

Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 78 (1987)

Heft: 2

Artikel: Immunchemische Methoden in der Lebensmittelanalytik =
Immunochemical methods for analysis of foods

Autor: Lüthy, J. / Windemann, Helena

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-982981>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 08.02.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Immunochemische Methoden in der Lebensmittelanalytik*

Immunochemical Methods for Analysis of Foods

J. Lüthy und Helena Windemann

Bundesamt für Gesundheitswesen, Bern, und Institut für Biochemie,
Laboratorium für Lebensmittelchemie der Universität Bern

Einleitung

Der Zeitpunkt, um über die Anwendung immunochemischer Methoden in der Lebensmittelanalytik zu sprechen, ist aus mehreren Gründen besonders günstig. Zum einen ist die Anzahl der Originalpublikationen über dieses Gebiet derzeit noch überblickbar: Es sind insgesamt nicht mehr als etwa 200 Publikationen erschienen, die meisten davon in den letzten Jahren. Dies steht in einem gewissen Gegensatz zur klinischen Chemie: Die Anwendung solcher Methoden ist dort viel früher erfolgt. Man steht also unter dem Eindruck, dass der Lebensmittelchemiker, dessen Denken stark von der Instrumentalanalytik geprägt ist, den immunologischen Methoden in der Vergangenheit und auch heute noch eher reserviert gegenüber steht. Es ist jedoch zu erwarten, dass in nächster Zeit eine Vielzahl von immunologischen Reagenzien im Handel erhältlich sein wird, und dies dürfte dann der Anwendung immunologischer Methoden in der Lebensmittelanalytik wohl zum Durchbruch verhelfen. Eine ähnliche Entwicklung jedenfalls war vor einigen Jahren bei den in vielerlei Hinsicht vergleichbaren enzymatischen Methoden zu beobachten. Als weiterer Grund für die zunehmende Wichtigkeit immunologischer Verfahren ganz allgemein darf die leichtere Zugänglichkeit zu sog. monoklonalen Antikörpern (1) angegeben werden. Diese von Köhler und Milstein (2, 3) im Jahre 1975 eingeführte Technik dürfte v. a. eine wesentliche Verbesserung der Reproduzierbarkeit, der Vergleichbarkeit und der Spezifität dieser Methoden ermöglichen.

* Vortrag gehalten an der 98. Jahresversammlung der Schweiz. Gesellschaft für Analytische und Angewandte Chemie vom 5./6. September 1986 in Pruntrut.

Nicht ganz einfach ist die Abgrenzung zu anderen biologischen Methoden (4). Beim «Bioassay» (5) verwendet man die Wechselwirkung von chemischen Substanzen mit lebenden Systemen (Tiere, Pflanzen, Mikroorganismen oder Zellkulturen) zu analytischen Zwecken. Die Anwendung ist im wesentlichen beschränkt auf toxische und lebensnotwendige Stoffe. Enzymatische Methoden (6) haben demgegenüber einen etwas grösseren Anwendungsbereich: Hier werden einerseits Stoffe des Primärstoffwechsels erfasst, andererseits sind Aktivitätsbestimmungen von lebensmitteleigenen Enzymen möglich. Der grösste Anwendungsbereich aber ist sicherlich den hier zur Diskussion stehenden immunologischen Methoden (7, 8) zuzuschreiben. Im Prinzip ist die Bestimmung von fast allen organischen Stoffen damit möglich und keineswegs nur auf Proteine beschränkt. Auch gegen niedermolekulare Stoffe (Haptene) lassen sich Antikörper gewinnen. Zudem bleibt die Kombination immunologischer Methoden mit anderen analytischen Techniken ein aussergewöhnlich vielfältiges und noch lange nicht voll ausgeschöpftes Betätigungsfeld für den analytisch tätigen Chemiker.

Theoretische Grundlagen

Mechanismus der Immunantwort

Mensch und Säugetiere verfügen über zwei Abwehrsysteme gegenüber Fremdstoffen oder eingedrungenen Organismen: a) ein unspezifisches, bestehend aus sog. «Fresszellen» und b) ein hochspezifisches, das eine etwas längere Aktivierungszeit braucht (ca. 5–8 Tage) und zur Bildung von «immunkompetenten» Zellen führt. Dieses uns hier in erster Linie interessierende System ist sowohl auf zellulärer wie auch auf molekularer Ebene sehr gut erforscht.

Die Vorläuferzellen des Immunsystems stammen vom Knochenmark und gelangen in die Blut- und Lymphbahn als *Lymphozyten*. Bei den Lymphozyten unterscheidet man wiederum zwischen zwei Zelltypen: die sog. *B-Zellen* und die *T-Zellen*, die in verschiedenen Organen heranreifen und auch unterschiedliche Aufgaben im Organismus zu erfüllen haben. Uns interessieren hier vor allem die B-Lymphozyten, deren Reifung in der Milz und in den Lymphknoten erfolgt. Diese B-Lymphozyten sind befähigt, lösliche Fremdkörper, sog. Immunogene, zu erkennen, dagegen spezifische Antikörper auszubilden und aus der Zelle auszuscheiden.

Nicht alle Fremdkörper oder -stoffe sind gleich gute Immunogene: Bei Fremdproteinen erfolgt die Immunantwort in der Regel rasch und spezifisch, während Polysaccharide und vor allem Nucleinsäuren als schlechte Immunogene gelten.

Was ist nun der Mechanismus dieser Immunantwort? Nach der sog. *Clon-Selektions-Theorie* stimuliert das Immunogen nur solche Zellen, die aufgrund ihres genetischen Codes in der Lage sind, spezifisch gegen das betreffende Immunogen gerichtete Antikörper zu produzieren. Wesentlich ist hierbei, dass nie das Immu-

nogen als ganzes, sondern immer nur bestimmte, räumlich eng begrenzte Bereiche, sog. *determinante Gruppen*, die Immunreaktion auslösen. Der Körper verfügt über eine sehr grosse, aber schliesslich doch begrenzte Zahl von verschiedenen immunkompetenten Zellen. Diejenige Zelle, die über einen Immunogen-Rezeptor verfügt, wird ausgewählt und zu einer Zellvermehrung (Proliferation) angeregt. Die dann von diesen Zellen innerhalb einer Woche produzierten Antikörper verfügen über dieselben Bindungseigenschaften gegenüber dem Immunogen wie der auf der Zelloberfläche gelegene Immunogen-Rezeptor. Da ein Immunogen immer über eine ganze Anzahl von determinanten Gruppen verfügt, sind auch die in vivo gebildeten Antikörper unterschiedlich in ihrer Spezifität, da sie aus verschiedenen Zellklonen stammen (sog. *polyklonale Antikörper*).

Welches sind denn nun die molekularen Eigenschaften dieser gebildeten Antikörper? Relativ früh schon hat man festgestellt, dass Antikörper der γ -Globulinfraktion des Blutserums angehören. Das klassische Experiment hierzu wurde vor ca. 40 Jahren durchgeführt. Trennt man das Serum eines immunisierten Kaninchens vor und nach Zugabe des entsprechenden Antigens elektrophoretisch auf, so führt eine solche Behandlung zu einer Konzentrationsverminderung der γ -Globulinbande.

Der molekulare Aufbau der Immunoglobuline ist vor allem in den 60iger Jahren geklärt worden. Antikörper haben einen Y-förmigen Aufbau und bestehen aus zwei leichten und zwei schweren Eiweissketten, die über Schwefelbrücken zusammengehalten werden. Unterscheiden kann man zudem zwischen einem in allen Antikörpern gleich auftretenden *konstanten* und einem *variablen Teil*, bestehend aus den beiden oberen Enden des Y, wo auch die zwei Bindungsstellen für das Antigen lokalisiert sind. Die Struktur dieses V-Teils entscheidet also über die Spezifität des Antikörpers. Der Organismus ist in der Lage, bis zu 10^7 verschiedene Antikörper hervorzubringen. Dies mag auch als Illustration für die praktisch unerschöpflichen analytischen Möglichkeiten dienen. Die Bifunktionalität des Antikörpers ist wesentlich bei der Antigen-Antikörper-Reaktion: Wenn Antikörper und Antigen in äquivalenten Mengen vorliegen, kommt es zu einer Vernetzung (weil das Antigen mehrere determinante Gruppen besitzt) und zu einer Ausfällung des Proteins. Dies bildet die Basis für die schon am längsten bekannte analytische Anwendung: die *Immunopräzipitation*, eine in der Serologie häufig benutzte Methode.

Betrachtet man die Antikörper und die kunstvolle Art ihrer Bildung im Organismus, so ist wohl die Aussage gerechtfertigt, dass beim Immunoassay die hochentwickelte Technologie im Reagenz steckt und nicht wie bei den instrumental-analytischen Methoden im Apparat.

Antikörper gegen niedermolekulare Verbindungen

Niedermolekulare Stoffe sind an sich keine Immunogene und können daher auch nicht als solche zur Gewinnung von Antikörpern eingesetzt werden. Mit einem Trick aber kann man sozusagen die Natur überlisten und dieses Ziel trotz-

dem erreichen. Man verknüpft die niedermolekulare Verbindung, die man in der Immunologie als *Hapten* bezeichnet, mit einem Trägerprotein und verwendet diesen Stoff als Immunogen. Die derart erzeugten Antikörper reagieren dann auch mit dem Hapten. Als Trägerprotein verwendet man z. B. ein Polylysin, das allein ein schlechtes Immunogen darstellt.

Es gibt eine Anzahl von Standard-Methoden, wie man Haptene kovalent an das Trägerprotein binden kann. Es sind dies dieselben Verfahren, wie sie auch in der Peptidchemie üblich sind, wobei die Wahl des Verfahrens natürlich davon abhängig ist, was für funktionelle Gruppen im Hapten zur Verfügung stehen. Am häufigsten wird die Carbodiimid-Methode eingesetzt. Die Art der Verknüpfung des Haptens kann grosse Auswirkungen auf die Spezifität der erzeugten Antiseren haben. Es hat sich hierbei gezeigt, dass es am ehesten zu Kreuzreaktionen kommen kann mit Molekülen, die in der Nähe der Verknüpfungsstelle verändert sind.

Bestimmung der Antigen-Antikörper-Bindung

Es existiert eine Vielfalt von Möglichkeiten, eine Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar oder messbar zu machen. Im Rahmen dieser Ausführungen sollen jedoch nur drei dieser Techniken näher besprochen werden.

Präzipitation im Gel

Die quantitative Präzipitationstechnik ist schon im Jahre 1929 durch *Heidelberg* und *Kendall* (9) eingeführt und seither stetig verfeinert oder mit anderen biochemischen Methoden kombiniert worden. Am bekanntesten ist hierbei die *doppelte Immunodiffusions-Technik nach Ouchterlony* (10), von der zahlreiche Anwendungen in der Literatur beschrieben wurden. Üblicherweise werden in der Mitte eines Agarosegels die Antikörperlösung und in kreisförmiger Anordnung die verschiedenen Prüflösungen mit oder ohne zu detektierendes Antigen aufgetragen. Bei positiver Reaktion kommt es im Mischungsbereich zur Bildung von Präzipitationsbanden. Eine der wichtigsten Anwendungen in der Lebensmittelanalytik ist der Nachweis von Fremdproteinen in Fleischprodukten (11) bzw. der Nachweis einer Verfälschung anderer Lebensmittel (12, 13). Weiterentwicklungen der Präzipitationstechnik sind die von *Grabar* und *Williams* (14) erstmals 1959 beschriebene *Immunoelktrophorese* bzw. die von *Laurell* (15) 1966 eingeführte *Rocket-Immunoelktrophorese*. Diese letztere Technik bringt zwar bezüglich Empfindlichkeit (im μg -Bereich) keine Verbesserung gegenüber der Immunodiffusion, dagegen handelt es sich um ein Verfahren, das auch eine quantitative Auswertung erlaubt.

Radioimmunoassay

Die Messung der Antigen-Antikörper-Bindung ist aber noch auf anderem Wege möglich als durch Präzipitation, nämlich durch Benutzung einer Bezugssubstanz, die man als Tracer bezeichnet – wobei der Tracer nicht identisch sein muss mit dem Antigen. Am einfachsten zu verstehen ist dieses Prinzip beim *Radioim-*

radioimmunoassay (RIA), der im Jahre 1958 erstmals durch *Berson and Yalow* (16) in die Laboratoriumspraxis eingeführt worden ist. In den meisten Fällen wird beim RIA radioaktiv markiertes Antigen als Tracer verwendet.

Dieser Test besteht aus drei Schritten:

1. Zugabe von radioaktiv markiertem Tracer im Überschuss zum Antikörper; Abtrennen von nichtgebundenem Tracer; Bestimmung des gebundenen Tracers durch eine Radioaktivitätsmessung.
2. Zugabe von gleicher Menge Tracer und wenig Antigen zum Antikörper mit sonst gleichem Vorgehen wie oben.
3. Zugabe von gleicher Menge Tracer und viel Antigen zum Antikörper mit wiederum gleichem Vorgehen wie oben.

Im Prinzip handelt es sich hier um nichts anderes als um eine Isotopenverdünnungs-Analyse, wobei bei der quantitativen Auswertung von der Voraussetzung ausgegangen wird, dass es sich bei der Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, auf die das Massenwirkungsgesetz anwendbar ist.

Der kritische Punkt des Testes ist die Trennung von nichtgebundenem Antigen (bzw. Tracer) vom Antigen-Antikörper-Komplex. Diese Trennung sollte schnell, vollständig und – bei einem Routine-Test auch von Bedeutung – mit geringem Aufwand erfolgen. Zusätzlich wichtig ist hierbei, dass keine Dissoziation des Antigen-Antikörper-Komplexes erfolgt. Da es sich um eine eher labile Bindung handelt, scheiden allzu drastische Abtrennungsmethoden von vornherein aus. In Frage kommen neben Ultrazentrifugation und Gelfiltration vor allem Fällungsmittel (Salzlösungen oder organische Lösungsmittel) und Adsorptionsmethoden (z. B. Aktivkohle).

Die Empfindlichkeit des RIA hängt von der spezifischen Aktivität des Tracers ab, die möglichst hoch sein sollte. Andererseits sollte die Lebensdauer des Isotops auch nicht zu kurzlebig sein. Am häufigsten eingesetzt werden Tritium und die Jod-Isotopen, während ^{14}C wegen der geringen spezif. Aktivität weniger Verwendung findet.

Ein wesentlicher Vorteil beim RIA ist, dass die Komplexbildungskonstanten des markierten und des unmarkierten Antigen-Antikörper-Komplexes praktisch gleich sind. (Dies ist beim noch zu besprechenden ELISA-Test nicht immer der Fall.) Dem stehen aber zwei gewichtige Nachteile gegenüber: Zum einen ist die Stabilität des markierten Antigens hoher spezifischer Aktivität nicht immer gewährleistet, und zweitens ist man beim RIA gezwungen, mit hohen Radioaktivitäten zu arbeiten, was nur mit geschultem Personal und geeigneten Laboreinrichtungen möglich ist. Dieser zweite Punkt ist ein so gewichtiger Nachteil, dass eine Anwendung des RIA im lebensmittelanalytischen Labor kaum in Frage kommt.

Enzym-Immunoassay (EIA)

Der Enzym-Immunoassay ist dadurch charakterisiert, dass die qualitative Erfassung des Tracers durch eine einfache Enzymbestimmung erfolgt. Üblicherweise wird als Tracer sowohl ein mit einem Enzym markiertes Antigen wie auch ein

derart markierter Antikörper verwendet. Seit der Einführung dieses Testes im Jahre 1971 (17, 18) sind allerdings zahlreiche Versuchsvarianten entwickelt worden (19, 20). Welche Anforderungen sind an ein solches Enzym als Marker zu stellen?

- Hohe spezifische Aktivität
- einfache und empfindliche Detektionsmethode
- Möglichkeit der Konjugation mit dem Antigen ohne wesentliche Aktivitätseinbußen
- gute Stabilität unter Versuchs- und Lagerbedingungen
- im Handel erhältlich in hoher Reinheit zu einem vernünftigen Preis.

Überraschenderweise gibt es sogar einige Enzyme, die alle diese Anforderungen erfüllen. In der Praxis haben sich die relativ stabilen Enzyme alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1.), Peroxidase (FC 1.11.1.7.) oder Glucose-Oxidase (FC 1.1.3.4.) am besten bewährt.

Das Prinzip des Enzym-Immuntests ist eigentlich dasselbe wie beim RIA. Die durch die Enzyme bedingten hohen molaren Massen der Tracer erlauben jedoch nicht mehr so einfache, auf Unterschieden in der Molekülgröße beruhende Trennverfahren anzuwenden. Dies ist der Grund, dass der Test meistens als *Solid-Phase-Verfahren (ELISA)* durchgeführt wird. Man verwendet hierbei z. B. mit Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatten. Dann werden wie beim RIA verschiedene Mischungen von Antigen und enzymmarkiertem Tracer zugegeben und das nicht gebundene ausgewaschen. Anstelle einer Radioaktivitätsmessung erfolgt nun die Zugabe der dem Enzym entsprechenden Substrate mit anschließender Bestimmung des gebildeten Produktes z. B. auf spektrophotometrischer Basis.

Eine interessante Variation stellt der *enzyme multiplied immunoassay* dar. Hierbei wird von einer Änderung der Enzymaktivität Gebrauch gemacht, die bei der Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes auftreten kann. Dies kann z. B. dadurch erreicht werden, dass das Antigen an eine Stelle des Enzyms geknüpft wird, die in der Nähe des aktiven Zentrums liegt. Und zwar kann man dies so geschickt tun, dass damit zunächst noch kein Aktivitätsverlust des Enzyms auftritt. Erst wenn das enzymmarkierte Antigen an den Antikörper gebunden wird, findet ein teilweiser oder ein vollständiger Aktivitätsverlust statt. Der Grund dafür kann sein, dass das Substrat aus sterischen Gründen keinen Zugang mehr hat zur aktiven Stelle oder aber dass durch die Antigen-Antikörper-Bindung eine Konformationsänderung an der aktiven Stelle des Enzyms bewirkt wird. Anwendungen dieser Technik in der Lebensmittelanalytik stellen allerdings bis jetzt eine Seltenheit dar.

Beim RIA und ELISA handelt es sich um aussergewöhnlich empfindliche analytische Methoden. Die unter optimalsten Bedingungen nachweisbaren Stoffmengen liegen im Picogrammbereich. Bei der Analyse von Lebensmitteln sind allerdings Matrixeffekte zu beachten: die Gefahr falschpositiver Resultate zwingt den kritischen Analytiker geradezu, wo immer möglich Bestätigungsanalysen vorzunehmen.

Eine bedeutsame Neuerung auf diesem Gebiet verdient hier noch erwähnt zu werden: die von *Köhler* und *Milstein* (2) entwickelte Technik der monoklonalen Antikörper (1).

Bei der Gewinnung monoklonaler Antikörper werden nicht mehr die Seren der immunisierten Tiere verwendet, sondern Lymphozyten aus der Milz oder aus Lymphknoten isoliert und mit Tumorzellen fusioniert. Dadurch erhält man Zelllinien, die einesteils «unsterblich» sind, anderenteils immer noch Antikörper produzieren. Diese sog. Hybridomzellen lassen sich relativ gut handhaben, so dass es gelingt, Zellen zu selektionieren und zur Vermehrung zu bringen, die nur einen einzigen Typ von Antikörpern produzieren.

Die Vorteile liegen vor allem darin, dass man damit über ganz genau definierte Standards verfügt, die jederzeit wieder herstellbar sind. Ein monoklonaler Antikörper ist gegen ein einziges Epitop (Strukturelement) des Antigens gerichtet. Bei der Verwendung monoklonaler Antikörper unterschiedlicher Spezifität kann man die Struktur eines Antigens geradezu abtasten. Damit lässt sich die Spezifität immunologischer Analysenmethoden stark erhöhen.

Anwendungen in der Lebensmittelanalytik

Allgemeines

Man kann mit Recht behaupten, dass die serologischen Methoden seit jeher zu der Analytik der Lebensmittelproteine gehören. Eine Übersicht der früheren Arbeiten bis in die 60er Jahre ist u. a. im Kapitel «Serologische Methoden zur Untersuchung von Proteinen», Handbuch der Lebensmittelchemie II/2 (21) zu finden. Wie der Name des Kapitels besagt, lag das Hauptgewicht der damaligen Untersuchungen auf der Bestimmung der Identität der Proteine im Sinne der Qualitätskontrolle oder des Fremdproteinnachweises. Dazu gehörte z. B. die Differenzierung der Milch-, Fleisch-, Getreide- und Nussproteine, Nachweis von Sojaprotein im Fleisch oder auch Eigelbnachweis in Eierweinbrand oder Verfälschungen von Kaviar (11–13, 41, 42).

Die Einführung der Techniken mit markiertem Immunoreagenz brachte — wie bereits erwähnt — eine zumindest 10^3 -fache Steigerung der Nachweisempfindlichkeit, eine drastische Reduktion des Verbrauches an Immunoreagenzien und eine einfache Testdurchführung mit sich. Somit wurde auch das Interesse für den Nachweis von niedermolekularen Verbindungen geweckt — zumindest als Alternativverfahren zu den gängigen physiko-chemischen Methoden. Dieses Gebiet war lange Zeit die Domäne des RIA-Testes. Heute dringen die Techniken mit nicht radioaktivem Marker vor. Eine Zusammenstellung der Anwendungsbeispiele zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1. Immunoassays in der Lebensmittelanalytik

<i>Analyt</i>	<i>Einige Beispiele</i>
Lebensmittelproteine	Fleisch, Milch, Weizen, Soja
Antigene aus Mikroorganismen	Salmonella, Campylobacter, Penicillium, Fusarium
Toxine, bakteriell	Enterotoxine des <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> ; <i>Cl. botulinum</i> ; <i>Cl. perfringens</i>
Mykotoxine	Aflatoxine, Ochratoxin, Trichothecene
PSP-Toxine (paralytic shellfish poisoning)	Saxitoxin
Alkaloide	Glykoalkaloide aus Kartoffeln
Rückstände	Anabolika, Antibiotika, Pestizide

Allein im Jahre 1986 erschienen rund 50 Arbeiten über EIA- oder RIA-Teste zum Nachweis von Proteinen oder Haptenen in Lebensmitteln. Die Reagenzien zum Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen in Lebensmitteln, von Sojaprotein in Fleischwaren sind in Form eines Kits erhältlich, ebenso die Antiseren zur Fleischnachweis. Weitere Kits zum Nachweis von Mykotoxinen sollen folgen. Diese günstige Entwicklung ist zu einem grossen Teil der Hybridomatechnologie zu verdanken.

In den folgenden Abschnitten wird nun anhand von praktischen Beispielen aus der Lebensmittelanalytik auf die Möglichkeiten und Einschränkungen einiger bereits bestehender Verfahren näher eingegangen. Es wurden bewusst nur diejenigen Beispiele gewählt, welche vom Analyt oder der Analytik her auch für Kontrolllaboratorien von Interesse sein könnten. Aus Zeit- und Platzgründen konnten wir z. B. auf die Bestimmung von Anabolika in Fleischwaren nicht eingehen (7). Es handelt sich indessen in diesem Falle um recht gut etablierte Methoden.

Makromoleküle

Staphylokokken-Enterotoxine (SET)

Die Bemühungen um einen ausreichend empfindlichen Nachweis von SET in Lebensmitteln ziehen sich bereits über Jahrzehnte hin. Ihre Analytik spiegelt die Entwicklung auf dem Gebiete der immunologischen Methoden wider: die Präzipitations- und Agglutinationstechniken, RIA- und EIA-Methoden, wurden angewendet. Der Sieg gehört zurzeit dem ELISA-Verfahren. Neuerdings ist ein SET-EIA®-Test, entwickelt von Fey et al. (22), auch als Kit kommerziell erhältlich (Schema 1).

Schema 1. SET-EIA® zum direkten Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen aus Lebensmitteln und zur Identifikation von Enterotoxin produzierenden *S. aureus* Stämmen

ELISA, Polystyrol-Perlen, polyklonale Antikörper, Detektion mit spezifischer Antikörper-Phosphatase

Lebensmittelaufarbeitung

1. Extraktion
H₂O, NaCl, Puffer, Harnstoff/Reduktionsmittel
Homogenisieren, Rühren
2. Reinigung
Isoelektrische Fällung, pH 4,5 → 7,3
Behandlung mit 10% CHCl₃ oder CH₂Cl₂
3. Aufkonzentrierung
Dialyse, Vakuumkonzentrierung
4. Vorbereitung für ELISA
Zusatz von Blockierungsmittel (Tween®-20)
Bindung von Staphylokokken Protein A

Nachweisempfindlichkeit: 0,1 ng/ml Pufferlösung

Validierungsverfahren: Keines mit analoger Empfindlichkeit
Indirekt über die klinischen Symptome; durch Isolierung von *S. aureus* aus Lebensmitteln und Prüfung auf Enterotoxinbildung

Der nichtkompetitive ELISA-Test basiert auf polyklonalen monospezifischen Antikörpern, die einzeln auf den Polystyrolperlen immobilisiert sind. Die hohe Nachweisempfindlichkeit in der Pufferlösung kann in den Lebensmitteln nicht immer erreicht werden. Dies ist mit der Verdünnung der Probe im Extraktionsmittel, der Extraktionsrate von SET und mit Interferenzen der mitextrahierten Substanzen aus dem Lebensmittel zu erklären (23). Diese Interferenzen stellen auch die Richtigkeit von der SET-Bestimmung im Extrakt mittels einer Eichkurve in der Pufferlösung stark in Frage. Dies ist insofern von Bedeutung, als für die SET-Typen A und B die Grenzwerte in Lebensmitteln in der Schweiz von 1 ng/g bzw. 10 ng/g zu berücksichtigen sind. Durch gewisse Änderungen von Testbedingungen (Träger, Nachweis der Enzymaktivität) sind jedoch zumindest semiquantitative Bestimmungen möglich.

Weizengliadin

Die Zöliakie wird als lebenslange Unverträglichkeit der alkohollöslichen Proteine aus Weizen, Roggen, Gerste und Hafer definiert. Solche Proteine werden in diesem Zusammenhang global als Gluten bezeichnet. Die Zöliakiepatienten ernähren sich glutenfrei, das heisst die erwähnten Cerealien werden durch Reis, Mais, Soja, Kartoffeln usw. ersetzt. Die tolerierbare Glutenmenge ist an sich unbekannt. Prinzipiell sollen als glutenfrei angepriesene Produkte kein Gluten enthalten. Der Nachweis der Anwesenheit von Weizengliadin ist von grosser Bedeutung, weil Weizen als die wichtigste Kontaminationsquelle der natürlicherweise glutenfreien Produkte bei deren technologischen Verarbeitung (Mahlen, Backen) gilt (Schema 2).

Schema 2. Nachweis von Weizengliadin in glutenfreien Lebensmitteln (24)

ELISA (Platten), polyklonale Antikörper, Detektion mit spezifischer Antikörper-Phosphatase oder -Peroxidase

Aufarbeitung der Proben:
Rühren mit 70% Ethanol bei 20 °C oder 40 °C

↓
Zentrifugieren

↓
ELISA

Nachweisempfindlichkeit: <0,01% natives Weizenmehl
≤0,01% erhitztes Weizenmehl

Kreuzreaktivität: Sehr schwach mit Roggen und Gerste (glutenhaltig)

Validierungsverfahren: Bei höheren Gehalten (>1%) HPLC sonst
Immunoblotting

Die Struktur des Weizengliadins bedingt, dass das native und erhitzte Weizenmehl nicht mit der gleichen Empfindlichkeit nachgewiesen werden kann. Wie bereits erwähnt, sollen die glutenfreien Produkte grundsätzlich kein Gluten enthalten. In diesem Sinne werden die glutenfreien Lebensmittel vorgängig im ELISA-Test geprüft. Bei positivem Nachweis einer Gliadinaktivität wird zur weiteren Antigencharakterisierung die Immunoblotting-Technik angewendet. Es ist im Prinzip ein zweidimensionales Verfahren, indem vor die Immunreaktion noch eine elektrophoretische Auftrennung der Proteine eingeschaltet wird. Dies erlaubt uns, z. B. zwischen Weizen-, Roggen- und Gersteprotein, aber auch zwischen erhitztem und unerhitztem Weizengliadin zu unterscheiden. Der Wider-

spruch zu der vorher erwähnten Kreuzreaktivität im ELISA besteht in Wirklichkeit nicht. Der Charakter des ELISA-Testes wird durch die hochaviden (stark bindend) Antiserumkomponenten geprägt, während bei der Immunoblotting-Technik auch die weniger aviden Komponenten des polyklonalen Serums von Bedeutung sind (25).

Salmonellen

Die Wichtigkeit des Salmonellennachweises in Lebensmitteln ist unbestritten (26). So hat es in den letzten 30 Jahren nicht an Versuchen gefehlt, eine schnelle Detektionsmethode für Salmonellen zu finden. Auch immunologische Methoden wurden herangezogen. Bis heute erschienen rund 10 Arbeiten über EIA zur Detektion von Salmonellen unter Verwendung von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern. Neuerdings ist ein Testsystem auch kommerziell erhältlich und durchläuft ein Validierungsverfahren in verschiedenen Laboratorien.

Der Test ist als ein nichtkompetitives ELISA-Verfahren ausgebaut. Verwendet werden 2 monoklonale Antikörper, womit eine hohe Erfassungsquote der Salmonellenstämme gesichert ist. Die Immobilisierung der Antikörper an Metallperlen (beschichtet mit dem eigentlichen Trägermaterial Polycarbonat) erleichtert die Handhabung der festen Phase (Schema 3).

Schema 3. Nachweis von Salmonellen mit «SALMONELLA Bio-Enza bead screening kit» (27, 28)

ELISA, Perlen (Metall beschichtet mit Polycarbonat).	
2 monoklonale Antikörper, Detektion mit Antikörper-Peroxidase.	
Aufarbeitung der Proben:	Nachweisempfindlichkeit:
Voranreicherung 14–16 h ↓ 37 °C	10 ⁶ Salmonellen/ml
Selektive Anreicherung 24 h ↓ 37 °C	Kreuzreaktivität: Selten mit bestimmten Enterobakterien
Anreicherung 6 h ↓ 37 °C M-broth	
Zentrifugieren, Suspendieren ↓	Validierung der Ergebnisse:
Dampfbehandlung 20 min. ↓ 100 °C EIA	Kulturell, biochemische und serologische Teste

Die Nachweisempfindlichkeit des Testes (10⁶ Salmonellen/ml) ist nicht hoch genug, um einen direkten Nachweis durchführen zu können, so dass – wie bei

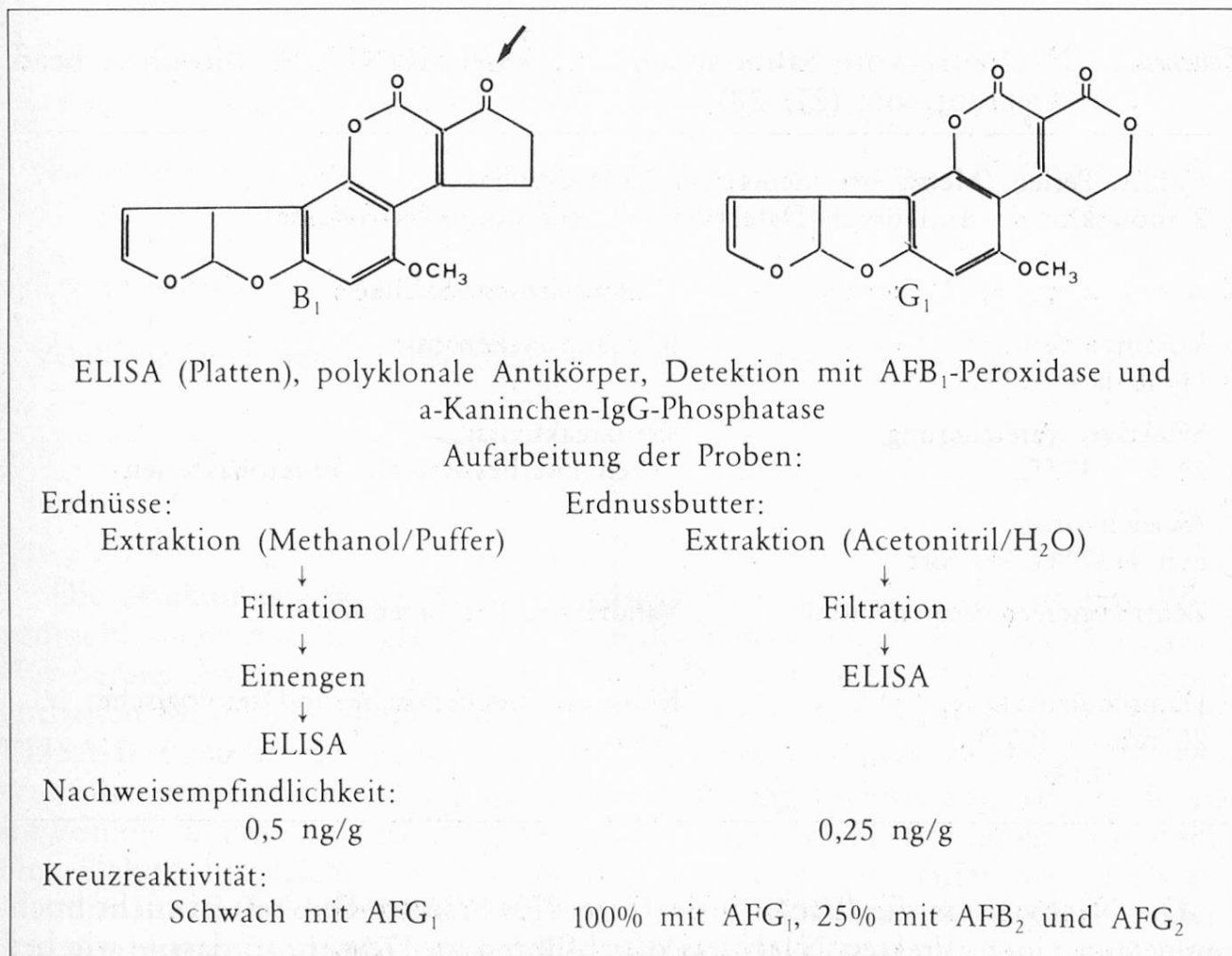
dem klassischen Nachweis — eine selektive Anreicherung vorgenommen werden muss. Der unbestrittene Vorteil dieses Screening-Testes ist der hohe Proben-durchsatz auf der Mikrotiterplatte (Testdauer beträgt nur rund 1 Stunde).

Niedermolekulare Verbindungen

Aflatoxine

Aflatoxine sind extrem potente Karzinogene, gebildet von den Schimmelpilzen *Aspergillus flavus* und *parasiticus*. Ein besonderes Problem der Aflatoxin-Analytik (und der Mykotoxine im allgemeinen) liegt in der nicht-homogenen Toxinverteilung im Substrat. Die chromatographischen Techniken benutzen die native Fluoreszenz der Aflatoxine zum empfindlichen und spezifischen Nachweis. Die immunologischen Methoden haben eine ähnliche Empfindlichkeit und Spezifität, zeichnen sich aber aus durch einfachere und schnellere Durchführung. Der erste RIA-Test wurde bereits 1976 beschrieben, und 1977 folgte ein ELISA-Test. Zwei der neueren ELISA-Verfahren werden in Schema 4 gezeigt.

Schema 4. Bestimmung von Aflatoxin B₁ und G₁ (AFB₁ und AFG₁) in Erdnüssen und Erdnussbutter mittels ELISA (29, 30)



In Anbetracht der Grenzwerte für Aflatoxine (1 ng B₁/g in der Schweiz) sind die beiden Teste als ausreichend empfindlich zu bezeichnen. Das von *Biermann* und *Terplan* (29) entwickelte Verfahren ist deutlich spezifischer für B₁ als dasjenige von *Morgan* et al. (30) entwickelte Verfahren, in dem G₁ in gleichem Ausmass erkannt wird wie B₁ und bei höheren Konzentrationen auch B₂ und G₂. Dies ist in Anbetracht der Lage der Kopplungsstelle (Pfeil) an sich zu erwarten, da meistens die distal zur Kopplungsstelle gelegenen Gruppen als immunodominant erkannt werden. Die Wiederfindungsraten liegen in Erdnüssen bei 70–90%, in Erdnussbutter bei 99%. Variationskoeffizienten werden im ersten Test mit 4–6% angegeben, im zweiten Test mit 4% in der Serie und mit 12% zwischen den Versuchen.

Auch für den Nachweis von AFM₁ in Milch wurden empfindliche und spezifische Verfahren entwickelt (2,5 pg AFM₁/ml Milch, schwache Kreuzreaktion mit AFB₁ (31)).

Ochratoxin

Ochratoxin gehört zu den toxischen Metaboliten der Schimmelpilze *Aspergillus* und *Penicillium*. Ochratoxin A ist ein potentes Nephrotoxin und wurde vor allem in gewissen europäischen Ländern und in Nordamerika im Getreide gefunden. Werden Schweine mit ochratoxinhaltigem Futter ernährt, so konzentriert sich das Toxin in der Niere. HPLC und DC werden üblicherweise zur Ochratoxinanalyse angewendet. In Schema 5 werden ein ELISA- und ein RIA-Test gezeigt. Beide Teste stellen eine echte Alternativmethode zu den chromatographischen Verfahren dar.

Die Wiederfindungsraten des zugesetzten Ochratoxins lagen bei 96% (Gerste) und betragen rund 72% in der Niere (RIA) bzw. 86% im ELISA. Variationskoeffizienten lagen bei rund 3% (in der Serie) und 6% (zwischen den Testen) im ELISA.

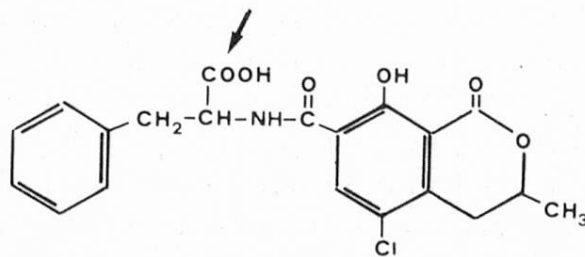
Die Vorteile der immunologischen Techniken wurden auch hier erkannt und ein Test mit monoklonalen Antikörpern für Ochratoxin A-Nachweis sollte bald kommerziell erhältlich sein.

Trichothecene

Die Trichothecene scheinen von der Verbreitung her die Mykotoxine unserer Klimaverhältnisse zu sein und werden vor allem in Futtermitteln (Mais) und Getreide (Reis, Weizen) gefunden. Sie werden von den *Fusarium*-Schimmelpilzen gebildet und stellen eine Gruppe von eng verwandten Sesquiterpenoiden dar. Die bekanntesten nicht makrozyklischen Vertreter sind T2-Toxin (am stärksten toxisch), Diacetoxyscirpenol (DAS) und das am wenigsten toxische, jedoch stark verbreitete Deoxynivalenol (DON). Die Trichothecene absorbieren schwach im UV, fluoreszieren nicht und müssen für den chromatographischen Nachweis meistens derivatisiert werden.

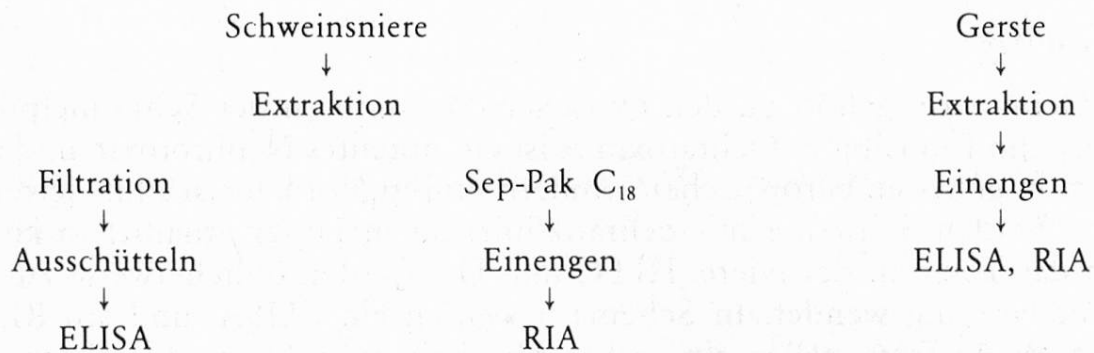
Als die beste physiko-chemische Methode gilt die Kombination GC/MS. Dieses Verfahren ist jedoch für Routineanalysen ungeeignet.

Schema 5. Bestimmung von Ochratoxin A in Fleisch und Getreide mittels ELISA oder RIA (32–34)



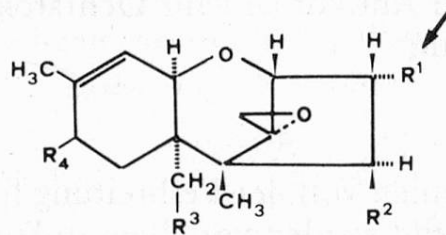
ELISA und RIA, polyklonale Antikörper, Detektion mit α -Kaninchen IgG-Phosphatase und ^{14}C -Ochratoxin A

Aufarbeitung der Proben:



Nachweisempfindlichkeit: 0,5 ng/g (ELISA), 0,4 ng/g (RIA)

Schema 6. Bestimmung von Trichothecenen in Getreide (35, 36)



T-2 Toxin, Diacetoxyscirpenol (DAS), Deoxynivalenol (DON), 3-Acetyldeoxynivalenol (3-ADON)

ELISA, RIA mit polyklonalen Antikörpern, Nachweis im Getreide (Mais, Weizen, Reis), für T-2 Toxin, DAS, 3-ADON und Deoxyverrucarol

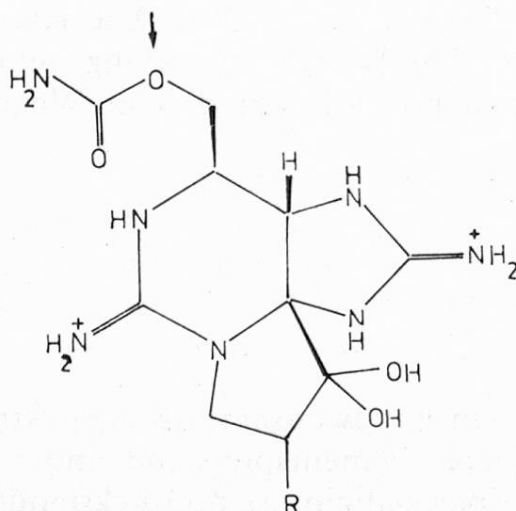
Nachweisempfindlichkeit: 1 ng/g

Kreuzreaktivität: minimal

Validierung der Ergebnisse: GC/MS

Da der chemische Nachweis sehr aufwendig ist, besteht deshalb ein starkes Interesse an immunologischen Methoden, die auch in der Tat eine hohe Nachweisempfindlichkeit und Spezifität für die einzelnen Toxine aufweisen (Schema 6). Dies wurde auch von den antikörperherstellenden Firmen erkannt, und Kits für T2-Toxin, DAS und DON sind bereits angekündigt. Die Produktion der Antikörper ist aufgrund der hohen Toxizität von T2-Toxin (Inhibitor der Protein-Synthese, immunosuppressiv) nicht trivial. Die hohe Spezifität (die Lage der Kopplungsstelle ist mit Pfeil bezeichnet) soll einen nur minimalen Clean-up erlauben. So besteht dies z. B. bei Nachweis von 3-ADON in Reis (36) aus Filtration der Methanolextrakte und Verdünnung für ELISA.

Schema 7. Bestimmung von Saxitoxin in Muscheln (38)



ELISA, polyklonale Antikörper, Detektion mit α -Kaninchen, IgG-Peroxidase
Aufarbeitung der Proben:

Muschel (Hepatopankreas), Venusmuscheln

↓
Säureextraktion/Kochen

↓
Zentrifugation

↓
ELISA

Nachweisempfindlichkeit:	50–100 ng/g
Kreuzreaktivität:	Mit neo-Saxitoxin
Validierung der Ergebnisse:	Bioassay (Maus)

Saxitoxin

Saxitoxin ist ein starkes Neurotoxin, welches in den Muschelvergiftungen, sogenannten «paralytic shellfish poisoning», involviert ist. Es wird von bestimmten Einzellern (Dinoflagellaten) gebildet, die den Muscheln als Nahrung dienen. Es wird angegeben, dass schon wenige mg Saxitoxin bei Menschen Vergiftungen verursachen können (37).

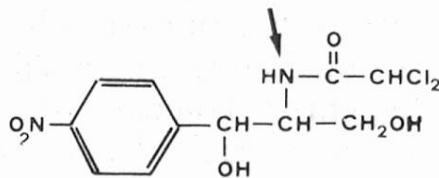
Zum analytischen Nachweis von Saxitoxin wurden von Anfang an die immunologischen Verfahren herangezogen, da die klassischen Methoden Schwierigkeiten in bezug auf Spezifität und Empfindlichkeit bekunden. Als offizielle Methode gilt der Maus-Bioassay, wobei rund 0,2 µg Saxitoxin genügen, um bei intraperitonealer Verabreichung eine 20-g-Maus zu töten. In Anbetracht des heutigen Bestrebens nach Ersatzmöglichkeiten für Tierversuche stellt der immunologische Test zweifellos eine Alternative dar. Der hier gezeigte ELISA-Test (Schema 7) ist in bezug auf die Anforderung an die Methode als ausreichend empfindlich zu betrachten. Auch hier ist die Empfindlichkeit in der Pufferlösung rund 100mal höher als in den Muschelextrakten zufolge der Interferenzen seitens der mitextrahierten Komponenten. Die Wiederfindungsraten lagen zwischen 87–107%, Variationskoeffizienten im Bereich von 9–20%. Die Korrelation mit dem Maus-Bioassay betrug rund 87%. Die Weiterentwicklung sieht auch die Erfassung der übrigen «paralytic shellfish poisons» auf diesem Wege vor.

Chloramphenicol

Chloramphenicol ist ein hochwirksames Breitspektrum-Antibiotikum, billig und wenig toxisch für Tiere. Dementsprechend findet Chloramphenicol breite Anwendung in der Veterinärmedizin. Seine Rückstände im Fleisch, Milch und Eiern sind jedoch höchst unerwünscht. Eine rigorose Kontrolle ist deshalb notwendig. Das GC-Verfahren hat für Chloramphenicol (mit Sep-Pak C₁₈, Silylierung) eine Nachweisempfindlichkeit je nach der Lebensmittelmatrix von rund 0,1–3 ppb. Als Alternativmethode wird hier ein RIA-Test und ein ELISA-Test gezeigt (Schema 8). Verwendet wurden polyklonale Schaf- und Kaninchenantikörper und für die Detektion ein radioaktiv markiertes (³H) sowie ein Enzym markiertes (Peroxidase) Hapten-Analog.

Der Clean-up ist verhältnismässig einfach und erlaubt somit einen hohen Probenumsatz. Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 0,2 ppb (RIA) und bei rund 0,5 ppb (ELISA). Quantitative Bestimmungen bei Routineanalysen sind ab 1 ppb möglich. Variationskoeffiziente liegen im Bereich von 5–10%. Das verwendete Antiserum kreuzreagiert mit Metaboliten, die sich nur in der Acyl-Seitenkette unterscheiden. Somit können z. B. in der Milch die mittels ELISA bestimmten Werte höher liegen als diejenigen aus der GC-Analyse. Der Test bedarf sorgfältiger Kontrolle, besonders bei tiefen Gehalten.

Schema 8. Chloramphenicol-Rückstände in Lebensmitteln (39, 40)



RIA, ELISA, polyklonale Antikörper, Detektion mit ^3H -Hapten und Hapten-Peroxidase

Aufarbeitung der Proben:

Fleisch (Muskulatur), Hühnereier

↓
Homogenisieren, Zentrifugieren

↓
Ausschütteln/Zentrifugieren

↓
Extrahieren

↓
Einengen

↓
RIA

Milch
↓ ↓
Entfetten Verdünnen
↓ ↓
RIA ELISA

Quantitative Bestimmungen: Ab ca. $1 \mu\text{g}/\text{kg}$
Kreuzreaktivität: Mit Glycolsäuremetabolit
Validierung der Ergebnisse: Mit GC (ECD-Detektor)

Schlussfolgerungen

Die hier aufgeführten Beispiele belegen die hohe Empfindlichkeit und Spezifität von Immunoassays in der Analytik der *Proteinindividuen*. Die Überlegenheit von Immunoassays ist auf diesem Gebiet derart hoch, dass oft kein Alternativverfahren mit vergleichbarer Empfindlichkeit zur Verfügung steht. Weiter ist gezeigt, dass die Immunoassays auch in der Analytik von *niedermolekularen Verbindungen* durchaus konkurrenzfähig sind. Die *Nachweisempfindlichkeit* ist mit derjenigen der empfindlichsten physikochemischen Methoden vergleichbar, die *Probenaufarbeitung* aber in der Regel weniger aufwendig. Die *Spezifität* von derartigen Immunoassays ist zudem durch die Art der Bindung von Hapten zum Trägermolekül beeinflussbar. Somit sind alle Voraussetzungen für die hervorragende Eignung von Immunoassays als *Screening-Verfahren* zum Erfassen von bestimmten Verbindungen oder Stoffklassen gegeben.

Die Entwicklung von Immunoassays, welche für die Lebensmittelanalytik geeignet sind, ist allerdings aufwendig. Die komplexe und schwer standardisierbare Lebensmittelmatrix macht eine umfangreiche Absicherung der Testspezifität notwendig. Die mitextrahierten Lebensmittelkomponenten in konzentrierten Ex-

trakten können einerseits durch unspezifische Bindungen zu falschpositiven Ergebnissen, andererseits durch Veränderung von «assay response» gegenüber den Pufferlösungen zu falschnegativen Ergebnissen führen. Durch geeignete Massnahmen (Kontrollen, Zusatz von indifferentem Protein, interne Standardisierung, Änderung der Testbedingungen) können jedoch derartige Effekte erkannt, minimalisiert oder eliminiert werden. Es ist klar ersichtlich, dass die Verwendung von gut definierten Antikörpern (monoklonale Antikörper) auch in dieser Beziehung von grossem Vorteil ist.

Anschliessend ist zu bemerken, dass die Entwicklung von Immunoassays noch keineswegs abgeschlossen ist. Die künftigen Teste sollen miniaturisiert und von sehr kurzer Analysendauer sein (einige Minuten), so dass sie idealerweise auch ausserhalb der Laboratorien für Vorprüfungen eingesetzt werden könnten.

Zusammenfassung

Die theoretischen Grundlagen der immunologischen Methoden werden beschrieben sowie deren Anwendung in der Lebensmittelanalytik diskutiert. Prinzipielle Vorteile dieser Methoden sind einfache und schnelle Durchführung, wenig Aufwand bei der Probenaufarbeitung, hohe Empfindlichkeit und Eignung zur Automatisierung. Als Nachteile müssen derzeit noch genannt werden: hoher Aufwand bei der Entwicklung des Testsystems (insbesondere bei der Gewinnung der Antikörper) und Matrixeffekte bei der Analyse von Lebensmitteln. Klassische Anwendungsgebiete sind die Bestimmung von lebensmittelspezifischen Proteinen und bakteriellen Toxinen. Neuerdings wird die ELISA-Technik zunehmend in der Rückstandsanalytik und zur Bestimmung von Mykotoxinen eingesetzt.

Résumé

Les bases théoriques des méthodes immunologiques sont décrites et l'application de ces méthodes dans l'analyse des denrées alimentaires, discutée. Le principe présente les avantages d'une exécution simple et rapide, n'impliquant pas une longue préparation des échantillons, d'une haute sensibilité et d'une facile adaptation à l'automatisation. En revanche, ces méthodes présentent actuellement des inconvénients, tels une élaboration très exigeante du système du test (en particulier pour la préparation des anticorps) et des effets de matrice qui interfèrent dans l'analyse des denrées alimentaires. Les domaines classiques d'application de ces méthodes sont le dosage des protéines spécifiques des denrées alimentaires et des toxines bactériennes. Récemment, la technique ELISA est utilisée de plus en plus dans l'analyse des résidus et dans le dosage des mycotoxines.

Summary

The basics of immunological methods are described and the application of these methods to food analysis discussed. Advantages of these methods are simple and rapid experimental procedure, high sensitivity and suitability for automation. The disadvantages are high expenditure for the development of the test system, especially for the preparation of

the antibodies, and the possible occurrence of matrix effects with food extracts. Classical applications are the determination of food-specific proteins and bacterial toxins. Recently, ELISA-tests are increasingly used for analysis of residues in food and of mycotoxins.

Literatur

1. *Petersen, J. H., Baumgarten, H. und Schulze, M.*: Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung. Springer-Verlag, Berlin 1985.
2. *Köhler, G. and Milstein, C.*: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity. *Nature* **256**, 495–497 (1975).
3. *Milstein, C.*: Monoklonale Antikörper. *Spektrum der Wissenschaften* 97–108 (1982).
4. *Grünwedel, D. W. and Whitaker, J. R.*: Food analysis, vol. 3: Biological techniques. Dekker, Inc., New York and Basel 1985.
5. *Lütby, J.*: Bioassays in food analysis. In: Recent developments in food analysis, Baltes, P. B. Czedik-Eysenberg and W. Pfannhauser (Ed.). Verlag Chemie, Weinheim 1982.
6. *Mercier, Ch.*: Enzymes in food analysis. In: Recent developments in food analysis, Baltes, P. B. Czedik-Eysenberg and W. Pfannhauser (Ed.). Verlag Chemie, Weinheim 1982.
7. *Newsome, W. H.*: Potential and advantages of immunochemical methods for analysis of foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **69**, 919–922 (1986).
8. *Allen, J. C.*: Immunoassays in food analysis. *Nutrition Bulletin* **11**, 46–54 (1986).
9. *Heidelberger, M. and Kendall, F. E.*: A quantitative study of the precipitin reaction between type III Pneumococcus polysaccharide and purified homologous antibody. *J. Exp. Med.* **50**, 809–823 (1929).
10. *Ouchterlony, O.*: Antigen-antibody reactions in gels. *Acta Pathol. Microbiol. Scand* **26**, 507–515 (1949).
11. *Kraack, J.*: Bestimmung von Fremdeiweiss in Wurstwaren. *Fleischwirtschaft* **53**, 697–698 (1973).
12. *Luigi, A. and Angeletti, P. U.*: Application of immunodiffusion in detecting the presence of barley in wheat flour. *J. Sci. Food. Agric.* **20**, 207–209 (1968).
13. *Piazzini, J. F. and Cantagalli, P.*: Immunochemical analysis on soluble proteins of wheat. *Cereal Chem.* **46**, 642–646 (1969).
14. *Grabar, P. et Williams, C. A., Jr.*: Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. *Biochim. Biophys. Acta* **10**, 193–194 (1953).
15. *Laurell, L.-B.*: Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal. Biochem.* **15**, 45–52 (1966).
16. *Berson, S. A. and Yalow, R. S.*: Isotopic tracers in the study of diabetes. *Adv. Biol. Med. Phys.* **6**, 439–440 (1958).
17. *Engvall, E. and Perlmann, P.*: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**, 871–874 (1971).
18. *VanWeemen, B. K. and Schuur, A. H. W. M.*: Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett.* **15**, 232–236 (1971).
19. *Schuurs, A. H. W. M. and vanWeemen, B. K.*: Enzymeimmunoassay. *Clin. Chim. Acta* **81**, 1–40 (1977).
20. *Belanger, L.*: Alternative approaches to enzyme immunoassays. *Scand. J. Immunol* **8** (Suppl 7), 33–40 (1978).

21. «Serologische Methoden zur Untersuchung von Proteinen». In: Handbuch der Lebensmittelchemie, Band II/2. Teil, ed. J. Schormüller, S. 198–226. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1967.
22. Fey, H., Pfister, H. and Rüegg, D.: Comparative evaluation of different enzyme-linked immunosorbent assay systems for the detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C and D. *J. Clin. Microbiol.* **19**, 34–38 (1984).
23. Windemann, H. und Baumgartner, E.: Bestimmung von Staphylokokken-Enterotoxinen A, B, C und D in Lebensmitteln mittels Sandwich-ELISA mit markiertem Antikörper. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B* **181**, 345–363 (1985).
24. Fritschy, F. und Windemann, H.: Bestimmung von Weizengliadinen in Lebensmitteln mittels ELISA. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **181**, 379–385 (1985).
25. Windemann, H.: Overcoming of unwanted interactions in immunoassays as illustrated by an ELISA for gliadin in foods. Proceedings of: Advances in Immunoassays for Veterinary and Food Analysis, University of Surrey, Surrey 1986 (in press).
26. Food poisoning. *BNF Nutrit. Bull.* **8**, 12–14 (1983).
27. Mattingly, J. A., Robison, B. J., Boehm, A. and Geble, W. D.: Use of monoclonal antibodies for the detection of *Salmonella* in foods. *Food Technol.* **39**, 90–94 (1985).
28. Beckers, H. J., Tips, P. D., DeLeon-van Asch, E. and Peters, R.: Evaluation of an enzyme immunoassay technique for the detection of *Salmonellas* in minced meat. *Lett. Appl. Microbiol.* **2**, 53–56 (1986).
29. Biermann, A. und Terplan, G.: Erfahrungen mit einem Mikro-ELISA zur Aflatoxin B₁-Bestimmung in Lebensmitteln. *Arch. Lebensmittelhyg.* **33**, 1–32 (1982).
30. Morgan, M. R. A., Kang, A. S. and Chan, H. W. S.: Aflatoxin determination in peanut butter by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Sci. Food Agric.* **37**, 908–914 (1986).
31. Märtlbauer, E. und Terplan, G.: Ein hochempfindlicher heterologer enzymimmunochemischer Nachweis von Aflatoxin M₁ in Milch und Milchpulver. *Arch. Lebensmittelhyg.* **36**, 49–76 (1985).
32. Morgan, M. R. A., McNerney, R., Chan, H. W. S. and Anderson, P. H.: Ochratoxin A in pig kidney determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Sci. Food Agric.* **37**, 475–480 (1986).
33. Rousseau, D., Slegers, G., van Peteghem, C. and Claeys, A.: Solid-Phase radioimmunoassay of the mycotoxin ochratoxin A in pig kidneys and serum. *J. Label. Compounds and Radiopharm.* **XXI**, 429–440 (1984).
34. Morgan, M. R. A., McNerney, R. and Chan, H. W. S.: Enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin A in barley. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **86**, 1481–1484 (1983).
35. Lee, S. and Chu, F. S.: Radioimmunoassay of T-2 toxin in corn and wheat. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **64**, 156–161 (1981).
36. Kemp, H. A., Mills, C. and Morgan, M. R. A.: Enzyme-linked immunosorbent assay of 3-acetyldeoxynivalenol applied to rice. *J. Sci. Food Agric.* **37**, 888–894 (1986).
37. Ghazarossian, V. E., Schantz, E. J., Schnoes, H. K. and Strong, F. M.: Identification of a poison in toxic scallops from a *Gonyaulax Tamarensis* red tide. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **59**, 1219–1225 (1974).
38. Chu, F. S. and Fan, T. S. L.: Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for saxitoxin in shellfish. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **68**, 13–16 (1985).
39. Arnold, D., vom Berg, D., Boertz, A. K., Mallick, U. und Somogyi, A.: Radioimmunologische Bestimmung von Chloramphenicol-Rückständen in Muskulatur, Milch und Eiern. *Arch. Lebensmittelhyg.* **35**, 121–148 (1985).

40. *Märtlbauer, E. und Terplan, G.*: Ein enzymimmunologischer Nachweis von Chloramphenicol in Milch. *Arch. Lebensmittelhyg.* **38**, 3–7 (1987).
41. *Günther, H. O.*: Immunochemische Methoden bei der Untersuchung von Proteinen in Lebensmitteln. *Ernährung* **10**, 91–94 (1986).
42. *Günther, H. O.*: Immunochemische Lebensmittelanalytik – Neue Entwicklungen beim Nachweis von Proteinen. *Lebensmittelchemie GIT-Supplement* 2/86, 10–17 (1986).

Dr. Helena Windemann
Institut für Biochemie
Laboratorium für Lebensmittelchemie
der Universität Bern
Freiestrasse 3
CH-3012 Bern

Dr. J. Lüthy
Bundesamt für Gesundheitswesen
Abteilung Lebensmittelkontrolle
Haslerstrasse 16
CH-3001 Bern