

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

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 82 (1991)

Heft: 6

Artikel: Ausgewählte Prinzipien der immundiagnostischen Methoden = Selected principles of immunochemical methods

Autor: Gottstein, B.

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-982431>

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>

B. Gottstein, Institut für Parasitologie der Universität Zürich, Zürich

Ausgewählte Prinzipien der immundiagnostischen Methoden

Selected Principles of Immunochemical Methods

Einleitung

Die heutige Lebensmitteltechnologie erfordert eine regelmässige Untersuchung der betreffenden Produkte nicht nur auf ihre Zusammensetzung (Kohlenhydrate, Proteine, Lipide u.a.), sondern auch auf die Anwesenheit kontaminierender, potentiell schädlicher Substanzen. Diese umfassen grundsätzlich die Kategorien der Pestizide/Toxine/Chemotherapeutika und der pathogenen Erreger oder solcher mit toxischen Derivaten. Abbildung 1 soll schematisch das Prinzip der Lebensmitteldiagnostik speziell hinsichtlich der Rolle biotechnologischer Verfahren veranschaulichen. Einleitend zum dazugehörigen Teilbereich «diagnostische Immunreaktionen» (oder *Immunoassays*) sei erwähnt, dass diese bezüglich ihres ursprünglichen Einsatzspektrums (Nachweis der Immunantwort eines Wirtes nach Kontakt mit fremden Organismen oder Stoffen; direkter Nachweis fremder Organismen oder Stoffe im Wirtsorganismus) im Laufe des letzten Jahrzehntes stark erweitert worden sind. Dies war vor allem auf die Entwicklung hochsensitiver Verfahren zur Darstellung von Immunreaktionen zurückzuführen, die auch den Einsatz ausserhalb medizinischer Fragestellungen ermöglicht hat. Zudem liessen sich, unter selektionierten und modulierten Bedingungen, bei praktisch jeder Substanz sogenannte «antigene» Eigenschaften nachweisen. Diese Antigenität erlaubte die experimentelle Induktion spezifischer Immunantworten in höheren Vertebraten und gleichzeitig die Synthese von sogenannten «Antikörpern», die zum auslösenden Immunogen passen und als Test-Reagenzien verwendet werden können.

Eine diagnostische Reaktion zwischen Antikörpern und antigenen Molekülen lässt sich *in vitro* einfach durchführen. Bereits in der ersten Hälfte dieses Jahrhunderts liessen Oudin und Ouchterlony eine solche Reaktion (Präzipitation) in einem Agargel ablaufen, mit anschliessendem färberischen Nachweis der Präzipitationsreaktion. Etwas später verfeinerten Williams und Grabar die Technik durch elektrophoretische Auftrennung der Antigenkomponenten («Immunelektrophorese»).

Die Ausweitung des «Antigenspektrums» auf solche Substanzen, die es in nur geringsten Konzentrationen (Proteine, Enzyme, Hormone usw.) nachzuweisen gilt, erforderte eine entsprechende methodische Sensitivität, die in dem von Berson und Yalow entwickelten *RadioImmunoAssay* (RIA) erreicht wurde. Dieser RIA beruht auf dem Prinzip, dass sehr kleine Mengen radioaktiv markierter Antigene oder Antikörper das entsprechende Partnermolekül binden. Eine erfolgte Antigen-Antikörperreaktion kann qualitativ wie quantitativ durch Messung der Isotopenaktivität nachgewiesen werden (auf die technischen Tricks zur Lösung der RIA-Problematik kann hier nicht eingegangen werden). In den 70er Jahren ersetzten Engvall und Perlman die Radioisotop-Markierung durch eine Enzym-Markierung der Antigene oder Antikörper, wobei die gemessene Enzymaktivität (bzw. der kolorimetrische Nachweis der Substratumsetzung) dabei proportional das Ausmass der primären diagnostischen Immunreaktion reflektierte. Im Laufe der letzten Jahre wurden sowohl das Spektrum der Markerenzyme erweitert als auch neue Markierungstechniken sowie neue Markersubstanzen (hochsensitive fluorochrome Lanthanide; kolloidale und andere Direktfarbstoffe usw.) entwickelt. Aus technologischer Sicht haben sich immunologische Verfahren immer mehr mit molekularbiologischen Methoden vernetzt, wie z. B. für die Herstellung rekombinanter monoklonaler Antikörper und anderer Reagenzien mit Proteinnatur.

Die vorliegende Arbeit wird sich hauptsächlich auf den technologischen Hintergrund der Verfahren konzentrieren, die sich zum Nachweis von potentiell «antigenen» Substanzen eignen. Ebenfalls werden nur die (arbiträr selektionierten) wichtigsten und am häufigsten angewendeten Testmethoden Beachtung finden. Auf die einzelnen spezifischen Anwendungsgebiete (Nachweis von pathogenen Keimen, Pestiziden, Toxinen, Drogen, Wirkstoffen u. a.) wird an dieser Stelle nicht eingegangen.

Der Immunoassay

Gleich wie im klinischen/infektiologischen Anwendungsbereich hat sich in der biologischen Lebensmitteldiagnostik fast ausschliesslich der sogenannte ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) zum Nachweis antigener Substanzen durchgesetzt (einige Tests basieren noch auf dem RIA, einige wenige auf der sogenannten «Latex»-Agglutination oder anderen einfachen Methoden; auf diese Tests wird an dieser Stelle, ihrer geringeren Bedeutung wegen, nicht eingegangen) (1). Mit «ELISA» soll dabei das ganze Spektrum an technischer Vielfältigkeit dieses *Immunoassays* verstanden werden. Zum «Antigennachweis» wird der ELISA prinzipiell auf zwei Arten angewendet: entweder (i) als sogenannter *Sandwich*-ELISA oder (ii) als sogenannter «kompetitiver» ELISA (Abb. 2). Zum Nachweis einer primären Antikörper-Antigenreaktion bedient sich die ELISA-Technologie eines Zweitantikörpers (*Sandwich*-ELISA) oder antigener Testmoleküle (kompetitiver ELISA), die vorgängig mittels eines Enzyms markiert worden sind (wie z. B. alkalische Phosphatase, Peroxidase o. a.). Das Enzym wird im ELISA einen kolo-

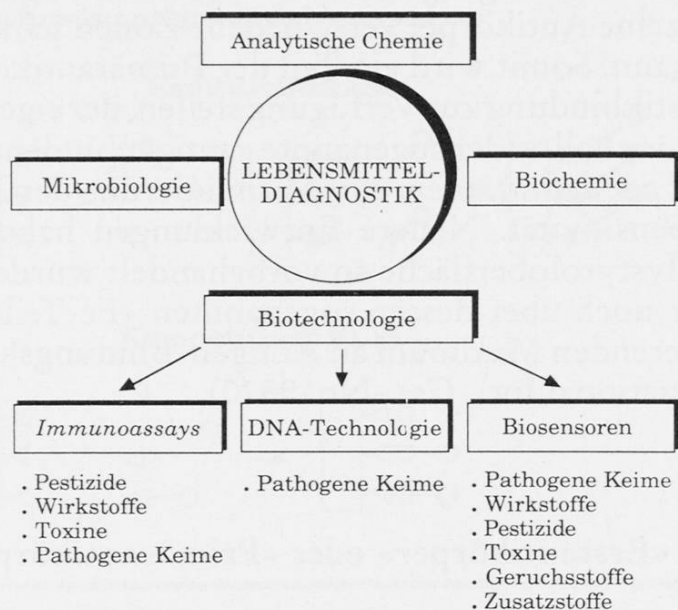


Abb. 1 (modifiziert nach Taylor and Little (1)). Darstellung der grundsätzlichen Lebensmittel-Diagnostik. Die Biotechnologie umfasst dabei einen wesentlichen Anteil der technischen Möglichkeiten. Die Rolle immundiagnostischer Verfahren wird in der vorliegenden Arbeit dargestellt. Die DNA-Technologie und die Entwicklung sogenannter Biosensoren werden in anderen Arbeiten derselben Reihe erläutert.

rimetrisch messbaren Farbumschlag in einer meistens ursprünglich farblosen Substratlösung hervorrufen. Bei geeigneten Testbedingungen steht die Intensität der gemessenen Farbreaktion meistens in einem direkt oder reziprok-proportionalen Verhältnis zur Menge nachgewiesener Testsubstanz («Antigen»). In jedem Testlauf mitgeführte Kontrollen (standardisierte Referenzsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen sowie «negative» Kontrollsubstanzen) erlauben, die Testergebnisse in definierten *Mengen* oder *Einheiten* zu exprimieren.

Der «Träger» oder die «feste Phase»

Die meisten der oben erwähnten *Immunoassays* werden primär an einer sogenannten «festen Phase» durchgeführt, d. h. dass der die antigene Testsubstanz erkennende Erstantikörper an einen Träger gekoppelt wird. Antikörper sind Glykoproteine, die sich leicht an Kunststoffoberflächen, wie z. B. Polystyrol, binden lassen. Solche Polystyrolträger werden meistens in Form von sogenannten Mikrotiterplatten oder Mikrotiterstreifen verwendet, deren einzelne Vertiefungen mit einem Volumen von 200 µl eine wirtschaftliche Arbeitsweise mit Kleinstmengen an Reagenzien ermöglichen. Alternativ zu Polystyrolvertiefungen eignen sich Polystyrolkügelchen, die heute ebenfalls in Mikrotiterformat angeboten werden. Die Bindung von Antikörpern an die Polystyroloberfläche erfolgt unspezifisch (wobei

der eigentliche chemische Vorgang der Bindung noch ungeklärt ist), d. h. dass strukturell jeder einzelne Antikörper verschiedene Zonen seiner Oberfläche an die feste Phase binden kann. Somit wird ein Teil der Primärantikörper den Teil seines Moleküls für die Plastikbindung zur Verfügung stellen, der eigentlich zur Erfassung der Testsubstanz dienen sollte (der sogenannte «antigenbindende Teil» oder «Fab»-Teil), es erfolgt somit *per definitionem* eine Verminderung der Testkapazität bezüglich methodischer Sensitivität. Neuere Entwicklungen haben dem entgegen gewirkt, indem die Polystyroloberfläche so vorbehandelt wurde, dass eine Bindung des Antikörpers nur noch über dessen sogenannten «Fc-Teil» erfolgen kann mit einem daraus resultierenden Maximum an Antigen-Bindungskapazität (Avidplate-HZ, BioProbe International Inc., Cat.-No. 9920).

Der «Erstantikörper» oder «Primärantikörper»

Unabhängig vom Typ des *Immunoassays* (*Sandwich* oder kompetitiv), beruhen sämtliche operationellen Charakteristika (wie methodische und diagnostische Sensitivität, Spezifität) und somit auch die Qualität des Tests auf der Eigenschaft des Primärantikörpers, die nachzuweisende Substanz unter Testbedingungen so zu binden, dass (a) die quantitativen Erfordernisse erfüllt werden, (b) unter diesen Bedingungen keine unspezifischen Bindungen mit störenden Fremdstoffen eingegangen werden und (c) die antigenbindenden Stellen, die vom Zweitantikörper benutzt werden sollen, vom Primärantikörper nicht abgedeckt werden.

Polyklonale Primärantikörper

Ausgangssubstanz zur Herstellung eines antigenspezifischen polyklonalen Antikörpers ist üblicherweise ein Hyperimmunserum, das durch Immunisierung eines Tieres (z.B. Kaninchen oder Huhn) mit der entsprechenden Testsubstanz und einem Adjuvans (Stoff, der die Produktion spezifischer Antikörper oder den Grad der Sensibilisierung gegen ein Antigen verstärkt) gewonnen wurde. Nicht-immunogene Substanzen können häufig biochemisch verändert oder durch Verkopplung an ein geeignetes Trägermolekül dem Immunsystem so präsentiert werden, dass die Induktion einer humoralen Immunantwort trotzdem möglich wird. Die antigenspezifischen Antikörper (erwünscht sind meistens Antikörper des Isotyps IgG) können mittels diverser Verfahren angereichert werden: Eine Anreicherung der gesamten IgG-Serumfraktion geschieht meistens über eine sogenannte Protein-A- oder Protein-G-Säule (2) oder über «Aussalzen» (bei 1,5 M Ammoniumsulfat). Ein beliebtes Verfahren zur anschließenden Abtrennung des antigenspezifischen von anderem IgG ist die «Immun-Affinitätschromatographie». Sind auf der nachzuweisenden Testsubstanz Epitope vorhanden, die identisch mit Epitopen auf störenden Fremdstoffen sind, können die gegen diese Epitope gerichteten Antikörper mittels «Immunsorption» entfernt werden.

Verschiedene Typen des Immunoassays zum Nachweis antigener Substanzen

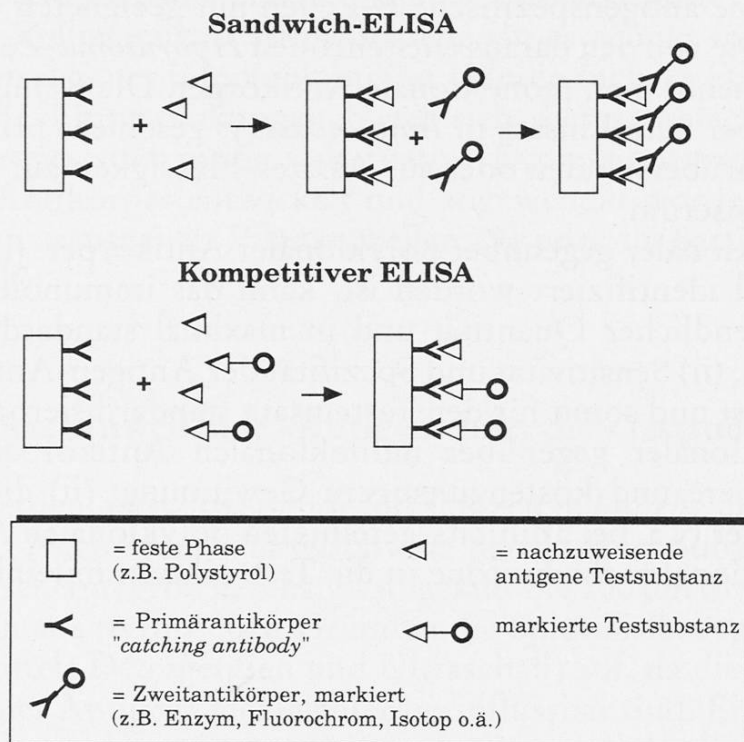


Abb. 2. (modifiziert nach Taylor and Little (1)). Der Sandwich-ELISA quantifiziert die Menge der an den Primärantikörper gebundenen nachzuweisenden Testsubstanz direkt durch einen markierten Zweitantikörper. Die Intensität der abschliessend gemessenen Farbreaktion (Enzyme), Fluoreszenz oder Radioaktivität ist direkt proportional zur nachzuweisenden Testsubstanzmenge. In einer Form (es gibt deren viele) des kompetitiven ELISAs konkurrenziert die (unmarkierte) nachzuweisende Testsubstanz mit der künstlich beigefügten markierten Testsubstanz um Bindungsstellen. Der Wert der gemessenen Reaktion ist somit reziprok-proportional zur nachzuweisenden Testsubstanzmenge.

Monoklonale Primärantikörper

Für bestimmte Fragestellungen kann es wichtig sein, nicht mit den oben dargestellten polyklonalen Antikörpergemischen, die normalerweise das ganze Spektrum von möglichen Oberflächen-B-Zellepitopen einer Substanz erkennen können, zu arbeiten. Als Alternative bieten sich sogenannte monoklonale Antikörper an, die klonspezifisch nur ein strukturell definiertes Epitop auf einer Substanz erkennen, wobei die Bindungsstärke an das Epitop für jedes einzelne Antikörpermolekül gleich ist (im Gegensatz zu polyklonalen Antikörpern, deren Affinität und Avidität stark unterschiedlich sein können). Da eine normale Immunantwort (wie z. B. nach Immunisierung mit einer «Testsubstanz») aus der Proliferation zahlreicher B-Zellklone hervorgeht, besteht die Aufgabe bei der Herstellung monoklona-

ler Antikörper darin, einen einzelnen geeigneten Klon herauszufischen und zu unbegrenzter Vermehrung sowie Antikörpersynthese zu veranlassen. Dies ist möglich, indem einzelne antigenspezifische B-Zellen mit geeigneten Tumorzellen fusioniert werden. Die von den daraus entstehenden *Hybridoma*-Zellen sezernierten Immunglobuline nennt man monoklonale Antikörper. Die Reinigung der monoklonalen Antikörper zum Einsatz in *Immunoassays* geschieht prinzipiell aus Hybridoma-Zellkulturüberständen oder aus Aszites-Flüssigkeit auf dieselbe Art wie beim Hyperimmunserum.

Vorteile monoklonaler gegenüber polyklonaler Antikörper: (i) Falls ein geeigneter Klon einmal identifiziert worden ist, kann das immunologische Reagenz theoretisch in unendlicher Quantität und in maximal standardisierter Qualität hergestellt werden; (ii) Sensitivität und Spezifität der Antigen-Antikörperreaktion sind genau definiert und somit für den Testeinsatz standardisierbar.

Vorteile polyklonaler gegenüber monoklonalen Antikörpern: (i) meistens schnellere, einfachere und kostengünstigere Gewinnung; (ii) die Sensitivität ist üblicherweise höher (v.a. bei affinitäts-gereinigten polyklonalen Antikörpern), da insgesamt proportional mehr Epitope in die Testreaktion miteinbezogen werden können (3).

Rekombinante Antikörper

Der heutige immense Anwendungsbereich von *E. coli* als Expressionswirt zur Synthese heterologer Polypeptide sowie die Einfachheit, mit der die Bakterien in ihrer Proteinsynthese manipuliert werden können, haben auch vor der Antikörperproduktion keinen Halt gemacht (4). Die dabei verwendete Strategie zielte auf eine getrennte Synthese der beiden Antikörperketten (*heavy* und *light chain*) in derselben Bakterienzelle, wobei die Ketten anschliessend in den periplasmatischen Raum des Bakteriums transportiert werden, wo sich die beiden Kettentypen spontan zu einem vollständigen nativen Antikörpermolekül aggregieren (5). Es zeigte sich, dass die effizienteste Expression bei der Herstellung von Antikörperfragmenten eintrat, wobei vor allem die Synthese der antigenerkennenden Struktur (der «Fv»-Teil des Antikörpers) angestrebt wurde (6). Diese Fv-Teile, post-translational chemisch stabilisiert, eignen sich vor allem ihrer kleinen Molekularmasse wegen für praktisch sämtliche immunbiologischen Anwendungen (7). Zum praktischen Vorgehen wird vorerst eine cDNA-Bank aus B-Zellen, z. B. dieselben, die zur Herstellung monoklonaler Antikörper generiert werden müssen, hergestellt. Dabei haben sich die quantitativen Anforderungen an das Ausgangsmaterial dramatisch vermindert, indem mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) [die Familie der Antikörper-Gene enthalten konservierte Sequenzen sowohl im 5'- wie auch im 3'-Bereich der variablen Gene, solche Sequenzen eignen sich zur Bestimmung von sogenannten *primer*Sequenzen für die PCR] geringste Mengen an mRNA (entsprechend weniger B-Zellen) voramplifizieren lassen (8). Mit dieser Strategie erhöht sich statistisch auch die Wahrscheinlichkeit, die angepeilten Anti-

körperspezifitäten zu finden. Ein weiterer Vorteil wird darin bestehen, dass, im Gegensatz zu monoklonalen Antikörpern, die sich auf ein kleines zur Verfügung stehendes Tierartenspektrum beschränken, wie Maus, Ratte und Hamster, der Ursprung des B-Zelllieferanten artunabhängig ist; es gelingt somit relativ einfach die Synthese menschlicher Immunglobuline. Gerade auch im Hinblick auf aktuelle tierexperimentelle Einschränkungen bietet sich dieses biotechnische Verfahren geradezu an. Bereits sind weitere alternative Expressionssysteme zur Synthese rekombinanter Antikörper entwickelt und angewendet worden, so die Antikörperproduktion in transgenen Pflanzenzellen (9) oder in Baculovirus-infizierten Insektenzellen (10).

Das nachzuweisende «Antigen» oder die «Testsubstanz»

Prinzipiell werden nachzuweisende Substanzen in *lösliche* und *partikuläre* Antigene eingeteilt. Auch wenn der Nachweis partikulärer Substanzen (der obere Grössenbereich scheint, grob geschätzt, ungefähr bei 100 µm Ø zu liegen) gelingen kann, drängt sich aus technischen Gründen die Solubilisierung partikulärer Substanzen (z. B. mittels Detergentien und Ultraschall) auf, da die Testparameter auf der Ebene löslicher Antigene viel leichter beeinflussbar sind. Eine zentrale Bedeutung bei der Selektion der in einem ELISA nachzuweisenden Substanz spielt deren Stabilität im Untersuchungsgut, vor allem bezüglich der Konfiguration der relevanten Epitope. Ein Testsystem mag unter künstlichen Laborbedingungen bestens funktionieren, kann jedoch unter praktischen «Feldkonditionen» vollständig scheitern, wenn während der Probenaufarbeitung das entsprechende Epitop zerstört oder verändert wird. Dieser Punkt ist vor allem bei der Verwendung monoklonaler Antikörper wichtig, deren Reaktion auf einer absoluten ja/nein-Entscheidung bezüglich der Erkennung einer einzigen Epitopstruktur basiert. Das Untersuchungsgut mit prinzipiell hoher proteolytischer oder sonstiger enzymatischer Aktivität wird häufig vor der Aufarbeitung mittels Inhibitoren vorbehandelt (die Inhibitoren dürfen aber im ELISA später die Enzymaktivität des Zweitantikörper-Konjugates nicht beeinflussen). Das Aufführen des gesamten Spektrums an möglichen nachzuweisenden Stoffen würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, aufgelistet seien die grossen Gruppen «Toxine», «Pestizide», «Drogen», «Chemotherapeutika und andere Wirkstoffe» sowie «pathogene Mikroorganismen» oder deren Stoffwechselprodukte. Ganz klar ergeben sich aus diagnostisch-technischer Sicht immer mehr Überschneidungen mit nahe verwandten Technologien, wie das diagnostische DNA-*probing* und die PCR. Die Frage der geeignetsten Technik muss für jede Fragestellung unter Berücksichtigung multipler technischer und wirtschaftlicher Komponenten einzeln bearbeitet und entschieden werden.

Der enzymmarkierte «Zweitantikörper»

Zum Nachweis des primären Antikörper-Antigen-Komplexes wird häufig ein gleicher Antikörper verwendet, wie er auch als «Erstantikörper» zum Einsatz kam. Ein wichtiger Grund, der für diese Wahl spricht, ist die identische Spezifität und Sensitivität der Sekundärreaktion. Dabei auftretende Kompetitionen um Antigenbindungsstellen spielen bei der Verwendung polyklonaler Antikörper keine grosse Rolle. Anders sieht es bei der Verwendung monoklonaler Antikörper aus. Sind pro nachzuweisendes Molekül nur wenige Epitope vorhanden, können diese theoretisch bereits alle durch den Erstantikörper besetzt sein. In einem solchen Falle muss als Zweitantikörper ein gegen ein anderes Epitop gerichtetes monoklonales oder evtl. polyklonales Immunglobulin verwendet werden. Dieser Zweitantikörper muss nun nicht mehr dieselbe Spezifität wie der Erstantikörper aufweisen, da die eigentlichen Testparameter der diagnostischen Reaktion durch die primäre Immunreaktion bestimmt werden. Zweitantikörper müssen für den ELISA mit einem Enzym markiert sein. Dies geschieht direkt durch kovalente Verkoppelung des Enzymmoleküls an den Antikörper oder indirekt unter Zuhilfenahme von Verbindungsmolekülen mit sehr starker Affinität (z. B. Streptavidin-Biotin-System). In beiden Fällen müssen mittels biochemischer Verfahren die Markermoleküle an den Antikörper gebunden werden, wobei es sich gezeigt hat, dass eine hochmolekulare Vernetzung eines sogenannten Konjugatkomplexes dazu beitragen kann, den Grad der methodischen Sensitivität eines Systems bedeutend zu erhöhen (11). Weitere Techniken zur Erhöhung der Sensitivität gelingen durch sogenannte Amplifikationssysteme (12). Als Enzyme haben sich vor allem die alkalische Phosphatase und die Peroxidase durchgesetzt. Auf das gesamte Spektrum weiterer verwendbarer Enzyme und Markierungstechniken möchte ich an dieser Stelle nicht eingehen und nur auf Literaturstellen hinweisen (13).

Alternative Markierungsverfahren und Markersubstanzen

Auf die Verwendung des Biotin-Streptavidin-Systems zur Verkoppelung von Antikörpern mit Markermolekülen ist bereits oben hingewiesen worden. Diese universelle Verbindungstechnik ist nicht nur sehr populär geworden, sie ist auch bezüglich der Art der abschliessenden Visualisierung der Reaktion weiterentwickelt worden. Als Paradebeispiel gilt der Trend zu methodisch weit empfindlicheren Nachweisverfahren als die einer Enzymreaktion, wie z. B. die Verwendung von Lanthaniden in einem Test, der zurzeit mit DELFIA (*Dissociation-Enhanced Lanthanide FluoroImmunoAssay*) oder TRFIA (*Time Resolved FluoroImmuno-Assay*) bezeichnet wird. Lanthanide sind seltene Erden (für den DELFIA prinzipiell eignen sich Europium Eu^{3+} , Samarium Sm^{3+} und Terbium Tb^{3+}), die in chelierter Form und mit einer reaktiven Gruppe (z. B. Isothiocyanate) versehen an freie Aminogruppen des Antikörpers gekoppelt werden können. Europiummarkierte Antikörper sind *per se* praktisch nicht-fluoreszierend. Nach Zugabe einer Verstär-

kerflüssigkeit (z. B. Triton X-100, β -Naphtholyltrifluoroaceton und TOPO) dissoziiert das Europium als freies Eu^{3+} und bildet rasch einen neuen Chelatkomplex innerhalb eines Mizels. Die Fluoreszenzaktivität wird dabei um das millionenfache amplifiziert. Doppelmarkierungen werden durch simultane Anwendung von Eu^{3+} und Sm^{3+} möglich, die bei verschiedenen Wellenlängen aktivierbar sind (613 nm für Eu^{3+} und 643 nm für Sm^{3+}). Die Anwendung eines Europium-Streptavidin-Komplexes hat sich bereits zum Nachweis von Interleukin-3 im Plasma bewährt (14) und wird in näherer Zukunft sicherlich das ganze Spektrum klassischer ELISAs ergänzen. Falls keine hohe methodische Sensitivität erforderlich ist, eignen sich kolloidale Farbstoffe zum Markieren von Zweitantikörpern (z. B. Palanilrot, Samaronblau u. a.). Diese Zweitantikörper eignen sich zum direkten färberischen Nachweis einer primären Antikörper-Antigen-Reaktion, die z. B. auf Nitrozellulose erfolgt ist, wobei die Reaktion visuell direkt von Auge abgelesen werden kann. Solche Techniken eignen sich ihrer Einfachheit wegen insbesondere für Feldstudien in Gebieten ohne hoch-technische Infrastruktur (15).

Andere analytische Immunoassays

Die oben beschriebenen Techniken eignen sich hauptsächlich zum Nachweis klar definierter Substanzen. Komplexere Fragestellungen erfordern meistens auch komplexere analytische Technologien, die aber meistens nur dann Verbreitung finden, wenn ihre Durchführbarkeit im diagnostisch tätigen Labor einfach handzuhaben ist. Eine sehr beliebt gewordene Methode (weil einfach) zur Isolierung von primären Antikörper-Antigenreaktionen (wobei v. a. auch partikuläre Antigene sich gut eignen) für anschließende analytische Nachuntersuchungen sind immunomagnetische Antikörper (16), die minutenschnelle Auftrennungen erlauben. Ebenfalls werden immer häufiger prinzipiell verschiedene Techniken miteinander verbunden und eignen sich so für äusserst komplexe Untersuchungen, hier sei nur ein Beispiel aufgeführt: Der ELISAGRAM verbindet die *High Performance Thin Layer Chromatography* mit einem kompetitiven ELISA und wurde als multi-Hapten *Immunoassay* zum Nachweis von Zearalenonen und Aflatoxinen innerhalb der Mykotoxinfamilie erprobt (17).

Allgemeines zu Immunoassays

Immunoassays zum Nachweis von Substanzen in Lebensmitteln operieren üblicherweise im methodischen Sensitivitätsbereich von ppm (*parts per million* oder $\mu\text{g pro ml}$) oder ppb (*parts per billion* oder ng pro ml) und können in nützlichen Zeiten von 5 bis 30 Minuten durchgeführt werden. Eine allerdings unvollständige Liste von bereits kommerziell erhältlichen Testkits im Bereich der Lebensmittel-diagnostik findet sich im Übersichtsartikel von Taylor und Little (1). In diesem Artikel wird das gegenwärtige Schwergewicht, das der Entwicklung von ELISAs

als Testsystem gegeben wird, klar ersichtlich. Heutige diagnostische Nachweisverfahren, ob auf immunchemischer, molekularbiologischer oder chemisch/biochemischer Stufe operierend, stossen nicht mehr auf bedeutende Probleme methodischer oder diagnostischer Sensitivität und Spezifität. Der enorm grosse Anwendungsbe- reich und die steigende Häufigkeit der Untersuchungsanträge erfordern heute, dass bestehende Tests vor allem kostengünstiger und schneller sowie einfacher durchführbar werden. Automatisierung der Verfahren, von der Probenaufarbeitung über Testdurchführung bis zur ausgereiften Verarbeitung der Testergebnisse, sind eine Herausforderung an multidisziplinär kooperierende Naturwissenschaftler, Mediziner, Techniker und Informatiker. Als Ansporn könnten folgende Zahlen dienen: In den USA wurde im Jahre 1989 der Markt bezüglich Lebensmitteldiagnostik auf 150 Mio \$ geschätzt, mit einer jährlichen Zuwachsrate von 10–12%; im Jahr 2000 wären das dann 475 Mio \$ (1).

Zusammenfassung

Immunologische Verfahren stellen neben neueren molekularen sowie chemischen Techniken einen wichtigen Beitrag zum Nachweis und zur Identifizierung verschiedenster Substanzen in Lebensmitteln und anderen Stoffen dar. Nachzuweisende Substanzen mit sogenannten «antigenen» Eigenschaften werden heutzutage vor allem mit Enzym-*Immunoassays* (ELISA u. ä.) getestet. Neuentwicklungen auf dem Gebiet dieser ELISA-Techniken beinhalten vor allem die Möglichkeiten zur Produktion rekombinanter monoklonaler Antikörper sowie die Neuentwicklung von hochsensitiven Markersubstanzen (z. B. Lanthanide, kolloidale Farbstoffe u. a.), die eine primäre diagnostische Antikörper-Antigenreaktion direkt visualisieren lassen. Testmaterialien und Reagenzien werden dem Bedürfnis nach grossen Untersuchungszahlen und entsprechender Automatisierung der Testverfahren angepasst.

Résumé

En plus des méthodes modernes en chimie et chimie-physique moléculaire, les tests immunologiques contribuent d'une manière importante à la détermination et identification de différentes substances dans les denrées alimentaires et autres produits. Aujourd'hui, les substances avec propriétés antigènes sont le plus souvent analysées à l'aide de tests immunoenzymatiques et d'enzymes (enzyme-immunoassays, comme ELISA et techniques similaires). Les derniers développements récents dans le domaine de ces techniques concernent les possibilités de synthèse d'anticorps monoclonaux et l'application de substances marqueurs très sensibles (p. ex. lanthanides, colorants à l'état colloïdal etc.). Ceci permet la visualisation directe d'une réaction anticorps-antigène de caractère diagnostique primaire. Les matériaux et réactifs de test sont de plus en plus adaptés au nombre croissant d'analyses et aux capacités d'automatisation des procédures de test.

Summary

Immunoassays, beside new molecular and chemical techniques, represent today a large portion of available methods to detect and analyze various substances in food and other

substrates. Today, substances with so-called «antigenic» properties are mainly demonstrated with enzyme-immunoassays (such as ELISA and similar techniques). New technological developments resulted in the possibility to synthesize recombinant monoclonal antibodies and in the application of new, highly sensitive marker substances (such as lanthanides, colloidal dyes a.o.) for visualizing primary diagnostic antibody-antigen reactions. Furthermore, test materials and reagents are more and more adapted to increasing numbers of test performances and corresponding capability for automatization of test procedures.

Literatur

1. Taylor, R. F. and Little, A. D.: New Diagnostic methods for the food industry. Spectrum Food Industry, July 26, 1990.
2. Mizrahi, A.: Monoclonal antibodies: production and application. Advances in Biotechnological Processes, Vol. 11. Alan R. Liss, Inc., New York 1989.
3. Fabnstock, S. R.: GammaBind®: Genetically Engineered recombinant Protein G. A new IgG binding reagent with advantages over [125I]-Protein A. DuPont Biotech Update 4, 1-11 (1989).
4. Plückthun, A.: Antibody engineering: advances from the use of *Escherichia coli* expression systems. Biotechnology 9, 545-550 (1991).
5. Plückthun, A.: Antibodies from *Escherichia coli*. Nature 347, 497-498 (1990).
6. Skerra, A., Pfitzinger, I. and Plückthun, A.: The functional expression of antibody Fv fragments in *Escherichia coli*: improved vectors and a generally applicable purification technique. Biotechnology 9, 273-278 (1991).
7. Hodgson, J.: Making monoclonals in microbes. Biotechnology 9, 421-425 (1991).
8. Jones, S. T. and Bending, M. M.: Rapid PCR-cloning of full-length mouse immunoglobulin variable regions. Biotechnology 9, 88-89 (1991).
9. Hiatt, A., Cafferkey, R. and Bowd, K.: Production of antibodies in transgenic plants. Nature 342, 76-78 (1989).
10. zu Pultitz, J., Kubasek, W.L., Duchene, M., Marget, M., von Specht, B. U. and Domdey, H.: Antibody production in Baculovirus-infected insect cells. Biotechnology 8, 651-654 (1990).
11. Tsang, V. C. W., Hancock, K. and Maddison, S. E.: Quantitative capacities of glutaraldehyde and sodium m-periodate coupled peroxidase-anti-human IgG conjugates in enzyme-linked immunoassays. J. Immunol. Meth. 70, 91-100 (1984).
12. Butler, J. E., Cantarero, L. A., Swanson, P. and McGivern, P. L.: The amplified enzyme-linked immunosorbent assay (a-ELISA) and its applications. In: Maggio, E.T., Enzyme-Immunoassay, pp. 197-212. CRC Press Inc., Boca Raton 1980.
13. Doel, T. R. and Collen, T.: Chemical cross-linking and the preparation of conjugates for ELISA. In: Wardley, R. C. and Crowther, J. R., The ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay in veterinary research and diagnosis, pp. 10-20. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague 1982.
14. Knopf, H. P. and Papoian, R.: Preparation of europium-streptavidin in a time-resolved fluoroimmunoassay for interleukin-3. J. Immunol. Meth. 138, 233-236 (1991).
15. Snowden, K. and Hommel, M.: Antigen detection immunoassay using dipsticks and colloidal dyes. J. Immunol. Meth. 140, 57-65 (1991).
16. Luk, J. M. C. and Lindberg, A. A.: Rapid and sensitive detection of *Salmonella* (0:6,7) by immunomagnetic monoclonal antibody-based assays. J. Immunol. Meth. 137, 1-8 (1991).

17. *Pestka, J. J.*: High performance thin layer chromatography ELISAGRAM: Application of a multi-hapten immunoassay to analysis of the zearalenone and aflatoxin mycotoxin families. *J. Immunol. Meth.* **136**, 177–183 (1991).

Dr. B. Gottstein
Institut für Parasitologie
der Universität Zürich
Winterthurerstrasse 266a
CH-8057 Zürich