



Magnetpartikelbasierte Immunoassays als vielseitiges Werkzeug für die Umweltanalytik

Alexander Ecke^{1,2} (alexander.ecke@bam.de), Konrad Bohm^{1,3} (konrad.bohm@web.de),
Rudolf J. Schneider^{1,3} (rudolf.schneider@bam.de)

¹ Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM), Richard-Willstätter-Str. 11, 12489 Berlin

² Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Chemie, Brook-Taylor-Str. 2, 12489 Berlin

³ Technische Universität Berlin, Straße des 17. Juni 135, 10623 Berlin

Zusammenfassung

Der Bedarf nach schnellen und kostengünstigen Analysemethoden in der (Trink-)Wasseranalytik steigt mit dem zunehmenden Eintrag pharmazeutisch aktiver Substanzen in die Umwelt. Insbesondere die Kontamination mit Antibiotika erscheint neben ökotoxikologischen Effekten vor allem in Hinblick auf die Evolution resistenter Keime im Wasser besorgniserregend. Wir berichten hier über die Entwicklung eines magnetpartikelbasierten Immunoassays (MBBA) zur Detektion des Breitbandantibiotikums Amoxicillin (AMX) in Wasserproben, der im Vergleich zum entsprechenden Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) eine wesentlich kürzere Analysendauer sowie einen breiteren Messbereich mit niedrigerer Nachweisgrenze aufweist. Das angewendete Assayprinzip ist dabei leicht auf weitere Analyten übertragbar und ermöglicht die Implementierung in einen Immunosensor.

Einleitung

Als Breitbandantibiotikum findet das Aminopenicillin AMX (Abbildung 1) Anwendung gegen zahlreiche bakterielle Infektionen und stellt dabei das am häufigsten verschriebene Antibiotikum dar (z. B. USA, 2018).[1] Insgesamt gehört es zu den 20 am häufigsten verschriebenen Medikamenten.[2] Mit dem hohen Einsatz in der Human- sowie Veterinärmedizin geht allerdings auch ein erhöhter Eintrag in die Umwelt einher. Ein Teil des Wirkstoffs wird unmetabolisiert wieder ausgeschieden und gelangt etwa in der Landwirtschaft direkt oder über die Gülleausbringung in den Boden, von wo er in Oberflächengewässer abfließen oder in das Grundwasser sickern kann. Auf menschlicher Seite spielt der Eintrag über das Abwasser in die Kanalisation und infolge des unvollständigen Abbaus in Kläranlagen die anschließende Einleitung in Oberflächengewässer die größte Rolle. AMX ist infolgedessen in Krankenhausabwässern, Klärwerkszu- und abläufen sowie Oberflächengewässern im ng-µg/L-Bereich nachweisbar.[3-6]

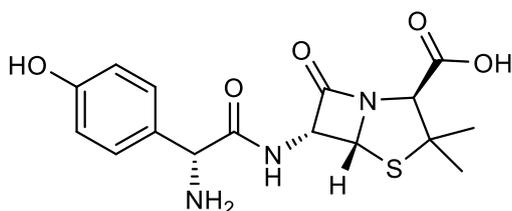


Abb. 1: Strukturformel von AMX

Neben ökotoxikologischen Effekten und der Allergenität der Stammverbindung sowie ihrer Abbauprodukte ist insbesondere die verstärkte Entwicklung von Antibiotikaresistenzen in diesem Zusammenhang besorgniserregend.[7-8] Die Kontamination von Oberflächengewässern, die auch zur Trinkwasseraufbereitung genutzt werden, stellt damit eine potenzielle Gesundheitsgefahr für Mensch und Tier dar und verlangt nach effektiven Screening-Verfahren, um Verunreinigungen schnell erkennen und zeitnah Gegenmaßnahmen einleiten zu können.

Immunanalytische Methoden, die auf der nichtkovalenten Bindung spezifischer Antikörper an Analytmoleküle basieren, wurden in der Umweltanalytik bereits vielfach zum Screening nach pharmazeutischen Rückständen in verschiedenen Gewässern (Abwasser, Oberflächengewässer, Trinkwasser) eingesetzt.[9-11] Sie eignen sich in dieser Hinsicht besonders aufgrund ihres hohen Probendurchsatzes als kosteneffiziente Analysenmethode mit moderatem instrumentellem Aufwand. Nichtsdestotrotz sind herkömmliche Assayformate wie der ELISA relativ zeitaufwändig und auf den Einsatz in der Mikrotiterplatte beschränkt, weshalb in den vergangenen Jahren vermehrt neue Assayformate entwickelt wurden, die Mikro- oder Nanopartikel als mobile Plattform nutzen.[12-14] Insbesondere magnetische Partikel, die meist aus einem paramagnetischen Eisenoxid-Kern mit einer chemisch modifizierbaren Polymer-Schale bestehen, sind in dieser Hinsicht besonders interessant, da sie durch Anlegen eines magnetischen Feldes reversibel immobilisiert werden können. Dies erlaubt beispielsweise die Implementierung der Assays in Immunosensoren, die eine kontinuierliche und automatisierte Analyse ermöglichen.[15]

Immunanalytische Bestimmungsmethodik

Für den MBBA zur Bestimmung von AMX in Wasserproben wurden Protein G funktionalisierte Magnetpartikel (Dynabeads, Thermo Fisher Scientific) zur Immobilisierung des monoklonalen Maus anti-AMX Antikörpers (Klon 1.BB.832, US-Biological) eingesetzt. Der Vorteil von Protein G liegt hierbei in dessen hoher Bindungsaffinität zur Fc Region von IgG-Antikörpern. Dies führt dazu, dass die an der Partikeloberfläche immobilisierten Antikörper optimal ausgerichtet sind und ihre Bindungskapazität nicht beeinträchtigt wird, wie es beim Einsatz unspezifischer Crosslinker wie Glutaraldehyd möglich wäre.

Die Partikel werden durch 30-minütige Inkubation mit dem Antikörper beladen und können nach einem Waschschrift direkt im Assay eingesetzt werden. Hier werden die Beads zunächst mit der Probe bzw. AMX-Standardlösung vorinkubiert (20 min) und anschließend mit dem Tracer (20 min) – einem AMX-Peroxidase-Konjugat – versetzt, der die übrigen freien Bindungsstellen des Antikörpers besetzt und für die Quantifizierung genutzt wird. Nach einem Waschschrift, bei dem die Beads mithilfe eines Magneten immobilisiert werden und die überstehende Lösung durch Pipettieren ausgetauscht wird, erfolgt die Zugabe des Substrats 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB). Dieses wird von der Peroxidase in Gegenwart von Wasserstoffperoxid zum entsprechenden Diimin oxidiert, welches sowohl photometrisch (Differenz der optischen Dichte bei 450 nm und 620 nm) als auch elektrochemisch (amperometrischer Strom bei 100 mV vs. Ag/AgCl) quantifiziert werden kann.^[16] Letzteres ist insbesondere für die Implementierung in einen Immunosensor interessant, da elektrochemische Methoden ein weitaus höheres Potenzial zur Miniaturisierung bieten als die photometrische Detektion.

Parallel zum MBBA wurde ein klassischer direkter ELISA entwickelt, bei dem zunächst ein anti-Maus IgG Antikörper an der Oberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert wird (18 h), an den im nächsten Schritt wiederum der Maus anti-AMX Antikörper gebunden wird (1 h). Anschließend verläuft der Assay analog zum MBBA, mit dem Unterschied, dass die einzelnen Inkubationsschritte langwieriger sind, da die Diffusion an die stationäre Wandung langsamer verläuft als an die mobile Partikeloberfläche in Suspension (Abbildung 2).^[17]

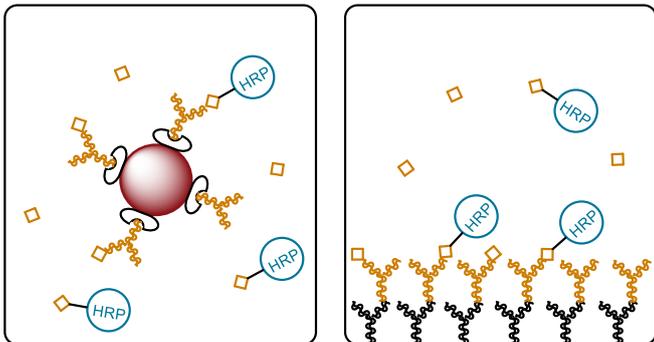


Abb. 2: Schematische Darstellung des MBBA (links) und ELISA (rechts) jeweils im analytischen Schritt, d. h. die kompetitive Bindung von Analyt und Tracer an den Antikörper.

Ergebnisse und Diskussion

Aus vorhergehenden Untersuchungen ist bekannt, dass der hier verwendete Antikörper eine höhere Affinität zur offenkettigen Form des AMX aufweist, die durch Hydrolyse des β -Lactam-Rings gebildet wird.^[18] Daher wurden Standards und Proben zunächst vor der Analyse durch Zugabe von 0.2 M NaOH für 3 h bei RT hydrolysiert, um die Nachweisgrenze zu verringern. Da der pH-Wert der Proben damit stark erhöht wird und für die Analyse im Assay anschließend wieder neutralisiert werden muss, wurde hier auch die Zugabe des Enzyms β -Lactamase aus *Bacillus cereus* zur Probenvorbereitung ge-

testet. Die β -Lactamase, die auch für die Resistenzentwicklung gegen Penicilline verantwortlich ist, katalysiert ebenfalls die hydrolytische Ringöffnung von β -Lactamen wie AMX. Damit konnte die Dauer der Probenvorbereitung (Hydrolysedauer) auf 1 h reduziert werden. Zudem entfällt die umständliche Angleichung des pH Werts und die Nachweisgrenze konnte nochmals verringert werden, da der Verdünnungseffekt der Proben durch Zugabe der NaOH-Lösung entfällt.

Im Vergleich von ELISA und MBBA ergeben sich aus den berechneten Präzisionsprofilen nach Ekins (Abbildung 3) für die Quantifizierung von AMX folgende Messbereiche:^[19] 7 μ g/L - 1.7 mg/L (ELISA) und 1 μ g/L - 1.4 mg/L (MBBA). Daraus folgt für den MBBA neben der deutlich verkürzten Analysendauer ein weiterer Vorteil in der geringeren Nachweisgrenze und dem größeren Messbereich gegenüber dem ELISA.

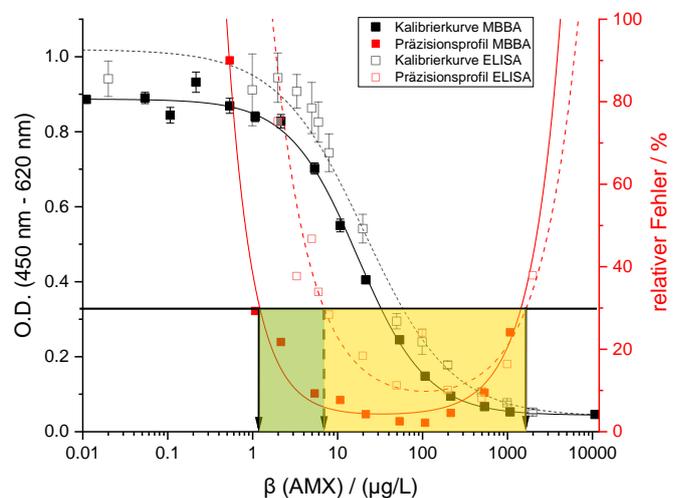


Abb. 3: Vergleich der Kalibrierkurven (schwarz) und der Präzisionsprofile (rot) von MBBA und ELISA sowie die daraus resultierenden Messbereiche für ELISA (gelb) und MBBA (gelb+grün).

Da im Messbereich des Assays nicht hinreichend kontaminierte Realproben zu erwarten waren, erfolgte die Validierung der Assays mit verschiedenen gespikten Wasserproben, um Matrixeffekte abschätzen zu können. Dabei ergaben sich für Leitungs- und Mineralwasserproben Wiederfindungsraten zwischen 40 und 100% im ELISA, wobei vor allem Proben im niedrigen Konzentrationsbereich oder mit sehr hohen Ca^{2+} Gehalten konsistent zu Unterbestimmungen führen. Letzteres ließe sich durch eine höhere Konzentration des Komplexbildners EDTA im verwendeten Probenpuffer beheben, die allerdings auch die Signalstärke negativ beeinflussen würde. In Abwägung dieser beiden Faktoren erscheint es sinnvoll, die Pufferzusammensetzung beizubehalten, zumal der störende Einfluss der Ca^{2+} -Ionen erst ab Gehalten über 200 mg/L auftritt, die lediglich in Mineralwasserproben aus bestimmten Mineralquellen zu finden sind.

Im MBBA wurde zusätzlich zu Leitungs- und Mineralwasser auch Oberflächenwasser (Teltowkanal) beprobt. Insgesamt er-

geben sich hier bessere Übereinstimmungen mit dem Erwartungswert für einen Großteil der Proben (Tabelle 1). Von 20 Proben mit unterschiedlichen AMX-Gehalten wurden zehn mit einer maximalen Abweichung von 10% bestimmt, vier weitere mit einer Abweichung von bis zu 30% und vier Blindproben wurden korrekt erkannt. Lediglich bei Leitungswasserproben erfolgten konsistent deutliche Überbestimmungen. Da auch hier die Blindprobe entsprechend erkannt wurde, lassen sich Matrixeffekte allerdings ausschließen. Die Befunde deuten stattdessen auf einen abweichenden Hydrolysegrad des AMX in diesen Proben hin. Es wurde bereits diskutiert,

dass die Hydrolyse von AMX in Leitungswasser womöglich aufgrund gelöster Metallionen wie Cu^{2+} aus den Leitungen schneller abläuft.^[18,20] Da die hydrolysierte (offenkettige) Form von AMX vom Antikörper besser erkannt wird, bindet im Assay dann entsprechend weniger Tracer. Dies resultiert in geringeren Signalintensitäten, die wiederum mit höheren AMX-Konzentrationen korrelieren und damit zu Überbestimmungen führen. Die vorliegenden Daten unterstützen somit die Annahme der schnelleren Hydrolyse von AMX in Leitungswasser.

Tabelle 1: Vergleich von gemessener und erwarteter AMX-Konzentration sowie Wiederfindungsraten (WFR) in verschiedenen gespikten Wasserproben nach Analyse im MBBA.

Probe	β (AMX) / ($\mu\text{g/L}$)		WFR / %	Probe	β (AMX) / ($\mu\text{g/L}$)		WFR / %	Probe	β (AMX) / ($\mu\text{g/L}$)		WFR / %	Probe	β (AMX) / ($\mu\text{g/L}$)		WFR / %
	erwartet	gemessen			erwartet	gemessen			erwartet	gemessen			erwartet	gemessen	
1	0	0	100	7	0	0	100	13	0	0	100	19	0	0	100
2	2.15	1.37±0.55	64	8	4.30	9.95±0.66	232	14	6.45	5.70±0.70	88	20	8.59	5.87±0.28	68
3	10.7	10.4±2.3	97	9	12.9	38.2±0.9	296	15	12.9	13.3±0.5	104	21	21.5	16.8±0.7	78
4	25.8	20.2±0.3	78	10	30.1	101±3	336	16	34.4	35.1±3.1	102	22	43.0	37.9±2.0	88
5	53.7	48.6±1.1	91	11	64.5	242±8	375	17	75.2	81.6±2.4	109	23	85.9	85.8±0.4	100
6	107	104±3	96	12	215	870±72	405	18	322	345±12	107	24	430	442±59	103
Reinstwasser				Leitungswasser				Mineralwasser				Oberflächenwasser			

Ausblick

Das hier vorgestellte Prinzip des MBBA lässt sich bei Verfügbarkeit entsprechender Antikörper und Tracer leicht auf andere Analyten übertragen und kann auch für diese eine schnellere und empfindlichere immunanalytische Bestimmung ermöglichen. In diesem Zusammenhang könnte der MBBA aufgrund seiner kurzen Analysendauer bei gleicher bis leicht verbesserter Performance gegenüber dem herkömmlichen ELISA diesen perspektivisch als Standardmethode in der Immunanalytik ersetzen. Auch ein indirektes Assayformat für solche Analyten, bei denen ein direktes Format nicht zugänglich ist (z.B. Diclofenac),^[21] ist möglich und wird von uns derzeit entwickelt.

Ein weiterer Vorteil der MBBA liegt in der möglichen Implementierung in ein Online-System, das die kontinuierliche und automatisierte Analyse von Trinkwasser hinsichtlich pharmazeutischer Kontaminationen ermöglichen soll. Ein Konzept für ein solches System wurde bereits erarbeitet und wird derzeit umgesetzt. Die Zugabe der einzelnen Assaykomponenten soll hier über separate Ventile zu einer zentralen Mischkammer erfolgen, in der die Inkubations- und Waschschriffe sowie die Substratumsetzung erfolgen. Zur Detektion wird die umgesetzte Substratlösung anschließend durch einen mikrofluidischen Chip mit integrierter Elektrode zur amperometrischen Quantifizierung geleitet, um mit geringen Probenmengen möglichst empfindliche Messungen zu ermöglichen.

Dieser Immunosensor soll zukünftig die Trinkwasserqualität direkt in der Versorgungsleitung überwachen und bei eventuell auftretenden Kontaminationen schnelle Gegenmaßnahmen ermöglichen.

Danksagung

Wir danken dem Indo-German Science and Technology Centre (IGSTC) sowie dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für die Förderung des assoziierten Projektes *IDC-Water* (FKZ 01DQ18003A).

Literatur

- [1] Centers for Disease Control and Prevention. Outpatient Antibiotic Prescriptions - United States, 2018. Available online: <https://www.cdc.gov/antibiotic-use/community/20programs-measurement/state-local-activities/outpatient-antibiotic-prescriptions-US-2018.html%20> (accessed on 24 March 2021).
- [2] The Top 200 Drugs of 2021. Available online: <https://clincalc.com/DrugStats/> (accessed on 24 March 2021).
- [3] A. M. Voigt, H. A. Faerber, G. Wilbring, D. Skutlarek, C. Felder, R. Mahn, D. Wolf, P. Brossart, T. Hornung, S. Engelhart, M. Exner, R. M. Schmithausen, The occurrence of antimicrobial substances in toilet, sink and shower drainpipes of clinical units: A neglected source of

- antibiotic residues. *Int. J. Hyg. Envir. Health* 2019, 222, 455-467.
- [4] R. Andreozzi, V. Caprio, C. Ciniglia, M. de Champdoré, R. Lo Giudice, R. Marotta, E. Zuccato, Antibiotics in the environment: Occurrence in Italian STPs, fate, and preliminary assessment on algal toxicity of amoxicillin. *Environ. Sci. Technol.* 2004, 38, 6832-6838.
- [5] T. Christian, R. J. Schneider, H. A. Färber, D. Skutlarek, M. T. Meyer, H. E. Goldbach, Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 2003, 31, 36-44.
- [6] B. Kasprzyk-Hordern, R. M. Dinsdale, A. J. Guwy, The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Res.* 2008, 42, 3498-3518.
- [7] D. Cacace, D. Fatta-Kassinos, C. M. Manaia, E. Cytryn, N. Kreuzinger, L. Rizzo, P. Karaolia, T. Schwartz, J. Alexander, C. Merlin, H. Garelick, H. Schmitt, D. de Vries, C. U. Schwermer, S. Meric, C. B. Ozkal, M.-N. Pons, D. Kneis, T. U. Berendonk, Antibiotic resistance genes in treated wastewater and in the receiving water bodies: A Pan-European survey of urban settings. *Water Res.* 2019, 162, 320-330.
- [8] A. Elizalde-Velázquez, L. M. Gómez-Oliván, M. Galar-Martínez, H. Islas-Flores, O. Dublán-García, N. SanJuan-Reyes, in *Environmental Health Risk - Hazardous Factors to Living Species* (Eds.: M. L. Larramendy, S. Soloneski), IntechOpen, London, UK, 2016, pp. 247-267.
- [9] A. Bahlmann, M. G. Weller, U. Panne, R. J. Schneider, Monitoring carbamazepine in surface and wastewaters by an immunoassay based on a monoclonal antibody. *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, 395, 1809.
- [10] A. Deng, M. Himmelsbach, Q.-Z. Zhu, S. Frey, M. Sengl, W. Buchberger, R. Niessner, D. Knopp, Residue analysis of the pharmaceutical diclofenac in different water types using ELISA and GC-MS. *Environ. Sci. Technol.* 2003, 37, 3422-3429.
- [11] W. L. Shelver, N. W. Shappell, M. Franek, F. R. Rubio, ELISA for sulfonamides and its application for screening in water contamination. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 6609-6615.
- [12] P. Carl, D. Sarma, B. J. R. Gregório, K. Hoffmann, A. Lehmann, K. Rurack, R. J. Schneider, Wash-free multiplexed mix-and-read suspension array fluorescence immunoassay for anthropogenic markers in wastewater. *Anal. Chem.* 2019, 91, 12988-12996.
- [13] L. Kantiani, M. Farré, D. Asperger, F. Rubio, S. González, M. J. López de Alda, M. Petrović, W. L. Shelver, D. Barceló, Triclosan and methyl-triclosan monitoring study in the northeast of Spain using a magnetic particle enzyme immunoassay and confirmatory analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Hydrol.* 2008, 361, 1-9.
- [14] T.-B. Xin, X. Wang, H. Jin, S.-X. Liang, J.-M. Lin, Z.-J. Li, Development of magnetic particle-based chemiluminescence enzyme immunoassay for the detection of 17 β -estradiol in environmental water. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2009, 158, 582-594.
- [15] F. S. Felix, L. Angnes, Electrochemical immunosensors – A powerful tool for analytical applications. *Biosens. Bioelectron.* 2018, 102, 470-478.
- [16] P. Fanjul-Bolado, M. B. González-García, A. Costa-García, Amperometric detection in TMB/HRP-based assays. *Anal. Bioanal. Chem.* 2005, 382, 297-302.
- [17] Y. Suzuki, K. Morioka, S. Ohata, T. Shimizu, H. Nakajima, K. Uchiyama, M. Yang, Rapid ELISA using a film-stack reaction field with micropillar arrays. *Sensors* 2017, 17.
- [18] A. Ecke, R. J. Schneider, Pitfalls in the immunochemical determination of β -lactam antibiotics in water. *Antibiotics* 2021, 10, 298.
- [19] R. P. Ekins, in *Immunoassays for Clinical Chemistry*, 2nd ed. (Eds.: W. M. Hunter, J. E. T. Corrie), Churchill Livingstone, Edinburgh, 1983, pp. 76-105.
- [20] N. P. Gensmantel, P. Proctor, M. I. Page, Metal-ion catalysed hydrolysis of some β -lactam antibiotics. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 1980, 1725-1732.
- [21] S. Schmidt, *Hapten Synthesis for the Antibody-based Detection of Diclofenac in Water Samples*, Dissertation, Technische Universität Berlin 2019.

Korrespondenzadresse

Alexander Ecke, M. Sc.
 Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM)
 Abteilung 1 Analytische Chemie; Referenzmaterialien
 Fachbereich 1.8 Umweltanalytik
 Richard-Willstätter-Str. 11
 12489 Berlin
 E-Mail: alexander.ecke@bam.de
 Tel.: +49 30 8104-5826