
Prüfungsarbeit eines Bewerbers

Verfahren zum Nachweis von Salmonellen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Verfahren zum Nachweis von Salmonellen in einer Kultur oder in einer kontaminierten Lebensmittelprobe, in diesem Verfahren zum Einsatz kommende, chemilumineszent markierte Antikörper, neue Verbindungen, die zur Chemilumineszenz-Markierung von Antikörpern geeignet sind, Verfahren zur Herstellung ebendieser Verbindungen sowie zur Markierung der Antikörper mit diesen Verbindungen, und ein Testkit geeignet zur Anwendung im Nachweisverfahren.

Hintergrund

Salmonellen-Bakterien sind einer der am weitesten verbreiteten Auslöser lebensmittelbedingter Darminfektionen in der entwickelten Welt, wobei in den Vereinigten Staaten jährlich über 40 000 Fälle gemeldet werden. Bis zu 1 000 dieser Infektionen enden tödlich.

Salmonellen lassen sich oft schwer nachweisen. Eine Lebensmittelprobe, bei der ein Verdacht auf Salmonellenbefall besteht, muß 2 bis 3 Tage kultiviert werden. Dann ist ein Nachweis von Salmonellen in der Kultur durch einen geschulten Mikrobiologen möglich. Dieser Test ist jedoch sehr zeitaufwendig und führt, wenn die Probe nur geringe Bakterienmengen enthält, häufig zu fälschlicherweise negativen Ergebnissen.

Stand der Technik

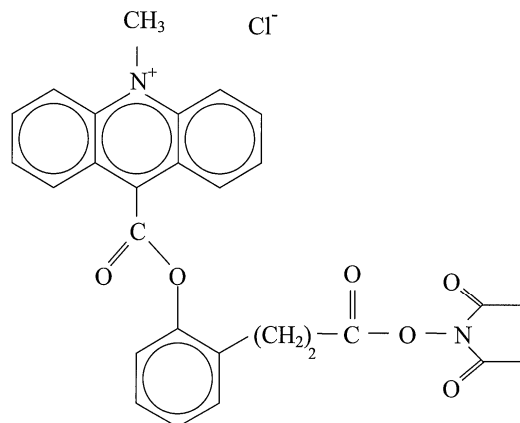
Aus dem Stand der Technik sind Nachweisverfahren für Salmonellen bekannt.

In jüngster Zeit haben mehrere Gruppen versucht, einen schnelleren und zuverlässigeren Salmonellentest bereitzustellen. Ein vielversprechender Ansatz besteht darin, zum Nachweis der Bakterien markierte Antikörper zu verwenden. Ein brauchbarer Antikörper für diese Erfindung ist ein Immunglobulin, das eine spezifische Bindungsstelle für ein Bakterium aufweist. Antikörper mit Bindungsstellen für

Salmonellen binden sich selektiv an diese Bakterien. Der Marker auf dem Antikörper ist eine Verbindung oder Gruppe, die mit chemischen oder spektroskopischen Mitteln nachgewiesen werden kann. Der Test umfaßt somit das Inkontaktbringen der Salmonellen mit dem markierten Antikörper, das Binden des Antikörpers an die Bakterien und das Nachweisen der daraus resultierenden markierten Antikörper-Bakterien-Komplexe. Es handelt sich dabei um ein sehr selektives Verfahren, denn der Antikörper bindet sich nur an die gewünschten Bakterien. Häufig sind diese Tests aber noch nicht sehr sensitiv und setzen für ein positives Ergebnis eine hohe Bakterienkonzentration in der zu testenden Probe voraus.

So beschreibt das Dokument DI ein entsprechendes Testverfahren, das zum Nachweis von Salmonellen geeignet ist und eine Nachweisgrenze von 100 Bakterien pro ml aufweist. In dem Verfahren nach DI werden mit einem chemilumineszenten Agens markierte Antikörper verwendet, wobei das Agens ein Acridinium-Derivat umfaßt. Der Antikörper aus DI ist wie folgt beschrieben:

Der im Verfahren nach DI ~~Der unter Punkt c)~~ verwendete Antikörper ist ein Antikörper, der sich mit ausreichender Spezifität an Salmonellen bindet, so daß ein brauchbarer Assay bereitgestellt werden kann. Der verwendete Antikörper ist bevorzugt ein Antikörper aus der Klasse der Proteine, die als Gamma-Immunglobuline (IgG-Moleküle) bezeichnet werden und von Kaninchen stammen. Der Antikörper wird mit an sich bekannten, herkömmlichen Techniken hergestellt. Der gewählte Antikörper wird mit einem chemilumineszenten Agens markiert, das aus Acridinium-Derivaten ausgewählt wird. Die Markierung wird bevorzugt unter Verwendung eines Acridinium-Derivats durchgeführt, das aus einem substituierten 10-Methylacridinium-9-carbonsäurephenylester mit folgender Formel (1) besteht:



Die Acridiniumester der Formel (1), die für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet werden, sind bekannte Verbindungen, deren Herstellung im Dokument EP-A-0082 636 beschrieben ist.

Allerdings ist eine Nachweisgrenze von 100 Bakterien pro ml, wie mit dem nach DI bekannten Verfahren erzielt, nicht immer ausreichend. Insbesondere ist es zum Nachweis geringer Salmonellen-Konzentrationen in Lebensmittelproben bislang immer notwendig, die Proben für mindestens 24h zu kultivieren, um einen entsprechenden Nachweis führen zu können.

Aufgabe

Es ist somit Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Testverfahren für Salmonellen zu entwickeln, mit denen sich schon sehr geringe Konzentrationen an Bakterien nachweisen lassen, und die es aufgrund ihrer hohen Sensitivität erlauben, die Vorbehandlung der Proben deutlich zu reduzieren. Insbesondere war es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, die Sensitivität der bekannten Testverfahren zu erhöhen.

Lösung

Überraschenderweise hat sich herausgestellt, dass durch den Einsatz neuer, chemilumineszenter Agenzien zur Markierung von Salmonellen-spezifischen Antikörpern die Sensitivität der Testverfahren deutlich erhöht werden kann. So ist es mit dem Testverfahren unter Einsatz der erfindungsgemäßen Antikörper möglich, Salmonellen von einer Konzentration von 10 Zellen/ml zu detektieren. Das dergestaltete Testverfahren ermöglicht z.B. den Nachweis von Salmonellen in kontaminierten Proben nach nur 4 h Vorinkubationszeit, während bei allen bekannten kommerziellen Tests die Proben für mindestens 24 h kultiviert werden müssen.

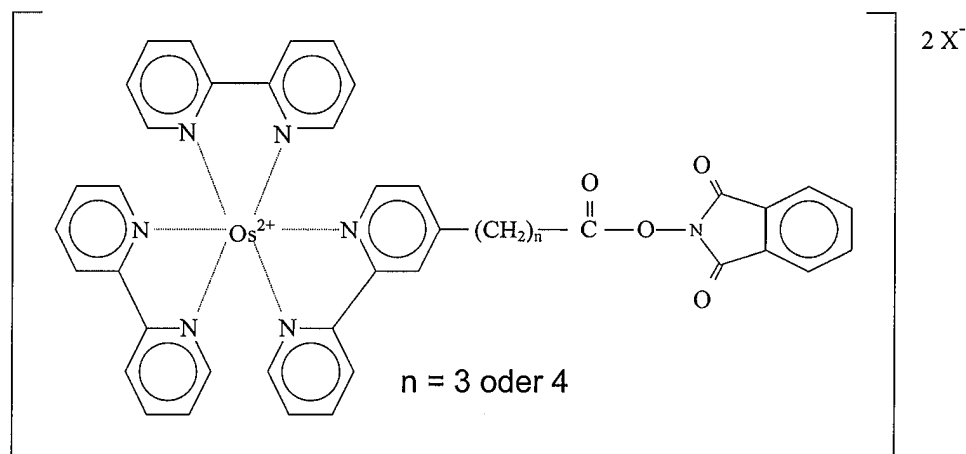
Aus DI gehen die erfindungsgemäßen Antikörper nicht hervor.

Auch die zur Markierung der Antikörper verwendeten substituierten Tris(2,2'-bipyridin)osmium-Komplexe sind Bestandteil der vorliegenden Erfindung. Tris(2,2'-bipyridin)osmium-Komplexe generell sind zwar im Stand der Technik bereits bekannt (J. Complex. Chem., Bd. 66, 1953, 44), und auch ihre Verwendung als chemilumineszente Agentien – allerdings in Leuchtdioden, einem technisch völlig anders gelagerten Gebiet – ist im Dokument DII beschrieben; allerdings werden die erfindungsgemäßen Substitutionsderivate bislang nicht aufgeführt.

Daher bezieht sich die vorliegende Erfindung in einem ersten Aspekt auf chemilumineszente Agenzien und Verfahren zu ihrer Herstellung. Diese Agenzien – die Tris(2,2'-bipyridin)osmium-Komplexe – müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllen, um zur Markierung von Antikörpern geeignet zu sein:

Die Verbindungen und Verfahren zu ihrer Herstellung sind in den Ansprüchen 1 – 4 beschrieben.

~~Der gewählte Antikörper wird mit einem~~ Das chemilumineszenten Agens markiert, das ist ein Tris(2,2'-bipyridin)osmium-Komplex. Diese Osmium-Komplexe sind bekannte chemilumineszente Agentien. Der Komplex als solcher bindet sich jedoch nicht an Antikörper und eignet sich daher nicht als Marker. Damit der Komplex als Marker benutzt werden kann, muß er mit einer Bindungsgruppe substituiert werden, die in der Lage ist, den Komplex an den Antikörper zu binden. Wie wir festgestellt haben, ist es erfindungswesentlich, als Bindungsgruppe einen Ester aus einer Carbonsäure mit 3 bis 8 Kohlenstoffatomen und N-Hydroxysuccinimid oder N-Hydroxyphthalimid zu verwenden. Ein Tris(2,2'-bipyridin)osmium-Komplex mit einer solchen Bindungsgruppe kann hergestellt werden, indem man zunächst ein Dichlor-bis(2,2'-bipyridin)osmium mit einem Carbonsäure-substituierten 2,2'-Bipyridin reagieren läßt (dieser erste Reaktionsschritt zur Herstellung des Markers ist veröffentlicht in J. Complex Chem. Bd. 66 (1953), 44), um einen Carbonsäure-substituierten Tris(2,2'-bipyridin)osmium-Komplex zu erhalten. Den Marker erhält man, indem man diesen Carbonsäure-substituierten Tris(2,2'-bipyridin)-Komplex in einem zweiten Schritt mit N-Hydroxysuccinimid oder N-Hydroxyphthalimid reagieren läßt, damit sich der mit dem Ester substituierte Tris(2,2'-bipyridin)-Komplex bildet. Besonders bevorzugt als Marker werden Verbindungen mit folgender Struktur:



Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung die mit diesen Komplexen markierten spezifischen Antikörper für Salmonellen.

Der unter Punkt c verwendete spezifische Antikörper ist ein Antikörper, der sich mit ausreichender Spezifität an Salmonellen bindet, so daß ein brauchbarer Test bereitgestellt werden kann. Der bevorzugte Antikörper ist ein monoklonaler Antikörper aus der Klasse der Proteine, die als Gamma-Immunglobuline (IgG) bezeichnet werden und von Kaninchen stammen. Der Antikörper kann mit an sich bekannten, herkömmlichen Techniken hergestellt werden und ist im Handel erhältlich.

Auch ein Verfahren zur Markierung der Antikörper ist ein Teil der vorliegenden Erfindung:

Ein geeignetes Schema zur Markierung des Antikörpers mit dem Tris(2,2'-bipyridin)osmium-Komplex umfaßt folgende Schritte:

- Auflösen des Antikörpers in einem Salzpuffer mit einem pH-Wert zwischen 8,0 und 9,5
- Hinzugeben dieser Antikörperlösung zum Marker (d. h. zum mit der Bindungsgruppe substituierten Osmium-Komplex), der in einem organischen Lösungsmittel aufgelöst ist, und gründliches Mischen der Bestandteile
- Rühren der Mischung für 5 bis 30 Minuten
- gegebenenfalls Reinigen der markierten Antikörperlösung.

Ausserdem ist ein wesentlicher Teil der vorliegenden Erfindung das Testverfahren selbst, in dem dieser Antikörper zum Einsatz kommt, sowie ein Testkit, der für dieses Verfahren bereitgestellt werden kann:

Wir haben nun einen sensitiveren Test für Salmonellen entwickelt, der auf der Verwendung eines der oben genannten Tris(2,2'-bipyridin)osmium-Komplexes als chemilumineszentem Marker beruht. Eine chemilumineszente Verbindung ist eine Verbindung, die infolge einer chemischen Reaktion Licht aussendet. Dieses Licht kann nachgewiesen werden.

Insbesondere stellen wir ein immunologisches Verfahren zum Nachweis von Salmonellen in einer Bakterienkultur oder einer kontaminierten Lebensmittelprobe bereit, das folgende Schritte umfaßt:

- a) Inkontaktbringen der zu testenden Probe mit einer Festphase während einer ersten Inkubationszeit, die so lang ist, daß sich die Bakterien auf oder in der Struktur der Festphase immobilisieren können,*
- b) ein erstes Waschen der Festphase mit den immobilisierten Bakterien zum Entfernen der ungebundenen Bakterien,*
- c) Inkontaktbringen der gewaschenen Festphase mit einem Antikörper, der mit einem chemilumineszenten Agens markiert ist, das einen substituierten, erfindungsgemäßen Tris(2,2'-bipyridin)osmium-Komplex umfaßt, während einer zweiten Inkubationszeit, die so lang ist, daß sich der markierte Antikörper an die Bakterien binden kann,*
- d) ein zweites Waschen der Festphase aus Schritt c zum Entfernen ungebundener markierter Antikörper und*
- e) die in Schritt d erhaltenen Festphase Bedingungen aussetzen, unter denen Licht erzeugt werden kann; die erzeugte Leuchtaktivität kann mit Hilfe eines geeigneten Geräts quantitativ gemessen werden.*

Das erfindungsgemäße Verfahren verwendet in Schritt a bevorzugt eine Festphase in Form von Kugeln, Röhrchen oder Mikrotiterplattenvertiefungen aus Polystyrol, Polyvinylchlorid, Nylon oder Agarose. Besonders bevorzugt wird als Festphase eine Mikrotiterplattenvertiefung aus Polystyrol.

Die Dauer der ersten Inkubationszeit liegt normalerweise zwischen 15 Minuten und 3 Stunden, und bevorzugt zwischen 20 Minuten und 2 Stunden 30 Minuten. Die Temperatur während der ersten Inkubationszeit beträgt bevorzugt von 20 °C bis 40 °C. Die Inkubation wird im allgemeinen in Gegenwart eines Puffers ausgeführt, der vorzugsweise ein Salzpuffer mit einem pH-Wert zwischen 8,0 und 9,5 ist.

Im allgemeinen erfolgt das in den Punkten b und d beschriebene Waschen jeweils unter Verwendung eines Puffers und bevorzugt eines Salzpuffers, der ebenfalls einen pH-Wert zwischen 8,0 und 9,5 erzeugt.

Die Dauer der zweiten Inkubationszeit in Schritt c unseres Verfahrens (in dem der markierte Antikörper den auf oder in der Struktur der Festphase immobilisierten Bakterien ausgesetzt wird) schwankt im allgemeinen zwischen 15 Minuten und 3 Stunden und liegt bevorzugt zwischen 20 Minuten und 2 Stunden 30 Minuten. Die Temperatur liegt vorzugsweise im Bereich von 20 °C bis 40 °C. Dieser Schritt wird im allgemeinen in Gegenwart eines Puffers ausgeführt, der bevorzugt ein Salzpuffer mit einem pH-Wert zwischen 8,0 und 9,5 ist.

Im abschließenden Schritt e des erfindungsgemäßen Verfahrens findet bei dem markierten Antikörper, der an die nachzuweisenden Bakterien gebunden ist, eine Leuchtreaktion statt. Eine Aktivierungslösung wird mit den an die Bakterien gebundenen markierten Antikörpern in Kontakt gebracht. Dies veranlaßt den Osmium-Komplex zu einer Lichtemission. Die Aktivierungslösung ist typischerweise eine wäßrige Lösung aus Natriumoxalat (0,05 M) und Wasserstoffperoxid (0,02 M). Die Intensität der Lichtemission ist proportional zur Konzentration des Osmium-Komplexes und somit zur Zahl der vorhandenen Bakterien. Die Intensität der Lichtemission kann mit Hilfe eines Luminometers gemessen werden. Die Zahl der in der Probe vorhandenen Bakterien ist proportional zu den mit dem Luminometer gemessenen relativen Lichteinheiten ("relative light units" = RLU). Eine stark mit Salmonellen kontaminierte Probe ergibt eine hohe RLU-Messung, eine negative Probe hingegen eine sehr niedrige.

Der Salmonellentest kann als Testkit zum Nachweis von Salmonellen in einer Bakterienkultur oder einer kontaminierten Lebensmittelprobe bereitgestellt werden, der folgendes enthält:

- *eine Festphase, bevorzugt als Mikrotiterplattenvertiefung*
- *einen Antikörper (bevorzugt einen monoklonalen Antikörper des IgG-Typs), der durch Kopplung an einen Tris(2,2'-bipyridin)osmium-Komplex markiert ist*
- *eine wäßrige Lösung aus Natriumoxalat (0,05 M) und Wasserstoffperoxid (0,02 M).*

Zur weiteren Veranschaulichung der vorliegenden Erfindung und ihrer Vorteile werden die folgenden Beispiele beschrieben, die selbstverständlich rein illustrativ und keineswegs erschöpfend sein sollen.

BEISPIEL I

Herstellung des bis(Hexafluorophosphat)salzes von bis(2,2'-Bipyridin)(2,2'-bipyridin-4-butansäure)-osmium, wie aus J. Complex Chem. Bd. 66 (1953), 44 bekannt.

Natriumbicarbonat (0,40 g), Osmium-dichlorbis(2,2'-bipyridin) (0,40 g) und 2,2'-Bipyridin-4-butansäure (0,30 g) wurden 9 Stunden lang in Methanol (20 ml) und Wasser (5 ml) unter Rückfluß gerührt. Die daraus entstandene Lösung wurde in einem Eisbad gekühlt, mit 5 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure behandelt und bei Eistemperatur 1,5 Stunden lang ruhen gelassen. Es bildete sich ein Niederschlag, der abfiltriert und mit Methanol (8 ml) gewaschen wurde.

Das Filtrat und die Waschlösung wurden vereinigt und mit einer Lösung von Natriumhexafluorophosphat (5,0 g) in Wasser (25 ml) behandelt. Die daraus entstandene Lösung wurde 3 Stunden in einem Eisbad gekühlt, und der entstandene Niederschlag aus purpurroten Kristallen wurde abfiltriert (0,40 g).

BEISPIEL II

Herstellung eines Esters aus N-Hydroxyphthalimid und des bis(Hexafluorophosphat)salzes von bis(2,2'-Bipyridin)(2,2'-bipyridin-4-butansäure)-osmium

Dicyclohexylcarbodiimid (DCC, 0,046 g) und N-Hydroxyphthalimid (0,034 g) wurden unter Rühren in Dimethylformamid (DMF, 2 ml) aufgelöst und in einem Eisbad gekühlt. Eine Lösung des bis(Hexafluorophosphat)salzes von bis(2,2'-Bipyridin)(2,2'-bipyridin-4-butansäure)-osmium (0,101 g, Herstellung wie in Beispiel I) in DMF (1 ml) wurde hinzugefügt und die Mischung 5 Stunden bei Eisbadtemperatur gerührt. Es bildete sich ein Niederschlag, der durch Zentrifugieren abgetrennt wurde. Der Überstand, der den Ester des Osmium-Komplexes enthält, wurde zurückbehalten und wird als Marker benutzt.

BEISPIEL III

Herstellung eines Antikörpers

Der verwendete Antikörper war ein monoklonaler Antikörper des Typs IgG gegen Salmonellen. Dieser Antikörper wurde auf an sich bekannte Weise als reine Lösung hergestellt.

Markierung eines monoklonalen Antikörpers des Typs IgG gegen Salmonellen mit einem Osmium-Komplex

Die in Beispiel 2 hergestellte Lösung des Esters aus N-Hydroxyphthalimid und dem bis(Hexafluorophosphat)salz von bis(2,2'-Bipyridin)(2,2'-bipyridin-4-butansäure)-osmium (1 ml) wurde zu einer gerührten Lösung von IgG in wässriger gepufferter physiologischer Salzlösung (PBS, 5 ml, pH: 9,0; 25mg/ml IgG) hinzugefügt. Die Mischung wurde 20 Minuten gerührt und der Niederschlag durch Zentrifugieren entfernt. Der Überstand, der mit Osmium markiertes IgG enthielt, wurde zurückbehalten.

Der Erfolg der Markierungsreaktion wurde getestet, indem die mit Osmium markierte IgG-Lösung gegen PBS-Lösung dialysiert wurde. Zur Kontrolle wurde der in Beispiel II hergestellte, ungebundene aktivierte Osmium-Komplex ebenfalls gegen PBS dialysiert. Nach 8 Stunden zeigte die Kontrollprobe keine Fluoreszenz im Dialyseschlauch. Die mit Osmium markierte IgG-Lösung jedoch wies starke Fluoreszenz auf und zeigte damit, daß der Osmium-Komplex an das IgG gebunden war

BEISPIEL IV

Nachweis von Salmonellen

Folgende Methodik wurde angewandt:

- a) Eine Probe mit Salmonellen wird in die Vertiefungen einer Polystyrol-Mikrotiterplatte gegeben (0,1 ml/Vertiefung). Es erfolgt eine Inkubation von 30 Minuten bei 37 °C in Gegenwart eines Tris-Puffers (pH: 9,2).*
- b) Die Mikrotiterplatte wird dann fünfmal mit PBS-Puffer (pH: 9,0) gewaschen, der 0,05 % Tween 20-Detergens (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat) enthält.*
- c) Ein mit einem (2,2'-Bipyridin)-osmium-Komplex markierter Antikörper (wie in Beispiel 3 hergestellt) wird hinzugefügt (0,1 ml/Vertiefung) und 30 Minuten bei 37 °C in Gegenwart eines Tris-Puffers (pH 9,2) inkubiert.*
- d) Die Platte wird wie in Schritt b gewaschen.*
- e) Die Lumineszenz wird mit einem LB96P-Luminometer gemessen, das automatisch eine wäßrige Lösung von Natriumoxalat (0,05 M) und Wasserstoffperoxid (0,02 M) in jede Vertiefung der Platte gibt.*

Das Verfahren wurde unter Verwendung von Antikörpern wiederholt, die mit mehreren verschiedenen handelsüblichen fluoreszierenden Markern markiert waren, und die Sensitivität der markierten Antikörper wurde verglichen. Bei jedem markierten Antikörper gab es eine Kontrollvertiefung, die derselben Schrittfolge unterworfen wurde, in die aber keine Bakterien gegeben wurden. Als positives Ergebnis gilt ein Signal, das eine RLU-Stärke von mindestens 20 % über dem von der Kontrollvertiefung erhaltenen Signal aufweist. Eine Reihe von Proben mit bekannten Bakterienmengen wurde getestet, und für jeden der getesteten Marker wurde die niedrigste nachweisbare Bakterienkonzentration bestimmt.

Verwendeter Marker	Nachweisgrenze (Bakterien/ml)
<i>Ester aus N-Hydroxyphthalimid und dem bis(Hexafluorophosphat)salz von bis(2,2'-Bipyridin)(2,2'-bipyridin-4-butansäure)-osmium</i>	10
<i>Acridiniumester</i>	100
<i>Fluorescillium</i>	700
<i>Bacdetect</i>	400
<i>Glowdark</i>	3 000

BEISPIEL V

Eine Lebensmittelprobe (Rinderhackfleisch) wurde künstlich mit Salmonellen kontaminiert. Das Fleisch wurde in Portionen zu jeweils 25 g geteilt und mit einer gleichen Menge von Tris-Puffer (pH: 9,2) vermischt. Eine kontrollierte Menge von Bakterien wurde zu jeder Probe hinzugefügt, und die Proben wurden gut geschüttelt und 4 Stunden bei 37 °C kultiviert. Die kultivierten Proben wurden durch eine Membran mit Öffnungen von 10 Mikrometern gefiltert, um das Fleisch von den Bakterien zu trennen, und die erhaltene Flüssigkeit wurde unter Verwendung des in Beispiel 3 hergestellten markierten Antikörpers und des Verfahrens nach Beispiel 4 getestet.

Die Proben führten alle zu positiven Ergebnissen. Bei allen bekannten kommerziellen Tests müssen die Proben für mindestens 24 Stunden kultiviert werden; somit kann unser Test den Zeitaufwand für das Testen von Lebensmittelproben erheblich reduzieren.

~~Mit freundlichen Grüßen~~

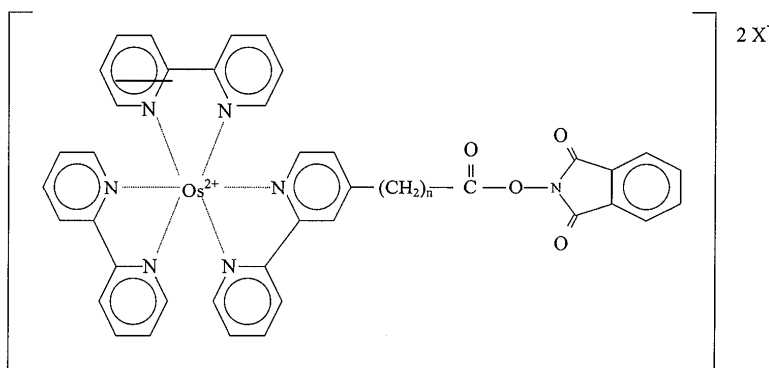
~~D. Belly~~

~~Produktentwicklung~~

~~Montezuma PLC~~

Ansprüche

1. Tris-(2,2'-bipyridin)osmium-Komplex, substituiert mit einem Ester aus einer C₃-C₈-Carbonsäure mit N-Hydroxysuccinimid oder N-Hydroxyphthalimid.
2. Substituierter Tris-(2,2'-bipyridin)osmium-Komplex nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch folgende Struktur:



wobei n 3 oder 4 ist.

3. Verfahren zur Herstellung substituierter Tris-(2,2'-bipyridin)osmium-Komplexe gemäß Anspruch 1 oder 2, in dem ein mit einer C₃-C₈-Carbonsäure substituierter Tris-(2,2'-bipyridin)osmium-Komplex mit N-Hydroxysuccinimid oder N-Hydroxyphthalimid umgesetzt wird.
4. Verfahren gemäß Anspruch 3, wobei der mit einer C₃-C₈-Carbonsäure substituierter Tris-(2,2'-bipyridin)osmium-Komplex durch Reaktion eines Dichlor-bis(2,2'-bipyridin)osmium mit einem mit einer C₃-C₈-Carbonsäure substituierten 2,2'-Bipyridin hergestellt wird.
5. Mit einem chemilumineszenten Agens markierter Antikörper, der für Salmonellen spezifisch ist, dadurch gekennzeichnet, dass das chemilumineszente Agens ein substituierter Tris-(2,2'-bipyridin)osmium-Komplex gemäß Anspruch 1 oder 2 ist.
6. Antikörper gemäß Anspruch 5, wobei als Antikörper ein monoklonaler Antikörper aus der Klasse der Gamma-Immunglobuline (IgG), der vom Kaninchen stammt, ausgewählt ist.

7. Verfahren zur Herstellung eines markierten Antikörpers entsprechend Anspruch 5 oder 6, das durch folgende Schritte gekennzeichnet ist:

- a) Auflösen eines für Salmonellen spezifischen Antikörpers in einem Salzpuffer mit einem pH-Wert zwischen 8,0 und 9,5,
- b) Hinzugeben dieser Antikörperlösung zu einem Marker, der in einem organischen Lösungsmittel aufgelöst ist, und gründliches Mischen der Bestandteile,
- c) Rühren der Mischung für 5 bis 30 Minuten, und
- d) gegebenenfalls Reinigen der markierten Antikörperlösung,

wobei als Marker ein substituierter Tris-(2,2'-bipyridin)osmium-Komplex gemäß Anspruch 1 oder 2 verwendet wird.

8. Verfahren zum Nachweis von Salmonellen in einer Kultur oder einer kontaminierten Lebensmittelprobe, das folgende Schritte umfaßt:

- a) Inkontaktbringen der zu testenden Probe mit einer Festphase während einer ersten Inkubationszeit, die so lang ist, daß sich die Bakterien auf oder in der Struktur der Festphase immobilisieren können,
- b) ein erstes Waschen der Festphase mit den immobilisierten Bakterien zum Entfernen der ungebundenen Bakterien,
- c) Inkontaktbringen der gewaschenen Festphase mit einem für Salmonellen spezifischen Antikörper, ~~der durch Kopplung an~~ mit einem chemilumineszenten Agens markiert ist, ~~das ein Acridinium-Derivat umfaßt~~, während einer zweiten Inkubationszeit, die so lang ist, daß sich der markierte Antikörper an die Bakterien binden kann,
- d) ein zweites Waschen der Festphase aus Schritt c zum Entfernen ungebundener markierter Antikörper und
- e) die in Schritt d erhaltene Festphase Bedingungen aussetzen, unter denen Licht erzeugt werden kann; die erzeugte Leuchtaktivität kann mit Hilfe eines geeigneten Geräts quantitativ gemessen werden,

dadurch gekennzeichnet, dass der spezifische, mit einem chemilumineszenten Agens markierte Antikörper ein Antikörper entsprechend Anspruch 5 oder 6 ist.

9. Verfahren gemäß Anspruch 8, wobei in Schritt a eine Festphase in Form von Kugeln, Röhrchen oder Mikrotiterplattenvertiefungen aus Polystyrol, Polyvinylchlorid, Nylon oder Agarose, insbesondere eine Mikrotiterplattenvertiefung aus Polystyrol, verwendet wird.

10. Verfahren gemäß Anspruch 8 oder 9, wobei die Inkubationszeiten in Schritt a und c durch folgende Parameter gekennzeichnet sind:

- die Dauer der Inkubationszeit beträgt zwischen 15 min und 3 h, bevorzugt zwischen 20 min und 2 h 30 min;
- die Temperatur beträgt von 20 °C bis 40 °C;
- die Inkubation wird in Gegenwart eines Puffers, bevorzugt eines Salzpuffer mit einem pH-Wert zwischen 8,0 und 9,5, ausgeführt.

11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10, wobei die an die Bakterien gebundenen markierten Antikörper mit einer Aktivierungslösung, bevorzugt eine wäßrige Lösung aus 0,05 M Natriumoxalat und 0,02 M Wasserstoffperoxid, in Kontakt gebracht werden und die entstehende Lichtemission in ihrer Intensität bestimmt wird.

12. *Testkit zum Nachweis von Salmonellen in einer Kultur oder in einer kontaminierten Lebensmittelprobe, umfassend:*

- *eine Festphase,*
- *einen Antikörper des ~~LgG~~-Typs, ~~der durch Kopplung an ein Acridinium-Derivat markiert ist,~~ und*
- *eine ~~verdünnte~~ wäßrige Lösung aus Natriumoxalat (0,05 M) und Wasserstoffperoxid (0,02 M),*

dadurch gekennzeichnet, dass als Antikörper ein Antikörper entsprechend Anspruch 5 oder 6 eingesetzt wird.

Anmerkungen an den Prüfer

Zu DII:

Die Auflistung der Osmium-Komplexe ist in der deutschen und englischen Version (d: S.19, Z 25-27 und englisch: S. 19, Z 21-24) unterschiedlich. Meiner Ansicht nach ist die englische Version korrekt und wurde daher von mir verwendet.

Zu den Antikörper Ansprüchen:

Die Ansprüche wurden auf Salmonellen-spezifische AK begrenzt, da auch nur diese in der Anmeldung offenbart sind. Theoretisch ist diese Art der Markierung wohl für viele Arten der AK denkbar -> in der Praxis würde ich entsprechend breitere Ansprüche (+ entsprechende Beschreibung) verfassen.

Zu der Spezifität der Antikörper (Ansprüche 5, 7, 8, 12):

-> Ich habe den Ausdruck „für Salmonellen spezifischer Antikörper“ gewählt, um damit die auf Seite 4, Zeile 1-3 dargestellte Bedingung auszudrücken, dass der Antikörper mit „ausreichender Spezifität an Salmonellen bindet, so dass ein brauchbarer Test bereitgestellt werden kann“. Dieses „spezifisch“ meint keine absolute Spezifität; daher habe ich dieses Merkmal entsprechend in der Beschreibung erläutert.