

Entwicklung und Anwendung auf antiidiotypischen
Antikörpern basierender Verfahren zum Nachweis von
Aflatoxinen und T-2 Toxin

von Laura Sophia Christina Gayk

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

Entwicklung und Anwendung auf antiidiotypischen
Antikörpern basierender Verfahren zum Nachweis von
Aflatoxinen und T-2 Toxin

von Laura Sophia Christina Gayk
aus München

München 2019

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

Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer

Mitbetreuung durch: Dr. Richard Dietrich

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

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

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

Tag der Promotion: 25. Februar 2019

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Allgemeiner Überblick.....	3
2.	Chemische Struktur.....	5
3.	Toxikologische Eigenschaften	7
4.	Aflatoxin- und T-2 Toxin-Metaboliten im Urin	9
5.	Rechtliche Bestimmungen	13
6.	Enzymimmuntests (EIAs)	15
6.1.	Allgemein.....	15
6.2.	Mykotoxin-spezifische EIAs	16
7.	Antidiotypische Antikörper (Ab2)	22
III.	MATERIAL UND METHODEN	29
1.	Material und Geräte	29
1.1.	Chemikalien und Biochemika.....	29
1.2.	Immunreagenzien.....	29
1.3.	Toxin-Standards.....	30
1.4.	Lösungen und Puffer.....	31
1.5.	Geräte	32
1.6.	Software	32
1.7.	Weitere Materialien	33
2.	Methodik.....	33
2.1.	Generierung und Nachweis von antidiotypischen Antikörpern.....	33
2.1.1.	Herstellung der Immunogene.....	33
2.1.2.	Immunisierung	33
2.1.3.	Herstellung Antigen-bindender Fragmente (Fab-Fragmente)	34
2.1.4.	Herstellung von Antikörper-HRP Konjugaten.....	35
2.1.5.	Charakterisierung polyklonaler Antiseren	36
2.1.6.	Hybridom-Zelllinien	37
2.2.	Etablierung Ab2-basierter EIAs.....	38

2.2.1.	Ermittlung der Sensitivität und Spezifität.....	39
2.2.2.	Vergleich mit kompetitiven, klassischen EIAs	39
2.3.	Nachweis der Toxine in Urinproben.....	40
2.3.1.	Orientierende Vorversuche	40
2.3.2.	Optimierung der Testsysteme zur Untersuchung von Urinproben	40
2.3.3.	Validierung der Testsysteme.....	41
IV.	ERGEBNISSE	43
1.	Polyklonale Ab2	43
1.1.	Ab2-Nachweis in Seren mittels Screening-Variante 1	43
1.2.	Ab2-Nachweis in Seren mittels Screening-Variante 2	45
1.2.1.	Charakterisierung der Ab1-Fab-HRP-Konjugate	45
1.2.2.	Optimierung des Ab2-Nachweises	48
1.2.3.	Titerbestimmung	50
1.2.4.	Erstellung von Standardkurven.....	51
1.3.	Ab2-Nachweis in Seren mittels Screening-Variante 3	53
2.	Generierung monoklonaler antiidiotypischer Antikörper	55
2.1.	Etablierung Hybridom-Zelllinien.....	55
2.2.	Etablierung und Optimierung von Ab2-basierten Toxin-Nachweisverfahren.....	58
2.2.1.	Überprüfung der Sensitivität der Ab2-basierten EIAs.....	60
2.2.2.	Spezifität der antiidiotypischen, direkten, kompetitiven EIAs	63
3.	Anwendbarkeit der Enzymimmuntests zum Toxin-Nachweis in Urin	65
3.1.	Orientierende Vorversuche	65
3.2.	Validierung der Ab2-basierten Testsysteme	70
V.	DISKUSSION.....	73
1.	Herstellung der Immunogene	74
2.	Bewertung der Screening-Ansätze zum Nachweis von Ab2 in polyklonalen Seren.....	76
3.	EIA-Etablierung und Optimierung.....	79
4.	Sensitivität und Spezifität Ab2-basierter EIA-Systeme	80
5.	Nachweis von HT-2 Toxin in Urin.....	83
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	85

VII.	SUMMARY	87
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	89
IX.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	109
X.	TABELLENVERZEICHNIS.....	111
XI.	DANKSAGUNG.....	113

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	Aspergillus
Ab1	Primärer, toxinspezifischer Antikörper
Ab2	Antiidiotypischer Antikörper
Ab3	Anti-antiidiotypischer Antikörper
AF	Aflatoxin
BSA	Bovines Serumalbumin
EIA	Enzymimmuntest (enzyme immunosorbent assay)
F.	Fusarium
FCS	Fetales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
HT	Hypoxanthin-Thymidin
IAC	Immunoaffinitätschromatographie
IARC	Internationale Agentur für Krebsforschung (International Agency for Research on Cancer)
IC₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
k.A.	Keine Angabe
KLH	Hämocyanin der Schlüsselloch-Schnecke (keyhole limpet hemocyanin)
LLE	Flüssig-Flüssig Extraktion (liquid-liquid extraction)
mAk	Monoklonaler Antikörper
pAk	Polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SPE	Festphasenextraktion (solid phase extraction)
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Vk	Variationskoeffizient
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation)

I. EINLEITUNG

Mykotoxine stellen aufgrund ihrer weiten Verbreitung und ihres Vorkommens in verschiedenen Lebensmitteln eine potentielle Gesundheitsgefährdung der Bevölkerung dar. Daher wurden von der Europäischen Union Höchstgehalte für Aflatoxin B₁ (AFB₁) bzw. Aflatoxin M₁ (AFM₁) und der Summe aus AFB₁, Aflatoxin B₂ (AFB₂), Aflatoxin G₁ (AFG₁) und Aflatoxin G₂ (AFG₂) für verschiedene Lebensmittel ((EG) Nr. 1881/2006) sowie Richtwerte für die Summe von T-2 Toxin und HT-2 Toxin festgelegt (Empfehlung der Kommission 2013/165/EU).

Neben der potentiellen Gesundheitsgefährdung durch natürlich mit Aflatoxinen bzw. Trichothecenen belasteten Lebensmitteln geht von beiden Toxin-Gruppen zusätzlich eine mögliche bioterroristische Gefahr aus, da Mykotoxine prinzipiell auch als Chemie-Waffen bzw. biologische Kampfstoffe eingesetzt werden können (Ciegler, 1986, Ludovici et al., 2017). Trichothecene eignen sich dafür besonders, da bereits der Kontakt mit wenigen Milligramm tödlich enden kann (Bennett and Klich, 2003).

Um eine mögliche Gefährdung der zivilen Bevölkerung durch eine gezielte bioterroristische Verbreitung von biologischen Toxinen rechtzeitig zu erkennen, wurde im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) unterstützten Programms „Forschung für die zivile Sicherheit“ ein Projekt mit dem Ziel der Entwicklung eines schnellen und sensitiven Nachweisverfahrens für biologische Toxine ins Leben gerufen.

Enzymimmuntests (EIAs) sind aufgrund ihrer hohen Sensitivität, Spezifität und Schnelligkeit prinzipiell für dieses Vorhaben geeignet. Um nicht auf die in konventionellen EIAs verwendeten (enzym)markierten Antigene (Toxin-Proteinkonjugate), von denen für den Anwender eine potentielle Gesundheitsgefährdung ausgeht, angewiesen zu sein, können alternativ antiidiotypische Antikörper (Ab2) zum Toxinnachweis eingesetzt werden.

Das dieser Arbeit zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 13N13795 [Sensor-basierte und automatisierte Detektion von hoch- und niedermolekularen biologischen Toxinen (SensTox)] gefördert.

Die im Rahmen dieser Arbeit am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch durchgeführten Eingriffe und Behandlungen an Tieren wurden der Regierung von Oberbayern gemäß §10a des Tierschutzgesetzes angezeigt und unter dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2532.0-47-2015 genehmigt.

Ab2 vom Typ β reagieren spezifisch mit dem Paratop des gegen das Toxin gerichteten Primär-Antikörpers (Ab1) (Uner and Gavalchin, 2006) und spiegeln somit ein Abbild des eigentlichen Toxins wider. Basierend auf diesem Prinzip können auch zum Nachweis von niedermolekularen Substanzen, wie Mykotoxinen, rein Antikörper-basierte Nachweisverfahren aufgebaut werden.

Vor diesem Hintergrund war das Ziel der vorliegenden Arbeit, Ab2-basierte Enzymimmuntests zum Nachweis von Aflatoxinen sowie T-2 Toxin und HT-2 Toxin anstelle bereits vorhandener auf Toxinkonjugaten basierter enzymimmunologischer Nachweismethoden zu entwickeln. Außerdem sollte die praktische Anwendbarkeit dieser Verfahren anhand künstlich kontaminierter Urinproben überprüft und validiert werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Allgemeiner Überblick

Mykotoxine sind von verschiedenen Pilzen gebildete niedermolekulare, sekundäre Metaboliten (Bennett and Klich, 2003). Es sind mittlerweile mehrere Hundert dieser Verbindungen bekannt, im Hinblick auf die toxischen Eigenschaften und die Vorkommenshäufigkeit stellen Aflatoxine und das Trichothecen T-2 Toxin (T-2) bzw. dessen Abbauprodukt HT-2 Toxin (HT-2) wichtige Vertreter dieser Gruppe dar.

Nach einem Massensterben von mehr als 100.000 Puten in Großbritannien im Jahr 1960 wurde der Begriff Turkey „X“ disease geprägt, da zwar eine Verbindung zu einem aus Brasilien importierten Futtermittel (Erdnussmehl) hergestellt werden konnte, die eigentliche Ursache für das Massensterben aber zunächst unentdeckt blieb (Blount, 1961). Letztlich konnte eine Kontamination des Erdnussmehls mit Aflatoxinen als eigentlicher Grund für die Verluste identifiziert werden (Sargeant et al., 1961).

Die Bezeichnung der Aflatoxine erfolgt aufgrund ihrer Fluoreszenzeigenschaften bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht. B steht hierbei für blau fluoreszierend (z.B. AFB₁ und AFB₂), G hingegen für grün fluoreszierend (z.B. AFG₁ und AFG₂). Die Zahlenindizes geben die relative chromatographische Mobilität wieder (McLean and Dutton, 1995).

Aflatoxine können von verschiedenen *Aspergillus* (A.) Species gebildet werden, wobei den beiden Hauptproduzenten *A. flavus* und *A. parasiticus* die weitaus größte Rolle zukommt. Aflatoxin-Bildung wurde daneben auch für *A. nomius*, *A. pseudotamarii*, *A. bombycis*, *A. ochraceoroseus* und *A. australis* postuliert. Besonders häufig kommt *A. flavus* in den Tropen vor und eher selten in gemäßigten Klimazonen. *A. parasiticus* hingegen scheint weniger weit verbreitet zu sein (Abbas et al., 2009, IARC, 2012). Während man früher annahm, dass *A. flavus* nur Aflatoxine vom B-Typ und Cyclopiazonsäure produziert, zeigen neuere Untersuchungen, dass manche Stämme auch Aflatoxine vom G-Typ bzw. Sterigmatocystin produzieren können (Moore et al., 2017). *A. parasiticus* hingegen bildet regelmäßig sowohl Aflatoxine vom B-Typ als auch vom G-Typ (IARC, 2012). Toxin-bildende Aspergillen wurden auf Mais, Reis, Gerste, Hafer,

Hirse, Erdnüssen, Pistazien, Mandeln, Walnüssen und Baumwollsaamen sowie auf Feigen, Ölsaaten und Tabak nachgewiesen (Bennett and Klich, 2003, Alshannaq and Yu, 2017).

Nach der Aufnahme von mit AFB₁ bzw. AFB₂ kontaminierten Lebensmitteln/Futtermitteln durch Mensch und Tier können als Stoffwechselprodukte typischerweise AFM₁, Aflatoxin M₂ (AFM₂) und Aflatoxicol in Milch, Urin und Faeces nachgewiesen werden (Peraica et al., 1999).

Bereits 1930 wurde eine Krankheit, die später als alimentäre toxische Aleukie bezeichnet wurde, mit dem Konsum von mit *Fusarien*-Spezies kontaminiertem Getreide in Verbindung gebracht (Pitt and Miller, 2017). Zu den bekanntesten Fusarientoxinen zählen heutzutage die Trichothecene, bei denen in Abhängigkeit von Modifikationen der chemischen Grundstruktur verschiedene Typen unterschieden werden (Ueno et al., 1973, Ueno, 1977, Eriksen and Alexander, 1998b).

Zu den klassischen Vertretern der Typ-A-Trichothecene zählt das T-2 Toxin, typische Abbauprodukte stellen HT-2, T-2-Triol und T-2-Tetraol dar. Typ-A-Trichothecene werden von verschiedenen *Fusarien* (*F.*) Species sowie von einigen *Trichoderma* Arten produziert, wobei *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae*, *F. acuminatum* und *F. poae* als wichtige Vertreter angesehen werden (Eriksen and Alexander, 1998a, Marin et al., 2013). *F. sporotrichioides* und *F. poae* kommen weltweit vor, *F. langsethiae* ist hingegen in Europa endemisch (Glenn, 2007). T-2 und HT-2 werden vor allem in Hafer, aber auch in anderen Getreidearten wie Weizen, Mais, Gerste und Reis nachgewiesen (Adhikari et al., 2017).

2. Chemische Struktur

Das Grundgerüst der Aflatoxine (Abbildung 1) besteht aus einem Bifuran-Ringsystem und einem substituierten Cumarinring, wobei dieses bei den B-Typ Aflatoxinen mit einem Pentanon-Ring, bei den G-Typ-Aflatoxinen hingegen mit einem Lakton-Ring kondensiert ist (Weber, 2010). Aflatoxine mit dem Zahlenindex 1 weisen eine Doppelbindung am terminalen Furan-Ring des Bifuran-Ringsystems auf, die hingegen bei den Derivaten mit Zahlenindex 2 fehlt. Die als typische Abbauprodukte in Eukaryonten zu findenden M-Aflatoxine verfügen über eine zusätzliche Hydroxygruppe an der Bifuraneinheit (Dutton, 1988). Aflatoxicol, als weiteres Abbauprodukt weist hingegen im Vergleich zu AFB₁ zusätzlich eine Hydroxygruppe am Pentanon-Ring auf.

Chemisch gesehen gehört die umfangreiche Gruppe der Trichothecene zu den tetracyklischen Sesquiterpenoiden. Natürlich vorkommende Vertreter weisen eine Doppelbindung zwischen dem Kohlenstoffatom (C)-9 und C-10 auf, sowie einen Epoxyring an C-12 und C-13 und werden daher als 12,13-Epoxytrichothecene bezeichnet. Aufgrund der unterschiedlichen Substituenten am Grundgerüst können Trichothecene in 4 Gruppen (A-D) unterteilt werden. T-2 und HT-2 gehören zur Gruppe A (Abbildung 2) und besitzen im Gegensatz zu den sehr häufig in Lebensmitteln zu findenden Typ-B-Trichothecen, keine Carbonyl-Gruppe an Position C-8 (Ueno, 1977, Creppy, 2002, Yazar and Omurtag, 2008, Adhikari et al., 2017).

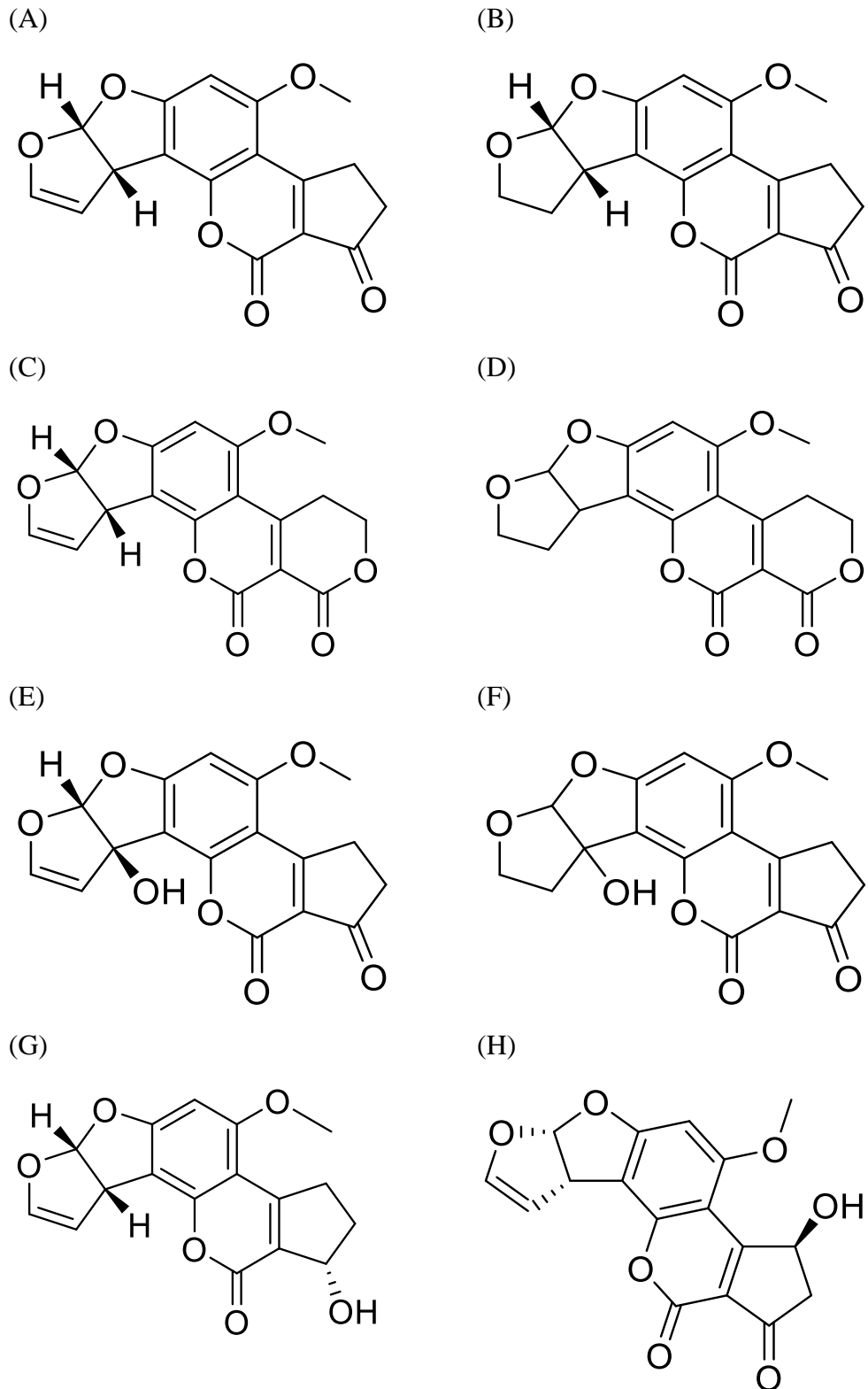


Abbildung 1: Strukturformeln einiger wichtiger Aflatoxine: (A) AFB₁, (B) AFB₂, (C) AFG₁, (D) AFG₂, (E) AFM₁, (F) AFM₂, (G) Aflatoxicol und (H) AFQ₁ (gezeichnet mit ChemDraw Professional).

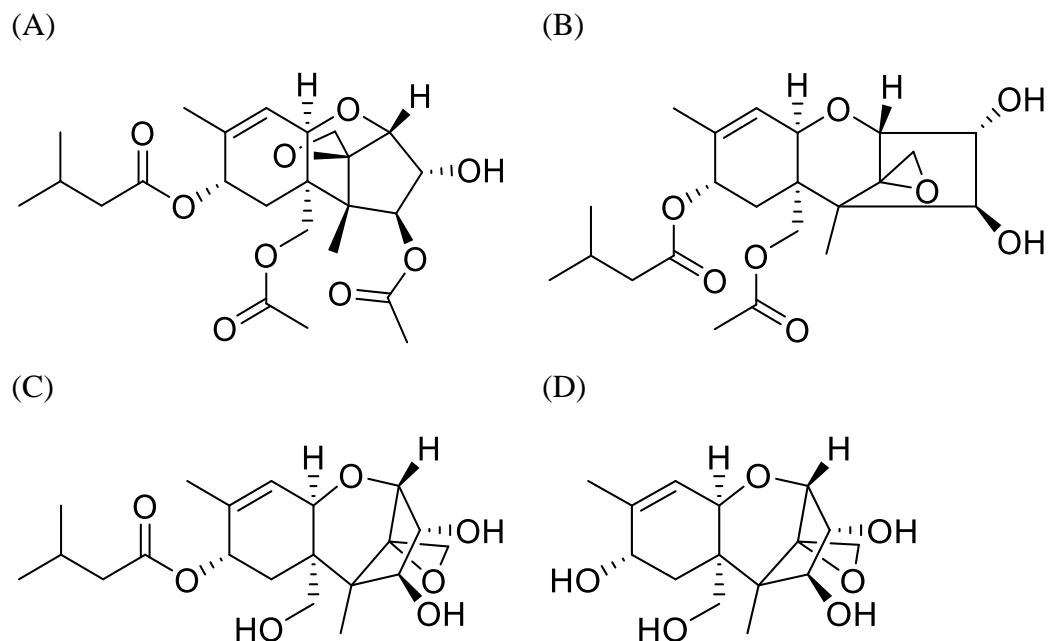


Abbildung 2: Strukturformeln einiger Typ-A-Trichothecene: (A) T-2 Toxin, (B) HT-2 Toxin, (C) T-2-Triol und (D) T-2-Tetraol (gezeichnet mit ChemDraw Professional).

3. Toxikologische Eigenschaften

Die Internationale Agentur für Krebsforschung (International Agency for Research on Cancer, IARC) ordnet natürlich vorkommende Aflatoxine in die Gruppe 1 der Kanzerogene, AFB₁ hingegen in die Gruppe 2B ein. In Gruppe 1 gelistete Substanzen gelten als für den Menschen krebserregend, in Gruppe 2B als möglicherweise kanzerogen (IARC, 1993).

Toxikologische Studien zeigten, dass das originäre AFB₁ nicht per se kanzerogen ist, es wird erst im Körper durch mikrosomale Monooxygenasen zum reaktiven AFB₁-8,9-Epoxid metabolisiert (McLean and Dutton, 1995). Dieses bindet an die N₇-Position der Nukleinbase Guanin und bildet so ein AFB₁-N₇-Guanin Addukt bzw. kann nach Hydrolyse Addukte mit Proteinen bilden. Die entstehenden AFB₁-Lysin-Verbindungen sind im Serum exponierter Personen nachweisbar. Hinsichtlich des Metabolismus von Aflatoxinen gibt es große Unterschiede zwischen den einzelnen Tierarten und zum Teil sogar zwischen einzelnen Individuen (Hussein and Brasel, 2001). Für die Empfindlichkeit verschiedener Spezies gegenüber Aflatoxinen spielt außerdem die Effektivität verschiedener zellulärer Detoxifikations-Mechanismen eine entscheidende Rolle. Ein gängiger Mechanismus ist die Detoxifikation mittels Konjugation an Gluthation, wobei das

im Zytosol und den Mikrosomen lokalisierte Glutathion-S-Transferase-System die Konjugation von aktiviertem Aflatoxin mit reduziertem Glutathion katalysiert (Bennett and Klich, 2003). Daneben gibt es noch die Möglichkeit der Entgiftung über die UDP-Glucuronyl-Transferase, die Sulphotransferase und über das Epoxidhydrolase-System (McLean and Dutton, 1995).

Toxikologisch wird zwischen akuten und chronischen Aflatoxikosen unterschieden. Akute Vergiftungen treten bei der Aufnahme von hohen Aflatoxin-Gehalten auf und führen zu direkten Leberschäden mit Hämorrhagie und Nekrose der Leber, außerdem zu Ödemen, Lethargie und in besonders schweren Fällen zum Tod (Williams et al., 2004). Am häufigsten ist jedoch die chronische Aflatoxikose, die durch die Aufnahme relativ geringer Mengen der Toxine über einen längeren Zeitraum ausgelöst wird. Typisch hierbei ist die Entstehung von hepatozellulären Karzinomen, aber auch von pulmonären, interstitiellen Fibrosen (Marin et al., 2013). Schätzungen zufolge sterben mehr als 600.000 Personen jährlich an den Folgen eines hepatozellulären Karzinoms (Wild and Gong, 2010). Mittlerweile gilt als gesichert, dass eine Aflatoxin-Exposition und Hepatitis B Infektion synergistisch bei der Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms zusammenwirken (Kew, 2003, Yu et al., 1997).

Im Gegensatz zu den Aflatoxinen besitzen die Typ-A-Trichothecene keine kanzerogenen Eigenschaften. T-2 hemmt aber in eukaryotischen Zellen die Proteinbiosynthese, indem es an die Peptidyltransferase der 60S-Ribosomen-Untereinheit bindet und so die Initiation der Polypeptidkettenbildung verhindert (Li et al., 2011, Cundliffe et al., 1974). T-2 hemmt zusätzlich die DNA- und RNA-Synthese, beeinflusst die Permeabilität von Zellmembranen, erhöht die Anzahl der Leberperoxide, verursacht Nekrose und ist hämato- und myelotoxisch (Scientific Committee on Food (SCF), 2001, EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), 2011, EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), 2017).

Nach der Aufnahme von T-2 Toxin - beispielsweise über kontaminierte Lebensmittel oder Futtermittel - findet die Verstoffwechselung vor allem in der Leber und im Gastrointestinal-Trakt statt, wobei es zu einer Hydrolyse, Hydroxylierung, De-Epoxidierung bzw. Konjugation der Ausgangssubstanz kommt. Abbauprodukte, wie beispielsweise HT-2, werden hauptsächlich mit Glucuronsäure konjugiert und ausgeschieden. Obwohl keine in vivo Studien beim Menschen vorhanden sind, weisen in vitro Studien darauf hin, dass dieselben vier,

oben aufgeführten, in Versuchstier-Studien nachgewiesenen Abbau-Wege auch für den Menschen zutreffen (Dohnal et al., 2008, EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), 2017, Wu et al. 2014). Grundsätzlich wurde in allen bisherigen Zellkulturstudien, bei denen T-2 mit diversen humanen und tierischen Zellarten inkubiert wurde, HT-2 als Hauptmetabolit von T-2 nachgewiesen (Ellison and Kotsonis, 1974, Ohta et al., 1977). Des Weiteren wurden in anderen Studien noch geringe Mengen an T-2-Triol und T-2-Tetraol als T-2 Metaboliten identifiziert (Trusal, 1986). Johnsen et al. (1988) postulierten außerdem die Möglichkeit der Transformation von T-2 zu Neosolaniol in humanen Blutzellen und Ratten-Erythrozyten mit Hilfe von Carboxylesterasen. Da HT-2 als Hauptstoffwechselprodukt von T-2 auch eine Rolle als Ausscheidungsprodukt im Urin spielt (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), 2011, EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), 2017), wird in Biomonitoring-Studien in der Regel neben T-2 gleichzeitig auch auf HT-2 gescreent (Rodriguez-Carrasco et al., 2014, Huybrechts et al., 2015).

Aufgrund des genannten Wirkmechanismen auf zellulärer Ebene führen Vergiftungen mit Trichothecenen prinzipiell zu Symptomen wie Kopfschmerzen, abdominalen Schmerzen, Schüttelfrost, Schwindel, Krämpfe, Erbrechen, Übelkeit, Anorexie, Leukopenie, Hämorrhagie, Diarrhoe, Hautnekrosen sowie Hautentzündungen und Stomatitis (Ueno, 1977, Creppy, 2002). Es bestehen allerdings Unterschiede hinsichtlich der Toxizität zwischen den einzelnen Typ A Trichothecenen. Die European Food Safety Authority (EFSA) hat verschiedene in vivo und in vitro Studien zur Toxizität von T-2, HT-2 und ihren Metaboliten miteinander verglichen und kam zu dem Schluss, dass sowohl in vivo als auch in vitro die toxische Aktivität von T-2 am höchsten war. HT-2 zeigte eine annähernd gleich hohe Aktivität, T-2-Triol und Neosolaniol waren weniger toxisch und T-2-Tetraol wies die geringste Toxizität auf (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), 2017).

4. Aflatoxin- und T-2 Toxin-Metaboliten im Urin

Die Bestätigung einer Exposition des Menschen gegenüber Aflatoxinen zum Beispiel durch Verzehr kontaminierter Lebensmittel kann durch den Nachweis verschiedener Stoffwechsel-Metabolite erfolgen. Zu den relevantesten und bereits

seit Jahren etablierten Aflatoxin-Biomarkern zählen der Nachweis von AFM₁ bzw. AFB₁-N₇-Guanin-Addukten im Urin bzw. das Auftreten von AFB₁-Albumin-Addukten im Serum (Turner et al., 2012). Aufgrund der längeren Halbwertszeit von Albumin im Vergleich zu den Urin-Metaboliten bzw. – Addukten, werden für die Beurteilung einer chronischen Aflatoxin-Exposition vor allem AFB₁-Albumin- bzw. AFB₁-Lysin-Addukte herangezogen. Die Urin-Biomarker sind hingegen insbesondere zum Nachweis einer akuten Aflatoxin-Exposition geeignet (Groopman et al., 1994, Leong et al., 2012).

Bereits Zhu et al. (1987) zeigten, dass zwischen der AFM₁-Konzentration in Urin und der geschätzten täglichen AFB₁-Aufnahme eine hohe Korrelation besteht, wobei etwa 1,2 - 2,2 % des aufgenommenen AFB₁ als AFM₁ im Urin ausgeschieden wird. Auch wenn in späteren Untersuchungen postuliert wurde, dass ein anderer AFB₁-Metabolit, nämlich AFQ₁, in deutlich höheren Konzentrationen als AFM₁ in menschlichem Urin gefunden werden kann (z.B. AFQ₁ 10,4 ng/ml vs. AFM₁ 0,04 ng/ml) (Mykkänen et al., 2005), wird in aktuellen Monitoring-Studien nach wie vor AFM₁ als Biomarker für eine Aflatoxin-Exposition herangezogen (Wallin et al., 2015, Sarkanj et al., 2018). Einige aktuelle Biomonitoring-Studien zur Häufigkeit des AFM₁-Nachweis in Urin sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Als Analyseverfahren wurden in diesen aktuellen Studien fast ausnahmslos LC-MS/MS (Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie) basierte Multi-Analyt-Nachweise eingesetzt, die Nachweisgrenzen lagen je nach eingesetzter Probenaufarbeitung bei bis zu 1 pg/ml. Für die Probenaufbereitung wurden die Proben in der Regel mit β -Glucuronidase vorbehandelt, ein Clean-up erfolgte über Festphasen-Kartuschen, v.a. Oasis HLB, bzw. Immunoaffinitätssäulen.

Der T-2 bzw. HT-2 Nachweis in Urin ist häufig auch Bestandteil dieser Multi-Mykotoxin-Biomarker-Studien, die erreichten Nachweisgrenzen liegen aber oft deutlich höher als die für die Aflatoxine angegebenen Werte. Mit Ausnahme von Gerding et al. (2014), die in einer von 101 untersuchten Urinproben Spuren von T-2 nachweisen konnten, wurden in allen anderen in Tabelle 2 aufgeführten Studien negative Ergebnisse erhalten.

Tabelle 1: Ausgewählte Biomonitoring-Studien zum Nachweis von AFM₁ in Urin.

Land der Studie	Probenaufbereitung	Probenanzahl (n)	% positive Proben	AFM ₁ Gehalt Proben(ng/ml)	Nachweisgrenze AFM ₁ (ng/ml)	Referenz
Korea	IAC	12	8,3	0,009	0,003	(Ahn et al., 2010)
Italien	IAC und SPE (Oasis HLB)	10	0	/	0,06	(Solfrizzo et al., 2011)
Ägypten	IAC	93	47,3	0,004 - 0,41 ³	0,04	(Piekkola et al., 2012)
Kamerun	dilute and shoot ¹	175	9	0,05 - 1,38	0,05	(Abia et al., 2013)
Nigeria	dilute and shoot	120	14,2	0,08 – 1,54	0,05	(Ezekiel et al., 2014)
Deutschland	dilute and shoot	101	0	/	0,025	(Gerding et al., 2014)
Deutschland	dilute and shoot	50	0	/	0,025	(Gerding et al., 2015)
Haiti		142	8	0,06 ⁴		
Bangladesch		95	8	0,06 ⁴		
Belgien	IAC	29	k.A.	Spuren (LOD-LOQ)	0,002	(Huybrechts et al., 2015)
Nigeria	SPE (Oasis HLB Prime)	120 ²	72,5	0,001-0,62	0,0003	(Sarkanj et al., 2018)

¹ Proben wurden 1:10 verdünnt und direkt analysiert² Analyse derselben Proben wie in der Studie von Ezekiel et al. (2014)³ Angabe in ng/mg Creatinin⁴ Mittelwert

Tabelle 2: Ausgewählte Biomonitoring-Studien zum Nachweis von T-2 und HT-2 in Urin.

Land der Studie	Proben- aufbereitung	Probenanzahl (n)	% positive Proben	Analyseverfahren	Nachweisgrenze (ng/ml)		Referenz
					T-2	HT-2	
Belgien	LLE und SPE (Oasis HLB)	40	0	LC-MS/MS	0,05	0,42	(Ediage et al., 2012)
Kamerun	dilute and shoot ¹	175	0	LC-MS/MS	2	20	(Warth et al., 2012)
Deutschland	dilute and shoot	101	1	LC-MS/MS	0,25	2	(Gerding et al., 2014) ²
Spanien	dispersive SPE	10	0	GC-MS/MS	0,5	1	(Rodriguez-Carrasco et al., 2014)
Deutschland	dilute and shoot	50	0	LC-MS/MS	0,1	4,5	(Gerding et al., 2015)
Haiti		142	0				
Bangladesch		95	0				
Belgien	direct shoot ³	32	k.A.	LC-MS/MS	0,01	0,2	(Huybrechts et al., 2015)

¹: Proben wurden 1:10 verdünnt und direkt analysiert

²: neben T-2 und HT-2 wurde auch der Metabolit HT-2 Toxin-4-O-Glucuronid erfasst (Nachweisgrenze 0,25 ng/ml)

³: Proben wurden nach Filtration direkt analysiert

5. Rechtliche Bestimmungen

Aufgrund der Kanzerogenität der Aflatoxine wurden von der Europäischen Gemeinschaft besonders niedrige Grenzwerte für diese Mykotoxine festgelegt. Die wesentlichen Bestimmungen finden sich in der am 19. Dezember 2006 von der Kommission erlassenen Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 zur Festsetzung von Höchstgehalten bestimmter Kontaminanten in Lebensmitteln, Änderungen der entsprechenden Bestimmungen erfolgten durch die Verordnung (EU) 165/2010. Die derzeit gültigen Grenzwerte liegen bei Erzeugnissen, die zum unmittelbaren Verzehr oder zur Verwendung als Lebensmittelzutat bestimmt sind, zwischen 2,0 - 8,0 µg/kg für AFB₁ und 4,0 - 10,0 µg/kg für die Summe aus AFB₁, AFB₂, AFG₁ und AFG₂. Für AFM₁ liegt der Wert bei 0,050 µg/kg Rohmilch, wärmebehandelte Milch und Werkmilch. Die Höchstgehalte für Erzeugnisse für Kleinkinder und Säuglinge liegen deutlich niedriger, nämlich bei 0,10 µg/kg für AFB₁ bzw. bei 0,025 µg/kg für AFM₁. Mit der Verordnung (EU) Nr. 1058/2012 der Kommission wurde außerdem noch ein separater Höchstgehalt für getrocknete Feigen von 6,0 µg/kg AFB₁ bzw. 10,0 µg/kg für die Summe aus AFB₁, AFB₂, AFG₁ und AFG₂ eingeführt.

Um die genaue Bestimmung des Aflatoxin-Gehaltes trotz der heterogenen Verteilung des Mykotoxins in einer Lebensmittel-Partie zu gewährleisten, und um sicherzustellen, dass EU-weit Analysemethoden mit komparablem Leistungsniveau angewendet werden, wurden von der Kommission in Anhang I der Verordnung (EG) Nr. 401/2006 vom 23. Februar 2006 verschiedene Probenahmeverfahren und unter Anhang II Kriterien zur Probenaufbereitung sowie für Analysemethoden zur amtlichen Kontrolle des Mykotoxin-Gehaltes in Lebensmitteln definiert. Durch die Verordnung (EG) Nr. 178/2010 der Kommission wurden allerdings einige Änderungen in Bezug auf Verordnung (EG) Nr. 401/2006 vorgenommen. Anstelle eines gemeinsamen Probenahmeverfahrens gilt nun ein neues Probenahmeverfahren für Erdnüsse, sonstige Ölsaaten, Aprikosenkerne und Nüsse sowie ein separates Probenahmeverfahren für getrocknete Feigen. Das Probenahmeverfahren für Gewürze zur Bestimmung der Höchstgehalte von Aflatoxinen ist nun zusätzlich zur Kontrolle der Höchstgehalte von Ochratoxin, ebenfalls ein Mykotoxin, in Gewürzen anzuwenden. Außerdem wurde das Probenahmeverfahren für Kaffee und Kaffeeerzeugnisse durch Süssholzwurzel und Süssholzauszug ergänzt und ein

zusätzliches Probenahmeverfahren für pflanzliche Öle definiert.

Die Leistungskriterien der Verordnung (EG) 401/2006 zur Bestimmung der Aflatoxine umfassen unter anderem die Wiederfindungsraten von Analysemethoden für bestimmte Konzentrationsbereiche von Aflatoxinen. Beispielsweise sollte bei einer Proben-Konzentration von 0,01 - 0,05 µg/kg AFM₁ die Wiederfindungsrate des eingesetzten Analyseverfahrens bei 60 % - 120 % liegen. Für die Summe von AFB₁, AFB₂, AFG₁ und AFG₂ werden bei Konzentrationen von ≥ 10 µg/kg Wiederfindungsraten von 80 % - 110 % gefordert.

Im Gegensatz zu den etablierten Grenzwerten für den Gehalt von Aflatoxinen in Lebensmitteln wurde von der Europäischen Kommission bisher keine genaue Höchstmengenregelung für T-2 und HT-2 erlassen. Eine von der EFSA durchgeführte Studie zur toxikologischen Bewertung von T-2 bzw. HT-2 Toxin resultierte in einer tolerierbaren täglichen Aufnahme (tolerable daily intake = TDI) von 0,10 µg Toxin per kg Körpergewicht (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), 2011). Aufgrund einer neuen Studie zur subchronischen Toxizität der Toxine in Ratten wurde der TDI im Jahr 2017 auf 0,02 µg/kg reduziert (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), 2017). Diese toxikologische Bewertung führte allerdings nicht zur Verabschiedung von rechtlich verbindlichen Grenzwerten, bislang gibt es lediglich Richtwerte für den Summenwert von T-2 und HT-2. Diese liegen bei unmittelbar für den Verzehr durch Menschen vorgesehenen Getreidekörnern bei 50 – 200 µg/kg, bei Getreideerzeugnissen zwischen 25 und 200 µg/kg und bei Getreidebeikost für Kleinkinder und Säuglinge bei 15 µg/kg (Empfehlung der Kommission 2013/165/EU).

Wie auch für die Aflatoxine wurden in der Verordnung (EG) Nr. 401/2006 verschiedene Leistungskriterien für Analysemethoden von T-2 und HT-2 definiert und mittlerweile durch die Verordnung (EU) Nr. 519/2014 der Kommission aktualisiert. Die Wiederfindungsraten müssen beispielsweise bei einer Proben-Konzentration von 15 - 250 µg/kg T-2 bzw. HT-2 (getrennt) zwischen 60 % - 130 % liegen.

6. Enzymimmuntests (EIAs)

6.1. Allgemein

Ein wichtiges und seit langem auch in der Lebensmittelanalytik etabliertes Verfahren ist der Nachweis von Toxinen, Kontaminanten bzw. Mikroorganismen mittels Enzymimmuntests (EIAs), ein Verfahren, das Anfang der 70er Jahre fast zeitgleich von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen entwickelt wurde. Van Weemen und Schuurs (1971) entwickelten ein als enzyme-immunoassay (EIA) bezeichnetes Verfahren, bei dem anstatt des zuvor im Radioimmunoassay üblichen Markierungsverfahren mit radioaktiven Isotopen, ein mit Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) markiertes Antigen eingesetzt wurde, um Antikörper-Antigen-Reaktionen sichtbar zu machen (Van Weemen and Schuurs, 1971). Parallel dazu wurde von Engvall und Perlmann (1971) ein auf einem Alkalische-Phosphatase-Konjugat basierender „enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA) entwickelt.

Unter Verwendung dieses grundlegenden Nachweisprinzips wurde in den nächsten Jahrzehnten eine breite Palette an verschiedenen EIA-Verfahren entwickelt. Grundsätzlich wird hierbei zwischen homogenen und heterogenen Assays unterschieden. Bei homogenen Systemen werden keine Trenn- oder Waschschrte benötigt, hier wird die Aktivität eines Enzymkonjugates durch die Antigen-Antikörper-Reaktion bestimmt. Bei heterogenen Methoden werden hingegen Trennschrte benötigt, die Enzymaktivität eines Enzymkonjugates wird bei diesen Systemen nicht durch die Antigen-Antikörper-Reaktion beeinflusst (Grol and Schulze, 1990).

Des Weiteren wird zwischen direkten und indirekten Methoden unterschieden. Bei der direkten Variante werden Mikrotiterplatten direkt mit Antikörpern beschichtet und ein enzymmarkiertes Antigen dient zum Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktion. Beim indirekten Enzymimmuntest werden hingegen die Platten mit dem Antigen beschichtet, entstehende Antikörper-Antigen-Komplexe werden mithilfe eines enzymmarkierten Sekundärantikörpers der beispielsweise gegen murine Immunglobuline gerichtet ist, indirekt nachgewiesen (Sheng et al., 2006, Gan and Patel, 2013, Liu et al., 2014, Aydin, 2015).

Außerdem wird noch zwischen kompetitiven und nicht kompetitiven EIAs differenziert. Nicht kompetitive bzw. Sandwich-Systeme werden bei hochmolekularen Analyten mit mehr als einem Epitop verwendet. Hier werden

zwei Antikörper eingesetzt, um den Analyten zu binden. Dabei ist ein Antikörper festphasengebunden (Fangantikörper), zur Detektion des gebundenen Antigens werden enzymmarkierte Antikörper eingesetzt (Darwish, 2006). Um niedermolekulare Substanzen wie in der vorliegenden Arbeit nachweisen zu können, werden hingegen kompetitive Systeme benötigt. Niedermolekulare Substanzen weisen lediglich ein Epitop auf, weshalb die Anwendung von Sandwich-basierten EIA-Systemen nicht möglich ist. Kompetitive EIAs basieren auf der Konkurrenz der Bindung eines markierten Analyten und des freien Analyten in einer Probe um die Antikörper-Bindungsstellen. Das Extinktionssignal ist hierbei indirekt proportional zur Antigen-Konzentration in der Probe, d.h. je mehr freier Analyt in der Probe umso geringer das Messsignal im EIA (Nagata et al., 1995, Zeck et al., 2001, Aydin, 2015).

6.2. Mykotoxin-spezifische EIAs

Im Bereich der Mykotoxin-Analytik wurden bereits relativ kurz nach der Erstbeschreibung des enzymimmunologischen Nachweisprinzips die ersten entsprechenden Nachweisverfahren für Aflatoxine beschrieben. Das von Lawellin et al. (1977) publizierte direkte, kompetitive EIA-System basierte auf Polystyrol-Röhrchen anstelle von Mikrotiterplatten. Unter Verwendung eines AFB_{2a}-BSA-Konjugates als Immunogen konnte ein polyklonales Kaninchen-Antiserum generiert werden, mit dem sich AFB₁ in einem Konzentrationsbereich von 1 - 100 pg/ml nachweisen ließ. Analog dazu entwickelte die Arbeitsgruppe um F.S. Chu ein Antikörper-basiertes System zum Nachweis des T-2 Toxins (Chu et al., 1979), das als modifiziertes ELISA-Verfahren erfolgreich zur Analyse des Toxins in künstlich kontaminierten Weizenmehl und Maismehl eingesetzt werden konnte (Pestka et al., 1981).

Inzwischen gibt es zahlreiche weitere Arbeiten zum immunchemischen Nachweis von Aflatoxinen bzw. T-2 Toxin, wobei unterschiedlichste Immunisierungsmodelle und Assay-Formate eingesetzt wurden. Da Mykotoxine als niedermolekulare Substanzen per se nicht antigen wirken, müssen sie zu Immunisierungszwecken an Proteine oder Polypeptide kovalent gebunden werden (Erlanger, 1980). Zu den sehr häufig verwendeten Proteinträgern zählen hierbei bovines Serumalbumin sowie das Hämocyanin der Schlüsselloch-Schnecke (keyhole limpet hemocyanin, KLH).

Um Aflatoxin spezifische Antikörper zu generieren, wurden sehr häufig AFB₁-Konjugate (Devi et al., 1999, Li et al., 2009b) eingesetzt, daneben gibt es aber auch Immunisierungsmodelle, bei denen AFM₁ oder AFB₂ zum Einsatz kamen (Dietrich et al., 1995, Cervino et al., 2008). Zur Konjugation der Aflatoxine an Proteinträger wurden fast ausnahmslos die Toxine an der Carbonylgruppe (C-1-Position) mit Carboxymethyloxim derivatisiert und anschließend über die eingefügte Carboxylgruppe mittels Carbodiimid-Methode bzw. aktivem Ester an freie Aminogruppen des Proteins gekoppelt. Entsprechend hergestellte AFB₁-bzw. AFM₁-Konjugate sind auch kommerziell erhältlich (Cervino et al., 2007, Li et al., 2009a). Da sich die Aflatoxine der Präfixgruppe 1 und 2 an der 8,9-Position unterscheiden, zeigen die resultierenden Antikörper in der Regel folgendes Reaktionsmuster: AFB₁ > AFG₁ > AFB₂ > AFG₂ (Cervino et al., 2007).

Als alternativer Ansatz zur Immunogensynthese wurde daher verschiedentlich AFB_{2a}, die Hemiacetal-Form von AFB₁, zur Generierung von Immunogenen verwendet. Die resultierenden Antikörper zeigten aber eine ausgeprägte Spezifität für die jeweiligen Pentanon-Aflatoxine, während die Lakton-Strukturanaloga (G-Aflatoxine) nur sehr schlecht erkannt werden (Lawellin et al., 1977, Kononenko et al., 2002). Eine ausführliche Darstellung der bislang publizierten Arbeiten zu diesem Thema würde den Rahmen der vorliegenden Arbeit bei Weitem sprengen, einige ausgewählte, typische Ansätze sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Wie die Aflatoxine muss auch T-2 Toxin zur Generierung spezifischer Antikörper zunächst an einen Proteinträger gekoppelt werden. Insbesondere die Hydroxylgruppe an Position C-3 eignet sich zum Einfügen reaktiver Gruppen durch Reaktion mit Säureanhydriden (Peng et al., 2016). In der Regel werden T-2-Hemisuccinat- (Chu et al., 1979, Wang et al., 2010) oder alternativ T-2-Hemiglutarat-Derivate (Ohtani et al., 1988, Peng et al., 2016) mit Hilfe von Bersteinsäureanhydrid bzw. Glutarsäureanhydrid hergestellt und anschließend ebenfalls mittels aktiver Ester-Methode (N-Hydroxysuccimid) bzw. Carbodiimid-Methode (Yoshizawa et al., 2004, Wang et al., 2010) an Proteinträger gekoppelt. Neben den T-2-Derivaten wurden auch analog hergestellte HT-2-Proteinkonjugate als Immunogen verwendet. Bei der Immunisierung mit HT-2-Derivaten können aufgrund der chemischen Ähnlichkeit zu T-2 und Acetyl-T-2 Antikörper generiert werden, die sowohl eine hohe relative Kreuzreaktivität für T-2 als auch HT-2 aufweisen (Hack et al., 1989). Nach Immunisierung mit T-2-Derivaten entstehen

hingegen typischerweise T-2 spezifische Antikörper mit einer sehr geringen relativen Kreuzreaktion zu HT-2 (Li et al., 2014, Wang et al., 2010). Allerdings ist es Yoshizawa et al. (2004) mit einem T-2-Hemisuccinat-KLH Konjugat gelungen, Antikörper mit einer 100 % relativen Kreuzreaktion zu HT-2 zu generieren. Maragos et al. (2013) verwendeten anstelle des T-2 bzw. HT-2 Toxin ein T-2-3-O-Glukosid als Immunogen, um glykosilierte Formen von T-2, die auch in Getreide vorkommen, aber mit den meisten Analysemethoden nicht nachgewiesen werden können, spezifisch zu detektieren. Der T-2-Glukosid spezifische Antikörper (mAk 2-13), zeigte aber eine hohe Kreuzreaktion mit T-2 (> 90 %). Einige ausgewählte publizierte Arbeiten zur Generierung T-2 bzw. HT-2 spezifischer Antikörper sind Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 3: Ausgewählte Publikationen zur Generierung von Antikörpern gegen Aflatoxine.

Immunogen	Ab-Typ	IC₅₀-Dosis (ng/ml)	Nachweisgrenze/- vermögen (ng/ml)	relative Kreuzreaktivität (%) [AFB₁/B₂/G₁/G₂/M₁]	Referenz
direkte kompetitive EIAs					
AFM ₁ -HSA	mAk	0,23	0,05	97,5/18/62/9,8/100	(Dietrich et al., 1995)
AFB ₁ -BSA	mAk	0,045	0,005	100/78/1,8/2,2/k.A.	(Liu et al., 2016)
indirekte kompetitive EIAs					
AFB ₂ -EDA-BSA	mAk	50	1	19/100/<1/<1/<1	(Hastings et al., 1988)
AFB ₁ -BSA	mAk	0,06	0,01	100/2/12/<1/k.A.	(Devi et al., 1999)
AFB ₁ -BSA	mAk	4,36	k. A.	100/61/66/15/k.A.	(Kim et al., 2011)
AFB _{2a} -BSA	pAk	20,6	k. A.	100/100/0,4/0,4/21	(Kononenko et al., 2002)
AFB ₂ -BSA	mAk	2,7	k. A.	100/98/72/30/k.A.	(Cervino et al., 2008)
AFB ₁ -BSA	mAk	2,1	0,06-0,09	100/94/95/65/71	(Li et al., 2009b)
AFB ₁ -BSA	mAk	0,0012	k. A.	100/92/55/7/9	(Zhang et al., 2009)

Legende im Anschluss an Tabelle 4

Tabelle 4: Ausgewählte Publikationen zur Generierung von Antikörpern gegen T-2 Toxin.

Immunogen	Ab-Typ	IC₅₀-Dosis (ng/ml)	Nachweisgrenze (ng/ml)	relative Kreuzreaktivität (%) [T-2/HT-2]	Referenz
direkte kompetitive EIAs					
T-2-HS-BSA	pAk	n.a.	0,1	k.A.	(Pestka et al., 1981)
HT-2-HS-HSA	mAk	0,02	0,005	100/7	(Hack et al., 1989)
k.A.	mAk	2,3	0,43	k.A.	(Barna-Vetro et al., 1994)
T-2-HS-KLH	pAk	0,12	0,01	100/7	(Wang et al., 2010)
T-2-BSA	mAk	0,28	0,09	100/125	(Oplatowska-Stachowiak et al., 2017)
indirekte kompetitive EIAs					
T-2-Poly-L-Lysin	mAk	> 6	k.A.	k.A.	(Chanh et al., 1989)
T-2-HS-KLH	mAk	0,16	k.A.	100/100	(Yoshizawa et al., 2004)
T2-Glc-KLH	mAk	3,5	k.A.	91,6/1,3/100 ¹	(Maragos et al., 2013)
T-2-HS-BSA	mAk	22,1	k.A.	100/3	(Li et al., 2014)
T-2-HG-BSA	mAk	1,46	k.A.	100/1	(Peng et al., 2016)

¹: IC₅₀ bzw. relative Kreuzreaktivität (%) T-2-Glukosid

Legende siehe nächste Seite

Legende zu Tabelle 3 und 4:

BSA	Bovines Serumalbumin
EDA	Ethylendiamin
Glc	Glukosid
HSA	Humanes Serumalbumin
HG	Hemiglutarat
HS	Hemisuccinat
k.A.	Keine Angabe
KLH	Keyhole limpet hemocyanin (Hämocyanin der Schlüsselloch-Schnecke)
mAk	Monoklonaler Antikörper
n.a.	nicht angegeben
OVA	Ovalbumin
pAk	Polyklonaler Antikörper

7. Antidiotypische Antikörper (Ab2)

Nach der 1974 von Jerne postulierten Netzwerktheorie entstehen im Laufe einer Immunisierung neben antigenspezifischen Antikörpern (primäre Antikörper = Ab1) auch sogenannte antidiotypische Antikörper (= Ab2), die gegen verschiedene idiotypische Determinanten in der variablen Region des Ab1 gerichtet sind (Jerne, 1974). Dabei kann zwischen verschiedenen antidiotypischen Subtypen unterschieden werden, je nachdem welche Idiotope erkannt werden. Sogenannte Ab2 α binden an idiotypische Determinanten, die mit dem Gerüst des primären Antikörpers assoziiert sind, Ab2 γ hingegen an Idiotope, die nahe am Paratop des Ab1 liegen. Ab2 β binden im Paratop des Ab1 und spiegeln somit dessen inneres Abbild wider (Pan et al., 1995, Uner and Gavalchin, 2006). Somit sind Ab2 vom β -Typ in der Lage, anstelle des Antigens mit dem Ab1 zu reagieren und um die Bindungsstelle am Ab1 zu konkurrieren. Die Epitopreaktivität der verschiedenen Ab2 Subtypen ist in Abbildung 3 graphisch dargestellt. Neben den Ab2 wurden noch sogenannte Epibodies beschrieben, die in der Lage sind, gleichzeitig an ein Antigen und das Idiotope des dazugehörigen antigenspezifischen Antikörpers zu binden (Bona et al., 1982, Bona and Moran, 1985, Uner and Gavalchin, 2006).

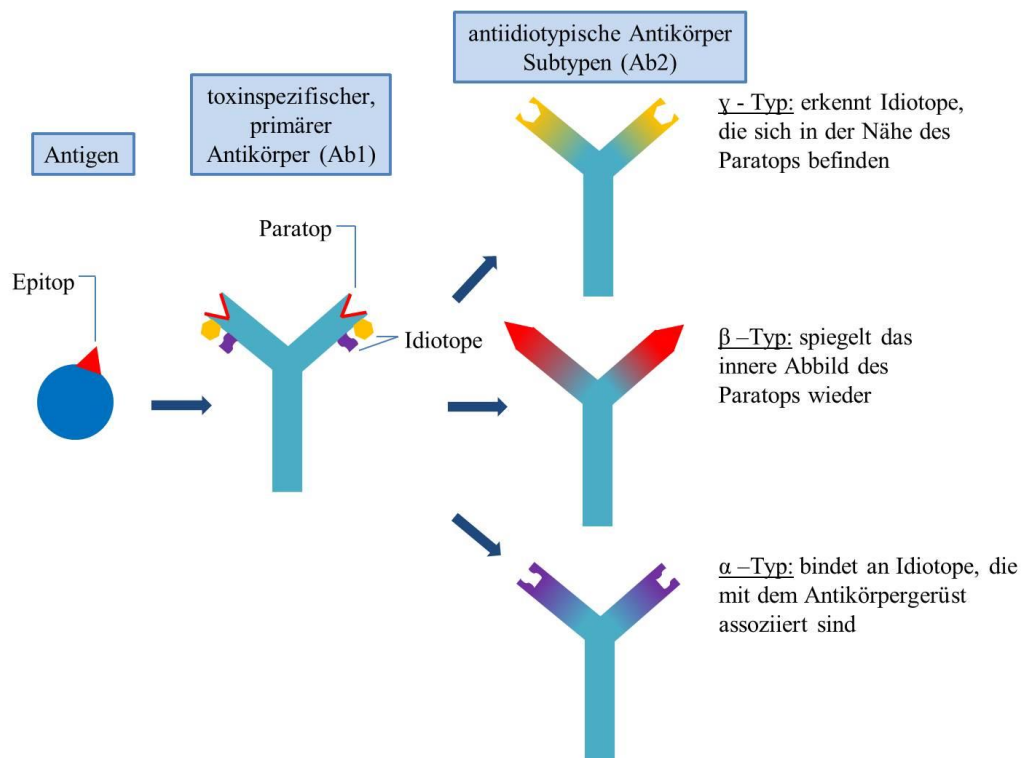


Abbildung 3: Epitopreaktivität verschiedener Ab2 Subtypen [in Anlehnung an Uner and Gavalchin (2006)].

In den 80´er und 90´er Jahren wurden antiidiotypische Antikörper in erster Linie im Hinblick auf immunologische Fragestellungen entwickelt, beispielsweise um Ab2 als alternative Vakzine gegen virale, bakterielle oder parasitäre Infektionserreger einzusetzen. Auch im Bereich der Mykotoxin-Forschung wurde der Einsatz von Ab2 als alternative Vakzinen zur Induzierung protektiver Antikörper gegen diese hochtoxischen Verbindungen propagiert, da sich eine konventionelle Vakzinierung mit Toxin-Proteinkonjugaten aufgrund der möglichen Freisetzung des Toxins verbot (Pan et al., 1995). Dagegen wurde das Potential von antiidiotypischen Antikörpern für analytische Fragestellungen jahrelang als relativ gering angesehen. Die ersten Ansätze für die Mykotoxin-Analytik wurde in den frühen 90´er Jahren beschrieben, wobei einerseits versucht wurde, durch die Immunisierung von Tieren mit Ab2 analytisch einsetzbare anti-antiidiotypische Antikörper (Ab3) mit verbesserten Eigenschaften im Vergleich zu den ursprünglichen Ab1 zu gewinnen und andererseits die Hoffnung bestand, dass durch die induzierten Ab3 eine Resistenz der Tiere gegen Mykotoxin-Rückstände im Futter hervorgerufen wird (Hsu and Chu, 1994, Chu et al., 1995).

Um Ab2 zu generieren, gibt es grundsätzlich zwei verschiedene Immunisierungsansätze, wobei zwischen xenogenen und syngen Modellen unterschieden wird. Bei xenogenen Immunisierungsmodellen werden Tiere einer Spezies (z.B. Mäuse) mit von einer fremden Art produzierten Antikörpern (z.B. Kaninchen) immunisiert (Colja Venturini et al., 2009, Hu et al., 2017), bei syngen Modellen erfolgt hingegen die Immunisierung zwischen Tieren derselben Art und desselben Inzuchtstammes (z.B. BALB/c Mäuse) (Tsutsumi et al., 1998, Chanh et al., 1990). Hierbei ist im syngen Ansatz allerdings zu beachten, dass Antikörper per se eine niedrige Immunogenität aufweisen, daher ist die Kopplung an Proteinträger wie KLH oder BSA sinnvoll (Eger et al., 2016).

Bereits 1989 wurden in einem xenogenen Ansatz erste antiidiotypische Kaninchen-Antiseren gegen einen T-2 spezifischen, murinen, monoklonalen Primärantikörper generiert (Chanh et al., 1989), wobei die Immunantwort allerdings von Kaninchen-anti-Maus-Antikörpern geprägt war. Daraufhin wurde 1990 mittels syngem Ansatz ein muriner monoklonaler Ab2 entwickelt (Chanh et al., 1990) und dessen Eignung als Vakzine zur Induktion einer T-2 Toxin protektiven Immunantwort in Mäusen überprüft. Die protektiven Eigenschaften der durch die Ab2-Immunisierung induzierten Ab3 konnte in vitro mittels Zytotoxizitätstests bewiesen werden, Ab3-haltige Mäuseseren verhinderten die

durch T-2 Toxin hervorgerufene Hemmung der Proteinbiosynthese. Dieser protektive Effekt konnte auch in in vivo Versuchen bestätigt werden (Chanh et al., 1991). Hierbei erhielten Mäuse nach vorheriger Immunisierung mit dem zuvor generierten Ab2-KLH Konjugat intradermal unterschiedliche T-2 Toxin Dosen. Bei den mit dem Ab2-Konjugat immunisierten Versuchsmäusen lag die Letalität bei 5,3 %, bei den nicht immunisierten Mäusen hingegen bei 85 %.

Auch bei Aflatoxinen wurden polyklonale Ab2 entwickelt. Nach Immunisierung von Kaninchen mit einem monoklonalen Aflatoxin-spezifischen Ab1 (Hsu and Chu, 1994) und Aufreinigung der Ab2-haltigen Seren konnten verschiedene Immunoassays zum Nachweis der Aflatoxine etabliert werden. Aufgrund mangelnder Testsensitivität wurde das analytische Potential von Ab2-basierten Verfahren von den Autoren allerdings als gering eingeschätzt.

Im Gegensatz zu diesen und anderen früheren Arbeiten, bei denen meist der potentielle Einsatz von Ab2 als Vakzine (Nisonoff and Lamoyi, 1981, Sacks et al., 1982, Stein and Soderstrom, 1984, Chanh et al., 1992) im Vordergrund stand, wurde in neueren Arbeiten der Einsatz von Ab2 als sogenannte Surrogate (Guan et al., 2011, Hu et al., 2017) anstelle von Toxin Standards in EIA postuliert. Um die Menge an Toxin in einer toxinhaltigen Probe im EIA quantitativ bestimmen zu können, werden üblicherweise Toxin-Standardkurven erstellt. Mithilfe dieser Standardkurven lässt sich dann der genaue Toxin-Gehalt einer Probe berechnen. Um allerdings das Risiko für den Anwender zu reduzieren, können alternativ zu Toxinen, nicht toxische Ab2-Verdünnungsreihen (Kalibrierkurven) erstellt werden und über diese der Toxin-Gehalt von Proben berechnet werden. Guan et al. (2011) entwickelten polyklonale Ab2, die anstelle von AFM₁ in einem indirekten kompetitiven EIA-Format eingesetzt wurden. Es wurden AFM₁-Standardkurven sowie Ab2-Kalibrierkurven erstellt und die Korrelation der beiden Kurven mittels linearer Regressions-Analyse berechnet. Ein Nachteil des Einsatzes von Ab2 anstelle von Toxin-Standardkurven ist der hohe Gehalt an Ab2, der benötigt wird, um eine mit der von Toxin-Standards hervorgerufenen, vergleichbare 50 % Hemmung zu erhalten. Die entsprechenden Werte lagen beispielsweise bei Guan et al. (2011) bei 2,4 µg Ab2/ml bzw. 70 pg AFM₁/ml.

Neben den typischen aus leichten und schweren Ketten bestehenden Antikörpern produzieren manche Tierarten wie beispielsweise Haie und Kameliden einzelkettige Antikörper. Die variable Domäne dieser einzelkettigen Antikörper wird als V_{HH}-Proteindomäne bezeichnet und kann rekombinant hergestellt

werden. Nach Immunisierung eines Versuchstieres (z.B. Alpaka) werden rekombinante V_{HH}-Genbibliotheken generiert, die dann mittels Phagen-Display spezifisch auf Antikörper mit den gewünschten Eigenschaften gescreent werden können (Peltomaa et al., 2018). Diese auch als Nanobodies bekannten Proteine weisen nur mehr ein Molekulargewicht von ca. 17 kDa auf und zeichnen sich durch eine hohe Stabilität aus (Wang et al., 2013). Verschiedene Arbeitsgruppen nutzten diese Technologie, um im Bereich der Mykotoxin-Analytik verschiedene Ab2-Nanobodies herzustellen und darauf basierende Nachweisverfahren zu entwickeln. Wang et al. (2013) generierten antiidiotypische heavy chain Antikörper aus einem Alpaka, das zuvor mit einem gegen Aflatoxin gerichteten murinen mAk immunisiert worden war. Beim letztlich etablierten Testsystem wurden Mikrotiterplatten anstelle eines Toxin-Proteinkonjugates mit einem der hergestellten antiidiotypischen V_{HH}-Antikörper direkt beschichtet und anschließend unter kompetitiven Bedingungen der monoklonale murine Ab1 und freies AFB₁ hinzugegeben. Die Detektion der an die Ab2 gebundenen Ab1 erfolgte anschließend durch Zugabe eines peroxidasemarkierten Sekundärantikörpers (Ziege-anti-Maus). Der IC₅₀-Wert für AFB₁ lag bei 160 pg/ml, die höchste relative Kreuzreaktion bestand zu AFG₁ (90,4 %) und AFB₂ (50,4 %). Damit konnten Wang et al. zeigen, dass auch antiidiotypische heavy chain Antikörper für die Erstellung von Toxinnachweisen einsetzbar sind, auch wenn die erreichte Testsensitivität deutlich unter der für den klassischen EIA-Ansatz propagierten Nachweisgrenze des Ab1 von < 1,2 pg/ml lag (Zhang et al., 2009). In einer späteren Arbeit dieser Arbeitsgruppe wurde dieser EIA-Ansatz nicht weiter verfolgt, der V_{HH}-Antikörper wurde nur mehr als Surrogat anstelle von AFB₁ verwendet (Wang et al., 2016b).

Als weitere Einsatzgebiete für die von Wang et al. (2013) etablierten heavy chain Antikörper wurden ein zeitaufgelöster Fluoreszenz-basierter Lateral-Flow-Test (Tang et al., 2017), sowie eine RT-Immuno-PCR (Lei et al., 2014) beschrieben. Im Lateral-Flow-Test wurden verschiedene EIA-Systeme verglichen, die auf einer antiidiotypischen V_{HH}-Antikörper-Beschichtung basierende Variante stellte sich als die deutlich sensitivere dar, der IC₅₀-Wert für AFB₁ lag bei 0,46 ng/ml. Lei et al. (2014) generierten M13K07 Phagen, die die von Wang et al. (2013) entwickelten V_{HH}-Antikörper exprimierten, die etablierte Immuno-PCR war in der Lage, 0,02 ng/ml AFB₁ nachzuweisen.

Während beim Nachweis von T-2 Toxin, abgesehen von früheren Arbeiten von

Chanh et al. (1989, 1990), Ab2 bislang keine Rolle spielen, wurden im Laufe der letzten Jahre eine breite Palette an antiidiotypischen Antikörpern für andere Mykotoxine wie z.B. Deoxynivalenol, Zearalenon, Fumonisin und Ochratoxin A beschrieben, wobei fast ausnahmslos Nanobodies für die Etablierung entsprechender Nachweissysteme eingesetzt wurden. Eine Übersicht hierzu gibt (Peltomaa et al., 2018).

Die Ergebnisse einiger ausgewählter Arbeiten zu Ab2-basierten Testsystemen zum Nachweis von Aflatoxinen und T-2 sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Auf Ab2 basierende Testsysteme zum Nachweis von Aflatoxin bzw. T-2 Toxin.

Zieltoxin	Immunogen	Ab2-Typ	Einsatzbereich	IC₅₀-Dosis Toxin (Nachweisgrenze)	Referenz
T-2	mAk	pAk (Kaninchen)	indirekter EIA	>200 µg/ml	(Chanh et al., 1989)
T-2	mAk-KLH	mAk (Maus)	Toxin-Neutralisation bzw. Einsatz als Vakkzine	/	(Chanh et al., 1990)
AFB ₁	mAk bzw. mAk-KLH	pAk (Maus)	direkter kompetitiver EIA	1,16 µg/ml	(Hsu and Chu, 1994)
AFM ₁	F(ab') ₂ -Fragmente	pAk (Kaninchen)	Surrogat	/	(Guan et al., 2011)
AFB ₁	mAk	Nanobody (Alpaka)	Nanobody-basierter, indirekter EIA	0,16 ng/ml	(Wang et al., 2013)
AFB ₁	mAk	Nanobody ¹ (Alpaka)	Surrogat	/	(Wang et al., 2016b)
AFB ₁	Fab-Fragmente (Kaninchen)	mAk (Mäuse)	Surrogat	/	(Hu et al., 2017)
AFB ₁	mAk	Nanobody ¹ (Alpaka)	Fluoreszenz-basierter Lateral-Flow-Test	0,46 ng/ml	(Tang et al., 2017)

¹: rekombinante Nanobodies generiert von Wang et al. (2013)

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Material und Geräte

1.1. Chemikalien und Biochemika

Bindungspuffer (Bio-Rad Laboratories GmbH, 153-6151)

Bovines Serumalbumin (Sigma-Aldrich, A7030-100G)

Dulbecco`s MEM (Biochrom GmbH, F 0435)

Fetales Kälberserum (Sigma-Aldrich, F7524)

Freundsches Adjuvans, inkomplett (Sigma-Aldrich, F5506)

Glutaraldehyd-Lösung (Sigma-Aldrich, G5882)

Inject mcKLH (Thermo Fisher scientific, Pierce, 77600)

L-Glutamin (200 mM) (Biochrom GmbH, K 0282)

Papain (Sigma-Aldrich, P4762)

Papain, immobilisiert (Agarose Resin) (Thermo Fisher Scientific, 20341)

PBS Dulbecco (Biochrom GmbH, L 1825)

Peroxidase, (POD), activated, Roche (Sigma-Aldrich, 11428861001)

Ready-to-use ELISA diluent (Mabtech, 3652-D2)

Roti[®]-Immunoblock, 10x Konzentrat (Carl Roth, T144.1)

Sigma Adjuvant System[®] (Sigma-Aldrich, S6322)

Natriumpyruvat (Biochrom GmbH, L0473)

StabilZyme[®] HRP Conjugate Stabilizer (Sigma-Aldrich, S1075)

Synthetisches Human-Urin-Imitat (SYNTHETIC URINE e.K., 1005-D)

Urease, *Canavalia ensiformis* (Sigma-Aldrich, U1500)

Alle weiteren, nicht speziell aufgeführten Chemikalien wurden in pro analysi-Qualität von den Firmen Sigma-Aldrich bzw. Merck KGaA erworben.

1.2. Immunreagenzien

Aus früheren Versuchen am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch standen zum Nachweis der Aflatoxine der mAk 2D1 (Isotyp IgG₁; Dietrich et al., 1995) sowie zum Nachweis von T-2/HT-2-Toxin der mAk 2A12 (Isotyp IgG_{2a}; unveröffentlichte Ergebnisse) zur Verfügung. Daneben wurden im Laufe der Arbeit noch folgende kommerziell erhältliche Immunreagenzien eingesetzt:

Ziege-anti-Maus IgG (Fc spezifisch) (Sigma-Aldrich, M4280)

Ziege-anti-Maus IgG_{FCγ}, Subklasse 1 spezifisch (Jackson Immuno Research Laboratories, INC, 115-005-205)

Ziege-anti-Maus IgG_{FCγ}, Subklasse 2a spezifisch (Jackson Immuno Research Laboratories, INC, 115-005-206)

Ziege-anti-Maus IgG_{FCγ}, Subklasse 2b spezifisch (Jackson Immuno Research Laboratories, INC, 115-005-207)

Ziege-anti-Maus IgG_{FCγ}, Subklasse 2c spezifisch (Jackson Immuno Research Laboratories, INC, 115-005-208)

Ziege-anti-Maus IgG_{FCγ}, Subklasse 3 spezifisch (Jackson Immuno Research Laboratories, INC, 115-005-209)

Ziege-anti-Maus IgM (Jackson Immuno Research, 115-005-075)

Kaninchen-anti-Maus Immunoglobulin/HRP (Dako Cytomation, P0161)

Ratte-anti-Maus IgG₁ (BD Pharmingen™, 553445)

Ratte-anti-Maus IgG_{2a} (BD Pharmingen™, 553387)

Kaninchen-anti-Maus IgG (Dako, Z0259)

1.3. Toxin-Standards

Aflatoxin B₁ [3 µg/ml Benzol:Acetonitril (98:2)] (SUPELCO, CRM46323)

Aflatoxin B₂ [3 µg/ml Benzol:Acetonitril (98:2)] (SUPELCO, CRM46324)

Aflatoxin G₁ [3 µg/ml Benzol:Acetonitril (98:2)] (SUPELCO, CRM46325)

Aflatoxin G₂ [3 µg/ml Benzol:Acetonitril (98:2)] (SUPELCO, CRM46326)

Aflatoxin M₁ 10 µg/ml Acetonitril (SUPELCO, CRM46319)

Aflatoxin M₂ (Enzo Life Sciences, ALX-630-114-MC01)

Aflatoxicol (Enzo Life Sciences, ENZ-CHM104-0001)

HT-2 Toxin (100,4 µg/ml Acetonitril; biopure, Romer Labs Diagnostic GmbH, S02036)

T-2 Toxin (100,4 µg/ml Acetonitril; biopure, Romer Labs Diagnostic GmbH, S02035)

T-2-Tetraol (50,8 µg/ml Acetonitril; biopure, Romer Labs Diagnostic GmbH, S02048)

T-2-Triol (50,1 µg/ml Acetonitril; biopure, Romer Labs Diagnostic GmbH, S02047)

1.4. Lösungen und Puffer

Enzymimmuntest (enzyme immunoassay, EIA):

- Absättigungspuffer: PBS mit Zusatz von 3 % (w/v) Casein
- Antikörperversdünnungspuffer: PBS mit Zusatz von BSA (3 µg/ml)
- Bicarbonatpuffer (pH 9,6): 1,59 g Na₂CO₃, 2,93 g NaHCO₃ ad 1 l A. dest.
- Enzymkonjugatversdünnungspuffer: PBS mit Zusatz von 1 % (w/v) Casein
- Substrat-Puffer (pH 3,95): 44,13 g Citronensäure-Monohydrat, 200 ml 1M KOH, 800 ml A. dest., Zugabe weiterer KOH bis pH 3,95 sowie 336 µl H₂O₂
- Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, PBS, pH 7,3): 6,79 g NaCl, 1,47 g Na₂HPO₄, 0,43 g KH₂PO₄ ad 1 l A. dest.
- Schwefelsäure (1 mol/l)
- Substrat/Chromogen-Lösung: 20 Teile Substrat-Puffer, 1 Teil Tetramethylbenzidin-Lösung
- Tetramethylbenzidin-Lösung: 252 mg 3,3',5,5',-Tetramethylbenzidin, 5 ml Aceton, 45 ml Methanol
- Toxinversdünnungspuffer: PBS mit Zusatz von 10 % (v/v) Methanol (MeOH)
- Waschlösung: 8,55 g NaCl, 0,25 ml Tween-20, 1 l A. dest.

Herstellung der Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) Konjugate:

- Kopplungspuffer (10 mM, pH 8,0): 8,71 g K₂HPO₄ auf 5 l A. dest. (Teil A), 1,36 g KH₂PO₄ auf 1 l A. dest. (Teil B), Teil B zu Teil A bis zum pH 8,0 geben, Volumen des Puffers bestimmen, 50 mM NaCl zugeben
- Natriumcarbonatpuffer (0,5 M, pH 9,5): 2,10 g NaHCO₃ auf 50 ml A. dest. (Teil A), 2,65 g Na₂CO₃ auf 50 ml A. dest., Teil A zu Teil B bis zum pH 9,5 geben
- Triethanolamin-Lösung: 2,66 ml Triethanolamin zu 3 ml A. dest. geben, mit HCl (5 mmol/l) auf pH 8 einstellen, auf 10 ml mit A. dest. auffüllen
- Natriumborhydridlösung: 8 mg NaBH₄ auf 1 ml A. dest., frisch herstellen, auf Eis lagern
- Glycin-Lösung (1M): 0,75 g Glycin auf 6 ml A. dest., mit NaOH (0,1 mol/l) auf pH 7 einstellen, mit A. dest. auf 10 ml auffüllen
- PBS/Glycin: PBS mit Zusatz von 10 mmol/l Glycin

Herstellung der Keyhole limpet hemocyanin (KLH) Konjugate:

- Ethanolaminlösung: 620 µl Ethanolamin auf 10 ml Natriumphosphatpuffer
- Glutaraldehydlösung (1 %) in Natriumphosphatpuffer
- Natriumphosphatpuffer (0,1 mol/l, pH 6,8)
- Physiologische Kochsalzlösung (0,9 %)

Herstellung Antikörper-Fab-Fragmente:Variante A:

- Probenpuffer (pH 7,0): 2,85 g Na_2HPO_4 (20 mM), 3,7 g EDTA (10 mM) ad 1 l A.dest.
- Verdauopuffer (pH 7): 20 mmol/l Cystein/HCl in Probenpuffer
- Tris/HCl (10 mmol/l, pH 7,5)

Variante B:

- Tris/HCl (0,1 mol/l, pH 8)
- EDTA/Dithiothreitol (20 mM/10 mM), Jodacetamid-Lösung (1mol/l) in Tris/HCl (0,1 mol/l)
- Papain-Lösung: 1 mg/ml in 0,1 M Tris/HCl mit Zusatz von EDTA/Dithiothreitol (2 mM/1 mM)

Präparation Urinproben:

- Sørensen-Puffer (1 mol/l, pH 7,0): 13,6 g KH_2PO_4 auf 100 ml A. dest. (Teil A), 14,2 g Na_2HPO_4 auf 100 ml A. dest. (Teil B), Teil A zu Teil B bis zum pH 7,0 geben
- Verdünnungspuffer: PBS mit Zusatz von 1 % (w/v) BSA
- Urease-Lösung: 1 mg Urease, 0,2 ml Sørensen-Puffer, 0,8 ml A.dest.

1.5. Geräte

Mikrotiterplattenlesegerät Infinite F50 (Tecan)

Photometer Specord 200 Plus (Analytik Jena)

Intelli-Mixer RM-2M (neoLab Migge)

Labor-pH Meter inoLab pH/Cond 720 (WTW)

1.6. Software

Magellan for F50 (Tecan)

1.7. Weitere Materialien

Amicon® Ultra-15 Filtrationseinheiten (Merck Millipore, UFC903024)

Mikrotiterplatten: F96 Nunc Immunoplate (Thermo SCIENTIFIC, 439454)

Polystyrol Röhrchen (Greiner Bio-One, 160101)

Safe lock Tubes 1,5 ml (Eppendorf AG, 0030120.086)

Safe lock Tubes 2 ml (Eppendorf AG, 0030120.094)

Urinanalysestreifen Combur 10 Test (Roche cobas, 04510062171)

Urinbecher 120 ml, mit Schraubdeckel (Preismed Medizin Discount GmbH, 101453)

2. Methodik

2.1. Generierung und Nachweis von antiidiotypischen Antikörpern

2.1.1. Herstellung der Immunogene

Zur Steigerung der Immunogenität wurden die bereits zuvor am Lehrstuhl hergestellten monoklonalen, primären Antikörper (Ab1) zum Nachweis von Aflatoxinen, mAk 2D1, bzw. T-2 Toxin, mAk 2A12 an das deutlich größere Trägermolekül Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) mittels Glutaraldehyd gekoppelt. Dazu wurden die über Protein A gereinigten Antikörper mit Hilfe von Ultrafiltrationseinheiten auf eine Konzentration von 2 mg in 0,8 ml PBS eingestellt und danach mit 1,34 mg KLH vermischt. Anschließend wurde der Ansatz über Nacht gegen Natriumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,8, 5 l) bei 4°C dialysiert. Zur Kopplung wurde der Ansatz auf 1 ml eingestellt, dann mit 63 µl Glutaraldehydlösung (1 %) versetzt und für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 63 µl Ethanolaminlösung (1 mol/l) zugegeben und der Ansatz für weitere 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Schluss wurden die Konjugate gegen 3 x 5 l physiologische Kochsalzlösung (0,9 %) bei 4°C dialysiert. Zum Entfernen von größeren Proteinaggregaten wurden die Ansätze abschließend für 5 min zentrifugiert (1000 x g) und die Konzentration am Photometer anhand der Absorption bei 280 nm bestimmt.

2.1.2. Immunisierung

Insgesamt fünf Mäuse aus der eigenen Nachzucht des Lehrstuhls (BALB/c Stamm

bzw. Hybrid Stamm aus BALB/c x (NZW x NZB) wurden mit einer Mischung aus den in 2.1.1 beschriebenen Ab1-KLH-Konjugaten (jeweils 20 µg/Tier) immunisiert. Details zur Immunisierung sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Den für Zellfusion ausgewählten Mäusen wurde 3 Tage vor der geplanten Fusion nochmals Ab1-KLH (2 x 30µg; gelöst in PBS) sowohl subkutan als auch intraperitoneal appliziert. Dies erfolgte für Maus III in Woche 8, für Maus V in Woche 24 und für Maus II in Woche 35.

Tabelle 6: Immunisierung von Mäusen mit Ab1-KLH-Konjugaten.

Woche	Maßnahme	Adjuvans	Applikation
0	Grundimmunisierung	Sigma	i. p.
3	1. Restimulierung	Sigma	i. p.
7	1. Blutentnahme		
8	1. Fusion (Maus III)		
18	2. Restimulierung	inkomplettes Freundsches	i. p.
23	2. Blutentnahme		
24	2. Fusion (Maus V)		
28	3. Restimulierung	inkomplettes Freundsches	s. c.
34	3. Blutentnahme		
35	3. Fusion (Maus II)		

2.1.3. Herstellung Antigen-bindender Fragmente (Fab-Fragmente)

Protokoll A: Verwendung von immobilisierten Papain

Der mittels Ultrafiltrationseinheiten aufkonzentrierte und gegen Probenpuffer dialysierte mAk 2A12 (7,1 mg in 1,1 ml) wurde im Verhältnis 1+1 mit Verdauopuffer verdünnt, auf 37°C vorgewärmt und anschließend mit 0,55 ml Gelsuspension (entspricht 275 µl Papain-Gel) in Verdauopuffer versetzt. Der Ansatz wurde dann im end-over-end Mixer für 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 2,75 ml Tris/HCl-Puffer wurde das Gel abzentrifugiert (1500 xg, 2 min) und der Fab/Fc-haltige Überstand abgenommen. Anschließend wurden sofort die Fab-Fragmente von den Fc-Fragmenten (Fragment crystallisable) mittels Protein A-Agarose abgetrennt. Protein A-Agarose bindet spezifisch an die Fc-Fragmente von IgG Antikörpern, d.h. die durch die Papain-Behandlung entstandenen Fab-Fragmente finden sich im Säulendurchlauf. Die

2A12-Fab-Fragmente wurden danach unter Verwendung von Ultrafiltrationseinheiten (MWCO 30 kDa) konzentriert. Die Reinheit der Fab-Fragmente wurden anschließend mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) überprüft.

Protokoll B: Verwendung von gelöstem Papain

Das für den mAk 2A12 eingesetzte Verfahren ist für Antikörper des IgG₂-Subtyps optimiert und funktioniert bei anderen Isotypen insbesondere bei IgG₁ nur bedingt. Dies war auch beim mAk 2D1 der Fall, so dass zur Spaltung dieses Antikörpers ein alternatives Verfahren eingesetzt werden musste. mAk 2D1 (12,1 mg) wurde dazu über Nacht gegen Tris/HCl (0,1 M; pH 8,0) dialysiert und nach Einstellen der Konzentration auf 5 mg/ml mit einer EDTA/Dithiothreitol-Lösung (20 mM/10 mM) im Verhältnis von 1:10 (v/v) versetzt. Danach wurde der Ansatz für 10 Minuten im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und mit vorgewärmter Papain-Lösung vermischt, wobei ein Mengenverhältnis von mAk zu Papain von 100:1 eingehalten wurde. Nach Inkubation für eine Stunde bei 37 °C wurde Jodacetamid-Lösung (1 M) im Volumen-Verhältnis von 1:50 zum Ansatz gegeben und anschließend sofort die Fab-Fragmente von den Fc-Fragmenten mittels Protein A-Agarose abgetrennt. Nach Überprüfung der vollständigen Spaltung der mAks mittels EIA, erfolgte die Reindarstellung der Fab-Fragmente wie bei Variante A beschrieben.

2.1.4. Herstellung von Antikörper-HRP Konjugaten

In einem typischen Ansatz wurde 1,6 mg aktivierte Peroxidase gelöst in 0,1 ml A. dest. zu 1,2 mg der jeweiligen Ab1-Fab-Fragmente bzw. full-length Ab1-Antikörper in 0,3 ml Kopplungspuffer gegeben. Danach erfolgte sofort das Einstellen des pH-Wertes mit Hilfe von Natriumcarbonatpuffer auf einen pH-Wert von 8,5. Nach zweistündiger Inkubation (lichtgeschützt, bei Raumtemperatur unter leichtem Rühren) wurde Triethanolamin-Lösung im Volumen-Verhältnis von 1:10, sowie Natriumborhydridlösung (1/8 des Kopplungsvolumens) zugegeben und der Ansatz für 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde erneut Triethanolamin-Lösung im Verhältnis von 1:16 (v/v) zugegeben und nach weiteren zwei Stunden Inkubation, erfolgte die Zugabe einer 1 M Glycin-Lösung (1/40 des Kopplungsvolumens). Nach Dialyse gegen 3 x 5 l PBS/Glycin wurden

die Antikörper-Konjugate mit BSA (1 %) und StabilZyme (1:2; v/v) stabilisiert sowie mit Thimerosal (0,01 %) konserviert. Die Konjugate wurden portioniert und Aliquote bei -80 °C eingefroren bzw. bei 4 °C aufbewahrt.

2.1.5. Charakterisierung polyklonaler Antiseren

Zum Nachweis der antiidiotypischen Antikörper in den Seren der immunisierten Mäuse wurden drei verschiedene Enzymimmuntest-Varianten verwendet:

Variante 1: Konkurrenz zwischen Toxin-Enzymkonjugat und Ab2 um Bindungsstellen des Ab1

Dafür wurden Mikrotiterplatten direkt mit Ab1 (600 ng/ml 2D1 bzw. 400 ng/ml 2A12) in PBS über Nacht in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Platten mit 3 % Casein/PBS Lösung (150 µl/Kavität) für 30 min bei Raumtemperatur abgesättigt. Die Platten wurden dann dreimal mit Waschlösung gespült und durch Ausschlagen auf Zellstoffstapel getrocknet (Waschschritt). Im anschließenden Konkurrenzschritt wurden die gewonnenen Maus-Antiseren bzw. ein Präimmunserum als serielle Verdünnungsreihe (Ausgangsverdünnung 1:100 in 1:2 Schritten, 50 µl/Kavität) zusammen mit 50 µl AFB₁-Oxim-HRP (Verdünnung 1:80.000) bzw. 50 µl T-2-HS-HRP (Verdünnung 1:30.000) in 1 % Casein/PBS Lösung (v/v) aufgetragen. Nach einer Stunde Inkubation wurden die Platten fünfmal mit Waschlösung gewaschen, getrocknet und die Enzymsubstrat/Chromogen-Lösung (100 µl/Kavität) zugegeben. Die Platten wurden für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann die Farbreaktion durch Zugabe von Schwefelsäure (1 M, 100 µl/Kavität) gestoppt. Die Auswertung erfolgte durch Messen der Absorption bei 450 nm im Mikrotiterplattenlesegerät.

Variante 2: Bindung von Ab2 an peroxidasemarkierte Ab1-Fab-Fragmente

Hierbei wurden Mikrotiterplatten zunächst mit Fc-spezifischen Ziege-anti-Maus IgG Antikörpern in einer Konzentration von 3 µg/ml in Bicarbonatpuffer über Nacht beschichtet. Nach Absättigung und einem Waschschritt wurden serielle Verdünnungsreihen der Maus-Antiseren (100 µl/Kavität) aufgetragen (Ausgangsverdünnung 1:500) und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten Waschschritt wurden peroxidasemarkierte Ab1-Fab-Fragmente

(50 µl 2D1-Fab-HRP in einer Verdünnung von 1:2.500 bzw. 2A12-Fab-HRP in einer Verdünnung von 1:8.000) zugegeben. Als Verdünnungspuffer wurde PBS mit Zusatz von 1 % (w/v) Casein verwendet, zur Reduktion unerwünschter Bindung der HRP-Konjugate an die Fc-spezifischen Coating-Antikörper wurden zusätzlich Isotyp-analoge, irrelevante mAk in einer Konzentration von 1 µg/ml (2D1-Assay) bzw. 2 µg/ml (2A12-Assay) zugegeben. In der Regel erfolgte die Titerbestimmung parallel auch unter kompetitiven Bedingungen bei denen Mykotoxin (Aflatoxin B₁ beim 2D1-Assay bzw. T-2 Toxin beim 2A12-Assay) und Ab2 um die Bindungsstelle der jeweiligen Ab1-Fab-HRPs konkurrierten. Das weitere Vorgehen erfolgte dann wie in Variante 1 beschrieben.

Variante 3 : Einsatz von Isotypspezifischen Sekundärantikörpern als Coating

Beim Nachweis der 2A12-spezifischen Ab2 wurden neben der bereits beschriebenen IgG_{Fc}-Beschichtung noch andere IgG-Isotyp spezifische Beschichtungen ausgetestet. Dafür wurden Mikrotiterplatten mit Ziege-anti-Maus IgG₁ bzw. -IgG_{2b} spezifischen Sekundärantikörpern (3 µg/ml Bicarbonatpuffer, 100 µl/Kavität) beschichtet. Der weitere Ablauf erfolgte wie bei Variante 2 beschrieben, wobei das 2A12-Fab-HRP in einer Verdünnung von 1:3.000 in 1 % Casein/PBS Lösung eingesetzt wurde.

2.1.6. Hybridom-Zelllinien

Um monoklonale Antikörper gegen die Ab1 2D1 und 2A12 zu generieren, wurden B-Lymphozyten von Mäusen, die beim Screening besonders hohe Titer gezeigt hatten, mit Maus-Myelomzellen der Linie X63-Ag8.653 unter Verwendung von Polyethylenglycol 1500 fusioniert. Hierzu wurden Einzelzellsuspensionen der axillären Lymphknoten sowie der Milz verwendet. Die Hybridome wurden in Zellkulturmedium auf bereits mit Maus-Peritonealmakrophagen beschichteten Mikrotiterplatten ausgesät und anschließend für 10 Tage in einem CO₂-Brutschrank (7 % CO₂) bei 37 °C inkubiert und vermehrt. Ein Teil des Fusionsmaterials wurde bei -80 °C kryokonserviert. Nach 10 Tagen wurden die Zellkulturüberstände auf die Produktion von 2D1- bzw. 2A12-spezifischen Antikörpern mit Hilfe der unter 2.1.5. beschriebenen Varianten gescreent. Die im Screening positiv-reagierenden Zelllinien wurden mittels limiting dilution (= Endpunktverdünnung) mindestens dreimal kloniert und vermehrt.

2.2. Etablierung Ab2-basierter EIAs

Das Prinzip direkter, kompetitiver, antiidiotypischer EIAs beruht auf der Konkurrenz von freiem Toxin und einem an HRP-gekoppelten Antikörper um die Bindung an einen festphasengebundenen Antikörper. Nach dem Entfernen nicht gebundenen Toxins bzw. HRP-markierten Antikörpers durch Waschschriffe, wird die Antigen-Antikörper- bzw. Antikörper-Antikörper-Reaktion durch Zugabe der Enzymsubstrat/Chromogen-Lösung sichtbar gemacht. Das Extinktionssignal beim kompetitiven EIA ist indirekt proportional zur Antigen-/Toxinkonzentration, d.h. je mehr Toxin am festphasengebundenen Antikörper gebunden hat, umso niedriger ist die Extinktion bzw. Absorption. Zur Etablierung entsprechender Nachweisverfahren wurden in den jeweiligen EIA-Systemen die optimalen Immunreagenz-Konzentrationen durch Schachbretttitrationen ermittelt und nachfolgend die Sensitivität der Testverfahren durch die Erstellung von Standardkurven bestimmt.

Im Laufe der Arbeit wurden zur Charakterisierung der generierten antiidiotypischen Antikörper zunächst auf den Screening-Varianten 2 (Nachweis Aflatoxine) bzw. 3 (Nachweis Typ-A-Trichothecene) basierende Nachweisverfahren eingesetzt. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit Ziege-anti-Maus IgG_{Fc} bzw. IgG₁ (3 µg/ml in Bicarbonatpuffer) beschichtet und abgesättigt. Danach erfolgte die Zugabe von Ab2-haltigen Zellkulturüberständen (mAk 1G10 1:320 bzw. mAk 1D6 1:80 in PBS). Nach 1 h Inkubation wurde freies Mykotoxin (verdünnt in PBS mit Zusatz von 10 % MeOH) zusammen mit peroxidasemarkierten Ab1-Fab-Konjugaten (2D1-Fab-HRP 1:4.000 mit Zusatz von 1 µg/ml Isotyp-analogen, irrelevanten mAk bzw. 2A12-Fab-HRP 1:16.000) zugegeben. Nach einer weiteren Stunde Inkubation wurde wie oben beschrieben Enzymsubstrat/Chromogen-Lösung zugegeben und abschließend die Absorption bei 450 nm gemessen.

Sobald gereinigte Ab2-Präparationen zur Verfügung standen, wurden im Hinblick auf die aufwändige Herstellung der peroxidasemarkierten Ab1-Fab-Fragmente bzw. dem Kostenaufwand für das Coating mit Sekundärantikörpern für die weitere Charakterisierung der Antikörper bzw. in den Anwendungsstudien direkt beschichtete EIA-Systeme eingesetzt. Dafür wurden Mikrotiterplatten zunächst direkt mit Ab1 oder Ab2 beschichtet und abgesättigt. Anschließend erfolgte die parallele Zugabe von freiem Mykotoxin (verdünnt in PBS mit Zusatz von 10 %

Methanol) und Ab2-HRP- bzw. Ab1-HRP-Konjugaten verdünnt in 1 % Casein/PBS Lösung. Nach 1 h Inkubation wurde wie in den zuvor beschriebenen Sekundärantikörper-basierten EIA-Varianten fortgefahren.

2.2.1. Ermittlung der Sensitivität und Spezifität

Zur Erstellung von Standardkurven für Aflatoxine bzw. T-2/HT-2 Toxin wurden die mittels Schachbrett titration ermittelten optimalen Immunreagenzien-Konzentrationen eingesetzt. Die Standardkonzentrationen wurden jeweils als Doppelansätze, Dreifachansätze oder Vierfachansätze in einer Verdünnungsreihe 1:3 bzw. 1:2 in 10 % Methanol/PBS pipettiert. Standardkurven für AFM₁ umfassten den Konzentrationsbereich von 5 ng/ml bis 0,25 pg/ml, für T-2 Toxin lagen die Werte bei 20 ng/ml bis 39,1 pg/ml. Um die Interassay-Variationskoeffizienten zu ermitteln, wurden ≥ 8 an verschiedenen Tagen erstellte Standardkurven ausgewertet.

Um die Spezifität der optimierten Testsysteme zu bestimmen, wurden mit den vorhandenen Aflatoxinstandards (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁, AFM₂ und Aflatoxicol) und Trichothecen-Typ-A-Standards (T-2 Toxin, HT-2 Toxin, T-2-Triol Toxin und T-2-Tetraol Toxin) Kompetitionsversuche durchgeführt. Die Toxine wurden dazu in Konzentrationen von 5 ng/ml bis 100 ng/ml (Aflatoxine) bzw. 20 ng/ml bis 1 µg/ml (Typ-A-Trichothecene) eingesetzt und der jeweilige IC₅₀-Wert ermittelt. Die relative Kreuzreaktion der Toxine wurde nach folgender Formel berechnet:

$$[50 \text{ \%-Wert (AFM1 bzw. T2)} \div 50 \text{ \%-Wert (jeweiliges getestetes Toxin)}] \times 100$$

2.2.2. Vergleich mit kompetitiven, klassischen EIAs

Vergleichend zur Entwicklung der Ab2-basierten EIAs wurden zwei bereits etablierte klassische Enzymimmuntests basierend auf einem toxinspezifischen, primären Antikörper und einem Toxin-Enzym-Konjugat nach folgender Methode durchgeführt: Mikrotiterplatten wurden mit Sekundärantikörper (5 µg/ml Kaninchen-anti-Maus IgG in Bicarbonatpuffer) beschichtet, nach Absättigung erfolgte die Zugabe der toxinspezifischen Ab1 (40 ng/ml mAk 2D1 bzw. 30 ng/ml mAk 2A12; jeweils 100 µl/Kavität). Nach 1 h Inkubation wurde freies Mykotoxin (verdünnt in PBS mit Zusatz von 10 % Methanol) mit enzymmarkierten Toxinen

(AFB₁-Oxim-HRP 1:40.000 bzw. T-2-HS-HRP 1:500.000 verdünnt in 1 % Casein/PBS) auf die Platten aufgetragen und wiederum für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde mit der Zugabe von Enzymsubstrat/Chromogen-Lösung und dem Messen der Absorption fortgefahren. Die Ermittlung der Sensitivität und Spezifität erfolgte wie unter III.2.2.1. beschrieben.

2.3. Nachweis der Toxine in Urinproben

Unter Verwendung von Proben verschiedener freiwilliger Probanden wurde die Anwendbarkeit der entwickelten, optimierten, Ab-2 basierten Enzymimmuntests zum Nachweis von Toxinen in Urin überprüft. Die Probanden umfassten Frauen und Männer im Alter von 22 bis 58 Jahren. Die Urinproben wurden zunächst mittels Urinanalysestreifen auf die Parameter Urindichte bzw. spezifisches Gewicht, pH-Wert, Leukozyten, Nitrit, Protein, Glucose, Keton, Urobilinogen, Bilirubin und Erythrozyten bzw. Hämoglobin untersucht. Anschließend wurden die Urinproben in sterile Röhrchen umgefüllt und bei 4 °C und 3000 x g für zehn Minuten zentrifugiert. Der genaue pH-Wert der Überstände wurde danach mittels pH-Meter ermittelt.

2.3.1. Orientierende Vorversuche

Im Hinblick auf die aus früheren Versuchen bekannte Anfälligkeit des T-2 Toxin-spezifischen Ab1 2A12 gegenüber Probenmatrix-Einflüssen wurden für die orientierenden Vorversuche das auf diesem Antikörper basierende Testsystem eingesetzt. Dazu wurden Verdünnungsreihen von Urinproben verschiedener Probanden mit dem unter III.2.2. beschriebenen, direkt beschichteten EIA untersucht. Vergleichend wurde künstlicher Urin (Human-Urin-Imitat) analysiert.

2.3.2. Optimierung der Testsysteme zur Untersuchung von Urinproben

Um die Matrixeffekte des Urins zu reduzieren, wurden verschiedene Verdünnungslösungen sowie der Zusatz eines hochmolaren Phosphatpuffers (1 mol/l Sørensen-Puffer, SøP, pH 7) und des harnstoffspaltenden-Enzyms Urease getestet.

Letztlich wurden folgende Systeme zum Nachweis von AFM₁ bzw. HT2-Toxin in

Urin etabliert: Urinproben (1 ml) wurden zunächst mit 100 µl Sørensen-Puffer und 200 µl Urease-Lösung (1 mg/ml) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur EIA-Analyse wurden nach Absättigung beschichteter Mikrotiterplatten (200 ng/ml 2D1 bzw. 250 ng/ml 2A12) die vorbehandelten Urinproben 1:2 bzw. 1:4 in BSA/PBS (1 %) (w/v) verdünnt und zusammen mit den peroxidasemarkierten Ab2-Konjugaten (1G10-HRP 1:1.000 bzw. 1D6-HRP 1:10.000) für 1 h inkubiert. Im Anschluss wurde für 20 min (Aflatoxin Nachweis) bzw. 12 min (HT-2 Nachweis) Enzymsubstrat/Chromogen-Lösung zugegeben und die Absorption bei 450 nm gemessen.

2.3.3. Validierung der Testsysteme

Die Validierung der entwickelten Testsysteme orientierte sich an der Entscheidung der Kommission 2002/657/EG (Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG) betreffend die Durchführung von Analysemethoden sowie die Auswertung von Ergebnissen und an den Richtlinien zur Validierung von Screening-Methoden für Rückstände aus der Veterinärmedizin der europäischen Referenzlabore (CRLs, 2010). In den Richtlinien der Community Reference Laboratories Residues (CRLs) werden verschiedene Kennzahlen definiert, mit denen sich anhand der Messergebnisse berechnen lässt, ob ein Testverfahren für eine bestimmte Screening-Zielkonzentration validiert werden kann oder nicht. Die Screening-Zielkonzentration ist diejenige Analyt-Konzentration, ab der ein Testergebnis als positiv bewertet wird. Der Cut-Off Level (F_m) ist wiederum dasjenige Messsignal (Extinktionswert bei EIAs), der die Kontamination einer Probe im Konzentrationsbereich der Zielkonzentration oder darüber anzeigt. Laut der Entscheidung 2002/657/EG und den Richtlinien des CRLs von 2010 sind jeweils mindestens 20 Leerwert-Proben und 20 toxische Proben auszuwerten. Für die Validierung der Ab2-basierten Toxinnachweise in Urin wurden als Zielkonzentrationen 0,2 ng/ml bzw. 0,4 ng/ml AFM₁ und 2 ng/ml bzw. 4 ng/ml HT-2 gewählt. Die Kennzahlen wurden nach folgender Formel berechnet:

$$F_m = M + 1,64 \cdot SD_M$$

M = Mittelwert der toxischen Proben

SD_M = Standardabweichung der toxischen Proben

Zusätzlich lässt sich noch mit Hilfe von 20 Leerwert Urinproben der Treshold Wert T berechnen:

$$\mathbf{T = B - 1,64*SD_B}$$

B = Mittelwert der Leerwert Proben

SD_B = Standardabweichung der Leerwert Proben

Der Treshold Wert T ist somit der Extinktionswert, der von weniger als 5 % der Leerwertproben unterschritten wird. Somit gilt, dass falls $F_m < B$ ist das Testverfahren geeignet, positive und negative Proben zu differenzieren und wenn $F_m < T$, dann sind für < 5 % der untersuchten Proben falsch positive Ergebnisse zu erwarten (CRLs, 2010).

IV. ERGEBNISSE

1. Polyklonale Ab2

Um den Erfolg der unter III.2.1.2. beschriebenen Immunisierung mit den Ab1-KLH-Konjugaten zu überprüfen, wurden wie in III.2.1.5. beschrieben verschiedene EIA-Varianten verwendet, wobei die Verfahren im Laufe der Immunisierung entsprechend angepasst und modifiziert wurden. Für die Untersuchung der ersten in Woche 7 gewonnenen Seren stand zunächst nur die Screening-Variante 1 zur Verfügung, die Seren wurden aber später auch mit den verbesserten Varianten 2 bzw. im Hinblick auf den Ab2-basierten T-2 Toxinnachweis auch mit Variante 3 nachuntersucht.

1.1. Ab2-Nachweis in Seren mittels Screening-Variante 1

Für Variante 1, die auf einer Competition des Ab2 mit einem Toxinkonjugat um limitierte Bindungsstellen des Ab1 beruht, wurde als Titer diejenige Verdünnungsstufe eines Antiserums definiert, bei der im EIA im Vergleich zum Kontrollansatz (ohne Ab2) eine Reduktion der Extinktion um 0,5 Absorptionseinheiten erreicht wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 und 5 zusammengefasst. Bei allen fünf immunisierten Mäusen konnten im Vergleich zu einer nicht mit den Ab1-KLH-Konjugaten immunisierten Maus deutliche Reaktivitätsunterschiede festgestellt werden. Dies war besonders ausgeprägt für das 2D1-KLH Immunogen, aber auch beim T-2 Toxinnachweis (mAk 2A12) konnten in vier von fünf Mäusen Ab2 - wenn gleich auf relativ niedrigem Niveau - nachgewiesen werden. Beim Nachweis 2D1-spezifischer Antikörper lagen die Titer im Bereich von 1:300-1:800, für den Nachweis gegen 2A12 gerichteter Ab2 ließen sich nur niedrige Titer im Bereich von 1:200-1:400 ermitteln. Diese ersten Ergebnisse belegten die Immunogenität der applizierten Ab1-KLH Konjugate, verdeutlichten aber auch, dass Optimierungsbedarf im Hinblick auf einen sensitiven und effizienten Ab2-Nachweis in den Mäuseseren bestand.

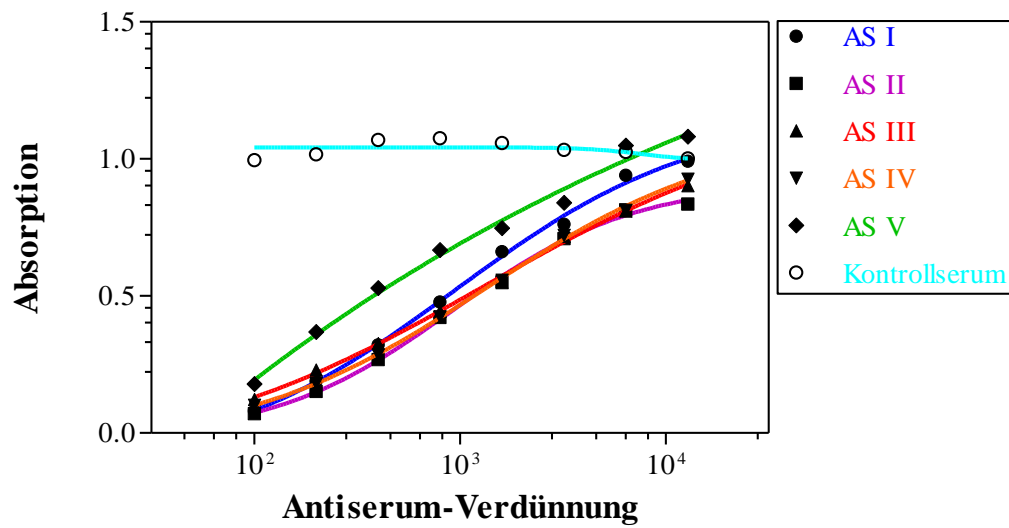


Abbildung 4: Bestimmung Antikörpertiter gegen Ab1 2D1 mit Variante 1
(Antiseren gewonnen 7 Wochen nach Grundimmunisierung).

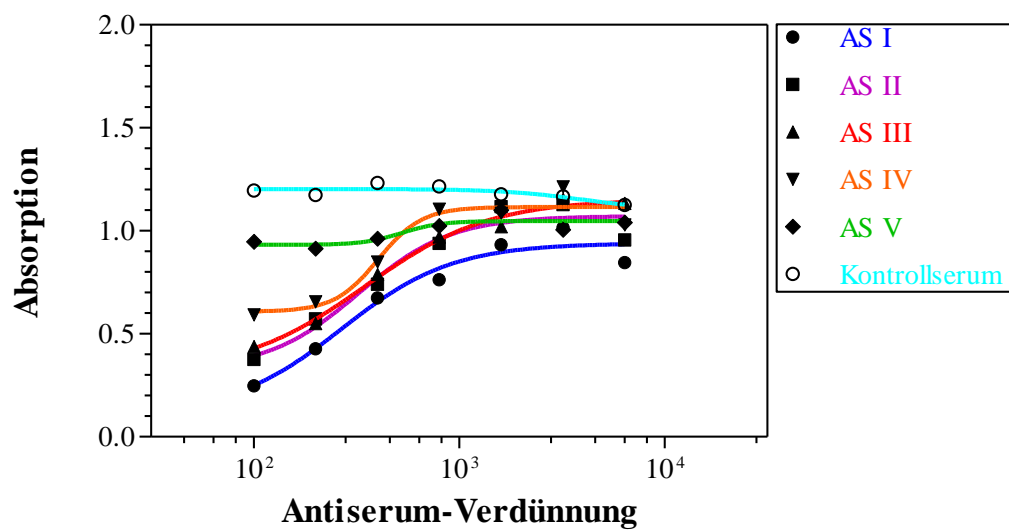


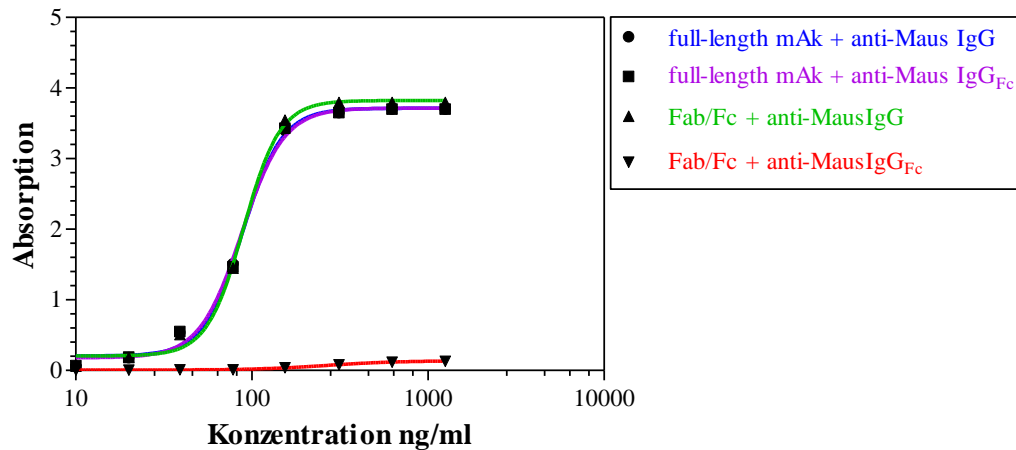
Abbildung 5: Bestimmung Antikörpertiter gegen Ab1 2A12 mit Variante 1
(Antiseren gewonnen 7 Wochen nach Grundimmunisierung).

1.2. Ab2-Nachweis in Seren mittels Screening-Variante 2

1.2.1. Charakterisierung der Ab1-Fab-HRP-Konjugate

Obwohl Screening-Variante 1 mit relativ geringem Aufwand zu realisieren war, wurde aufgrund der geringen Sensitivität eine weitere unter III.2.1.5. beschriebene Variante (Variante 2) entwickelt. Entscheidende Komponente hierfür war die Entwicklung von Ab1-Fab-HRP-Konjugaten, basierend auf der Spaltung der full-length mAk mit Hilfe von Papain und anschließender Kopplung an aktivierte Peroxidase. Um eine möglichst hohe Spaltungseffizienz zu erzielen, wurden zwei verschiedene Papain-Spaltungs-Protokolle ausgetestet. Ziel war es, die full-length mAk vollständig zu spalten und dabei gleichzeitig die immunologische Reaktivität der Antikörper zu erhalten. Die Spaltung wurde jeweils zeitnah in direkten EIAs überprüft, wobei Kaninchen-anti-Maus IgG bzw. -IgG_{Fc} spezifische Sekundärantikörper als Beschichtung dienten. An die beiden unterschiedlichen Festphasen gebundenen Antikörper(fragmente) wurden dann durch Zugabe peroxidasemarkierter Toxinkonjugate (AFB₁-HRP bzw. T2-HRP) detektiert. Unbehandelte full-length mAk wurden jeweils als Kontrollansätze in die entsprechenden EIAs eingesetzt (Abbildung 6). Bei Verwendung des Spaltungsprotokolls A, basierend auf immobilisierten Papain, konnten für mAk 2A12 eine hohe Spaltungseffizienz sowie hohe Restaktivitäten festgestellt werden, für mAk 2D1 hingegen waren deutliche Aktivitätsverluste sowie eine geringere Spaltungseffizienz zu verzeichnen.

(A)



(B)

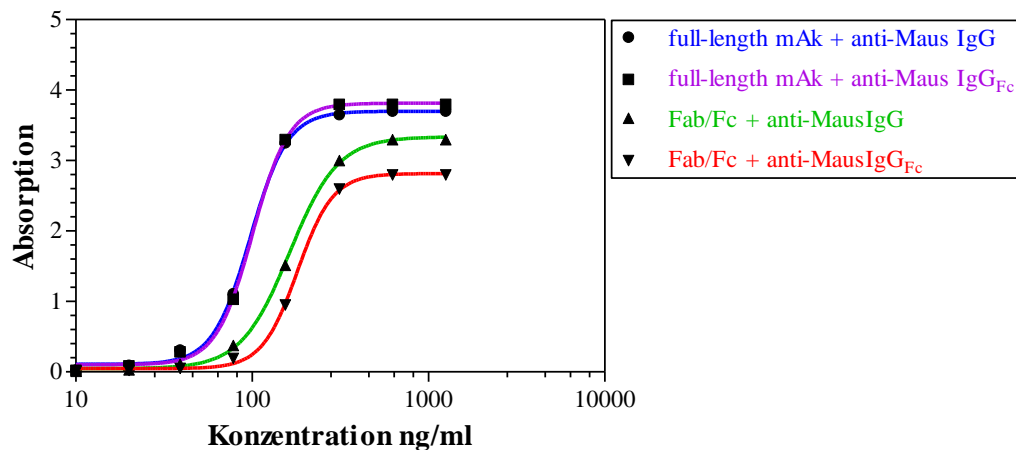


Abbildung 6: Überprüfung der Papain-Spaltung des mAk 2A12 (A) bzw. mAk 2D1 (B): Vergleichend wurden full-length mAk und die nach Spaltung gewonnenen Fab/Fc-Gemische in anti-Maus-IgG-Antikörper- bzw. anti-Maus-IgG_{FC}-Antikörper beschichteten EIA-Platten überprüft. Nach erfolgreicher Spaltung sollte in den anti-IgG_{FC}-beschichteten Platten keine Antikörper-Aktivität mehr messbar sein, so wie es bei der mAk 2A12 Spaltung (A) war. Bei der Spaltung von mAk 2D1 (B) hingegen zeigte sich eine geringe Spaltungseffizienz, da noch ungespaltene mAk vorhanden waren, die an der IgG_{FC}-Beschichtung binden.

Durch Änderung des Spaltungsprotokolls konnten letztlich aktive Fab-Fragmente sowohl für mAk 2A12 als auch 2D1 generiert werden, die anschließend an aktivierte Peroxidase gekoppelt wurden. In einem geeigneten EIA-System (indirekt; beschichtet mit AFB₁-BSA bzw. T-2-BSA) wurden die hergestellten Ab1-Fab-HRP Konjugate überprüft, wobei die Parameter Kopplungseffizienz (HRP-Aktivität) und immunologische Restaktivität der markierten Fab-Fragmente zur Beurteilung der HRP-Konjugate herangezogen wurden. Als Kontrollansatz wurde die Aktivität unbehandelter full-length mAk bestimmt. Beim 2D1-Fab-HRP zeigten sich deutliche, aber noch tolerierbare Aktivitätsverluste von bis zu 80 %, das 2A12-Fab-HRP zeichnete sich hingegen durch hohe Restaktivitäten von > 90 % aus (Abbildung 7).

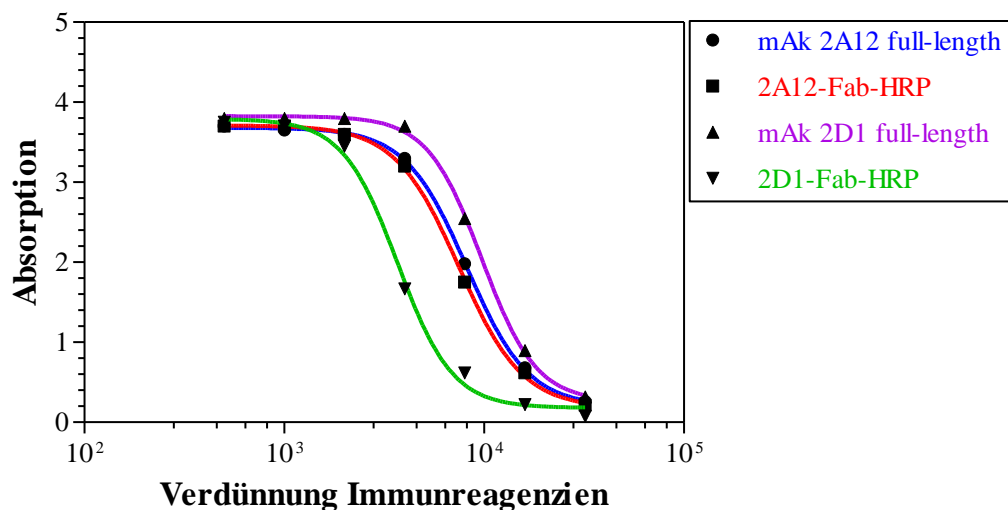


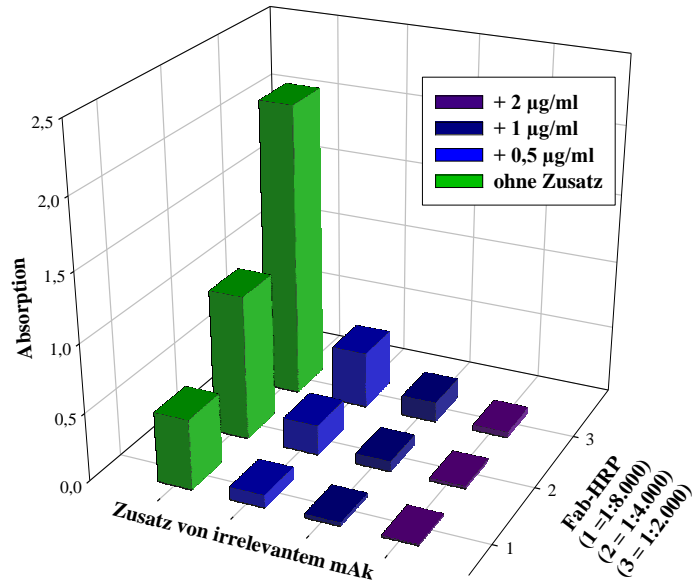
Abbildung 7: Überprüfung der Aktivität der Ab1-Fab-HRP-Konjugate.

1.2.2. Optimierung des Ab2-Nachweises

Die generierten Ab1-Fab-HRP Konjugate kamen bei Screening-Variante 2 zum Einsatz, als Beschichtung wurden anti-Maus-IgG_{Fc}-spezifische Antikörper verwendet. So sollte sichergestellt werden, dass die in den Mäuseseren vorhandenen Antikörper (u.a. Ab2) an die Festphase binden, nicht aber das zum spezifischen Nachweis der Ab2 verwendete peroxidase markierte Ab1-Fab-Konjugat. Allerdings trat zum Teil bei dieser Screening-Variante ein hohes Hintergrundsignal (Background) von etwa 0,5 - 2,0 (2D1-Fab-HRP) bzw. 0,3 - 1,2 (2A12-Fab-HRP) Absorptionseinheiten auf, weshalb Isotyp-analoge, irrelevante Antikörper (IgG₁-Isotyp beim anti-2D1-Ab2 bzw. IgG_{2a}-Isotyp beim anti-2A12-Ab2 Nachweissystem) zur Reduzierung des Backgrounds in unterschiedlichen Konzentrationen zum Enzymkonjugat hinzugegeben wurden. In Abbildung 9 ist die Höhe der Hintergrundsignale abhängig von der jeweiligen Ab1-Fab-HRP Verdünnungsstufe sowie unterschiedlichen Konzentrationen an irrelevanten mAk für die beiden Ab2-Nachweise dargestellt. Insbesondere beim Einsatz des 2A12-Fab-HRP traten auch noch bei vergleichsweise hohen Verdünnungen sehr hohe Extinktionswerte in den Ab2-freien Kontrollansätzen auf.

Letztlich wurde die Screening-Variante 2 unter folgenden optimierten Bedingungen durchgeführt: beim anti-2D1-Ab2-Test erfolgte ein Zusatz von 1 µg/ml mAk Isotyp IgG₁ zur 2D1-Fab-HRP Verdünnung (1:2.500) bzw. beim anti-2A12-Ab2 EIA ein Zusatz von 2 µg/ml mAk Isotyp IgG_{2a} zur 2A12-Fab-HRP Verdünnung (1:8.000). Die Extinktionswerte für die Ab2-freien Kontrollansätze lagen hierbei jeweils im Bereich von 0,18 – 0,25 (2D1-Assay) bzw. 0,43 – 0,55 (2A12-Assay).

(A)



(B)

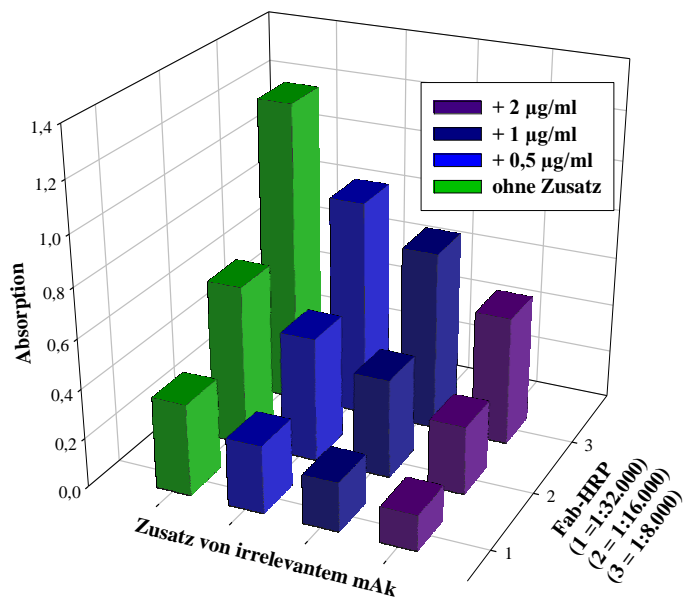


Abbildung 8: Optimierung der Screening-Variante 2: Extinktionswerte im EIA für die Ab2-freien Kontrollansätze nach Zusatz von verschiedenen Konzentrationen irrelevanter mAk zu unterschiedlichen Verdünnungen von 2D1-Fab-HRP (A) bzw. 2A12-Fab-HRP (B).

1.2.3. Titerbestimmung

Bei der Bestimmung der Antikörper-Titer in den Seren der immunisierten Mäuse konnten mit der optimierten Screening-Variante 2 deutlich höhere Titer als mit Variante 1 bestimmt werden. Der Titer wurde hierbei als die Verdünnungsstufe des Antiserums definiert, bei der im EIA eine Extinktion von 1 erreicht wurde. Dargestellt sind die Titer der 23 Wochen nach Grundimmunisierung gewonnenen Seren von Maus I, II, IV und V, Maus III war zu diesem Zeitpunkt bereits für die erste Fusion euthanasiert worden. Die nachweisbaren Titer lagen für die Ab2 gegen mAk 2D1 im Bereich von 1:20.000-1:100.000 (Abbildung 9) bzw. beim Nachweis von Ab2 gegen mAk 2A12 im Bereich von 1:10.000-1:40.000 (Abbildung 10). Für beide Immunogene konnten also in den immunisierten Mäusen entsprechende Ab2 nachgewiesen werden.

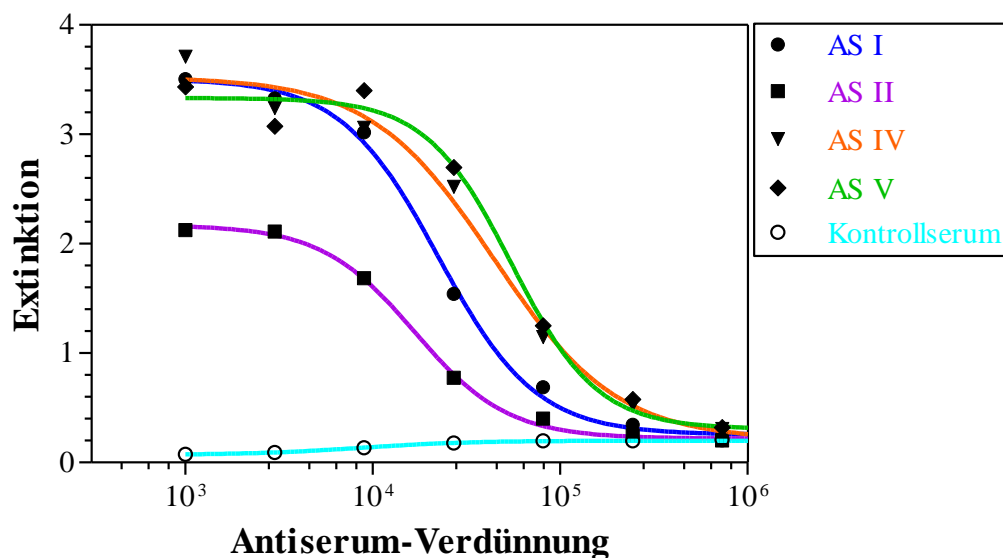


Abbildung 9: Bestimmung Antikörpertiter gegen Ab1 2D1 mit Variante 2.

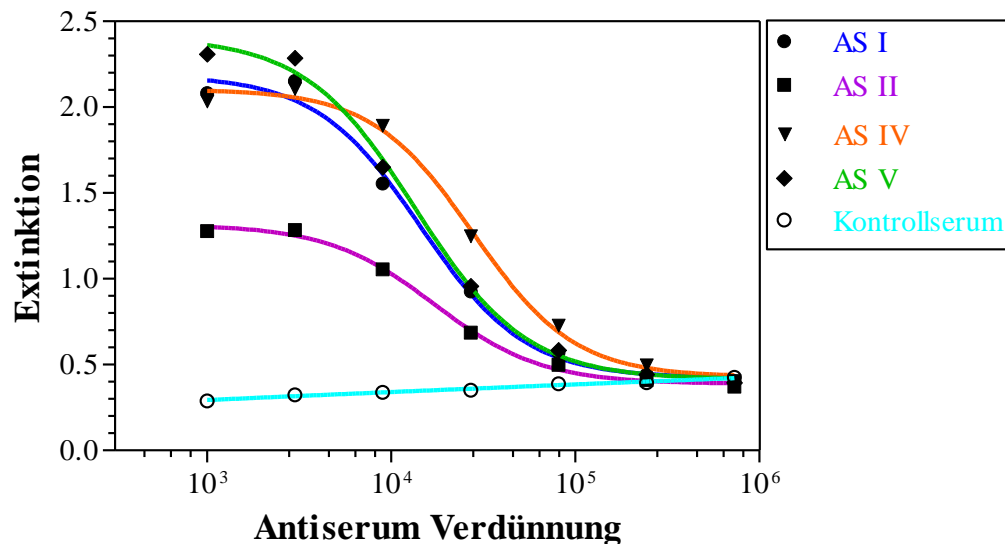


Abbildung 10: Bestimmung Antikörpertiter gegen Ab1 2A12 mit Variante 2.

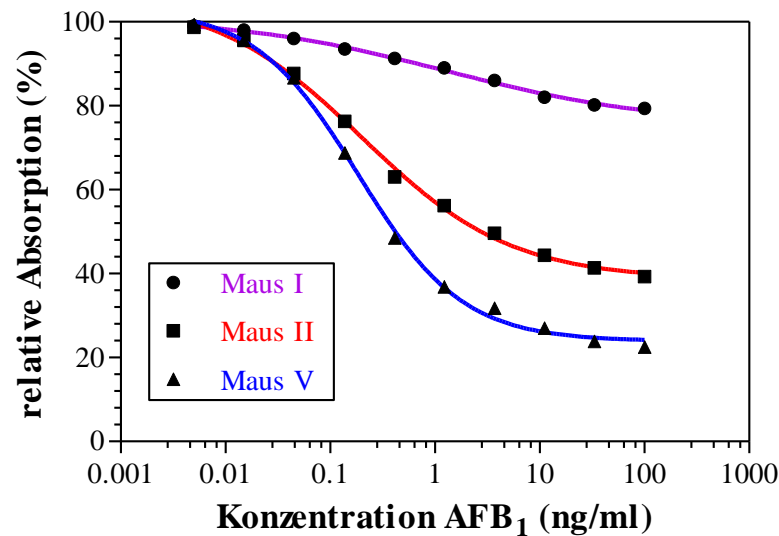
1.2.4. Erstellung von Standardkurven

Zur Überprüfung des Anteils an Ab2 β und Ab2 γ in den Seren wurden Standardkurven erstellt. Dazu wurde zuerst mittels Schachbrett-Titration die optimalen Immunreagenzien-Konzentrationen bestimmt und dann unter kompetitiven EIA-Bedingungen ermittelt, inwieweit durch Zugabe von freiem Toxin (AFB₁ bzw. T-2) die Bindung der jeweiligen Ab1-Fab-HRP an Ab2 gehemmt werden kann. Dabei zeigte sich, dass die Immunantwort nach Immunisierung mit 2A12-KLH v.a. durch Ab2 vom γ -Typ dominiert war, die zwar in der Nähe aber nicht direkt im Paratop binden. Dementsprechend kann bei diesen Ab2 die Bindung an Ab1 nicht durch Zugabe von freiem Toxin gehemmt werden und daher konnte in den Seren auch bei Zugabe einer hohen Toxinkonzentration von 200 ng/ml nur eine geringe Hemmung von maximal 20 % beobachtet werden. Zum gewünschten Ab2 β -Typ, der das innere Abbild des Ab1-Paratops widerspiegelt, zählte somit nur ein geringer Anteil der Antikörper in den Seren. Dies ist in Abbildung 11 B für Maus II und IV illustriert, ähnliche Ergebnisse wurden auch für die anderen untersuchten Mäuse erhalten.

Die Immunantwort nach Immunisierung mit 2D1-KLH fiel dagegen deutlich vielversprechender aus. Für das Paratop dieses mAks konnte zum Teil in den Seren ein hoher Anteil an Ab2 vom β -Typ gefunden werden (Abbildung 11 A), allerdings bestanden hier zwischen den einzelnen Mausantiseren hohe Variabilitäten. Während die Seren der Maus I bzw. IV ähnlich wie beim T-2 spezifischen mAks 2A12 durch Ab2 γ dominiert wurden, resultierte bei den Seren

der anderen Mäuse die Zugabe von freiem AFB₁ in einer deutlichen Hemmung der EIA-Reaktivität. Eine vollständige Hemmung konnte allerdings auch bei diesen Seren nicht erreicht werden, die wahrscheinlich durch Ab2 γ verursachten Hintergrundsignale lagen im Bereich von 20 - 40 %.

(A)



(B)

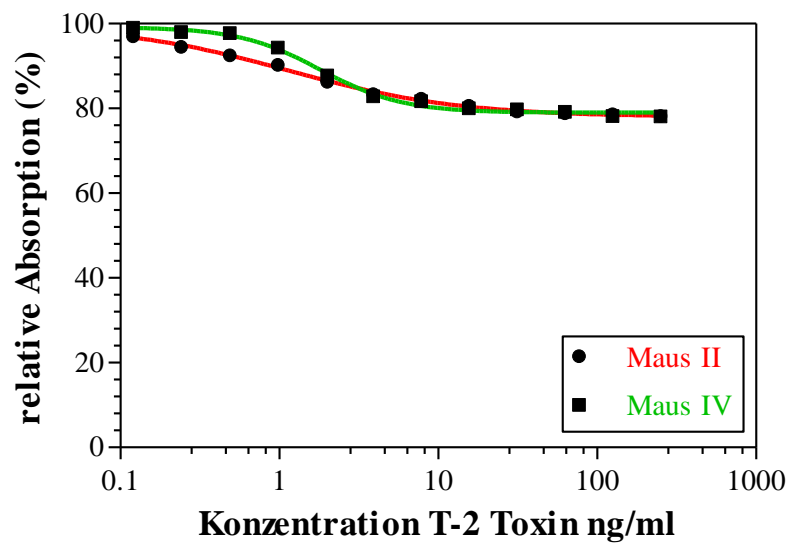


Abbildung 11: Standardkurven für AFB₁ (A) und T-2 Toxin (B) im Screening-Variante 2 EIA-System unter Verwendung verschiedener Mausantiseren (gewonnen 23 Wochen nach Grundimmunisierung).

1.3. Ab2-Nachweis in Seren mittels Screening-Variante 3

Wie unter III.2.1.5. beschrieben, wurde aufgrund der bestehenden Background-Problematik beim Nachweis 2A12-spezifischer Antikörper noch eine weitere Screening-Variante (Variante 3) basierend auf Iso-/Subtypspezifischen Sekundärantikörper-Beschichtungen ausgetestet. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit anti-Maus-IgG₁ bzw. -IgG_{2b} Antikörpern beschichtet, die in Vorversuchen überprüfte hohe Spezifität dieser Beschichtungsantikörper verhinderten die bei Variante 2 beobachtete Bindung des 2A12-Fab-HRPs (IgG_{2a}) an die Festphase. Auch bei dieser Variante war der Titer als diejenige Verdünnungsstufe des Antiserums definiert, bei der eine Extinktion von 1 im EIA erreicht wurde. Mit beiden Sekundärantikörper-Beschichtungen konnte der Background beim Nachweis 2A12-spezifischer Ab2 deutlich auf Werte von 0,05 - 0,2 reduziert werden. Das Fab-HRP konnte somit auch deutlich konzentrierter (1:3.000 statt 1:8.000 wie bei Variante 2) eingesetzt werden. Bei Analyse des 7 Wochen nach Grundimmunisierung gewonnenen Serums zeigte sich, dass vornehmlich Ab2 vom IgG₁-Subtyp nachweisbar waren. Die entsprechenden Titer lagen im Bereich von 1:16.000-1:32.000, während mit Hilfe der IgG_{2b} spezifischen Beschichtung lediglich Titer im Bereich von 1:1000 - 1:2000 ermittelt wurden (Abbildung 12). Auch bei der Untersuchung der weiteren zu späteren Zeitpunkten gewonnenen Seren zeigte sich ein ähnliches Verteilungsmuster, die Seren nach der 1. Restimulierung zeigten zudem einen Titeranstieg von etwa einer Verdünnungsstufe (Ergebnisse nicht dargestellt).

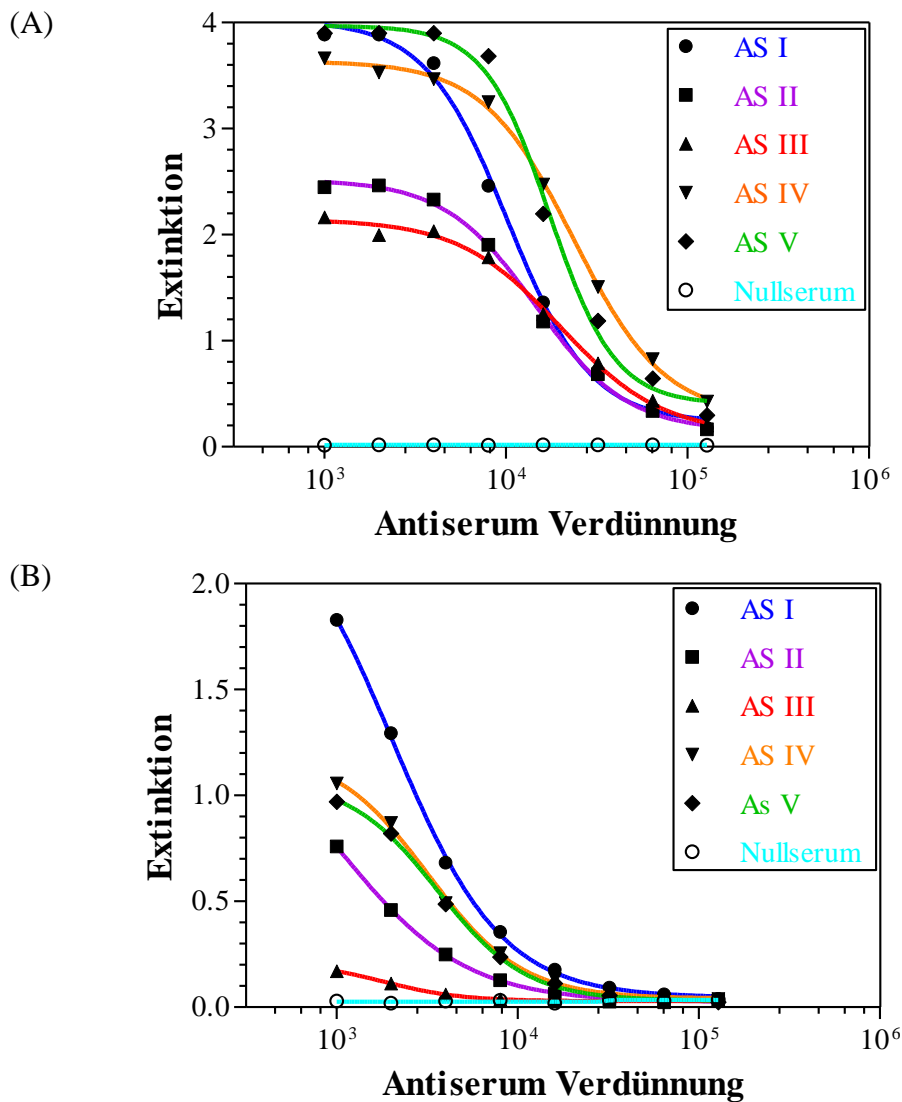


Abbildung 12: Bestimmung Antikörpertiter gegen mAk 2A12 unter Verwendung der EIA-Screening-Variante 3, (A) anti-Maus-IgG₁-, (B) anti-Maus-IgG_{2b}-Beschichtung. Untersucht wurden die 7 Wochen nach Grundimmunisierung gewonnenen Seren.

Somit konnten insgesamt mit der Variante 2 zum Nachweis 2D1-spezifischer Ab2 und mit Variante 3 (anti-Maus-IgG₁ Beschichtung) zum Nachweis 2A12-spezifischer Ab2 zwei sensitive und stabile EIA-Verfahren etabliert werden, die dann im Laufe der weiteren Untersuchungen zum Screenen der nach Zellfusion gewonnenen Zellkulturüberstände bzw. zur weiteren Charakterisierung der monoklonalen Ab2 eingesetzt wurden.

2. Generierung monoklonaler antiidiotypischer Antikörper

2.1. Etablierung Hybridom-Zelllinien

Die Herstellung und Etablierung der Hybridom-Zelllinien erfolgte wie unter III.2.1.6 beschrieben. Insgesamt waren 3 Fusionen nötig, bis 2D1- bzw. 2A12-spezifische Ab2 generiert werden konnten. Bei der 1. noch mit Screening-Variante 1 getesteten Zellfusion konnten keine positiven Zellkulturüberstände erhalten werden, die bei der 2. Fusion reaktiven Zellkulturüberstände enthielten mAk vom Ab2 γ -Typ. Bei der 3. Fusion konnten in 7 (anti-2D1) bzw. 12 (anti-2A12) der 190 ausgesäten Kavitäten deutliche Ab2-Reaktivitäten (Extinktionswerte 1,0 - 4,0) nachgewiesen werden. Letztlich erwiesen sich jeweils vier Primärklone als stabil, die Bindung der sekretierten Ab2 an Ab1 (2D1 bzw. 2A12) ließ sich - wie orientierende Untersuchungen zeigten - durch Zugabe von freiem AFB₁ bzw. T-2 zumindest teilweise hemmen. Nach Reklonierung und Etablierung der Hybridome wurden die Ab2-haltigen Zellkulturüberstände genauer charakterisiert und zur Erstellung von Standardkurven verwendet. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 7 und 8 bzw. Abbildung 13 und 14 zusammengefasst.

Tabelle 7: Charakteristika der gegen mAk 2D1 (anti-Aflatoxin) gerichteten Ab2. Getestet wurden Ab2-haltige Zellkulturüberstände der etablierten Hybridom-Zelllinien unter den in IV.1.2. beschriebenen EIA-Bedingungen.

Parameter	Ab2			
	1C11	1E2	1H2	1G10
Ig-Subtyp	IgG ₁	IgG ₁	IgG ₁	IgG ₁
Verdünnung Zellkulturüberstände	1:160	1:320	1:80	1:320
Verdünnung des 2D1-Fab-HRP	1:32.000	1:8.000	1:4.000	1:8.000
IC₅₀ (pg AFM₁/ml)	>10.000	>10.000	360	192
Detektionslimit (pg AFM₁/ml)	n.b.	n.b.	105	55,7
Hintergrundsignal (rel. Extinktion, %)	73	67	17	< 10

Tabelle 8: Charakteristika der gegen mAk 2A12 (anti-T-2-Toxin) gerichteten Ab2. Getestet wurden Ab2-haltige Zellkulturüberstände der etablierten Hybridom Zelllinien unter den in IV.1.3. beschriebenen EIA-Bedingungen.

Parameter	Ab2			
	1C1	1D6	1D7	1F10
Ig-Subtyp	IgG1	IgG1	IgG2b	IgM
Verdünnung Zell-kulturüberstände	1:10	1:80	1:15	1:10
Verdünnung des 2A12-Fab-HRP	1:4.000	1:16.000	1:2.000	1:3.000
IC₅₀ (pg T-2/ml)	1800	702	2800	1700
Detektionslimit (pg T-2/ml)	488	193	520	390
Hintergrundsignal (rel. Extinktion, %)	28	< 10	43	22

Diese orientierenden Untersuchungen zeigten, dass nur mAk 1G10 und 1H2 beim Aflatoxin-Nachweis bzw. 1D6 beim T-2-Toxin-Nachweis die Kriterien eines Ab2β erfüllten, da sich nur bei diesen drei Antikörpern eine nahezu vollständige Hemmung der Bindung der Ab2 an die Peroxidase-markierten Ab1-Fab-Konjugate erzielen ließ (Abbildung 13 und 14). Bei den anderen untersuchten Klonen konnte trotz Zugabe höherer Toxin-Konzentrationen keine vollständige Hemmung erreicht werden. Dementsprechend variierten auch die IC₅₀-Werte der jeweiligen EIAs, beim T-2 Toxin Nachweis lag die Spannbreite beispielsweise bei 0,7 – 2,8 ng/ml.

Um einen Ab2-basierten EIA zum Nachweis von Aflatoxinen zu entwickeln, wurde letztlich mAk 1G10 aufgrund der vergleichsweise höheren Sensitivität für AFB₁ und des niedrigeren Background anstelle von mAk 1H2 ausgewählt. Zum Nachweis von Typ-A Trichothecenen und zur Etablierung eines Ab2-basierten EIAs wurde mAk 1D6 eingesetzt. Die entsprechenden Hybridome wurden in CELLline 1000 Bioreactor Flasks massenproduziert, die Antikörper-enthaltenden Zellkulturüberstände anschließend mit Ammoniumsulfatlösung gefällt und über Protein-A affinitätschromatographisch gereinigt.

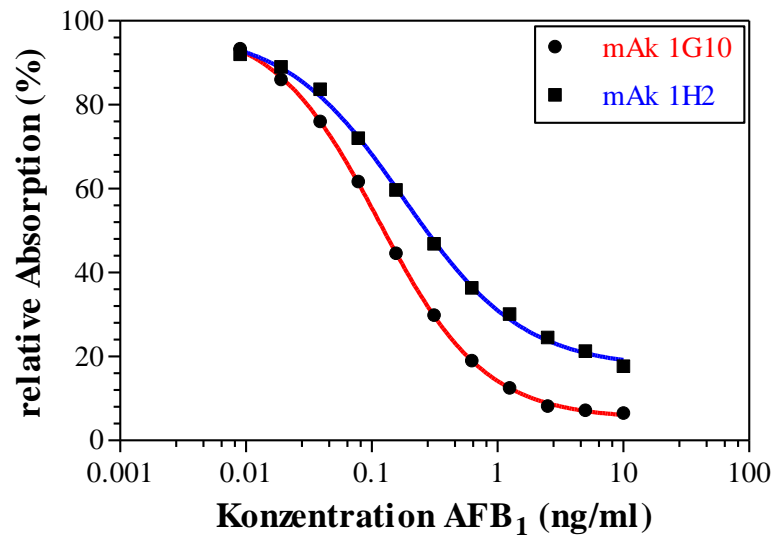


Abbildung 13: AFB₁-Standardkurven in Ab2-basierten EIA-Systemen analog zu Screening-Variante 2. Die Ab2-haltigen Zellkulturüberstände 1G10 und 1H2 wurden in Verdünnungen von 1:320 bzw. 1:80 eingesetzt, 2D1-Fab-HRP in Verdünnungen von 1:8000 bzw. 1:4.000.

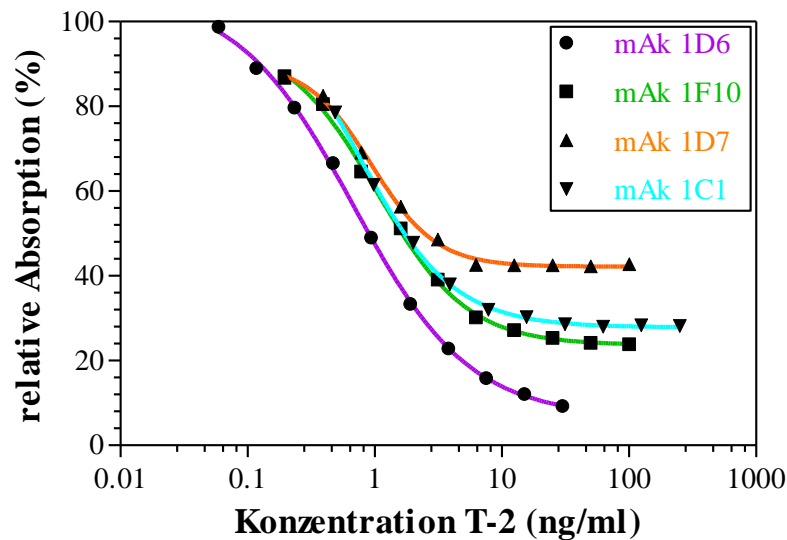


Abbildung 14: T-2-Standardkurven in Ab2-basierten EIA-Systemen, als Ab2 wurden mAk 1D6, 1D7, 1F10 und 1C1 eingesetzt.

2.2. Etablierung und Optimierung von Ab2-basierten Toxin-Nachweisverfahren

Die bislang zum Nachweis von Ab2 in den Mäuseseren bzw. zur Identifikation und vorläufigen Charakterisierung der Ab2-produzierenden Hybridome eingesetzten Verfahren basierten auf den beiden Screening-Varianten 2 (Nachweis Aflatoxine) bzw. 3 (Nachweis Typ-A-Trichothecene). Im Hinblick auf den hohen experimentellen und zeitlichen Aufwand für die Herstellung von Ab1-Fab-Konjugaten und die hohen Kosten für die Fc- bzw. Isotyp-spezifischen Sekundärantikörper wurde im Weiteren überprüft, inwieweit EIA-Systeme, bei denen die Mikrotiterplatten direkt mit gereinigten Ab1 bzw. Ab2 beschichtet werden, realisierbar sind. Allerdings zeigten erste Versuche, bei denen Mikrotiterplatten direkt beschichtet wurden, dass verglichen mit den zuvor auf Sekundärantikörper-Beschichtungen basierenden Systemen die Antikörper in deutlich höheren Konzentrationen (ca. Faktor 10) eingesetzt werden mussten, um ähnlich hohe Signalintensitäten im EIA zu erzielen.

Auffällig war hierbei, dass zwischen eingesetzten Antikörper-Konzentrationen und erreichtem Messsignal kein linearer Bezug bestand, vielmehr kam es bei niedrigen Antikörper-Konzentrationen zu einem rapiden Verlust der Signalintensität. Da dies auf eine Denaturierung der Antikörper hindeutete, wurden in einem orientierenden Vorversuch unterschiedlich konzentrierte BSA-Lösungen zur Stabilisierung der Signalintensität zugesetzt. Ab einem Zusatz von 0,8 µg BSA pro ml konnte eine deutliche Verbesserung beobachtet werden, die beste Performance wurde mit einem BSA-Zusatz von 1,6 µg bzw. 3,2 µg pro ml PBS erzielt (Abbildung 15). Für die weitere Etablierung der direkt beschichteten EIA wurde daher im weiteren Verlauf standardmäßig PBS mit Zusatz von 3 µg BSA pro ml als Beschichtungslösung eingesetzt.

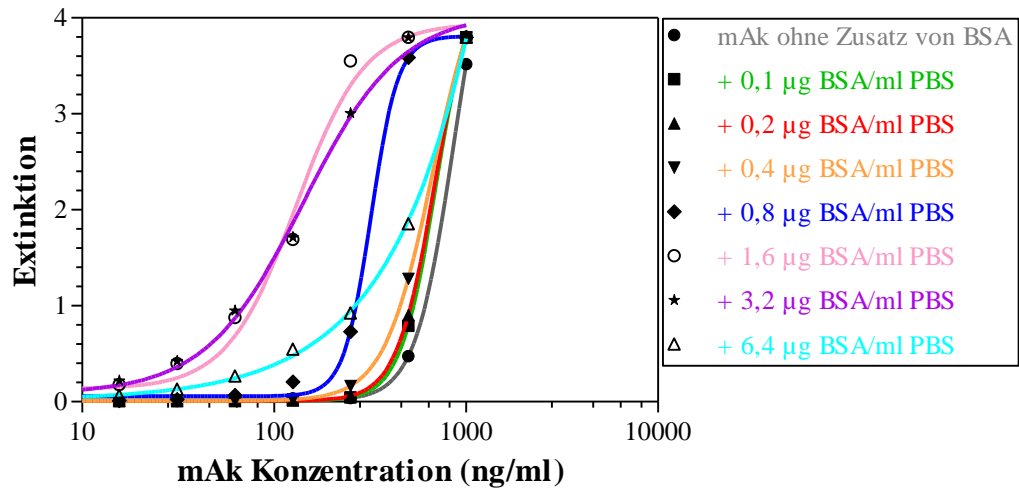


Abbildung 15: Erzielte Signalintensitäten in einem direkt beschichteten, Ab2-basierten EIA-System abhängig vom eingesetzten Beschichtungspuffer. Die dargestellten Daten wurden in einem EIA-System generiert, bei dem mAk 1D6 zur Beschichtung verwendet wurde. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die anderen überprüften mAk (2A12, 2D1, 1G10) erhalten.

Nachdem durch den Zusatz von BSA eine verbesserte Stabilität der zur Beschichtung der Mikrotiterplatten eingesetzten Fangantikörper erzielt werden konnte, wurden im Hinblick auf die Etablierung rein Antikörper-basierter EIAs für beide Toxine unterschiedliche Testformate überprüft, wobei jeweils alternierend Ab1 oder Ab2 als Fangantikörper oder in Form von full-length mAk-HRP-Konjugaten als Detektionsantikörper eingesetzt wurden. Die mittels Schachbretttitration ermittelten, optimierten Immunreagenzien-Konzentrationen für die verschiedenen EIA-Typen sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: In den optimierten Ab1/Ab2-basierten EIA-Systemen verwendete Immunreagenzien-Konzentrationen.

Parameter	Aflatoxin-Nachweissystem		T-2/HT-2-Nachweissystem	
	EIA-Typ A	EIA-Typ B	EIA-Typ A	EIA-Typ B
Fangantikörper	2D1	1G10	2A12	1D6
(Konzentration)	(200 ng/ml)	(1000 ng/ml)	(250 ng/ml)	(250 ng/ml)
Konjugat	1G10-HRP	2D1-HRP	1D6-HRP	2A12-HRP
(Verdünnung)	(1:1.000)	(1:2.000)	(1:10.000)	(1:5.000)

2.2.1. Überprüfung der Sensitivität der Ab2-basierten EIAs

Die Sensitivität der entwickelten Ab2-basierten Nachweissysteme wurde wie unter III.2.2.1. beschrieben im Vergleich zu den bereits am Lehrstuhl etablierten klassischen Systemen bestimmt. Prinzipiell erwies sich für beide Toxine das Ab2-basierte EIA-Format, bei dem Ab1 als Fangantikörper und Ab2 als Detektionsantikörper dienen, als sensitivste Variante. Der IC_{50} -Wert betrug beim Aflatoxin-Nachweis im Mittel 104 pg/ml und beim T-2 Toxin Nachweissystem 561 pg/ml. Die Nachweisgrenzen wurden als die dem 80 %-Wert (IC_{20}) der Standardkurven entsprechende Toxinkonzentration definiert und lagen durchschnittlich bei 26,8 pg AFM₁ pro ml bzw. 147 pg T-2 pro ml. Dies bedeutet im Vergleich zu den klassischen, auf Toxinkonjugaten basierenden EIA-Systemen, bei denen die IC_{50} -Werte bei 233 pg und 1042 pg Toxin pro ml lagen, eine deutliche Verbesserung der Testsensitivität um etwa Faktor 2. Die auf Ab-1 Beschichtung basierenden EIAs weisen außerdem eine bessere Sensitivität im Vergleich zu den zuvor erstellten auf Sekundärantikörper-Beschichtungen basierenden, antiidiotypischen EIA Varianten (Variante C) auf. Hier betrug der IC_{50} -Wert 192 pg AFM₁ pro ml bzw. 702 pg T-2 pro ml. Tabelle 10 und 11 geben einen Überblick über den Aufbau und die Sensitivität der verschiedenen EIA-Systeme. In Abbildung 16 und 17 sind typische Standardkurven für die vier untersuchten EIA-Systeme dargestellt.

Tabelle 10: Format und Sensitivität verschiedener EIA-Systeme zum Nachweis von AFM₁.

Parameter	Klassischer	Ab2-basierte EIA-Formate		
	EIA	A	B	C
Beschichtung	Anti-Maus IgG	/	/	Anti-Maus IgG _{Fc}
Fangantikörper	Ab1 ¹	Ab1	Ab2 ²	Ab2
Konjugat	AFB1-Oxim- HRP	Ab2-HRP	Ab1-HRP	Ab1-Fab-HRP
Detektionslimit (pg AFM₁/ml)	87,5	26,8	27,7	55,7
IC₅₀-Wert (pg AFM₁/ml)	233	104	165	192

¹ mAk 2D1

² mAk 1G10

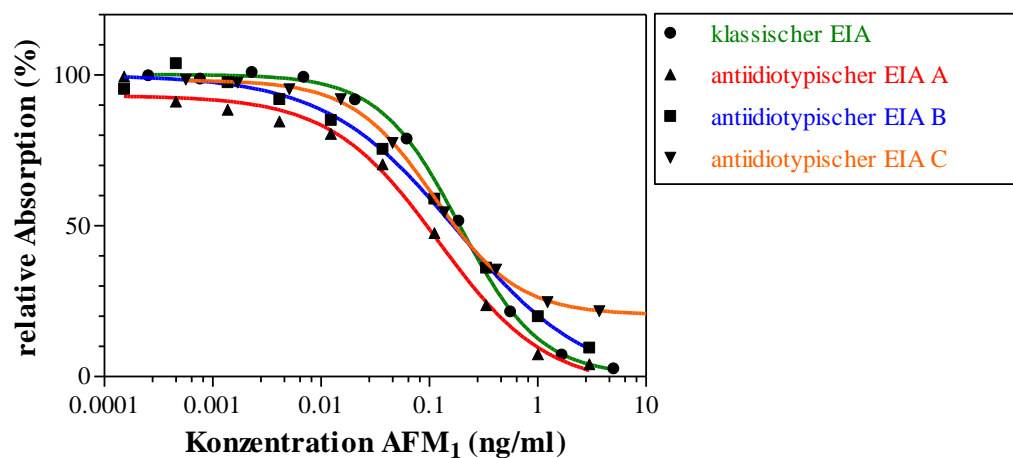
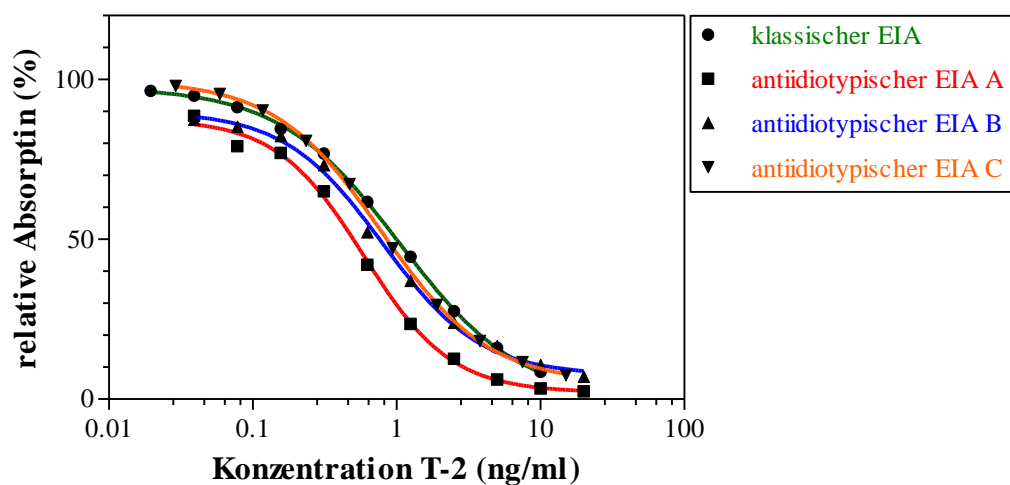


Abbildung 16: AFM₁-Standardkurven für vier verschiedene EIA-Formate (siehe Tabelle 10).

Tabelle 11: Format und Sensitivität verschiedener EIA-Systeme zum Nachweis von T-2 Toxin.

Parameter	Klassischer EIA	Ab2-basierte EIA Varianten		
		A	B	C
Beschichtung	Anti-Maus IgG	/	/	Anti-Maus IgG ₁
Fangantikörper	Ab1 ¹	Ab1	Ab2 ²	Ab2
Konjugat	T-2-HS-HRP	Ab2-HRP	Ab1-HRP	Ab1-Fab-HRP
Detektionslimit (pg T-2/ml)	304	147	230	193
IC₅₀-Wert (pg T-2/ml)	1042	561	821	702

¹ mAk 2A12² mAk 1D6**Abbildung 17:** T-2 Toxin-Standardkurven für vier verschiedene EIA-Formate (siehe Tabelle 11).

Aufgrund der hohen Test-Sensitivität wurde entschieden, das als Typ-A bezeichnete EIA-Format zum Nachweis von Aflatoxinen bzw. T-2 Toxin weiter zu untersuchen und zu etablieren. Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit der EIAs wurden über einen Zeitraum von mindestens einem Monat wiederholt Standardkurven angelegt und ausgewertet. Der lineare Messbereich der ausgewerteten Standardkurven lag für AFM₁ im Bereich von 0,03 - 0,22 ng/ml

bzw. für T-2 bei 0,2 - 1,21 ng/ml. Die Intraassay-Variationskoeffizienten der im Drei- bzw. Vierfach-Ansatz angelegten Standardkurven betrugen im Durchschnitt 8,11 % bzw. 6,9 %, die Extinktionswerte der jeweiligen antigenfreien Kontrollansätze lagen durchschnittlich bei 1,16 (AFM₁) bzw. 0,99 (T-2). Die Reproduzierbarkeit der Standardkurven für AFM₁ und T-2 Toxin ist in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Charakteristika der in den etablierten Ab2-basierten EIAs erstellten Standardkurven. Ab1 wurde jeweils als Fang-, Ab2 als Detektionsantikörper eingesetzt.

Parameter	AFM ₁		T-2 Toxin	
	Nachweisgrenze (pg/ml)	IC ₅₀ - Wert (pg/ml)	Nachweisgrenze (pg/ml)	IC ₅₀ - Wert (pg/ml)
Mittelwert	26,8	104	147	561
Standard- abweichung	14,6	18,3	54,3	122
Variations- koeffizient	54,5	17,6	37,0	22,0
Minimalwert (pg/ml)	12,4	79,3	78,6	376
Maximalwert (pg/ml)	44,1	133	224	781

2.2.2. Spezifität der antiidiotypischen, direkten, kompetitiven EIAs

Zur weiteren Charakterisierung der Ab2-basierten EIAs wurde die Spezifität der Testverfahren anhand von Aflatoxin bzw. T-2 Toxin Strukturanaloga überprüft. Dazu wurden Standardkurven mit den verschiedenen Toxinen erstellt und nachfolgend die relativen Kreuzreaktionen wie unter III.2.2.1. beschrieben berechnet. Parallel dazu wurden unter Verwendung derselben Standards auch die relativen Kreuzreaktionen in den bereits vorhandenen klassischen Systemen ermittelt. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 13 und 14 zusammengefasst.

Tabelle 13: Spezifität und Nachweisgrenzen des Ab2-basierten EIAs für Aflatoxine im Vergleich zur Spezifität des klassischen EIA-Systems.

Toxin	Ab2-basierter EIA (Variante A)			klassischer EIA
	IC₅₀ (pg/ml)	Nachweis- grenze	relative Kreuz- reaktivität (%)	relative Kreuz- reaktivität (%)
AFB₁	110	27,2	90,5	88,1
AFM₁	104	26,8	100	100
AFG₁	246	83,5	42,8	67,2
AFB₂	3130	1240	3,22	5,71
AFM₂	2860	1070	3,69	7,65
AFG₂	4400	1840	2,40	4,86
Aflatoxicol	747	268	13,5	22,9

Tabelle 14: Spezifität und Nachweisgrenzen des Ab2-basierten EIAs für Typ A Trichothecene im Vergleich zur Spezifität des klassischen EIA-Systems.

Toxin	Ab2-basierter EIA (Variante A)			klassischer EIA
	IC₅₀ (pg/ml)	Nachweis- grenze	relative Kreuzreaktivität (%)	relative Kreuzreaktivität (%)
T-2	561	147	100	100
HT-2	1339	363	38,0	41,8
T-2 -Triol	211000	68000	0,22	< 0,01
T-2 -Tetraol	> 1.000.000	> 1.000.000	< 0,01	< 0,01

Der auf Ab1 2D1 und Ab2 1G10-HRP basierende EIA reagierte mit allen getesteten Aflatoxinen. Da zur Generierung des mAk 2D1 ursprünglich ein AFM₁-HSA-Konjugat als Immunogen verwendet worden war (Dietrich et al., 1995), wurde die Reaktivität von AFM₁ gleich 100 % gesetzt. Von den anderen

getesteten Aflatoxinen zeigte AFB₁ die höchste relative Kreuzreaktion (90,5 %). Zudem weist AFG₁ eine hohe relative Kreuzreaktion von 42,8 % auf. Für die Aflatoxine mit Zahlenindex 2 besteht hingegen eine deutlich niedrigere relative Kreuzreaktion von 2,40 – 3,69 %. Die Kreuzreaktivität zu Aflatoxicol lag bei 13,5 %. Somit lassen sich alle getesteten Aflatoxine mit dem entwickelten Ab2-basierten EIA nachweisen. Vergleichende Untersuchungen zum klassischen, Toxinkonjugat-basierten EIA-System zeigten außerdem, dass die Spezifität der verschiedenen Systeme vergleichbar ist, massive Veränderungen der relativen Kreuzreaktionen wurden nicht beobachtet. Damit ist auch der Ab2-basierte EIA geeignet, Aflatoxine generisch nachzuweisen.

Der auf Ab1 2A12 und 1D6-HRP basierende EIA reagiert neben T-2 zusätzlich auch mit dem Hauptmetaboliten HT-2. Die relative Kreuzreaktion zu HT-2 beträgt 38,0 %. Die beiden anderen getesteten Stoffwechsel-Metabolite T-2-Triol und T-2-Tetraol, reagierten deutlich schwächer. Für T-2-Tetraol wurde auch bei hohen Konzentrationen von 1 µg/ml keine Hemmung beobachtet, zu T-2-Triol bestand nur eine sehr niedrige Kreuzreaktion von 0,22 %. Der entwickelte EIA ist somit zum simultanen Nachweis von T-2 und HT-2 geeignet. Auch im klassischen EIA-System zeigten sich ähnliche Kreuzreaktionen, für HT-2 wurde hier eine relative Kreuzreaktivität von 41,8 % ermittelt.

3. Anwendbarkeit der Enzymimmuntests zum Toxin-Nachweis in Urin

3.1. Orientierende Vorversuche

Um die Anwendbarkeit der entwickelten, Ab2-basierten EIAs zu überprüfen, wurde die Probenmatrix Urin gewählt, da nach einer AFB₁ oder T-2 Intoxikation die Abbauprodukte, wie in II. 4. dargestellt, unter anderem in Urin ausgeschieden werden (Peraica et al., 1999, EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), 2011). Für die orientierenden Vorversuche wurden aufgrund einer bekannten Anfälligkeit des Ab1 2A12 gegenüber Probenmatrix-Einflüssen Urinproben freiwilliger Probanden zunächst nur in dieses Testsystem eingesetzt und auf Matrixeffekte untersucht. Gleichzeitig wurde vergleichend synthetisches Human-Urin-Imitat eingesetzt. Die Untersuchungen erfolgten wie unter III.2.3.1

beschrieben. Unverdünnter Probanden-Urin zeigte ausgeprägte Matrixeffekte: Im EIA-System wurden bis zu 87 % geringere Signalintensitäten erhalten, beim synthetischen Urin lag die relative Hemmung bei durchschnittlich 8,8 %. In Abbildung 18 ist die relative Hemmung verschiedener Verdünnungsstufen von Probanden-Urinen und synthetischem Urin schematisch gegenüber gestellt.

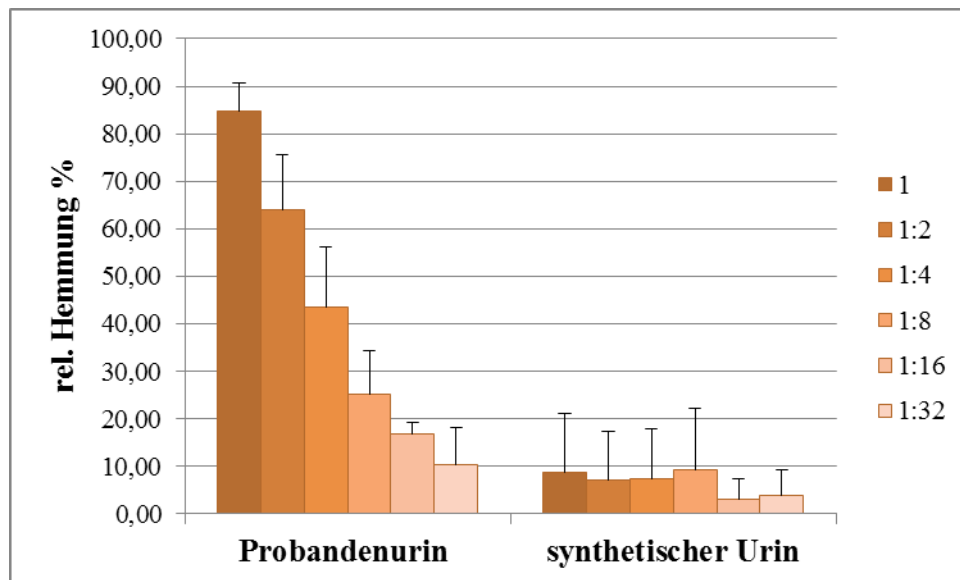


Abbildung 18: Relative Hemmung des Ab2-basierten T-2 Toxin EIA-Systems durch Probanden- bzw. synthetischen Urin. Die toxinfreien Proben wurden in verschiedenen Verdünnungsstufen in das Testsystem eingesetzt. Als Kontrollansatz diente PBS mit Zusatz von 10 % Methanol.

Diese ausgeprägten Matrixeffekte konnten erst ab Verdünnungen von 1:16 auf einen tolerablen Bereich von < 20 % reduziert werden. Solch hohe Verdünnungsfaktoren sind aber im Hinblick auf einen sensitiven Toxinnachweis nicht akzeptabel. Um die hohe relative Hemmung zu reduzieren, wurde daher eine breite Palette verschiedener Proben-Verdünnungslösungen überprüft. In Abbildung 19 sind die dabei erzielten Ergebnisse exemplarisch anhand einer Urinprobe graphisch dargestellt.

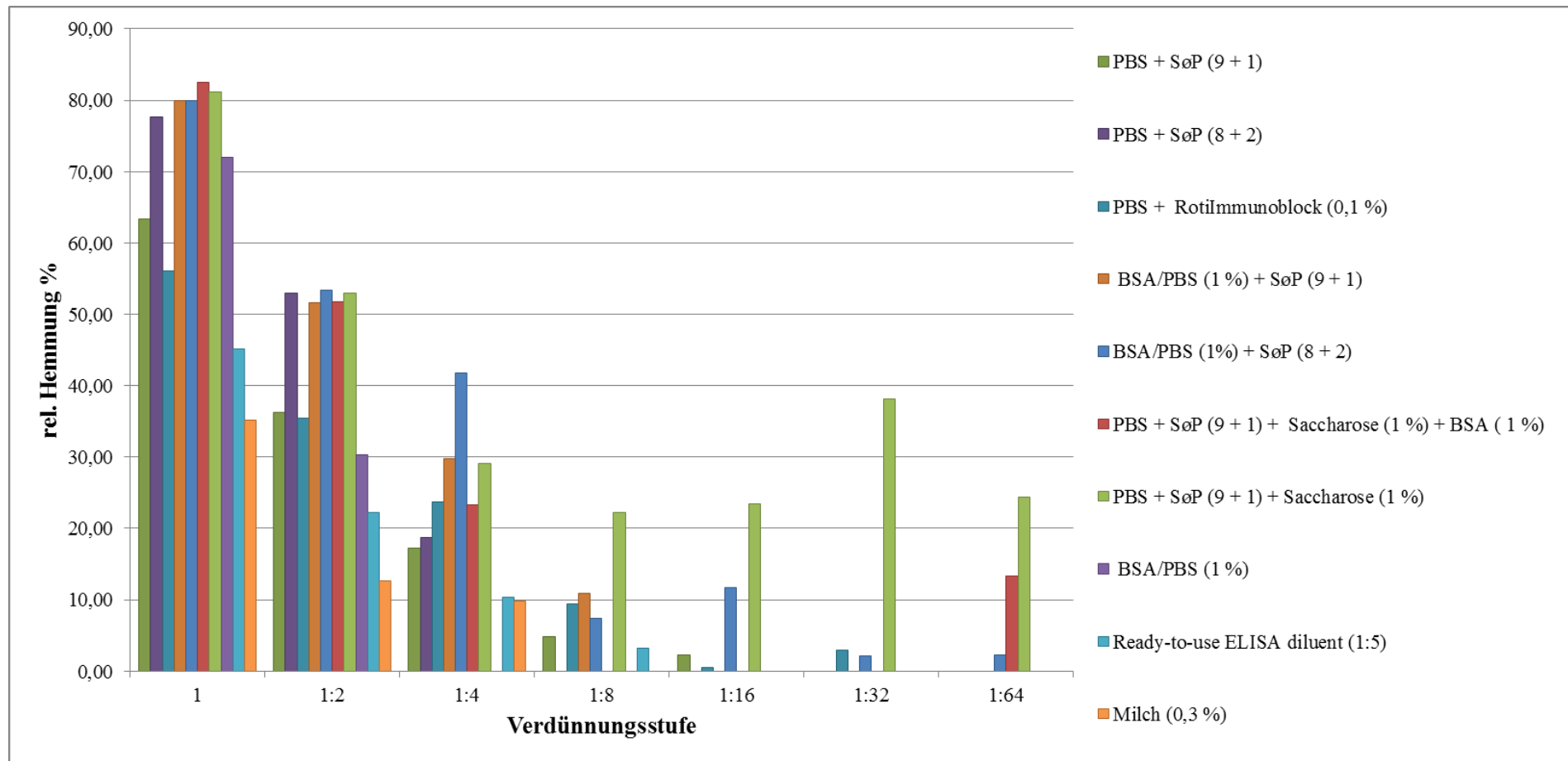


Abbildung 19: Reduktion der durch die Probenmatrix Urin in einem EIA-System verursachten unspezifischen Hemmung durch den Einsatz verschiedener Probenverdünnungspuffer bzw. -lösungen. Exemplarische Darstellung einer Urin-Analyse, die Proben wurden als serielle Verdünnungsreihen in den Ab2-basierten EIA zum Nachweis von T-2/HT-2 Toxin eingesetzt.

Um grundsätzlich eine Beeinflussung des EIAs durch den pH-Wert der Urinproben zu vermeiden, wurden zudem alle Proben standardmäßig mit einem hochmolaren Phosphatpuffer (Sørensenpuffer, SØP; 1 mol/l; pH 7,0) versetzt (100 µl auf 1 ml Probe). Durch Einsatz des Sørensenpuffers und mit Hilfe der Verdünnungslösungen BSA/PBS (1 %) (v/v), dem kommerziell erhältlichen Ready-to-use ELISA diluent von Mabtech bzw. frei verkäuflicher Milch (0,3 %) konnte bei 3 von 4 untersuchten Urinen eine deutliche Reduktion der Probenmatrix-Interferenzen erreicht werden, die relative Hemmung lag bei einer Verdünnungsstufe von 1:4 bei $< 10\%$ (Abbildung 19). Aus Praktikabilitätsgründen wurden für alle weiteren Untersuchungen BSA/PBS (1 %) als geeignetste Verdünnungslösung ausgewählt.

Bei der EIA-Analyse von Urinproben eines Probanden (Proband 1) traten aber auch unter diesen modifizierten Versuchsbedingungen weiterhin Probleme auf (Abbildung 20). Die Untersuchungen wurden über einen Zeitraum von einigen Wochen wiederholt, die Ergebnisse differierten nur marginal. Auffällig bei all diesen Proben war das regelmäßig beobachtete hohe spezifische Uringewicht von $\geq 1,015$.

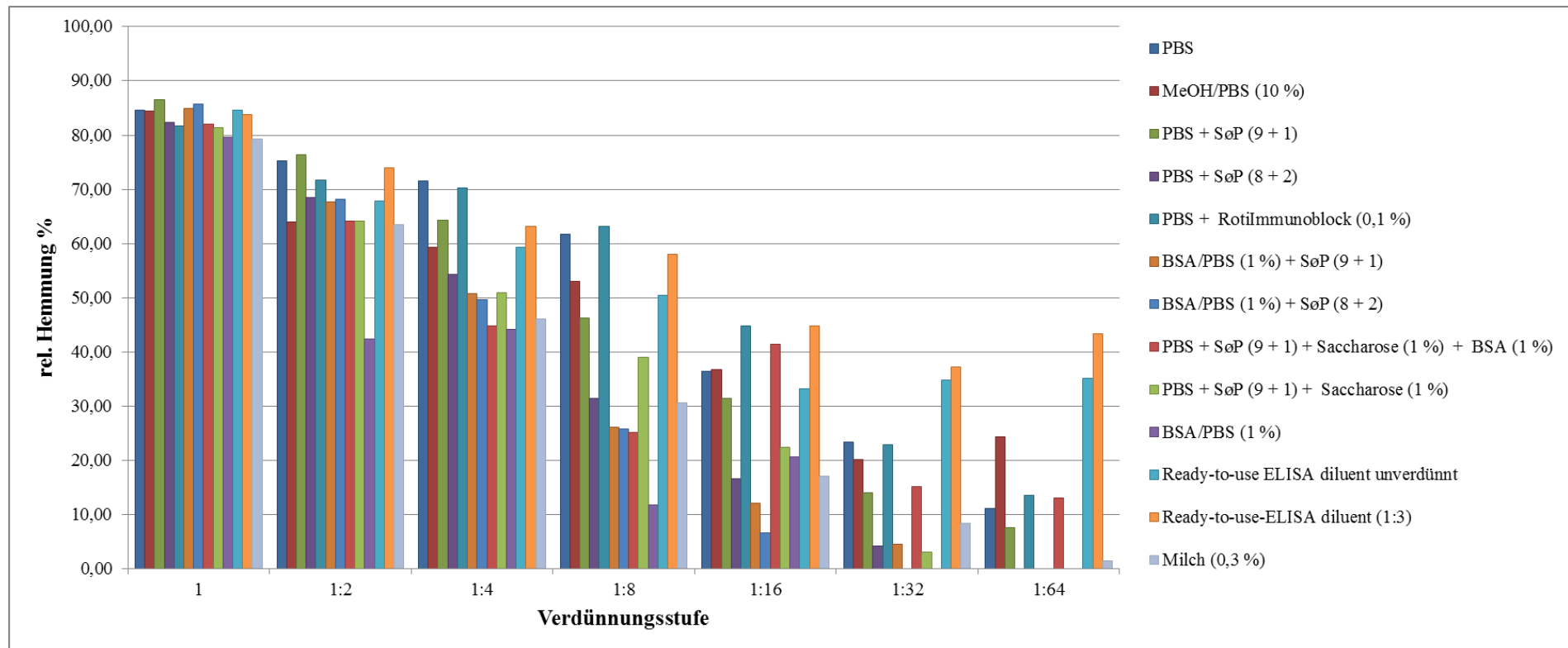


Abbildung 20: Beeinflussung des T-2/HT-2 EIA-Systems durch Urinproben von Proband 1, das spezifische Gewicht der Probe lag bei $\geq 1,015$ (vergleiche Abbildung 19).

Aufgrund des hohen spezifischen Urin-Gewichtes konnte davon ausgegangen werden, dass auch die Harnstoff-Konzentration in diesen Proben deutlich höher als bei den unproblematischen Vergleichsproben lag. Um den Einfluss dieses Faktors auf das EIA-System zu überprüfen, wurden daher Proben mit unterschiedlichen Mengen an Urease-Stammlösung (1 mg/ml) vorbehandelt. Nach Zusatz von 200 µl Urease-Lösung pro ml Urin konnten, wie in Abbildung 21 gezeigt, auch diese Proben konzentrierter in den EIA eingesetzt werden. Bei einer Verdünnungsstufe des Urins von 1:4 in BSA/PBS (1 %) trat ähnlich wie bei den Vergleichsproben nur mehr eine geringe relative Hemmung (8,9 %) auf.

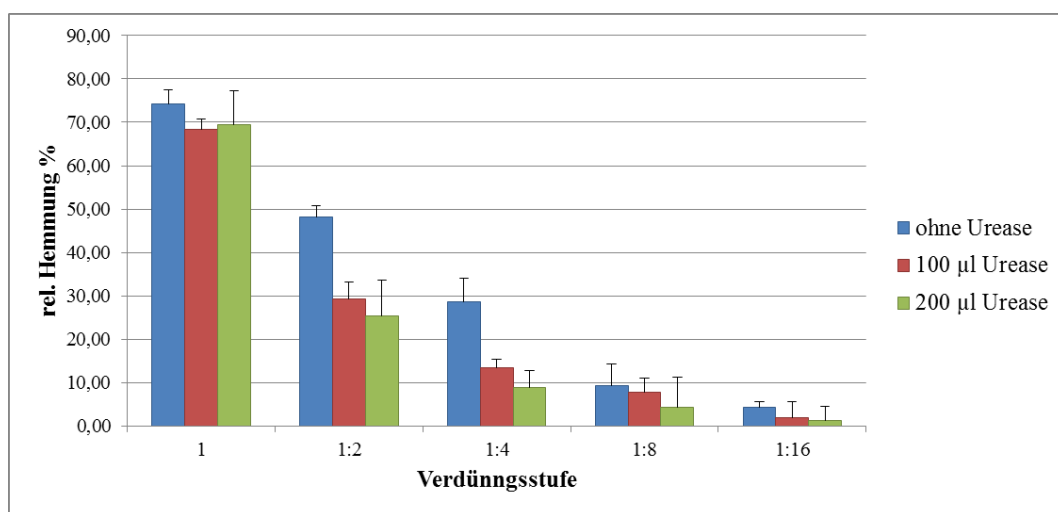


Abbildung 21: Verbesserung der EIA-Kompatibilität von problematischen Urinproben durch Vorbehandlung mit Urease.

3.2. Validierung der Ab2-basierten Testsysteme

Nach der oben beschriebenen Optimierung der Probenvorbehandlung wurden die unter III.2.3.2. beschriebenen optimierten Testverfahren nach den Richtlinien der Community Reference Laboratories Residues (CRLs, 2010) sowie den Kriterien der Entscheidung 2002/657/EG der Kommission als qualitative Screening-Verfahren zum Nachweis von HT-2 bzw. AFM1 in Urinproben validiert.

Die Entscheidung schreibt für die Validierung qualitativer Methoden die Bestimmung der Nachweisgrenze CC β vor. Sie stellt das Nachweisvermögen einer Screeningmethode dar und ist der geringste Gehalt einer Substanz, der mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von $\leq 5\%$ nachgewiesen werden kann. Da es keine Grenzwerte für Aflatoxine bzw. T-2 und HT-2 in menschlichem Urin gibt, wird in diesem Fall das Nachweisvermögen als die geringste Konzentration bei

der mit einer statistischen Sicherheit von $1 - \beta$ eine toxinhaltige Probe als solche mit der entwickelten Methode erkannt wird, definiert (2002/657/EG). Um diesen Wert zu ermitteln, wurden Urinproben mit 0,2 bzw. 0,4 ng/ml AFM₁ und mit 2 ng/ml bzw. 4 ng/ml HT-2 künstlich kontaminiert. Das entspricht bei Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren von 1:2 bzw. 1:4 circa dem IC₅₀ Wert der in dieser Arbeit entwickelten Nachweisverfahren für AFM₁ bzw. HT-2. Für die Validierung wurden über einen Zeitraum von 2 Wochen 20 Leerwert- und 20 künstlich kontaminierte Urinproben in die beiden Nachweissysteme eingesetzt und mit den unter III.2.3.2. beschriebenen Prozedere der jeweilige Fm-Wert sowie der T-Wert berechnet. In Tabelle 15 sind die dabei erhaltenen Werte für die zwei getesteten, verschiedenen Zielkonzentrationen von HT-2 bzw. AFM₁ dargestellt.

Tabelle 15: Validierung der Ab2-basierten EIA-Testsysteme zum Nachweis von HT-2 und AFM₁ in Urinproben entsprechend der CRL-Richtlinien (2010). Die angegebenen Werte repräsentieren die in den EIA-Systemen unter den jeweiligen Bedingungen gemessenen relativen Absorptionswerte (%).

Toxin	Proben- verdünnung	Toxinkon- zentration (ng/ml)	M	Fm- Wert	B	T- Wert	Fm < T
HT-2	1:2	2	38,1 ¹	48,2	80,1	38,8	-
		4	23,1	30,2			✓
	1:4	2	60,4 ¹	72,5	96,6	66,3	-
		4	41,5	46,9			✓
AFM₁	1:2	0,2	45,2 ¹	55	67,7	41,3	-
		0,4	34,7 ²	48,5			-
	1:4	0,2	68,3 ¹	80,5	88,4	68,3	-
		0,4	59,7 ²	75,3			-

¹ ausgewertete Proben n = 10

² ausgewertete Proben n = 9

Im Hinblick auf die für eine erfolgreiche Validierung gestellten Anforderungen, nämlich $Fm < T$, wurden nur für das HT-2 System valide Ergebnisse erhalten. Bei einer Zielkonzentration von 4 ng HT-2 Toxin pro ml lag bei beiden Urin-

Verdünnungsstufen (1:2 bzw. 1:4) der Fm-Wert unter dem B- und unter dem T-Wert, so dass ab dieser Konzentration eine Unterscheidung von toxinhaltigen und toxfreien Proben mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von unter 5 % möglich ist. In Abbildung 22 ist die Validierung des Screening-Verfahrens mit einer Zielkonzentration von 4 ng/ml und einer Urin-Verdünnungsstufe von 1:4 anhand von Punktwolken in Anlehnung an Stolker (2012) dargestellt. Der Cut-Off liegt hier bei einer relativen Absorption von 46,9 %.

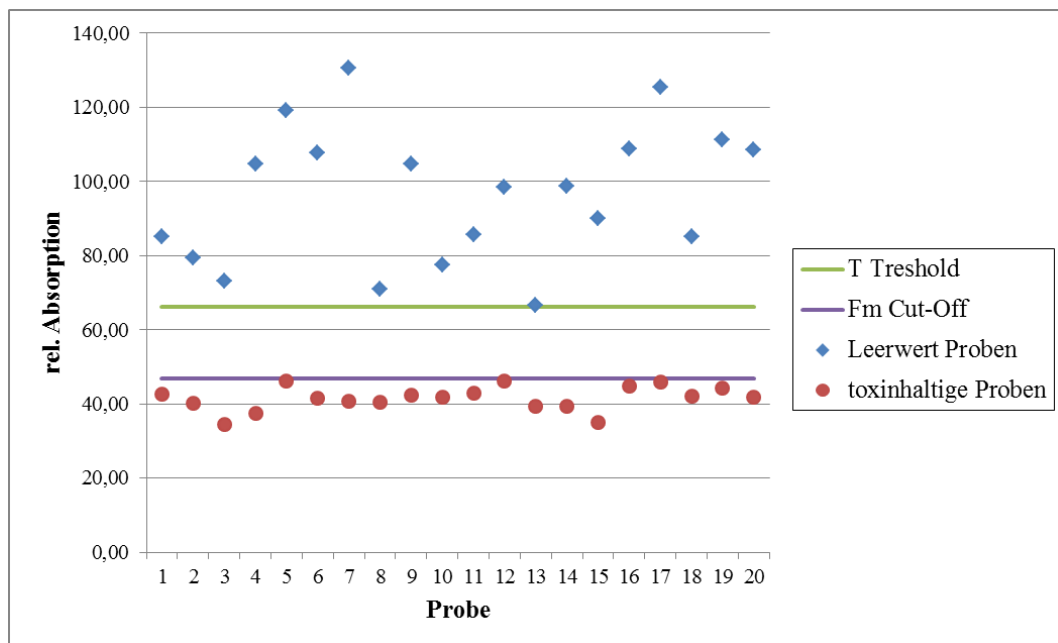


Abbildung 22: Validierung von 20 Leerwert- und 20 künstlich kontaminierten Urinproben (1:4 verdünnt) bei einer Zielkonzentration von 4 ng/ml HT-2 und einer Verdünnungsstufe von 1:4.

Beim Nachweis von AFM₁ ließ sich hingegen bereits nach einer Zwischenauswertung von 10 Proben eine große Schwankung der relativen Absorption der Leerwertproben (1:2 bzw. 1:4 verdünnt) feststellen, die Werte lagen zwischen 51 % und 105 %. Aufgrund dieses großen Schwankungsbereiches war es nicht möglich, geeignete Kennzahlen zu berechnen, der Fm-Wert lag bei beiden Zielkonzentrationen jeweils über dem T-Wert. Das System konnte somit nicht für die überprüfte Zielkonzentration von 0,2 bzw. 0,4 ng AFM₁/ml validiert werden, höhere Zielkonzentrationen wurden nicht überprüft.

V. DISKUSSION

Aufgrund ihrer toxischen Eigenschaften stellen biologische Toxine, zu denen auch die in dieser Arbeit untersuchten Mykotoxine zählen, eine relevante Gefahr für die Gesundheit der zivilen Bevölkerung dar. Um sowohl vorsätzliche Ausbringungsversuche als auch eine natürliche Verbreitung rechtzeitig zu erfassen, wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) ein Forschungsvorhaben mit dem Titel „Sensor-basierte und automatisierte Detektion von hoch- und niedermolekularen biologischen Toxinen (SensTox)“ initiiert (BMBF, 2015). Im Rahmen eines Teilvorhabens dieses Projektes sollten basierend auf antiidiotypischen Antikörpern (Ab2) alternative, immunchemische Verfahren zum Nachweis der niedermolekularen Aflatoxine und T-2 bzw. HT-2 entwickelt werden.

Im Hinblick auf die langfristige Verfügbarkeit der Immunreagenzien und die Nutzung bestehender, etablierter Techniken zur Massenproduktion und Reinigung von Antikörpern wurde angestrebt murine, monoklonale Ab2 herzustellen. Da auch die zugrundeliegenden primären, toxinspezifischen Ab1 im Mausmodell generiert worden waren, war ein wesentlicher Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit, geeignete Immunogene und Ab2-Screeningverfahren zu entwickeln. Letztere dienten dazu, gezielt Ab1-Paratop spezifische Antikörper, sogenannte Ab2 β , in den Seren der immunisierten Tiere bzw. den nach Zellfusion vorhandenen Zellkulturüberständen der Hybridomzellen nachzuweisen, da aufgrund des syngenesischen Ansatzes übliche tierartspezifische Antikörper-Konjugate nicht zur Detektion eingesetzt werden konnten.

Weitere wichtige Aspekte bei der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Neuentwicklung Ab2-basierter Testverfahren zum Nachweis der oben aufgeführten Mykotoxine stellte die Optimierung des Testablaufs, die Überprüfung der grundsätzlichen Testparameter wie Sensitivität und Spezifität sowie die Anwendbarkeit des entwickelten EIAs für Urinalysen dar.

Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurde eine Vielzahl von Arbeiten zur Gewinnung Aflatoxin- bzw. T-2-spezifischer, poly- und monoklonaler, primärer Antikörper publiziert, das analytische Potential von antiidiotypischen Antikörpern im Bereich

der Toxinanalytik stand hingegen bisher kaum im Fokus des Interesses. Neben dem verschiedentlich beschriebenen Einsatz von Ab2 als Surrogat (Hu et al., 2017, Guan et al., 2011) liegt der wesentliche Vorteil darin, dass so auf den Einsatz von Toxin-Proteinkonjugaten verzichtet werden kann. Die Herstellung dieser Toxinkonjugate ist kostspielig, schwierig und sehr aufwendig, die Präparationen sind zum Teil instabil und stellen zudem für den Nutzer eine potentielle toxische Gefährdung dar.

1. Herstellung der Immunogene

Um Ab2 zum Nachweis von Aflatoxinen sowie T-2 und HT-2 in den immunisierten Tieren zu induzieren, wurden - basierend auf entsprechenden Angaben in der Literatur (Raychaudhuri et al., 1986, Vazquez et al., 1998) - die toxinspezifischen Ab1 2D1 und 2A12 an den stark immunogenen Proteinträger KLH gekoppelt. Die Kopplung erfolgte unter Verwendung des Quervernetzungsreagenz Glutaraldehyd, ein Verfahren, das sich bereits bei der Etablierung von Ab2 zum Saxitoxin-Nachweis (Szkola et al., 2014) bewährt hatte. Bei Einsatz dieses laborintern optimierten Kopplungsverfahrens bleibt - wie orientierende Untersuchungen zeigten - die Aktivität der Antikörper weitgehend erhalten, d.h. die für die Induktion von Ab2 β essentielle Struktur des Ab1-Paratops wurde durch die Kopplung nicht beeinträchtigt (Ergebnisse nicht dargestellt).

Grundsätzlich sind in der verfügbaren Literatur zur Induktion von Ab2 in Versuchstieren zwei verschiedene Ansätze beschrieben. Zum einen werden zur Immunisierung, wie in der vorliegenden Arbeit, an Proteinträger gekoppelte Antikörper eingesetzt, wobei sowohl full-length als auch Fab-Fragmente verwendet wurden (Hsu and Chu, 1994, Colja Venturini et al., 2009). Zum anderen werden gereinigte, nicht modifizierte full-length Antikörper (Chu et al., 1995) bzw. unkonjugierte Fab-Fragmente als Immunogene verwendet (Hu et al., 2017).

Letztere Variante ist allerdings in der Regel xenogenen Immunisierungsprotokollen vorbehalten, da aufgrund der erhöhten Immunogenität durch die Spezies-Unterschiede im Gegensatz zum syngenesischen Ansatz auch bei Verwendung von unkonjugierten full-length Antikörpern hohe Antikörper-Titer induziert

werden können (Colja Venturini et al., 2009, Tsuda et al., 1992). Allerdings wiesen Chen et al. (1993) in orientierenden Versuchen zur Induktion von anti-antiidiotypischen Antikörpern (Ab3) unter Einsatz von Kaninchen als Versuchstieren nach, dass eine Kopplung der Antikörper an einen Proteinträger auch im xenogenen Ansatz die Immunogenität deutlich erhöht. Maruyama et al. (2002) schlussfolgerten nach der retrospektiven Auswertung von im Zeitraum von 10 Jahren durchgeführten Versuchen zur Induktion von Ab2, dass prinzipiell in xenogenen Ansätzen mit einer Vielzahl verschiedenster Immunogene erfolgreich Ab2 β induziert werden können.

Aufgrund der bestehenden Selbsttoleranz gegenüber dem konstanten Teil von Immunglobulinen ist im syngenesischen Ansatz bei Immunisierung mit einem full-length mAk nur ein kleiner Anteil (hoch variable Region) immunogen. Eine Erhöhung der Immunogenität kann, wie eingangs erwähnt, durch Kopplung an einen Proteinträger erreicht werden (Colja Venturini et al., 2009). Ein Vergleich der beiden Ansätze findet sich beispielsweise bei Chanh et al. (1990). Bei der Entwicklung von anti-antiidiotypischen (Ab3) Antikörpern gegen T-2 Toxin wurden Versuchstiere sowohl mit einem full-length Antikörper (Ab2) als auch mit einem full-length Antikörper-KLH-Konjugat (Ab2) immunisiert. Deutlich höhere Antikörper-Titer wurden nach Immunisierung mit dem full-length Antikörper-KLH-Konjugat im Vergleich zum unkonjugierten full-length Antikörper erhalten. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Vazquez et al. (1998) bei der Entwicklung monoklonaler antiidiotypischer Antikörper gegen einen für bestimmte Ganglioside spezifischen Ab1 beschrieben. Auch zur institutsinternen Entwicklung von Ab2 gegen Saxitoxin, wurde der toxinspezifische Ab1 an KLH zur Steigerung der Immunogenität gekoppelt (Szkola et al., 2014). Verschiedene Autoren postulierten hingegen, dass nach Spaltung der full-length mAk in Fab-Fragmente und Entfernen des nicht immunogenen konstanten Fc-Teils eine verbesserte Immunantwort im syngenesischen Ansatz erreicht werden kann. Basierend auf einer retrospektiven Auswertung verschiedenster Immunisierungsansätze über einen Zeitraum von 10 Jahren kamen beispielsweise Maruyama et al. (2002) zu dem Schluss, dass F(ab')₂-Ab1 Fragmente gekoppelt an KLH das geeignetste Immunogen in einem syngenesischen Ansatz (Mäuse) darstellen. Nur bei Verwendung solcher Immunogene konnten geeignete, monoklonale Paratop-spezifische Ab2 erhalten werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten hingegen bei allen immunisierten Mäusen mit den eingesetzten full-length Ab1-KLH-Konjugaten Ab2 β induziert werden: ein Beleg zum einen für die ausgeprägte Immunogenität der hergestellten Ab1-Konjugate, zum anderen aber auch dafür, dass durch die eingesetzten schonenden Kopplungsbedingungen das Paratop des Ab1 weitgehend strukturell unversehrt blieb. Dies bestätigte sich auch mittlerweile in weiteren im Lehrstuhl durchgeführten Immunisierungen mit anderen toxinspezifischen Ab1 (R. Dietrich, persönliche Mitteilung).

2. Bewertung der Screening-Ansätze zum Nachweis von Ab2 in polyklonalen Seren

Wie eingangs erwähnt, stellte die Optimierung der Ab2-Screeningverfahren einen wesentlichen Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit dar. Prinzipiell sind zwar verschiedenste Ansätze zum spezifischen Ab2-Nachweis in Seren beschrieben, viele der Verfahren sind allerdings bei syngen Immunisierungsprotokollen nicht einsetzbar.

Xenogene Ansätze bieten den Vorteil, dass tierartspezifische Sekundärantikörper zur Detektion von Ab2 in den Seren der immunisierten Tiere eingesetzt werden können. So wurden beispielsweise von Wang et al. (2016a) bei der Generierung Prolaktin-spezifischer Ab2 Mikrotiterplatten mit polyklonalen Kaninchen Ab1-Fab-Fragmenten beschichtet und anschließend mit murinen Ab2-haltigen Zellkultur-Hybridom-Überständen inkubiert. Gebundene Ab2 konnten einfach durch ein tierartspezifisches Antikörper-Enzymkonjugat (Ziege-anti-Maus-IgG_{FC}-HRP) nachgewiesen werden. Chu et al. (1995) wendeten bei ihrem ebenfalls xenogenen Immunisierungsmodell (murine Antikörper in Kaninchen) eine ähnliche Nachweismethode an, um Ab2 gegen einen Fumonisin B₁-gerichteten Ab1 zu detektieren an, allerdings wurde mit full-length mAk anstelle von Fab-Fragmenten beschichtet. Ähnliche Screening-Ansätze wurden außerdem von verschiedenen weiteren Autoren beschrieben (Lan et al., 2015, Cahill and Rogers, 1999).

Bei dem in der vorliegenden Arbeit realisierten syngen Immunisierungsansatz ist der Nachweis und die Charakterisierung von Ab2 in den Seren allerdings ein

besonders kritischer Punkt, da wie oben beschrieben beim Antiseren-Screening keine gängigen tierartsspezifischen Sekundärantikörper verwendet werden können. Vielmehr müssen deutlich aufwändigere Detektionsmethoden eingesetzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt drei verschiedene Screening-Varianten ausgetestet, um Ab2 spezifisch nachweisen zu können.

Bei Variante 1 wurden Mikrotiterplatten direkt mit den toxinspezifischen Ab1 beschichtet und anschließend die gewonnenen Antiseren in einer Verdünnungsreihe zusammen mit den jeweiligen Mykotoxin-Enzymkonjugaten aufgetragen. Die in den Seren vorhandenen Ab2 konkurrierten somit mit den Toxinkonjugaten um die Bindung im Paratop des Ab1. Mit dieser Screening-Methode ließen sich in den nach der Grundimmunisierung gewonnenen Seren zwar spezifisch Ab2 nachweisen, die Titer bewegten sich allerdings auf einem sehr niedrigen Niveau im Bereich von 1:300-1:800 bzw. 1:200-1:400 (entspricht etwa einer pAk-Konzentration von 12-50 µg/ml). Damit war diese Screening-Variante zwar relativ einfach zu etablieren, allerdings wies sie erhebliche Nachteile im Hinblick auf die Sensitivität und Effizienz des Screenings auf. Diese kompetitive Screeningmethode wurde unter anderem auch von Maragos (2014) und Liu et al. (1996) zum Nachweis von Ab2 gegen Deoxynivalenol (Mykotoxin) bzw. Microcystin-LR (Algantoxin) spezifische Ab1 eingesetzt. Zugrunde lag diesen Untersuchungen jeweils ein xenogener Immunisierungsansatz, ähnlich wie in den eigenen Untersuchungen mussten die Ab2-haltigen Seren in vergleichsweise hohen Konzentrationen von ca. 20 - 50 µg/ml eingesetzt werden, um eine 50 %ige Reduktion der Bindung des Toxinkonjugates an die Ab1 zu erreichen.

Aufgrund der geringen Sensitivität der Screening Variante 1 wurde für die näheren Untersuchungen ein alternatives Screening-Verfahren eingesetzt, das sich in ähnlicher Form bereits bei der institutsinternen Generierung von Ab2 gegen Saxitoxin-spezifische Primärantikörper im syngenesischen Ansatz bewährt (Szkola et al., 2014) hatte. Dazu wurden die Antiseren zunächst auf IgG_{FC}-beschichteten Platten in einer Verdünnungsreihe aufgetragen und anschließend freies Toxin und peroxidase-markierte Ab1-Fab-Fragmente hinzugegeben. Nachteilig war hier allerdings das Auftreten von hohen Hintergrundsignalen, wahrscheinlich bedingt durch eine unvollständige Abtrennung der Fc-Fragmente bei der Protein A-Aufreinigung des Papain-verdauten Antikörpers. Dies legen neuere

Untersuchungen mit anderen mAbs nahe, bei denen durch eine zweimalige Aufreinigung des Fab/Fc-Gemisches über Protein A eine deutliche Reduktion des Background-Signals erreicht werden konnte (R. Dietrich, persönliche Mitteilung). In der vorliegenden Arbeit konnte durch den Zusatz irrelevanter IgG₁ bzw. IgG_{2a} Antikörper zum Ab1-Fab-HRP das Hintergrundrauschen deutlich reduziert werden. Dass durch den Einsatz dieser Screening-Variante Ab2 in den Seren immunisierter Tiere deutlich sensitiver nachzuweisen waren, äußerte sich in den hohen Titern, die mit diesem System bei der Untersuchung der 23 Wochen nach Grundimmunisierung gewonnenen Antiseren erhalten wurden. Die Werte für 2D1 spezifische Ab2 lagen im Bereich von 1:20.000 - 1:100.000, die Titer für 2A12 spezifische Ab2 lagen bei 1:10.000 - 1:40.000. Ein vergleichbarer auf Fab- bzw. Fc-Fragmenten/-Reaktivität beruhender Ansatz wurde von Colja Venturini et al. (2009) beschrieben, wobei diese Autoren Fab-Ab1 Fragmente als Beschichtung einsetzten. Die Bindung von syngen Ab2 an diese Festphase wurde mittels peroxidasemarkierten Ziege-anti-Maus-IgG_{FC}-Konjugaten nachgewiesen.

Da sich allerdings insbesondere beim Nachweis 2A12-spezifischer Ab2 die Background-Problematik auch durch Zusatz irrelevanter, Isotyp-identischer Antikörper nicht völlig lösen ließ, wurde zusätzlich eine dritte Screening-Variante entwickelt. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit IgG Isotyp-spezifischen anti-Maus Antikörpern beschichtet, d.h. im Falle des T-2-spezifischen mAk 2A12 (IgG_{2a}) mit anti-Maus-IgG₁ bzw. -IgG_{2b}. Der weitere Ablauf erfolgte wie bei Variante 2, für den Nachweis Ab1-Paratop spezifischer Antikörper wurden parallel Inhibierungsversuche unter Einsatz von freiem T-2 Toxin durchgeführt. Es zeigte sich eine deutliche Verbesserung der Background-Problematik, das Hintergrundrauschen konnte auf Werte von 0,05 - 0,2 Extinktion reduziert werden. Auch mit diesem System konnten im Vergleich zur Screening-Variante 1 deutlich sensitiver Ab2 nachgewiesen werden, die Titer der 7 Wochen nach Grundimmunisierung gewonnenen Antiseren lagen mit der anti-IgG₁-Beschichtung bei 1:16.000-1:32.000 bzw. bei der anti-IgG_{2b}-Beschichtung bei 1:1.000-1:2.000. Bei den von den immunisierten Tieren produzierten Ab2 handelte es sich also zum Großteil um Antikörper vom IgG₁-Subtyp. Nachteilig bei dieser Form des Antikörper-Screenings ist allerdings, dass zum einen Ab1 Isotyp-analoge Ab2 nicht detektiert werden können, da beispielsweise eine anti-Maus-IgG_{2a} Beschichtung aufgrund desselben Subtyps beim Ab1-Enzym-Konjugat (2A12-Fab-HRP; IgG_{2a}) nicht einsetzbar ist. Zum anderen ist der

Einsatz kommerzieller Subtyp-spezifischer Beschichtungen im Vergleich zu anderen Sekundärantikörpern deutlich kostenintensiver.

3. EIA-Etablierung und Optimierung

Neben der grundsätzlichen Induzierbarkeit von Ab2 und deren Nachweisbarkeit unter syngenem Rahmenbedingungen, war in Hinblick auf die Realisierung Ab2-basierter Nachweisverfahren der relative Anteil Paratop-spezifischer Ab2 β in den Seren der immunisierten Tiere ein wichtiges Kriterium für die Beurteilung des Immunisierungserfolges. Dazu wurden unter kompetitiven EIA-Bedingungen überprüft, inwieweit durch Zugabe von freiem Toxin die Bindung der Ab2 an Ab1 inhibiert werden kann. Bei der Auswertung der jeweiligen Standardkurven war auffällig, dass nach Immunisierung mit 2A12-KLH hauptsächlich Ab2 vom γ -Typ gebildet wurden, selbst bei hohen Toxin-Dosen ließ sich lediglich eine Hemmung von $\leq 20\%$ erzielen. Hingegen konnte nach der Immunisierung mit 2D1-KLH bei den meisten Versuchstieren ein hoher Ab2-Anteil vom Typ β gefunden werden. Allerdings ließ sich auch hier keine vollständige Hemmung erzeugen, die Hintergrundsignale lagen zwischen 20 – 40 %. Trotz dieser v.a. beim Immunogen 2A12-KLH ungünstigen Ausgangslage gelang es sowohl für mAk 2D1 als auch mAk 2A12 jeweils vier Paratop-spezifische antiidiotypische Primärklone zu etablieren, wobei letztlich ein anti-2A12 Klon und zwei anti-2D1 Klone die Kriterien eines Ab2 vom β -Typ erfüllten. Ein Vergleich der mit den Seren bzw. den monoklonalen Ab2 erstellten Standard-Kurven (Abb. 11 bzw. 13 und 14) zeigte eindeutig, dass nur mit monoklonalen Ab2 sensitive Nachweise etabliert werden können, da der auch von anderen Autoren (Maruyama et al., 2002, Colja Venturini et al., 2009) beschriebene und offensichtlich auch bei einem syngenem Ansatz auftretende hohe Anteil von Ab2 γ in den Seren der immunisierten Tiere die Qualität des EIA-Nachweises bei Einsatz polyklonaler Antikörper massiv beeinträchtigt. Beispielsweise wiesen auch die im Jahr 1989 von Chanh et al. generierten polyklonalen antiidiotypischen Kaninchen-Antiseren gegen einen murinen, monoklonalen T-2-spezifischen Ab1 einen hohen Anteil von nicht Ab2- β -Typ Antikörpern auf. Trotz vorheriger Aufreinigung unter Verwendung von Maus Ig-Sepharose 4B Säulen, um den Großteil der antiisotypischen und antiallotypischen Antikörper zu entfernen, ließ sich keine Hemmung der Bindung der antiidiotypischen Antikörper am Ab1 durch freies T-2 Toxin erzielen. Selbst

der Einsatz hoher T-2 Konzentrationen von 200 µg/ml verursachte keine Hemmung.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die Realisierbarkeit direkt mit Ab1 bzw. Ab2 beschichteter EIA-Systeme überprüft, wobei allerdings vor allem bei niedrigen Beschichtungskonzentrationen eine Denaturierung der mAk auftrat, die sich auch in einer massiven Abnahme der Signalintensität äußerte. Zur Stabilisierung des EIA-Systems wurde daher BSA zum Fangantikörper hinzugegeben. Der positive Einfluss von BSA-Zusätzen auf die Stabilität von Antikörper-Enzymkonjugaten ist seit langem bekannt (Sakaki et al., 1999, Ishikawa et al., 1987), der Einsatz von niedrigen BSA-Konzentrationen bei der Beschichtung von Mikrotiterplatten mit Antikörpern ist hingegen unüblich.

4. Sensitivität und Spezifität Ab2-basierter EIA-Systeme

Nachdem die Antikörper-Stabilitätsprobleme durch den Zusatz von BSA gelöst werden konnten, wurde überprüft, welches der möglichen Ab2-basierten EIA-Systeme die höchste Sensitivität aufweist, und ob im Vergleich zu den klassischen, auf Toxin-Proteinkonjugaten basierenden EIAs Unterschiede bestehen. Bei den Ab2-basierten Immunoassays wurde neben den auf Sekundärantikörper-Beschichtungen und Ab1-Fab-Enzym-Konjugaten basierenden, ursprünglichen Systemen auch die oben beschriebenen EIAs evaluiert, wobei die zum Aflatoxin bzw. T-2-Toxin Nachweis eingesetzten Antikörperpärchen (Ab1 2D1 bzw. 2A12 und Ab2 1G10 bzw. 1D6) alternierend als Fang- bzw. Detektionsantikörper eingesetzt wurden. Interessanterweise erwies sich sowohl beim Aflatoxin-spezifischen Nachweis als auch beim Nachweis von T-2 das Format, bei dem Ab1 als Fangantikörper und enzymmarkierte Ab2 als Detektionsantikörper fungierten, als die sensitivste Variante. In diesem System konkurrieren Ab2 und freies Toxin direkt um die immobilisierten Ab1-Bindungsstellen. Bei Ab2 beschichteten EIAs könnte eventuell eine Steigerung der Testsensitivität erreicht werden, indem Ab1 mit dem Toxin vorinkubiert wird und der Ansatz nur kurz mit den Ab2 zusammengebracht wird. Diese Variante wurde allerdings nicht überprüft. Grundsätzlich wurde interessanterweise durch den Einsatz von Ab2 bei beiden Toxinen im Vergleich zu den klassischen EIAs eine signifikante Verbesserung der Testsensitivität um jeweils etwa Faktor 2 erzielt. Die IC₅₀-Dosis des klassischen EIA-Systems lag für AFM₁ bei 233 pg/ml,

beim antiidiotypischen EIA hingegen bei 104 pg/ml. Für T-2 lag der IC_{50} -Wert im klassischen EIA-System bei 1042 pg/ml und beim Ab2-basierten System bei 561 pg/ml. Die Sensitivität kompetitiver EIAs wird grundsätzlich determiniert durch die Affinitäten des toxinspezifischen Antikörpers für freies bzw. markiertes Toxin. Da zur Generierung der Antikörper Toxin-Proteinkonjugate eingesetzt werden, liegt es in der Natur der Sache, dass die Affinität des Antikörpers für markiertes Toxin in der Regel deutlich höher liegt als für freies Toxin, mit entsprechend negativen Auswirkungen für die Testempfindlichkeit (Märtlbauer, 1993). Durch den Einsatz von Ab2 ändert sich aber diese grundlegende Konstellation, d.h. die Sensitivität des Testsystems wird neben der Affinität des Ab1 für freies Toxin auch durch die Affinität des Ab2 zum Ab1-Paratop bestimmt. Liegen die beiden Affinitäten in einem engeren Bereich als die des Ab1 für freies vs. markiertes Toxin, ist theoretisch eine Sensitivitätssteigerung, wie sie in der vorliegenden Arbeit erreicht wurde, möglich. Eine deutliche Steigerung der Testsensitivität um bis zu Faktor 18 durch den Einsatz von Ab2 wurde auch von (Qiu et al., 2015) berichtet, der zugrundeliegende IC_{50} -Wert (163,7 ng/ml) des klassischen EIA-Systems zum Nachweis des Mykotoxins Deoxynivalenol, entsprach allerdings nicht dem derzeitigen Stand der Technik. Gängige, kommerzielle Deoxynivalenol-spezifische EIAs weisen in der Regel Nachweisgrenzen im Bereich von 1-3 ng/ml auf. Ähnliche Ergebnisse wurden von der gleichen Arbeitsgruppe für ein weiteres Mykotoxin, nämlich Citrinin erhalten (Xu et al., 2015), die Ab2-induzierte Steigerung der Testsensitivität lag hier bei etwa Faktor 2.

Im Gegensatz hierzu wurde vor allem in älteren Arbeiten bei Verwendung von polyklonalen Ab2 eine deutliche Verschlechterung der Testsensitivität beobachtet. In dem von Hsu und Chu im Jahr 1994 entwickelten, direkten, kompetitiven auf polyklonalen Ab2-basierten Testsystem konnte lediglich ein IC_{50} -Wert von 1,16 µg/ml AFB₁ erzielt werden. Ein Grund für diese geringe Testsensitivität könnte hierbei unter anderem in einem hohen Ab2γ-Anteil in den Seren der immunisierten Tiere liegen. Aber auch bei Einsatz rekombinanter Ab2-V_{HH}-Antikörper traten zum Teil unerwünschte Effekte auf. So generierten Wang et al. (2013) durch Immunisierung eines Alpakas mit dem von Zhang et al. (2009) beschriebenen, monoklonalen Antikörper antiidiotypische V_{HH}-Antikörper. Der IC_{50} -Wert lag im V_{HH}-basierten EIA bei 160 pg/ml, dies stellt im Vergleich zu der von Zhang et al. (2009) im klassischen EIA erreichten, postulierten IC_{50} -Dosis

von 1,2 pg/ml einen massiven Sensitivitätsverlust dar. Dabei ist allerdings fraglich, ob die postulierte IC_{50} -Dosis von Zhang et al. tatsächlich 1,2 pg/ml betrug, liegt dieser Wert doch um Faktor 50 - 100 unter den Angaben anderer Autoren zur Sensitivität von konventionellen, auf Toxinkonjugaten basierenden, Aflatoxin-spezifischen EIAs (Dietrich et al., 1995, Li et al., 2009b, Liu et al., 2016).

Bisher wurden antiidiotypische Antikörper gegen T-2-Toxin-spezifische Ab1 lediglich von Chanh et al. entwickelt (Chanh et al., 1989, Chanh et al., 1990). Hierbei wurden ebenfalls zwei EIA-Formate basierend auf einer Ab2- bzw. Ab1-Beschichtung überprüft. Im Gegensatz zu den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit, in der das auf der Ab1 Beschichtung basierende EIA-Format deutlich sensitiver war, erwies sich in diesen Untersuchungen die auf der Ab2-Beschichtung-basierende Variante als die sensitivere. Die Autoren führten dies darauf zurück, dass die vorherige Inkubation von T-2 und dem Ab1 positive Effekte auf die Testsensitivität haben könnte.

Bei der vergleichenden Untersuchung der Spezifität der Ab2-basierten EIA zu den klassischen Systemen konnten in der vorliegenden Arbeit keine grundlegenden Änderungen beobachtet werden. Die relativen Kreuzreaktionen im Ab2-basierten EIA lagen beispielsweise für AFB₁ bei 90,5 %, im klassischen System bei 88,1 %. Tendenziell etwas geringere Konzentrationen wurden für AFG₁ und Aflatoxinol ermittelt (42,8 % vs. 67,2 % bzw. 13,5 % vs. 22,9 %). Diese Unterschiede sind jedoch nicht als signifikant anzusehen. Auch beim Nachweis von Typ A Trichothecenen wurden mit dem klassischen System vergleichbare Werte für die relativen Kreuzreaktivitäten erhalten. HT-2 zeigte eine Kreuzreaktion von 38 % (klassischer EIA 41,8 %), zudem konnten wie im klassischen System keine relative Kreuzreaktivität zu T-2-Tetraol und lediglich eine sehr geringe relative Kreuzreaktivität von 0,22 % zu T-2-Triol nachgewiesen werden. Durch die Implementierung der Ab2 ist es somit einerseits gelungen die Sensitivität im Vergleich zu den klassischen EIAs zu erhöhen sowie die breite Spezifität zu erhalten und andererseits EIA-Systeme zu entwickeln, die ohne den Einsatz von potentiell toxischen Toxinkonjugaten auskommen.

5. Nachweis von HT-2 Toxin in Urin

Aufgrund einer in früheren Arbeiten am Lehrstuhl beobachteten Anfälligkeit des mAk 2A12 gegenüber Matrixeffekten konzentrierten sich die Vorversuche zur Anwendbarkeit der entwickelten EIAs auf dieses Testverfahren. Die Probenvorbereitung orientierte sich hierbei an dem von Hooper et al. (2009) bzw. Feng et al. (2013) beschriebenen Ansatz. Die Proben wurden zunächst unter Verwendung von Urinanalysestreifen auf zehn verschiedene Parameter hin untersucht, anschließend zentrifugiert und mittels pH-Meter der genaue pH-Wert ermittelt.

Bei Untersuchung der so vorbereiteten Proben traten jedoch vor allem im Vergleich zu einem synthetischem Human-Urin-Imitat massive Matrixeffekte im EIA auf. Insgesamt zeigte unverdünnter Probanden-Urin eine deutlich höhere unspezifische Hemmung als der synthetische Urin (87 % bzw. 8,8 % relative Hemmung). Im Gegensatz hierzu wird in vielen Publikationen im rückstandsanalytischen Bereich propagiert, dass eine simple Verdünnung des Urins (üblicherweise 1:10 in PBS) ausreichend sei, um eventuelle EIA-Matrixeffekte zu eliminieren (Hooper et al., 2009, Vasylieva et al., 2015, Zhang et al., 2017). Allerdings ist es zumindest bei einigen dieser Publikationen fraglich, ob die Testsysteme tatsächlich ausreichend validiert wurden, insbesondere die Anzahl der real untersuchten Leerwert-Proben ist oft fraglich (Vasylieva et al., 2015, Zhang et al., 2017). Lediglich Hooper et al. (2009) weisen explizit daraufhin, dass die Validierung eines direkten kompetitiven EIA zum Nachweis makrozyklischer Trichothecene nach den Vorgaben des Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS) erfolgte, dies bedingt die 20-fache Untersuchung von Leerwert bzw. künstlich kontaminierten Proben.

Dass die Probenmatrix Urin im EIA Probleme verursachen kann, wurde dagegen auch von Shan et al. (2004) postuliert. Die Forschergruppe entwickelte einen indirekten kompetitiven Immunoassay zum Nachweis von Pyrethroid-Metaboliten in menschlichem Urin und untersuchte die Matrixeffekte anhand von Phenoxybenzoesäure-Standardkurven verdünnt in unterschiedlichen Urin-Puffer-Konzentrationen. Bereits bei einem Anteil von 10 % Urin zeigten sich Abweichungen der Standardkurven. Insgesamt kamen die Autoren zu dem Schluss, dass eine Verdünnung der Urinproben von 1:50 vor dem Einsetzen in den generierten ELISA nötig sei.

Eine deutliche Verbesserung der Probenmatrix-Problematik konnte in den eigenen Untersuchungen durch den Einsatz von Sørensenpuffer sowie BSA/PBS (1 %) als Verdünnungslösung erreicht werden. Dadurch ließ sich die relative Hemmung deutlich reduzieren, bei Urin-Verdünnungen von 1:4 lagen die Werte bei $< 10 \%$. Allerdings zeigten sich bei Urinproben eines Probanden weiterhin hohe Matrixeffekte und ein hohes spezifisches Gewicht des Urins von ≥ 1.015 , weshalb im weiteren Verlauf die Urinproben zusätzlich mit dem Enzym Urease versetzt wurden. Durch den Zusatz der Urease bei gleichzeitigem Einsatz von hochmolarem Sørensenpuffer und BSA/PBS (1 %) als Verdünnungslösung, ließ sich die relative Hemmung auch bei diesem Probanden auf Werte von $< 10 \%$ reduzieren. Ähnliche Ansätze zur Aufarbeitung von Urinproben von anderen Autoren konnten in einer Literaturrecherche nicht gefunden werden.

Letztlich ließ sich so das Testsystem zum Nachweis von HT-2 bei einer Zielkonzentration von 4 ng/ml nach den Richtlinien der Community Reference Laboratories Residues (CRLs, 2010) bzw. den Kriterien der Entscheidung 2002/657/EG der Kommission als qualitatives Screening-Verfahren validieren. Beim AFM₁-Nachweissystem zeigte sich hingegen ein großer Schwankungsbereich der relativen Absorptionswerte der Leerwertproben. In wieweit diese Schwankungen auf eine natürliche Kontamination der Proben mit Aflatoxinen zurückzuführen sind, muss in weiteren Studien geklärt werden.

Zusammenfassend konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit in einem syngenem Ansatz erfolgreich antiidiotypische Antikörper vom β -Typ gegen Mykotoxin-spezifische murine mAk entwickelt werden. Der Einsatz dieser Ab2 zur Etablierung von EIA-Systemen resultierte in einer deutlichen Verbesserung der Testsensitivität im Vergleich zu den klassischen, auf Toxinkonjugaten basierenden Immunoassays. Die hochsensitiven Nachweisverfahren wurden für die Analyse von Urinproben validiert, könnten aber auch im Bereich der Lebensmittelanalytik mittelfristig Toxin-basierte EIA-Systeme ablösen. Ein besonderes Potential liegt hierbei vor allem bei der Entwicklung von laborunabhängigen, kostengünstigen Schnelltests, da durch die Verfügbarkeit von Ab2 auf die zeit- und kostenintensive Synthese von Toxin-Proteinkonjugaten verzichtet werden kann.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung und Etablierung enzymimmunologischer Methoden zum Nachweis von Aflatoxinen (AF), T-2 Toxin und HT-2 Toxin sowie der Anwendbarkeit dieser Testverfahren zum Nachweis von Toxinen in menschlichem Urin.

Mit Hilfe der Glutaraldehydmethode wurden bereits zuvor am Lehrstuhl etablierte, monoklonale, toxinspezifische Antikörper (Ab1) 2D1 (Aflatoxinspezifisch) bzw. 2A12 (T-2/HT-2 Toxin spezifisch) an einen Proteinträger (keyhole limpet hemocyanin) gekoppelt und zur Immunisierung von Mäusen im syngenesischen Ansatz verwendet. Mit Hilfe optimierter Screening-Varianten konnten bei allen immunisierten Tieren antiidiotypische, spezifische Antikörper (Ab2) gegen die jeweiligen Ab1 nachgewiesen werden, wobei der Anteil Ab1-Paratop-spezifischer Ab2 vom β -Typ in den Seren eine hohe Schwankungsbreite zeigte. Nach Zellfusion konnten letztlich für beide Ab1 spezifische, monoklonale Ab2 β gewonnen und entsprechende rein Antikörper-basierte EIA-Nachweisverfahren etabliert werden. Anstelle der zunächst auf Fc- bzw. Isotyp-spezifischen Sekundärantikörper-Beschichtungen und Ab1-Fab-Fragment-Konjugaten basierenden Testsysteme wurden im weiteren Verlauf für beide Toxine direkt beschichtete EIA-Formate entwickelt, wobei sich die EIA-Formate, bei denen Ab1 als Fang- und Ab2 als Detektionsantikörper eingesetzt wurden, als sensitivste Varianten erwiesen.

Die Nachweisgrenzen lagen bei 26,8 pg/ml für Aflatoxin M₁ bzw. 147 pg/ml für T-2 Toxin. Durch den Einsatz von Strukturanaloga konnte die breite Reaktivität der EIAs mit anderen Toxinen aus der jeweiligen Stoffgruppe gezeigt werden. Hohe Kreuzreaktionen wurden insbesondere mit AFB₁ (90,5 %), AFG₁ (42,8 %) und Aflatoxicol (13,5 %) bzw. mit HT-2 (38,0 %) ermittelt.

Zur Untersuchung der Anwendbarkeit der entwickelten Testsysteme wurden Urinproben freiwilliger Probanden mit HT-2 Toxin künstlich kontaminiert. Durch Analyse von 20 toxinfreien und 20 toxinhaltigen (künstlich kontaminierten) Proben konnte der Ab2-basierte EIA zum Nachweis von HT-2 Toxin erfolgreich nach den Richtlinien der Community Reference Laboratories Residues (CRLs, 2010) validiert werden.

VII. SUMMARY

This thesis describes the development and establishment of enzyme immunoassays for the detection of aflatoxins, T-2 toxin and HT-2 toxin as well as the applicability of these test procedures for the detection of toxins in human urine.

By using glutaraldehyde, previously established, monoclonal, toxin specific antibodies (Ab1) 2D1 (aflatoxin specific) and 2A12 (T-2/HT-2 toxin specific) were coupled to a protein carrier (keyhole limpet hemocyanin) and used for immunization of mice in a syngeneic approach. By using optimized screening procedures, antiidiotypic specific antibodies (Ab2) against the respective Ab1 could be found in the sera of all immunized animals. However, a high variability was observed regarding the relative proportion of Ab2 β reacting specific with the Ab1-paratope.

After cell fusion, specific monoclonal Ab2 β could be finally obtained for both Ab1, which were used for the establishment of EIA detection methods. Hereby, the original EIA formats, in which Fc-isotype specific secondary antibodies and labelled Ab1 Fab-fragments have been implemented, were replaced by directly coated EIA systems. With respect to assay sensitivity, best results were obtained when Ab1 was used as capture and Ab2 as detection antibody.

The detection limits of the optimized assays were 26.8 pg/ml aflatoxin M₁ and 147 pg/ml T-2 toxin. By using structural analogues the broad reactivity of the EIAs with other toxins from the respective substance groups could be demonstrated. High cross-reactions were determined in particular for aflatoxin B₁ (90.5 %), aflatoxin G₁ (42.8 %), as well as aflatoxicol (13.5 %) and for HT-2 toxin (38.0 %).

To investigate the applicability of the developed assays, urine samples of voluntary test persons were artificially contaminated with HT-2 toxin. By analyzing 20 toxin free and 20 toxin containing (spiked) samples the Ab2-based EIA for the detection of HT-2 toxin was successfully validated according to the guidelines of the Community Reference Laboratories Residues (CRLs, 2010).

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

ABBAS, H. K., WILKINSON, J. R., ZABLOTOWICZ, R. M., ACCINELLI, C., ABEL, C. A., BRUNS, H. A. & WEAVER, M. A. 2009. Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. *Toxin Reviews*, 28, 142-153.

ABIA, W. A., WARTH, B., SULYOK, M., KRSKA, R., TCHANA, A., NJOBEH, P. B., TURNER, P. C., KOUANFACK, C., EYONGETAH, M., DUTTON, M. & MOUNDIPA, P. F. 2013. Bio-monitoring of mycotoxin exposure in Cameroon using a urinary multi-biomarker approach. *Food and Chemical Toxicology*, 62, 927-934.

ADHIKARI, M., NEGI, B., KAUSHIK, N., ADHIKARI, A., AL-KHEDHAIRY, A. A., KAUSHIK, N. K. & CHOI, E. H. 2017. T-2 mycotoxin: toxicological effects and decontamination strategies. *Oncotarget*, 8, 33933-33952.

AHN, J., KIM, D., KIM, H. & JAHNG, K. Y. 2010. Quantitative determination of mycotoxins in urine by LC-MS/MS. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 27, 1674-1682.

ALSHANNAQ, A. & YU, J. H. 2017. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in Food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14, 1-20.

AYDIN, S. 2015. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4-15.

BARNA-VETRO, I., GYONGYOSI, A. & SOLTÍ, L. 1994. Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay of *Fusarium* T-2 and zearalenone toxins in cereals. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 729-731.

BENNETT, J. W. & KLICH, M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 497-516.

BLOUNT, W. P. 1961. Turkey "X" disease. *Turkeys*, 9, 52-61.

BONA, C. & MORAN, T. 1985. Idiotypic vaccines. *Annales De L' Institut Pasteur/Immunology*, C136, 299-312.

BONA, C. A., FINLEY, S., WATERS, S. & KUNKEL, H. G. 1982. Anti-immunoglobulin antibodies. III. Properties of sequential anti-idiotypic antibodies to heterologous anti-gamma globulins. Detection of reactivity of anti-idiotypic antibodies with epitopes of Fc fragments (homobodies) and with epitopes and idiotopes (epibodies). *Journal of Experimental Medicine*, 156, 986-999.

BUNDESMINISTERIUM FÜR BILDUNG UND FORSCHUNG (BMBF) 2015. Sensor-basierte und automatisierte Detektion von hoch- und niedermolekularen biologischen Toxinen (SensTox). https://www.sifo.de/files/Projektumriss_SensTox.pdf (abgerufen am 19.10.2018).

CAHILL, C. M. & ROGERS, J. T. 1999. Anti-idiotypic sera against monoclonal antiporcine growth hormone antibodies: production in rabbits and characterization of specificity. *Journal of Immunoassay*, 20, 45-55.

CERVINO, C., KNOPP, D., WELLER, M. G. & NIESSNER, R. 2007. Novel aflatoxin derivatives and protein conjugates. *Molecules*, 12, 641-653.

CERVINO, C., WEBER, E., KNOPP, D. & NIESSNER, R. 2008. Comparison of hybridoma screening methods for the efficient detection of high-affinity hapten-specific monoclonal antibodies. *Journal of Immunological Methods*, 329, 184-193.

CHANH, T. C., HUOT, R. I., SCHICK, M. R. & HEWETSON, J. F. 1989. Anti-idiotypic antibodies against a monoclonal antibody specific for the trichothecene

mycotoxin T-2. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 100, 201-207.

CHANH, T. C., KENNEDY, R. C. & HEWETSON, J. F. 1992. Anti-idiotypic vaccines in toxicology. *International Journal of Clinical and Laboratory Research*, 22, 28-35.

CHANH, T. C., RAPPOCCIOLO, G. & HEWETSON, J. F. 1990. Monoclonal anti-idiotypic induces protection against the cytotoxicity of the trichothecene mycotoxin T-2. *The Journal of Immunology*, 144, 4721-4728.

CHANH, T. C., SIWAK, E. B. & HEWETSON, J. F. 1991. Anti-idiotypic-based vaccines against biological toxins. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 108, 183-193.

CHEN, Z. J., YANG, H., LIU, C. C., HIRAI, S. & FERRONE, S. 1993. Modulation by adjuvants and carriers of the immunogenicity in xenogeneic hosts of mouse anti-idiotypic monoclonal antibody MK2-23, an internal image of human high molecular weight-melanoma associated antigen. *Cancer Research*, 53, 112-119.

CHU, F. S., GROSSMAN, S., WEI, R. D. & MIROCHA, C. J. 1979. Production of antibody against T-2 toxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 37, 104-108.

CHU, F. S., HUANG, X. & MARAGOS, C. M. 1995. Production and characterization of anti-idiotypic and anti-anti-idiotypic antibodies against fumonisin B₁. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 261-267.

CIEGLER, A. 1986. Mycotoxins: a new class of chemical weapons. *Nuclear, Biological, Chemical Defense and Technology, International*, 1, 52-57 (zitiert nach Bennett, J. W. & Klich, M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 497-516).

COLJA VENTURINI, A., BRESJANAC, M., VRANAC, T., KOREN, S., NARAT, M., POPOVIC, M. & CURIN SERBEC, V. 2009. Anti-idiotypic antibodies: a new approach in prion research. *BMC Immunology*, 10, 1-14.

COMMUNITY REFERENCE LABORATORIES RESIDUES (CRLs) 2010. Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer). https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs_vet-med-residues_guideline_validation_screening_en.pdf (abgerufen am 15.08.2018).

CREPPY, E. E. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127, 19-28.

CUNDLIFFE, E., CANNON, M. & DAVIES, J. 1974. Mechanism of inhibition of eucaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71, 30-34.

DARWISH, I. A. 2006. Immunoassay methods and their applications in pharmaceutical analysis: basic methodology and recent advances. *International Journal of Biomedical Science*, 2, 217-235.

DEVI, K. T., MAYO, M. A., REDDY, K. L. N., DELFOSSE, P., REDDY, G., REDDY, S. V. & REDDY, D. V. R. 1999. Production and characterization of monoclonal antibodies for aflatoxin B₁. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 284-288.

DIETRICH, R., SCHNEIDER, S., USLEBER, E. & MÄRTLBAUER, E. 1995. Use of monoclonal antibodies for the analysis of mycotoxins. *Natural Toxins*, 3, 288-293.

DOHNAL, V., JEZKOVA, A., JUN, D. & KUCA, K. 2008. Metabolic pathways of T-2 toxin. *Current Drug Metabolism*, 9, 77-82.

DUTTON, M. F. 1988. Enzymes and aflatoxin biosynthesis. *Microbiological Reviews*, 52, 274-295.

EDIAGE, E. N., DI MAVUNGU, J. D., SONG, S., WU, A., VAN PETEGHEM, C. & DE SAEGER, S. 2012. A direct assessment of mycotoxin biomarkers in human urine samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 741, 58-69.

EFSA PANEL ON CONTAMINANTS IN THE FOOD CHAIN (CONTAM) 2011. Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxin in food and feed. *EFSA Journal*, 9, 1-187.

EFSA PANEL ON CONTAMINANTS IN THE FOOD CHAIN (CONTAM) 2017. Appropriateness to set a group health based guidance value for T-2 and HT-2 toxin and its modified forms. *EFSA Journal*, 15, 1-53.

EGER, C., SIEBERT, N., SEIDEL, D., ZUMPE, M., JUTTNER, M., BRANDT, S., MULLER, H. P. & LODE, H. N. 2016. Generation and characterization of a human/mouse chimeric GD2-mimicking anti-idiotypic antibody ganglidiximab for active immunotherapy against neuroblastoma. *Plos One*, 1-19.

ELLISON, R. A. & KOTSONIS, F. N. 1974. In vitro metabolism of T-2 toxin. *Applied Microbiology*, 27, 423-424.

EMPFEHLUNG DER KOMMISSION vom 27. März 2013 über das Vorhandensein der Toxine T-2 und HT-2 in Getreiden und Getreideerzeugnissen (2013/165/EU). *Amtsblatt* 91, 03.04.2013, 12-15.

ENGVAL, E. & PERLMANN, P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8, 871-874.

ENTSCHEIDUNG DER KOMMISSION vom 12. August 2003 zur Umsetzung der

Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen (2002/657/EG). *Amtblatt L 221*, 17.08.2002, 8-36.

ERIKSEN, G. S. & ALEXANDER, J. (eds.) 1998a. *Fusarium* toxins in cereals - a risk assesment. Copenhagen: *Nordic Council of Ministers, ThermaNord 1998:502*, 14-15.

ERIKSEN, G. S. & ALEXANDER, J. (eds.) 1998b. *Fusarium* toxins in cereals - a risk assessment. Copenhagen: *Nordic Council of Ministers, ThermaNord 1998:502*, 16-19.

ERLANGER, B. F. 1980. The preparation of antigenic hapten-carrier conjugates: a survey. *Methods in Enzymology*, 70, 85-104.

EZEKIEL, C. N., WARTH, B., OGARA, I. M., ABIA, W. A., EZEKIEL, V. C., ATEHNKENG, J., SULYOK, M., TURNER, P. C., TAYO, G. O., KRSKA, R. & BANDYOPADHYAY, R. 2014. Mycotoxin exposure in rural residents in northern Nigeria: a pilot study using multi-urinary biomarkers. *Environment International*, 66, 138-145.

FENG, X. L., LU, S. Y., LIU, D., LI, L., WU, X. Z., SONG, J., HU, P., LI, Y. S., TANG, F., LI, Z. H., WANG, G. M., ZHOU, Y., LIU, Z. S. & REN, H. L. 2013. Direct competitive immunosorbent assay for detection of MEHP in human urine. *Chemosphere*, 92, 150-155.

GAN, S. D. & PATEL, K. R. 2013. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Investigative Dermatology*, 133, 1-3.

GERDING, J., ALI, N., SCHWARTZBORD, J., CRAMER, B., BROWN, D. L., DEGEN, G. H. & HUMPF, H. U. 2015. A comparative study of the human urinary mycotoxin excretion patterns in Bangladesh, Germany, and Haiti using a rapid and sensitive LC-MS/MS approach. *Mycotoxin Research*, 31, 127-136.

GERDING, J., CRAMER, B. & HUMPF, H. U. 2014. Determination of mycotoxin exposure in Germany using an LC-MS/MS multibiomarker approach. *Molecular Nutrition and Food Research*, 58, 2358-2368.

GLENN, A. E. 2007. Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, 137, 213-240.

GROL, M. & SCHULZE, M. 1990. Immunoassays für lösliche Antigene: Ein Überblick. In: PETERS, J. H. & BAUMGARTEN, H. (eds.) Monoklonale Antikörper Herstellung und Charakterisierung. 2. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong: Springer-Verlag, 321-329.

GROOPMAN, J. D., WOGAN, G. N., ROEBUCK, B. D. & KENSLER, T. W. 1994. Molecular biomarkers for aflatoxins and their application to human cancer prevention. *Cancer Research*, 54, 1907-1911.

GUAN, D., LI, P., CUI, Y., ZHANG, Q. & ZHANG, W. 2011. A competitive immunoassay with a surrogate calibrator curve for aflatoxin M₁ in milk. *Analytica Chimica Acta*, 703, 64-69.

HACK, R., MÄRTLBAUER, E. & TERPLAN, G. 1989. A monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for the detection of T-2 toxin at picogram levels. *Letters in Applied Microbiology*, 9, 133-135.

HASTINGS, K. L., TULIS, J. J. & DEAN, J. H. 1988. Production and characterization of a monoclonal antibody to aflatoxin B₂. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 404-408.

HOOVER, D. G., BOLTON, V. E., GUILFORD, F. T. & STRAUS, D. C. 2009. Mycotoxin detection in human samples from patients exposed to environmental molds. *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 1465-1475.

HSU, K. H. & CHU, F. S. 1994. Production and characterization of anti-idiotypic

and anti-anti-idiotypic antibodies from a monoclonal antibody against aflatoxin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2353-2359.

HU, L., LIU, A., CHEN, W., YANG, H., WANG, X. & CHEN, F. 2017. A non-toxic enzyme-linked immunosorbent assay for aflatoxin B₁ using anti-idiotypic antibodies as substitutes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 1640-1645.

HUSSEIN, H. S. & BRASEL, J. M. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167, 101-134.

HUYBRECHTS, B., MARTINS, J. C., DEBONGNIE, P., UHLIG, S. & CALLEBAUT, A. 2015. Fast and sensitive LC-MS/MS method measuring human mycotoxin exposure using biomarkers in urine. *Archives of Toxicology*, 89, 1993-2005.

IARC 1993. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 56, 245-395.

IARC 2012. Chemical agents and related occupations - Volume 100F a review of human carcinogens. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 100F, 225-248.

ISHIKAWA, E., HASHIDA, S., KATO, Y. & IMURA, H. 1987. Sensitive enzyme immunoassay of human growth hormone for clinical application: A review. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 1, 238-242.

JERNE, N. K. 1974. Towards a network theory of the immune system. *Annales d'Immunologie (Institut Pasteur)*, 125 C, 373-389.

JOHNSEN, H., ODDEN, E., JOHNSEN, B. A. & FONNUM, F. 1988. Metabolism of T-2 toxin by blood cell carboxylesterases. *Biochemical*

Pharmacology, 37, 3193-3197.

KEW, M. C. 2003. Synergistic interaction between aflatoxin B₁ and hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis. *Liver International*, 23, 405-409.

KIM, S. H., CHA, S. H., KARYN, B., PARK, S. W., SON, S. W. & KANG, H. G. 2011. Production of group specific monoclonal antibody to aflatoxins and its application to enzyme-linked immunosorbent assay. *Toxicological Research*, 27, 125-131.

KONONENKO, G. P., BURKIN, A. A. & SOBOLEVA, N. A. 2002. Comparative characterization of immune reagents based on hemiacetals of aflatoxin B₁ and sterigmatocystin. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 38, 487-492.

LAN, H. N., JIANG, H. L., LI, W., WU, T. C., HONG, P., LI, Y. M., ZHANG, H., CUI, H. Z. & ZHENG, X. 2015. Development and characterization of a novel anti-idiotypic monoclonal antibody to growth hormone, which can mimic physiological functions of growth hormone in primary porcine hepatocytes. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28, 573-583.

LAWELLIN, D. W., GRANT, D. W. & JOYCE, B. K. 1977. Enzyme-linked immunosorbent analysis for aflatoxin B₁. *Applied and Environmental Microbiology*, 34, 94-96.

LEI, J., LI, P., ZHANG, Q., WANG, Y., ZHANG, Z., DING, X. & ZANG, W. 2014. Anti-idiotypic nanobody-phage based real-time immuno-PCR for detection of hepatocarcinogen aflatoxin in grains and feedstuffs. *Analytical Chemistry*, 86, 10841-10846.

LEONG, Y. H., LATIFF, A. A., AHMAD, N. I. & ROSMA, A. 2012. Exposure measurement of aflatoxins and aflatoxin metabolites in human body fluids. A short review. *Mycotoxin Research*, 28, 79-87.

- LI, P., ZHANG, Q. & ZHANG, W. 2009a. Immunoassays for aflatoxins. *Trends in Analytical Chemistry*, 28, 1115-1126.
- LI, P. W., ZHANG, Q., ZHANG, W., ZHANG, J. Y., CHEN, X. M., JIANG, J., XIE, L. H. & ZHANG, D. H. 2009b. Development of a class-specific monoclonal antibody-based ELISA for aflatoxins in peanut. *Food Chemistry*, 115, 313-317.
- LI, Y., LUO, X., YANG, S., CAO, X., WANG, Z., SHI, W. & ZHANG, S. 2014. High specific monoclonal antibody production and development of an ELISA method for monitoring T-2 toxin in rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 1492-1497.
- LI, Y., WANG, Z., BEIER, R. C., SHEN, J., DE SMET, D., DE SAEGER, S. & ZHANG, S. 2011. T-2 toxin, a trichothecene mycotoxin: review of toxicity, metabolism, and analytical methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 3441-3453.
- LIU, B. H., YU, F. Y. & CHU, F. S. 1996. Anti-idiotypic and anti-anti-idiotypic antibodies generated from polyclonal antibodies against microcystin-LR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 4037-4042.
- LIU, J.-W., LU, C.-C., LIU, B.-H. & YU, F.-Y. 2016. Development of novel monoclonal antibodies-based ultrasensitive enzyme-linked immunosorbent assay and rapid immunochromatographic strip for aflatoxin B₁ detection. *Food Control*, 59, 700-707.
- LIU, L., XING, C., YAN, H., KUANG, H. & XU, C. 2014. Development of an ELISA and immunochromatographic strip for highly sensitive detection of microcystin-LR. *Sensors (Basel)*, 14, 14672-14685.
- LUDOVICI, G. M., CENCIARELLI, O., CARESTIA, M., GABBARINI, V., MALIZIA, A. & GAUDIO, P. 2017. Mycotoxins: a new concern for biosecurity? *Biomedicine & Prevention*, 3, 140-142.

MARAGOS, C. M. 2014. Production of anti-idiotypic antibodies for deoxynivalenol and their evaluation with three immunoassay platforms. *Mycotoxin Research*, 30, 103-111.

MARAGOS, C. M., KURTZMAN, C., BUSMAN, M., PRICE, N. & MCCORMICK, S. 2013. Development and evaluation of monoclonal antibodies for the glucoside of T-2 Toxin (T2-Glc). *Toxins*, 5, 1299-1313.

MARIN, S., RAMOS, A. J., CANO-SANCHO, G. & SANCHIS, V. 2013. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 218-237.

MÄRTLBAUER, E. 1993. Enzymimmuntests für antimikrobiell wirksame Stoffe. Stuttgart: *Ferdinand Enke Verlag*, 180-183.

MARUYAMA, H., SPERLAGH, M., ZALOUDIK, J., LIANG, S., MIZUKI, K., MOLTHOFF, C. & HERLYN, D. 2002. Immunization procedures for anti-idiotypic antibody induction in mice and rats. *Journal of Immunological Methods*, 264, 121-133.

MCLEAN, M. & DUTTON, M. F. 1995. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. *Pharmacology & Therapeutics*, 65, 163-192.

MOORE, G. G., OLARTE, R. A., HORN, B. W., ELLIOTT, J. L., SINGH, R., O'NEAL, C. J. & CARBONE, I. 2017. Global population structure and adaptive evolution of aflatoxin-producing fungi. *Ecology and Evolution*, 7, 9179-9191.

MYKKÄNEN, H., ZHU, H., SALMINEN, E., JUVONEN, R. O., LING, W., MA, J., POLYCHRONAKI, N., KEMILAINEN, H., MYKKANEN, O., SALMINEN, S. & EL-NEZAMI, H. 2005. Fecal and urinary excretion of aflatoxin B₁ metabolites (AFQ₁, AFM₁ and AFB-N⁷-guanine) in young Chinese males. *International Journal of Cancer*, 115, 879-884.

NAGATA, S., SOUTOME, H., TSUTSUMI, T., HASEGAWA, A., SEKIJIMA, M., SUGAMATA, M., HARADA, K., SUGANUMA, M. & UENO, Y. 1995. Novel monoclonal antibodies against microcystin and their protective activity for hepatotoxicity. *Natural Toxins*, 3, 78-86.

NISONOFF, A. & LAMOYI, E. 1981. Implications of the presence of an internal image of the antigen in anti-idiotypic antibodies: possible application to vaccine production. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 21, 397-406.

OHTA, M., ISHII, K. & UENO, Y. 1977. Metabolism of trichothecene mycotoxins. I. Microsomal deacetylation of T-2 toxin in animal tissues. *Journal of Biochemistry*, 82, 1591-1598.

OHTANI, K., KAWAMURA, O. & UENO, Y. 1988. Improved preparation of T-2 toxin-protein conjugates. *Toxicon*, 26, 1107-1111.

OPLATOWSKA-STACHOWIAK, M., KLEINTJENS, T., SAJIC, N., HAASNOOT, W., CAMPBELL, K., ELLIOTT, C. T. & SALDEN, M. 2017. T-2 toxin/HT-2 toxin and ochratoxin A ELISAs development and in-house validation in food in accordance with Commission Regulation (EU) No 519/2014. *Toxins*, 9, 1-18.

PAN, Y., YUHASZ, S. C. & AMZEL, L. M. 1995. Anti-idiotypic antibodies: biological function and structural studies. *Faseb Journal*, 9, 43-49.

PELTOMAA, R., BENITO-PENA, E. & MORENO-BONDI, M. C. 2018. Bioinspired recognition elements for mycotoxin sensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410, 747-771.

PENG, D., CHANG, F., WANG, Y., CHEN, D., LIU, Z., ZHOU, X., FENG, L. & YUAN, Z. 2016. Development of a sensitive monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay for monitoring T-2 toxin in food and feed. *Food Additives & Contaminants Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 33, 683-692.

PERAICA, M., RADIC, B., LUCIC, A. & PAVLOVIC, M. 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization*, 77, 754-766.

PESTKA, J. J., LEE, S. C., LAU, H. P. & CHU, F. S. 1981. Enzyme-linked immunosorbent assay for T-2 toxin. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 58, 940A-944A.

PIEKKOLA, S., TURNER, P. C., ABDEL-HAMID, M., EZZAT, S., EL-DALY, M., EL-KAFRAWY, S., SAVCHENKO, E., POUSSA, T., WOO, J. C., MYKKANEN, H. & EL-NEZAMI, H. 2012. Characterisation of aflatoxin and deoxynivalenol exposure among pregnant Egyptian women. *Food Additives & Contaminants Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 29, 962-971.

PITT, J. I. & MILLER, J. D. 2017. A concise history of mycotoxin research. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 7021-7033.

QIU, Y. L., HE, Q. H., XU, Y., BHUNIA, A. K., TU, Z., CHEN, B. & LIU, Y. Y. 2015. Deoxynivalenol-mimic nanobody isolated from a naive phage display nanobody library and its application in immunoassay. *Analytic Chimica Acta*, 887, 201-208.

RAYCHAUDHURI, S., SAEKI, Y., FUJI, H. & KOHLER, H. 1986. Tumor-specific idiotype vaccines. I. Generation and characterization of internal image tumor antigen. *The Journal of Immunology*, 137, 1743-1749.

RODRIGUEZ-CARRASCO, Y., MOLTO, J. C., MANES, J. & BERRADA, H. 2014. Development of a GC-MS/MS strategy to determine 15 mycotoxins and metabolites in human urine. *Talanta*, 128, 125-131.

SACKS, D. L., ESSER, K. M. & SHER, A. 1982. Immunization of mice against African trypanosomiasis using anti-idiotypic antibodies. *Journal of Experimental Medicine*, 155, 1108-1119.

SAKAKI, S., NAKABAYASHI, N. & ISHIHARA, K. 1999. Stabilization of an antibody conjugated with enzyme by 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine copolymer in enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Biomedical Materials Research*, 47, 523-528.

SARGEANT, K., SHERIDAN, A. N. N., O'KELLY, J. & CARNAGHAN, R. B. A. 1961. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature*, 192, 1096-1097.

SARKANJ, B., EZEKIEL, C. N., TURNER, P. C., ABIA, W. A., RYCHLIK, M., KRSKA, R., SULYOK, M. & WARTH, B. 2018. Ultra-sensitive, stable isotope assisted quantification of multiple urinary mycotoxin exposure biomarkers. *Analytica Chimica Acta*, 1019, 84-92.

SCF. 2001. Opinion of the Scientific Committee on Food on *Fusarium* toxins Part 5: T-2 toxin and HT-2 toxin.
https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs_contaminants_catalogue_out88_en.pdf (abgerufen am 3.9.18).

SHAN, G., HUANG, H., STOUTAMIRE, D. W., GEE, S. J., LENG, G. & HAMMOCK, B. D. 2004. A sensitive class specific immunoassay for the detection of pyrethroid metabolites in human urine. *Chemical Research in Toxicology*, 17, 218-225.

SHENG, J. W., HE, M., SHI, H. C. & QIAN, Y. 2006. A comprehensive immunoassay for the detection of microcystins in waters based on polyclonal antibodies. *Analytica Chimica Acta*, 572, 309-315.

SOLFRIZZO, M., GAMBACORTA, L., LATTANZIO, V. M., POWERS, S. & VISCONTI, A. 2011. Simultaneous LC-MS/MS determination of aflatoxin M₁, ochratoxin A, deoxynivalenol, de-epoxydeoxynivalenol, α and β -zearalenols and fumonisin B₁ in urine as a multi-biomarker method to assess exposure to mycotoxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401, 2831-2841.

STEIN, K. E. & SODERSTROM, T. 1984. Neonatal administration of idiotypic or anti-idiotypic primes for protection against *Escheria coli* K13 infection in mice. *Journal of Experimental Medicine*, 160, 1001-1011.

STOLKER, A. A. 2012. Application of EU guidelines for the validation of screening methods for veterinary drugs. *Drug Testing and Analysis*, 4, 28-33.

SZKOLA, A., LINARES, E. M., WORBS, S., DORNER, B. G., DIETRICH, R., MÄRTLBAUER, E., NIESSNER, R. & SEIDEL, M. 2014. Rapid and simultaneous detection of ricin, staphylococcal enterotoxin B and saxitoxin by chemiluminescence-based microarray immunoassay. *Analyst*, 139, 5885-5892.

TANG, X., LI, P., ZHANG, Q., ZHANG, Z., ZHANG, W. & JIANG, J. 2017. Time-resolved fluorescence immunochromatographic assay developed using two idiotypic nanobodies for rapid, quantitative, and simultaneous detection of aflatoxin and zearalenone in maize and its products. *Analytical Chemistry*, 89, 11520-11528.

TRUSAL, L. R. 1986. Metabolism of T-2 mycotoxin by cultured cells. *Toxicon*, 24, 597-603.

TSUDA, T., ONODERA, T., SUGIMURA, T. & MURAKAMI, Y. 1992. Induction of protective immunity and neutralizing antibodies to pseudorabies virus by immunization of anti-idiotypic antibodies. *Archives of Virology*, 124, 291-300.

TSUTSUMI, T., NAGATA, S., YOSHIDA, F. & UENO, Y. 1998. Anti-idiotypic monoclonal antibodies against anti-microcystin antibody and their use in enzyme immunoassay. *Toxicon*, 36, 235-245.

TURNER, P. C., FLANNERY, B., ISITT, C., ALI, M. & PESTKA, J. 2012. The role of biomarkers in evaluating human health concerns from fungal contaminants in food. *Nutrition Research Reviews*, 25, 162-179.

UENO, Y. 1977. Mode of action of trichothecenes. *Pure and Applied Chemistry*, 49, 1737-1745.

UENO, Y., SATO, N., ISHII, K., SAKAI, K., TSUNODA, H. & ENOMOTO, M. 1973. Biological and chemical detection of trichothecene mycotoxins of *Fusarium* species. *Applied Microbiology*, 25, 699-704.

UNER, A. & GAVALCHIN, J. 2006. Idiotypes. *Encyclopedia of life sciences*, 1-5.

VAN WEEMEN, B. K. & SCHUURS, A. H. 1971. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Letters*, 15, 232-236.

VASYLIEVA, N., AHN, K. C., BARNYCH, B., GEE, S. J. & HAMMOCK, B. D. 2015. Development of an immunoassay for the detection of the phenylpyrazole insecticide fipronil. *Environmental Science & Technology*, 49, 10038-10047.

VAZQUEZ, A. M., PEREZ, A., HERNANDEZ, A. M., MACIAS, A., ALFONSO, M., BOMBINO, G. & PEREZ, R. 1998. Syngeneic anti-idiotypic monoclonal antibodies to an anti-NeuGc-containing ganglioside monoclonal antibody. *Hybridoma*, 17, 527-534.

VERORDNUNG (EG) Nr. 401/2006 DER KOMMISSION vom 23. Februar 2006 zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle des Mykotoxingehalts von Lebensmitteln. *Amtsblatt L 70*, 09.03.2006, 12-34.

VERORDNUNG (EG) Nr. 1881/2006 DER KOMMISSION vom 19. Dezember 2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln. *Amtsblatt L 364*, 20.12.2006, 5-24.

VERORDNUNG (EU) Nr. 165/2010 DER KOMMISSION vom 26. Februar 2010 zur Änderung der Verordnung (EG) 1881/2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln hinsichtlich Aflatoxinen.

Amtsblatt L 50, 27.02.2010, 8-12.

VERORDNUNG (EU) Nr. 178/2010 DER KOMMISSION vom 2. März 2010 zur Änderung der Verordnung (EG) 401/2006 hinsichtlich Erdnüssen, sonstigen Ölsaaten, Nüssen, Aprikosenkernen, Süßholz und pflanzlichem Öl. *Amtsblatt L 52*, 03.03.2010, 32-43.

VERORDNUNG (EU) Nr. 519/2014 DER KOMMISSION vom 16. Mai 2014 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 401/2006 hinsichtlich der Probenahmeverfahren für große Partien, Gewürze und Nahrungsergänzungsmittel, der Leistungskriterien für die Bestimmung von T-2-Toxin, HT-2-Toxin und Citrinin sowie der Screening-Methoden für die Analyse. *Amtsblatt L 147*, 17.05.14, 29-43.

VERORDNUNG (EU) Nr. 1058/2012 DER KOMMISSION vom 12. November 2012 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 hinsichtlich der Höchstgehalte von Aflatoxinen in getrockneten Feigen. *Amtsblatt L 313*, 13.11.2012, 14-15.

WALLIN, S., GAMBACORTA, L., KOTOVA, N., LEMMING, E. W., NALSEN, C., SOLFRIZZO, M. & OLSEN, M. 2015. Biomonitoring of concurrent mycotoxin exposure among adults in Sweden through urinary multi-biomarker analysis. *Food and Chemical Toxicology*, 83, 133-139.

WANG, J. P., DUAN, S. X., ZHANG, Y. & WANG, S. O. 2010. Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of T-2 toxin in cereals and feedstuff. *Microchimica Acta*, 169, 137-144.

WANG, M., ZHANG, D. C., WANG, S. T. & LI, M. L. 2016a. Development of a novel, anti-idiotypic monoclonal anti-prolactin antibody that mimics the physiological functions of prolactin. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 29, 571-579.

WANG, Y., LI, P., MAJKOVA, Z., BEVER, C. R., KIM, H. J., ZHANG, Q.,

DECHANT, J. E., GEE, S. J. & HAMMOCK, B. D. 2013. Isolation of alpaca anti-idiotypic heavy-chain single-domain antibody for the aflatoxin immunoassay. *Analytical Chemistry*, 85, 8298-8303.

WANG, Y., LI, P., ZHANG, Q., HU, X. & ZHANG, W. 2016b. A toxin-free enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of aflatoxins based on a VHH surrogate standard. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408, 6019-6026.

WARTH, B., SULYOK, M., FRUHMANN, P., MIKULA, H., BERTHILLER, F., SCHUHMACHER, R., HAMETNER, C., ABIA, W. A., ADAM, G., FROHLICH, J. & KRSKA, R. 2012. Development and validation of a rapid multi-biomarker liquid chromatography/tandem mass spectrometry method to assess human exposure to mycotoxins. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 26, 1533-1540.

WEBER, H. (ed.) 2010. Mikrobiologie der Lebensmittel - Grundlagen. 9. Auflage. Hamburg: *BEHR's Verlag*, 307-309.

WILD, C. P. & GONG, Y. Y. 2010. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis*, 31, 71-82.

WILLIAMS, J. H., PHILLIPS, T. D., JOLLY, P. E., STILES, J. K., JOLLY, C. M. & AGGARWAL, D. 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 1106-1122.

WU, Q. H., WANG, X., YANG, W., NUSSLER, A. K., XIONG, L. Y., KUCA, K., DOHNAL, V., ZHANG, X. J. & YUAN, Z. H. 2014. Oxidative stress-mediated cytotoxicity and metabolism of T-2 toxin and deoxynivalenol in animals and humans: an update. *Archives of Toxicology*, 88, 1309-26.

XU, Y., XIONG, L., LI, Y., XIONG, Y., TU, Z., FU, J. & CHEN, B. 2015. Anti-idiotypic nanobody as citrinin mimotope from a naive alpaca heavy chain single

domain antibody library. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407, 5333-5341.

YAZAR, S. & OMURTAG, G. Z. 2008. Fumonisin, trichothecenes and zearalenone in cereals. *International Journal of Molecular Sciences*, 9, 2062-2090.

YOSHIZAWA, T., KOHNO, H., IKEDA, K., SHINODA, T., YOKOHAMA, H., MORITA, K., KUSADA, O. & KOBAYASHI, Y. 2004. A practical method for measuring deoxynivalenol, nivalenol, and T-2 + HT-2 toxin in foods by an enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68, 2076-2085.

YU, M. W., LIEN, J. P., CHIU, Y. H., SANTELLA, R. M., LIAW, Y. F. & CHEN, C. J. 1997. Effect of aflatoxin metabolism and DNA adduct formation on hepatocellular carcinoma among chronic hepatitis B carriers in Taiwan. *Journal of Hepatology*, 27, 320-330.

ZECK, A., EIKENBERG, A., WELLER, M. G. & NIESSNER, R. 2001. Highly sensitive immunoassay based on a monoclonal antibody specific for [4-arginine]microcystins. *Analytica Chimica Acta*, 441, 1-13.

ZHANG, D., ZHOU, L. F., LEI, Y. J., ZHOU, Z., ZHOU, J. & CHEN, S. Q. 2017. Investigation of diethylstilbestrol residue level in human urine samples by a specific monoclonal antibody. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 7042-7050.

ZHANG, D. H., LI, P. W., ZHANG, Q., ZHANG, W., HUANG, Y. L., DING, X. X. & JIANG, J. 2009. Production of ultrasensitive generic monoclonal antibodies against major aflatoxins using a modified two-step screening procedure. *Analytica Chimica Acta*, 636, 63-69.

ZHU, J.-Q., ZHANG, L.-S., HU, X., XIAO, Y., CHEN, J.-S., XU, Y.-C., FREMY, J. & CHU, F. S. 1987. Correlation of dietary aflatoxin B₁ levels with

excretion of aflatoxin M₁ in human urine. *Cancer Research*, 47, 1848-1852.

IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Strukturformeln einiger wichtiger Aflatoxine: AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ , AFM ₁ , AFM ₂ , Aflatoxicol und AFQ ₁ .	6
Abbildung 2:	Strukturformeln einiger Typ-A-Trichothecene: T-2 Toxin, HT-2 Toxin, T-2-Triol und T-2-Tetraol.	7
Abbildung 3:	Epitopreaktivität verschiedener Ab2 Subtypen.	22
Abbildung 4:	Bestimmung Antikörpertiter gegen Ab1 2D1 mit Variante 1.	44
Abbildung 5:	Bestimmung Antikörpertiter gegen Ab1 2A12 mit Variante 1.	44
Abbildung 6:	Überprüfung der Papain-Spaltung des mAk 2A12 bzw. mAk 2D1.	46
Abbildung 7:	Überprüfung der Aktivität der Ab1-Fab-HRP-Konjugate.	47
Abbildung 8:	Optimierung der Screening-Variante 2.	49
Abbildung 9:	Bestimmung Antikörpertiter gegen Ab1 2D1 mit Variante 2.	50
Abbildung 10:	Bestimmung Antikörpertiter gegen Ab1 2A12 mit Variante 2.	51
Abbildung 11:	Standardkurven für AFB ₁ und T-2 Toxin im Screening-Variante 2 EIA-System unter Verwendung verschiedener Mausantiseren.	52
Abbildung 12:	Bestimmung Antikörpertiter gegen mAk 2A12 unter Verwendung der EIA-Screening-Variante 3, mit Einsatz einer anti-Maus-IgG ₁ - bzw. anti-Maus-IgG _{2b} -Beschichtung.	54
Abbildung 13:	AFB ₁ -Standardkurven in Ab2-basierten EIA-Systemen analog zu Screening-Variante 2.	57
Abbildung 14:	T-2-Standardkurven in Ab2-basierten EIA-Systemen, als Ab2 wurden mAk 1D6, 1D7, 1F10 und 1C1 eingesetzt.	57

Abbildung 15:	Erzielte Signalintensitäten in einem direkt beschichteten, Ab2-basierten EIA-System abhängig vom eingesetzten Beschichtungspuffer.	59
Abbildung 16:	AFM ₁ -Standardkurven für vier verschiedene EIA-Formate.	61
Abbildung 17:	T-2 Toxin-Standardkurven für vier verschiedene EIA-Formate	62
Abbildung 18:	Relative Hemmung des Ab2-basierten T-2 Toxin EIA-Systems durch Probanden- bzw. synthetischen Urin.	66
Abbildung 19:	Reduktion der durch die Probenmatrix Urin in einem EIA-System verursachten unspezifischen Hemmung durch den Einsatz verschiedener Probenverdünnungspuffer bzw. -lösungen.	67
Abbildung 20:	Beeinflussung des T-2/HT-2 EIA-Systems durch Urinproben von Proband 1.	69
Abbildung 21:	Verbesserung der EIA-Kompatibilität von problematischen Urinproben durch Vorbehandlung mit Urease.	70
Abbildung 22:	Validierung von 20 Leerwert- und 20 künstlich kontaminierten Urinproben (1:4 verdünnt) bei einer Zielkonzentration von 4 ng/ml HT-2 und einer Verdünnungsstufe von 1:4.	72

X. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Ausgewählte Biomonitoring-Studien zum Nachweis von AFM ₁ in Urin.	11
Tabelle 2:	Ausgewählte Biomonitoring-Studien zum Nachweis von T-2 und HT-2 in Urin.	12
Tabelle 3:	Ausgewählte Publikationen zur Generierung von Antikörpern gegen Aflatoxine.	19
Tabelle 4:	Ausgewählte Publikationen zur Generierung von Antikörpern gegen T-2 Toxin.	20
Tabelle 5:	Auf Ab2 basierende Testsysteme zum Nachweis von Aflatoxin bzw. T-2 Toxin.	27
Tabelle 6:	Immunisierung von Mäusen mit Ab1-KLH-Konjugaten.	33
Tabelle 7:	Charakteristika der gegen mAk 2D1 (anti-Aflatoxin) gerichteten Ab2.	55
Tabelle 8:	Charakteristika der gegen mAk 2A12 (anti-T-2-Toxin) gerichteten Ab2.	56
Tabelle 9:	In den optimierten Ab1/Ab2-basierten EIA-Systemen verwendete Immunreagenzien-Konzentrationen.	59
Tabelle 10:	Format und Sensitivität verschiedener EIA-Systeme zum Nachweis von AFM ₁ .	61
Tabelle 11:	Format und Sensitivität verschiedener EIA-Systeme zum Nachweis von T-2 Toxin.	62
Tabelle 12:	Charakteristika der in den etablierten Ab2-basierten EIAs erstellten Standardkurven.	63
Tabelle 13:	Spezifität und Nachweisgrenzen des Ab2-basierten EIAs für Aflatoxine im Vergleich zur Spezifität des klassischen EIA-Systems.	64
Tabelle 14:	Spezifität und Nachweisgrenzen des Ab2-basierten EIAs für Typ A Trichothecene im Vergleich zur Spezifität des klassischen EIA-Systems.	64

Tabelle 15:	Validierung der Ab2-basierten EIA-Testsysteme zum Nachweis von HT-2 und AFM ₁ in Urinproben entsprechend der CRL-Richtlinien (2010).	71
--------------------	---	-----------

XI. DANKSAGUNG

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Erwin Märtlbauer für die Überlassung dieses interessanten Themas und die freundliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Mein größter Dank gilt Dr. Richard Dietrich für die engagierte Betreuung während der gesamten Zeit am Lehrstuhl, die große Sorgfalt bei der Durchsicht des Manuskripts, sein unglaubliches Wissen und seine stets freundliche und humorvolle Art. Danke für die vielen Anregungen und die zuverlässige, geduldige Unterstützung bei der Anfertigung der Dissertation!

Mein herzlichster Dank geht an Brunhilde Minich, Franziska Faber und Margit Straka für die intensive Einarbeitung vor allem zu Beginn meiner Labortätigkeit, ihre Hilfsbereitschaft und für die gute Zusammenarbeit.

Außerdem möchte ich mich besonders bei Gabi Acar für ihre unglaublich nette, lustige sowie freundliche Art und ihre Unterstützung in allen Bereichen bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an Stefanie Schwemmer und Jonas Hofmayer für ihre Freundschaft, die schöne Zeit im Labor und Büro sowie die lustigen gemeinsamen Ausflüge nach der Arbeit. Dafür möchte ich mich auch bei Katharina Schulz ganz herzlich bedanken.

Vielen Dank an Simon Budde für die Unterstützung bei der Erstellung der chemischen Strukturformeln.

Darüber hinaus möchte ich allen Mitarbeitern für die nette Zeit am Lehrstuhl, für die unterhaltsamen Pausen, Feste und schönen Betriebsausflüge danken.

Der allergrößte Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester, die immer für mich da sind und mich auf diesem Weg stets unterstützt haben. Danke für alles!