dass MIPs im Vergleich zu anderen Rezeptoren relativ günstig in größeren Mengen hergestellt werden können und eine hohe Temperatur- und pH-Stabilität aufweisen [95].

MIP-Materialien können auch als selektive Sorbenzien für die Extraktion eingesetzt werden, wenn nur ganz bestimmte Analyten in einer Probe analysiert werden sollen [35, 95].

3.3.4.3 Proteine als biologische Rezeptoren

Als natürliche, biologische Rezeptoren kommen grundsätzlich alle Proteine infrage, die eine gewisse Selektivität für die interessierenden Zielstrukturen aufweisen. Für die Antibiotika-Analytik bieten sich bakterielle Proteine an, die entweder das Ziel des Wirkstoffs beziehungsweise der Wirkstoffklasse darstellen oder aber bei dem Resistenzmechanismus des Bakteriums eine Rolle spielen.

So sind beispielsweise die Transpeptidasen PBP2X und PBP3 von *Streptococcus pneumoniae* an der Synthese von Murein beteiligt, das für die Stabilität der bakteriellen Zellwand relevant ist [96]. In Anwesenheit von Penicillin oder anderen β -Lactam-Antibiotika werden die Proteine inaktiviert, was schließlich zur Lyse der Zellwand führt. PBP2X und PBP3 wurden bereits erfolgreich in Biosensoren eingesetzt [96, 97].

Das Tetracyclin-Repressor-Protein TetR ist hingegen an dem Resistenzmechanismus von Bakterien gegen Tetracycline beteiligt. TetR hat sich als Rezeptor in Biosensoren zur Tetracyclin-Analytik bewährt und wurde auch in dieser Arbeit in einen Rezeptor-Assay

integriert. Daher wird im Folgenden der Resistenzmechanismus gegen Tetracycline erläutert und es werden einige etablierte analytische Anwendungen näher beschrieben.

a) Resistenz gegen Tetracycline: Bakterielltes TetR-*tetO*-System

In Tetracyclin-empfindlichen Bakterien inaktiviert das Antibiotikum die Ribosomen und unterbindet so die Proteinbiosynthese der Zelle [98].

Ein verbreiteter Resistenzmechanismus gramnegativer Bakterien beruht auf dem aktiven Ausschleusen des Tetracyclins (in Form eines einfach negativ geladenen Tetracyclin-Anions Tc^- , das ein zweifach positiv geladenes Magnesium-Ion Mg^{2+} komplexiert: $[MgTc]^+$) durch das Membran-ständige Efflux-Protein TetA [99, 100]. Da dieser Transporter in Abwesenheit von Tetracyclin fortwährend positiv geladene Ionen aus der Zelle exportieren würde, wird seine Expression erst durch die Anwesenheit von Tetracyclinen induziert [101, 102]. Die Transkription des Gens, das für TetA codiert, wird durch Bindung des homodimeren Tetracyclin-Repressor-Proteins TetR an die Operator-Sequenz *tetO* verhindert ($K_{ass} \approx 10^{11} M^{-1}$) [101, 103]. In Abbildung 12 sind die palindromische *tetO*-Sequenz und eine räumliche Simulation des TetR-*tetO*-Komplexes dargestellt.

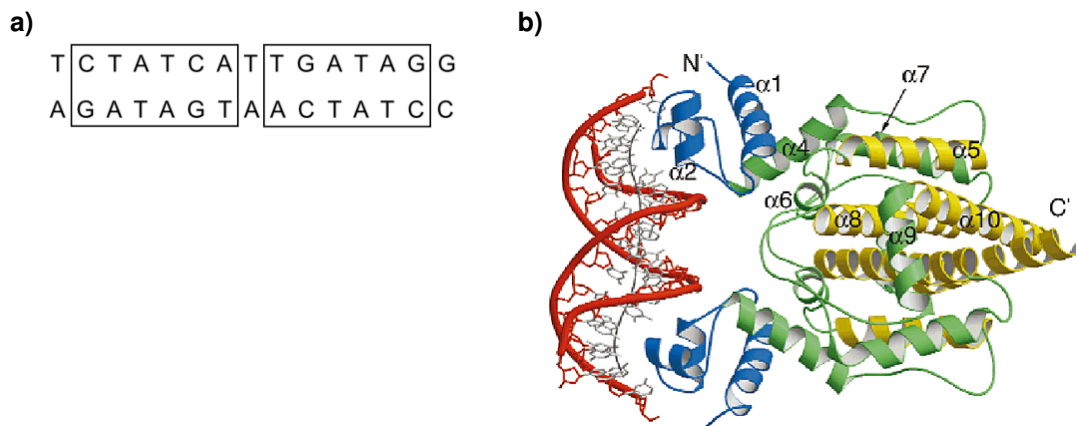


Abbildung 12. (a) DNA-Sequenz (15 Basenpaare) des *tet*-Operators; die Kästen verdeutlichen die palindromische Symmetrie von *tetO*. (b) Homodimeres Tetracyclin-Repressor-Protein TetR gebunden an *tetO*; DNA rot-grau, Helix-Turn-Helix-Helices blau, starre Helices gelb, durch Induktion bewegliche Helices grün (Verwendung der Abbildung freundlicherweise lizenziert durch Springer Nature) [101].

Dringt Tetracyclin in die Bakterienzelle ein, so bindet es als $[MgTc]^+$ mit hoher Affinität an TetR ($K_{ass} \approx 10^9 M^{-1}$) und bewirkt damit Konformationsänderungen des Repressor-Proteins, sodass sich dieses von *tetO* löst [104]. Auf diese Weise wird die Transkription der Gene ermöglicht, die für das Efflux-Protein TetA und für das Repressor-Protein TetR codieren [101,

103, 105]. Sobald ein Großteil des Tetracyclins aus der Zelle ausgeschleust ist, kann das freie TetR wieder an *tetO* binden und die Transkription wird beendet.

b) Adaption für die Analytik von Tetracyclinen

Für die analytische Anwendung können entweder ganze resistente bakterielle Zellen oder isoliertes TetR verwendet werden. Darüber hinaus ist es möglich, rekombinant exprimiertes TetR zu verwenden [38]. In jedem Fall ist die Anwesenheit von Mg^{2+} oder anderen zweiwertigen Kationen sicherzustellen [106].

TetR wurde bereits in einigen analytischen Anwendungen etabliert. Kommerziell erhältlich sind z.B. SNAP (Rezeptor-Assay mit Enzym-Markierung von IDEXX), Charm II (Radio-Rezeptor-Assay von Charm Sciences) und TetraSensor (Rezeptor-Assay auf Gold-Partikeln von Unisensor). Weitere TetR-basierte Assays für die Tetracyclin-Analytik zeigt Tabelle 2.

3 Theoretische Grundlagen

Tabelle 2. Bioassays für die Detektion von Tetracyclinen mit TetR als Rezeptor.

Assay-Prinzip	Detektionsmethode	Matrices	Nachweisgrenze / $\mu\text{g L}^{-1}$	Dauer der Analyse	Regenerierbar?	Ref
<i>Statisch inkubierte Assays</i>						
(a) Vollständige Zellen in Mikrotiterplatte	Bio-lumineszenz	Geflügel-fleisch	25 $\mu\text{g kg}^{-1}$	4 h	nein	[107]
(b) TetR immobilisiert in Mikrotiterplatte, Tetracyclin-HRP als Kompetitor	Chemilumineszenz	Milch	0,008	2 h	nein	[108]
(c) <i>tetO</i> immobilisiert auf Membran	Farb-reaktion	Milch, Fleisch, Serum	5 – 10	1 h	nein	[109]
(d) <i>tetO</i> immobilisiert in Mikrotiterplatte	Farb-reaktion	Milch, Rinderserum	1,9	einige Stunden	nein	[110]
(e) <i>tetO</i> immobilisiert in Mikrotiterplatte	Bio-lumineszenz	Tris-Puffer	0,05	2 h	nein	[111]
<i>Fluss-basierte Assays</i>						
(f) <i>tetO</i> immobilisiert auf Chip	Elektrischer Strom	Human-plasma	6,3	15 min	nein	[112]
(g) Doxycyclin immobilisiert auf Chip als Kompetitor	SPR	HBS-P-Puffer	–	15 min	kaum	[113]
(h) <i>tetO</i> immobilisiert auf Chip	SPR	HBS-P-Puffer Milch (+ Vorbehandlung)	1 15	10 min	ja	[114]
(i) <i>tetO</i> immobilisiert auf Chip (kovalent)	Chemilumineszenz	Leitungswasser	0,1	30 min	ja	<i>vorliegende Arbeit,</i> [115]

Zunächst sind einige statisch inkubierte Assays (a) - (e) dargestellt. Für den Nachweis von Tetracyclinen in Mikrotiterplatten wurde ein Biosensor mit ganzen Zellen des resistenten *E. coli*-Stammes TetLux entwickelt (a). Die Zellen enthielten ein Plasmid mit einem bakteriellen Luciferase-Operon, das zusammen mit *tetO* reguliert wurde. Die Bindung von Tetracyclin an TetR führte daher zur Expression der Luciferase und die resultierende Biolumineszenz wurde detektiert [107].

3 Theoretische Grundlagen

In einem kompetitiven Mikrotiterplatten-Rezeptor-Assay (b) wurde HRP-konjugiertes Tetracyclin verwendet, um mit Tetracyclin in der Probe um immobilisiertes TetR zu konkurrieren [108].

Kompetitive Assays mit immobilisiertem *tetO* wurden ebenfalls etabliert. So basierte ein Membranstreifen-Test (c) auf His₆-markiertem TetR, das in Gegenwart von Tetracyclin von *tetO* freigesetzt wurde. Das verbliebene TetR wurde mit anti-His₅-Antikörpern und HRP-markierten anti-IgG-Antikörpern gebunden und mittels einer HRP-katalysierten Farbreaktion sichtbar gemacht [109].

Mit in Mikrotiterplatten immobilisiertem *tetO* wurden einige ELISA-ähnliche Assays durchgeführt, z.B. (d) mit His₆-gekennzeichnetem TetR, anti-His₅-Antikörper, HRP-markiertem anti-Maus-Antikörper und Farbreaktion [110] oder (e) mit Luciferase-markiertem TetR und Biolumineszenz [111].

Im Allgemeinen sind diese statischen Assays recht einfach durchzuführen. Sie sind jedoch zeitaufwendig und nicht für ein kontinuierliches Monitoring geeignet. Außerdem sind diese Assays nicht regenerierbar und erlauben keine gleichzeitige Messung verschiedener Analyten im Sinne eines Multiplex-Verfahrens.

Darüber hinaus wurden einige Fluss-basierte Methoden (f) - (h) entwickelt. In einem kompetitiven Assay, bei dem *tetO* auf einem elektrochemischen mikrofluidischen Polymerchip immobilisiert war (f), wurde die Probe mit biotinyliertem TetR und Avidin-markierter Glucoseoxidase gemischt und über den Chip geleitet. Das elektrochemische Signal der Glucose-Oxidation wurde schließlich aufgezeichnet. Diese Methode kann in kleinem Maßstab zu einem Multiplex-Verfahren erweitert werden, da die hier vorgestellte mikrofluidische Plattform bis zu acht Assays gleichzeitig prozessieren kann. Der Biosensor ist jedoch für den Einmalgebrauch ausgelegt und kann nicht regeneriert werden [112].

Assays mit SPR-Detektion, z.B. auf der Biacore-Plattform, sind prinzipiell regenerierbar. Bei einem Assay mit immobilisiertem Doxycyclin als Kompetitor (g) stellte sich jedoch heraus, dass die Signalintensität mit jedem Regenerationsschritt deutlich abnahm [113].

Als einziger effektiv regenerierbarer Assay wurde bisher ein SPR-Biacore-Assay (h) veröffentlicht, bei dem auf einer Streptavidin-Oberfläche das mit Biotin markierte *tetO* immobilisiert war [114]. Jedoch erfordert diese Methode eine aufwendige Probenvorbehandlung aufgrund der Matrix-Empfindlichkeit der SPR-Technik und eine gleichzeitige Prozessierung verschiedener Assays auf dem gleichen Chip ist nicht möglich.

Für eine automatische Vor-Ort-Überwachung verschiedener Schadstoffe in Gewässer- oder Abwasserproben ist jedoch sowohl die Möglichkeit eines Multiplex-Verfahrens als auch die Regenerierbarkeit des Sensors für viele Messungen von großer Bedeutung. Diese Bedingungen erfüllt die in dem vorliegenden Forschungsprojekt entwickelte Methode mit kovalent auf einem Mikroarray-Chip immobilisiertem *tetO* und Chemilumineszenz-Detektion (i), die im weiteren Verlauf dieser Arbeit vertiefend diskutiert wird.

3.4 Methoden zur Extraktion und Aufkonzentrierung

Bei der Untersuchung von Realproben auf Antibiotika-Rückstände können zwei grundsätzliche Probleme auftreten. Zum einen sind die Analyten oftmals in eine komplexe biologische Matrix eingebettet, die eine direkte Analytik unmöglich macht, und zum anderen sind die Konzentrationen mitunter so gering, dass die Empfindlichkeit der Messung für Nachweis oder Quantifizierung nicht ausreicht. Deswegen wird eine Methode zur Probenaufbereitung benötigt, die die interessierenden Substanzen möglichst selektiv und vollständig aus der Probe extrahiert und dabei gleichzeitig aufkonzentriert.

Da eine geeignete Probenaufbereitung essenziell für die Gesamtleistung einer Analyse ist, liegt ein besonderes Augenmerk auf diesem Schritt, der abhängig von der Probenmatrix und den gesuchten Analyten individuell zu bedenken und auszuführen ist.

Die am häufigsten angewandten Verfahren zur Probenaufbereitung für den Nachweis von organischen Kontaminanten in Lebensmittel- und Umweltproben sind die Flüssig-Flüssig-Extraktion (*liquid-liquid extraction*, LLE) und die Festphasenextraktion (*solid phase extraction*, SPE) [35, 116].

Die LLE ist ein Verfahren, das auf der unterschiedlichen Verteilung (Löslichkeit) der Analyten in zwei nicht mischbaren flüssigen Phasen (normalerweise Wasser und ein organisches Lösungsmittel) basiert. Zur Extraktion der interessierenden Substanz wird die flüssige Probe üblicherweise mit einer ähnlichen Menge des Extraktionsmittels intensiv geschüttelt, um eine große Kontaktfläche zwischen den beiden flüssigen Phasen zu erhalten und den Übertritt des Analyten in das Extraktionsmittel zu begünstigen. Da die Verteilung mit einer Gleichgewichtseinstellung verbunden ist, sollten sich für eine möglichst effektive Extraktion die Löslichkeiten des Analyten in den beiden Phasen deutlich unterscheiden. Außerdem ist es empfehlenswert, dieselbe Probe mehrmals hintereinander zu extrahieren und die Extrakte zu vereinen.

Nachteil der LLE ist somit der (unter Umständen hohe) Verbrauch an oftmals gesundheitsschädlichen, giftigen oder zumindest teuren organischen Lösungsmitteln.

Bei der SPE wird die Probe durch eine Extraktionskartusche geleitet, die ein Material enthält, an das die interessierenden Analyten möglichst selektiv adsorbieren. Die anschließende Elution erfolgt mit einer geringen Menge eines geeigneten Lösungsmittels. Somit liegen die Vorteile der SPE im Vergleich zur LLE darin, dass der Verbrauch an Lösungsmitteln deutlich geringer ist und eine Aufkonzentrierung direkt erreicht wird. Darüber hinaus kann die Extraktion sehr einfach an die jeweiligen Analyten angepasst werden, indem man das Sorbens durch passende funktionelle Gruppen optimiert oder ein anderes Elutionsmittel einsetzt.

Im Folgenden wird die SPE im Detail erläutert.

3.4.1 Festphasenextraktion (*solid phase extraction, SPE*)

Grundlage der SPE ist der physikalische Prozess der Adsorption, der die Anlagerung von Stoffen aus einer Flüssig- oder Gasphase an die Oberfläche eines Feststoffs beschreibt. Dieser Prozess beruht auf bestimmten Wechselwirkungen zwischen der Festphase und den Analytmolekülen, wie etwa Van-der-Waals-Kräften, π - π -Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, ionischen Interaktionen oder der Ausbildung kovalenter Bindungen [117].

Der Ablauf einer SPE besteht typischerweise aus vier Schritten: Zunächst wird das Sorbens zur Vorkonditionierung mit geeigneten Lösungsmitteln benetzt und gespült (1). Daraufhin wird die Probe unter kontrollierten Bedingungen über die Festphase geleitet, sodass die enthaltenen Analyten adsorbieren, während unerwünschte Bestandteile der Probe nicht zurückgehalten werden (2). Die vollständige Entfernung von nicht adsorbierten Substanzen wird durch einen Waschschrift mit dem gleichen oder einem der Probe ähnlichen Medium (z. B. bei wässrigen Proben: Wasser) gewährleistet, das die Adsorption der Analyten nicht beeinträchtigt (3). Schließlich werden diese von der Festphase eluiert, indem ein Lösungsmittel zum Einsatz kommt, das die Wechselwirkungen zwischen Sorbens und Analyten so beeinträchtigt, dass eine Desorption erfolgt (4). Das Elutionsvolumen kann dabei weit unter dem eingesetzten Probenvolumen liegen.

Die Effizienz einer SPE hinsichtlich der Selektivität und Ausbeute der Extraktion ist von verschiedenen Parametern abhängig und kann durch eine gezielte Anpassung an die interessierenden Analyten und die Probenmatrix optimiert werden.

Einen großen Einfluss hat die Wahl eines geeigneten Sorptionsmittels. In der klassischen SPE werden dafür meist in Säulen gepackte, poröse sphärische Partikel oder auch poröse monolithische Materialien verwendet, die somit eine große Oberfläche für die Adsorption der Analyten aufweisen. Für die Extraktion von hydrophilen Substanzen wird oftmals Silica-Gel verwendet, das äußerst polare Silanol-Gruppen aufweist. Diese können mit organischen Funktionalitäten wie *n*-Octadecyl (C₁₈) modifiziert werden, sodass dann vor allem hydrophobe Verbindungen zurückgehalten werden. Wegen der Umkehrung der Polarität werden solche Sorptionsmittel auch als Umkehrphase (*reversed phase*, RP) bezeichnet.

Darüber hinaus werden häufig bestimmte Copolymere eingesetzt, die aus hydrophoben und hydrophilen Bestandteilen, wie Styrol beziehungsweise Divinylbenzol und *N*-Vinylpyrrolidon, aufgebaut sind und dementsprechend eine große Bandbreite von Analyten zurückhalten können.

Für die Extraktion von ionischen Substanzen bieten sich Kationenaustauscher mit beispielsweise Carboxyl- oder Sulfonyl-Gruppen oder Anionenaustauscher mit beispielsweise quartären Ammonium-Gruppen an.

Für eine möglichst umfassende Prozessierung einer Probe kann es hilfreich sein, mehrere verschiedene Sorptionsmittel nacheinander einzusetzen, mitunter auch bei unterschiedlichen pH-Werten, um die Analyten anhand ihrer unterschiedlichen Polaritäten zu fraktionieren und/oder störende Probenbestandteile effektiv zu entfernen [116].

3.4.2 Anwendung der SPE für die Analytik von Sulfonamid-Antibiotika

Die Anwendung der SPE zur Extraktion von Sulfonamiden wurde bereits vielfach beschrieben. Dabei kommt der Wahl des Sorptionsmittels eine besondere Bedeutung zu, da die Effektivität der Extraktion maßgeblich von den Wechselwirkungen zwischen Analyt und Sorptionsmittel, die wiederum durch die Probenmatrix beeinflusst sind, abhängt und sich sogar innerhalb einer Gruppe von chemisch ähnlichen Analyten deutlich unterscheiden kann [116]. Deswegen ist es wichtig, bei einer neuen Anwendung umfassende Voruntersuchungen zu den Wiederfindungen für die verschiedenen interessierenden Substanzen durchzuführen.

Tabelle 3 gibt eine Übersicht über gängige kommerziell erhältliche SPE-Säulen, die für die Extraktion von Sulfonamiden eingesetzt werden können, und führt Anwendungsbeispiele auf. Die Elution der Analyten erfolgt dabei üblicherweise mit Methanol oder auch Acetonitril [36].

3 Theoretische Grundlagen

Tabelle 3. Gängige SPE-Säulen für die Extraktion von Sulfonamiden mit Anwendungsbeispielen.

SPE-Säule (Hersteller)	Sorbens	Matrix	Analyse- methode	Ref
(a) BAKERBOND spe C18 (Avantor)	C ₁₈ -modifiziertes Kieselgel	Honig	LC mit Fluoreszenz- Detektor	[118]
(b) LiChrolut EN (Merck)	Ethylvinylbenzol- Divinylbenzol- Copolymer	Milch	LC-MS	[119]
(c) Chromabond HR-X (Macherey-Nagel)	Styrol-Divinylbenzol- Copolymer	Oberflächenwasser	LC-MS	[120]
(d) Strata- X (Phenomenex)	Styrol-Divinylbenzol- N-Vinylpyrrolidon- Copolymer	Abwasser	LC-MS	[66]
(e) Oasis HLB (Waters)	Divinylbenzol- N-Vinylpyrrolidon- Copolymer	Abwasser	LC-MS	[66]
		Abwasser einer Schweinezucht	LC-MS	[121]
		Grundwasser, Oberflächenwasser	LC-MS	[72]

Die Säule BAKERBOND spe C18 (a) enthält mit C₁₈-modifiziertem Kieselgel eine klassische Umkehrphase, bei der die Adsorption der Analyten auf Van-der-Waals-Wechselwirkungen beruht. Damit ist diese Säule relativ unspezifisch, jedoch für eine große Bandbreite von eher unpolaren Analyten geeignet. Eine Extraktion von Honig-Proben mit einer effektiven Aufkonzentrierung um den Faktor 3 und einer anschließenden LC mit Fluoreszenz-Detektion ergab Wiederfindungen von mehr als 80 % für SMZ, STZ und Sulfacetamid [118].

Bei der Säule LiChrolut EN (b), die ein Copolymer aus Ethylvinylbenzol und Divinylbenzol als Sorbens enthält, handelt es sich ebenfalls um eine Umkehrphase, die allerdings durch die aromatischen Ringe auch π - π -Wechselwirkungen ausbilden kann. Bei einer Extraktion von Milch mit einem Aufkonzentrierungsfaktor von 20 und einer anschließenden LC mit massenspektrometrischer Detektion wurde für SMA eine Wiederfindung von 101 % bestimmt [119]. Diese Methodencharakterisierung wurde allerdings nicht für die anderen später analysierten Sulfonamide durchgeführt, was – wie oben beschrieben – einen gewissen Mangel darstellt.

3 Theoretische Grundlagen

Das Sorbens der Chromabond HR-X (c) ist ein Copolymer aus Styrol und Divinylbenzol und ist demnach ebenfalls für unpolare Analyten und π - π -Wechselwirkungen geeignet. Bei einem Projekt, in dem ein neues Verfahren zur automatischen Extraktion einer Vielzahl von umweltrelevanten organischen Kontaminanten aus Oberflächenwasser entwickelt wurde, konnte mit einem Aufkonzentrierungsfaktor von 250 und einer LC-MS-Detektion beispielsweise SMX in Realproben nachgewiesen werden. Wiederfindungen wurden zwar für 251 Substanzen bestimmt, allerdings nicht einzeln angegeben. Für 159 Substanzen lagen die Wiederfindungen zwischen 60 % und 123 % [120].

Die Säule Strata-X (d) enthält als Sorbens ein Copolymer aus Styrol, Divinylbenzol und dem polaren Bestandteil *N*-Vinylpyrrolidon, sodass neben unpolaren und aromatischen Analyten auch solche mit hydrophilen Anteilen besonders gut adsorbieren können.

Ein sehr ähnliches Sorbens (Divinylbenzol-*N*-Vinylpyrrolidon-Copolymer) wird in der Säule Oasis HLB (e) verwendet. In einer Untersuchung von Abwasser-Proben auf ihren Gehalt an verschiedenen Antibiotika wurden diese beiden Säulen miteinander verglichen. In stark verdünntem Urin, der eine Antibiotika-freie Abwasser-Probe simulieren sollte, wurden mit beiden Extraktionssäulen (und LC-MS-Detektion) jeweils Wiederfindungen für zahlreiche Antibiotika bestimmt. Diese variierten wie erwartet stark für die unterschiedlichen Substanzen, fielen jedoch im Mittel mit Oasis HLB etwas höher aus. Für SMX, das als einziges Sulfonamid getestet wurde, ergab sich eine deutlich höhere Wiederfindung von 81 % mit Oasis HLB gegenüber 48 % mit Strata-X [66].

Die Säule Oasis HLB (e) wurde auch für eine Extraktion von Sulfonamiden und anderen Antibiotika aus den im Abwasser eines Schweinemast-Betriebes suspendierten Feststoffen verwendet. Vor der Extraktion wurden die Proben durch eine Anionenaustauscher-Säule geleitet, um negativ geladene organische Matrixbestandteile abzutrennen. Die Detektion erfolgte schließlich mittels LC-MS. Für die verschiedenen Sulfonamide wurden bei dieser Untersuchung Wiederfindungen von 76 % bis 104 % ermittelt [121].

Ebenfalls mittels Oasis HLB (e) wurden Sulfonamide und Tetracycline aus Grund- und Oberflächenwasser-Proben extrahiert. Bei diesem Versuchsaufbau wurde ein theoretischer Aufkonzentrierungsfaktor von 1.000 erreicht und die anschließende Messung erfolgte mittels LC-MS. Die Wiederfindungen der Sulfonamide lagen zwischen 84 % für SMZ und 130 % für SMA [72].

3 Theoretische Grundlagen

Da das HLB-Material für die Extraktion von Sulfonamiden besonders geeignet zu sein scheint, wurde es auch im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt und soll im Folgenden etwas genauer beschrieben werden. Die Abkürzung HLB steht für *hydrophilic-lipophilic balance* und bezeichnet damit die Eigenschaft, dass es gleichermaßen hydrophile und lipophile Analyten zurückhalten kann. Das Sorptionsmittel ist ein Copolymer aus dem polaren *N*-Vinyl-2-pyrrolidon und dem unpolaren Divinylbenzol, das überdies durch seinen aromatischen Ring π - π -Wechselwirkungen zu aromatischen Analyten ausbilden kann. In Abbildung 13 sind die beiden Monomere sowie ein Ausschnitt des Copolymers dargestellt.

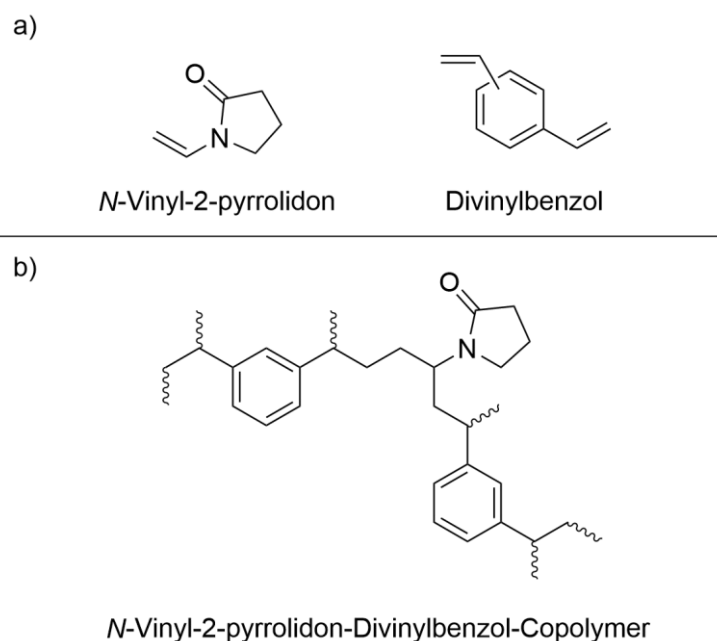


Abbildung 13. Monomere Bestandteile (a) und Ausschnitt des Copolymers (b), das in den Oasis HLB Extraktionskartuschen als Sorptionsmittel dient.

Da die Sulfonamide sowohl einen aromatischen Ring als auch die äußerst polare Sulfonsäureamid-Gruppe besitzen (siehe Abbildung 7 in Kapitel 3.1.3), sollten insbesondere π - π -Wechselwirkungen sowie Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zu dem HLB-Sorbens ausgebildet werden.

4 Experimentelle Durchführung

4.1 Laborausstattung und Verbrauchsgüter

4.1.1 Geräte und Materialien

Bohr- und Fräsgerät MICROMOT 50/E mit Diamantstift NG 2/S (Proxxon, Niersbach)

Einmalkanülen Sterican, \varnothing 0,80 x 120 mm (4665643, Braun, Melsungen)

Einmalkanülen Sterican, \varnothing 0,90 x 70 mm (4665791, Braun, Melsungen)

Einmalspritzen Omnifix-F, PP/PS, 1 mL (9161406V, Braun, Melsungen)

Einmalspritzen Injekt, PP/PE, 5 mL (4606051V, Braun, Melsungen)

Einmalspritzen Injekt, PP/PE, 10 mL (4606108V, Braun, Melsungen)

Einmalspritzen Injekt, PP/PE, 20 mL (4606205V, Braun, Melsungen)

Einmalspritzen BD Plastipak Luer-Lock, PP, 50 mL (BD 300865, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)

Extraktionssäulen AttractSPE HLB, 200 mg / 6 mL (HLB-25.S.6.200, Affinisep, Petit-Couronne, Frankreich)

Extraktionssäulen Chromabond HLB, 200 mg / 6 mL (730926, Macherey-Nagel, Düren)

Extraktionssäulen Chromabond HR-X, 200 mg / 3 mL (730931, Macherey-Nagel, Düren)

Extraktionssäulen LiChrolut EN, 200 mg / 6 mL (119941, Merck, Darmstadt)

Extraktionssäulen Oasis HLB, 60 mg / 3 mL (WAT094226, Waters, Eschborn)

Extraktionssäulen Strata SAX, 500 mg / 6 mL (8B-S008-HCH, Phenomenex, Aschaffenburg)

Extraktionssäulen Strata-X, 60 mg / 3 mL (8B-S100-UBJ-S, Phenomenex, Aschaffenburg)

Färbeschale, PMP (2290.2, Roth, Karlsruhe)

Färbeschaleneinsatz, PP, für 20 Objektträger (2291.2, Roth, Karlsruhe)

Gasverteilerrechen zum Eindampfen mehrerer Proben mit N₂ (hergestellt am IWC, München)

Hydrobox zur Inkubation bei geringer Luftfeuchtigkeit (hergestellt am IWC, München)

4 Experimentelle Durchführung

Klebefolie ARcare 90106, Acryl-Hybrid, doppelseitig (Adhesive Research Ireland, Limerick, Irland) mit Zwei-Kanal-Struktur, ausgeschnitten mittels Schneideplotter Graphtec CE6000-40 (Graphtec Corporation, Yokohama, Japan).

Klebe- und Walzvorrichtung zur Fertigstellung der Mikroarray-Durchflusszellen (hergestellt am IWC, München)

Klimakammer HCP 108L (Mettler, Büchenbach)

Kontaktspotter-Nadel Stealth Solid Pin SNS 9 (Arrayit, Sunnyvale, CA, USA)

Kontaktspotter-System BioOdyssey Calligrapher MiniArrayer (Bio-Rad Laboratories, München)

Kunststoffträger, PMMA, schwarz, mit Ein- und Auslässen für die beiden Flusszellen (Hergestellt am IWC, München)

Laborflaschen, DURAN Borosilikatglas 3.3, mit PP-Schraubverschluss, 100 mL, 250 mL, 500 mL, 1 L, 2 L (Schott, Mainz)

Magnetrührer mit Heizung (MR 3002, Heidolph, Schwabach)

Maßpipetten, 0,5 – 10 µL, 10 – 100 µL, 100 – 1000 µL, 1 – 5 mL (Eppendorf, Hamburg)

MCR 3 (gwk Präzisionstechnik, München)

Mikrotiterplatten, 96 Kavitäten, PS, Flachboden, nicht-bindend, (655901, Greiner Bio-One, Frickenhausen)

Mikrotiterplatten, 384 Kavitäten, PP, Flachboden (784201, Greiner Bio-One, Frickenhausen)

Mikrotiterplatten-Auslesegerät Synergy HT (BioTek, Bad Friedrichshall)

Mikrotiterplatten-Spülgerät ELx405 Select (BioTek, Bad Friedrichshall)

PCR-Reaktionsgefäße Multi-Ultra, 0,2 mL (H560.1, Roth, Karlsruhe)

Petrischalen, Glas (Roth, Karlsruhe)

Pipettenspitzen Standard MIKRO, 0,1 – 10 µL (K138.1, Roth, Karlsruhe)

Pipettenspitzen Standard UNIVERSAL, 10 – 100 µL (2395.2, Roth, Karlsruhe)

Pipettenspitzen Standard UNIVERSAL, 100 – 1000 µL (2679.1, Roth, Karlsruhe)

Pipettenspitzen Standard MAKRO, 1 – 5 mL (5846.1, Roth, Karlsruhe)

Reinstwasseranlage Milli-Q plus 185 (Millipore, Bedford, MA, USA)

4 Experimentelle Durchführung

Rollrandgläser (Kalk-Soda-Glas) mit Schnappdeckel (PE), 5 mL (X654.1, Roth, Karlsruhe)

Rollrandgläser (Kalk-Soda-Glas) mit Schnappdeckel (PE), 10 mL (X655.1, Roth, Karlsruhe)

Rollrandgläser (Kalk-Soda-Glas) mit Schnappdeckel (PE), 25 mL (X659.1, Roth, Karlsruhe)

Rollrandgläser (Kalk-Soda-Glas) mit Schnappdeckel (PE), 40 mL (X662.1, Roth, Karlsruhe)

Rotilabo Abdeckfolien für Mikrotiterplatten (EN76, Roth, Karlsruhe)

Rotilabo Kanister, 10 L, PE (N369.1, Roth, Karlsruhe)

Rotilabo Probefläschchen, 4 mL, mit Schraubkappen (E152.1, E155.1, Roth, Karlsruhe)

Rotilabo Spritzenfilter, CME, unsteril, Porengröße 0,8 µm, Durchmesser 25 mm (P820.1, Roth, Karlsruhe)

Rotilabo Spritzenfilter, PES, steril, Porengröße 0,22 µm, Durchmesser 33 mm (P668.1, Roth, Karlsruhe)

Saugflaschen, DURAN mit KECK Montage-Set (Schott, Mainz)

Schüttelinkubator C24KC (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA)

Schüttler TOP MIX Fisherbrand 15024 (11118, Novodirect, Kehl)

Standard-Objektträger, Kalk-Natron-Glas, geschnitten, 26 x 76 x 1 mm, +/- 0,1 mm (Roth, Karlsruhe)

Teflonschläuche, diverse

ThermoMixer C (Eppendorf, Hamburg)

Vakuumblock, 12-plätzig (H676.1, Roth, Karlsruhe)

Vakuumblock-Zubehör: Supelco Schlauch-Adapter (57020-U, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Vakuumblock-Zubehör: Supelco Flüssigkeitsführung (57047, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Trockenschrank, max. 120 °C (Memmert, Büchenbach)

Ultraschallbad Sonorex RK510S (Bandelin, Berlin)

Vakuumsystem VP 2 Autovac, chemikalienbeständig (Vacuubrand, Wertheim)

Versanddosen, PP, für 5 Objektträger (T208.1, Roth, Karlsruhe)

Vortexer Top Mix FB15024 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)

Waage Mettler AT261 Delta Range (Mettler-Toledo, Giessen)

Waage Mettler PM 4600 Delta Range (Mettler-Toledo, Giessen)

Whirl-Pak Probenbeutel, 532 mL, PE (B01365, Fort Atkinson, WI, USA)

Zentrifuge Universal 320R (Hettich, Tuttlingen)

4.1.2 Software

Avis FITS Viewer (MSB Software, Ravenna, Italien)

BioOdyssey Calligrapher 2.0 (Bio-Rad Laboratories, München)

ChemDraw Professional 15.1 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA))

MCRImageAnalyzer (ODEVIS, Burghausen)

Microsoft Office 365 (Microsoft, Redmond, WA, USA)

Origin 2018b (OriginLab, Northampton, MA, USA)

4.1.3 Chemikalien und Reagenzien

4.1.3.1 Chemikalien

Casein aus Kuhmilch, gereinigtes Pulver (C5890, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Dimethylsulfoxid (41647, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

ELISTAR SUPERNOVA ELISA Luminol-Enhancer-Lösung und Wasserstoffperoxid-Lösung (XLSE2,0500, Cyanagen, Bologna, Italien)

Ethanol, $\geq 99,8$ % (32205, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

3-Glycidyoxypropyltrimethoxysilan (440167, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Glycin (33226, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Hellmanex II (320.002, Hellma, Müllheim)

Jeffamine ED-2003 Polyetheramin (kostenlose Probe von Huntsman, Everberg, Belgien)

Kaliumdihydrogenphosphat (P5655, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Kaliumhydrogenphosphat (04248, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Methanol, $\geq 99,9$ % (34860, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

4 Experimentelle Durchführung

Natriumcarbonat (S7795, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Natriumchlorid (S7653, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Natriumcitrat (C8532, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Natriumdodecylsulfat (L6026, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Natriumhydrogencarbonat (S5761, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Polyethylenglycoldiglycidylether, 500 Da (475696, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Salzsäure, 37% (v/v) (84422, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Schwefelsäure, 95-97% (v/v) (84720, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Sigma 7-9 (T1378, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

4.1.3.2 Puffer

Für die Herstellung aller Pufferlösungen wird UV-behandeltes Reinstwasser verwendet.

Carbonatpuffer (pH 9,6)

Na ₂ CO ₃ (15 mM)	1,59 g
NaHCO ₃ (35 mM)	2,93 g
Reinstwasser	ad 1000 mL

SSC-Puffer (20-fach)

NaCl	172 g
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ (Natriumcitrat)	88 g
Reinstwasser	ad 100 mL

Anschließend: autoklavieren

Tris-HCl-Puffer (pH 8,5)

Tris (1 M)	121 g
NaCl (150 mM)	8,8 g
37% (v/v) HCl	ad pH 8,5
Reinstwasser	ad 1000 mL

4 Experimentelle Durchführung

PBS-Puffer (pH 7,6)

K ₂ HPO ₄ (70 mM)	12,2 g
KH ₂ PO ₄ (10 mM)	1,36 g
NaCl (145 mM)	8,5 g
Reinstwasser	ad 1000 mL

Laufpuffer MCR 3

Casein (0,5 % (w/v))	5,0 g
PBS-Puffer	ad 1000 mL

Regenerationspuffer MCR 3 (pH 3 beziehungsweise 4)

Glycin (100 mM)	7,51 g
NaCl (100 mM)	5,85 g
SDS (0,1 % (w/v))	1,0 g
37% (v/v) HCl	ad pH 3 beziehungsweise 4
Reinstwasser	ad 1000 mL

Spülpuffer MCR 3

Hellmanex II (2 % (v/v))	20 mL
Reinstwasser	ad 1000 mL

Zum Spülen der Fluidik auf 60 °C erwärmen

Dekontamination MCR 3 nach Messung von Realproben:

0,1 % (w/v) NaClO; anschließend: 0,2 % (w/v) Na₂S₂O₃

4.1.3.3 Antibiotika

Cefalexin (33989, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

(Kontaktdruck-Konzentrationen: 5 mg mL⁻¹, 1 mg mL⁻¹, 0,5 mg mL⁻¹ und 0,1 mg mL⁻¹ in 1:1 DMSO/Carbonatpuffer)

4 Experimentelle Durchführung

Kanamycinsulfat (60615, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

(Kontaktdruck-Konzentrationen: 5 mg mL⁻¹, 1 mg mL⁻¹, 0,5 mg mL⁻¹ und 0,1 mg mL⁻¹ in 2:3 DMSO/Carbonatpuffer)

Nafcillin-Natriumsalz (N3269, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

(Kontaktdruck-Konzentration: 0,1 mg mL⁻¹ in 1:1 DMSO/Carbonatpuffer)

Sulfadiazin-Natriumsalz (S6387, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Sulfadimethoxin-Natriumsalz (S7385, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Sulfadoxin (31736, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Sulfamerazin (S8876, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Sulfamethazin-Natriumsalz (S5637, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Sulfamethoxazol (S7507, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Sulfathiazol-Natriumsalz (S0127, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

(Kontaktdruck-Konzentration aller Sulfonamide: 1 mg mL⁻¹ in 1:1 DMSO/Carbonatpuffer)

Tetracyclin (T3258, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Tylosin-Tartrat (T6271, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

(Kontaktdruck-Konzentration: 5 mg mL⁻¹ in 1:1 DMSO/Carbonatpuffer)

4.1.3.4 DNA-Oligonukleotide

DNA-Oligonukleotid-Einzelstrang, modifiziert (Eurofins Genomics, Ebersberg)

5' → 3': GCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAACG mit 5'-Amino-C₁₂-Modifikation

DNA-Oligonukleotid-Einzelstrang, unmodifiziert (Eurofins Genomics, Ebersberg)

5' → 3': CGTTTCTCTATCACTGATAGGGAGTGC

Hybridisierung

Die DNA-Einzelstränge wurden jeweils in Reinstwasser zu einer Konzentration von 800 μM gelöst. Im Anschluss wurden die Lösungen der beiden Stränge 1:1 gemischt und gegebenenfalls mit Reinstwasser (beziehungsweise für entsprechende Vergleichsmessungen mit SSC-Puffer) auf die benötigte Konzentration verdünnt. Für die Versuche mit SSC-Puffer wurde noch eine entsprechende Menge des 20-fach konzentrierten SSC-Puffers zugegeben.

Folgende Konzentrationen wurden für das Kontaktdruck-Verfahren hergestellt: 400 μM , 200 μM , 150 μM , 100 μM , 50 μM .

Für die Hybridisierung wurden die Einzelstrang-Gemische mittels ThermoMixer unter Schütteln auf 95 °C erhitzt und für 5 min bei dieser Temperatur gehalten. Anschließend wurden die Lösungen mit etwa 2 K min^{-1} wieder auf Raumtemperatur abgekühlt und standen damit für den Kontaktdruck-Vorgang bereit.

4.1.3.5 Antikörper

Monoklonale Primärantikörper

anti-Kanamycin (3 mg mL^{-1} , orb243904, Biorbyt, Cambridge, UK)

Am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch (Prof. Dr. Dr. h. c. Erwin Märklbauer, Ludwig-Maximilians-Universität München) produziert:

anti-Cefalexin (ca. 0,05 mg mL^{-1} im Zellkulturüberstand, 1F10)

anti-SDA (0,5 mg mL^{-1} , 2G6)

anti-SMA (0,5 mg mL^{-1} , 4D9)

anti-Sulfonamid (0,5 mg mL^{-1} , 1G12)

anti-Nafcillin (0,5 mg mL^{-1} , 2C8)

anti-Tylosin (0,5 mg mL^{-1} , 2E8)

Konzentration für die Messungen: 0,5 mg L^{-1} in Laufpuffer

(anti-Sulfonamid: 0,17 mg L^{-1} in Laufpuffer)

Polyklonaler Sekundärantikörper

anti-Maus-IgG (Kaninchen), HRP-markiert (10 – 20 mg mL⁻¹, A9044, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Verdünnung für die Messungen: 1:3.000 in Laufpuffer

4.1.3.6 TetR und Streptavidin-HRP

TetR, biotinyliert (0,6 mg mL⁻¹, Institut für Biologie II und BIOS Centre, Prof. Dr. Wilfried Weber, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg); Konzentration für die Messungen: 0,2 mg L⁻¹ in Laufpuffer mit 50 mM MgCl₂

Streptavidin-HRP (1 mg mL⁻¹, SA-5004, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA); Konzentration für die Messungen: 0,15 mg L⁻¹ in Laufpuffer

Streptavidin-PolyHRP 40 (1 mg mL⁻¹, 2.8.1.1, Senova, Weimar); Konzentration für die Messungen: 0,3 mg L⁻¹ in Laufpuffer

4.1.3.7 Realproben

Milch und Urin einer Kuh

Von einer laktierenden Kuh, die wegen einer Euter-Entzündung intramammär mit Ubrolexin (Kombinationspräparat aus Cefalexin und Kanamycin) behandelt wurde, wurden Milch- und Urinproben einige Stunden nach Verabreichung genommen, mit Rotilabo Spritzenfiltern der Porengrößen 0,8 µM und 0,22 µM (steril) filtriert und bei -20 °C gelagert. Für die Messung wurden die Proben so mit PBS-Puffer verdünnt, dass die Messwerte jeweils im Arbeitsbereich der Assays lagen.

Urin und Dünndarm-Sekret eines Menschen

Von einer Person mit Ileostoma (künstlicher Dünndarm-Ausgang), die wegen einer Halsentzündung mit Cefalexin behandelt wurde, wurden Urin- und Dünndarm-Sekret-Proben genommen, mit Rotilabo Spritzenfiltern der Porengrößen 0,8 µM und 0,22 µM (steril) filtriert und bei -20 °C gelagert. Für die Messung wurden die Proben so mit PBS-Puffer verdünnt, dass die Messwerte jeweils im Arbeitsbereich der Assays lagen.

Oberflächenwasser

Alle Oberflächenwasser-Proben wurden in Rotilabo Kanistern (10 L, PE) oder Whirl-Pak Probenbeuteln (532 mL, PE) gesammelt, mit Rotilabo Spritzenfiltern der Porengrößen 0,8 μM und 0,22 μM (steril) filtriert und bei 8 °C gelagert.

Folgende Proben (mit Ort und Datum der Probenahme) wurden verwendet:

Ammersee (Herrsching, 10.06.2018)

Aubach (Gilching, 20.10.2017)

Brunnenbach (Augsburg, 15.11.2018)

Donau (Deggendorf Brücke B 11, 11.06.2018)

Forellenbach (Möttingen, 09.06.2018)

Hohlohsee (Gernsbach, 12.09.2017)

Ilz (Kalteneck Brücke, 11.06.2018)

Inn (Passau-Ingling, 11.06.2018)

Kläranlagenablauf Klärwerk Augsburg (Augsburg, 08.06.2018)

Langeröner Fließ (Wullwinkel, 29.05.2017)

Lech (Augsburg Brücke A8, 08.06.2018)

Regnitz (Hausen Messstation, 11.06.2018)

Tiroler Achen (Staudach Messstation, 11.06.2018)

Wörnitz (Ronheim-Steg Messstation, 12.06.2018)

Wörthsee (Steinebach, 08.06.2018)

Wurm (Gräfelfing, 18.04.2018)

4.2 Mikroarray-Experimente

4.2.1 Funktionalisierung der Glaschip-Oberflächen

Vorbereitung und Reinigung

Kommerziell erhältliche Glasobjektträger (26 mm x 76 mm x 1 mm) wurden zunächst mit einem Glasdiamantstift an definierter Stelle mit fortlaufenden Nummern versehen. Diese Markierung diente zur Unterscheidung der beiden Objektträgerseiten und kennzeichnete im Folgenden stets die unbeschichtete Unterseite. Zur Reinigung wurden die Objektträger mithilfe eines Färbeschaleneinsatzes in 200 mL einer wässrigen Hellmanex-Lösung (2% (v/v)) getaucht und erst für 1 h im Ultraschallbad, dann für 15 h auf einem Schüttler (600 rpm) und schließlich nochmals für 1 h im Ultraschallbad behandelt. Die Glaschips wurden schließlich fünfmal mit je 200 mL Reinstwasser gespült.

Anätzung der Glasoberfläche

Um die Glasoberflächen anzuätzen, wurden die Objektträger für 1 h in 200 mL eines frisch bereiteten 1:1-Gemisches aus Salzsäure (37% (v/v)) und Methanol geschüttelt (600 rpm), daraufhin fünfmal mit je 200 mL Reinstwasser gereinigt, dann für 1 h in konzentrierter Schwefelsäure geschüttelt (600 rpm) und schließlich wiederum fünfmal mit je 200 mL Reinstwasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

Silanisierung

Die Hälfte der Objektträger wurde mit der markierten Seite nach unten in Petrischalen vorgelegt. Darauf wurden je 600 µL GOPTS verteilt und mit der unmarkierten Seite eines weiteren Chips bedeckt. Diese Sandwich-Pakete wurden für 3 h in geschlossenen Petrischalen in einer Inkubationskammer mit niedriger Luftfeuchtigkeit gelagert und anschließend manuell in absolutem Ethanol getrennt und vorgespült. Mithilfe eines Färbeschaleneinsatzes wurden die Chips daraufhin für je 15 min in Ethanol, Methanol und erneut in Ethanol im Ultraschallbad gereinigt und im Stickstoffstrom getrocknet.

Beschichtung mit Jeffamine ED-2003

Für die Beschichtung von 40 Objektträgern wurden ca. 20 g Jeffamine ED-2003 bei 98 °C im Trockenschrank geschmolzen. Die Hälfte der Glaschips wurde mit der silanisierten Seite nach oben in Petrischalen vorgelegt, mit je 600 µL flüssigem Jeffamine ED-2003 bestrichen und im Sandwich-Format mit einem weiteren Chip bedeckt. Die geschlossenen Petrischalen wurden für 15 h bei 98 °C im Trockenschrank gelagert. Daraufhin wurden die noch heißen Sandwich-Pakete manuell in Reinstwasser getrennt und vorgespült, zweimal für je 15 min unter Austausch des Wassers im Ultraschallbad gereinigt und schließlich im Stickstoffstrom getrocknet. Die Jeffamine-beschichteten Mikroarray-Chips wurden im Exsikkator unter Vakuum aufbewahrt und waren dadurch einige Wochen stabil.

Herstellung der Epoxy-PEG-Oberfläche

Die Hälfte der Objektträger wurde mit der Jeffamine-beschichteten Seite nach oben in Petrischalen vorgelegt, mit 600 µL Diepoxy-PEG bestrichen, im Sandwich-Format mit einem weiteren Chip bedeckt und in geschlossenen Petrischalen für 15 h bei 98 °C im Trockenschrank inkubiert. Anschließend wurden die Chips im heißen Zustand in Methanol getrennt, manuell vorgespült und zweimal für je 15 min unter Austausch des Methanols im Ultraschallbad gereinigt. Nach dem Trocknen im Stickstoffstrom kamen die Epoxy-PEG-Mikroarray-Chips direkt beim Kontaktdruck-Prozess zum Einsatz.

4.2.2 Herstellung der Mikroarray-Chips

Immobilisierung von Antibiotika und DNA-Oligonukleotiden

Zur Immobilisierung der Antibiotika und DNA-Oligonukleotide auf der Epoxy-PEG-Chip-Oberfläche wurde der Kontaktpotter BioOdyssey Calligrapher (Bio-Rad Laboratories, München) mit einem Solid Pin SNS 9 (3,3 nL Übertragungsvolumen) verwendet. Temperatur und relative Luftfeuchtigkeit im Geräteinneren wurden während des automatisch ablaufenden Kontaktdruck-Vorgangs bei 20 °C und 50 % konstant gehalten. Je ca. 30 µL der zu übertragenden Lösungen wurden in einer Mikrotiterplatte (PP, nicht bindend, 384 Kavitäten) vorgelegt.

Für die Messung am MCR 3 wurden die Mikroarray-Glaschips mit zwei getrennten Messkanälen zu je fünf Punkten pro Reihe belegt, wobei die Abstände der Replikate einer Reihe

untereinander 1,1 mm, der Reihen zueinander 1,3 mm und der beiden Flusszellen 11,75 mm betragen.

Die belegten Chips wurden nach dem Kontaktdruck-Vorgang in geschlossenen Petrischalen in einer Klimakammer bei 25 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 % für 15 h inkubiert.

Inaktivierung der unbelegten Chip-Oberfläche

Um anschließend nicht gebundene Reagenzien zu entfernen und die verbliebene reaktive Epoxy-Oberfläche für unspezifische Bindungen zu inaktivieren, wurden die Glaschips zunächst mit Tris-HCl-Puffer (pH 8,5) für 15 min unter Schütteln (600 rpm) behandelt. Nach dreimaligem Waschen mit Reinstwasser wurden die Chips zusätzlich für je 15 min in Reinstwasser und Methanol geschüttelt (600 rpm) und im Stickstoffstrom getrocknet.

Fertigung der Mikroarray-Durchflusszellen

Die Mikroarray-Glaschips wurden mithilfe einer doppelseitigen PE-Klebefolie, die zwei Aussparungen in Form der beiden Flusszellen aufwies, an einen schwarzen PMMA-Träger gekoppelt, der zur Anbindung an die Fluidik des MCR 3 diente. Dabei wurde zunächst der Kunststoffträger so mit der Folie beklebt, dass die Bohrungen für Zu- und Ablaufanschlüsse in die beiden Aussparungen mündeten. Anschließend wurde der Glaschip mit der oberflächenmodifizierten Seite aufgeklebt. Die so erhaltene dreiteilige, gekapselte Mikroarray-Durchflusszelle wurde zur Messung in die dafür vorgesehene abgedichtete Schublade des MCR 3 eingelegt (beziehungsweise für die Tetracyclin-Versuche wurde ein Flusskanal zunächst manuell befüllt).

4.2.3 Messungen am MCR 3

Die verschiedenen Assays dieser Arbeit wurden alle mit der Mikroarray-Analyse-Plattform MCR 3 (GWK Präzisionstechnik, München) automatisch prozessiert. Der MCR 3 (Innenansicht siehe Abbildung 14) besitzt eine Durchflusskammer (4), in die eine Mikroarray-Durchflusszelle eingelegt werden kann, sowie integrierte Pumpen, Ventile und Schläuche für die Reagenzienzufuhr. Zur Chemilumineszenz-Detektion ist oberhalb der Durchflusskammer eine CCD-Kamera (5) angebracht. Laufpuffer (1) und Regenerationspuffer (2) wurden in

4 Experimentelle Durchführung

Glasflaschen vorgelegt und die Chemilumineszenz-Substrate Luminol und H_2O_2 (3) in kleinen lichtdichten Kunststoffgefäßen bereitgestellt. Bei automatischer Inkubation wurde die Probe über eine 1-mL-Probenspritze (8) in die Fluidik des MCR 3 injiziert. Für die Immunoassays wurden in den installierten 50-mL-Spritzen die Primär- (7) und Sekundärantikörper (6) vorgelegt. Für den Tetracyclin-Rezeptor-Assay wurden in Spritze (7) das Rezeptor-Protein TetR und in Spritze (6) Streptavidin-HRP bereitgestellt beziehungsweise bei der Assay-Variante mit manueller Injektion nur Streptavidin-HRP in Spritze (6).

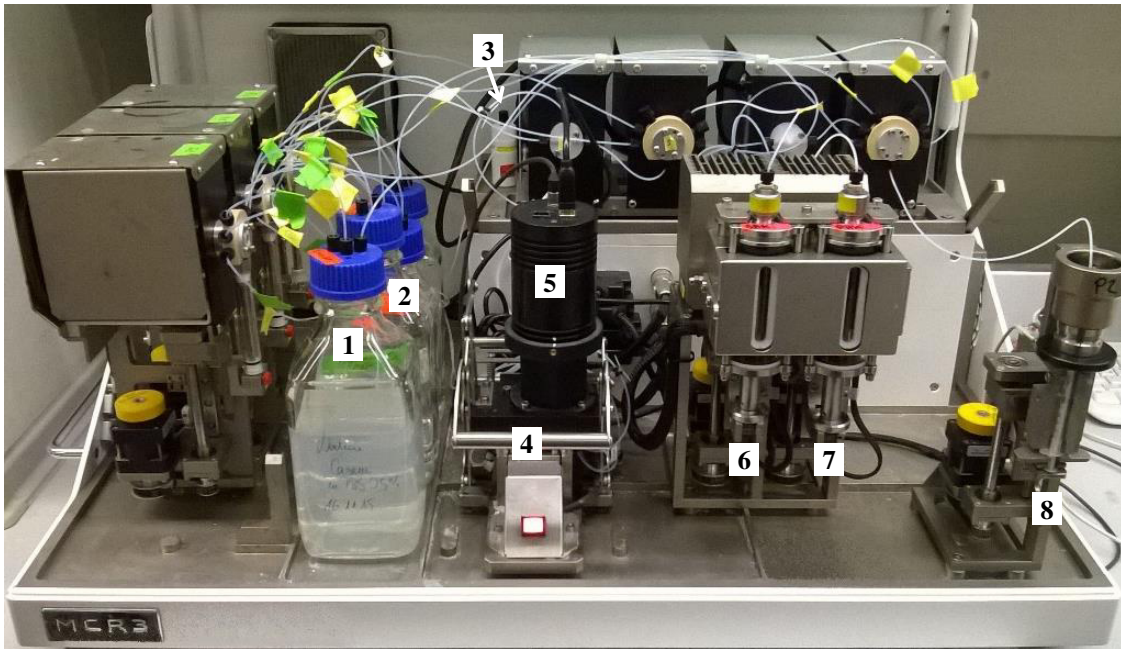


Abbildung 14. Innenansicht des MCR 3 mit Laufpuffer (1), Regenerationspuffer (2), Luminol und H_2O_2 (3), Durchflusskammer (4), CCD-Kamera (5), Spritze für Sekundärantikörper beziehungsweise Streptavidin-HRP (6), Spritze für Primärantikörper (7) und Probenspritze (8).

Zu Beginn jedes Messtages wurde die gesamte Fluidik des MCR 3 zunächst gespült, nachdem an den Positionen (1), (2), (3), (6), (7) und (8) Reinstwasser eingefüllt wurde. Daraufhin wurden alle für die Messungen erforderlichen Lösungen vorbereitet und in den jeweiligen Vorratsgefäßen vorgelegt. Nach automatischer Befüllung der entsprechenden Schläuche stand der MCR 3 für Messungen bereit und ein neuer Mikroarray-Chip wurde in die Durchflusskammer eingelegt. Zunächst wurden die Flusskanäle mit Laufpuffer gespült und das Hintergrundsignal der CCD-Kamera mit einer Belichtungszeit von 60 s aufgezeichnet. Die Signalintensitäten dieses Hintergrund-Bildes wurden daraufhin von allen folgenden Messbildern automatisch subtrahiert.

Immunoassay-Messprogramm

- I. Jede Immunoassay-Messung wurde mit dem Messprogramm durchgeführt. Dabei wurde 1 mL der Probe in eine Einmalspritze aufgezogen und automatisch in die Fluidik des MCR 3 injiziert (8). Die Probe wurde mit einem Volumenverhältnis von 1:1 mit Primärantikörper-Lösung (7) vermischt. 400 μL dieses Gemisches wurden langsam durch eine Flusszelle des Mikroarray-Chips gepumpt (Flussrate: 10 $\mu\text{L s}^{-1}$).
- II. Nach Spülen mit 2000 μL Laufpuffer (Flussrate: 100 $\mu\text{L s}^{-1}$) wurden erst 200 μL der Sekundärantikörper-Lösung schnell (Flussrate: 100 $\mu\text{L s}^{-1}$) und dann 800 μL langsam (Flussrate: 10 $\mu\text{L s}^{-1}$) durch die Flusszelle transportiert, gefolgt von einem weiteren Spülschritt (2000 μL Laufpuffer; Flussrate: 100 $\mu\text{L s}^{-1}$).
- III. Ein Gemisch aus je 200 μL Luminol- und H_2O_2 -Lösung wurde mit einer Flussrate von 100 $\mu\text{L s}^{-1}$ durch die Flusszelle gepumpt, um die Chemilumineszenz-Reaktion auszulösen. Der Fluss wurde gestoppt und die Lichtintensität wurde für 60 s von der CCD-Kamera aufgezeichnet.
- IV. Daraufhin wurde das gesamte Fluss-basierte System intensiv mit Laufpuffer gespült und die Flusszelle wurde schließlich mit Regenerationspuffer behandelt (1000 μL ; Flussrate: 10 $\mu\text{L s}^{-1}$). Nach einem letzten Reinigungsschritt mit 2000 μL Laufpuffer (Flussrate: 500 $\mu\text{L s}^{-1}$) war das System bereit für eine neue Messung.

Während des gesamten Messprogramms wurde die Temperatur in der Flusszelleneinheit des MCR 3 bei 18 °C konstant gehalten.

Messprogramm für den Tetracyclin-Rezeptor-Assay

Für den Tetracyclin-Rezeptor-Assay wurde zunächst das gleiche Messprogramm wie für die Immunoassays erprobt. Dazu wurde die Probe (im Verhältnis 100:1 versetzt mit 5 M MgCl_2 -Lösung) in Schritt I. ebenfalls über eine Einmalspritze in die Fluidik des MCR 3 überführt und mit TetR-Lösung aus Spritze (7) im Verhältnis 1:1 vermischt. In Schritt II. wurde statt des Sekundärantikörpers Streptavidin-HRP in Spritze (6) verwendet.

Wegen zu geringer Chemilumineszenz-Signalintensitäten mit diesem Messprogramm wurde zusätzlich eine Variante mit Stop-Flow getestet, bei der acht Inkremente zu je 50 μL des Probe-TetR-Gemisches in die Flusszelle geleitet und dort für jeweils 60 s inkubiert wurden.

Da auch hiermit keine deutliche Steigerung der Chemilumineszenz-Signalintensitäten zu erzielen war, wurde eine weitere Variante entwickelt, bei der außerhalb des MCR 3 zunächst

30 μL der Probe mit 30 μL der TetR-Lösung vermischt wurden. 50 μL des Probe-TetR-1:1-Gemisches wurden manuell in die Flusszelle injiziert und der gefüllte Chip wurde für einen bestimmten längeren Zeitraum (10 – 120 min) bei definierter Temperatur (18 – 46 °C) inkubiert. Das computergesteuerte Messprogramm wurde dafür so angepasst, dass Schritt I. entfiel und Schritt II. bis IV. nach Einlegen des zuvor außerhalb des MCR 3 inkubierten Chips gestartet werden konnten. Diese Variante mit manueller Injektion erwies sich als besonders geeignet und wurde für diesen Assay im Folgenden ausschließlich verwendet.

Die Temperatur in der Flusszelleneinheit des MCR 3 wurde dabei in der Regel bei 18 °C konstant gehalten (außer bei den Versuchen mit einer Messtemperatur von 39 °C).

4.3 Aufkonzentrierung von Oberflächenwasser-Realproben

4.3.1 SPE mittels Extraktionssäulen

Die mithilfe von Spritzenfiltern der Porengrößen 0,8 μM und 0,22 μM (steril) vorgereinigten Oberflächenwasser-Realproben wurden mittels SPE-Einweg-Kartuschen aufkonzentriert. Dazu wurden die Kartuschen zunächst mit 2 mL Methanol und 2 mL Reinstwasser bei Flussraten von 5 mL min^{-1} vorkonditioniert. 100 mL einer Probe wurden bei einer Flussrate von 5 mL min^{-1} zur Extraktion über die Kartusche gegeben. Anschließend wurde mit 1 mL Reinstwasser nachgewaschen. Die Elution erfolgte mit 2 mL Methanol, die in einem neuen Gefäß aufgefangen und dann im Stickstoffstrom verdampft wurden.

Für die Messung am MCR 3 wurde der Rückstand in 2 mL Reinstwasser aufgenommen und für 10 min im Ultraschallbad behandelt. Damit sollten die Antibiotika in der Probe theoretisch um den Faktor 50 aufkonzentriert worden sein.

Eingedampfte Extrakte, die nicht direkt am MCR 3 gemessen, sondern mittels Anionenaustausch weiter aufgereinigt werden sollten, wurden in nur 1,5 mL Reinstwasser aufgenommen und für 10 min im Ultraschallbad behandelt.

4.3.2 Aufreinigung der Extrakte mittels Anionenaustauscher-Säulen

Die zur Aufreinigung der Extrakte verwendeten Anionenaustauscher-Säulen wurden zunächst mit 2 mL Methanol und 2 mL Reinstwasser bei Flussraten von 5 mL min^{-1} vorkonditioniert. Einer der in 1,5 mL Reinstwasser aufgenommenen Probenextrakte wurde daraufhin mit

4 Experimentelle Durchführung

5 mL min⁻¹ über die Säule geleitet, wobei die Antibiotika nicht von der Säule zurückgehalten werden sollten, jedoch im Extrakt enthaltene anionische Bestandteile, wie z. B. Huminsäuren. Die Säule wurde anschließend mit 0,5 mL Reinstwasser nachgewaschen. Der Durchlauf des Probenextrakts und des Waschwassers wurden gemeinsam in einem neuen Gefäß aufgefangen, sodass jeder so behandelte Extrakt nun auch ein Volumen von 2 mL und damit einen theoretischen Aufkonzentrierungsfaktor von 50 aufwies.

Die aufgereinigten Extrakte waren nun bereit für die Messung am MCR 3.

5 Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse der drei Teilprojekte dieser Forschungsarbeit zur Entwicklung Fluss-basierter Chemilumineszenz-Mikroarrays für den Nachweis von diversen Antibiotika in flüssigen Proben vorgestellt und diskutiert. („Chemilumineszenz“ wird bei der Darstellung der Ergebnisse zur besseren Übersichtlichkeit mit „CL“ abgekürzt.)

5.1 Regenerierbare Mikroarray-basierte Immunoassays für die Detektion von Cefalexin und Kanamycin

Im ersten Projekt wurde der bereits etablierte Mikroarray für die gleichzeitige Immunoassay-Detektion von diversen Antibiotika [27] um die beiden Wirkstoffe Cefalexin und Kanamycin erweitert, die sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin eingesetzt werden.

Für das Prinzip eines regenerierbaren kompetitiven Immunoassays mussten Cefalexin und Kanamycin kovalent auf der Chip-Oberfläche immobilisiert werden, um als Kompetitoren für entsprechende in der Probe vorhandene Cefalexin- oder Kanamycin-Gehalte fungieren zu können (Assay-Schema siehe Abbildung 11).

5.1.1 Signalintensität und -Stabilität in Abhängigkeit von den Kontaktdruck-Konzentrationen der Antibiotika

Bei dem bereits für diverse andere Antibiotika etablierten Mikroarray [27] hatte sich gezeigt, dass die verwendeten Antibiotika bei unterschiedlichen Kontaktdruck-Konzentrationen (im Bereich von $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ bis 10 mg L^{-1}) die jeweils besten Ergebnisse liefern. Daher wurden die beiden Antibiotika Cefalexin und Kanamycin zunächst jeweils in mehreren Konzentrationen zur Immobilisierung auf den Mikroarray-Chips aufgebracht (5 mg L^{-1} , 1 mg L^{-1} , $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ und $0,1 \text{ mg L}^{-1}$). Angestrebt wurde eine möglichst hohe Signalintensität, die grundsätzlich mit einer hohen Belegungsdichte korreliert, bei gleichzeitig geringen (relativen) Signalschwankungen oder -Verlusten über eine Vielzahl von Regenerationszyklen, um niedrige Nachweisgrenzen zu erreichen.

Ein exemplarisches CL-Messbild mit den detektierten Signalintensitäten einer Leerwert-Messung zeigt Abbildung 15.

5 Ergebnisse und Diskussion

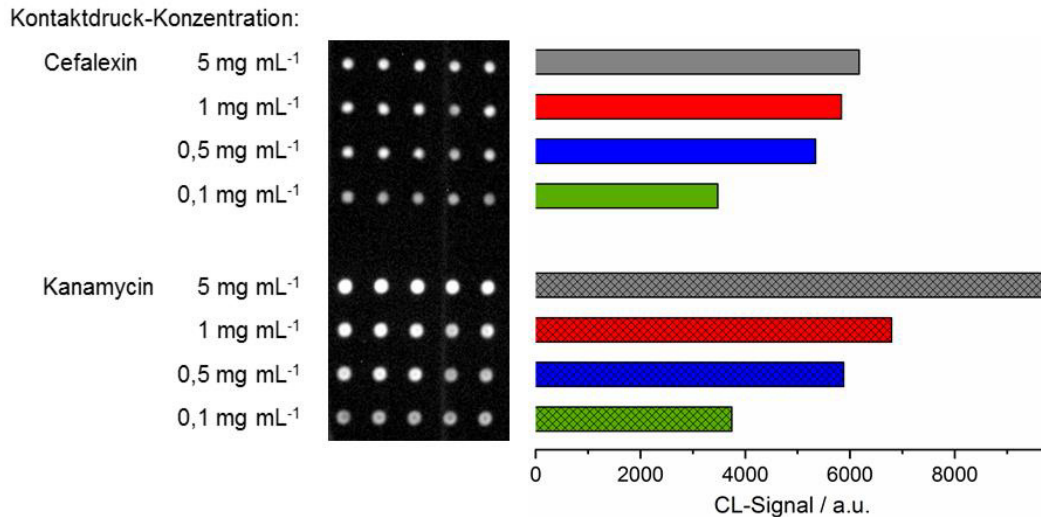


Abbildung 15. CL-Messbild und Signalintensitäten einer Leerwert-Messung mit einem Mikroarray-Chip, auf dem Cefalexin und Kanamycin jeweils nebeneinander in verschiedenen Konzentrationen immobilisiert wurden.

Für alle gewählten Kontaktdruck-Konzentrationen wurden jeweils klar definierte Punkte erhalten. Wie erwartet korrelierte eine höhere Konzentration in der Kontakt-Lösung jeweils mit einer höheren Signalintensität. Da bei beiden Antibiotika die niedrigste erprobte Konzentration ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$) deutlich schwächere Signale und weniger gleichförmige Punkte lieferte, wurde diese Konzentration im Folgenden verworfen.

Für die anderen Kontaktdruck-Konzentrationen sollte zunächst gezeigt werden, dass der Mikroarray-Chip mit Cefalexin und Kanamycin analog zu dem bereits mit diversen anderen Antibiotika etablierten Mikroarray mithilfe eines Glycin-Puffers (pH 3) regeneriert und so für eine Vielzahl von Messungen verwendet werden kann. Dafür wurden auf einem Mikroarray-Chip nacheinander 30 Leerwert-Messungen jeweils mit zwischengeschalteter Regenerierung durchgeführt. Die CL-Signalintensitäten der Cefalexin-Reihen sind in Abbildung 16 dargestellt.

5 Ergebnisse und Diskussion

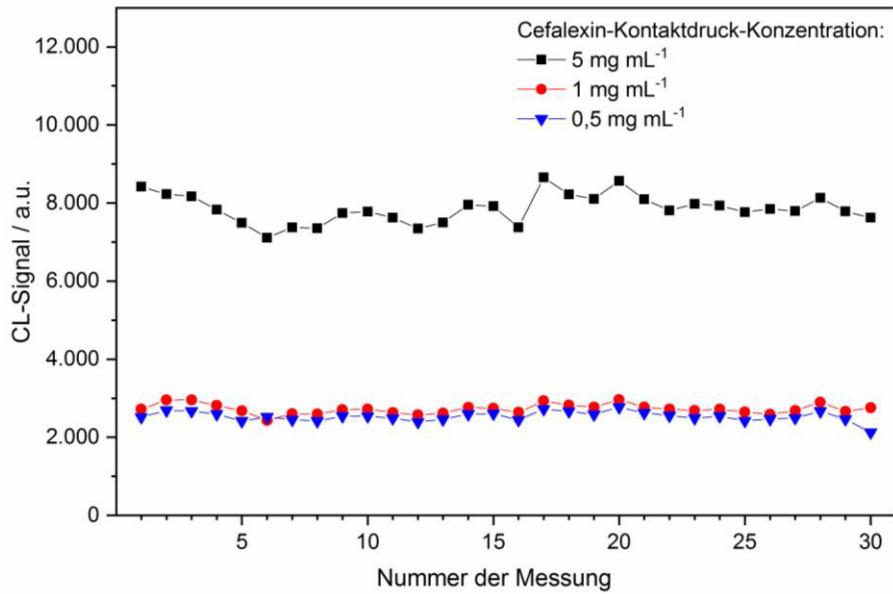


Abbildung 16. CL-Signalintensitäten von nacheinander auf demselben Chip mit immobilisiertem Cefalexin durchgeführten Leerwert-Messungen 1 – 30. Da der Fokus hier auf der Beschreibung der allgemeinen Trends liegt, wurde die Messreihe nur einmal durchgeführt. Statistisch auftretende Signalschwankungen werden dadurch kompensiert, dass die Messpunkte jeweils den Mittelwert aus fünf äquivalenten Punkten darstellen, die auf dem Chip in einer Reihe immobilisiert waren.

Für die Cefalexin-Kontaktdruck-Konzentrationen von 5 mg mL⁻¹, 1 mg mL⁻¹ und 0,5 mg mL⁻¹ betrug der Mittelwert der Messungen 28 – 30 jeweils noch 95 %, 96 % und 92 % des Mittelwerts der Messungen 1 – 3. Die Variationskoeffizienten der 30 Messungen wurde für alle untersuchten Kontaktdruck-Konzentrationen jeweils zu 5 % berechnet. Somit zeigten alle Cefalexin-Reihen eine hohe Regenerierbarkeit mit geringen Signalschwankungen.

Die Ergebnisse für Kanamycin zeigt Abbildung 17.

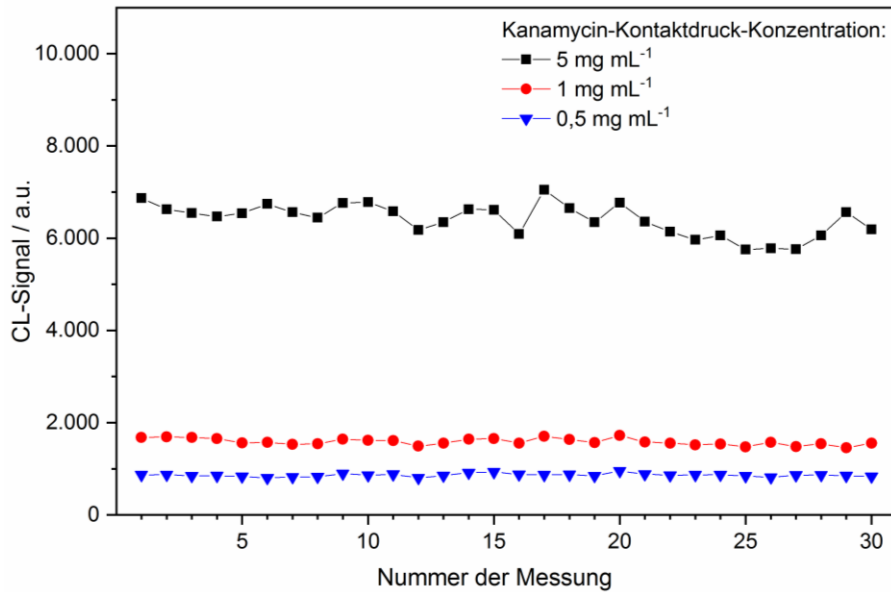


Abbildung 17. CL-Signalintensitäten von nacheinander auf demselben Chip mit immobilisiertem Kanamycin durchgeführten Leerwert-Messungen 1 – 30. Da der Fokus hier auf der Beschreibung der allgemeinen Trends liegt, wurde die Messreihe nur einmal durchgeführt. Statistisch auftretende Signalschwankungen werden dadurch kompensiert, dass die Messpunkte jeweils den Mittelwert aus fünf äquivalenten Punkten darstellen, die auf dem Chip in einer Reihe immobilisiert waren.

Auch bei immobilisiertem Kanamycin blieben die Leerwert-Signalintensitäten über 30 Messungen annähernd konstant. Für die Kanamycin-Kontaktdruck-Konzentrationen von 5 mg mL^{-1} , 1 mg mL^{-1} und $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ betrug der Mittelwert der Messungen 28 – 30 jeweils noch 94 %, 90 % und 99 % des Mittelwerts der Messungen 1 – 3. Die Variationskoeffizienten der 30 Messungen wurden zu 5 %, 5 % und 4 % berechnet. Somit zeigten die Kanamycin-Reihen ebenfalls eine hohe Regenerierbarkeit mit geringen Signalschwankungen.

5.1.2 Ermittlung von Kalibrierkurven und Wiederfindungen

Die Nachweisstärke und die Reproduzierbarkeit der Immunoassays wurde anhand von Kalibrierkurven und Wiederfindungen untersucht. Dazu wurden jeweils Sieben-Punkt-Kalibrierungen mit Konzentrationen von $0,01$ bis $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ in PBS-Puffer durchgeführt.

Die Messwerte wurden jeweils auf das höchste Signal der zugehörigen Kalibrierreihe normiert. Diese relativen Signalintensitäten B/B_0 der verschiedenen Kalibrierreihen wurden für jede Kalibrierkonzentration gemittelt.

5 Ergebnisse und Diskussion

Für Cefalexin wurden insgesamt sechs Kalibrierungen durchgeführt, wobei mit den Kontaktdruck-Konzentrationen 5 mg mL^{-1} und 1 mg mL^{-1} reproduzierbare Kalibrierfunktionen erhalten wurden. Die Mittelwerte mit Standardabweichungen sowie die sigmoidalen Regressionskurven sind in Abbildung 18 dargestellt.

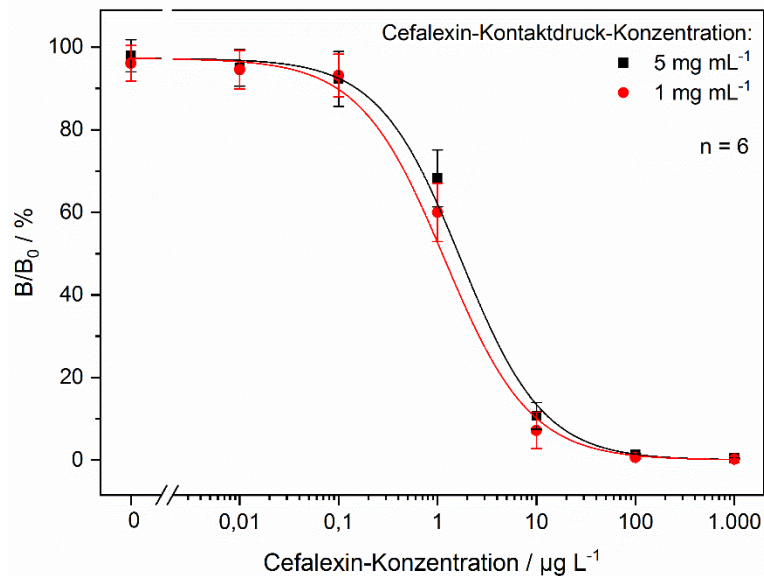


Abbildung 18. Sieben-Punkt-Kalibrierungen mit sigmoidalen Regressionskurven, dargestellt als relative Signalintensitäten B/B_0 bezogen auf den jeweils höchsten Messwert einer Kalibrierreihe.

Mit beiden Cefalexin-Kontaktdruck-Konzentrationen wurden sehr ähnliche Kalibrierkurven erhalten, wobei mit der niedrigeren Kontaktdruck-Konzentration von 1 mg mL^{-1} im Sinne der Kompetitionsreaktion etwas geringere Cefalexin-Konzentrationen in der Probe ausreichen, um entsprechende Signalreduktionen zu bewirken.

Für Kanamycin wurden insgesamt drei Kalibrierungen durchgeführt, wobei nur mit einer Kontaktdruck-Konzentration von 5 mg mL^{-1} reproduzierbare Kalibrierfunktionen erhalten wurden. Die Mittelwerte mit Standardabweichungen sowie die sigmoidalen Regressionskurven zeigt Abbildung 19.

5 Ergebnisse und Diskussion

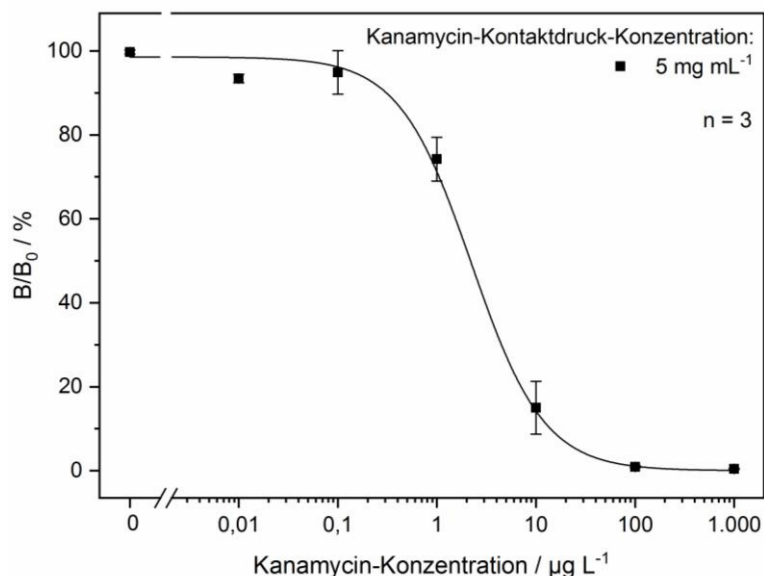


Abbildung 19. Sieben-Punkt-Kalibrierung mit sigmoidaler Regressionskurve, dargestellt als relative Signalintensitäten B/B_0 bezogen auf den jeweils höchsten Messwert einer Kalibrierreihe.

Die ermittelten analytischen Parameter der Kalibrierungen mit Cefalexin und Kanamycin sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4. Charakteristika der Kalibrierungen und Wiederfindungen für Cefalexin und Kanamycin.

Kontakt-druck-Konzentration:	Cefalexin		Kanamycin
	5 mg mL ⁻¹	1 mg mL ⁻¹	5 mg mL ⁻¹
Nachweisgrenze / µg L ⁻¹	0,2	0,2	0,02
Bestimmungsgrenze / µg L ⁻¹	0,5	0,5	0,1
Arbeitsbereich / µg L ⁻¹ (80 % – 20 % B/B_0)	0,6 – 6,3	0,3 – 4,5	0,7 – 7,1
Testmittelpunkt / µg L ⁻¹ (50 % B/B_0)	1,7	1,2	2,2
Wiederfindung (1 µg L ⁻¹) / %	80 ± 20 (n = 6)	77 ± 22 (n = 6)	88 ± 21 (n = 3)

So betragen für Cefalexin die berechneten Nachweisgrenzen mit beiden Kontakt-druck-Konzentrationen 0,2 µg L⁻¹ und die Bestimmungsgrenzen ebenfalls übereinstimmend 0,5 µg L⁻¹. Die Arbeitsbereiche (80 % – 20 % B/B_0) wurden mit der Kontakt-druck-Konzentration von 5 mg mL⁻¹ zu 0,6 – 6,3 µg L⁻¹ und mit der Kontakt-druck-Konzentration von 1 mg mL⁻¹ zu 0,3 – 4,5 µg L⁻¹ bestimmt. Die entsprechenden Testmittelpunkte (50 % B/B_0) lagen bei 1,7 µg L⁻¹ beziehungsweise 1,2 µg L⁻¹. Die etwas niedrigeren Werte von

Arbeitsbereich und Testmittelpunkt bei der geringeren Kontaktdruck-Konzentration sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass aufgrund der Konkurrenz bei einer geringeren Anzahl der immobilisierten Cefalexin-Moleküle auf der Chip-Oberfläche auch etwas weniger Cefalexin in der Probe ausreicht, um einen entsprechenden Signalarückgang (bezogen auf das Maximalsignal der Kalibrierreihe) zu bewirken, als bei der höheren Kontaktdruck-Konzentration.

Bei Kanamycin betragen die berechneten Werte für Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$ und $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$. Der Arbeitsbereich ($80 \% - 20 \% \text{ B/B}_0$) wurde zu $0,7 - 7,1 \mu\text{g L}^{-1}$ mit einem Testmittelpunkt von $2,2 \mu\text{g L}^{-1}$ bestimmt.

Auf Grundlage der Kalibrierungen wurden Wiederfindungen mit Proben ermittelt, die Cefalexin beziehungsweise Kanamycin in einer Konzentration von $1 \mu\text{g L}^{-1}$ enthielten, da dies einer eher niedrigen Konzentration innerhalb des jeweiligen Arbeitsbereichs entspricht. Für die Cefalexin-Kontaktdruck-Konzentrationen von 5 mg mL^{-1} und 1 mg mL^{-1} wurden Wiederfindungen von $80 \% \pm 20 \%$ und $77 \% \pm 22 \%$ erhalten. Für Kanamycin betrug die Wiederfindungsrate $88 \% \pm 21 \%$.

Somit sind alle etablierten Assays im Bereich von unter $1 \mu\text{g L}^{-1}$ bis hin zu mehreren $\mu\text{g L}^{-1}$ mit verlässlichen Wiederfindungen einsetzbar.

5.1.3 Messungen in menschlichen und tierischen Realproben

Die Anwendbarkeit der für Cefalexin und Kanamycin etablierten Assays, die auf dem Mikroarray-Chip gleichzeitig ausgeführt werden können, wurde anhand von verschiedenen flüssigen Realproben demonstriert.

Zum einen wurden Milch- und Urinproben einer laktierenden Kuh untersucht, die wegen einer Euter-Entzündung mit dem Kombinationspräparat Ubrolexin behandelt wurde. Die Proben wurden jeweils mehrere Stunden nach intramammärer Verabreichung der Injektion gesammelt und für die Messung geeignet mit PBS-Puffer verdünnt.

Die ermittelten Cefalexin- und Kanamycin-Konzentrationen sind in Abbildung 20 dargestellt.

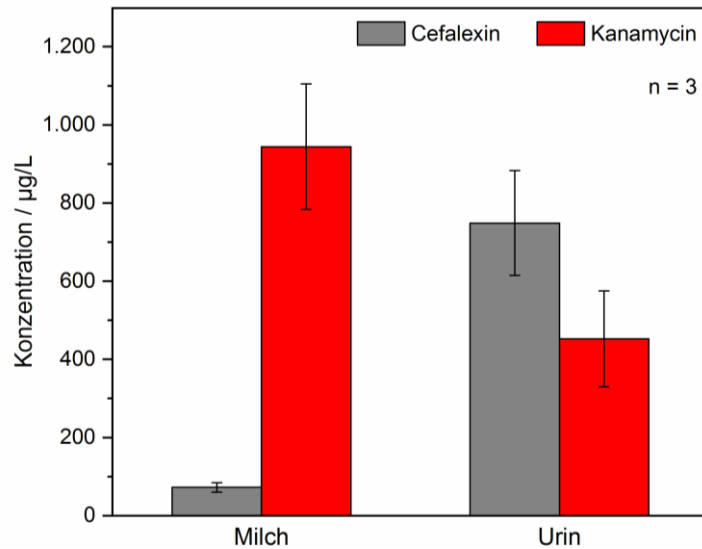


Abbildung 20. Analyse von Realproben einer Milchkuh nach intramammärer Injektion einer Ampulle des Kombinationspräparats Ubrolexin.

Hierbei zeigte sich, dass sowohl in der Milch als auch im Urin der Kuh beide Antibiotika nachweisbar waren. Jedoch schien sich Kanamycin bevorzugt in der Milch anzureichern, während Cefalexin im Urin in wesentlich höheren Konzentrationen vorlag. Somit bietet die mit dem Mikroarray-Chip mögliche parallele Analyse von mehreren Kontaminanten in einer Probe eine gute Möglichkeit, die unterschiedliche Verteilung von gleichzeitig verabreichten Wirkstoffen in verschiedenen Körperflüssigkeiten zu ermitteln und damit beispielsweise Untersuchungen von Metabolisierungswegen zu unterstützen.

Des Weiteren wurden Proben eines Menschen, der wegen einer bakteriellen Halsentzündung mit Cefalexin behandelt wurde, mit dem Mikroarray-Immunoassay-Verfahren analysiert. Neben Urin konnte aufgrund eines künstlichen Dünndarm-Ausgangs (Ileostoma) der Person auch Dünndarm-Sekret gesammelt werden.

Die Einnahme einer Tablette mit 500 mg Cefalexin erfolgte morgens um 7 Uhr, wobei unmittelbar vor der Tabletteneinnahme die Harnblase und das externe Reservoir des Ileostomas entleert worden waren. In den folgenden Stunden nahm die Person etwa 400 mL Wasser und nur wenig Ballaststoff-arme Nahrung (ein Weißbrot mit Butter) zu sich, um das Dünndarm-Sekret möglichst flüssig zu halten. Nach etwa drei Stunden wurde eine Urinprobe (Gesamtvolumen des Exkrets ca. 100 mL) genommen. Aus dem externen Reservoir des Ileostomas wurden sowohl bei der Entleerung nach zwei Stunden als auch nach sechs Stunden Proben genommen (Gesamtvolumen des Exkrets jeweils ca. 25 mL), die mithilfe eines

5 Ergebnisse und Diskussion

Spritzenfilters von Feststoff-Anteilen befreit wurden. Die Proben wurden für die Messung geeignet mit PBS-Puffer verdünnt. In Tabelle 5 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 5. Analyse von Realproben einer Person nach Einnahme einer Tablette mit 500 mg Cefalexin. Da es sich um Zweifach-Bestimmungen handelt, sind jeweils beide Messwerte sowie der Mittelwert angegeben.

	Urin	Dünndarm-Sekret*	
Zeitspanne nach Cefalexin-Einnahme / h	0 – 3	0 – 2	2 – 6
Volumen des Exkrets (ca.) / mL	100	25	25
Konzentration Messung 1 2 / mg L ⁻¹	1115 660	11 10	359 367
Mittelwert der Konzentrationen / mg L ⁻¹	887	11	363
Ausscheidungsmenge absolut (ca.) / mg	89	0,3	9

* Nach Passage des Dünndarms kontinuierlich ausgeschieden über Ileostoma (künstlicher Ausgang des Dünndarms) und aufgefangen in externem Reservoir.

Im Urin waren nach drei Stunden hohe Cefalexin-Konzentrationen von etwa 887 mg L⁻¹ nachweisbar. Das Dünndarm-Sekret, das im Zeitraum bis zwei Stunden nach der Einnahme ausgeschieden wurde, enthielt mit etwa 11 mg L⁻¹ hingegen nur geringe Mengen Cefalexin, während in dem Dünndarm-Sekret, das im Zeitraum von zwei bis sechs Stunden nach der Einnahme ausgeschieden wurde, deutlich höhere Cefalexin-Konzentrationen von etwa 363 mg L⁻¹ nachgewiesen werden konnten. Das steht im Einklang mit der Tatsache, dass die Passage von oral aufgenommenen Stoffen bis zum Ende des Dünndarms in der Regel deutlich länger dauert als die Passage der Harnwege und deswegen nach zwei Stunden noch kein nennenswerter Anteil des eingenommenen Cefalexins im Dünndarm-Sekret enthalten sein konnte.

Die überschlagsmäßig bestimmten absoluten Ausscheidungsmengen von etwa 89 mg im Urin und 0,3 mg beziehungsweise 9 mg im Dünndarmsekret legen nahe, dass der hauptsächliche Ausscheidungsweg von nicht metabolisiertem Cefalexin der Urin ist. Von den eingenommenen 500 mg Cefalexin wurden bei dieser Untersuchung insgesamt etwa 100 mg (20 %) in Exkrementen gefunden, was als realistischer Wert für den nicht metabolisierten und in den folgenden Stunden ausgeschiedenen Wirkstoffanteil angesehen werden kann.

Diese Arbeit zeigt, dass der Fluss-basierte CL-Mikroarray-Immunoassay eine effiziente Methode zur Untersuchung von Patientenproben darstellt, da diese direkt (ohne aufwendige Extraktion) gemessen und gleichzeitig verschiedene Analyten detektiert werden können.

5.2 Regenerierbarer Mikroarray-basierter Rezeptor-Assay für die Detektion von Tetracyclin

Im zweiten Projekt dieser Arbeit wurde nach dem Vorbild der regenerierbaren kompetitiven Immunoassays ein vergleichbarer Assay mit dem Rezeptor-Protein TetR anstelle eines Antikörpers etabliert. Als Kompetitor wurde statt eines Tetracyclin-Derivats die DNA-Operator-Sequenz *tetO* auf dem Mikroarray-Chip immobilisiert, die auch im bakteriellen Resistenzmechanismus mit Tetracyclin um TetR konkurriert.

5.2.1 Entwicklung des Assay-Prinzips

Zunächst wurde ein Prinzip für den Nachweis von Tetracyclinen mittels DNA-Rezeptor-Assay entwickelt, wobei die für den Nachweis zahlreicher Antibiotika etablierte Methode der Fluss-basierten regenerierbaren CL-Immunoassays (siehe Abbildung 11 in Kapitel 3.3.3.2 sowie [27]) entsprechend ergänzt beziehungsweise modifiziert wurde. Aufgrund der parallelen Schritte ist es prinzipiell denkbar, dass diese beiden Assay-Varianten auch gemeinsam ausgeführt werden können. (Dies wird in Kapitel 5.2.6 durch entsprechende Experimente belegt.) Daher zeigt Abbildung 21 das neu entwickelte Assay-Prinzip für den Nachweis von Tetracyclinen zusammen mit einem exemplarischen Immunoassay (mit geringerer Farbintensität dargestellt).

5 Ergebnisse und Diskussion

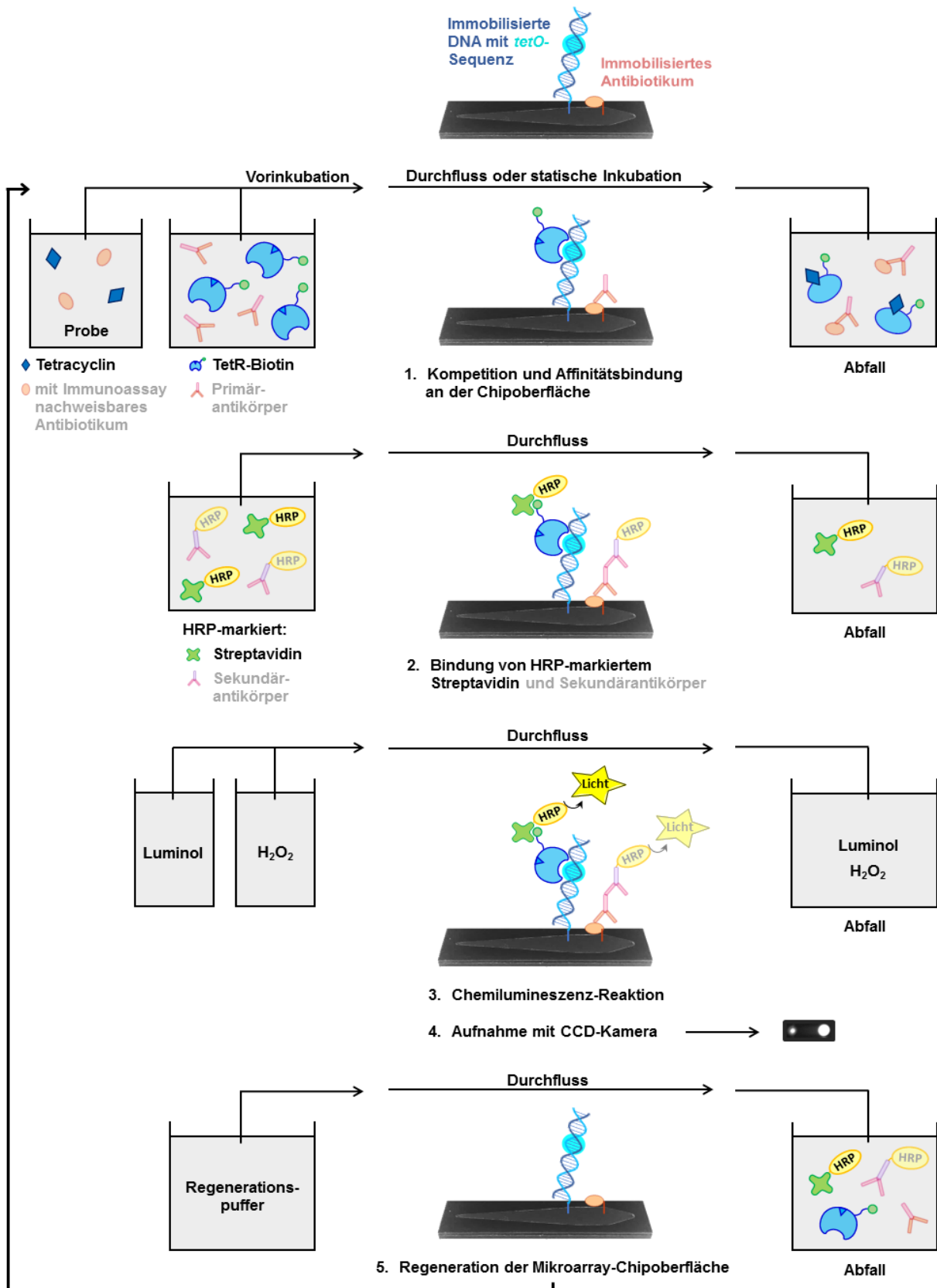


Abbildung 21. Prinzip des DNA-Rezeptor-Assays zum Nachweis von Tetracyclinen, eventuell gleichzeitig ausgeführt mit Immunoassays zum Nachweis von anderen Antibiotika; ein exemplarischer Immunoassay ist zum Vergleich dargestellt (mit geringerer Farbintensität).

Auf dem Chip wurde ein 27 Basenpaare umfassendes Oligonukleotid immobilisiert, das die palindromische *tetO*-Sequenz enthielt. Die Probe wurde mit einer Lösung des biotinylierten Rezeptor-Proteins TetR gemischt, vorinkubiert und in die Flusszelle des Chips ($V = 50 \mu\text{L}$) geleitet (1). Sofern in der Probe Tetracycline vorhanden waren, konkurrierten diese mit *tetO*-Sequenzen der immobilisierten Oligonukleotide um TetR. Jedes TetR-Molekül, an das ein Tetracyclin-Derivat gebunden wurde, durchlief eine Konformationsänderung, sodass es nicht mehr an *tetO* binden konnte. Demzufolge stand prinzipiell umso mehr biotinyliertes TetR für die Bindung an *tetO* zur Verfügung, je geringer die Tetracyclin-Konzentration in der Probe war.

Bei Versuchen mit Leerwertproben zeigte sich jedoch, dass im Gegensatz zu den Immunoassays die Interaktionszeit für die Bindung von TetR an *tetO* bei einem langsamen, kontinuierlichen Fluss ($10 \mu\text{L s}^{-1}$) des Probe-TetR-Gemisches nicht ausreichte und nur sehr geringe CL-Signalintensitäten detektiert wurden. (Die Verwendung von Streptavidin-PolyHRP 40 anstelle von Streptavidin-HRP führte nur zu einem starken unspezifischen Leuchten des gesamten Chips, aber nicht zu einer deutlicheren Abgrenzung der Punkte.)

Daher wurden eine Stop-Flow-Methode und eine statische Inkubation erprobt. Bei der Stop-Flow-Methode wurde das Probe-TetR-Gemisch in acht Inkrementen zu je $50 \mu\text{L}$ in die Flusszelle gepumpt und dort jeweils für 60 s inkubiert. Auf diese Weise konnte das CL-Signal auf das 2,5-Fache gesteigert werden. Die statische Inkubation erfolgte über einen längeren Zeitraum, zunächst für 5 min oder 15 min. Dadurch erhöhte sich das CL-Signal um Faktor 15 beziehungsweise Faktor 25. Aus praktischen Gründen wurden dazu $50 \mu\text{L}$ des Probe-TetR-Gemisches manuell in die Flusszelle injiziert und auch für die Dauer der Inkubation wurde der Chip außerhalb des MCR 3 verwahrt, um währenddessen jeweils einen anderen Chip im MCR 3 prozessieren zu können. (Diese Methode wurde im Folgenden beibehalten und hinsichtlich der optimalen Inkubationsdauer und -Temperatur tiefergehend untersucht.)

Im weiteren Verlauf des neu entwickelten Assays wurde das erfolgreich an *tetO* gebundene TetR-Biotin mit Streptavidin-HRP markiert (2), sodass auch hier die CL-Reaktion von Luminol und H_2O_2 von HRP katalysiert werden (3) und das dabei emittierte Licht mittels CCD-Kamera aufgezeichnet werden konnte (4).

Wie in Kapitel 5.2.2 detailliert gezeigt wird, war eine Regeneration der Chip-Oberfläche (5) auch bei diesem Assay mithilfe desselben Regenerationspuffers (allerdings bei pH 4) möglich. Während TetR-Biotin und Streptavidin-HRP dadurch denaturiert und abgelöst wurden, blieb

das kovalent gebundene Oligonukleotid unbeschadet auf der Oberfläche erhalten und weitere Messungen konnten auf demselben Chip durchgeführt werden.

5.2.1.1 Medium zum Hybridisieren und Kontaktdrucken der Oligonukleotide

In ersten Vorversuchen wurden die beiden DNA-Einzelstränge für die Hybridisierung und den anschließenden Kontaktdruck-Vorgang in Reinstwasser oder SSC-Puffer gelöst und parallel auf dem gleichen Chip zur Immobilisierung aufgetragen. Damit wurden Leerwert-Messungen zur Bestimmung der maximalen Signalintensitäten durchgeführt. Da die Wechselwirkungen von TetR mit *tetO* beziehungsweise Tetracyclin in der Bakterienzelle üblicherweise bei der Körpertemperatur des Wirtsorganismus ablaufen und somit vermutlich in diesem Bereich ihr Optimum haben, wurde die Inkubation des Probe-TetR-Gemisches bei Temperaturen von 37 °C und 18 °C im Vergleich durchgeführt (siehe Abbildung 22).

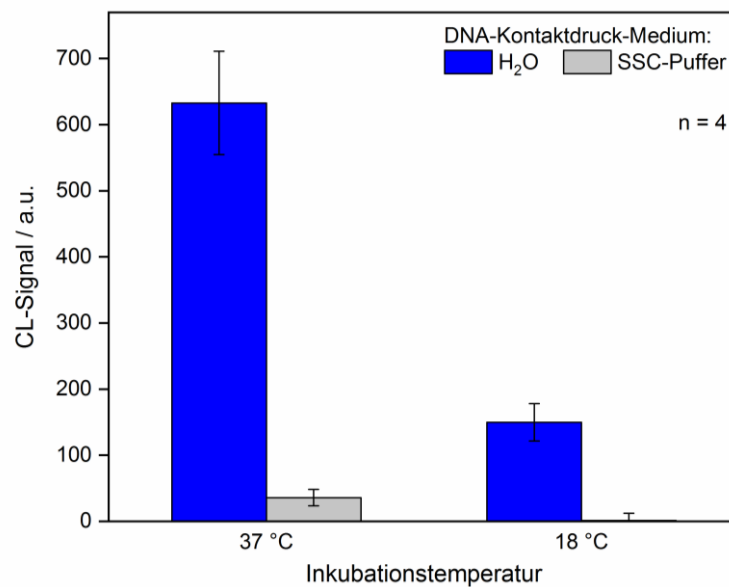


Abbildung 22. Einfluss des DNA-Kontaktdruck-Mediums und der Inkubationstemperatur auf die maximalen CL-Signalintensitäten. Die DNA-Kontaktdruck-Konzentration betrug für beide Medien 150 µM. Das Leerwertprobe-TetR-Gemisch wurde im Chip jeweils für 10 min inkubiert und die folgenden Schritte der Messung wurden im MCR 3 bei 18 °C durchgeführt.

Signifikante Signalintensitäten wurden lediglich mit Reinstwasser erhalten, mit SSC-Puffer hingegen nicht. Somit war H₂O wesentlich besser als Medium für die Hybridisierung und die Immobilisierung des doppelsträngigen Oligonukleotids geeignet und wurde im Folgenden weiterhin verwendet.

Wie erwartet, führte die Inkubation des Probe-TetR-Gemisches bei 37 °C zu deutlich höheren Signalintensitäten als bei 18 °C. Dies wird in Kapitel 5.2.3.1 genauer untersucht.

5.2.1.2 Abhängigkeit der Signalintensität von der DNA-Kontaktdruck-Konzentration

Insgesamt zeigten die Punkte, die mit einer DNA-Konzentration von 150 μM in der Kontaktdruck-Lösung erzeugt worden waren, relativ geringe Signalintensitäten (< 700 a.u.), daher wurden im Folgenden auch etwas höhere DNA-Konzentrationen in der Kontaktdruck-Lösung zum Vergleich getestet.

Exemplarische CL-Messbilder von Chips, die parallele Reihen von Kontaktdruck-Lösungen mit 400 μM , 200 μM und 100 μM DNA enthielten, zeigt Abbildung 23. Dabei wurden neben Leerwertproben bereits auch mit Tetracyclin dotierte Proben (1 $\mu\text{g L}^{-1}$ und 10 $\mu\text{g L}^{-1}$) analysiert, um zu überprüfen, ob die erwartete Konkurrenz in diesem Konzentrationsbereich funktioniert.

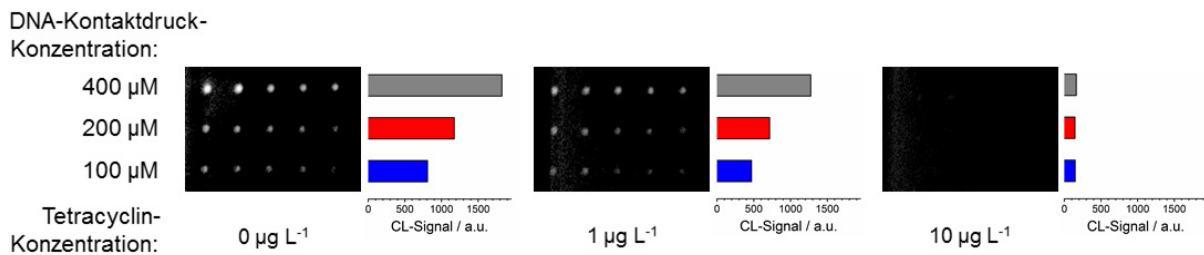


Abbildung 23. CL-Messbilder von Proben mit unterschiedlichen Tetracyclin-Konzentrationen. Das Probe-TetR-Gemisch wurde im Chip jeweils für 30 min bei 37 °C inkubiert und die folgenden Schritte der Messung wurden im MCR 3 bei 18 °C durchgeführt.

Das neu entwickelte Prinzip des DNA-Rezeptor-Assays erwies sich als geeignet, da für alle verwendeten DNA-Konzentrationen klar definierte Punkte mit einem gleichmäßig niedrigen Hintergrund erhalten wurden. Somit traten keine unspezifischen Bindungen des TetR-Proteins an die Chip-Oberfläche auf.

Mit höheren DNA-Kontaktdruck-Konzentrationen korrelierten höhere CL-Signalintensitäten. Grundsätzlich sollten die Signale für eine robuste und nachweisstarke Methode möglichst intensiv sein. Jedoch war zunächst zu untersuchen, ob mit zunehmender DNA-Kontaktdruck-Konzentration möglicherweise die Regenerierbarkeit wegen einer zu dichten Belegung beeinträchtigt wäre oder ob die Nachweisgrenze bei einer höheren Konzentration des

Kompetitors auf der Oberfläche ungewollt erhöht würde, da mehr Tetracyclin-Moleküle für eine Reduktion der Signalintensität erforderlich wären. Daher wurden für die folgenden Versuche die drei hier verwendeten DNA-Kontaktdruck-Konzentrationen weiterhin nebeneinander eingesetzt, um die optimale Konzentration – auch im Hinblick auf einen möglichst sparsamen Einsatz der Oligonukleotide – zu ermitteln.

In Anwesenheit von $1 \mu\text{g L}^{-1}$ beziehungsweise $10 \mu\text{g L}^{-1}$ Tetracyclin wurden bei allen Kontaktdruck-Reihen signifikante Signalkügelungen verzeichnet. Mit $1 \mu\text{g L}^{-1}$ Tetracyclin reduzierte sich die Signalintensität auf etwa die Hälfte der Leerwert-Messung. Damit sollte der Testmittelpunkt einer Kalibrierung etwa in diesem Konzentrationsbereich liegen. Mit $10 \mu\text{g L}^{-1}$ Tetracyclin erreichten die Punkte nur noch etwa 10 % – 20 % der Intensitäten der Leerwert-Signale. Eine grundsätzliche Abhängigkeit der Signalintensitäten von der Tetracyclin-Konzentration in der Probe konnte demnach gezeigt werden.

5.2.2 Untersuchungen zur Regenerierbarkeit

Analog zu den bereits etablierten kompetitiven Immunoassays mit immobilisierten Analyt-Derivaten sollten auch die Chips mit immobilisierten doppelsträngigen DNA-Oligonukleotiden für eine Vielzahl von Messungen regeneriert werden. Nach der Aufzeichnung der CL-Signale wurde die Chip-Oberfläche dazu mit dem bewährten Regenerationspuffer behandelt. Allerdings wurde dessen pH-Wert auf 4 eingestellt, um die Oligonukleotide auch über viele Regenerationszyklen nicht zu hydrolysieren.

Eine erfolgreiche Regeneration der Chip-Oberfläche sollte zum einen dadurch gezeigt werden, dass bei auf dem gleichen Chip mehrmals hintereinander durchgeführten Leerwert-Messungen immer etwa die gleichen Signalintensitäten detektiert würden.

Nach jeder Messung mit Regeneration sollte in einem weiteren Schritt nachgewiesen werden, dass die Oberfläche wieder in ihren ursprünglichen Zustand versetzt und dass weder TetR-Biotin noch Streptavidin-HRP an den DNA-Oligonukleotiden auf der Oberfläche zurückgeblieben waren. Dazu wurde der Chip erneut mit Streptavidin-HRP sowie Luminol und Wasserstoffperoxid behandelt, woraufhin ein weiteres CL-Bild aufgenommen und die Oberfläche wiederum mit Regenerationspuffer gespült wurde (siehe Schritte (2) – (5) des Messprogramms in Abbildung 21).

5.2.2.1 Regenerierbarkeit bei einer Messtemperatur im MCR 3 von 18 °C

Eine Abfolge von neun Messungen und den dazwischengeschalteten Messungen (R) zum Nachweis der erfolgreichen Regeneration ist in Abbildung 24 dargestellt. Dabei erfolgte die Inkubation des Probe-TetR-Gemisches im Chip jeweils für 20 min bei 39 °C und die Messung im MCR 3 bei 18 °C.

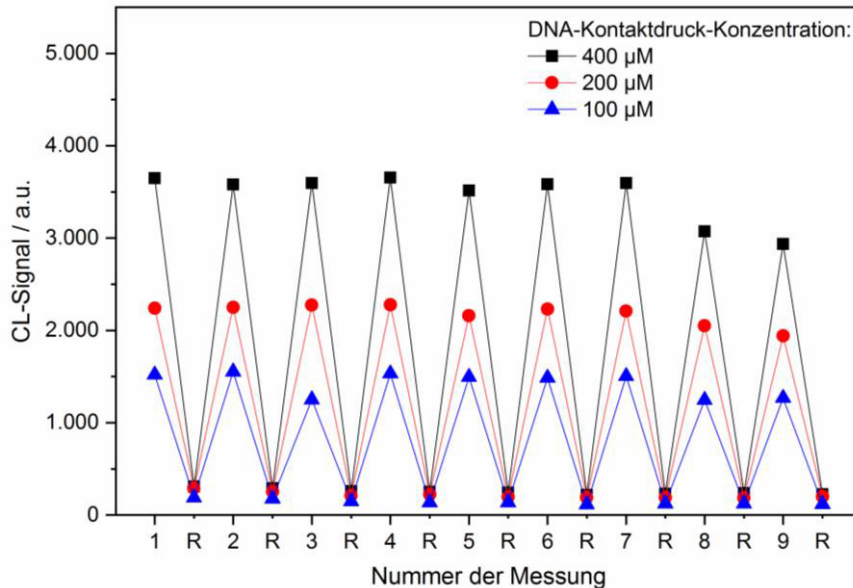


Abbildung 24. CL-Signalintensitäten von nacheinander auf demselben Chip durchgeführten Messungen 1 – 9 und den jeweils dazwischengeschalteten Messungen R, die die Wirksamkeit des Regenerationspuffers belegen. Das Leerwertprobe-TetR-Gemisch wurde im Chip jeweils für 20 min bei 39 °C inkubiert und die folgenden Schritte der Messung wurden im MCR 3 bei 18 °C durchgeführt. Für die Messungen R wurde kein neues Probe-TetR-Gemisch eingebracht, sondern das Programm setzte bei der Zugabe von Streptavidin-HRP ein. Da der Fokus hier auf der Beschreibung der allgemeinen Trends liegt, wurde die Messreihe nur einmal durchgeführt. Statistisch auftretende Signalschwankungen werden dadurch kompensiert, dass die Messpunkte jeweils den Mittelwert aus fünf äquivalenten Punkten darstellen, die auf dem Chip in einer Reihe immobilisiert waren.

Die Leerwert-Signalintensitäten blieben über neun Messungen annähernd konstant. Für die DNA-Kontaktdruck-Konzentrationen von 400 μM, 200 μM und 100 μM betrug der Mittelwert der Messungen 7 – 9 jeweils noch 89 %, 92 % und 93 % des Mittelwerts der Messungen 1 – 3. Die Variationskoeffizienten der neun Messungen wurden zu 8 %, 5 % und 9 % bestimmt. Damit zeigte die Reihe mit einer DNA-Kontaktdruck-Konzentration von 200 μM die geringsten Signalschwankungen bei einer sehr hohen Regenerierbarkeit.

Bei den dazwischengeschalteten Messungen (R) zum Nachweis der erfolgreichen Regeneration wurden nur äußerst geringe unspezifische Signalintensitäten (deutlich weniger als 10 % des

jeweiligen Leerwert-Signals) detektiert. Somit konnte eine wiederholte Regenerierung der immobilisierten doppelsträngigen DNA-Oligonukleotide erfolgreich demonstriert werden.

5.2.2.2 Regenerierbarkeit bei einer Messtemperatur im MCR 3 von 39 °C

Eine frühere Studie hatte gezeigt, dass die Signalintensitäten eines CL-Assays mit immobilisierten einzelsträngigen DNA-Oligonukleotiden zum Nachweis von Virus- und Phagen-DNA/RNA signifikant erhöht wurden, wenn die gesamte Messung bei 40 °C statt bei 20 °C durchgeführt wurde [122]. Daher wurde in einer weiteren Versuchsreihe von acht Leerwert-Messungen das Probe-TetR-Gemisch wiederum jeweils für 20 min bei 39 °C inkubiert, die darauffolgenden Schritte der Messung im MCR 3 fanden allerdings ebenfalls bei 39 °C (anstelle von 18 °C) statt. Die erhaltenen CL-Signalintensitäten zeigt Abbildung 25.

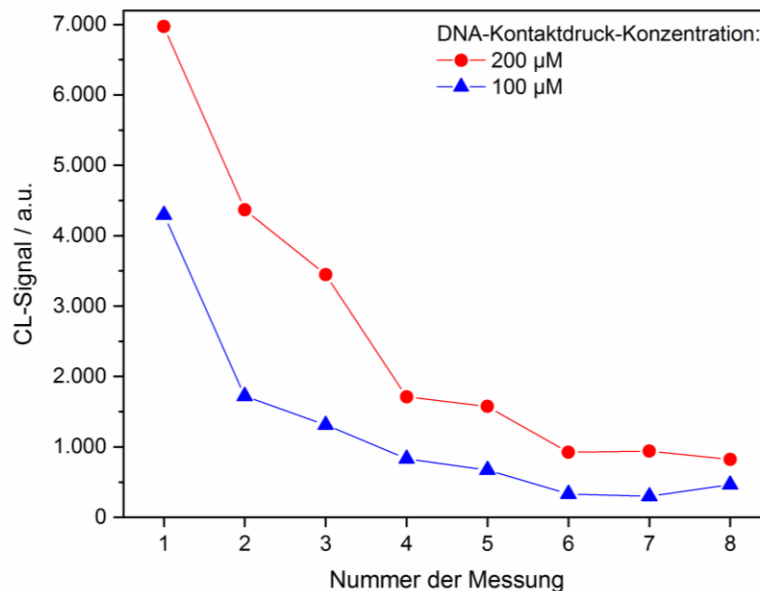


Abbildung 25. CL-Signalintensitäten von nacheinander auf demselben Chip durchgeführten Messungen 1 – 8. Das Leerwertprobe-TetR-Gemisch wurde im Chip jeweils für 20 min bei 39 °C inkubiert und die folgenden Schritte der Messung wurden im MCR 3 ebenfalls bei 39 °C durchgeführt. Da der Fokus hier auf der Beschreibung der allgemeinen Trends liegt, wurde die Messreihe nur einmal durchgeführt. Statistisch auftretende Signalschwankungen werden dadurch kompensiert, dass die Messpunkte jeweils den Mittelwert aus fünf äquivalenten Punkten darstellen, die auf dem Chip in einer Reihe immobilisiert waren.

Die Signalintensitäten der ersten Messung bei 39 °C fielen etwa dreimal so hoch aus wie bei der ersten Messung bei 18 °C. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Bindung von

Streptavidin an Biotin und die HRP-Katalyse ebenfalls biochemische Reaktionen sind, die im Bereich natürlicher Körpertemperaturen am effizientesten ablaufen.

Mit zunehmender Anzahl der Messdurchgänge verringerten sich die Signalintensitäten jedoch drastisch (auf etwa ein Drittel des jeweils vorherigen Messwerts), bis sie sich ab der sechsten Messung auf einem sehr niedrigen Niveau stabilisierten (ca. 12 % der Intensität der ersten Messung beziehungsweise ca. 40 % der bei 18 °C ab der ersten Messung konstant erhaltenen Werte).

Der deutliche Signalverlust ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass Wasserstoffperoxid bei der CL-Reaktion Radikale bildet, die die DNA-Basen der Oligonukleotide oxidieren und damit zu einem Bruch des Doppelstrangs führen [123]. Damit würde der spezifische Operator *tetO* zerstört und stünde bei weiteren Messungen nicht mehr für die Bindung von TetR zur Verfügung. Da die Ausbeute an Radikalen und deren Reaktivität an den DNA-Basen mit steigender Temperatur zunimmt, tritt die Beschädigung der Oligonukleotide bei 39 °C wesentlich stärker auf als bei 18 °C. Somit wurden im Folgenden alle im MCR 3 ablaufenden Schritte der Messung bei 18 °C durchgeführt. (Die Inkubation des Probe-TetR-Gemisches erfolgte jedoch weiterhin bei höheren Temperaturen, siehe Kapitel 5.2.3.)

5.2.3 Einfluss von Inkubationstemperatur und -Dauer

Da die Inkubation des Probe-TetR-Gemisches im Chip den entscheidenden Schritt für eine hohe Signalintensität darstellt, wurden die beiden Einflussfaktoren Temperatur und Dauer der Inkubation systematisch untersucht.

5.2.3.1 Variation der Inkubationstemperatur

Die Inkubationstemperatur wurde im Bereich von 18 – 46 °C in sieben Schritten variiert (bei einer konstanten Inkubationsdauer von 15 min). Die erhaltenen Signalintensitäten sind in Abbildung 26 dargestellt.

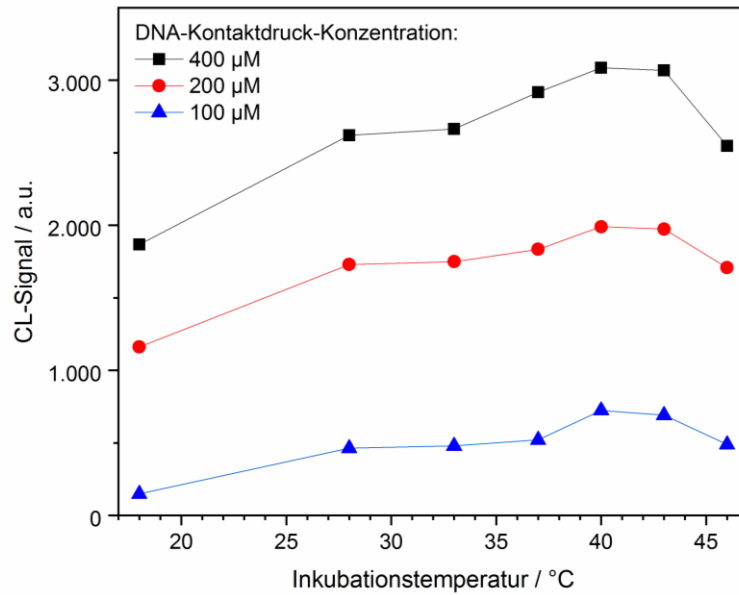


Abbildung 26. Einfluss der Inkubationstemperatur auf die maximalen Signalintensitäten. Das Leerwertprobe-TetR-Gemisch wurde im Chip jeweils für 15 min inkubiert und die folgenden Schritte der Messung wurden im MCR 3 bei 18 °C durchgeführt. Da der Fokus hier auf der Beschreibung der allgemeinen Trends liegt, wurde die Messreihe nur einmal durchgeführt. Statistisch auftretende Signalschwankungen werden dadurch kompensiert, dass die Messpunkte jeweils den Mittelwert aus fünf äquivalenten Punkten darstellen, die auf dem Chip in einer Reihe immobilisiert waren.

Für alle DNA-Kontaktdruck-Konzentrationen war ein deutlicher Signalanstieg mit zunehmender Inkubationstemperatur zu verzeichnen. Wie erwartet, lag das Maximum bei etwa 40 °C und damit im Bereich der in Wirtsorganismen relevanten Temperaturen. Bei 46 °C wurden wiederum deutlich geringere Signalintensitäten detektiert, was auf eine beginnende Protein-Denaturierung hindeutet. Daher wurden keine höheren Temperaturen getestet.

Insgesamt bestätigte diese Untersuchung, dass eine Inkubation des Probe-TetR-Gemisches bei biologisch relevanten Temperaturen (37 – 40 °C) und eine Durchführung der folgenden Schritte der Messung bei 18 °C eine effiziente Kombination für diesen regenerierbaren Rezeptor-Assay darstellt. Daher wurde dieses Konzept im Folgenden so beibehalten.

5.2.3.2 Variation der Inkubationsdauer

Da auch die Inkubationsdauer des Probe-TetR-Gemisches im Chip einen wesentlichen Einfluss auf die Signalintensitäten hatte, wurde diese systematisch in acht Schritten im Bereich von

5 Ergebnisse und Diskussion

10 – 120 min variiert (bei einer konstanten Inkubationstemperatur von 39 °C). Die erhaltenen Signalintensitäten sind in Abbildung 27 dargestellt.

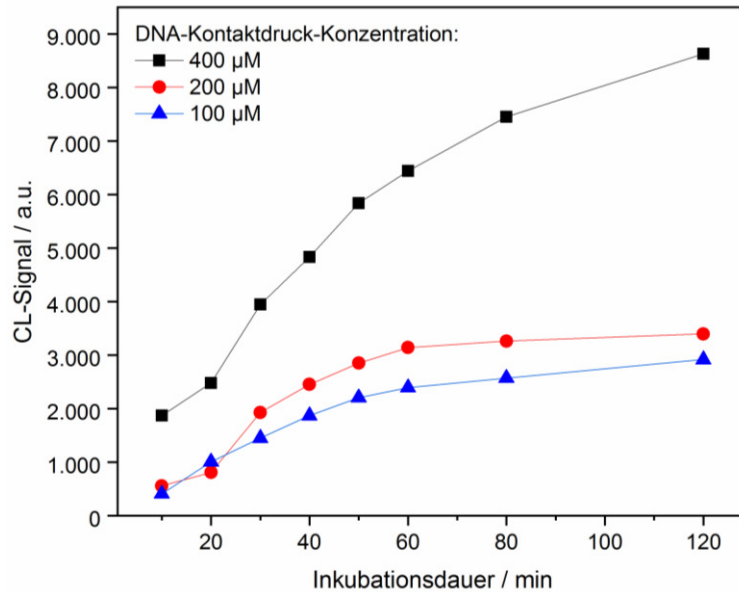


Abbildung 27. Einfluss der Inkubationsdauer auf die maximalen Signalintensitäten. Das Leerwertprobe-TetR-Gemisch wurde im Chip jeweils bei 39 °C inkubiert und die folgenden Schritte der Messung wurden im MCR 3 bei 18 °C durchgeführt. Da der Fokus hier auf der Beschreibung der allgemeinen Trends liegt, wurde die Messreihe nur einmal durchgeführt. Statistisch auftretende Signalschwankungen werden dadurch kompensiert, dass die Messpunkte jeweils den Mittelwert aus fünf äquivalenten Punkten darstellen, die auf dem Chip in einer Reihe immobilisiert waren.

Insgesamt zeigte sich eine deutliche Signalsteigerung mit zunehmender Inkubationsdauer, besonders im Bereich von 10 – 60 min. Bei einer längeren Inkubationsdauer schwächte sich der Effekt etwas ab.

Da eine Abwägung zwischen einer möglichst hohen Signalintensität und einer möglichst schnellen Analyse zu treffen war, erschien es zweckmäßig, eine Inkubationsdauer von etwa 20 – 40 min zu wählen. Die Effizienz kann dabei grundsätzlich noch gesteigert werden, indem die Inkubation des Probe-TetR-Gemisches im Chip weiterhin außerhalb des MCR 3 durchgeführt wird und mehrere Chips parallel im Einsatz sind, allerdings mit zeitversetzter Inkubation und Messung, sodass die Analysezeit im MCR 3 optimal ausgenutzt wird. Dieses Konzept wurde im Verlauf der Arbeit weiterverfolgt.

5.2.4 Ermittlung von Kalibrierkurven und Wiederfindungen

Um die Nachweisstärke und die Reproduzierbarkeit des etablierten Assays zu untersuchen, wurden Kalibrierkurven und Wiederfindungen bestimmt. Dazu wurden auf drei verschiedenen Chips Sechs-Punkt-Kalibrierungen mit Tetracyclin-Konzentrationen von 0,1 bis 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ in Leitungswasser durchgeführt. Die Messchips waren mit DNA-Kontakt-druck-Konzentrationen von 400 μM und 200 μM belegt worden und das optimierte Messprotokoll (Inkubation des Probe-TetR-Gemisches im Chip für 30 min bei 37 °C außerhalb des MCR 3; Messung im MCR 3 bei 18 °C; parallele, aber zeitversetzte Prozessierung der drei Chips) kam zum Einsatz.

Die Messwerte wurden jeweils auf das höchste Signal der zugehörigen Kalibrierreihe normiert. Diese relativen Signalintensitäten B/B_0 der drei Kalibrierreihen wurden für jede Kalibrierkonzentration gemittelt. Die daraus erhaltenen Werte mit ihren Standardabweichungen sowie die sigmoidalen Regressionskurven sind in Abbildung 28 dargestellt.

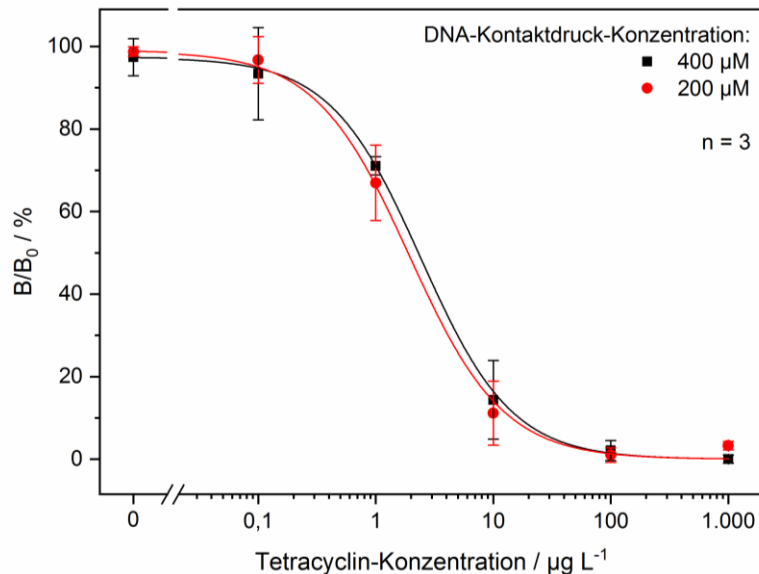


Abbildung 28. Sechs-Punkt-Kalibrierungen mit sigmoidalen Regressionskurven, dargestellt als relative Signalintensitäten B/B_0 bezogen auf den jeweils höchsten Messwert einer Kalibrierreihe. Das Probe-TetR-Gemisch wurde im Chip jeweils für 30 min bei 37 °C inkubiert und die folgenden Schritte der Messung wurden im MCR 3 bei 18 °C durchgeführt. Der Graph zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen von drei auf verschiedenen Chips ausgeführten Kalibrierreihen.

Mit beiden DNA-Kontakt-druck-Konzentrationen wurden sehr ähnliche Kalibrierkurven erhalten. Die ermittelten analytischen Parameter sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6. Charakteristika der Kalibrierungen und Wiederfindungen.

	DNA-Kontaktdruck-Konzentration	
	400 μM	200 μM
Nachweisgrenze / $\mu\text{g L}^{-1}$	0,5	0,1
Bestimmungsgrenze / $\mu\text{g L}^{-1}$	1,0	0,2
Arbeitsbereich (80 % – 20 % B/B ₀) / $\mu\text{g L}^{-1}$	0,6 – 8,1	0,5 – 6,8
Testmittelpunkt (50 % B/B ₀) / $\mu\text{g L}^{-1}$	2,4	1,9
Wiederfindung (1 $\mu\text{g L}^{-1}$) / %	80 \pm 19 (n = 3)	77 \pm 16 (n = 3)

So betragen die berechneten Nachweisgrenzen / Bestimmungsgrenzen 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ / 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ für 400 μM DNA und 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ / 0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ für 200 μM DNA und die entsprechenden Arbeitsbereiche (80 % – 20 % B/B₀) wurden zu 0,6 – 8,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ beziehungsweise 0,5 – 6,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ bestimmt. Die Testmittelpunkte (50 % B/B₀) lagen bei 2,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ beziehungsweise 1,9 $\mu\text{g L}^{-1}$. Die etwas niedrigeren Werte bei 200 μM DNA sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass aufgrund der Konkurrenz bei einer geringeren Anzahl der immobilisierten DNA-Oligonukleotide auf der Chip-Oberfläche auch etwas weniger Tetracyclin in der Probe ausreicht, um einen entsprechenden Signalrückgang (bezogen auf das Maximalsignal der Kalibrierreihe) zu bewirken, als bei der höheren DNA-Kontaktdruck-Konzentration von 400 μM .

Auf Grundlage der Kalibrierungen wurden Wiederfindungen bestimmt. Dazu wurden Leitungswasser-Proben mit 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ Tetracyclin versetzt, da dies einer möglichst niedrigen Konzentration innerhalb des Arbeitsbereichs entspricht. Für die DNA-Kontaktdruck-Konzentrationen von 400 μM und 200 μM wurden Wiederfindungen von 80 % \pm 19 % und 77 % \pm 16 % ermittelt.

5.2.5 Voruntersuchung zur Analyse von Oberflächenwasser-Realproben

Wie in Kapitel 3.2.5 gezeigt, wurden mit anderen Methoden bereits Tetracyclin-Konzentrationen von (teilweise deutlich) mehr als 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ in Regionen mit intensiver Nutztierhaltung in Asien und den USA nachgewiesen. Daher sollte die hier etablierte Methode grundsätzlich für die Analyse von Oberflächenwasser-Realproben geeignet sein.

In Europa wurden bisher keine so hohen Konzentrationen in Umweltproben gefunden, daher wurden auch keine positiven Ergebnisse erwartet. Jedoch sollte untersucht werden, ob unspezifische Signalunterdrückungen bedingt durch die komplexe Realmatrix auftreten und es damit zu falsch-positiven Ergebnissen kommen könnte.

Neun Oberflächenwasser-Proben, die aus dem Langeröner Fließ an drei Probenahmestellen in der Umgebung einer Geflügelfarm in Wullwinkel, Brandenburg, gesammelt worden waren, wurden mit der neu entwickelten Methode analysiert. Dabei wurde das Probe-TetR-Gemisch jeweils für 30 min bei 37 °C inkubiert und die folgenden Schritte der Messung erfolgten im MCR 3 bei 18 °C. Die erhaltenen relativen Signalintensitäten (B/B_0) der Proben betragen im Mittel $91 \% \pm 8 \%$ bei einer DNA-Kontaktdruck-Konzentration von 200 μM und $97 \% \pm 9 \%$ bei einer DNA-Kontaktdruck-Konzentration von 100 μM . Somit waren keine signifikanten Signalrückgänge aufgetreten und unspezifische Signalunterdrückungen bedingt durch die Realwasser-Matrix konnten ausgeschlossen werden.

Diese Voruntersuchung zeigte, dass Oberflächenwasser-Realproben direkt ohne weitere Probenaufbereitung (abgesehen von Abfiltrieren suspendierter Feststoffe) mit der neu entwickelten Methode analysiert werden können.

5.2.6 Ausblick: Gleichzeitige Durchführung von Tetracyclin-Rezeptor-Assay und Immunoassays für andere Antibiotika

Da das Messprotokoll für den Tetracyclin-Rezeptor-Assay auf der Basis der bereits etablierten indirekt kompetitiven Immunoassays für den Multiplex-Nachweis verschiedener Antibiotika in Milch [27] oder Honig [124] entwickelt wurde und sich nur durch die verlängerte und statische Inkubation der Probe auf dem Chip unterscheidet, sollten sich die Konzepte grundsätzlich kombinieren lassen. Ziel ist es, in Zukunft einen einzigen Mikroarray-Chip zur Verfügung zu haben, der mehrere Rezeptor- und Immunoassays parallel prozessieren kann.

Das kombinierte Assay-Prinzip ist in Abbildung 21 (Kapitel 5.2.1) schematisch dargestellt.

In einer Prinzipstudie wurde der Tetracyclin-Rezeptor-Assay mit den indirekt kompetitiven Immunoassays für das Sulfonamid SMA, das Beta-Lactam Nafcillin und das Makrolid Tylosin kombiniert. Neben den DNA-Oligonukleotiden wurden auch die genannten Antibiotika als Kompetitoren für die durchzuführenden Immunoassays in separaten Reihen auf dem Chip immobilisiert. Die entsprechenden Primärantikörper wurden zusammen mit TetR und der HRP-

5 Ergebnisse und Diskussion

markierte Sekundärantikörper gemischt mit Streptavidin-HRP vorgelegt. Die Messungen wurden mit Leitungswasser als Leerwertproben und mit dem für den Tetracyclin-Rezeptor-Assay optimierten Messprotokoll durchgeführt. Ein exemplarisches CL-Messbild zeigt Abbildung 29.

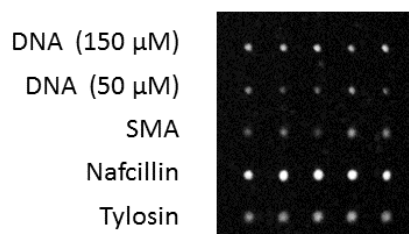


Abbildung 29. CL-Messbild der gleichzeitigen Durchführung des Tetracyclin-Rezeptor-Assays mit Immunoassays für drei weitere Antibiotika. Das Leerwertprobe-TetR/Primärantikörper-Gemisch wurde im Chip für 10 min bei 37 °C inkubiert und die folgenden Schritte der Messung wurden im MCR 3 bei 18 °C durchgeführt.

Für alle Reihen erschienen definierte Punkte mit Signalintensitäten in den Bereichen, die auch bei der alleinigen Durchführung des Tetracyclin-Rezeptor-Assays beziehungsweise der Immunoassays auftraten. Wurden die Reagenzien für den Tetracyclin-Rezeptor-Assay beziehungsweise die Immunoassays getrennt voneinander eingesetzt, so wurden nur bei den jeweils passenden Reihen CL-Signale detektiert. Somit konnte gezeigt werden, dass die Wechselwirkungen der immobilisierten DNA-Oligonukleotide mit TetR und die der Antikörper mit den immobilisierten Antibiotika grundsätzlich parallel funktionieren und keine unspezifischen Kreuzreaktionen auftreten.

Die Anwendbarkeit dieses Multiplex-Verfahrens ist durch eine detaillierte Studie zu belegen. Die notwendigen Mehrfach-Kalibrierungen und Wiederfindungsbestimmungen aller Assays sind jedoch sehr komplex und aufwendig, sodass dies Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein wird.

5.3 Aufkonzentrierung und Mikroarray-Immunoassay-basierter Nachweis von Sulfonamiden in Oberflächenwasser

Im dritten Teilprojekt dieser Arbeit wurde untersucht, ob und mit welchen Limitierungen eine Festphasenextraktion zur möglichst selektiven Aufkonzentrierung der Analyten aus Oberflächenwasser mit einer anschließenden Mikroarray-Immunoassay-Detektion kombiniert werden kann. Für die Experimente wurde die Gruppe der Sulfonamide verwendet, da diese in Umweltproben relevant sind (siehe Kapitel 3.2.6).

5.3.1 Chip-Belegung mit Sulfonamiden und Antikörper-Reaktivitäten

Die beiden Sulfonamide SMA und SDA sowie zwei Antikörper (anti-SMA und anti-SDA) mit einer hohen Selektivität für jeweils eines dieser beiden Antibiotika waren bereits in den etablierten Mikroarray zur Immunoassay-Detektion von diversen Antibiotika [27] integriert. Um eine größere Bandbreite an Sulfonamiden nachweisen zu können, sollten die aus der strukturellen Ähnlichkeit der Sulfonamide resultierenden Kreuzreaktivitäten systematisch untersucht und ausgenutzt werden. Dazu wurden weitere wichtige Vertreter der Sulfonamide auf den Mikroarray-Chip aufgebracht und ein dritter monoklonaler Antikörper (anti-Sulfonamid), der mit besonders vielen Sulfonamiden reagieren sollte, ergänzt.

Ein erstes Messbild eines Mikroarray-Chips mit sieben verschiedenen Sulfonamiden zeigt Abbildung 30. (Zur Orientierung sind die Namen der in dieser Arbeit verwendeten Sulfonamide neben den üblichen Abkürzungen angegeben.)

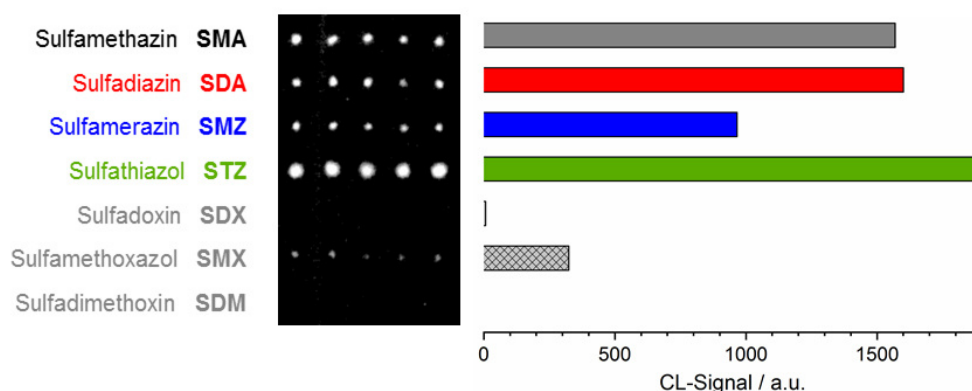


Abbildung 30. CL-Messbild und Signalintensitäten einer Leerwert-Messung mit einem Mikroarray-Chip, auf dem sieben verschiedene Sulfonamide nebeneinander aufgebracht worden waren.

5 Ergebnisse und Diskussion

Mit den bereits etablierten Sulfonamiden SMA und SDA sowie auch mit SMZ und STZ wurden gewohnt klar definierte Punkte erhalten, die sich deutlich vom Hintergrund abheben. Dahingegen zeigte die SMX-Reihe nur sehr schwache Signale und SDX sowie SDM waren gar nicht zu erkennen. Für diese drei Sulfonamide wurde daher angenommen, dass sie sich entweder nicht kovalent immobilisieren ließen oder aber das Epitop dabei jeweils so verändert wurde, dass es nicht mehr an den Antikörper binden konnte. Grundsätzlich wäre auch denkbar, dass alle drei eingesetzten Primärantikörper nur sehr geringe Affinitäten zu diesen Sulfonamiden haben. Dies erschien jedoch nicht wahrscheinlich und konnte bei späteren Kalibrierexperimenten mit Lösungen dieser Sulfonamide widerlegt werden (siehe Kapitel 5.3.3).

Aufgrund der bisherigen Erkenntnisse wurden im Folgenden Mikroarray-Chips mit Reihen von SMA, SDA, SMZ und STZ verwendet.

Um die unterschiedlichen Selektivitäten der Primärantikörper für die immobilisierten Sulfonamide zu untersuchen, wurden die Primärantikörper jeweils einzeln eingesetzt. Die erhaltenen Messbilder sind in Abbildung 31 dargestellt.

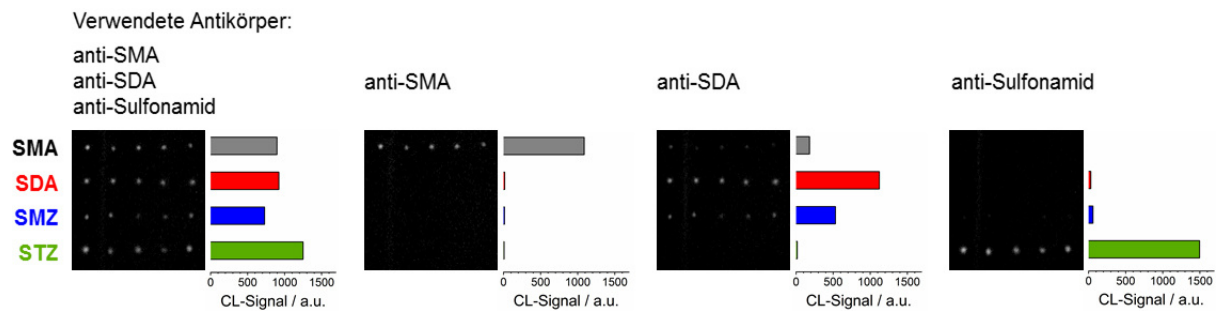


Abbildung 31. CL-Messbilder und Signalintensitäten von Leerwert-Messungen mit jeweils nur einem Primärantikörper im Vergleich zu einer Messung mit allen drei Primärantikörpern.

Der anti-SMA-Antikörper zeigte eine hohe Selektivität für SMA, gegen das er ursprünglich auch entwickelt worden war. Der anti-SDA-Antikörper hingegen wies sowohl zu SDA als auch zu SMZ hohe Affinitäten und zu SMA eine geringere Affinität auf. Der eigentlich auf eine möglichst umfassende Gruppenselektivität hin entwickelte anti-Sulfonamid-Antikörper band bei dieser Auswahl von immobilisierten Sulfonamiden nur an STZ.

Aufgrund dieser deutlich verschiedenen Selektivitäten der drei Primärantikörper war zu vermuten, dass abhängig von dem in einer Probe befindlichen Sulfonamid-Vertreter jeweils nur bei bestimmten Kontaktdruck-Reihen auf dem Mikroarray-Chip eine Verringerung der

Signalintensitäten durch Konkurrenz auftreten würde. Diese These wurde durch Kalibrierexperimente mit verschiedenen Sulfonamiden näher beleuchtet (siehe Kapitel 5.3.3).

5.3.2 Regenerierbarkeit

Zunächst wurde die Signalstabilität über 30 Leerwert-Messungen für die vier erfolgreich immobilisierten Sulfonamide STZ, SMA, SDA und SMZ untersucht. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 32.

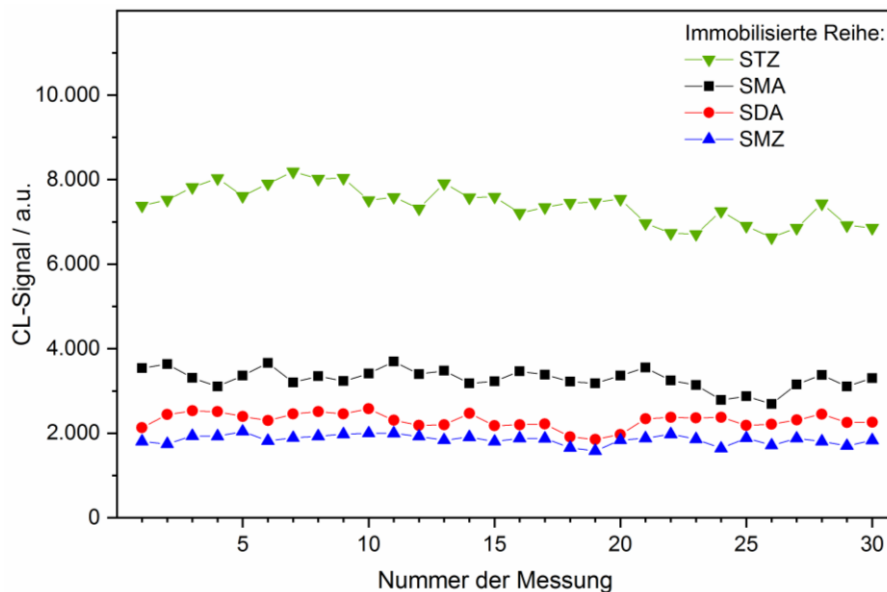


Abbildung 32. CL-Signalintensitäten von nacheinander auf demselben Chip durchgeführten Leerwert-Messungen 1 – 30. Da der Fokus hier auf der Beschreibung der allgemeinen Trends liegt, wurde die Messreihe nur einmal durchgeführt. Statistisch auftretende Signalschwankungen werden dadurch kompensiert, dass die Messpunkte jeweils den Mittelwert aus fünf äquivalenten Punkten darstellen, die auf dem Chip in einer Reihe immobilisiert waren.

Als Variationskoeffizienten der 30 Messungen wurden für die immobilisierten Reihen von STZ (grün) 6 %, SMA (schwarz) 7 %, SDA (rot) 8 % und SMZ (blau) 6 % berechnet. Der Mittelwert der Messungen 28 – 30 betrug für STZ und SMA jeweils noch 93 %, für SDA 98 % und für SMZ noch 97 % des Mittelwerts der Messungen 1 – 3. Somit zeigten alle immobilisierten Sulfonamide geringe Signalschwankungen und eine hohe Regenerierbarkeit.

5.3.3 Ermittlung von Kalibrierkurven mit verschiedenen Sulfonamiden

Mit jedem der sieben häufig verabreichten Sulfonamide SMA, SDA, SMZ, STZ, SDX, SMX und SDM wurden auf verschiedenen Mikroarray-Chips und an verschiedenen Messtagen insgesamt drei Kalibrierungen durchgeführt. Die jeweils mit den vier immobilisierten Sulfonamid-Reihen erhaltenen Kalibrierungen sind im Folgenden dargestellt. Der Fokus lag hierbei auf der Untersuchung, welche Sulfonamide in gelöster Form im relevanten Konzentrationsbereich von $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ bis $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ mit welchen immobilisierten Sulfonamiden überhaupt in Konkurrenz um die entsprechenden Primärantikörper treten, sodass sigmoidale Regressionskurven angepasst werden können. Daher wird auf eine genaue Angabe der erhaltenen Werte an dieser Stelle verzichtet.

Die Ergebnisse mit SMA-Kalibrierlösungen zeigt Abbildung 33.

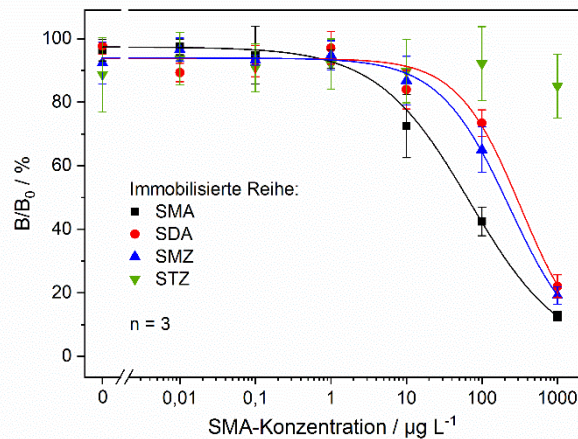


Abbildung 33. Sieben-Punkt-Kalibrierungen mit SMA-Lösungen, dargestellt als relative Signalintensitäten B/B_0 bezogen auf den jeweils höchsten Messwert einer Kalibrierreihe und mit sigmoidalen Regressionskurven (wo möglich).

Mit gelöstem SMA trat ein signifikanter Signalrückgang bei der Reihe mit immobilisiertem SMA (schwarz) bereits bei relativ niedrigen Konzentrationen im Vergleich zu den SDA- und SMZ-Kontaktdruck-Reihen (rot beziehungsweise blau) auf. Bei der STZ-Kontaktdruck-Reihe (grün) war dagegen auch mit sehr hohen SMA-Konzentrationen praktisch keine Verringerung der Signalintensität zu verzeichnen. Dies steht im Einklang mit den vorangegangenen Untersuchungen. So hatte sich gezeigt, dass insbesondere der anti-SMA-Antikörper eine hohe Selektivität für SMA hat und demnach zwischen gelöstem und immobilisiertem SMA (schwarz) eine Konkurrenz um anti-SMA stattfindet. Der anti-SDA-Antikörper hat hingegen eine höhere Selektivität für SDA und SMZ als für SMA, sodass bei den SDA- und SMZ-Kontaktdruck-Reihen (rot beziehungsweise blau) erst bei höheren SMA-Konzentrationen in

5 Ergebnisse und Diskussion

den Kalibrierlösungen eine Signalverringering auftrat. Der anti-Sulfonamid-Antikörper, der bevorzugt an die STZ-Kontaktdruck-Reihe (grün) bindet, weist hingegen praktisch keine Affinität für SMA auf, sodass hier auch keine Konkurrenz zu beobachten war.

Somit kann SMA am nachweisstärksten mit der SMA-Kontaktdruck-Reihe gemessen werden. Mit SDA- und SMZ-Kalibrierlösungen wurden zueinander sehr ähnliche Ergebnisse erhalten. Daher werden diese in Abbildung 34 gemeinsam dargestellt.

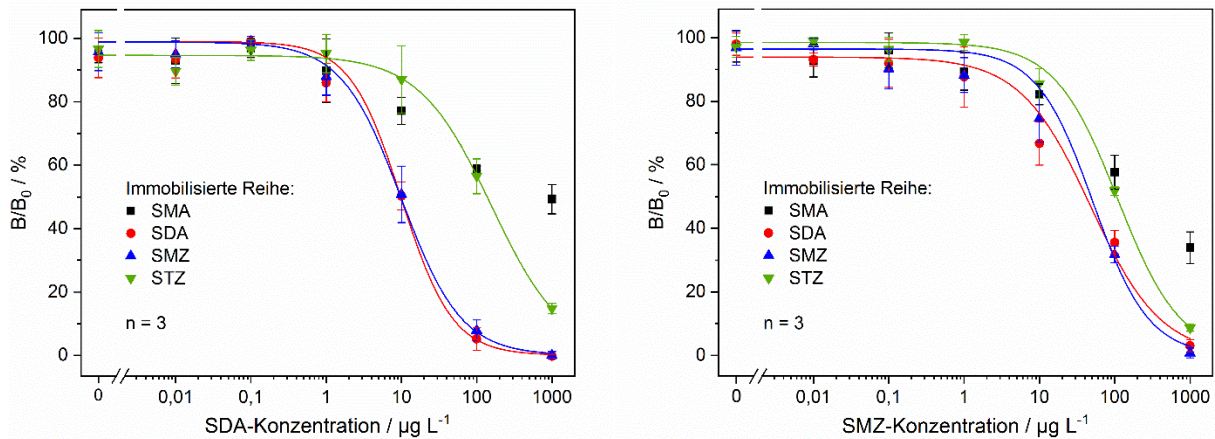


Abbildung 34. Sieben-Punkt-Kalibrierungen mit SDA-Lösungen (links) und SMZ-Lösungen (rechts), dargestellt als relative Signalintensitäten B/B_0 bezogen auf den jeweils höchsten Messwert einer Kalibrierreihe und mit sigmoidalen Regressionskurven (wo möglich).

Da der anti-SDA-Antikörper eine hohe Affinität sowohl zu SDA als auch zu SMZ hat, trat bei den SDA- und SMZ-Kontaktdruck-Reihen (rot beziehungsweise blau) die Konkurrenz bereits bei vergleichsweise niedrigen SDA- oder SMZ-Konzentrationen in den Kalibrierlösungen in Erscheinung. Für die STZ-Kontaktdruck-Reihe (grün) war ein signifikanter Signalfall erst bei deutlich höheren SDA- oder SMZ-Konzentrationen zu beobachten. Die Signalintensitäten der SMA-Kontaktdruck-Reihe (schwarz) nahmen aufgrund der gezeigten hohen Selektivität des anti-SMA-Antikörpers für SMA schließlich erst bei sehr hohen SDA- oder SMZ-Konzentrationen etwas ab.

Somit eignen sich für die Messung von SDA und SMZ die entsprechenden Kontaktdruck-Reihen gleichermaßen am besten, wobei SDA und SMZ allerdings nicht unterschieden werden können.

Die Ergebnisse der Kalibrierungen mit STZ-Lösungen zeigt Abbildung 35.

5 Ergebnisse und Diskussion

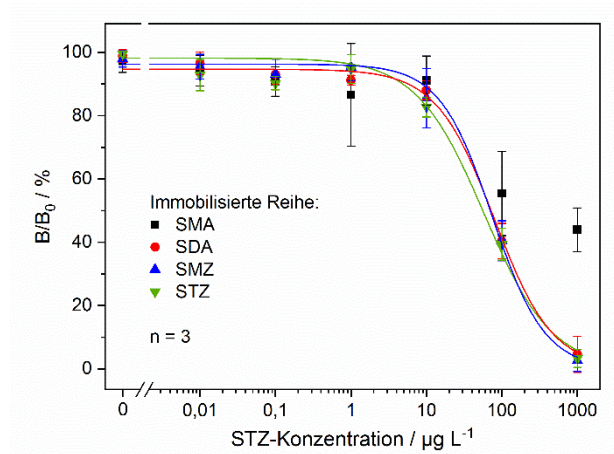


Abbildung 35. Sieben-Punkt-Kalibrierungen mit STZ-Lösungen, dargestellt als relative Signalintensitäten B/B_0 bezogen auf den jeweils höchsten Messwert einer Kalibrierreihe und mit sigmoidalen Regressionskurven (wo möglich).

Da der anti-Sulfonamid-Antikörper – wie in Kapitel 5.3.1 gezeigt – eine hohe Affinität zu STZ hat, findet im relevanten Konzentrationsbereich zwischen gelöstem und immobilisiertem STZ (grün) eine Konkurrenz um den Antikörper statt. Annähernd deckungsgleiche Kalibrierkurven wurden mit den SDA- und SMZ-Kontaktdruck-Reihen (rot beziehungsweise blau) erhalten, obwohl der anti-SDA-Antikörper, der für diese beiden Sulfonamide eine hohe Affinität aufweist, nicht an das immobilisierte STZ gebunden hatte (siehe Kapitel 5.3.1). Daraus lässt sich schließen, dass der anti-SDA-Antikörper jedoch durchaus affin zu gelöstem STZ ist. Die SMA-Kontaktdruck-Reihe (schwarz) zeigt wie erwartet erst bei hohen STZ-Konzentrationen eine gewisse Signalverringerng, da der anti-SMA-Antikörper keine hohe Affinität zu STZ hat. Für die Messung von STZ sind somit die Kontaktdruck-Reihen von SDA, SMZ und STZ gleichermaßen geeignet.

Die Ergebnisse der Kalibrierungen mit SDX-Lösungen sind in Abbildung 36 dargestellt.

5 Ergebnisse und Diskussion

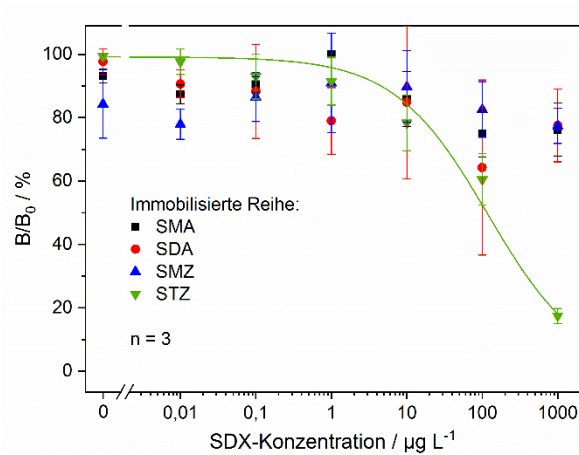


Abbildung 36. Sieben-Punkt-Kalibrierungen mit SDX-Lösungen, dargestellt als relative Signalintensitäten B/B_0 bezogen auf den jeweils höchsten Messwert einer Kalibrierreihe und mit sigmoidalen Regressionskurven (wo möglich).

Gelöstes SDX bewirkte nur bei der STZ-Kontaktdruck-Reihe (grün) eine Signalverringering durch Konkurrenz um den anti-Sulfonamid-Antikörper, jedoch auch erst bei vergleichsweise hohen Konzentrationen. Mit den anderen Antikörpern und Kontaktdruck-Reihen waren praktisch keine relevanten Wechselwirkungen festzustellen, da der anti-SMA- und der anti-SDA-Antikörper offenbar nicht affin zu SDX sind.

Somit kann für die Messung von SDX nur die STZ-Kontaktdruck-Reihe herangezogen werden. Mit SMX- und SDM-Kalibrierlösungen wurden zueinander sehr ähnliche Ergebnisse erhalten. Daher werden diese in Abbildung 37 gemeinsam dargestellt.

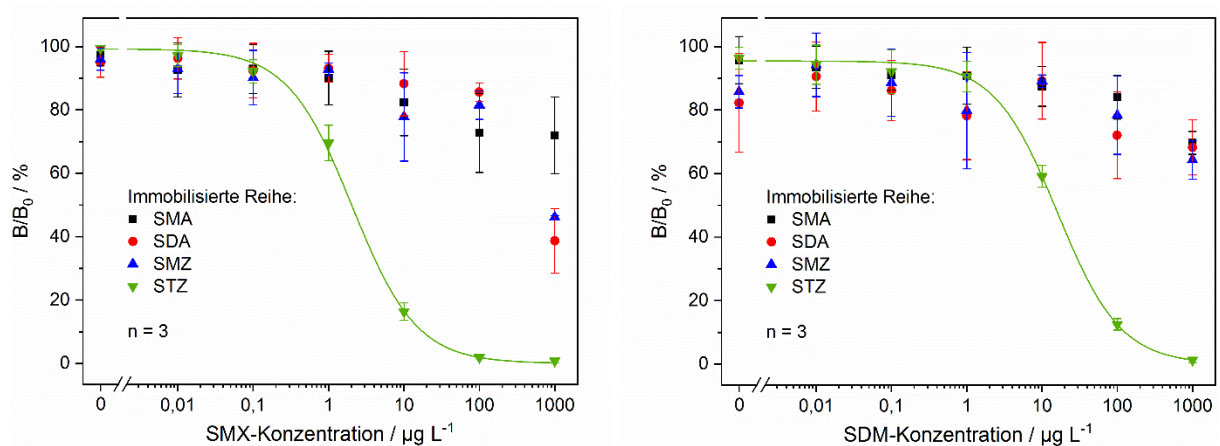


Abbildung 37. Sieben-Punkt-Kalibrierungen mit SMX-Lösungen (links) und SDM-Lösungen (rechts), dargestellt als relative Signalintensitäten B/B_0 bezogen auf den jeweils höchsten Messwert einer Kalibrierreihe und mit sigmoidalen Regressionskurven (wo möglich).

Auch bei den Kalibrierungen mit SMX- und SDM-Lösungen wurden nur mit der STZ-Kontaktdruck-Reihe (grün) sigmoidale Regressionskurven erhalten. Dabei trat eine Signalverringering mit SMX schon bei vergleichsweise niedrigen Konzentrationen auf, was auf eine besonders hohe Affinität des anti-Sulfonamid-Antikörpers zu SMX hindeutet. Bei den anderen Kontaktdruck-Reihen war erst mit sehr hohen SMX- oder SDM-Konzentrationen eine geringe Signalabnahme messbar, sodass zu konstatieren ist, dass der anti-SMA- und der anti-SDA-Antikörper nur eine sehr geringe Affinität zu SMX und SDM aufweisen.

Diese beiden Sulfonamide können also nur mit der STZ-Kontaktdruck-Reihe gemessen werden.

5.3.4 Vorversuche zur Extraktion mittels SPE-Säule

Ausgehend von den bisherigen mit Leitungswasser erzielten Ergebnissen sollten nun Untersuchungen mit Oberflächenwasser-Realproben durchgeführt werden. Da die Antibiotika-Konzentrationen in belasteten Gewässern sehr gering sind, ist eine Aufkonzentrierung erforderlich. Oberflächenwasser enthält jedoch verschiedene typische Matrixbestandteile wie Huminsäuren, die die Mikroarray-Detektion stören könnten. Somit muss eine Methode zur Probenvorbereitung gefunden werden, die sowohl eine Abtrennung der störenden Matrix als auch eine möglichst selektive Aufkonzentrierung der Analyten gewährleistet. In verschiedenen Studien [66, 72, 121] wurde das Säulenmaterial HLB (*hydrophilic-lipophilic balance*) für die SPE von Sulfonamiden erfolgreich eingesetzt; daher wurde es auch für diese Arbeit erprobt.

Grundlegende Voraussetzung für eine erfolgreiche SPE ist einerseits eine möglichst vollständige Adsorption des Analyten an das Sorbens im Schritt der Beladung. Andererseits sollte der Analyt im Elutionsschritt mit einer definierten (kleinen) Menge eines geeigneten Lösungsmittels quantitativ desorbiert werden.

Da für die SPE das Elutionsmittel Methanol verwendet wurde, wäre es grundsätzlich von Vorteil, wenn die anschließende Mikroarray-Immunoassay-Messung direkt mit diesem Medium durchgeführt werden könnte. Somit wurden Leerwert-Messungen mit unterschiedlichen Wasser/Methanol-Gemischen durchgeführt. Für den Test wurden Mikroarray-Chips mit Reihen von immobilisiertem SMA und SDA verwendet. Abbildung 38 zeigt die Signalintensitäten von Leerwert-Messungen in Abhängigkeit von dem Verhältnis der Lösungsmittel Wasser und Methanol zueinander.

5 Ergebnisse und Diskussion

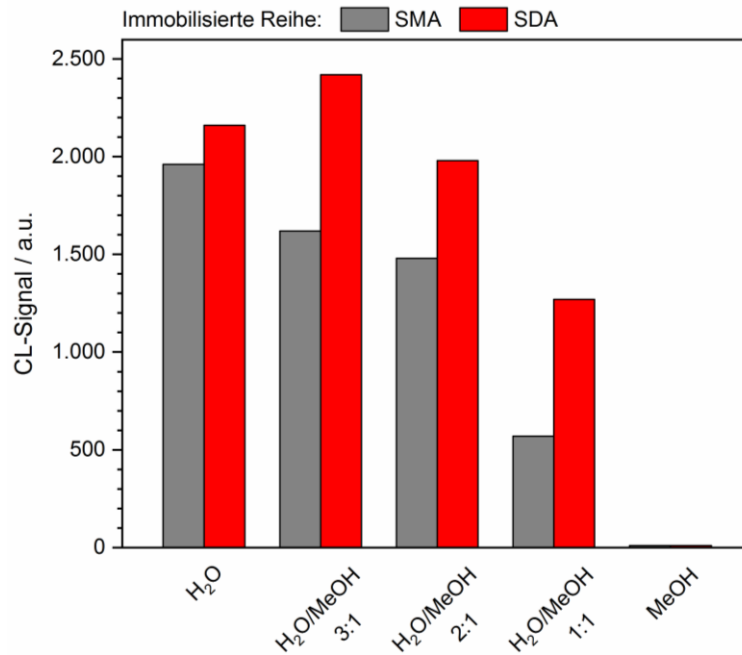


Abbildung 38. Abhängigkeit der Signalintensität vom MeOH-Gehalt der Leerwertprobe. Da der Fokus hier auf der Beschreibung der allgemeinen Trends liegt, wurde die Messreihe nur einmal durchgeführt. Statistisch auftretende Signalschwankungen werden dadurch kompensiert, dass die Messpunkte jeweils den Mittelwert aus fünf äquivalenten Punkten darstellen, die auf dem Chip in einer Reihe immobilisiert waren.

Daraus geht hervor, dass die Signalintensitäten mit steigendem Methanol-Anteil deutlich abnehmen. Eine Messung in reinem Methanol wäre nicht möglich, da hier keine vom Hintergrund unterscheidbaren Signale erhalten wurden. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Antikörper durch einen hohen Methanol-Gehalt denaturiert werden und eine Bindung an die Antigene dadurch nicht mehr möglich ist.

Da eine hohe Signalintensität bei den Leerwert-Messungen eine Voraussetzung für einen sensitiven Mikroarray ist, wären auch Messungen bei einem Methanol-Anteil von mehr als 1:2 nicht zielführend. Dies würde jedoch bedeuten, dass die Aufkonzentrierung der SPE mindestens um den Faktor 3 reduziert würde, wenn das methanolische Eluat mit wenigstens der doppelten Menge Reinstwasser verdünnt werden müsste.

Um zunächst die grundsätzliche Eignung von HLB-Säulen für die Extraktion von Sulfonamiden zu überprüfen, wurden Wiederfindungsexperimente durchgeführt. Dafür wurden Lösungen der beiden Sulfonamide SMA und SDA (in Reinstwasser) extrahiert und jeweils die Konzentrationen der beiden Stoffe in Durchlauf und Eluat bestimmt. Zudem wurde die Elution gestaffelt in Schritten von je 1 mL bei einer Gesamtmenge von 4 mL vorgenommen, um Elutionsprofile zu erstellen. Es wurden jeweils drei Proben mit Konzentrationen von je 5 µg L⁻¹ oder 10 µg L⁻¹ SMA und SDA in 50 mL Leitungswasser untersucht.

5 Ergebnisse und Diskussion

Die Gehalte der beiden Sulfonamide in Durchlauf und Eluatfraktionen wurden mit entsprechend kalibrierten Mikroarrays bestimmt.

In Reinstwasser betragen die Nachweisgrenzen für SMA $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ und für SDA $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$. In den Durchlauf-Proben wurden damit keine Sulfonamid-Gehalte nachgewiesen, was unter Berücksichtigung der Nachweisgrenzen bedeutet, dass weniger als 10 % bezogen auf die Ausgangskonzentration von $5 \mu\text{g L}^{-1}$ oder sogar weniger als 5 % bezogen auf die Ausgangskonzentration von $10 \mu\text{g L}^{-1}$ der Sulfonamide nicht von der Säule zurückgehalten wurden. Dies wurde durch die Messungen der Eluate bestätigt (siehe Tabelle 7).

Abbildung 39 zeigt die Elutionsprofile vom ersten bis zum vierten Milliliter der Elution.

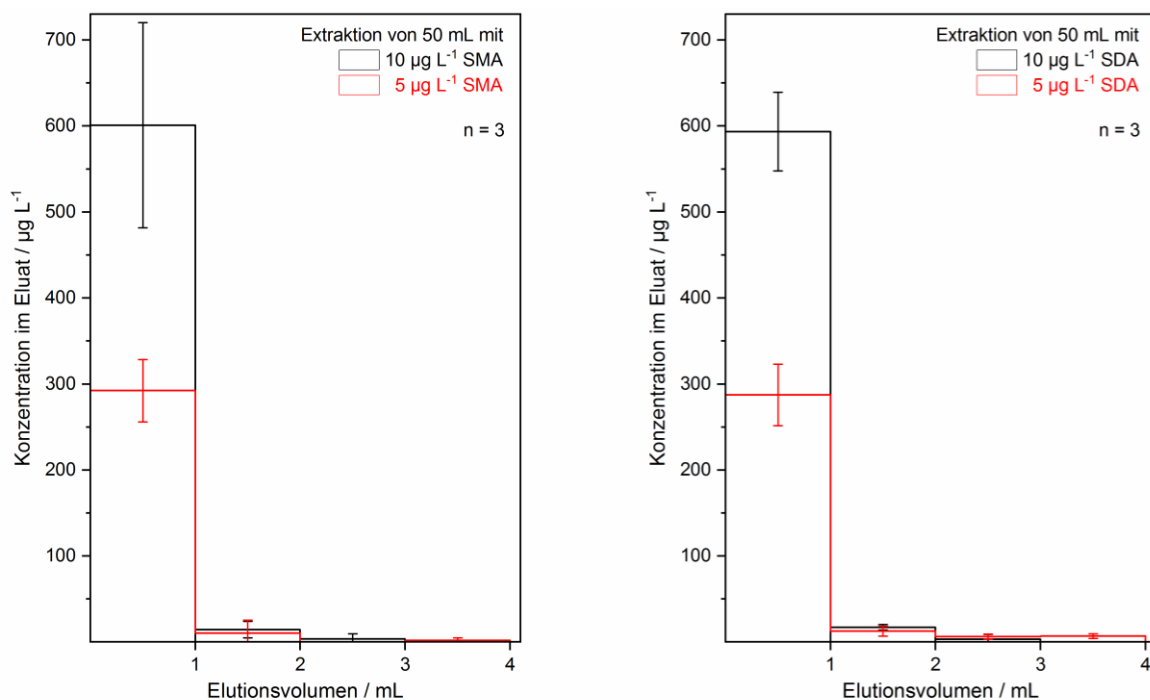


Abbildung 39. Elutionsprofile der Extraktionen von SMA und SDA (aus je 50 mL Reinstwasser mit $5 \mu\text{g L}^{-1}$ oder $10 \mu\text{g L}^{-1}$, Elution mit 4 mL Methanol in Fraktionen zu je 1 mL). Die Kalibrierungen wurden in $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (2:1) durchgeführt; die erste Eluatfraktion wurde dazu jeweils mit sechs Teilen H_2O und zwei Teilen MeOH versetzt, um Messwerte im Arbeitsbereich zu erhalten, und die zweiten bis vierten Eluatfraktionen wurden nur mit zwei Teilen H_2O verdünnt.

Bei Betrachtung der Elutionsprofile fällt auf, dass die Elution bereits nach der ersten 1-mL-Fraktion annähernd vollständig erfolgt war. Ab den zweiten Fraktionen wurden die Bestimmungsgrenze ($70 \mu\text{g L}^{-1}$ für SMA und $29 \mu\text{g L}^{-1}$ für SDA) oder sogar die Nachweisgrenze ($24 \mu\text{g L}^{-1}$ für SMA und $14 \mu\text{g L}^{-1}$ für SDA) unterschritten. Daher sind die hierfür gezeigten Konzentrationen nicht als tatsächliche Werte anzusehen, sondern dienen nur

5 Ergebnisse und Diskussion

der Veranschaulichung, dass ab den zweiten Fraktionen praktisch kein SMA und SDA mehr enthalten waren.

Als Konsequenz dieser Untersuchung wurde das Elutionsvolumen in den nachfolgenden Experimenten auf 2 mL reduziert.

Die ermittelten Wiederfindungen in der jeweils ersten Eluatfraktion sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7. Wiederfindungen der Extraktion von SMA und SDA aus je 50 mL Ausgangslösung in der jeweils ersten Eluatfraktion (1 mL). Die Kalibrierungen wurden in H₂O/MeOH (2:1) durchgeführt und die ersten Eluatfraktionen entsprechend mit sechs Teilen H₂O und zwei Teilen MeOH verdünnt, um Messwerte im Arbeitsbereich zu erhalten.

	SMA		SDA	
Ausgangskonzentration / $\mu\text{g L}^{-1}$	10	5	10	5
Wiederfindung / %	120 ± 24 (n = 3)	117 ± 7 (n = 3)	119 ± 9 (n = 3)	115 ± 7 (n = 3)

Die Messungen ergaben für die untersuchten Sulfonamide bei beiden Ausgangskonzentrationen eine Wiederfindung von etwas mehr als 100 %. Dies kann vermutlich damit erklärt werden, dass infolge des eingesetzten Unterdrucks bei der Elution ein kleiner Teil des Methanol-Volumens verdampft wurde und dadurch eine leicht erhöhte Aufkonzentrierung gegenüber dem theoretischen Wert erfolgte.

Jedenfalls kann davon ausgegangen werden, dass die Wiederfindungsraten im Bereich von 100 % liegen und eine weitestgehend quantitative Extraktion und Elution der Sulfonamide mit den HLB-Säulen erreicht wurde.

Wegen der für die Mikroarray-Immunoassay-Messung notwendigen Verdünnung des Eluats mit der doppelten Menge Reinstwasser und der möglichen Verflüchtigung eines Teils des Methanols wurde entschieden, die methanolischen Eluate vor der Mikroarray-Messung im Stickstoffstrom vollständig einzudampfen und die Rückstände in Reinstwasser mit einem definierten Volumen wieder aufzunehmen. Auf diese Weise wurden alle folgenden Messungen durchgeführt.

5.3.5 Störung der Mikroarray-Immunoassay-Messung durch (aufkonzentrierte) Matrixbestandteile

Da Oberflächenwasser eine Vielzahl von Substanzen beinhaltet darstellt, ist es grundsätzlich denkbar, dass die Mikroarray-Immunoassay-Messungen durch Matrixbestandteile gestört werden, insbesondere falls diese durch die SPE mit aufkonzentriert werden. Daher wurde die SPE zunächst mit verschiedenen Volumina einer Sulfonamid-freien Oberflächenwasser-Probe des Flusses Würm durchgeführt, um zu untersuchen, ob mit zunehmender Matrixmenge, die durch die SPE-Säule geleitet wird, eine Verringerung der Leerwert-Signalintensitäten in der Mikroarray-Messung zu verzeichnen ist. Die Ergebnisse, die mit Oberflächenwasser des Flusses Würm erhalten wurden, zeigt Abbildung 40.

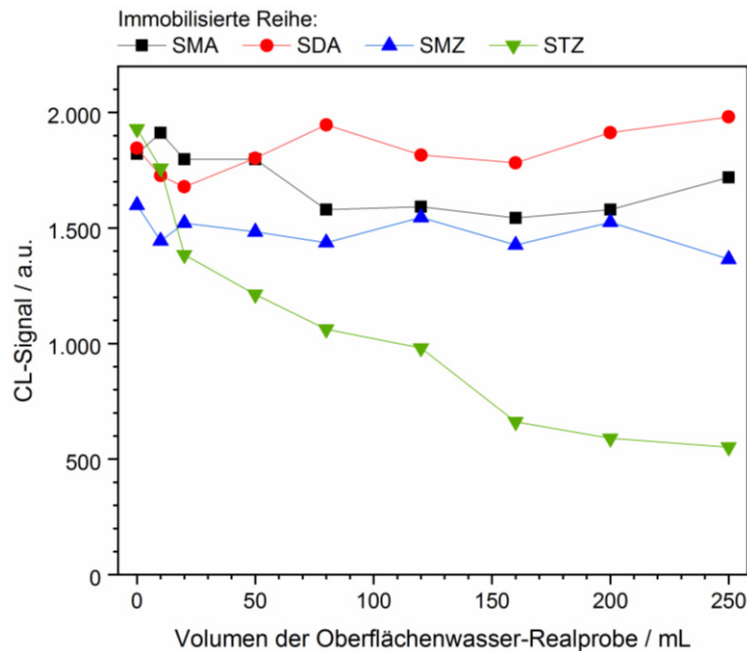


Abbildung 40. Einfluss des für die SPE eingesetzten Volumens der Oberflächenwasser-Realprobe (hier: Würm) auf die Signalintensitäten von Leerwert-Messungen. Die methanolischen Eluate (2 mL) wurden im Stickstoffstrom eingedampft und in 2 mL Reinstwasser wieder aufgenommen. Da der Fokus hier auf der Beschreibung der allgemeinen Trends liegt, wurde die Messreihe nur zweimal durchgeführt und die Mittelwerte sind dementsprechend ohne Standardabweichungen dargestellt.

Während die Signalintensitäten bei den immobilisierten Reihen von SMA, SDA und SMZ konstant blieben, verringerten sie sich für STZ mit zunehmendem Probenvolumen, das für die SPE eingesetzt wurde, deutlich. Das scheint darauf zurückzuführen zu sein, dass Matrixbestandteile (wahrscheinlich Huminsäuren) die Wechselwirkung zwischen dem anti-Sulfonamid-Antikörper und dem immobilisierten STZ besonders stören und diese gleichzeitig

5 Ergebnisse und Diskussion

durch die HLB-Säule mit aufkonzentriert werden. Je größer das für die SPE eingesetzte Probenvolumen also ist, desto mehr störende Matrixbestandteile finden sich letztlich im Eluat. Sinnvolle Volumina für die SPE sind jedoch mindestens 50 mL oder besser 100 mL, um bei einem Extrakt-Volumen von 2 mL einen Aufkonzentrierungsfaktor von 25 beziehungsweise 50 zu erreichen. Daher wurden andere kommerziell erhältliche SPE-Säulen getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 41 dargestellt.

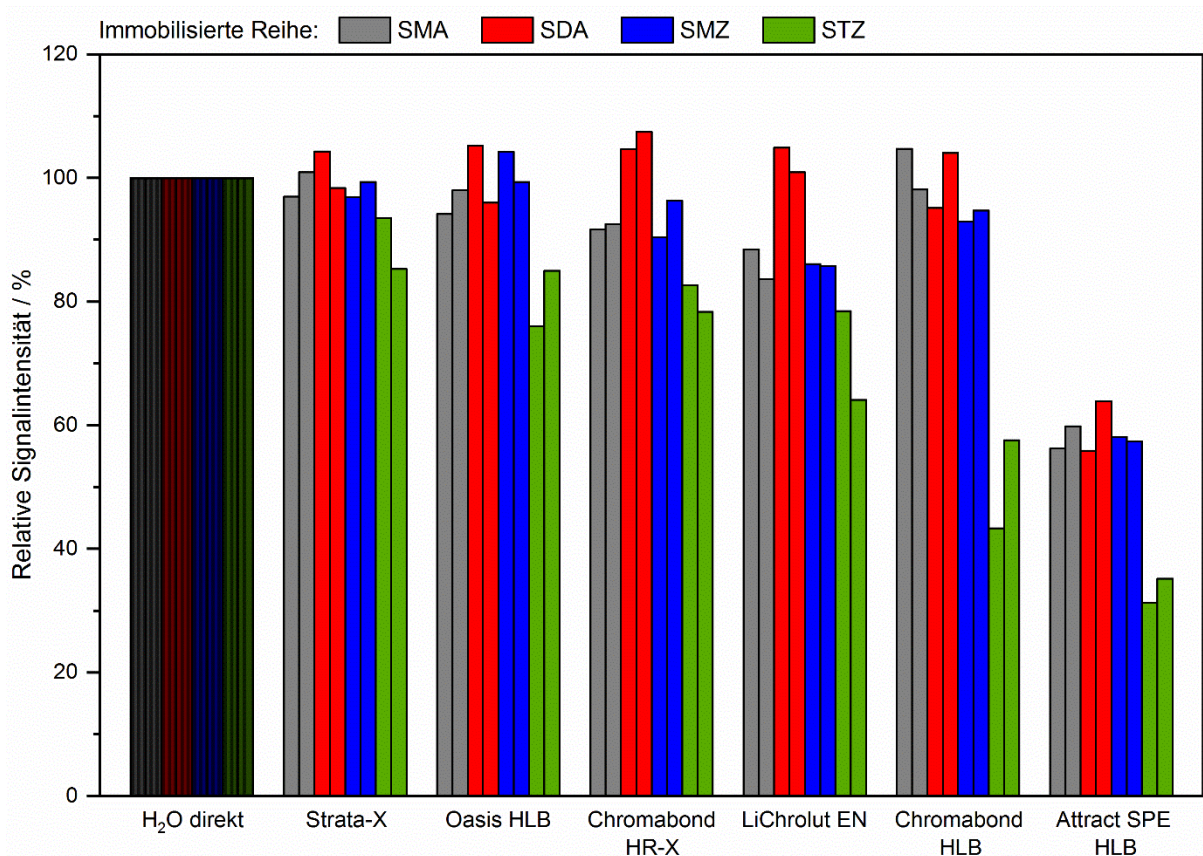


Abbildung 41. Einfluss der für die SPE von 100 mL Oberflächenwasser (hier: Würm) eingesetzten Säule auf die Signalintensitäten von Leerwert-Messungen. Die methanolischen Eluate wurden im Stickstoffstrom eingedampft und in Reinstwasser wieder aufgenommen. Zu sehen sind die relativen Signalintensitäten (in Doppelbestimmung) bezogen auf die direkte Leerwert-Messung von Reinstwasser (ohne SPE).

Bei der STZ-Kontaktdruck-Reihe traten bei allen getesteten Säulen im Vergleich zu direkt gemessenem Reinstwasser Signalverluste auf. Für die anderen Kontaktdruck-Reihen waren hingegen nur mit der Säule Attract SPE HLB signifikant verringerte Signalintensitäten zu verzeichnen. Insgesamt wurden mit den Säulen Strata-X und Oasis HLB die geringsten Signalbeeinflussungen festgestellt. Somit wurde einerseits der Einsatz der Säule Oasis HLB für die Sulfonamid-Extraktion beibehalten, andererseits sollte ein Ansatz erprobt werden, um die störenden Matrixbestandteile vor der Mikroarray-Messung abzutrennen.

5.3.6 Entwicklung einer Methode zur Aufkonzentrierung von Sulfonamiden und Abtrennung von störenden Matrixbestandteilen

In Arbeiten anderer Autoren wurde bereits der Einsatz einer zusätzlichen Säule etabliert, die die vorhandenen Huminstoffe extrahiert, während die Sulfonamide die Säule unbeeinflusst passieren [121, 125]. Da im neutralen pH-Bereich Huminsäuren zumeist negativ und Sulfonamide überwiegend positiv geladen sind, wurde die Säule Strata SAX (*strong anion exchange*) von Phenomenex als bewährt starker Anionenaustauscher eingesetzt.

Für die Versuche wurde zunächst Wasser aus dem Funtensee verwendet, da hiermit sogar ohne Aufkonzentrierung bereits Signalverringierungen bei allen Sulfonamid-Kontaktdruck-Reihen zu verzeichnen waren, was auf einen hohen Gehalt an störenden Matrixbestandteilen hindeutet. So wurde zunächst getestet, ob das Durchleiten der Realwasser-Probe durch die SAX-Säule eine Erhöhung der Signalintensitäten bewirkt. Daraufhin wurden verschiedene Kombinationen aus SAX- und HLB-Einsatz erprobt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 42 dargestellt. Da die immobilisierten Reihen von SMA, SDA und SMZ jeweils sehr ähnliche relative Signalintensitäten aufwiesen, sind diese in einem Diagramm zusammengefasst.

5 Ergebnisse und Diskussion

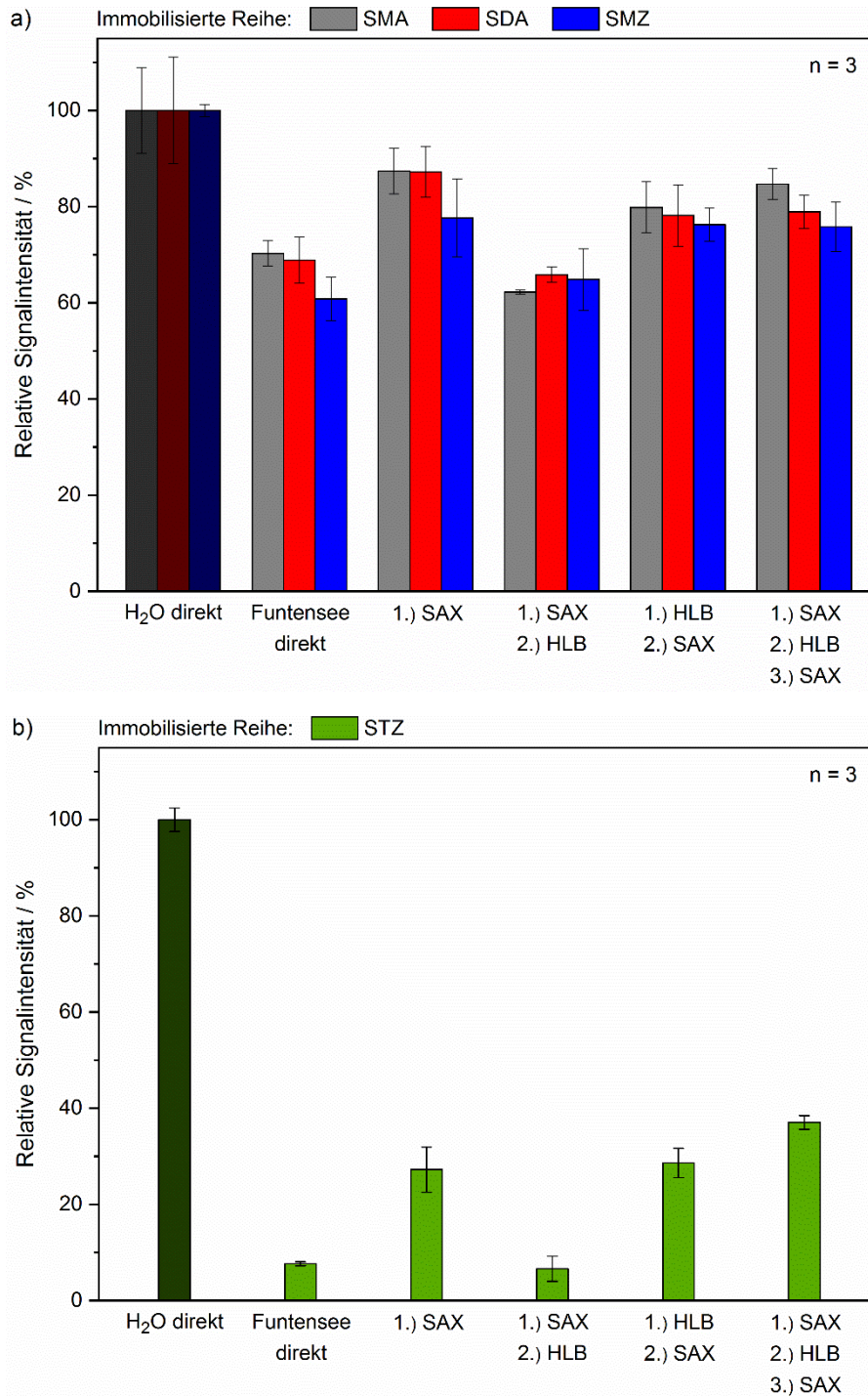


Abbildung 42. Test verschiedener Kombinationen der Säulen HLB und SAX mit Oberflächenwasser (hier: Funtensee). Dargestellt sind die relativen Signalintensitäten der immobilisierten Reihen von SMA, SDA und SMZ (a) beziehungsweise STZ (b) bezogen auf eine direkte Leerwert-Messung von Reinstwasser. Im HLB-Schritt wurden jeweils 20 mL auf 2 mL aufkonzentriert, sodass der Gehalt der Matrixbestandteile dabei maximal um den Faktor 10 gesteigert wurde.

Die Messung des lediglich zur Entfernung großer Partikel vorfiltrierten Funtensee-Wassers zeigte teils erhebliche Signalverringernungen bezogen auf direkt gemessenes Reinstwasser,

5 Ergebnisse und Diskussion

insbesondere bei der STZ-Reihe. Eine Aufreinigung mittels SAX bewirkte deutliche Erhöhungen der Signalintensitäten. Wurde die Wasserprobe nach der SAX-Behandlung mittels HLB um den Faktor 10 aufkonzentriert, resultierten wiederum deutlich niedrigere Signalintensitäten. Eine umgekehrte Ausführung der beiden Schritte (erst HLB-Aufkonzentrierung, dann SAX-Aufreinigung) führte hingegen zu signifikant höheren Signalintensitäten, die durch die präparativ aufwendigste Abfolge SAX – HLB – SAX nur noch geringfügig gesteigert werden konnte.

Somit wurde für die folgenden Experimente eine kombinierte Methode aus Aufkonzentrierung mittels HLB-Säule und Aufreinigung mittels SAX-Säule erprobt (siehe Abbildung 43).

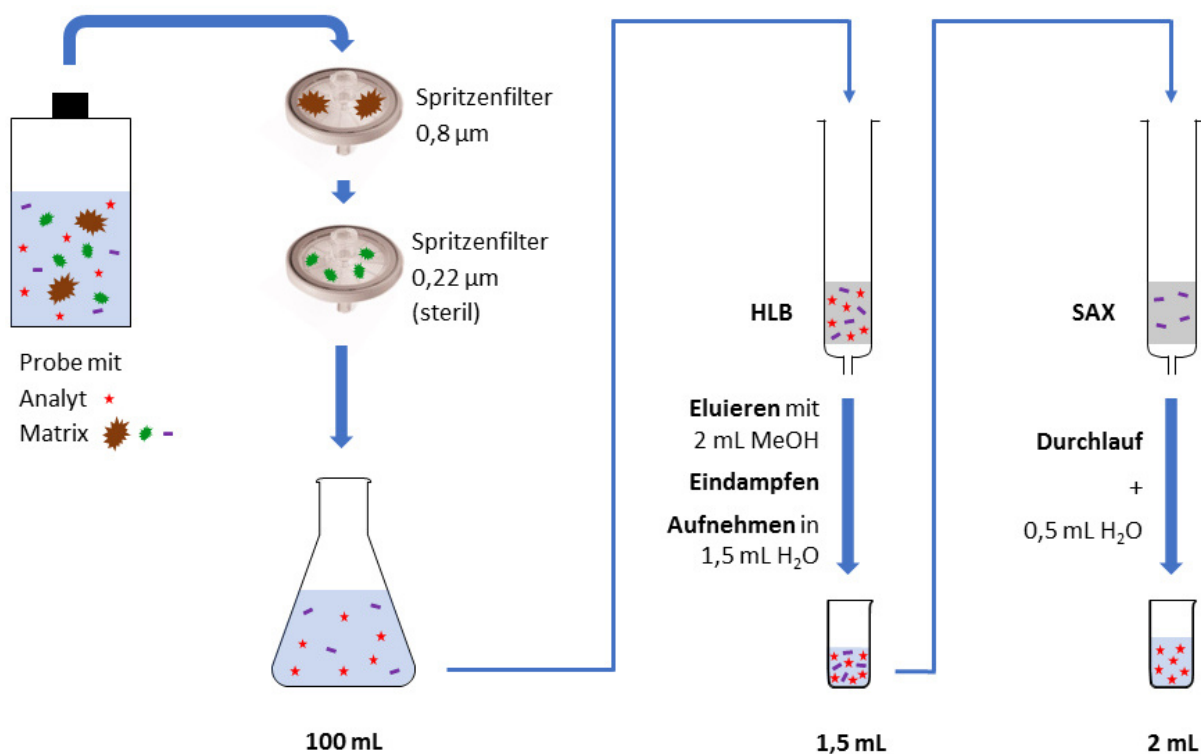


Abbildung 43. Kombinierte Methode aus Aufkonzentrierung mittels HLB-Säule und Aufreinigung des Extraktes mittels SAX-Säule.

Dazu wurde die Oberflächenwasser-Probe zunächst mithilfe von zwei Spritzenfiltern der Porengrößen 0,8 µm und 0,22 µm von groben Bestandteilen befreit. Je 100 mL einer Probe wurden mittels HLB-Säule extrahiert, wobei die Elution mit 2 mL Methanol erfolgte. Nach Eindampfen des Extraktes wurde dieser in 1,5 mL Reinstwasser aufgenommen und durch eine SAX-Säule geleitet. Der auf diese Weise aufgereinigte Durchlauf (1,5 mL) wurde aufgefangen und mit dem anschließend durch die SAX-Säule geleiteten Washwasser (0,5 mL) vereinigt.

5 Ergebnisse und Diskussion

Insgesamt ging mit dieser Methode also eine Aufkonzentrierung von 100 mL auf 2 mL einher, was einem Faktor von 50 entspricht.

Der Einfluss der SAX-Säule wurde anhand von anderen Gewässern weitergehend untersucht. Die Ergebnisse der Proben von Würm, Hohlohsee und Forellenbach sind in Abbildung 44 dargestellt.

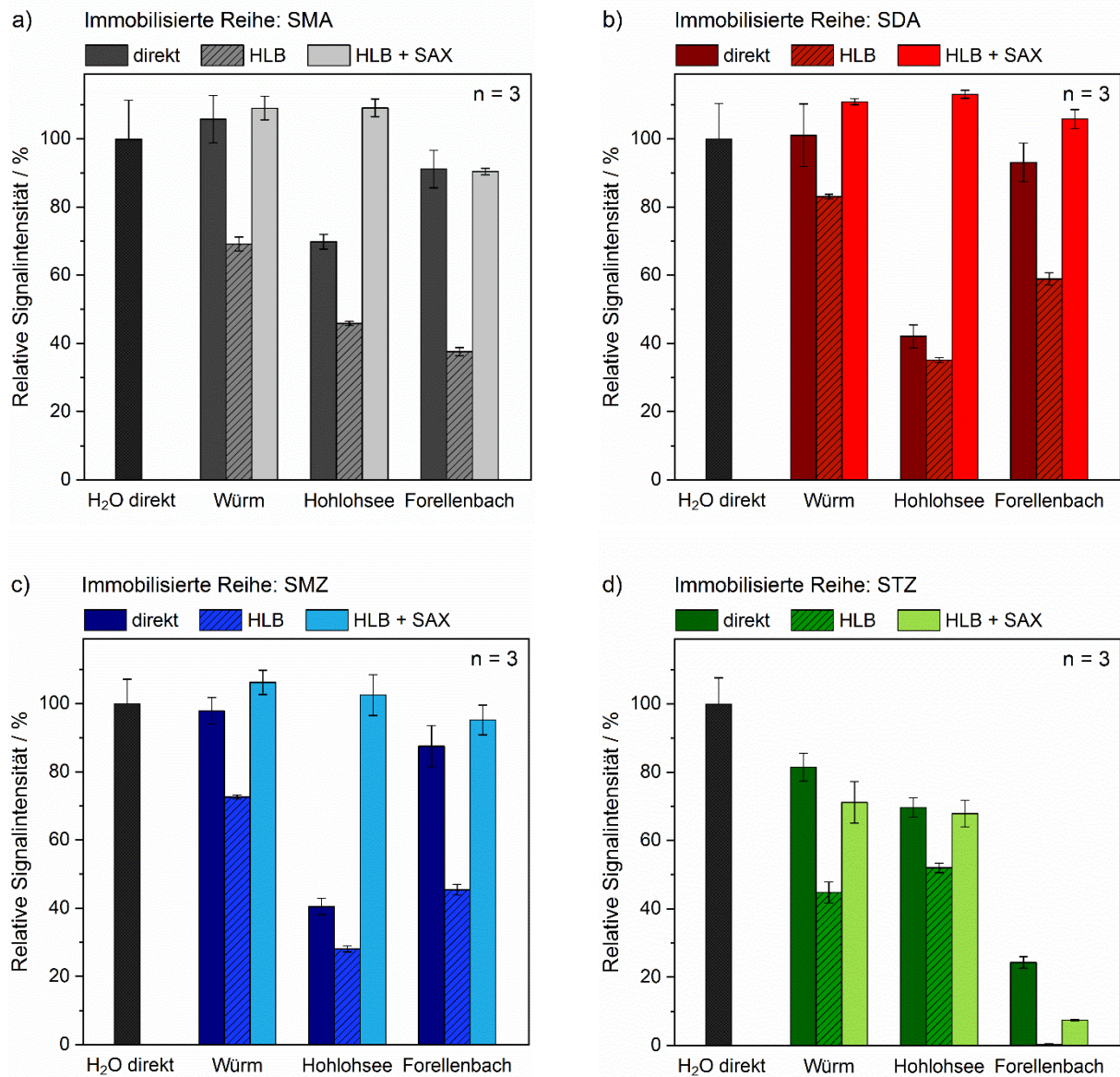


Abbildung 44. Einfluss der Säulen HLB und SAX auf die Leerwert-Signalintensitäten von verschiedenen Oberflächenwasser-Proben (hier: Würm, Hohlohsee und Forellenbach). Dargestellt sind die relativen Signalintensitäten der immobilisierten Reihen von SMA (a), SDA (b), SMZ (c) und STZ (d) jeweils bezogen auf eine direkte Leerwert-Messung von Reinstwasser (ohne HLB und SAX). Im HLB-Schritt wurden jeweils 100 mL auf 2 mL aufkonzentriert, sodass der Gehalt der Matrixbestandteile dabei maximal um den Faktor 50 gesteigert wurde.

Die untersuchten Proben der drei Oberflächengewässer wiesen deutliche Unterschiede auf. Während mit direkt gemessenem Würm-Wasser nur bei der STZ-Reihe eine um knapp 20 % geringere Signalintensität im Vergleich zu Reinstwasser zu verzeichnen war, zeigte der Forellenbach hier bereits einen Signalverlust von mehr als 70 %. Das moorige Hohlohsee-Wasser mit hohem Huminstoff-Gehalt führte dagegen bei allen Sulfonamid-Reihen zu deutlichen Signalverlusten von etwa 30 % bei SMA und STZ sowie mehr als 50 % bei SDA und SMZ.

Durch die HLB-Aufkonzentrierung um den Faktor 50 wurden die relativen Signalintensitäten von allen Oberflächenwasser-Proben und bei sämtlichen Sulfonamid-Reihen deutlich verringert, bis zu einem totalen Signalverlust der STZ-Reihe mit Forellenbach-Wasser.

Die Aufreinigung der Extrakte mittels SAX konnte die Signalintensitäten der immobilisierten Reihen von SMA, SDA und SMZ bei allen analysierten Gewässern auf das Niveau von direkt gemessenem Reinstwasser erhöhen und somit die Störung durch Matrixbestandteile effektiv beseitigen. Lediglich die STZ-Kontaktdruck-Reihe zeigte nach der SAX-Behandlung der Proben noch eine Verringerung der Signalintensitäten von etwa 30 % mit Würm und Hohlohsee und sogar 90 % mit Forellenbach. Da mittels HPLC-MS als Referenz-Methode nachgewiesen wurde, dass die hier verwendeten Oberflächenwasser-Proben keinerlei Sulfonamide enthielten (siehe Kapitel 5.3.8), sind diese Signalverluste offenbar weiterhin auf Störungen durch verbliebene Matrixbestandteile zurückzuführen.

5.3.7 Ermittlung von Kalibrierkurven und Wiederfindungen für das kombinierte Verfahren aus SPE und Mikroarray-Immunoassay

Das entwickelte Verfahren zur Aufkonzentrierung mittels HLB-Säule und Aufreinigung mittels SAX-Säule wurde nun mit der Mikroarray-Immunoassay-Messung kombiniert. Zwei Sulfonamid-freie Oberflächenwasser-Proben (Würm und Brunnenbach) wurden jeweils für Kalibrierexperimente mit SMA, SDA, SMZ beziehungsweise STZ in geeigneten Konzentrationen versetzt. Außerdem wurden die Kalibrierfunktionen für jedes Sulfonamid (gemittelt aus den Kalibrierungen in Würm und Brunnenbach) genutzt, um Wiederfindungen mit Konzentrationen von $2 \mu\text{g L}^{-1}$ und $4 \mu\text{g L}^{-1}$ zu bestimmen.

Die mit dem kombinierten Verfahren und Oberflächenwasser-Matrix erhaltenen Ergebnisse werden im Folgenden mit den Kalibrierungen in Leitungswasser (ohne vorherige Aufkonzentrierung) verglichen, die bereits in Kapitel 5.3.3 diskutiert wurden.

Kalibrierungen mit SMA-Lösungen

Wie in Kapitel 5.3.3 erläutert wurde, können SMA-Gehalte nur mit der Kontaktdruck-Reihe von SMA als Kompetitor gemessen werden. Die entsprechenden Kalibrierungen zeigt Abbildung 45.

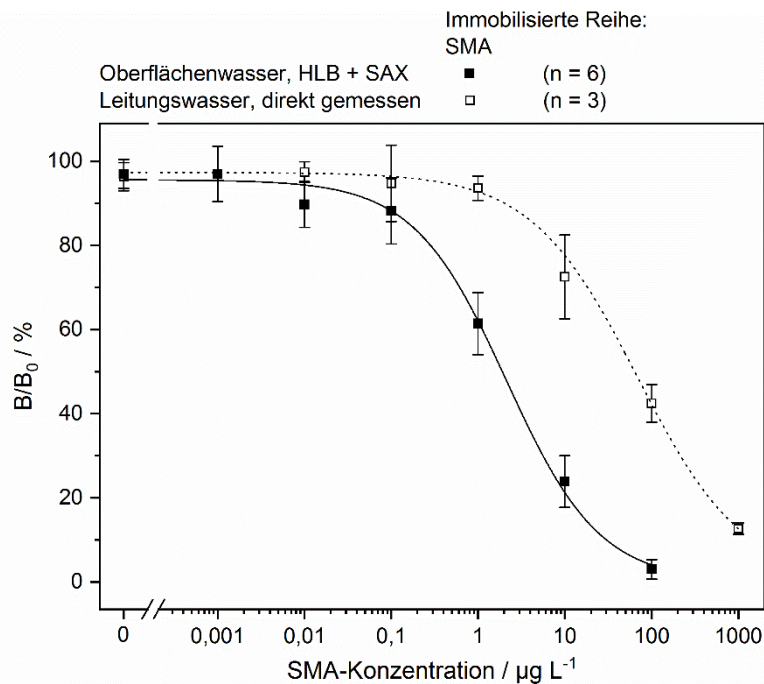


Abbildung 45. Sieben-Punkt-Kalibrierungen mit SMA-Lösungen, dargestellt als relative Signalintensitäten B/B_0 bezogen auf den jeweils höchsten Messwert einer Kalibrierreihe. Mit SMA versetzte Oberflächenwasser-Proben (Würm und Brunnenbach) wurden mittels HLB-Säulen extrahiert, mittels SAX-Säulen weiter aufgereinigt und dann mittels Mikroarray-Immunoassay analysiert. Zum Vergleich wurden mit SMA versetzte Leitungswasser-Proben direkt mittels Mikroarray-Immunoassay gemessen.

Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass die Kalibrierung in Oberflächenwasser-Matrix mit Aufkonzentrierung mittels HLB-Säulen und Aufreinigung mittels SAX-Säulen deutlich nachweisstärker war als die ohne Aufkonzentrierung ausgeführte Kalibrierung in Leitungswasser.

Die mithilfe von sigmoidaler Regression berechneten Charakteristika der beiden Kalibrierungen sowie die ermittelten Wiederfindungen sind in Tabelle 8 dargestellt.

5 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 8. Charakteristika der Kalibrierungen und Wiederfindungen von SMA. Mit SMA versetzte Oberflächenwasser-Proben (Würm und Brunnenbach) wurden mittels HLB-Säulen extrahiert, mittels SAX-Säulen weiter aufgereinigt und dann mittels Mikroarray-Immunoassay analysiert. Zum Vergleich wurden mit SMA versetzte Leitungswasser-Proben direkt mittels Mikroarray-Immunoassay gemessen.

	Oberflächenwasser, HLB + SAX	Leitungswasser, direkt gemessen
<i>Immobilisierte Reihe: SMA</i>		
Nachweisgrenze / $\mu\text{g L}^{-1}$	0,1	3,8
Bestimmungsgrenze / $\mu\text{g L}^{-1}$	0,4	11
Arbeitsbereich (80 % – 20 % B/B ₀) / $\mu\text{g L}^{-1}$	0,3 – 11	8,0 – 461
Testmittelpunkt (50 % B/B ₀) / $\mu\text{g L}^{-1}$	2,1	69
Aufkonzentrationsfaktor*	32	
Wiederfindung (2 $\mu\text{g L}^{-1}$) / %	93 ± 12 (n = 3)	
Wiederfindung (4 $\mu\text{g L}^{-1}$) / %	88 ± 10 (n = 3)	

* Der Aufkonzentrationsfaktor wurde berechnet aus den Testmittelpunkten (Leitungswasser, direkt gemessen : Oberflächenwasser, HLB +SAX).

Die Betrachtung der Daten zeigt, dass die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, der Arbeitsbereich und der Testmittelpunkt durch die Aufkonzentrierung hin zu deutlich niedrigeren Konzentrationen verschoben wurden. Anhand der Testmittelpunkte wurde ein Aufkonzentrationsfaktor von 32 berechnet, der zumindest in der Größenordnung des theoretischen Werts von 50 lag. Somit ist das neu entwickelte kombinierte Verfahren für den sensitiven Nachweis von SMA geeignet.

Dies bestätigen auch die hohen Wiederfindungen, die mit SMA-Konzentrationen bestimmt wurden, die bei der direkten Kalibrierung ohne Aufkonzentrierung unterhalb der Nachweis- beziehungsweise Bestimmungsgrenze gelegen hätten, mit dem kombinierten Verfahren nun aber erfasst werden konnten.

Kalibrierungen mit SDA-Lösungen

Die Anwesenheit von SDA kann gleichermaßen mit immobilisiertem SDA und SMZ als Kompetitoren nachgewiesen werden. Abbildung 46 zeigt die erhaltenen Kalibrierkurven in Oberflächenwasser nach HLB- und SAX-Behandlung sowie direkt gemessen in Leitungswasser.

5 Ergebnisse und Diskussion

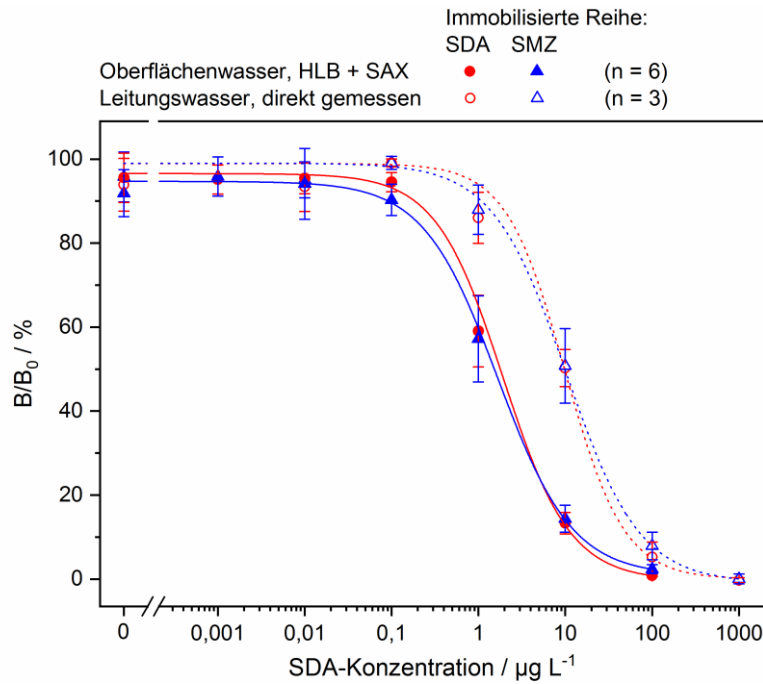


Abbildung 46. Sieben-Punkt-Kalibrierungen mit SDA-Lösungen, dargestellt als relative Signalintensitäten B/B_0 bezogen auf den jeweils höchsten Messwert einer Kalibrierreihe. Mit SDA versetzte Oberflächenwasser-Proben (Wurm und Brunnenbach) wurden mittels HLB-Säulen extrahiert, mittels SAX-Säulen weiter aufgereinigt und dann mittels Mikroarray-Immunoassay analysiert. Zum Vergleich wurden mit SDA versetzte Leitungswasser-Proben direkt mittels Mikroarray-Immunoassay gemessen.

Sowohl bei den direkten Messungen in Leitungswasser als auch nach Anwendung des neu entwickelten kombinierten Verfahrens auf mit SDA versetzte Oberflächenwasser-Proben wurden mit den immobilisierten Reihen von SDA und SMZ jeweils annähernd deckungsgleiche Regressionskurven erhalten.

Auch hier bewirkte die Aufkonzentrierung mittels HLB-Säule offenbar eine Steigerung des Nachweisvermögens, jedoch scheint der Effekt weniger deutlich zu sein als bei den Kalibrierungen mit SMA-Lösungen. Dies soll nachfolgend durch die erhaltenen Daten der Kalibrierungen näher beleuchtet werden, die in Tabelle 9 dargestellt sind.

5 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 9. Charakteristika der Kalibrierungen und Wiederfindungen von SDA. Mit SDA versetzte Oberflächenwasser-Proben (Würm und Brunnenbach) wurden mittels HLB-Säulen extrahiert, mittels SAX-Säulen weiter aufgereinigt und dann mittels Mikroarray-Immunoassay analysiert. Zum Vergleich wurden mit SMZ versetzte Leitungswasser-Proben direkt mittels Mikroarray-Immunoassay gemessen.

	Oberflächenwasser, HLB + SAX	Leitungswasser, direkt gemessen
<i>Immobilisierte Reihe: SDA</i>		
Nachweisgrenze / $\mu\text{g L}^{-1}$	0,6	4,1
Bestimmungsgrenze / $\mu\text{g L}^{-1}$	1,2	8,0
Arbeitsbereich (80 % – 20 % B/B ₀) / $\mu\text{g L}^{-1}$	0,5 – 5,9	3,2 – 29
Testmittelpunkt (50 % B/B ₀) / $\mu\text{g L}^{-1}$	1,9	9,9
Aufkonzentrierungsfaktor*	5	
Wiederfindung (2 $\mu\text{g L}^{-1}$) / %	58 ± 12 (n = 3)	
Wiederfindung (4 $\mu\text{g L}^{-1}$) / %	104 ± 8 (n = 3)	
<i>Immobilisierte Reihe: SMZ</i>		
Nachweisgrenze / $\mu\text{g L}^{-1}$	0,4	2,9
Bestimmungsgrenze / $\mu\text{g L}^{-1}$	1,0	6,5
Arbeitsbereich (80 % – 20 % B/B ₀) / $\mu\text{g L}^{-1}$	0,3 – 6,9	2,6 – 34,4
Testmittelpunkt (50 % B/B ₀) / $\mu\text{g L}^{-1}$	1,7	9,7
Aufkonzentrierungsfaktor*	6	
Wiederfindung (2 $\mu\text{g L}^{-1}$) / %	70 ± 12 (n = 3)	
Wiederfindung (4 $\mu\text{g L}^{-1}$) / %	104 ± 6 (n = 3)	

* Der Aufkonzentrierungsfaktor wurde berechnet aus den Testmittelpunkten (Leitungswasser, direkt gemessen : Oberflächenwasser, HLB +SAX).

Hierbei zeigt sich mit den immobilisierten Reihen von SDA und SMZ, dass für die SDA-Lösungen durch das kombinierte Verfahren lediglich eine Aufkonzentrierung um den Faktor 5 bis 6 erreicht wurde. Dies bedeutet zwar eine gewisse Steigerung des Nachweisvermögens, jedoch liegt der Aufkonzentrierungsfaktor damit um eine Größenordnung unter dem theoretischen Wert von 50. Da bei der Charakterisierung der Extraktion von SDA mittels HLB (siehe Kapitel 5.3.4) belegt wurde, dass dieser Schritt quantitativ ablief, also im Durchlauf kein SDA mehr vorhanden war und die gesamte Menge dann im Eluat gefunden wurde, ist zu vermuten, dass ein gewisser Teil des SDA von der SAX-Säule zurückgehalten wurde. Daher wurden drei Kalibrierungen von SDA-Extrakten aus Brunnenbach-Wasser ohne SAX-Behandlung gemessen. Die Aufkonzentrierungsfaktoren im Vergleich zur direkten Messung

in Leitungswasser betragen 20 für die SDA-Kontakt-druck-Reihe und 26 für die SMZ-Kontakt-druck-Reihe und waren damit etwa viermal so hoch wie bei der nachträglichen Aufreinigung mittels SAX-Säule. Somit scheint der Verdacht bestätigt zu sein, dass SDA zu einem großen Teil von der SAX-Säule zurückgehalten wurde. Ob dies möglicherweise durch eine geeignete pH-Wert-Einstellung verhindert werden kann, sollte in Zukunft untersucht werden.

Bei der jetzigen Versuchsanordnung waren allerdings trotzdem hohe Wiederfindungen zu verzeichnen, da sowohl die Kalibrierlösungen als auch die Proben für die Wiederfindungsbestimmungen mit der gleichen kombinierten Methode aus HLB-Extraktion und SAX-Aufreinigung behandelt wurden und der Analyt-Verlust offenbar in einer ungefähr gleichbleibenden Größenordnung auftrat. Somit ist diese neue Methode auch für den Nachweis von SDA prinzipiell geeignet, auch wenn die Aufkonzentrierung weniger effektiv ist.

Kalibrierungen mit SMZ-Lösungen

Das Sulfonamid SMZ kann gleichermaßen mit den immobilisierten Reihen von SDA und SMZ sowie auch mit der STZ-Kontakt-druck-Reihe nachgewiesen werden. In Abbildung 47 sind die entsprechenden Kalibrierungen in Oberflächenwasser mit HLB- und SAX-Behandlung sowie direkt gemessen in Leitungswasser dargestellt.

5 Ergebnisse und Diskussion

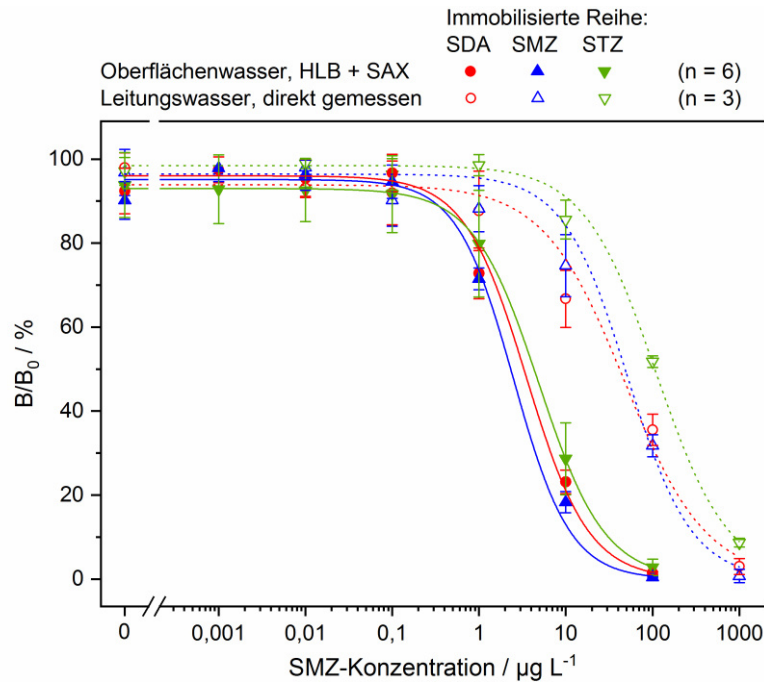


Abbildung 47. Sieben-Punkt-Kalibrierungen mit SMZ-Lösungen, dargestellt als relative Signalintensitäten B/B_0 bezogen auf den jeweils höchsten Messwert einer Kalibrierreihe. Mit SMZ versetzte Oberflächenwasser-Proben (Wurm und Brunnenbach) wurden mittels HLB-Säulen extrahiert, mittels SAX-Säulen weiter aufgereinigt und dann mittels Mikroarray-Immunoassay analysiert. Zum Vergleich wurden mit SMZ versetzte Leitungswasser-Proben direkt mittels Mikroarray-Immunoassay gemessen.

Auch hier ergaben sich bei beiden Versuchsanordnungen für die unterschiedlichen Kontaktdruck-Reihen jeweils ähnliche Kalibrierkurven, wobei eine Aufkonzentrierung durch das neu entwickelte kombinierte Verfahren deutlich zu erkennen ist.

Die Daten der Kalibrierungen sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

5 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 10. Charakteristika der Kalibrierungen und Wiederfindungen von SMZ. Mit SMZ versetzte Oberflächenwasser-Proben (Würm und Brunnenbach) wurden mittels HLB-Säulen extrahiert, mittels SAX-Säulen weiter aufgereinigt und dann mittels Mikroarray-Immunoassay analysiert. Zum Vergleich wurden mit SMZ versetzte Leitungswasser-Proben direkt mittels Mikroarray-Immunoassay gemessen.

	Oberflächenwasser, HLB + SAX	Leitungswasser, direkt gemessen
<i>Immobilisierte Reihe: SDA</i>		
Nachweisgrenze / $\mu\text{g L}^{-1}$	1,2	2,8
Bestimmungsgrenze / $\mu\text{g L}^{-1}$	2,3	9,3
Arbeitsbereich (80 % – 20 % B/B ₀) / $\mu\text{g L}^{-1}$	0,9 – 11	7,3 – 195
Testmittelpunkt (50 % B/B ₀) / $\mu\text{g L}^{-1}$	3,5	48
Aufkonzentrierungsfaktor*	14	
Wiederfindung (2 $\mu\text{g L}^{-1}$) / %	65 ± 22 (n = 3)	
Wiederfindung (4 $\mu\text{g L}^{-1}$) / %	105 ± 12 (n = 3)	
<i>Immobilisierte Reihe: SMZ</i>		
Nachweisgrenze / $\mu\text{g L}^{-1}$	0,9	13
Bestimmungsgrenze / $\mu\text{g L}^{-1}$	1,5	29
Arbeitsbereich (80 % – 20 % B/B ₀) / $\mu\text{g L}^{-1}$	0,7 – 6,8	13 – 161
Testmittelpunkt (50 % B/B ₀) / $\mu\text{g L}^{-1}$	2,5	51
Aufkonzentrierungsfaktor*	21	
Wiederfindung (2 $\mu\text{g L}^{-1}$) / %	68 ± 8 (n = 3)	
Wiederfindung (4 $\mu\text{g L}^{-1}$) / %	95 ± 15 (n = 3)	
<i>Immobilisierte Reihe: STZ</i>		
Nachweisgrenze / $\mu\text{g L}^{-1}$	1,3	15
Bestimmungsgrenze / $\mu\text{g L}^{-1}$	3,5	32
Arbeitsbereich (80 % – 20 % B/B ₀) / $\mu\text{g L}^{-1}$	1,0 – 15	27 – 405
Testmittelpunkt (50 % B/B ₀) / $\mu\text{g L}^{-1}$	4,9	109
Aufkonzentrierungsfaktor*	22	
Wiederfindung (2 $\mu\text{g L}^{-1}$) / %	133 ± 18 (n = 3)	
Wiederfindung (4 $\mu\text{g L}^{-1}$) / %	131 ± 28 (n = 3)	

* Der Aufkonzentrierungsfaktor wurde berechnet aus den Testmittelpunkten (Leitungswasser, direkt gemessen : Oberflächenwasser, HLB +SAX).

Anhand dieser Ergebnisse ist zu erkennen, dass die Aufkonzentrierung durch das kombinierte Verfahren mit Faktoren von 14 bis 22 für SMZ deutlich effektiver war als für SDA.

5 Ergebnisse und Diskussion

Die ermittelten Wiederfindungen liegen überwiegend im richtigen Bereich. Mit der STZ-Reihe wurden allerdings Werte von weit über 100 % erhalten. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Matrix-bedingte Signalverringering bei den Lösungen für die Wiederfindungsexperimente stärker ausfiel als bei den Kalibrierungen und es damit bei der STZ-Reihe zu einer Überbestimmung kam.

Insgesamt ist das neu entwickelte Verfahren geeignet, um SMZ in Konzentrationen von wenigen $\mu\text{g L}^{-1}$ in Oberflächenwasser-Proben zu analysieren.

Kalibrierungen mit STZ-Lösungen

Auch STZ kann mit den immobilisierten Reihen von SDA, SMZ und STZ nachgewiesen werden. Abbildung 48 zeigt die erhaltenen Kalibrierkurven in Oberflächenwasser nach HLB- und SAX-Behandlung sowie direkt gemessen in Leitungswasser.

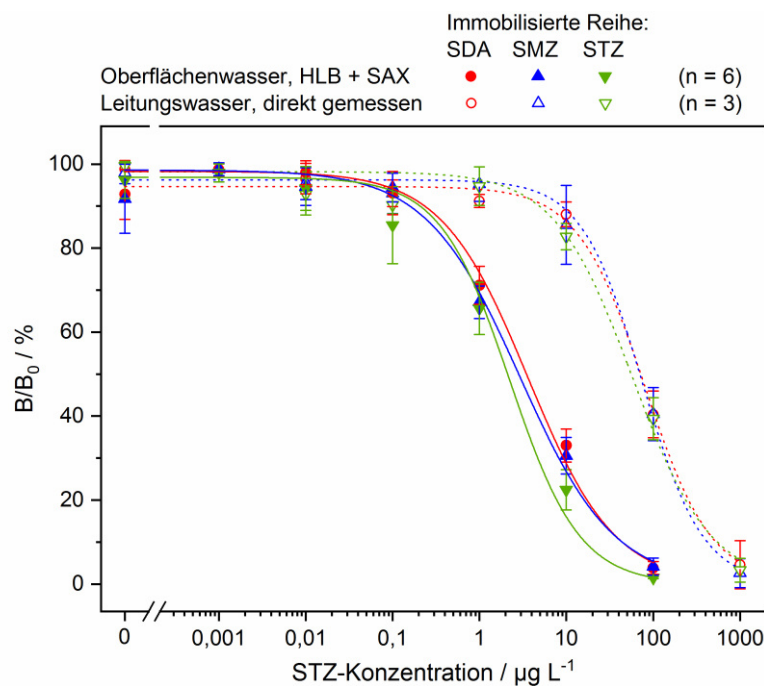


Abbildung 48. Sieben-Punkt-Kalibrierungen mit STZ-Lösungen, dargestellt als relative Signalintensitäten B/B_0 bezogen auf den jeweils höchsten Messwert einer Kalibrierreihe. Mit STZ versetzte Oberflächenwasser-Proben (Würm und Brunnenbach) wurden mittels HLB-Säulen extrahiert, mittels SAX-Säulen weiter aufgereinigt und dann mittels Mikroarray-Immunoassay analysiert. Zum Vergleich wurden mit STZ versetzte Leitungswasser-Proben direkt mittels Mikroarray-Immunoassay gemessen.

Wie erwartet wurden sowohl bei den direkten Messungen in Leitungswasser als auch nach Anwendung des neu entwickelten kombinierten Verfahrens jeweils annähernd deckungsgleiche Regressionskurven mit den immobilisierten Reihen von SDA, SMZ und STZ erhalten, wobei

5 Ergebnisse und Diskussion

eine deutliche Aufkonzentrierung zu erkennen ist.

Die Daten der Kalibrierungen sind in Tabelle 11 zusammengestellt.

Tabelle 11. Charakteristika der Kalibrierungen und Wiederfindungen von STZ. Mit STZ versetzte Oberflächenwasser-Proben (Würm und Brunnenbach) wurden mittels HLB-Säulen extrahiert, mittels SAX-Säulen weiter aufgereinigt und dann mittels Mikroarray-Immunoassay analysiert. Zum Vergleich wurden mit STZ versetzte Leitungswasser-Proben direkt mittels Mikroarray-Immunoassay gemessen.

	Oberflächenwasser, HLB + SAX	Leitungswasser, direkt gemessen
<i>Immobilisierte Reihe: SDA</i>		
Nachweisgrenze / $\mu\text{g L}^{-1}$	0,9	2,6
Bestimmungsgrenze / $\mu\text{g L}^{-1}$	2,5	9,7
Arbeitsbereich (80 % – 20 % B/B ₀) / $\mu\text{g L}^{-1}$	0,7 – 17	18 – 256
Testmittelpunkt (50 % B/B ₀) / $\mu\text{g L}^{-1}$	3,6	79
Aufkonzentrierungsfaktor*	22	
Wiederfindung (2 $\mu\text{g L}^{-1}$) / %	72 ± 15 (n = 3)	
Wiederfindung (4 $\mu\text{g L}^{-1}$) / %	96 ± 5 (n = 3)	
<i>Immobilisierte Reihe: SMZ</i>		
Nachweisgrenze / $\mu\text{g L}^{-1}$	0,7	8,5
Bestimmungsgrenze / $\mu\text{g L}^{-1}$	2,2	18
Arbeitsbereich (80 % – 20 % B/B ₀) / $\mu\text{g L}^{-1}$	0,5 – 16	21 – 218
Testmittelpunkt (50 % B/B ₀) / $\mu\text{g L}^{-1}$	2,9	76
Aufkonzentrierungsfaktor*	25	
Wiederfindung (2 $\mu\text{g L}^{-1}$) / %	71 ± 17 (n = 3)	
Wiederfindung (4 $\mu\text{g L}^{-1}$) / %	98 ± 6 (n = 3)	
<i>Immobilisierte Reihe: STZ</i>		
Nachweisgrenze / $\mu\text{g L}^{-1}$	0,4	1,5
Bestimmungsgrenze / $\mu\text{g L}^{-1}$	0,9	6,5
Arbeitsbereich (80 % – 20 % B/B ₀) / $\mu\text{g L}^{-1}$	0,5 – 7,8	13 – 230
Testmittelpunkt (50 % B/B ₀) / $\mu\text{g L}^{-1}$	2,2	65
Aufkonzentrierungsfaktor*	29	
Wiederfindung (2 $\mu\text{g L}^{-1}$) / %	113 ± 11 (n = 3)	
Wiederfindung (4 $\mu\text{g L}^{-1}$) / %	117 ± 12 (n = 3)	

* Der Aufkonzentrierungsfaktor wurde berechnet aus den Testmittelpunkten (Leitungswasser, direkt gemessen : Oberflächenwasser, HLB +SAX).

Hierbei zeigt sich, dass für STZ-Lösungen mit dem neu entwickelten kombinierten Verfahren hohe Aufkonzentrierungsfaktoren erreicht wurden, die mit etwa 22 bis 29 im Bereich des theoretischen Werts von 50 lagen. Auch die überwiegend hohen Wiederfindungen belegen, dass STZ auf diese Weise zuverlässig in Oberflächenwasser-Proben nachgewiesen werden kann.

5.3.8 Anwendung der entwickelten Methode für die Analyse von Oberflächenwasser-Realproben

Das kombinierte Verfahren aus HLB-Extraktion, SAX-Aufreinigung und Mikroarray-Immunoassay-Messung wurde für die Analyse von Realproben eingesetzt. Die erhaltenen Signalintensitäten wurden jeweils auf den Mittelwert der bereits für die Kalibrierexperimente verwendeten Proben von Brunnenbach und Würm referenziert.

Zur Beurteilung einer Probe als positiv oder negativ sollte grundsätzlich die Nachweisgrenze beziehungsweise die relative Signalintensität, die mit der Nachweisgrenze korreliert, herangezogen werden (siehe Formel (3.2), Seite 25):

$$B/B_0(\text{Nachweisgrenze}) = B/B_0(\text{Leerwert}) - 3 \sigma_{B/B_0(\text{Leerwert})}$$

Bei einigen immobilisierten Sulfonamid-Reihen wurden allerdings – aufgrund der beschriebenen Kreuzreaktivitäten – Kalibrierungen mit verschiedenen gelösten Sulfonamiden durchgeführt und somit auch unterschiedliche Nachweisgrenzen erhalten. Daher wurde für jede immobilisierte Sulfonamid-Reihe ein Cutoff-Wert definiert, der (gegebenenfalls) als Mittelwert aus den mit verschiedenen Sulfonamiden ermittelten Nachweisgrenzen berechnet wurde. Die entsprechenden relativen Signalintensitäten B/B_0 der einzelnen Nachweisgrenzen sowie die resultierenden Cutoff-Werte sind in Tabelle 12 dargestellt.

5 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 12. Relative Signalintensitäten B/B_0 der für die verschiedenen immobilisierten Reihen und mit Kalibrierungen der genannten Sulfonamide in Oberflächenwasser von Brunnenbach und Würm ermittelten Nachweisgrenzen sowie die resultierenden Cutoff-Werte.

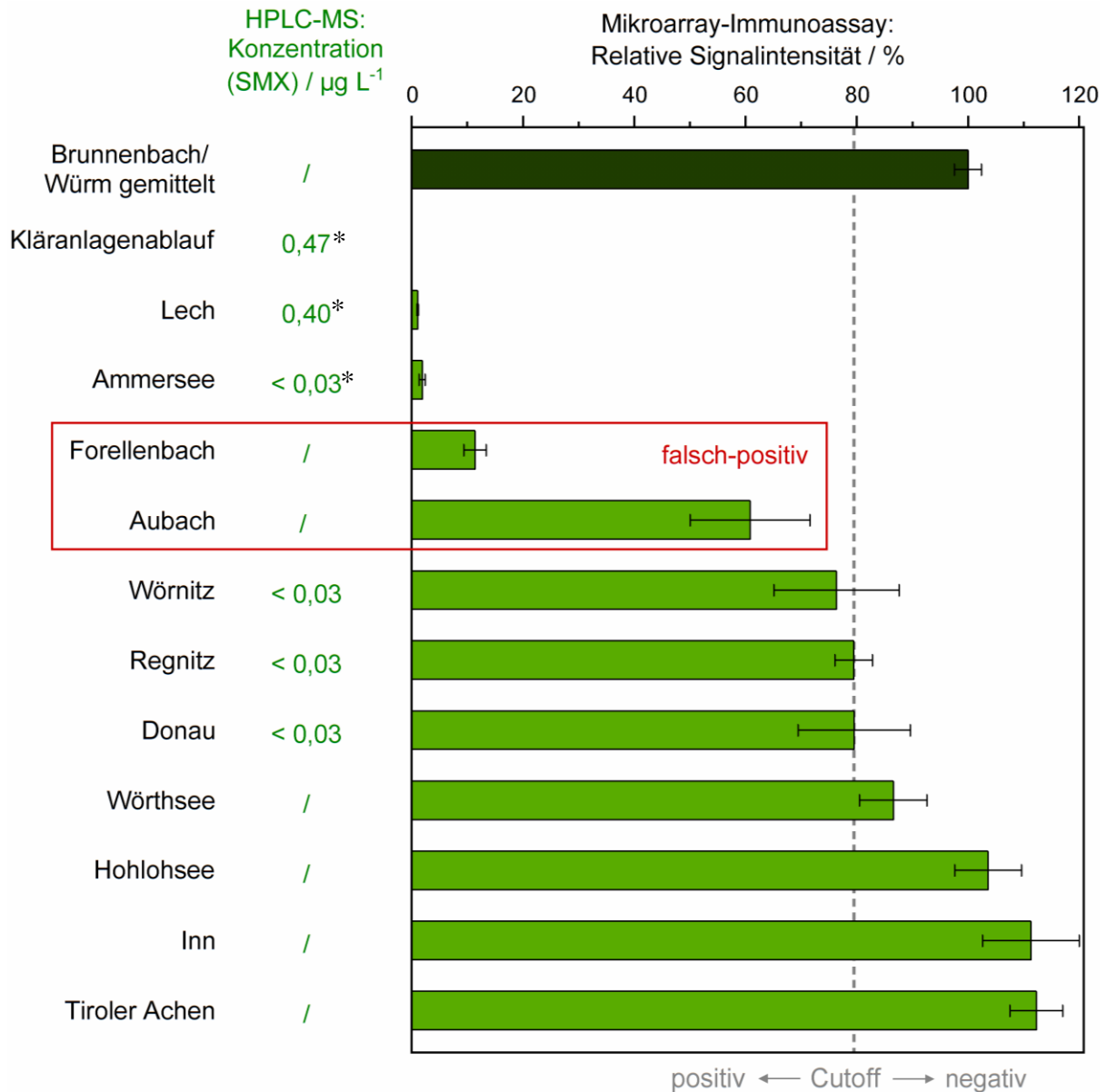
<i>B/B₀(Nachweisgrenze) / %</i>				
ermittelt mit immobilisierter Reihe:				
	SMA	SDA	SMZ	STZ
Kalibrierung mit:				
SMA	86,6	–	–	–
SDA	–	78,0	75,1	–
SMZ	–	76,2	76,7	75,9
STZ	–	75,0	74,7	83,0
Mittelwert = Cutoff	86,6	76,4	75,5	79,5

Die relativen Signalintensitäten, die mit den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Nachweisgrenzen korrelieren, lagen im Bereich von 74,7 % bis 86,6 % und die sich daraus ergebenden Cutoff-Werte betragen zwischen 75,5 % und 86,6 %.

Mithilfe dieser Cutoff-Werte wurden elf Oberflächenwasser-Proben und eine Probe des Kläranlagenablaufs aus dem Klärwerk Augsburg befundet. Vergleichsmessungen mit HPLC-MS wurden am Bayerischen Landesamt für Umwelt in Augsburg durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Bestätigungsmethode sind den mit der immobilisierten STZ-Reihe erhaltenen Resultaten in Abbildung 49 gegenübergestellt.

5 Ergebnisse und Diskussion



* Sulfapyridin ebenfalls nachgewiesen (nicht quantifiziert wegen fehlender Kalibrierung)

Abbildung 49. Ergebnisse der Analysen von Realwasser-Proben mittels HPLC-MS und Mikroarray-Immunoassays. Die HPLC-MS war ausgelegt auf den Nachweis von 30 verschiedenen Sulfonamiden und wurde am Bayerischen Landesamt für Umwelt in Augsburg durchgeführt. Die Mikroarray-Immunoassay-Messungen (dargestellte immobilisierte Reihe: STZ) erfolgten nach HLB-Extraktion und SAX-Aufreinigung (Dreifach-Bestimmungen) und die erhaltenen Signalintensitäten wurden jeweils auf den Mittelwert der Ergebnisse von Brunnenbach und Würm normiert.

Mittels HPLC-MS konnte in einigen Proben SMX oberhalb (Kläranlagenablauf des Klärwerks Augsburg und Lech unmittelbar hinter der Einleitungsstelle des Klärwerks) oder unterhalb der Bestimmungsgrenze von $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$ (Ammersee, Wörnitz, Regnitz und Donau) nachgewiesen werden. Außerdem wurde in drei Proben (gekennzeichnet mit *) Sulfapyridin gefunden, für das

allerdings keine Quantifizierung durchgeführt wurde. Andere Sulfonamide wurden in keiner Probe nachgewiesen.

Die Mikroarray-Immunoassay-Messungen zeigten mit der immobilisierten STZ-Reihe bei einigen Proben deutlich geringere Signalintensitäten als bei den Referenz-Proben Brunnenbach und Würm. Mit dem ermittelten Cutoff-Wert von 79,5 % relativer Signalintensität bezogen auf den Mittelwert von Brunnenbach und Würm wurden alle positiven Befunde der HPLC-MS-Analyse bestätigt. Allerdings wiesen auch zwei nicht mit Sulfonamiden belastete Proben (Forellenbach und Aubach) deutlich verringerte Signalintensitäten auf und wurden damit falsch-positiv befundet. Bei diesen Proben waren offensichtlich trotz SAX-Behandlung der Extrakte noch störende Matrixbestandteile vorhanden. Vier Proben (Wörthsee, Hohlohsee, Inn und Tiroler Achen) wurden anhand des gewählten Cutoff-Werts übereinstimmend mit der HPLC-MS-Analyse als negativ eingestuft.

Mit der SMA-Kontaktdruck-Reihe wurden lediglich bei Lech und Kläranlagenablauf relative Signalintensitäten unterhalb des Cutoff-Wertes erhalten. Die immobilisierten Reihen von SDA und SMZ zeigten nur für den Kläranlagenablauf signifikant verminderte Signalintensitäten.

Da bei der STZ-Kontaktdruck-Reihe bereits sehr geringe SMX-Konzentrationen in den Proben vergleichsweise deutliche Signalrückgänge mit sich brachten, ist zu vermuten, dass der anti-Sulfonamid-Antikörper eine besonders hohe Affinität zu SMX hat und der Assay damit sehr sensitiv für dieses Sulfonamid ist. In künftigen Untersuchungen sollten daher Kalibrierungen mit einer Vielzahl von Sulfonamiden durchgeführt werden.

6 Zusammenfassung und Ausblick

6.1 Relevanz eines umfassenden Antibiotika-Monitorings

Antibiotika sind äußerst wichtige Medikamente für die Behandlung von mitunter lebensbedrohlichen bakteriellen Infektionskrankheiten. Die Wirksamkeit wird jedoch durch die fortschreitende Ausbildung und Verbreitung von Resistenzen gegen häufig eingesetzte Antibiotikaklassen beeinträchtigt und es besteht schon heute die Gefahr, dass eine Infektion mit einem multiresistenten Keim nicht therapiert werden kann.

Menschen können Antibiotika entweder als Medikamente oder aber durch belastete Lebensmittel aufnehmen. Die Antibiotika werden zum Teil nicht metabolisiert ausgeschieden, gelangen über das Abwasser in Kläranlagen und bewirken dort, dass die zur Abwasser-Klärung eingesetzten Mikroorganismen Resistenzen entwickeln. Auch in Güllegruben und Biogasanlagen wird die Resistenzbildung aufgrund von Antibiotika-Gehalten in den tierischen Exkrementen begünstigt. Sowohl über Kläranlagen-Ablauf und Klärschlamm als auch über Gülle und Abfälle aus der Biogas-Anlage gelangen die Antibiotika schließlich in die Umwelt (Oberflächenwasser, Grundwasser, Boden), wo die dort vorhandenen Bakterienstämme wiederum Resistenzen entwickeln können.

Für ein Antibiotika-Monitoring im Sinne der öffentlichen Gesundheit sollten die beschriebenen Wege daher umfassend überwacht werden. Dafür bedarf es kostengünstiger, mobil einsetzbarer und nachweisstarker Screening-Methoden, die für die verschiedenen Matrices, wie Fleisch, Milch, Abwasser, Gülle, Boden, Oberflächenwasser und Grundwasser, geeignet sind.

6.2 Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Forschungsarbeit

Diese Arbeit liefert dazu einen wichtigen Beitrag. Basierend auf einem bereits etablierten regenerierbaren Chemilumineszenz-Mikroarray-Immunoassay-Verfahren zur Messung von 13 Antibiotika in Milch [27] wurden Methoden für den Nachweis von weiteren Antibiotika und in verschiedenen flüssigen Realmatrixen entwickelt. Dabei wurden drei Teilprojekte bearbeitet, deren Ergebnisse im Folgenden dargestellt werden.

6.2.1 Mikroarray-Immunoassay-Verfahren zur Detektion von Cefalexin und Kanamycin in flüssigen menschlichen und tierischen Proben

Da die Wirkstoffe Cefalexin (ein Cephalosporin) und Kanamycin (ein Aminoglykosid) in Form des Kombinationspräparats Ubrolexin zunehmend bei Euter-Entzündungen von Milchkühen eingesetzt werden und auch in der Humanmedizin eine Rolle spielen, wurde das etablierte Mikroarray-Verfahren um Immunoassays im ersten Teilprojekt für diese beiden Antibiotika ergänzt.

Mit der höchsten Konzentration von 5 mg mL^{-1} in der Kontaktdruck-Lösung wurden für beide Antibiotika insgesamt die stabilsten Ergebnisse erhalten. Die immobilisierten Kompetitoren waren über 30 Messungen praktisch ohne Signalverlust regenerierbar. Mit Kalibrierexperimenten wurden die Nachweisgrenzen für den Cefalexin-Assay zu $0,2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ und für den Kanamycin-Assay zu $0,02 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ bestimmt. Die Wiederfindungen bei $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ Cefalexin beziehungsweise Kanamycin betragen $80 \% \pm 20 \%$ und $88 \% \pm 21 \%$.

Mit diesem Mikroarray-Verfahren wurden Cefalexin und Kanamycin in Milch- und Urinproben einer intramammär mit Ubrolexin behandelten Milchkuh parallel gemessen. Während in der Milch der Kanamycin-Gehalt um ein Vielfaches überwog, war im Urin etwas mehr Cefalexin als Kanamycin enthalten. Das Verhältnis der Konzentrationen in Milch und Urin betrug bei Kanamycin etwa 2:1 und bei Cefalexin etwa 1:10. Somit legt diese Untersuchung nahe, dass die Exkretion von nicht metabolisiertem Kanamycin in ähnlichem Maße über Milch und Urin erfolgt, während Cefalexin überwiegend über den Urin ausgeschieden wird.

In einer zweiten Anwendung wurden Dünndarm-Sekret (ausgeschieden über einen künstlichen Dünndarm-Ausgang) und Urin eines Menschen analysiert, der wenige Stunden vorher 500 mg Cefalexin oral eingenommen hatte. Insgesamt wurden knapp 100 mg Cefalexin in den Exkrementen wiedergefunden, wobei sich der Wirkstoff zwischen Dünndarm-Sekret und Urin etwa im Verhältnis 1:10 verteilte. Damit ergab auch die Untersuchung von menschlichen Proben, dass der nicht metabolisierte Anteil des Cefalexins überwiegend über den Urin ausgeschieden wird.

Anhand dieser Beispiele ist zu erkennen, dass das vorgestellte Verfahren in hohem Maße für die direkte Analyse von menschlichen und tierischen Realproben ohne vorherige Aufreinigung oder Extraktion geeignet ist.

6.2.2 Fluss-basierter regenerierbarer Chemilumineszenz-Rezeptor-Assay für den Nachweis von Tetracyclinen

Die häufig verabreichte Antibiotikaklasse der Tetracycline konnte bislang nicht erfolgreich in den Mikroarray integriert werden, da sich kein Tetracyclin-Derivat regenerationsstabil als Kompetitor immobilisieren ließ. Daher wurde im zweiten Teilprojekt dieser Arbeit ein alternatives kompetitives Assay-Format basierend auf dem bakteriellen Resistenz-Mechanismus gegen Tetracycline etabliert.

Kovalent auf der Chip-Oberfläche immobilisiert wurde ein DNA-Oligonukleotid mit der spezifischen Operatorsequenz *tetO*, an die das Repressor-Protein TetR grundsätzlich gebunden ist. In Anwesenheit von Tetracyclin erfährt TetR allerdings eine Konformationsänderung induziert durch die Bindung von $[\text{MgTc}]^+$ und kann damit nicht mehr an *tetO* binden.

In dem neu entwickelten Assay wurde die Mg^{2+} -haltige Probe mit biotinyliertem TetR versetzt und in die Flusszelle des Chips geleitet, um eine Konkurrenz zwischen eventuell vorhandenem $[\text{MgTc}]^+$ und immobilisiertem *tetO* um TetR zu ermöglichen. Die anschließende Detektion des an *tetO* gebundenen Anteils der TetR-Moleküle erfolgte über Streptavidin-HRP und die katalysierte Chemilumineszenz-Reaktion von Luminol und Wasserstoffperoxid. Daraufhin wurde das immobilisierte *tetO* mithilfe eines Glycin-HCl-Puffers (pH 4) wieder für eine neue Messung regeneriert.

Entscheidend für intensive Chemilumineszenz-Signale und eine hohe Regenerationsstabilität war (1.) eine möglichst hohe Konzentration der DNA-Oligonukleotide in der Kontaktdruck-Lösung (400 μM oder 200 μM in Reinstwasser), (2.) die statische Inkubation des Probe/TetR-Gemisches in der Flusszelle für mindestens einige Minuten zur Förderung der kompetitiven Reaktion, (3.) eine biologisch relevante Temperatur (37 – 40 °C) während dieser Inkubation und (4.) eine deutlich niedrigere Temperatur (18 °C) für die folgenden Schritte der Messung zur Vermeidung von DNA-Schädigungen. Die Wahl der Inkubationsdauer stellt folglich einen Kompromiss zwischen möglichst kurzer Analysedauer und möglichst hohen Signalintensitäten dar und muss daher unter Berücksichtigung der Anforderungen der jeweiligen Anwendung festgelegt werden.

Für die vorliegenden Kalibrier-Experimente wurde eine Inkubationsdauer von 30 min und eine Inkubationstemperatur von 37 °C gewählt. Mit den DNA-Kontaktdruck-Konzentrationen von 400 μM und 200 μM wurden für Tetracyclin Nachweisgrenzen von 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ und 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ sowie Wiederfindungen bei 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ von 80 % \pm 19 % und 77 % \pm 16 % erhalten.

Eine Voruntersuchung mit Oberflächenwasser-Proben, die keine Tetracycline enthielten, zeigte, dass der Assay unempfindlich gegenüber Matrix-Einflüssen ist und Realproben daher ohne Probenaufbereitung direkt gemessen werden können.

Da das Messprotokoll auf der Basis des bereits etablierten indirekten kompetitiven Mikroarray-Immunoassays für den gleichzeitigen Nachweis verschiedener Antibiotika entwickelt wurde, sollten sich die Konzepte grundsätzlich kombinieren lassen. Das zukünftige Ziel ist ein einziger Mikroarray-Chip, der mehrere Rezeptor- und Immunoassays parallel verarbeiten kann. Dazu können die entsprechenden Primärantikörper zusammen mit TetR (und möglicherweise noch weiteren Rezeptor-Proteinen) sowie der HRP-markierte Sekundärantikörper zusammen mit Streptavidin-HRP eingesetzt werden. In einer Prinzip-Studie wurde der Tetracyclin-Rezeptor-Assay mit den indirekten kompetitiven Immunoassays für SMA, Nafcillin und Tylosin kombiniert. Leerwert-Messungen wurden mit statischer Inkubation für 10 min bei 37 °C durchgeführt. Wenn nur TetR oder nur die Primärantikörper zugegeben wurden, waren nur die *tetO*-Reihe oder nur die Reihen mit den immobilisierten Antibiotika sichtbar. Wenn TetR und die Primärantikörper gemeinsam eingesetzt wurden, zeigten sich alle Reihen. Somit traten keine Kreuzreaktivitäten auf und es konnte belegt werden, dass die Kombination der beiden Assay-Konzepte grundsätzlich möglich ist.

Aufgrund der Multiplex-Fähigkeit und der Regenerierbarkeit ist ein solcher Fluss-basierter Sensor ideal geeignet für ein vollautomatisches Vor-Ort-Monitoring von verschiedenen Kontaminanten. Eine umfassende Studie mit Kalibrierungen aller Assays und der Analyse zahlreicher Realproben ist jedoch sehr komplex und aufwendig, sodass dies Gegenstand weiterer Untersuchungen sein soll.

6.2.3 SPE-Aufkonzentrierung und Mikroarray-Immunoassay-Messung von Sulfonamiden in Oberflächenwasser

Da die Antibiotika-Konzentrationen in Umweltproben in der Regel äußerst niedrig sind und daher mit der direkten Mikroarray-Messung oftmals nicht erfasst werden können, wurde im dritten Teilprojekt die Kombination mit einer vorgeschalteten SPE zur Extraktion und Aufkonzentrierung erprobt. Als umweltrelevante Antibiotika wurden einige Sulfonamide beispielhaft für diese Experimente eingesetzt.

Die vier Sulfonamide SMA, SDA, SMZ und STZ konnten erfolgreich als Kompetitoren auf dem Mikroarray-Chip immobilisiert werden. Drei Primärantikörper mit unterschiedlichen Selektivitäten für die Sulfonamide standen zur Verfügung. Der anti-SMA-Antikörper band mit hoher Selektivität an immobilisiertes SMA, der anti-SDA-Antikörper hauptsächlich an SDA und SMZ und der anti-Sulfonamid-Antikörper mit hoher Selektivität an STZ.

Bei Kalibrierexperimenten zeigte sich ein komplexes Bild an unterschiedlichen Selektivitäten. Abhängig von den zur Kalibrierung verwendeten Substanzen traten starke Unterschiede im Verlauf der Signalreihen der vier immobilisierten Sulfonamide auf. SMA reagierte überwiegend mit dem anti-SMA-Antikörper, der wiederum eine geringe Kreuzreaktivität aufweist. Somit erfolgte bei den Kalibrierungen mit SMA der sensitivste Signalrückgang bei der SMA-Kontaktdruck-Reihe. Die Anwesenheit von SDA oder SMZ in den Kalibrierlösungen zeigte sich besonders deutlich bei den entsprechenden beiden Kontaktdruck-Reihen. STZ konnte ebenfalls mit diesen beiden immobilisierten Kompetitoren wie auch mit der STZ-Kontaktdruck-Reihe zuverlässig nachgewiesen werden. SDX, SMX und SDM führten nur bei der STZ-Kontaktdruck-Reihe zu einer deutlichen Abnahme der Signalintensität, bei SMX allerdings schon bei besonders niedrigen Konzentrationen.

Im Ergebnis ist zu konstatieren, dass mit dieser Kombination an immobilisierten Kompetitoren und Primärantikörpern eine Vielzahl von Sulfonamiden detektiert werden kann. Eine genaue Quantifizierung wird ohne Kenntnis der Substanz zwar nicht möglich sein; das ist bei einem Screening-Verfahren aber auch nicht erforderlich. Vielmehr geht es darum, möglichst effizient und nachweisstark mögliche positive Proben zu ermitteln, die dann mit einer Bestätigungsmethode weiter untersucht werden können.

Die Extraktion und Aufkonzentrierung von Sulfonamiden aus Oberflächenwasser wurde mit einer Oasis HLB-Säule durchgeführt, da sich diese bereits in zahlreichen Anwendungen bewährt hatte [66, 72, 121]. Anhand von Reinstwasser-Proben, die mit SMA und SDA versetzt waren, wurde belegt, dass im Durchlauf keine Sulfonamide nachweisbar waren, während die Wiederfindungen schon im ersten Milliliter der methanolischen Eluate rechnerisch über 100 % betragen. Da Methanol die Chemilumineszenz-Immunoassay-Detektion stört, wurde das Verfahren daraufhin so angepasst, dass die Eluate vollständig eingedampft und die Extrakte dann in einem definierten Volumen von Reinstwasser wieder aufgenommen wurden.

Anhand von Sulfonamid-freien Oberflächenwasser-Proben wurde untersucht, ob das bei der Extraktion eingesetzte Probenvolumen einen Einfluss auf die Signalintensitäten der Chemilumineszenz-Mikroarray-Messung hat. Bei den immobilisierten Reihen von SMA, SDA

und SMZ war kein Effekt zu verzeichnen, während die Intensitäten der immobilisierten STZ-Reihe mit zunehmendem Extraktionsvolumen (und damit höherer Aufkonzentrierung) deutlich abnahmen. Dies war mit Proben aus verschiedenen Gewässern zu beobachten, wenn auch in unterschiedlichem Maße. Mit anderen kommerziell erhältlichen SPE-Säulen konnte keine Verbesserung erzielt werden.

Da die Störung vermutlich auf Huminsäure-Bestandteile der Realwasser-Matrix zurückzuführen war, die überwiegend negativ geladen sind, wurde eine Anionenaustauscher-Säule (Strata SAX) zur Aufreinigung erprobt, die den störenden Einfluss tatsächlich deutlich verringerte. Somit wurde für die weiteren Experimente die Abfolge etabliert, dass zunächst 100 mL einer Oberflächenwasser-Probe mittels HLB-Säule extrahiert wurden, die eingedampften Extrakte in 1,5 mL Reinstwasser aufgenommen und dann mittels SAX-Säule aufgereinigt wurden. Der aufgereinigte Durchlauf (1,5 mL) wurde mit 0,5 mL Waschwasser vereinigt, sodass ein theoretischer Aufkonzentrierungsfaktor von 50 bezogen auf die ursprüngliche Oberflächenwasser-Probe (100 mL) für die Sulfonamide resultierte.

Mit diesem Verfahren wurden Kalibrierexperimente mit Lösungen von SMA, SDA, SMZ und STZ in Sulfonamid-freien Proben verschiedener Gewässer durchgeführt. Die ermittelten Nachweisgrenzen lagen im Bereich von $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ bis $0,9 \mu\text{g L}^{-1}$. Im Vergleich zu den Kalibrierungen ohne vorherige Aufkonzentrierung wurden Aufkonzentrierungsfaktoren von etwa 20 bis 30 für SMA, SMZ und STZ berechnet. Für SDA betrug der Aufkonzentrierungsfaktor mit SAX-Aufreinigung jedoch nur etwa 5 (im Vergleich zu etwa 20 mit HLB-Extraktion ohne SAX-Aufreinigung), was darauf hindeutet, dass SDA überwiegend auf der SAX-Säule verbleibt. Dieses Problem soll zukünftig durch Anpassung des pH-Wertes für die SAX-Aufreinigung behoben werden.

Mit dem entwickelten kombinierten Verfahren wurden diverse Oberflächenwasser-Proben und eine Probe des Kläranlagenablaufs aus dem Klärwerk Augsburg untersucht und zum Vergleich mittels HPLC-MS analysiert, wobei in einigen Proben SMX nachgewiesen wurde. Bei den immobilisierten Reihen von SMA, SDA und SMZ wurden keine Signalverringernungen festgestellt, da niedrige Konzentrationen von SMX dort keinen Effekt erzielen. Die immobilisierte Reihe von STZ zeigte hingegen zum Teil deutliche Signalverringernungen. Mit einem Cutoff-Wert von 79,5 % (entsprechend den ermittelten Nachweisgrenzen) bezogen auf die Messung von Sulfonamid-freien Realwasserproben, die für die Kalibrierungen verwendet wurden, wurden schließlich sechs Proben korrekt als positiv, vier Proben korrekt als negativ und zwei Proben als falsch-positiv befundet.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass das kombinierte Verfahren aus HLB-Extraktion, SAX-Aufreinigung und Chemilumineszenz-Mikroarray-Immunoassay-Messung grundsätzlich als Screening-Verfahren für den Nachweis von Antibiotika in Oberflächenwasser geeignet ist. Für die Zukunft wird angestrebt, die Nachweisgrenzen durch größere Probenvolumina und damit verbundene höhere Aufkonzentrierungsfaktoren sowie eine pH-Wert-Optimierung weiter zu senken.

6.3 Fazit und Ausblick

Mit dieser Forschungsarbeit wurde aufgezeigt, dass die hier vorgestellten Fluss-basierten Chemilumineszenz-Mikroarray-Immuno- und Rezeptor-Assays ideal als Screening-Verfahren für Antibiotika in diversen flüssigen Matrices geeignet sind und dabei keine Probenaufbereitung erforderlich ist. Auch die Kombination mit SPE zur Aufkonzentrierung wurde erfolgreich demonstriert.

In den nächsten Jahren wird die Überwachung von Oberflächen- und Abwässern zu einem Hauptthema der Umweltanalytik werden [126, 127]. Qualitätsanforderungen wurden bereits festgelegt, z. B. in der Europäischen Wasserrahmenrichtlinie 2000/60/EG.

Ein drängendes Problem besteht darin, dass Kläranlagen noch nicht in der Lage sind, Kontaminanten wie z. B. Antibiotika vollständig aus dem Abwasser zu entfernen [128], sodass diese Verbindungen in die Umwelt eingetragen werden. Zudem mobilisieren Starkregen-Ereignisse, die infolge des Klimawandels zunehmen [129, 130], im Boden adsorbierte Substanzen und waschen sie in Oberflächengewässer aus [131]. Daher müsste auch sichergestellt werden, dass die Gülle, die auf Felder ausgebracht wird, keine Antibiotika enthält.

Bereits zum Teil schon ubiquitär vorhandene Resistenzen können nicht mehr rückgängig gemacht werden. Jedoch muss für die Zukunft alles darangesetzt werden, weitere Resistenzbildungen gegen neue Wirkstoffe zu verhindern. Dafür wäre es notwendig, die sogenannten Reserve-Antibiotika wirklich nur bei Infektionen mit (multi-)resistenten Erregern zu verabreichen, die nicht anders behandelt werden können. An der aktuellen EU-Verordnung 2019/6 wird daher zu Recht kritisiert, dass der Einsatz von Reserve-Antibiotika nicht strikt genug reglementiert ist und eine eigentlich nicht vertretbare Gabe pauschal mit dem Tierwohl gerechtfertigt werden kann.

Um die Wirksamkeit von Antibiotika langfristig zu sichern, ist ein überlegter Einsatz und eine geeignete Behandlung der Ausscheidungen von menschlichen und tierischen Patienten sehr wichtig, denn jedes Molekül, das gar nicht erst in die Umwelt gelangt, ist langfristig ein Gewinn für die öffentliche Gesundheit.

7 Summary and Outlook

7.1 Relevance of Comprehensive Antibiotic Monitoring

Antibiotics are extremely important drugs for the treatment of potentially life-threatening bacterial infectious diseases. However, their effectiveness is being compromised by the progressive development and spread of resistance to commonly used classes of antibiotics, and there is already a risk that an infection with a multidrug-resistant pathogen cannot be treated.

Humans can ingest antibiotics either as medications or through contaminated food. Some of the antibiotics are excreted unmetabolized and enter sewage treatment plants via wastewater, where they cause the microorganisms used for wastewater treatment to develop resistances. Resistance is also promoted in slurry pits and biogas plants due to antibiotics in animal excreta. Via sewage treatment plant effluent and sewage sludge as well as via manure and waste from biogas plants, antibiotics eventually enter the environment (surface water, groundwater, soil) where the bacterial strains present there can also develop resistances.

For antibiotic monitoring in the interest of public health, the described pathways should therefore be comprehensively monitored. This requires cost-effective, mobile screening methods with high sensitivity that are suitable for the various matrices, such as meat, milk, wastewater, slurry, soil, surface water and groundwater.

7.2 Summary of the Present Research Work

Based on an already established regenerable chemiluminescence microarray immunoassay method for the measurement of 13 antibiotics in milk [27], methods for the detection of additional antibiotics and in different liquid real matrices were developed in this research work. The results of the three subprojects are presented below.

7.2.1 Microarray Immunoassay Method for the Detection of Cefalexin and Kanamycin in Liquid Human and Animal Samples

Since the active ingredients cefalexin (a cephalosporin) and kanamycin (an aminoglycoside) are increasingly used for udder inflammation in dairy cows (in the form of the combination

preparation Ubrolexin) and also play a role in human medicine, the established microarray method was extended with immunoassays for these two antibiotics.

With the highest concentration of 5 mg mL⁻¹ in the spotting solution, the most stable results were obtained overall for both antibiotics. The immobilized competitors were regenerable over 30 measurements with almost no signal loss. Calibration experiments were used to determine the detection limits for the cefalexin assay at 0.2 µg L⁻¹ and for the kanamycin assay at 0.02 µg L⁻¹. The recoveries at 1 µg L⁻¹ cefalexin and kanamycin, respectively, were 80% ± 20% and 88% ± 21%.

Using this microarray method, cefalexin and kanamycin were measured in parallel in milk and urine samples from a dairy cow treated intramammary with Ubrolexin. While in milk the kanamycin content predominated by a multiple, the urine contained slightly more cefalexin than kanamycin. The ratio of concentrations in milk and urine was about 2:1 for kanamycin and about 1:10 for cefalexin. Thus, this study shows that unmetabolized kanamycin is excreted in milk and urine to a similar extent, whereas cefalexin is predominantly excreted in urine.

In a second application, small intestine secretions from an artificial outlet (ileostomy) and urine were analyzed from a human who had orally incorporated 500 mg of cefalexin a few hours earlier. A total of about 100 mg of cefalexin was recovered in the excreta, with the antibiotic distributed between small intestine secretions and urine in a ratio of approximately 1:10. Thus, the analysis of human samples revealed that the unmetabolized amount of cefalexin is predominantly excreted in urine.

Based on these examples, the presented method is highly suitable for direct analysis of human and animal real samples without prior purification or extraction.

7.2.2 Flow-based Regenerable Chemiluminescence Receptor Assay for the Detection of Tetracyclines

The frequently administered antibiotic class of tetracyclines could not be successfully integrated into the microarray so far, since no tetracycline derivative could be immobilized as a competitor stable to surface regeneration. Therefore, an alternative competitive assay format based on the bacterial resistance mechanism to tetracyclines was established in the second subproject of this work.

7 Summary and Outlook

A DNA oligonucleotide with the specific operator sequence *tetO*, to which the repressor protein TetR is bound in principle, was covalently immobilized on the chip surface. However, in the presence of tetracycline, TetR undergoes a conformational change induced by the binding of $[\text{MgTc}]^+$ and thus can no longer bind to *tetO*.

In the newly developed assay, biotinylated TetR was added to the Mg^{2+} -containing sample and passed into the chip flow cell to allow for competition between $[\text{MgTc}]^+$ and immobilized *tetO* for TetR. Subsequent detection of TetR molecules bound to *tetO* was performed with streptavidin-HRP and the catalyzed chemiluminescence reaction of luminol and hydrogen peroxide. Thereafter, the immobilized *tetO* was regenerated for a new measurement using a glycine-HCl buffer (pH 4).

Crucial for intense chemiluminescence signals and high regeneration stability was (1.) the highest possible concentration of DNA oligonucleotides in the spotting solution (400 μM or 200 μM in ultrapure water), (2.) static incubation of the sample/TetR mixture in the flow cell for at least a few minutes to promote the competition reaction, (3.) a biologically relevant temperature (37 – 40 °C) during this incubation, and (4.) a much lower temperature (18 °C) for the following steps of the measurement to avoid DNA damage. Consequently, the choice of incubation time represents a compromise between the shortest possible analysis time and the highest possible signal intensities and may therefore be determined considering the requirements of the particular application.

For the present calibration experiments, an incubation time of 30 min and an incubation temperature of 37 °C were set. Using DNA spotting concentrations of 400 μM and 200 μM , detection limits of 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ and recoveries of 80% \pm 19% and 77% \pm 16% (with a tetracycline concentration of 1 $\mu\text{g L}^{-1}$) were obtained, respectively.

A preliminary study with surface water samples that did not contain tetracyclines showed that the assay is insensitive to matrix influences and real samples can therefore be directly measured without sample preparation.

Since the measurement protocol was developed based on the already established indirect competitive microarray immunoassay for the simultaneous detection of different antibiotics, the concepts should in principle be combinable. The future objective is a single microarray chip that can process multiple receptor and immunoassays in parallel. For this purpose, the corresponding primary antibodies can be used together with TetR (and possibly other receptor proteins) and the HRP-labeled secondary antibody together with streptavidin-HRP. In a proof-

of-concept study, the tetracycline receptor assay was combined with the indirect competitive immunoassays for SMA, nafcillin, and tylosin. Blank measurements were performed with static incubation for 10 min at 37 °C. When either TetR or the primary antibodies were added, solely the *tetO* row or the rows of the immobilized antibiotics were visible. When TetR and the primary antibodies were used together, all rows appeared. Thus, no cross reactivities occurred and it could be proven that the combination of the two assay concepts is possible.

Due to its multiplex capability and regenerability, this flow-based sensor is ideally suited for fully automated on-site monitoring of various contaminants. However, a comprehensive study involving calibrations of all assays and analysis of numerous real samples is very complex and demanding, so this will be the subject of further investigation.

7.2.3 SPE Concentration and Microarray Immunoassay Measurement of Sulfonamides in Surface Water

Antibiotic concentrations in environmental samples are extremely low in most cases and therefore, direct microarray measurement is not practicable. For this reason, the combination with upstream SPE for extraction and concentration was tested in the third subproject. The experiments were conducted with several sulfonamides due to their relevance in environmental samples.

The four sulfonamides SMA, SDA, SMZ and STZ were successfully immobilized as competitors on the microarray chip. Three primary antibodies with different selectivities for the respective sulfonamides were available. The anti-SMA antibody bound with high selectivity to immobilized SMA, the anti-SDA antibody bound mainly to SDA and SMZ, and the anti-sulfonamide antibody bound with high selectivity to STZ.

Calibration experiments showed distinct differences depending on the sulfonamide used for calibration. SMA in the calibration solution reacted predominantly with the anti-SMA antibody, so the most sensitive signal decrease occurred with the SMA spotting row. The presence of SDA or SMZ in the calibration solutions was mainly detectable with the corresponding two spotting rows. STZ was also detected with these two immobilized competitors as well as with the STZ spotting row. In contrast, SDX, SMX and SDM caused a significant decrease in signal intensity only with the STZ spotting row, with SMX already at particularly low concentrations.

7 Summary and Outlook

In conclusion, sulfonamides can be detected with this combination of immobilized competitors and primary antibodies. Exact quantification will not be possible without knowing the specific substance, but this is not required for a screening method. Rather, the aim is to identify positive samples as efficient and sensitive as possible, which can then be further investigated with a confirmatory method.

The extraction and concentration of sulfonamides from surface water was carried out with an Oasis HLB column, as this had already been successfully used in numerous applications [66, 72, 121]. Using ultrapure water samples spiked with SMA and SDA, it was demonstrated that no sulfonamides were detectable in the filtrates, while recoveries were mathematically over 100% in the first milliliter of methanolic eluates. Since methanol interferes with chemiluminescence immunoassay detection, the procedure was adapted so that the eluates were completely evaporated and the extracts were then recovered in a defined volume of ultrapure water.

Sulfonamide-free surface water samples were used to investigate whether the sample volume used in the extraction influenced the signal intensities of the chemiluminescence microarray measurement. There was no effect for the immobilized rows of SMA, SDA and SMZ, while the intensities of the immobilized STZ row decreased significantly with increasing extraction volume. This effect was observed with real samples from different waters, but to varying degrees. No improvement was obtained with other commercially available SPE columns.

The interference was probably due to humic acid components of the real water matrix, which are predominantly negatively charged. Thus, an anion exchange column (Strata SAX) was tested for purification and indeed significantly reduced the interfering influence. For further experiments, the sequence was established that 100 mL of a surface water sample was first extracted using HLB column, the evaporated extracts were taken up in 1.5 mL of ultrapure water, and then purified using SAX column. The purified filtrate (1.5 mL) was combined with 0.5 mL of rinsing water, resulting in a theoretical concentration factor of 50 relative to the original surface water sample (100 mL) for the sulfonamides.

Calibration experiments with solutions of SMA, SDA, SMZ and STZ in sulfonamide-free samples of different surface waters were performed using this method. The determined detection limits were in the range of $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ to $0.9 \mu\text{g L}^{-1}$. Compared to the calibrations without prior concentration, concentration factors of about 20 to 30 were calculated for SMA, SMZ and STZ. However, for SDA, the concentration factor with SAX purification was only 5 (compared to 20 with HLB extraction without SAX purification), indicating that SDA remains

predominantly on the SAX column. This problem will be addressed in future experiments by optimizing the pH for SAX purification.

Various surface water samples and a sample of sewage treatment plant effluent from Augsburg were examined using the presented combined method and HPLC-MS for comparison. With HPLC-MS, SMX was detected in some samples. No signal reductions occurred with the immobilized rows of SMA, SDA and SMZ, as low concentrations of SMX did not produce any effect there. The immobilized STZ row, however, showed significant signal reductions in some cases. Finally, with a cutoff value of 79,5% (corresponding to the ascertained limit of detection) relative to the sulfonamide-free surface water samples used for calibration, six samples were correctly found to be positive, four samples were correctly found to be negative, and two samples were found to be false positive.

Overall, it can be concluded that the combined method of HLB extraction, SAX purification and chemiluminescence microarray immunoassay measurement is suitable as a screening method for the detection of antibiotics in surface water. In the future, efforts will be made to further lower the detection limits through larger sample volumes and associated higher concentration factors as well as pH optimization.

7.3 Results and Future Perspectives

This research has demonstrated that the flow-based chemiluminescence microarray immuno- and receptor assays presented here are ideally suited as screening methods for antibiotics in diverse liquid matrices, with no sample preparation required. Combination with SPE for concentration has also been successfully demonstrated.

In the coming years, monitoring of surface water and wastewater will become a major topic in environmental analysis [126, 127]. Quality requirements have already been established, e.g. in the European Water Framework Directive 2000/60/EC.

A pressing problem is that sewage treatment plants are not yet able to completely remove contaminants such as antibiotics from wastewater [128], so these compounds are discharged into the environment. In addition, heavy rainfall events, which are increasing as a result of climate change [129, 130], mobilize substances adsorbed in soil and leach them into surface waters [131]. Therefore, it would also be necessary to ensure that manure applied to fields does not contain antibiotics.

7 Summary and Outlook

Resistances that are already ubiquitous in some cases cannot be reversed. However, every effort must be made in the future to prevent further development of resistances to new antibiotics. For this purpose, it would be necessary to administer the so-called reserve antibiotics only in the case of infections with (multi-)resistant pathogens that cannot be treated in any other way. The current EU Regulation 2019/6 is therefore rightly criticized for not regulating the use of reserve antibiotics strictly enough and for justifying an unjustifiable administration on the grounds of animal welfare.

In order to ensure the effectiveness of antibiotics in the long term, considered use and appropriate treatment of the excreta of human and animal patients is very important, because every molecule that does not get into the environment is a long-term benefit for public health.

Literaturverzeichnis

1. Cassini, A.; Högberg, L. D.; Plachouras, D.; Quattrocchi, A.; Hoxha, A.; Simonsen, G. S.; Colomb-Cotinat, M., et al., *Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: A population-level modelling analysis*. *The Lancet Infectious Diseases* **2019**, *19* (1), 56-66.
2. Donner, S. *Gefährliche Krankenhauskeime – Wieso niederländische Kliniken sicherer sind als deutsche* (21.12.2017); geprüft am 14.04.2020; erreichbar unter: <https://www.spiegel.de/spiegelwissen/krankenhaus-keime-in-den-niederlanden-sind-patienten-sicherer-a-1184260.html>.
3. Fleming, A., *On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. Influenzæ*. *British Journal of Experimental Pathology* **1929**, *10* (3), 226-236.
4. Valentin-Weigand, P., *Teil II Allgemeine Bakteriologie: Antimikrobielle Wirkstoffe*, in: *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 10., aktualisierte Auflage* (Selbitz, H.-J.; Truyen, U.; Valentin-Weigand, P., Hrsg.). Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York **2015**, 134-138.
5. World Health Organization, *WHO report on surveillance of antibiotic consumption: 2016-2018 early implementation*. Genf **2018**.
6. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V., *GERMAP 2015 – Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland*. Antiinfectives Intelligence, Rheinbach **2016**.
7. Adler, N.; Balzer, F.; Blondzik, K.; Brauer, F.; Chorus, I.; Ebert, I.; Fiedler, T., et al., *Antibiotika und Antibiotikaresistenzen in der Umwelt – Hintergrund, Herausforderungen und Handlungsoptionen*. Umweltbundesamt **2018**.
8. Abraham, G.; Ammer, H.; Bankstahl, M.; Bäumer, W.; Ebert, U.; Fink, H.; Frey, H.-H., et al., *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin* (Löscher, W.; Richter, A., Hrsg.). Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York **2016**.

9. Wallmann, J.; Bode, C.; Heberer, T., *Abgabemengenerfassung von Antibiotika in Deutschland 2018*. Deutsches Tierärzteblatt **2019**, *67* (8), 1082-1090.
10. Flor, M.; Käsbohrer, A.; Kaspar, H.; Tenhagen, B.-A.; Wallmann, J., *Beiträge zur Evaluierung der 16. AMG-Novelle – Themenkomplex 1: Entwicklung der Antibiotikaabgabe- und -Verbrauchsmengen sowie der Therapiehäufigkeit*. Arbeitsgruppe Antibiotikaresistenz des Bundesinstituts für Risikobewertung und des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit **2018**.
11. Van Boeckel, T. P.; Brower, C.; Gilbert, M.; Grenfell, B. T.; Levin, S. A.; Robinson, T. P.; Teillant, A., et al., *Global trends in antimicrobial use in food animals*. Proceedings of the National Academy of Sciences **2015**, *112* (18), 5649-5654.
12. Krüger, M.; Seidler, T., *Allgemeine Bakteriologie*, in: *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 8., überarbeitete Auflage* (Mayr, A., Hrsg.). Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York **2007**, 344-392.
13. Noll, I.; Schweickert, B.; Tenhagen, B.-A.; Käsbohrer, A., *Antibiotikaverbrauch und Antibiotikaresistenz in der Human- und Veterinärmedizin*. Bundesgesundheitsblatt **2018**, *61* (5), 522-532.
14. aus der Beek, T.; Weber, F.-A.; Bergmann, A.; Hickmann, S.; Ebert, I.; Hein, A.; Küster, A., *Pharmaceuticals in the environment – global occurrences and perspectives*. Environmental Toxicology and Chemistry **2016**, *35* (4), 823-835.
15. Sharma, V. K.; Johnson, N.; Cizmas, L.; McDonald, T. J.; Kim, H., *A review of the influence of treatment strategies on antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes*. Chemosphere **2016**, *150*, 702-714.
16. Gothwal, R.; Shashidhar, T., *Antibiotic pollution in the environment: A review*. CLEAN – Soil, Air, Water **2015**, *43* (4), 479-489.
17. Kümmerer, K., *Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I*. Chemosphere **2009**, *75* (4), 417-434.
18. Westphal-Settele, K.; Konradi, S.; Balzer, F.; Schönfeld, J.; Schmithausen, R., *Die Umwelt als Reservoir für Antibiotikaresistenzen*. Bundesgesundheitsblatt **2018**, *61* (5), 533-542.

19. Kümmerer, K.; Henninger, A., *Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent*. *Clinical Microbiology and Infection* **2003**, 9 (12), 1203-1214.
20. Hu, X.; Zhou, Q.; Luo, Y., *Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, Northern China*. *Environmental Pollution* **2010**, 158 (9), 2992-2998.
21. Tenhagen, B.-A.; Werner, N.; Käsbohrer, A.; Kreienbrock, L., *Übertragungswege resistenter Bakterien zwischen Tieren und Menschen und deren Bedeutung – Antibiotikaresistenz im One-Health-Kontext*. *Bundesgesundheitsblatt* **2018**, 61 (5), 515-521.
22. Perret, D.; Gentili, A.; Marchese, S.; Greco, A.; Curini, R., *Sulphonamide residues in Italian surface and drinking waters: A small scale reconnaissance*. *Chromatographia* **2006**, 63 (5), 225-232.
23. Charuaud, L.; Jarde, E.; Jaffrezic, A.; Thomas, M.-F.; Le Bot, B., *Veterinary pharmaceutical residues from natural water to tap water: Sales, occurrence and fate*. *Journal of Hazardous Materials* **2019**, 361, 169-186.
24. World Health Organization, *Global action plan on antimicrobial resistances*. Genf **2015**.
25. European Commission, *A European one health action plan against antimicrobial resistance (AMR)*. **2017**.
26. Bundesregierung, *DART 2020 – Antibiotika-Resistenzen bekämpfen zum Wohl von Mensch und Tier*. **2015**.
27. Kloth, K.; Rye-Johnsen, M.; Didier, A.; Dietrich, R.; Martlbauer, E.; Niessner, R.; Seidel, M., *A regenerable immunochip for the rapid determination of 13 different antibiotics in raw milk*. *Analyst* **2009**, 134 (7), 1433-1439.
28. Pastor-Navarro, N.; Maquieira, Á.; Puchades, R., *Review on immunoanalytical determination of tetracycline and sulfonamide residues in edible products*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, 395 (4), 907-920.
29. Stahlmann, R.; Lode, H.; Barth, H.; Sonntag, H.-G., *Antibiotika und andere Therapeutika zur antiinfektiven Therapie*, in: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie*

- und Toxikologie, 12. Auflage* (Aktories, K.; Hofmann, F.; Förstermann, U.; Starke, K., Hrsg.). Elsevier, München **2017**, 701-762.
30. Jawetz, E.; Melnick, J. L.; Adelberg, E. A., *Medizinische Mikrobiologie, 4., überarbeitete und erweiterte Auflage*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg **1977**, 132-158.
31. Hänsel, R., *Aus Mikroorganismen hergestellte Arzneistoffe*, in: *Pharmazeutische Biologie – Molekulare Grundlagen und klinische Anwendungen* (Dingermann, T.; Hänsel, R.; Zündorf, I., Hrsg.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg **2002**, 309-310.
32. Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, *Fachinformation in Form der Zusammenfassung der Merkmale des Tierarzneimittels Ubrolexin* **2008**.
33. Bahrami, F.; Morris, D. L.; Pourgholami, M. H., *Tetracyclines: Drugs with huge therapeutic potential*. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry **2012**, 12 (1), 44-52.
34. Chopra, I.; Roberts, M., *Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance*. Microbiology and Molecular Biology reviews **2001**, 65 (2), 232-260.
35. Pérez-Rodríguez, M.; Pellerano, R. G.; Pezza, L.; Pezza, H. R., *An overview of the main foodstuff sample preparation technologies for tetracycline residue determination*. Talanta **2018**, 182, 1-21.
36. Dmitrienko, S. G.; Kochuk, E. V.; Apyari, V. V.; Tolmacheva, V. V.; Zolotov, Y. A., *Recent advances in sample preparation techniques and methods of sulfonamides detection – a review*. Analytica Chimica Acta **2014**, 850, 6-25.
37. García-Galán, M. J.; Díaz-Cruz, M. S.; Barceló, D.; Barceló, D., *Combining chemical analysis and ecotoxicity to determine environmental exposure and to assess risk from sulfonamides*. Trends in Analytical Chemistry **2009**, 28 (6), 804-819.
38. Ahmed, S.; Ning, J.; Cheng, G.; Ahmad, I.; Li, J.; Mingyue, L.; Qu, W., et al., *Receptor-based screening assays for the detection of antibiotics residues – a review*. Talanta **2017**, 166, 176-186.
39. Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, *Erfassung von Antibiotikarückständen in ausgewählten Lebensmitteln tierischer Herkunft*. **2013**.

40. Bilandžić, N.; Solomun Kolanović, B.; Varenina, I.; Jurković, Z., *Concentrations of veterinary drug residues in milk from individual farms in Croatia*. *Mljekarstvo* **2011**, *61* (3), 260-267.
41. Unusan, N., *Occurrence of chloramphenicol, streptomycin and tetracycline residues in ultra-heat-treatment milk marketed in Turkey*. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **2009**, *60* (5), 359-364.
42. Hakem, A.; Titouche, Y.; Houali, K.; Yabrir, B.; Malki, O.; Chenouf, N.; Yahiaoui, S., et al., *Screening of antibiotics residues in poultry meat by microbiological methods*. *Bulletin UASVM, Veterinary Medicine* **2013**, *70* (1), 77-82.
43. Ehsani, A.; Hashemi, M., *Determination of antibacterial drug residues in commercial eggs distributed in Urmia, Iran*. *Journal of Food Quality and Hazards Control* **2015**, *2* (2), 61-65.
44. Kim, P. V.; Degand, G.; Douny, C.; Pierret, G.; Delahaut, P.; Dinh, T. V.; Granier, B., et al., *Preliminary evaluation of antimicrobial residue levels in marketed pork and chicken meat in the Red River delta region of Vietnam*. *Food and Public Health* **2013**, *3* (6), 267-276.
45. Gaurav, A.; Gill, J. S.; Aulakh, R. S.; Bedi, J. S., *ELISA based monitoring and analysis of tetracycline residues in cattle milk in various districts of Punjab*. *Veterinary World* **2014**, *7* (1), 26-29.
46. Du, B.; Wen, F.; Zhang, Y.; Zheng, N.; Li, S.; Li, F.; Wang, J., *Presence of tetracyclines, quinolones, lincomycin and streptomycin in milk*. *Food Control* **2019**, *100*, 171-175.
47. Zhang, Y. D.; Zheng, N.; Han, R. W.; Zheng, B. Q.; Yu, Z. N.; Li, S. L.; Zheng, S. S., et al., *Occurrence of tetracyclines, sulfonamides, sulfamethazine and quinolones in pasteurized milk and UHT milk in China's market*. *Food Control* **2014**, *36* (1), 238-242.
48. Olatoye, I. O.; Basiru, A., *Antibiotic usage and oxytetracycline residue in African catfish (*Clarias gariepinus*) in Ibadan, Nigeria*. *World Journal of Fish and Marine Sciences* **2013**, *5* (3), 302-309.
49. Hamscher, G.; Pawelzick, H. T.; Höper, H.; Nau, H., *Different behavior of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2005**, *24* (4), 861-868.

50. Martínez-Carballo, E.; González-Barreiro, C.; Scharf, S.; Gans, O., *Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria*. Environmental Pollution **2007**, *148* (2), 570-579.
51. Jacobsen, A. M.; Halling-Sørensen, B., *Multi-component analysis of tetracyclines, sulfonamides and tylosin in swine manure by liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry **2006**, *384* (5), 1164-1174.
52. Conde-Cid, M.; Álvarez-Esmorís, C.; Paradelo-Núñez, R.; Nóvoa-Muñoz, J. C.; Arias-Estévez, M.; Álvarez-Rodríguez, E.; Fernández-Sanjurjo, M. J., et al., *Occurrence of tetracyclines and sulfonamides in manures, agricultural soils and crops from different areas in Galicia (NW Spain)*. Journal of Cleaner Production **2018**, *197*, 491-500.
53. Li, Y.-X.; Zhang, X.-L.; Li, W.; Lu, X.-F.; Liu, B.; Wang, J., *The residues and environmental risks of multiple veterinary antibiotics in animal faeces*. Environmental Monitoring and Assessment **2013**, *185* (3), 2211-2220.
54. Ghirardini, A.; Grillini, V.; Verlicchi, P., *A review of the occurrence of selected micropollutants and microorganisms in different raw and treated manure – environmental risk due to antibiotics after application to soil*. Science of the Total Environment **2020**, *707*, Artikel-Nr. 136118.
55. Hou, J.; Wan, W.; Mao, D.; Wang, C.; Mu, Q.; Qin, S.; Luo, Y., *Occurrence and distribution of sulfonamides, tetracyclines, quinolones, macrolides, and nitrofurans in livestock manure and amended soils of Northern China*. Environmental Science and Pollution Research **2015**, *22* (6), 4545-4554.
56. Kuppusamy, S.; Kakarla, D.; Venkateswarlu, K.; Megharaj, M.; Yoon, Y.-E.; Lee, Y. B., *Veterinary antibiotics (VAs) contamination as a global agro-ecological issue: A critical view*. Agriculture, Ecosystems & Environment **2018**, *257*, 47-59.
57. Daghrrir, R.; Drogui, P., *Tetracycline antibiotics in the environment: A review*. Environmental Chemistry Letters **2013**, *11* (3), 209-227.
58. Burke, V.; Richter, D.; Greskowiak, J.; Mehrtens, A.; Schulz, L.; Massmann, G., *Occurrence of antibiotics in surface and groundwater of a drinking water catchment area in Germany*. Water Environment Research **2016**, *88* (7), 652-659.
59. Hamscher, G.; Sczesny, S.; Höper, H.; Nau, H., *Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid*

- chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Analytical Chemistry **2002**, *74* (7), 1509-1518.
60. Awad, Y. M.; Kim, S.-C.; Abd El-Azeem, S. A. M.; Kim, K.-H.; Kim, K.-R.; Kim, K.; Jeon, C., et al., *Veterinary antibiotics contamination in water, sediment, and soil near a swine manure composting facility*. Environmental Earth Sciences **2014**, *71* (3), 1433-1440.
61. Christian, T.; Schneider, R. J.; Färber, H. A.; Skutlarek, D.; Meyer, M. T.; Goldbach, H. E., *Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters*. Acta Hydrochimica et Hydrobiologica **2003**, *31* (1), 36-44.
62. Kumar, K.; Gupta, S. C.; Baidoo, S. K.; Chander, Y.; Rosen, C. J., *Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure*. Journal of Environmental Quality **2005**, *34* (6), 2082-2085.
63. Azanu, D.; Mortey, C.; Darko, G.; Weisser, J. J.; Styrihave, B.; Abaidoo, R. C., *Uptake of antibiotics from irrigation water by plants*. Chemosphere **2016**, *157*, 107-114.
64. Tadić, Đ.; Matamoros, V.; Bayona, J. M., *Simultaneous determination of multiclass antibiotics and their metabolites in four types of field-grown vegetables*. Analytical and Bioanalytical Chemistry **2019**, *411* (20), 5209-5222.
65. Aydin, S.; Aydin, M. E.; Ulvi, A.; Kilic, H., *Antibiotics in hospital effluents: Occurrence, contribution to urban wastewater, removal in a wastewater treatment plant, and environmental risk assessment*. Environmental Science and Pollution Research **2019**, *26* (1), 544-558.
66. Rossmann, J.; Schubert, S.; Gurke, R.; Oertel, R.; Kirch, W., *Simultaneous determination of most prescribed antibiotics in multiple urban wastewater by SPE-LC-MS/MS*. Journal of Chromatography B **2014**, *969*, 162-170.
67. Deblonde, T.; Cossu-Leguille, C.; Hartemann, P., *Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature*. International Journal of Hygiene and Environmental Health **2011**, *214* (6), 442-448.
68. Watkinson, A. J.; Murby, E. J.; Kolpin, D. W.; Costanzo, S. D., *The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water*. Science of the Total Environment **2009**, *407* (8), 2711-2723.

69. Rodríguez-Mozaz, S.; Vaz-Moreira, I.; Varela Della Giustina, S.; Llorca, M.; Barceló, D.; Schubert, S.; Berendonk, T. U., et al., *Antibiotic residues in final effluents of European wastewater treatment plants and their impact on the aquatic environment*. Environment International **2020**, *140*, Artikel-Nr. 105733.
70. Wei, R.-C.; Ge, F.; Chen, M.; Huang, S.-Y.; Wang, R., *Pollution of tetracyclines from livestock and poultry farms in aquatic environment in Jiangsu province, China*. Journal of Agro-Environment Science **2010**.
71. Matsui, Y.; Ozu, T.; Inoue, T.; Matsushita, T., *Occurrence of a veterinary antibiotic in streams in a small catchment area with livestock farms*. Desalination **2008**, *226* (1), 215-221.
72. Lindsey, M. E.; Meyer, M.; Thurman, E. M., *Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry*. Analytical Chemistry **2001**, *73* (19), 4640-4646.
73. Richardson, S. D.; Ternes, T. A., *Water analysis: Emerging contaminants and current issues*. Analytical Chemistry **2018**, *90* (1), 398-428.
74. Boxall, A. B. A.; Fogg, L. A.; Blackwell, P. A.; Blackwell, P.; Kay, P.; Pemberton, E. J.; Croxford, A., *Veterinary medicines in the environment*. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology **2004**, *180*, 1-91.
75. Cháfer-Pericás, C.; Maquieira, Á.; Puchades, R., *Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples*. Trends in Analytical Chemistry **2010**, *29* (9), 1038-1049.
76. Suhren, G.; Heeschen, W., *Detection of inhibitors in milk by microbial tests – a review*. Food **1996**, *40* (1), 1-7.
77. Pikkemaat, M. G., *Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals*. Analytical and Bioanalytical Chemistry **2009**, *395* (4), 893-905.
78. Hussein, K., *Experimental design for the microbiological four-plate test for the detection of sulphadimidine residues at the levels of concern*. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy **2004**, *48*, 403-407.

79. Aerts, M. M. L.; Hogenboom, A. C.; Brinkman, U. A. T., *Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications **1995**, 667 (1), 1-40.
80. Okocha, R. C.; Olatoye, I. O.; Adedeji, O. B., *Food safety impacts of antimicrobial use and their residues in aquaculture*. Public Health Reviews **2018**, 39, Artikel-Nr. 21.
81. Navrátilová, P., *Screening methods used for the detection of veterinary drug residues in raw cow milk – a review*. Czech Journal of Food Sciences. **2008**, 26, 393-401.
82. Pellegrini, G. E.; Carpico, G.; Coni, E., *Electrochemical sensor for the detection and presumptive identification of quinolone and tetracycline residues in milk*. Analytica Chimica Acta **2004**, 520 (1), 13-18.
83. Dasenaki, M. E.; Thomaidis, N. S., *Multi-residue determination of 115 veterinary drugs and pharmaceutical residues in milk powder, butter, fish tissue and eggs using liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta **2015**, 880, 103-121.
84. Batt, A. L.; Aga, D. S., *Simultaneous analysis of multiple classes of antibiotics by ion trap LC/MS/MS for assessing surface water and groundwater contamination*. Analytical Chemistry **2005**, 77 (9), 2940-2947.
85. Gentili, A.; Perret, D.; Marchese, S., *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products*. Trends in Analytical Chemistry **2005**, 24 (7), 704-733.
86. Gaudin, V., *Advances in biosensor development for the screening of antibiotic residues in food products of animal origin – a comprehensive review*. Biosensors and Bioelectronics **2017**, 90, 363-377.
87. Viñas, P.; Balsalobre, N.; López-Erroz, C.; Hernández-Córdoba, M., *Liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the analysis of tetracycline residues in honey*. Journal of Chromatography A **2004**, 1022 (1), 125-129.
88. Cháfer-Pericás, C.; Maquieira, Á.; Puchades, R.; Miralles, J.; Moreno, A., *Fast screening immunoassay of sulfonamides in commercial fish samples*. Analytical and Bioanalytical Chemistry **2010**, 396 (2), 911-921.

89. Rebe Raz, S.; Bremer, M. G. E. G.; Haasnoot, W.; Norde, W., *Label-free and multiplex detection of antibiotic residues in milk using imaging surface plasmon resonance-based immunosensor*. *Analytical Chemistry* **2009**, *81* (18), 7743-7749.
90. Seidel, M.; Niessner, R., *Chemiluminescence microarrays in analytical chemistry: A critical review*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2014**, *406* (23), 5589-5612.
91. Seidel, M.; Niessner, R., *Automated analytical microarrays: A critical review*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *391* (5), 1521-1544.
92. Wolter, A.; Niessner, R.; Seidel, M., *Preparation and characterization of functional poly(ethylene glycol) surfaces for the use of antibody microarrays*. *Analytical Chemistry* **2007**, *79* (12), 4529-4537.
93. Liu, X.; Huang, D.; Lai, C.; Zeng, G.; Qin, L.; Zhang, C.; Yi, H., et al., *Recent advances in sensors for tetracycline antibiotics and their applications*. *Trends in Analytical Chemistry* **2018**, *109*, 260-274.
94. Strehlitz, B.; Reinemann, C.; Linkorn, S.; Stoltenburg, R., *Aptamers for pharmaceuticals and their application in environmental analytics*. *Bioanalytical Reviews* **2012**, *4* (1), 1-30.
95. Andrade-Eiroa, A.; Canle, M.; Leroy-Cancellieri, V.; Cerdà, V., *Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review. Part II*. *Trends in Analytical Chemistry* **2016**, *80*, 655-667.
96. Cacciatore, G.; Petz, M.; Rachid, S.; Hakenbeck, R.; Bergwerff, A. A., *Development of an optical biosensor assay for detection of beta-lactam antibiotics in milk using the penicillin-binding protein 2X*. *Analytica Chimica Acta* **2004**, *520* (1-2), 105-115.
97. Bruch, R.; Chatelle, C.; Kling, A.; Rebmann, B.; Wirth, S.; Schumann, S.; Weber, W., et al., *Clinical on-site monitoring of β -lactam antibiotics for a personalized antibiotherapy*. *Scientific Reports* **2017**, *7*, Artikel-Nr. 3127.
98. Valentin-Weigand, P., *Teil II Allgemeine Bakteriologie: 5 Antimikrobielle Wirkstoffe*, in: *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 9., vollständig überarbeitete Auflage* (Selbitz, H.-J.; Truyen, U.; Valentin-Weigand, P., Hrsg.). Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York **2011**, 125-129.

99. Poole, K., *Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms*. *Annals of Medicine* **2007**, *39* (3), 162-176.
100. Wang, W.; Guo, Q.; Xu, X.; Sheng, Z.-k.; Ye, X.; Wang, M., *High-level tetracycline resistance mediated by efflux pumps Tet(A) and Tet(A)-I with two start codons*. *Journal of Medical Microbiology* **2014**, *63* (11), 1454-1459.
101. Orth, P.; Schnappinger, D.; Hillen, W.; Saenger, W.; Hinrichs, W., *Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor–operator system*. *Nature Structural Biology* **2000**, *7*, 215-219.
102. Berens, C.; Hillen, W., *Gene regulation by tetracyclines*. *European Journal of Biochemistry* **2003**, *270* (15), 3109-3121.
103. Saenger, W.; Orth, P.; Kisker, C.; Hillen, W.; Hinrichs, W., *Der Tetracyclin-Repressor – das Musterbeispiel für einen biologischen Schalter*. *Angewandte Chemie* **2000**, *112* (12), 2122-2133.
104. Aleksandrov, A.; Schuldt, L.; Hinrichs, W.; Simonson, T., *Tetracycline-Tet repressor binding specificity: Insights from experiments and simulations*. *Biophysical Journal* **2009**, *97* (10), 2829-2838.
105. Aleksandrov, A.; Schuldt, L.; Hinrichs, W.; Simonson, T., *Tet repressor induction by tetracycline: A molecular dynamics, continuum electrostatics, and crystallographic study*. *Journal of Molecular Biology* **2008**, *378* (4), 898-912.
106. Palm, G. J.; Lederer, T.; Orth, P.; Saenger, W.; Takahashi, M.; Hillen, W.; Hinrichs, W., *Specific binding of divalent metal ions to tetracycline and to the Tet repressor/tetracycline complex*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2008**, *13* (7), 1097-1110.
107. Virolainen, N. E.; Pikkemaat, M. G.; Elferink, J. W. A.; Karp, M. T., *Rapid detection of tetracyclines and their 4-epimer derivatives from poultry meat with bioluminescent biosensor bacteria*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56* (23), 11065-11070.
108. Wang, G.; Zhang, H. C.; Liu, J.; Wang, J. P., *A receptor-based chemiluminescence enzyme linked immunosorbent assay for determination of tetracyclines in milk*. *Analytical Biochemistry* **2019**, *564-565*, 40-46.

109. Link, N.; Weber, W.; Fussenegger, M., *A novel generic dipstick-based technology for rapid and precise detection of tetracycline, streptogramin and macrolide antibiotics in food samples*. *Journal of Biotechnology* **2007**, *128* (3), 668-680.
110. Weber, C. C.; Link, N.; Fux, C.; Zisch, A. H.; Weber, W.; Fussenegger, M., *Broad-spectrum protein biosensors for class-specific detection of antibiotics*. *Biotechnology and Bioengineering* **2005**, *89* (1), 9-17.
111. Pellinen, T.; Rytönen, K.; Ristiniemi, N.; Karp, M.; Lamminmaki, U., *Protein-DNA interaction-based detection of small molecules by employing Renilla luciferase fusion protein: Quantitative and generic measurement of tetracyclines with a Renilla luciferase-tagged Tet repressor protein*. *Analytical Biochemistry* **2006**, *358* (2), 301-303.
112. Kling, A.; Chatelle, C.; Armbrrecht, L.; Qelibari, E.; Kieninger, J.; Dincer, C.; Weber, W., et al., *Multianalyte antibiotic detection on an electrochemical microfluidic platform*. *Analytical Chemistry* **2016**, *88* (20), 10036-10043.
113. Andree, U.; Mueller-Seitz, E.; Usai, I.; Loeber, S.; Gmeiner, P.; Wimmer, C.; Hillen, W., et al., *Tetracycline sensing using novel doxycycline derivatives immobilized on different surface plasmon resonance biosensor surfaces*. *Bioanalysis* **2010**, *2* (2), 217-227.
114. Moeller, N.; Mueller-Seitz, E.; Scholz, O.; Hillen, W.; Bergwerff, A. A.; Petz, M., *A new strategy for the analysis of tetracycline residues in foodstuffs by a surface plasmon resonance biosensor*. *European Food Research and Technology* **2007**, *224* (3), 285-292.
115. Meyer, V. K.; Chatelle, C. V.; Weber, W.; Niessner, R.; Seidel, M., *Flow-based regenerable chemiluminescence receptor assay for the detection of tetracyclines*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2020**, *412*, 3467-3476.
116. Tölgyessy, P.; Liška, I., *Study of applicability of various solid-phase extraction materials for sample handling in screening analysis of organic micropollutants in water*. *Journal of Chromatography A* **1999**, *857* (1), 247-254.
117. Rouquerol, F.; Rouquerol, J.; Sing, K. S. W.; Llewellyn, P.; Maurin, G., *Adsorption by powders and porous solids, 2. Auflage*. Academic Press, Oxford **2012**, 1-24.

118. Posyniak, A.; Śniegocki, T.; Żmudzki, J., *Solid phase extraction and liquid chromatography analysis of sulfonamide residues in honey*. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy **2002**, *46*, 111-117.
119. Kim, D. H.; Choi, J. O.; Kim, J.; Lee, D. W., *Application of a polymeric solid phase extraction for the analysis of sulfonamides in milk by LC/MS*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies **2003**, *26* (7), 1149-1159.
120. Schulze, T.; Ahel, M.; Ahlheim, J.; Ait-Aïssa, S.; Brion, F.; Di Paolo, C.; Froment, J., et al., *Assessment of a novel device for onsite integrative large-volume solid phase extraction of water samples to enable a comprehensive chemical and effect-based analysis*. Science of the Total Environment **2017**, *581-582*, 350-358.
121. Pan, X.; Qiang, Z.; Ben, W.; Chen, M., *Simultaneous determination of three classes of antibiotics in the suspended solids of swine wastewater by ultrasonic extraction, solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry*. Journal of Environmental Sciences (China) **2011**, *23* (10), 1729-1737.
122. Lengger, S.; Otto, J.; Elsässer, D.; Schneider, O.; Tiehm, A.; Fleischer, J.; Niessner, R., et al., *Oligonucleotide microarray chip for the quantification of MS2, ΦX174, and adenoviruses on the multiplex analysis platform MCR 3*. Analytical and Bioanalytical Chemistry **2014**, *406* (14), 3323-3334.
123. Ward, J. F.; Evans, J. W.; Limoli, C. L.; Calabro-Jones, P. M., *Radiation and hydrogen peroxide induced free radical damage to DNA*. The British Journal of Cancer. Supplement **1987**, *8*, 105-112.
124. Wutz, K.; Niessner, R.; Seidel, M., *Simultaneous determination of four different antibiotic residues in honey by chemiluminescence multianalyte chip immunoassays*. Microchimica Acta **2011**, *173* (1-2), 1-9.
125. Zhou, L.-J.; Ying, G.-G.; Liu, S.; Zhao, J.-L.; Chen, F.; Zhang, R.-Q.; Peng, F.-Q., et al., *Simultaneous determination of human and veterinary antibiotics in various environmental matrices by rapid resolution liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A **2012**, *1244*, 123-138.
126. Literathy, P.; Laszlo, F., *Harmonisation of micropollutant monitoring in large international river: Danube*. Water Science and Technology **1995**, *32* (5), 125-137.

127. Petrie, B.; Proctor, K.; Youdan, J.; Barden, R.; Kasprzyk-Hordern, B., *Critical evaluation of monitoring strategy for the multi-residue determination of 90 chiral and achiral micropollutants in effluent wastewater*. *Science of the Total Environment* **2017**, *579*, 569-578.
128. Batt, A. L.; Bruce, I. B.; Aga, D. S., *Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges*. *Environmental Pollution* **2006**, *142* (2), 295-302.
129. Jentsch, A.; Beierkuhnlein, C., *Research frontiers in climate change: Effects of extreme meteorological events on ecosystems*. *Comptes Rendus Geoscience* **2008**, *340* (9), 621-628.
130. Villarini, G.; Smith, J. A.; Vecchi, G. A., *Changing frequency of heavy rainfall over the central united states*. *Journal of Climate* **2013**, *26* (1), 351-357.
131. Ghirardini, A.; Verlicchi, P., *A review of selected microcontaminants and microorganisms in land runoff and tile drainage in treated sludge-amended soils*. *Science of the Total Environment* **2019**, *655*, 939-957.