

## **IMMUNOASSAYS IN DER UMWELTANALYTIK**

**Vergleich verschiedener in Österreich  
kommerziell erhältlicher Triazin-Immunoassays**



## **Immunoassays in der Umweltanalytik**

Vergleich verschiedener in Österreich kommerziell  
erhältlicher Triazin-Immunoassays

**UBA-BE-052**

Wien, Jänner 1996

Bundesministerium für Umwelt



Autoren: Fritz Grone unter Mitarbeit von Susanne Schmid

Projektleitung: Sigrid Scharf

Analytik: Fritz Grone

Textgestaltung/Layout: Fritz Grone

**Danksagung:**

Allen voran möchten sich die Autoren bei Herrn Dr. G. Kirchner (MA 15, Institut für Umweltmedizin der Gemeinde Wien) für seine zur Verfügung gestellten Unterlagen, das Einbringen seiner vieljährigen Erfahrung auf dem Gebiet der Immunoassays in zahlreichen fachlichen Diskussionen und die wertvollen Anregungen zu dieser Studie bedanken.

Großer Dank gebührt auch der Stadtwerke Mainz AG und Herrn Univ. Prof. Dr. B. Hock (Lehrstuhl f. Botanik - Weihenstephan, TU München) für die Bereitstellung der dotierten Wasserproben sowie die Überlassung der GC/MS-Meßergebnisse, anlässlich eines von ihm durchgeführten Ringversuches (HOCK B. et al, in press).

Bedanken möchten sich die Autoren auch bei der Fa. Laborpartner, die eine Dynatech MRX Relevation Photometer- und Auswerteeinheit zur Verfügung stellte.

**Impressum**

Medieninhaber und Herausgeber: Umweltbundesamt, Spittelauer Lände 5, A-1090 Wien  
Eigenvervielfältigung

© Umweltbundesamt, Wien, 1996  
Alle Rechte vorbehalten (all rights reserved)  
ISBN 3-85457-289-1

## **INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Vorteile und Nachteile der Verwendung von Immunoassays beim Monitoring umweltrelevanter Analyte .....	1
1.2	Geschichtliche Entwicklung der Immunoassays .....	3
1.3	Prinzip eines kompetitiven ELISA .....	4
<b>2.</b>	<b>Auswertemethoden für ELISAs .....</b>	<b>6</b>
2.1	Prinzipielles zu den Auswertemethoden und den Meßdaten .....	6
2.2	Beschreibung der angewendeten Auswertemethoden .....	7
2.3	Bestimmung von Nachweisgrenzen / Arbeitsbereich .....	12
2.4	Vergleich der Auswertemethoden.....	13
2.5	Reproduzierbarkeit, Präzision.....	14
<b>3.</b>	<b>Vergleich der Testkits .....</b>	<b>15</b>
3.1	Millipore - Envirogard™ Triazin-ELISA.....	15
3.1.1	Firmenangaben zum ELISA Kit .....	15
3.1.2	Inhalt des Testkits und zusätzlich benötigte Geräte .....	16
3.1.3	Testdurchführung und Handhabung .....	16
3.1.4	Messung von dotierten Proben und deren Ergebnisse mit verschiedenen Auswertemöglichkeiten .....	18
3.1.5	Reproduzierbarkeit, Präzision.....	20
3.2	Millipore - Envirogard™ High Sensitivity Triazin-ELISA .....	22
3.2.1	Firmenangaben zum ELISA Kit .....	22
3.2.2	Inhalt des Testkits und zusätzlich benötigte Geräte .....	22
3.2.3	Testdurchführung und Handhabung .....	23
3.2.4	Messung von dotierten Proben und deren Ergebnisse mit verschiedenen Auswertemöglichkeiten .....	24
3.2.5	Reproduzierbarkeit, Präzision.....	26

3.3	Quantix - Triazine <u>0.1</u> <sup>HS</sup> .....	27
3.3.1	Firmenangaben zum ELISA Kit .....	27
3.3.2	Inhalt des Testkits und zusätzlich benötigte Geräte .....	27
3.3.3	Testdurchführung und Handhabung .....	28
3.3.4	Messung von dotierten Proben und deren Ergebnisse mit verschiedenen Auswertemöglichkeiten .....	29
3.3.5	Reproduzierbarkeit, Präzision .....	30
3.4	Quantix - Atrazine <u>0.1</u> <sup>HS</sup> .....	32
3.4.1	Firmenangaben zum ELISA Kit .....	32
3.4.2	Inhalt des Testkits und zusätzlich benötigte Geräte .....	32
3.4.3	Testdurchführung und Handhabung .....	32
3.4.4	Messung von dotierten Proben und deren Ergebnisse mit verschiedenen Auswertemöglichkeiten .....	33
3.4.5	Reproduzierbarkeit, Präzision .....	35
3.5	r-Biopharm - Ridascreen <sup>(R)</sup> .....	37
3.5.1	Firmenangaben zum ELISA Kit .....	37
3.5.2	Inhalt des Testkits und zusätzlich benötigte Geräte .....	37
3.5.3	Testdurchführung und Handhabung .....	38
3.5.4	Messung von dotierten Proben und deren Ergebnisse mit verschiedenen Auswertemöglichkeiten .....	39
3.5.5	Reproduzierbarkeit, Präzision .....	41
3.6	Riedel-de Haën - Triazin ELISA .....	43
3.6.1	Firmenangaben zum ELISA Kit .....	43
3.6.2	Inhalt des Testkits und zusätzlich benötigte Geräte .....	43
3.6.3	Testdurchführung und Handhabung .....	44
3.6.4	Messung von dotierten Proben und deren Ergebnisse mit verschiedenen Auswertemöglichkeiten .....	45
3.6.5	Reproduzierbarkeit, Präzision .....	47

3.7	Transia - Triazine Dosage Kit .....	49
3.7.1	Firmenangaben zum ELISA Kit .....	49
3.7.2	Inhalt des Testkits und zusätzlich benötigte Geräte .....	49
3.7.3	Testdurchführung und Handhabung.....	50
3.7.4	Messung von dotierten Proben und deren Ergebnisse mit verschiedenen Auswertemöglichkeiten.....	51
3.7.5	Reproduzierbarkeit, Präzision.....	53
<b>4.</b>	<b>Überblick der zum Zeitpunkt der Untersuchungen in Österreich kommerziell erhältlichen Testkits für Triazine .....</b>	<b>55</b>
4.1	Vertrieb der Testkits, Inhalt, Zeitbedarf und Nachweisgrenzen .....	55
4.2	Kreuzreaktivitäten der Triazine .....	56
4.3	Überblick über die in der Studie verwendeten Auswertemodelle .....	57
4.4	Streuung, Intraassay- und Interassaypräzision der einzelnen Kits .....	57
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>58</b>
5.1	Zusammenfassung der Testergebnisse.....	58
5.2	Ausblick .....	59
<b>6.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>60</b>
6.1	Begriffsdefinitionen .....	60
6.2	Herleitung der Linearisierung der 4-Parameter- Funktion (logit).....	64
6.3	Literaturverzeichnis.....	65
6.4	Tabellenverzeichnis .....	80
6.5	Abbildungsverzeichnis .....	81
6.6	Formelverzeichnis.....	82
6.7	Bezugsquellen .....	83



## 1. EINLEITUNG

Das Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften Nr. L 229/11 „Richtlinie des Rates vom 15. Juli 1980 über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (80/778/EWG)“ sieht unter anderem vor:

„Um die Konzentrationswerte der verschiedenen Parameter überprüfen zu können, *ist dafür zu sorgen*, daß die Mitgliedstaaten alle erforderlichen Maßnahmen für eine *systematische Überwachung der Qualität des Wassers* für den menschlichen Gebrauch ergreifen.“

Die EU-Richtlinie versteht unter Pestiziden und ähnlichen Produkten Insektenvertilgungsmittel wie beständige organische Chlorverbindungen (z.B. Triazine), organische Phosphorverbindungen, sowie Carbamate, Unkrautvertilgungsmittel, Fungizide, PCB und PCT.

In Österreich werden in der Trinkwasser-Pestizidverordnung (BGBl 448/1991) für Pestizide und sonstige Pflanzenschutzwirkstoffe Grenzwerte von 0,1 µg/l festgelegt. In der Grundwasserschwellenwertverordnung (BGBl 502/1991) gilt ebenfalls 0,1 µg/l je Pestizid als zulässige Höchstkonzentration. Die zu überwachenden Pestizide und Pflanzenschutzwirkstoffe werden in den jeweiligen Gesetzen taxativ aufgezählt.

Eine systematische Überwachung des Grundwassers auf diese Stoffe sollte möglichst effizient, rasch und kostengünstig durchgeführt werden können. Die in dieser Studie beschriebene immunologische Bestimmungsmethode kann für ein Monitoring (z.B. auf Pestizide) eingesetzt werden. Die Vor- und Nachteile dieser in der Umweltanalytik relativ neuen Analysetechnik werden anhand von Triazin-Immunoassaysystemen, die in Österreich von mehreren Firmen angeboten werden, aufgezeigt. Die Testsysteme wurden unter Einhaltung gewisser Rahmenbedingungen bezüglich ihrer Verfahrenskenndaten geprüft; die Ergebnisse werden in dieser Studie dargestellt.

### 1.1 Vorteile und Nachteile der Verwendung von Immunoassays beim Monitoring umweltrelevanter Analyte

Da die Vorgaben der EU-Richtlinie sowie der Wassergüte-Erhebungsverordnung eine systematische Überwachung des Trink- bzw. Grundwassers fordern (im US-amerikanischen Raum sollen Böden sowie Grund- und Oberflächenwasser ebenfalls systematisch untersucht werden), bereitet es für die zuständigen Stellen immer größere Schwierigkeiten, mit zeitaufwendigen GC- und LC-Methoden die wachsende Probenanzahl auch nur mit annähernd gleichbleibenden finanziellen und personellen Ressourcen zu bewerkstelligen (VANDERLAAN M. et al, 1988).

Von den Auftraggebern werden bezüglich der enorm hohen Kosten von Analysen immer folgende Punkte kritisiert:

- zu wenige Parameter werden überwacht
- die Anzahl der analysierten Proben ist zu gering, wodurch nicht jede Kontaminierung des Wassers mit Sicherheit detektiert werden kann
- zwischen Probenahme und Vorlage von Ergebnissen vergeht zu viel Zeit

Diese Kritikpunkte sind auf die Kosten der teilweise aufwendigen, herkömmlich angewandten Methoden, sowie den Zeitbedarf moderner Multirückstandsanalytik zurückzuführen. Um alle geforderten Parameter mit einzelanalytischen Methoden bestimmen zu können, reicht es weiters in den seltensten Fällen aus, die Proben nur einer Aufarbeitung zu unterziehen. Um dennoch die gesamte Palette aller interessanten Parameter abdecken zu können, muß die Probe verschieden aufgearbeitet werden, bevor sie analysiert werden kann. Dies erhöht die Kosten und den Zeitbedarf und bringt weitere Schwierigkeiten mit sich, da die benötigte Probemenge größer wird. Das kann bei einem notwendigen Transport der Proben in das Labor, vielleicht auch noch in gekühltem oder gefrorenem Zustand, ein erhebliches logistisches Problem darstellen. Manchmal ist die erforderliche Probenmenge gar nicht verfügbar und die „traditionelle Analytik“ muß auf eine Bestimmung verzichten; man denke nur an die Aerosolanalytik in der Atmosphäre oder an Pflanzenteile, die nicht in beliebiger Menge als Probe genommen werden können. Außerdem muß natürlich nach einer Analyse allfälliges Probematerial wieder entsorgt werden.

All diese Überlegungen führen zwangsläufig zur Suche nach effektiveren, kostengünstigeren, schnelleren und automatisierbaren Rückstandsanalytik-Methoden.

Die medizinische Labor-Diagnostik, vor allem im Bereich der Serumanalytik, hat schon seit längerer Zeit genau die gleichen Aufgabenstellungen, wie die große Anzahl an Proben, viele relevante Parameter und die möglichst rasche Verfügbarkeit der Ergebnisse, gelöst: mit Hilfe von Immunoassays werden diese Aufgaben in medizinisch-diagnostischen Labors bewältigt.

Warum sollte man also in der Umweltanalytik dieses Verfahren nicht auch einsetzen...?

Vorteile von Immunoassays:

- geringe Probenmenge (1ml für 4-fach Bestimmung)
- keine Anreicherung des Analyten erforderlich
- kostengünstig
- bessere Transportlogistik aufgrund kleinerer Probenmenge bzw. Entfall des Transports durch „Vor-Ort-Analytik“
- schnelles Verfahren, da Probenvorbereitung und Aufarbeitung entfallen
- viele Parallelmessungen in kurzer Zeit möglich
- die Kalibrationskurven werden gleichzeitig unter gleichen Bedingungen ermittelt
- als Entscheidungshilfe für eine effiziente Probenahme vor Ort verwendbar
- hochempfindliche Methode (fmol)
- polare bzw. schwer extrahierbare Stoffe können gemessen werden
- keine falsch negativen Ergebnisse bei Verwendung als Screening-Test

Umweltanalytische Immunoassays haben jedoch auch Nachteile (Problematik von Haptenen):

- Querempfindlichkeit gegenüber strukturverwandten Stoffen (Kreuzreaktivität)
- sie sind keine Multimethode für verschiedenste Analyte
- aufwendige Entwicklung

So könnten Enzymimmunoassays eine Entscheidungshilfe bei der Probenahme vor Ort bieten. Die vorher erwähnte komplexe Logistik eines Probentransportes ins Labor könnte bei vielen Proben durch Screening vor Ort vereinfacht werden.

## 1.2 Geschichtliche Entwicklung der Immunoassays

Im Jahr 1959 wurde von Yalow und Berson zum ersten Mal das Prinzip eines immunologischen Verfahrens zu Bestimmung von Insulin in Blutplasma beschrieben, wofür ihnen auch der Nobelpreis verliehen wurde (YALOW R.S. und BERSON S.A., 1960). Grundlage für das entwickelte Verfahren war die Beobachtung, daß radioaktiv markiertes Insulin von einer Proteinfraction des Serums - den für Insulin spezifischen Antikörpern - gebunden wird und daß die Anzahl dieser Bindungen durch Zusatz von unmarkiertem Insulin beeinflusst werden kann. Dabei dient die radioaktive Markierung als meßbares Signal für die Anzahl der Bindungen zwischen Antikörper und Antigen.

Alle als „kompetitiv“ bezeichneten Immunoassays basieren auf der Konkurrenzreaktion zwischen markiertem und unmarkiertem Antigen um die im Unterschluß vorliegenden Bindungsstellen an Antikörpern.

Der Radioimmunoassay (RIA) stand am Anfang der Entwicklung der Immunoassays. Heute noch hat der RIA Bedeutung bei der quantitativen Bestimmung gewisser Hormone (z.B. für die Funktionsdiagnostik der Schilddrüse), sowie bei der Titerbestimmung viraler Antigene oder spezifischer Antikörper. Jedoch wird er aufgrund der mit radioaktiven Substanzen verbundenen Umweltproblematik und der daraus resultierenden Ablehnung der Verwendung radioaktiver Marker durch Immunoassays mit anderen Tracern abgelöst.

Es wurden viele Verfahren getestet, die die Vorteile der immunologischen Reaktion ohne Verwendung von radioaktiver Markierung bieten sollten. So wurden Bakteriophagen (HAIMOVICH J. et al, 1970), Erythrocyten (ALDER F.L. et al, 1971), stabile freie Radikale (LEUTE R. et al, 1972), fluoreszierende Moleküle (ULLMANN E.F. et al, 1976), chemolumineszente Substanzen (SCHROEDER H.R. et al, 1976), Latex-Partikel (CAMBIASO C.L. et al, 1977) und Metallionen (CAIS M. et al, 1977) für verschiedenartige Nachweisverfahren verwendet.

Der erste mit Enzymen markierte Immunoassay (EIA) wurde unabhängig von Engvall und Perlmann für die Bestimmung von Immunglobulin G (IgG) (ENGVALL E. et al, 1971, 1972) sowie von Van Weemen und Schuurs für die Bestimmung von Östrogen (VAN WEEMEN B.K. et al, 1971, 1975) 1971 entwickelt, wobei zu erwähnen ist, daß Enzyme schon früher als Marker in der Immunchemie verwendet worden sind (NAKANE P.K. et al, 1966).

Ebenfalls 1971 diskutierte Ercegovich den Einsatz von Immunoassays in der Umweltanalytik, z.B. für die Bestimmung von DDT, Malathion und Aminotriazol (ERCEGOVICH C.D., 1971).

Das eigentliche Problem der Entwicklung solcher Immunoassays liegt in der Größe der Moleküle, die damit nachgewiesen werden sollen. Ein Antigen in einem tierischen Organismus ist befähigt, Antikörper hervorzubringen (siehe Begriffsdefinitionen); Moleküle unter 1000 Dalton Molekulargewicht, wie z.B. Atrazin, könne dies nicht (LANDSTEIN K., 1945). (Da bei Substanzen mit niedrigem Molekulargewicht der Begriff Antigen irreführend wäre, nennt man solche Moleküle in Zusammenhang mit Immun-Reaktionen Haptene.)

Haptene wurden 1980 von Hammock und Mumma an Proteine gekoppelt und damit Hapten-Protein-Konjugate synthetisiert. Mit Hilfe derartiger Immunogene war es nun möglich, polyklonale Antikörper durch die Immunreaktion eines tierischen Organismus zu erhalten (HAMMOCK B.D. et al, 1980).

Durch Auswahl geeigneter Hapten-Derivate in solchen Immunogenen kann man Antikörper erhalten, deren Spezifität entweder auf eine bestimmte Verbindungsklasse oder auf einzelne Strukturelemente gerichtet sind. Die beschriebene Vorgehensweise liefert polyklonale Antikörper, d.h. das produzierte Antiserum enthält ein Gemisch von Antikörperpopulationen mit unterschiedlicher Affinität und Spezifität.

Häufig werden nun monoklonale Antikörper verwendet. Diese immunologisch homogenen Antikörper werden mittels Zellkultur in vitro erzeugt. Der große Vorteil liegt in der unbegrenzten Menge zur Verfügung stehender Antikörper (GODING J.W., 1983 und KÖHLER G., 1975).

Da sich diese Studie ausschließlich mit kompetitiven Enzymimmunoassays und hier wiederum nur mit ELISAs (Enzym Linked Immunosorbent Assays) beschäftigt, wird nur näher auf das Prinzip dieser Immunoassays eingegangen. In der im Anhang angeführten Literatur finden sich auch Beschreibungen der anderen Enzymimmunoassays (CHAN D.W. et al, 1987; NIESSNER R., 1993; HOCK B., 1993; O'SULLIVAN M.J., 1984)

### 1.3 Prinzip eines kompetitiven ELISA

Das Prinzip der in dieser Studie verwendeten ELISAs beruht darauf, daß eine unbekannte Zahl von Haptenen (hier: Pestizid-Moleküle, AG) in einer Probe mit einer bekannten Zahl zugefügter Hapten-Enzym-Konjugate (markiertes Antigen, AG\*) um eine begrenzte, im Unterschuß vorliegende Zahl von Bindungsplätzen der Antikörper (AK) konkurrieren.

Je nachdem, ob mehr oder weniger Hapten in der Probe vorhanden ist, wird auch umgekehrt proportional weniger oder mehr Hapten-Enzym-Konjugat an die Antikörper gebunden. Eine Gleichgewichtsreaktion liegt vor.



Die ungebundenen Immunreaktanden werden in einem Waschschrift entfernt und das Verhältnis von gebundenem Hapten zu gebundenem Hapten-Enzym-Konjugat wird durch eine enzymatische Farbreaktion bestimmt. Zugegebenes Substrat (S) wird durch Enzyme (der Enzym-Hapten-Konjugate) in ein farbiges Endprodukt umgesetzt. Die daraus resultierende Farbintensität kann photometrisch bestimmt werden.

Die Farbintensität wächst umgekehrt proportional zur vorhandenen Konzentration des Haptens in der Probe (siehe Abb. 1).

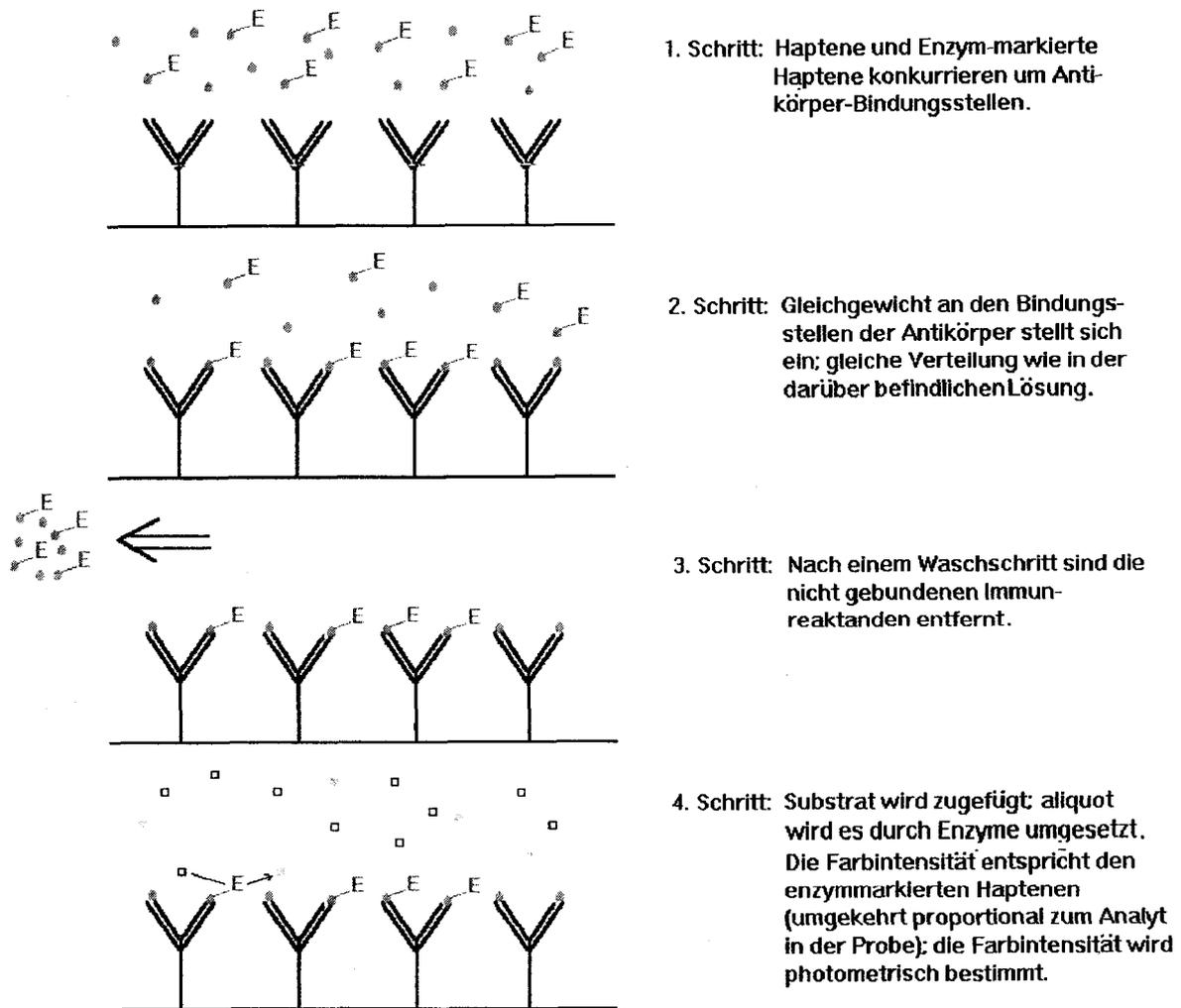


Abb. 1

Im Vergleich zur „herkömmlichen Einzelanalytik“ kommt es jedoch zu sogenannten Kreuzreaktivitäten - das heißt, strukturverwandte Substanzen werden zu einem bestimmten Teil miterfaßt. Die bei den Immunoassays auftretenden Kreuzreaktivitäten sind von den verwendeten Antikörpern abhängig. Da je nach Hersteller andere Antikörper verwendet werden, weisen daher die verschiedenen Immunoassays unterschiedliche Kreuzreaktivitäten auf (siehe auch Kap. 4.2 und Begriffsdefinitionen).

## 2. AUSWERTEMETHODEN FÜR ELISAS

### 2.1 Prinzipielles zu den Auswertemethoden und den Meßdaten

#### • Auswertemethoden

Die heute kommerziell erhältlichen Photometer bzw. Automaten für Mikrotiterplatten-ELISAs sind zumeist Software unterstützt oder mit einer Software gekoppelt, mit Hilfe derer die Auswertung relativ einfach durchzuführen ist. Auch eine geräteunabhängige Software für die Auswertung von ELISAs ist verfügbar. Dennoch lohnt es sich, ein wenig hinter die Kulissen der Auswertemodelle, die verschiedenen Programmen zugrunde liegen, zu blicken und sich mit den Problematiken der applizierbaren Modelle zu beschäftigen. Es finden sich in der Literatur (z.B. MARSCHNER I. et al, 1974, HERDL R. et al, 1975, RODGERS R., 1984) eine Reihe von mathematischen Auswertungsmöglichkeiten für ELISAs. Im Rahmen dieser Studie werden folgende sechs behandelt:

- Manuelle Auswertung
- Punkt-zu-Punkt Lineare Interpolation
- Lineare Regression über den gesamten Bereich
- 4-Parameter logistische Gleichung
- Polygonale Interpolation
- Spline-Interpolation

#### • Meßdaten und deren Umrechnung

Für die Auswertung können entweder die gemessenen Extinktionen, die %B/B<sub>0</sub>-Werte - dies normiert den Leerwert auf der Ordinate auf 100 % - oder die %B/B<sub>0</sub> Ü-Werte - dies normiert auf der y-Achse den Leerwert auf 100 % und einen Überschußstandard auf 0 % - herangezogen werden.

Die zugrundegelegten Formeln sind:

$$\%B/B_0 = \frac{\text{Extinktion des Standards}}{\text{Extinktion des Leerwertes}} * 100 \quad (2)$$

$$\%B/B_0 \ddot{U} = \frac{\text{Extinktion des Standards} - \text{Extinktion des Überschußstandards}}{\text{Extinktion des Leerwertes} - \text{Extinktion des Überschußstandards}} * 100 \quad (3)$$

Ein wesentlicher Vorteil einer Umrechnung auf die %B/B<sub>0</sub>- bzw. %B/B<sub>0</sub> Ü-Werte besteht in einer besseren Vergleichbarkeit der einzelnen Assays untereinander. Weiters wirkt sich die Chromogen-Entwicklungszeit bzw. der Langzeit-Intensitätsdrift des Photometers nicht mehr

unmittelbar auf die Absolutergebnisse aus. Ferner ermöglicht die Umrechnung die Auftragung der gemessenen Werte auf einer linear skalierten Ordinate.

Bei Verwendung von %B/B<sub>0</sub>-Werten können alle Standards außer dem Leerwert für eine Kalibrationskurve herangezogen werden. Dies bedingt jedoch keinen Nachteil, da der Null-Standard und sein Meßergebnis ohnehin nicht auf einer logarithmisch skalierten Abszisse aufgetragen werden können.

Die Verwendung von %B/B<sub>0</sub> Ü-Werten reduziert die Anzahl der Kalibrationspunkte um den Überschußstandard (den höchsten Standard); dies ist bei der Verwendung kommerziell erhältlicher Testkits mit nur wenigen Standards zu berücksichtigen.

## 2.2 Beschreibung der angewendeten Auswertemethoden

### • Manuelle Auswertung

Die ersten Immunoassays wurden manuell ausgewertet, indem meist die %B/B<sub>0</sub>-Werte der gemessenen Standards gegen ihre Konzentration auf halblogarithmischem Papier aufgetragen und dann eine Kalibrationskurve erstellt wurde.

Diese Art der Kalibration ist jedoch ungenau, da verschiedene Analytiker, die denselben Assay auswerten, die Datenpunkte auf unterschiedliche Art durch einen Kurvenzug verbinden. Mit dieser rein empirisch-graphischen Methode können weiters nur sehr schwierig Verfahrenskenndaten über Streuung bzw. Ergebnisunsicherheit der Meßwerte erhalten werden. Da verschiedene Personen unterschiedlich auswerten, kann nur die Streuung der Auswertung ermittelt werden.

Diese quasi „willkürliche Auswertung“, läßt sogar offen, durch welche Kurve (linear, polynomisch, ...) und in welchem Bereich ausgewertet wird.

Diese Problematik soll an einem Beispiel demonstriert werden:

Fünf Analytikern wurde ein Scatter-Plot der Meßpunkte auf halblogarithmischem Papier (Konzentration / x-Achse (logarithmisch), %B/B<sub>0</sub> / y-Achse (linear)) gegeben. Sie sollten nun ohne weitere Informationen aufgrund dieser eingezeichneten Standardmeßpunkte von fünf fiktiven Probenwerten, angegeben in %B/B<sub>0</sub>, die Konzentration ermitteln.

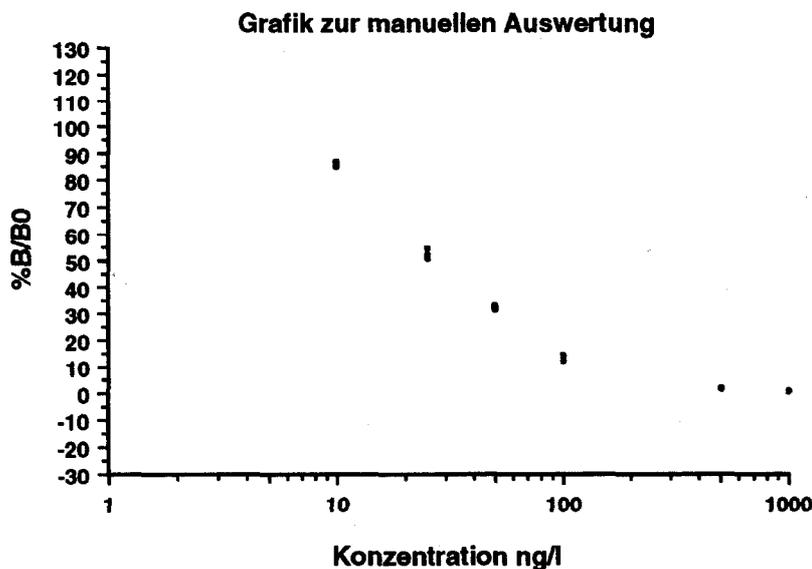


Abb. 2

Auffallend war, daß ein Analytiker erst gar nicht versuchte, eine Kurve anzupassen, sondern jeweils zwei benachbarte Meßpunkte durch eine Gerade verband (Lineare Interpolation). Die anderen versuchten freihändig bzw. mit Hilfe von Kurvenlinealen einen „bestangepaßten“ Kurvenzug über die Standard-Meßdaten zu legen. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind bei den jeweiligen Tests tabelliert (Kapitel 3).

#### • Punkt-zu-Punkt Lineare Interpolation

Eine weitere Auswertungsmöglichkeit besteht darin, durch die gemessenen Standards automatisiert eine lineare Interpolation als Kalibrationskurve zu legen. Dazu wird zwischen zwei benachbarten Standards eine Geradengleichung aufgestellt und so eine Kalibrationskurve ermittelt.

%B/B0-Werte von potentiellen Proben werden je nach Bereich, in dem ihre Werte relativ zu den Standardwerten liegen, in die jeweilige Geradengleichung eingesetzt und so deren Konzentration ermittelt.

Die Vorteile dieses Verfahrens liegen einerseits in der Automatisierbarkeit (unabhängig von Streuung durch verschiedene Methoden) und andererseits in der Einfachheit. Zusätzlich kommt es bei dieser Methode nur bedingt, zumindest was die Anzahl der zugrundegelegten Standards betrifft, zu Auswertungsschwierigkeiten. Sobald mindestens zwei Standardmessungen und eine Leerwertmessung durchgeführt worden sind, kann diese Auswertemethode rein theoretisch (würde dann einer Linearen Regression entsprechen) angewandt werden.

Auch die Ergebnisse dieser Auswertung sind bei den jeweiligen Tests angeführt.

Das der Auswertung zugrundegelegte Verfahren sieht vor:

- Umrechnung der Extinktionen in %B/B<sub>0</sub>-Werte.
- Logarithmieren der Standardkonzentrationen (weil logarithmische Skalierung). Hier muß der Leerwert gleich 0,1 gesetzt werden, da Null nicht logarithmierbar ist. Dies spielt aber insofern keine Rolle, als die dadurch produzierte systematische Abweichung innerhalb des Vertrauensbereiches des mehrfachbestimmten Leerwertes liegt. Außerdem sollte in diesem Bereich des Kurvenzuges sinnvollerweise ohnehin nicht ausgewertet werden (siehe Pkt. 2.3 Arbeitsbereich).
- Aufstellen von Geradengleichungen zwischen jeweils 2 benachbarten Standards mit logarithmierten Konzentrationen und %B/B<sub>0</sub>-Werten.
- Bei Auswertung von Proben, Abfrage in welchem Bereich %B/B<sub>0</sub>-Wert der Probe liegt; Berechnung der zugehörigen logarithmischen Konzentration mit Hilfe der passenden Geradengleichung.
- Entlogarithmieren des Ergebnisses zur gewählten Basis der logarithmischen Abszisse - Probenkonzentration.

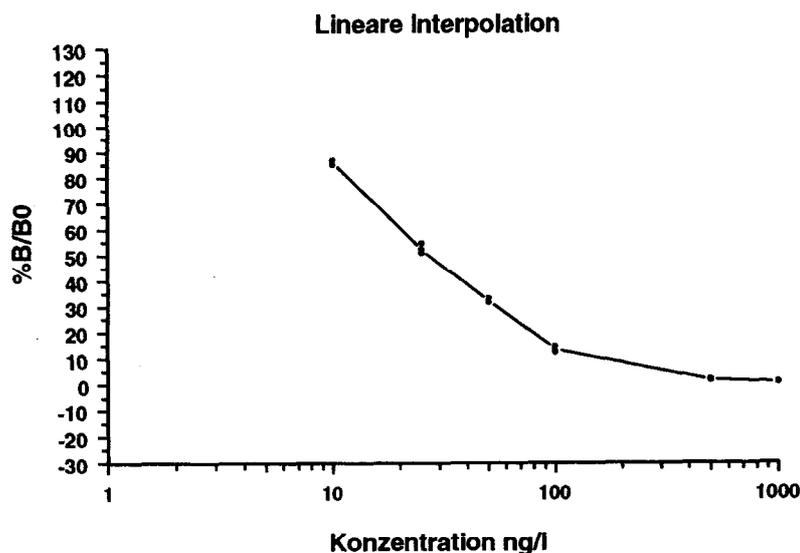


Abb. 3

#### • **Lineare Regression über den gesamten Bereich**

Wenn der lineare Bereich eines bestimmten Testsystems bekannt ist und nur dort ausgewertet wird, kann die einfache Lineare Regression für eine Auswertung herangezogen werden. Im Normalfall scheidet jedoch diese Methode aus, da ELISA-Daten a priori (ohne mathematische Transformationen) nur in einem bestimmten Bereich linear korreliert sind.

#### • **4-Parameter logistische Gleichung**

Eine semi-empirische Methode der Auswertung ist die einer 4-Parameter logistischen Gleichung (CANELLAS P.F. et al, 1981; RODBARD D., 1974, 1977). Diese Methode wird auch

im DIN-Entwurf „DEV - Rahmenbedingungen für selektive Immuntestverfahren (Immunoassays) zur Bestimmung von Pflanzenbehandlungs- und Schädlingsbekämpfungsmitteln (T2)“ vorgeschlagen.

Hier wird der funktionale Zusammenhang zwischen Extinktionen bzw. %B/B0- oder %B/B0 Ü-Werten und Konzentrationen wie folgt dargestellt:

$$y = \frac{a - d}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b} + d \quad (4)$$

Legende: a ... obere Asymptote der Kurve  
 b ... Steigung der Kurve am Testmittelpunkt  
 c ... Analytkonzentration am Testmittelpunkt  
 d ... untere Asymptote der Kurve  
 x ... Analytkonzentration  
 y ... Meßwert (Absorption bzw. %B/B0 ...)

Mit Hilfe kommerziell erhältlicher Computerprogramme können die Parameter dieser Funktion für die jeweiligen Meßdaten im iterativen Verfahren ermittelt werden.

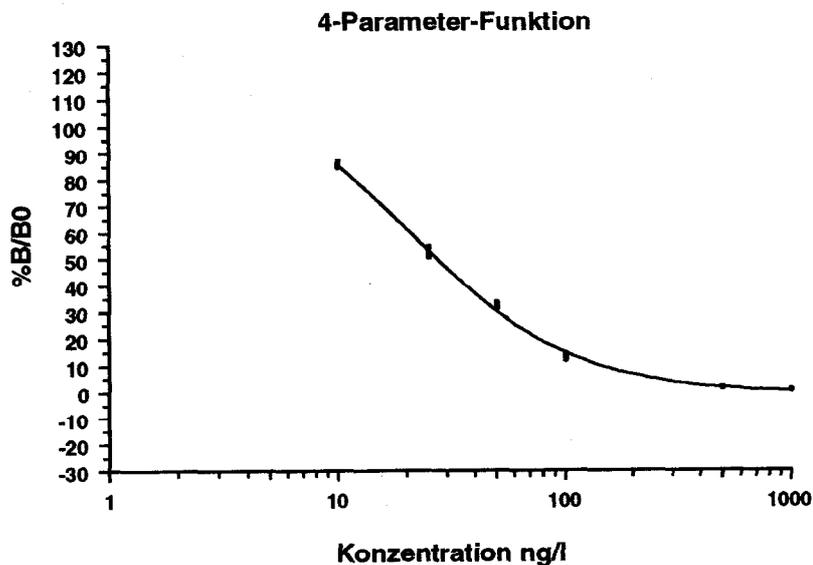


Abb. 4

Da die erhaltene Funktion sigmoiden Charakter aufweist, kann sie nun noch mit Hilfe der logit-Transformation linearisiert werden.

Durch Umformen der Gleichung (4) (siehe Anhang) wird ein linearer Bezug hergestellt:

$$\log\left(\frac{y-d}{a-y}\right) = -b \cdot \log(x) + b \cdot \log(c) \quad (5)$$

Setzt man nun  $\log\left(\frac{y-d}{a-y}\right)$  gleich Y, was einer logit-Transformation entspricht, wird aus Gleichung (5):

$$Y = -b \cdot \log(x) + b \cdot \log(c) \quad (6)$$

Trägt man nun Y gegen  $\log(x)$  auf, so erhält man mit Hilfe von Gleichung (6) eine Gerade mit der Steigung  $(-b)$  und dem Achsenabschnitt  $(b \cdot \log(c))$ .

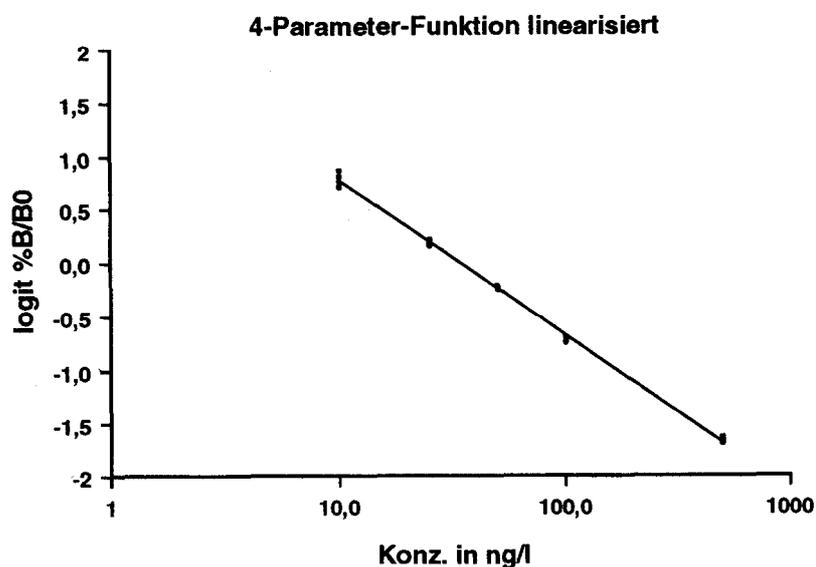


Abb. 5

### • Polygonale Interpolation

Dieses Auswertemodell ist dem, im Rahmen dieser Studie verwendeten ELISA-Auswertegerät, zugrundegelegt. Der wesentliche Unterschied zu den vorgenannten Auswertemethoden besteht darin, daß die polygonale Interpolation den gemessenen Daten keinerlei Modell zugrundelegt. Sie ist daher für jede Art der Näherung an einen funktionalen Zusammenhang geeignet. Das Verfahren beruht auf einer Unterteilung der Abszissenwerte zwischen 2 Standards in  $n$  äquidistante Strecken, in denen (wie zwischen den Standards bei der linearen Interpolation) nach einer Rekursionsformel (LÖTZ A. et al., 1976) den Abszissenwerten der Eckpunkte der äquidistanten Strecken Ordinatenwerte zugeordnet werden. Der polygonale Kurvenzug kann nun als Kalibrationskurve verwendet werden.

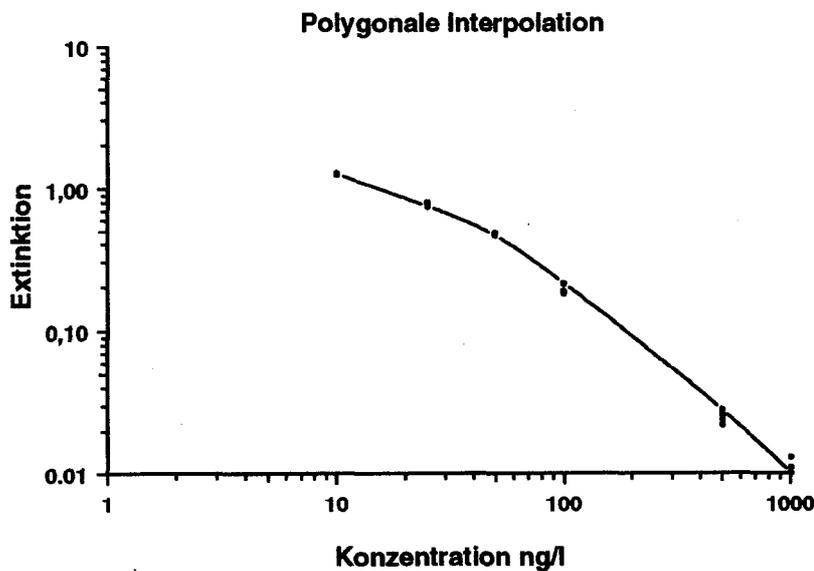


Abb. 6

### • Spline-Interpolation

Spline-Funktionen eignen sich besonders gut, um glatte Interpolationskurven, die durch alle Meßpunkte exakt durchgehen, zu erhalten. Wie die Polygonale Interpolation ist die Spline-Interpolation für fast jeden funktionalen Zusammenhang der Daten als Approximation geeignet, da sie auf keinem Modell beruht.

Bei der kubischen Spline-Interpolation wird durch jeweils 2 benachbarte Meßpunkte ein Polynom 3. Grades gelegt. Da durch 2 Meßpunkte jedoch nur ein Polynom 1. Grades - eine Gerade - eindeutig bestimmt wird, benötigt man zusätzliche Bedingungen. Zwei erhält man, indem die erste und die zweite Ableitung zweier benachbarter Polynome an ihrem gemeinsamen Meßpunkt gleich gesetzt werden. Dadurch sind die Steigung und die Krümmung im Meßpunkt selbst für beide Polynome gleich und es läßt sich eine stetige und differenzierbare Funktion darstellen. Die beiden noch fehlenden Bedingungen für die Aufstellung eines kubischen Polynoms erhält man durch die Bildungsfunktionen der beiden benachbarten Polynome.

Dort, wo ein Polynom nur „einen Nachbarn“ hat - an den Endpunkten - nimmt man an, daß über die Endpunkte hinaus die Kurve linear extrapoliert wird, d.h. die beiden zweiten Ableitungen werden an den Endpunkten gleich Null gesetzt (EBERT et al., 1985; MARSCHNER I. et al, 1974; DE BOOR C., 1978).

## 2.3 Bestimmung von Nachweisgrenzen / Arbeitsbereich

Je nach Art der Auswertung werden verschiedene Methoden der Bestimmung von Arbeitsbereich bzw. Nachweisgrenzen angewandt.

Zur Festlegung eines Arbeitsbereiches ist zu sagen, daß dieser prinzipiell durch die Konzentrationen des niedrigsten und des höchsten Standards begrenzt wird, jedoch die Steigung der Funktion berücksichtigt werden muß. Ist die Empfindlichkeit der Funktion sehr gering, so führen minimale Signaländerungen zu großen ermittelten Konzentrationsänderungen. Die Ergebnisse sind in weiterer Folge mit sehr großen Variationskoeffizienten verse-

hen. Daher sollte nur im Bereich großer Steigungen quantifiziert werden. Proben, deren Konzentrationen über oder unter diesem Bereich liegen, sollten vor der Quantifizierung geeigneten Probenvorbereitungsschritten, wie etwa Verdünnung oder Aufkonzentrierung, unterzogen werden.

Etliche mathematische Methoden zur Ermittlung von Nachweisgrenzen stehen zur Verfügung. Prinzipiell hängt die Berechnung von Nachweisgrenzen davon ab, ob der Kalibrationskurve homogene oder inhomogene Varianzen zugrunde liegen (OPPENHEIMER L. et al, 1983; RODBARD D., 1977). Wir haben aufgrund der unterschiedlichsten Auswertemodelle und Varianzen der verschiedenen Kits auf eine Bestimmung der Nachweisgrenze verzichtet.

## 2.4 Vergleich der Auswertemethoden

Während es sich bei den Methoden der Linearen Regression sowie der 4-Parameter-Funktion um modellgestützte Auswertungen handelt, d.h. es wird ein bestimmter funktionaler Zusammenhang vorausgesetzt, sind die Methoden Lineare-, Polygonale- und Spline-Interpolation als Interpolationsverfahren auf beinahe jede Art der Verteilung von Meßdaten applizierbar.

Für das Auswerten von Immunoassays ergibt sich daher folgendes Problem:

Während bei den Interpolationsverfahren jede Kurvenform weitgehend approximiert werden kann, ohne daß vorher etwas über die Kurvenform bekannt sein muß, setzen die modellgestützten Auswertemethoden gewisse Annahmen voraus.

Interpolationsverfahren sind aber gegenüber Meßungenauigkeiten entschieden anfälliger als modellgestützte Verfahren. Interpolationsverfahren geben lokal begrenzt allen Abweichungen nach. Modellgestützte Verfahren jedoch geben einer Abweichung an einer Stützstelle nur bedingt nach. Das Gewicht der übrigen Werte vermindert diesen Einfluß (SANDEL P. et al, 1976).

Da, wie schon oben erwähnt, eine Lineare Regression nur bedingt als Modell für bestimmte Kits verwendet werden kann, scheint die beste Methode der Auswertung die des 4-Parameter-Modells zu sein.

Ein weiteres grundlegendes Problem besteht in den unterschiedlichen Streuungen der Meßwerte in Abhängigkeit von den zugrunde liegenden Konzentrationen; diesem Problem ist durch Gewichtung entgegenzuwirken. Der Frage einer Gewichtung von Meßdaten - um homogene Varianzen über den gesamten Bereich einer Kalibrationskurve zu erhalten - wird in dieser Studie jedoch nicht nachgegangen.

## 2.5 Reproduzierbarkeit, Präzision

Um die Reproduzierbarkeit der Tests zu ermitteln, wurden von uns verschiedene Verfahren angewandt:

Fragestellungen waren:

1. Ist die Streuung der Meßwerte bei Mehrfachbestimmung in allen Bereichen der Kalibrationskurve gleich?
2. Wie variieren Standardreihen, wenn sie mehrfach auf eine Platte aufgetragen werden?
3. Wie variieren Standardreihen, wenn sie zu verschiedenen Zeiten mit unterschiedlichen Mikrotiterplatten desselben Herstellers aufgenommen werden?

ad 1.: Aus den Rohdaten wurden die % B/BO-Werte ermittelt und deren Variationskoeffizient gegen die Konzentration des Standards aufgetragen.

ad 2.: Um die Präzision der ermittelten Kalibrationskurve innerhalb einer Platte (Intra-assaypräzision) verfolgen zu können, wurden auf einer Platte drei Standardreihen aufgetragen und zur Messung gebracht. Die Ergebnisse der drei Standardkurven wurden mit Hilfe der 4-Parameter logistischen Gleichung aufgetragen. Bei Übereinanderlegen der drei Kurven ist die Streuung der Ergebnisse unmittelbar ersichtlich. Die Grafiken finden sich beim jeweiligen Test in Kapitel 3.

ad 3.: Um die Präzision der Kalibrationskurven über mehrere Platten (Interassaypräzision) bzw. an verschiedenen Tagen verfolgen zu können, wurde das Schema, das unter obigem Punkt erklärt wurde, an drei verschiedenen Tagen auf drei verschiedene Tests (Platten) angewandt. In den in Kapitel 3 wiedergegebenen Abbildungen sind jeweils die dritte Standardreihe der unterschiedlichen Platten übereinandergelegt.

### 3. VERGLEICH DER TESTKITS

Die am österreichischen Markt kommerziell erhältlichen Triazin-Immunoassays auf Mikrotiterplattenbasis sollten nach folgenden Kriterien miteinander verglichen werden:

- Anwendbarkeit der Testkits nach Arbeitsbereich und Kreuzreaktivitäten der Triazine
- Inhalt und Handhabung der Testkits
- Auswertungen nach verschiedenen Modellen
- Präzision von Mehrfachbestimmungen
- Vergleich der Immunoassay-Ergebnisse mit GC/MS-Ergebnissen
- Streuung der Meßergebnisse in Abhängigkeit von der Analytkonzentration
- Reproduzierbarkeit von Ergebnissen an verschiedenen Positionen innerhalb einer Mikrotiterplatte (INTRAASSAY-Präzision)
- Reproduzierbarkeit von Ergebnissen auf mehreren Mikrotiterplatten (INTERASSAY-Präzision)

Für den Vergleich und die Beurteilung der Handhabung eines Testkits sind verschiedene Parameter ausschlaggebend. So ist z.B. entscheidend, ob Proben bzw. Standards manuell oder mittels einem Automaten pipettiert werden. Dasselbe gilt für die Reagenszugabe und den Waschschrift.

Um einen Vergleich der einzelnen Testkits zu ermöglichen, wurden bei den verschiedenen Testkits dieselben Rahmenbedingungen eingehalten (siehe Anhang).

#### 3.1 MILLIPORE - ENVIROGARD™ TRIAZIN-ELISA

##### 3.1.1 Firmenangaben zum ELISA Kit

- **Kurzinformation zum Anwendungsbereich des Kits:**

Quantitativer Labor-Test für die Detektion von Triazin-Pestizid-Rückständen in Wasser.

- **Kreuzreaktivitäten:**

Atrazin	100 %
Ametryn	291 %
Propazin	110 %
Simetryn	94 %
Prometryn	94 %
Simazin	48 %
Terbutryn	32 %
Terbutylazin	14 %
6-Hydroxy Atrazin	6 %
Trietazin	6 %
Desethylatrazin	3 %
Cyanazin	3 %

- **Zeitbedarf:**

90 Minuten

- **Nachweisgrenze:**

37 ng/l (ppt) für Atrazin

### 3.1.2 Inhalt des Testkits und zusätzlich benötigte Geräte

- **Packungsinhalt:**

- 1 Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten - 8 Streifen à 12 Kavitäten (horizontal)
- Je ein Fläschchen 0, 100, 250 und 2000 ng/l Atrazin- Standard-Lösungen
- Je ein gebrauchsfertiges Fläschchen (mit Tropfer) Atrazin- Enzym-Konjugat, Substrat, Chromogen und Stoppreagens
- 1 Blatt halblogarithmisches Papier für manuelle Auswertung

- **Zusätzlich benötigte Geräte:**

- 40 und 80 µl-Mikropipetten
- Klebeetiketten oder Parafilm<sup>(R)</sup>
- Leitungs- oder deionisiertes Wasser (500 ml)
- Schüttler (optional)
- Mikrotiterplatten-Washer (optional)
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm); ELISA Reader
- Rechner für Linearregression (optional)

### 3.1.3 Testdurchführung und Handhabung

- **Testdurchführung lt. Hersteller (vereinfacht und gekürzt):**

- 80 µl Standardlösung oder Probe in Kavität pipettieren (3-fach Bestimmung empfohlen)
- 80 µl Enzymkonjugat dazupipettieren
- 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubieren (mit Abdeckfolie zugedeckt und unter Schütteln - 200 U/min)
- Fünfmal Kavitäten komplett mit Wasser füllen und wieder ausleeren; alternativ Mikrotiterplatten-Washer verwenden
- 80 µl Substrat dazupipettieren
- 40 µl Chromogen dazupipettieren (wenn ganze Platte auf einmal bearbeitet wird - Chromogen und Substrat vorher mischen, 120 µl dazupipettieren!)
- Mit Abdeckfolie zudecken und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (Mischen bei 200 U/min optional)
- 80 µl Stoppreagens dazupipettieren und gut durchmischen
- Extinktionen bei 450 nm photometrisch bestimmen

**Anmerkung:**

Unmittelbar auf den Reagensfläschchen (Konjugat, Substrat, Chromogen und Stoppreagens) sind Tropfer angebracht. Die Anleitung sieht vor, daß die Reagenzien so zugegeben werden, jedoch wird empfohlen bei mehr als 3 Streifen für Standards, Proben und Reagentien eine Multi-Kanalpipette zu verwenden.

**• Kommentar zur Handhabung des Testkits:**

In der dem Test beigelegten *Gebrauchsanweisung* in englischer Sprache, werden verschiedene Optionen innerhalb der Testdurchführung angeboten (Automatischer Washer, elektronische Auswertung, Multikanalpipette / Tropfer, ...). Es wird darauf hingewiesen, daß jeglicher positiver Befund mit Hilfe anerkannter Methoden der Einzelanalytik bestätigt werden muß (der Test versteht sich also als Screening!). Zu Matrixeffekten potentieller Proben, die das Ergebnis verfälschen können, wird zwar Stellung genommen, es werden aber keine Strategien zur Vermeidung solcher Fehler erwähnt.

Der Testkit ist bezüglich der *mitgelieferten Bestandteile* sehr vollständig. Leider enthält der Testkit nur drei Standards und einen Null-Standard, wodurch gewisse Auswertungsmodelle (wie z.B. das der 4-Parameter Funktion) nicht angewendet werden können. Die Tropfer, die auf den Reagensfläschchen angebracht sind, erscheinen für eine Feld- bzw. grobe Screeninganalytik ideal, sind jedoch gegenüber Pipetten wesentlich ungenauer. Für den Anwender, der manuell auswertet, ist halblogarithmisches Papier, bereits für den Arbeitsbereich des Tests adaptiert, dem Test beigelegt.

Die *Vorbereitung* für den Test besteht maximal aus 2 Schritten: Mikrotiterplatten, Standards Reagentien und Proben auf Raumtemperatur bringen und - falls eine ganze Mikrotiterplatte bearbeitet werden soll - Vereinigen der Konjugat- und Substratlösungen.

Die *Durchführung* (Pipettieren von Proben und Reagentien bzw. Waschschrift) ist sehr einfach. Die Option, einen kommerziell erhältlichen Washer zu verwenden, ist vorhanden. Die Reagentienzugaben können je nach Genauigkeitsanforderungen des Anwenders durch Tropfer bzw. Mikropipetten erfolgen.

Die *Zeitangabe* des Herstellers bezieht sich nur auf die Inkubationszeiten (90 min) und beinhaltet nicht die Auswertung.

### 3.1.4 Messung von dotierten Proben und deren Ergebnisse mit verschiedenen Auswertmöglichkeiten

Testkit: Millipore

Anzahl der Parallelbestimmungen: 3

Anzahl der Kalibrationspunkte: 4

(inklusive O-Standard)

Zugrundegelegte y-Werte: %B/BO

Probe	Manuelle Auswertung	VK	Lineare Interpolation	VK	Polygonale Interpolation	4-Parameter Funktion	VK	Spline-Approximation	GC/MS							
									ng/l	%	ng/l	ng/l	ng/l	Propazin	Propazin + Propazin	Errechnete Werte
1	ng/l	%	ng/l	%	ng/l	ng/l	%	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l
2	n.n.	--	n.n.	--	n.n.	nicht möglich	--	nicht durchgef.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
3	154	15,6	164	3,9	162	nicht möglich	--	nicht durchgef.	150	150	150	150	150	150	150	150
4	359	2,5	377	6,1	346	nicht möglich	--	nicht durchgef.	98	136	234	234	234	234	234	234
5	380	2,6	389	5,9	361	nicht möglich	--	nicht durchgef.	101	160	261	261	261	261	261	261
6	519	5,2	561	4,7	474	nicht möglich	--	nicht durchgef.	291	190	481	481	481	481	481	481
6	144	4,1	144	3,4	142	nicht möglich	--	nicht durchgef.	114	--	114	114	114	114	114	114

Kreuzreaktivitäten: Atrazin 100%

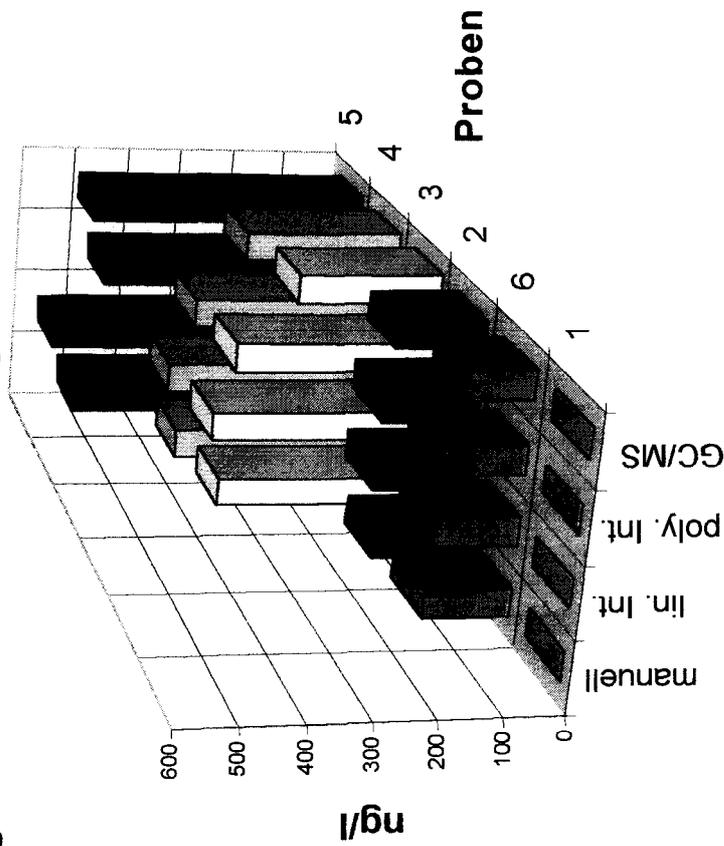
Propazin 110%

\* ... die errechneten Werte sind zum Vergleich mit den ELISA-Auswertungen heranzuziehen (Berücksichtigung der Kreuzreaktivität)

VK ... Variationskoeffizient

Tab. 1

**MILLIPORE**  
**Vergleich ELISA-Auswertungen / GC-MS-Daten\***



\* ... ermittelt durch Umrechnung der gemessenen GC-MS-Daten; die Kreuzreaktivität von Propazin (nach Herstellerangaben, siehe Kap. 4.2) wurde berücksichtigt

Abb.7

### 3.1.5 Reproduzierbarkeit, Präzision

siehe Pkt. 2.5

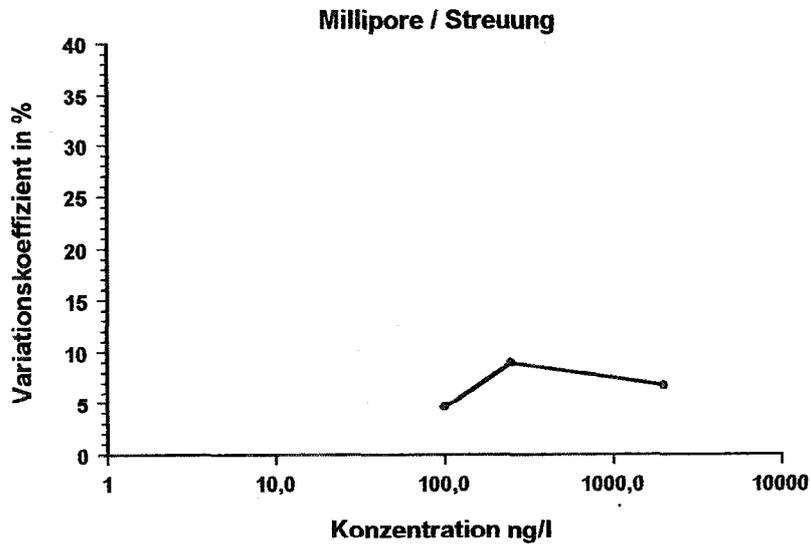


Abb. 8

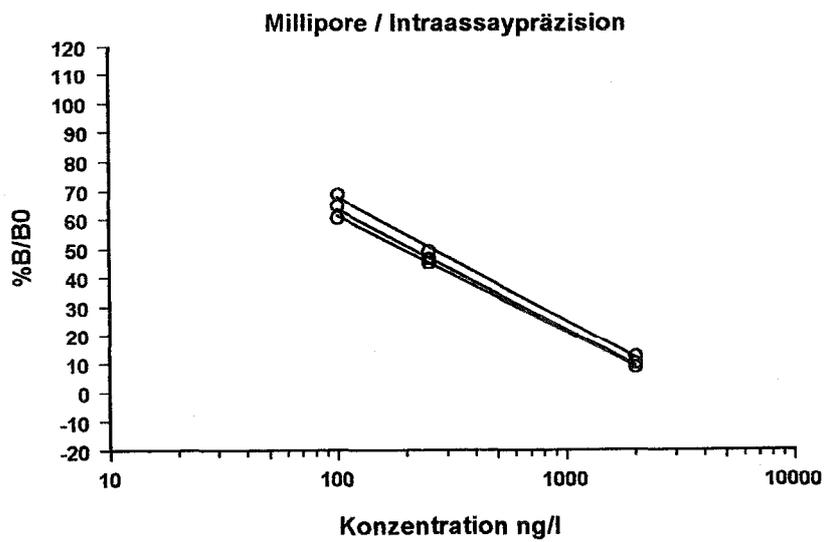


Abb. 9

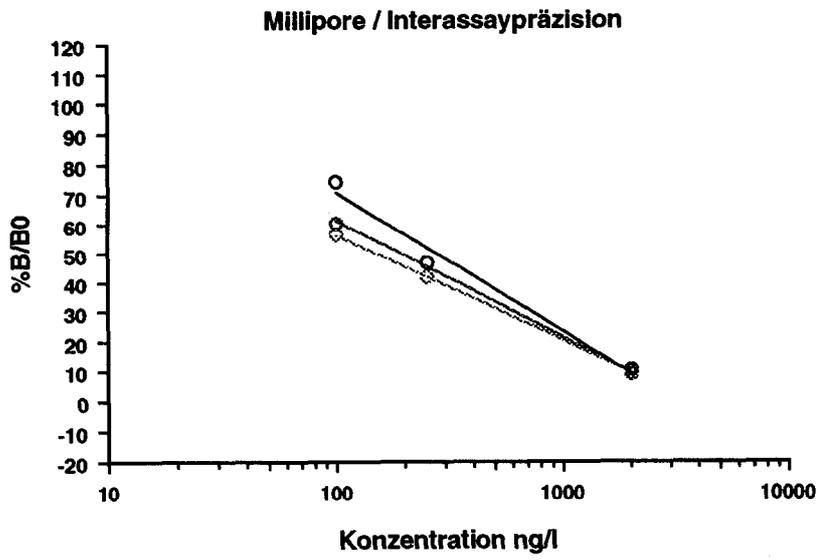


Abb. 10

## 3.2 MILLIPORE - ENVIROGARD™ HIGH SENSITIVITY TRIAZIN - ELISA

### 3.2.1 Firmenangaben zum ELISA Kit

- **Kurzinformation zum Anwendungsbereich des Kits:**

Quantitativer Labor-Test für die Detektion von Triazin-Pestizid-Rückständen in Wasser

- **Kreuzreaktivitäten:**

Atrazin	100 %
Ametryn	156 %
Propazin	132 %
Prometryn	93 %
Prometon	86 %
Simetryn	22 %
Simazin	17 %
Terbutylazin	10 %
Terbutryn	8 %
Desethylatrazin	2 %
Trietazin	2 %
Cyanazin	1 %
6-Hydroxy-Atrazin	1 %

- **Zeitbedarf:**

90 Minuten

- **Nachweisgrenze:**

25 ng/l (ppt) für Atrazin

### 3.2.2 Inhalt des Testkits und zusätzlich benötigte Geräte

- **Packungsinhalt:**

- 1 Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten - 8 Streifen à 12 Kavitäten (horizontal)
- Je ein Fläschchen 0, 25, 50, 100, 250 und 500 ng/l Atrazin-Standard-Lösungen
- Je ein Fläschchen mit gebrauchsfertigem Atrazin-Enzym Konjugat, Substrat, Chromogen und Stoppreagens

- **Zusätzlich benötigte Geräte:**

- 40, 80 und 100 µl- Mikropipetten
- Klebeetiketten oder Parafilm<sup>(R)</sup>
- Leitungs- oder deionisiertes Wasser (500 ml)
- Schüttler (optional)
- Mikrotiterplatten Washer (optional)
- Mikrotiterplattenphotometer (450nm); ELISA Reader
- Rechner, der Linearregression rechnet (optional)

### 3.2.3 Testdurchführung und Handhabung

- **Testdurchführung lt. Hersteller (vereinfacht und gekürzt):**

- 100 µl Standardlösung oder Probe in Kavität pipettieren (2-fach Bestimmung empfohlen)
- 80 µl Enzymkonjugat dazupipettieren
- 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubieren
- Fünfmal Kavitäten komplett mit Wasser füllen und wieder ausleeren; alternativ Mikrotiterplatten-Washer verwenden
- 80 µl Substrat dazupipettieren
- 40 µl Chromogen dazupipettieren (wenn die ganze Platte auf einmal bearbeitet wird - Chromogen und Substrat vorher mischen, 120 µl dazupipettieren!)
- Mit Abdeckfolie zudecken und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- 40 µl Stoppreagens dazupipettieren und gut durchmischen
- Extinktionen bei 450 nm photometrisch bestimmen

- **Kommentar zur Handhabung des Testkits:**

Für die Handhabung des Tests gilt das Gleiche wie für den „Millipore-Testkit“ (Punkt 3.1.3.). Lediglich die Anzahl der mitgelieferten Standards ist bei diesem Testkit größer, und läßt daher mehrere Auswertungen zu - auch die Genauigkeit wird durch Verwendung von mehr Kalibrationspunkten erhöht.

### 3.2.4 Messung von dotierten Proben und deren Ergebnisse mit verschiedenen Auswertmöglichkeiten

Testkit: Millipore High Sensitivity Anzahl der Parallelbestimmungen: 3  
 Anzahl der Kalibrationspunkte: 6 (inklusive 0-Standard)  
 Zugrundegelegte y-Werte: %B/BO

Probe	Manuelle Auswertung	VK	Lineare Interpolation	VK	Polygonale Interpolation	4-Parameter Funktion	VK	Spline-Approximation	GC/MS				
									Atrazin	Propazin	Atrazin + Propazin	Errechnete Werte*	
1	ng/l	%	ng/l	%	ng/l	ng/l	%	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l
2	n.n.	--	n.n.	--	n.n.	n.n.	--	10	n.n.	--	n.n.	n.n.	n.n.
3	200	0,9	196	2,4	196	196	5,8	214	150	--	150	150	150
4	346	2,7	347	7,7	340	343	4,3	300	98	138	234	278	278
5	330	3,7	327	6,4	322	325	8,5	291	101	160	281	312	312
6	478	7,3	504	16,5	487	492	2,4	467	291	190	481	542	542
6	146	2,8	142	3,5	147	138	7,3	173	114	--	114	114	114

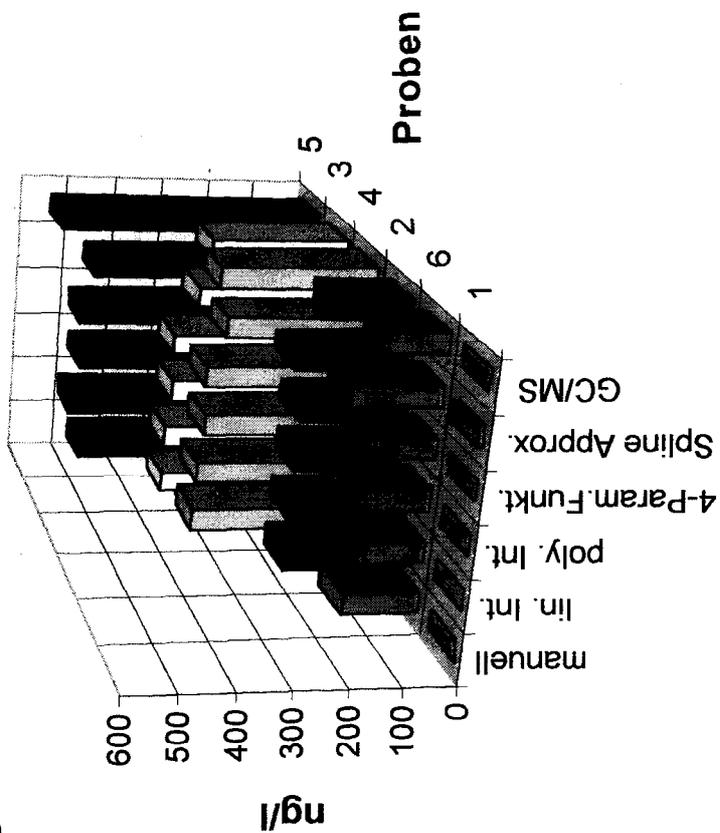
Kreuzreaktivitäten: Atrazin 100%  
 Propazin 132%

\* ... die errechneten Werte sind zum Vergleich mit den ELISA-Auswertungen heranzuziehen (Berücksichtigung der Kreuzreaktivität)

VK ... Variationskoeffizient

Tab. 2

**MILLIPORE HIGH SENSITIVITY  
Vergleich ELISA-Auswertungen / GC-MS-Daten\***



\* ... ermittelt durch Umrechnung der gemessenen GC-MS-Daten; die Kreuzreaktivität von Propazin (nach Herstellerangaben, siehe Kap. 4.2) wurde berücksichtigt

Abb. 11

### 3.2.5 Reproduzierbarkeit, Präzision

siehe Pkt. 2.5

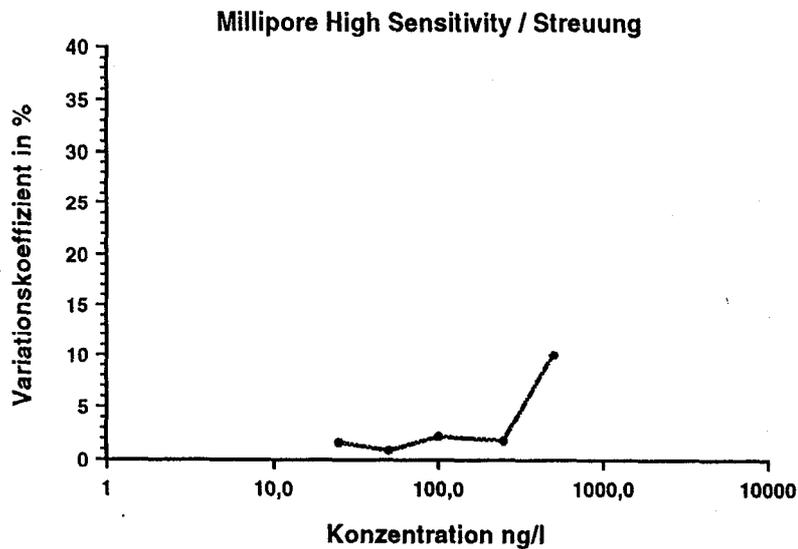


Abb. 12

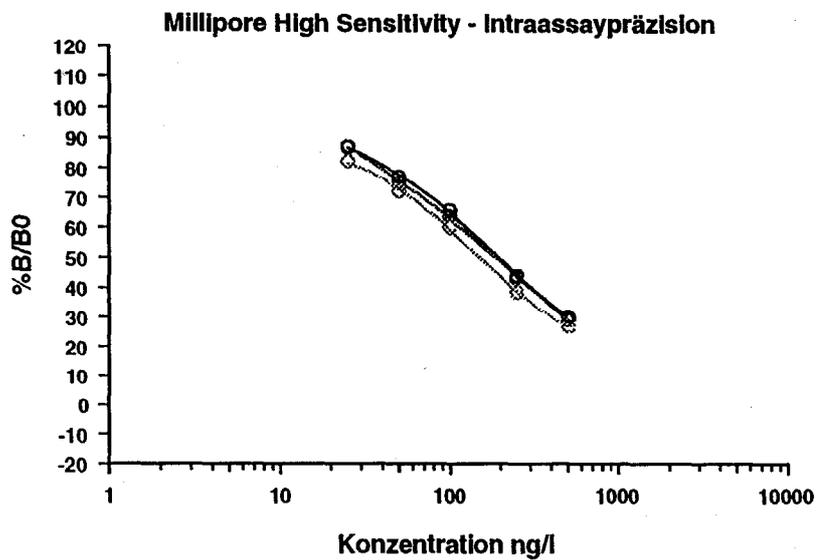


Abb. 13

Es fehlt hier die Ermittlung der Interassaypräzision, da während der praktischen Arbeiten zu dieser Studie von der Fa. Millipore von Kaninchen- auf Schaf-Antikörper übergegangen wurde und diese in ihrem Verhalten nur bedingt vergleichbar sind.

### 3.3 QUANTIX - TRIAZINE 0.1<sup>HS</sup>

#### 3.3.1 Firmenangaben zum ELISA Kit

- **Kurzinformation zum Anwendungsbereich des Kits:**

Der Test ist für die Detektion der Schlüssel-Triazin-Herbizide (key triazine herbicides) in Grund-, Oberflächenwasser und Bodenextrakten geeignet. Der Test detektiert Atrazin, Simazin und Cyanazin quantitativ bis 50 ppt.

- **Kreuzreaktivitäten:**

Atrazin	100 %
Propazin	139 %
Cyanazin	81 %
Simazin	56 %
Prometryn	56 %
Hydroxy-Simazin	56 %
Ametryn	26 %
Prometon	10 %
Hydroxy-Atrazin	10 %
Desethylatrazin	2 %

- **Zeitbedarf:**

keine Angabe

- **Nachweisgrenze:**

50 ng/l (ppt)

#### 3.3.2 Inhalt des Testkits und zusätzlich benötigte Geräte

- **Packungsinhalt:**

- 1 Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten - 12 Streifen à 8 Kavitäten (vertikal)
- Ein Fläschchen Nullstandard
- Waschpuffer-Konzentrat
- Je ein Fläschchen Konjugat, Substrat, Chromogen und Stoppreagens

- **Zusätzlich benötigte Geräte:**

- 50 und 200 µl-Mikropipetten
- Mikrotiterplatten-Schüttler
- Mikrotiterplatten-Washer
- Mikrotiterplatten-Photometer (650 nm)
- Glaswaren für die Zubereitung des Waschpuffers
- Statistische Software zur Auswertung der Ergebnisse

### 3.3.3 Testdurchführung und Handhabung

- **Testdurchführung lt. Hersteller (vereinfacht und gekürzt):**

- 200 µl Standardlösung oder Probe in Kavität pipettieren (Doppelbestimmung empfohlen)
- 50 µl Enzym-Konjugat dazupipettieren
- auf einem Schüttler bei 800 U/min 10 Minuten inkubieren
- Kavitäten fünfmal mit Waschpuffer waschen
- 200 µl Substrat zugeben
- auf Schüttler wieder 10 Minuten inkubieren
- 50 µl Stoppreagens zugeben und gut durchmischen
- Extinktionen bei 650 nm photometrisch bestimmen

- **Kommentar zur Handhabung des Testkits:**

Die dem Test beigelegte *Gebrauchsanweisung* (in englischer Sprache) enthält nur „short form instructions“ sowie ein „Technisches Daten-Blatt“. In diesen wird weder zu Matrixeffekten, Lagerbedingungen noch zu den verschiedenen Anwendungsmöglichkeiten des Immunoassays Stellung bezogen. Die detaillierte Beschreibung des Testsystems erhält man erst auf spezielle Anfrage.

Die *mitgelieferten Bestandteile* enthalten keine Atrazinstandards. Diese müssen extra beim Hersteller bezogen werden. Bezieht man die Herstellerstandards, so hat man fünf Standards (50, 100, 200, 400, 800 und 1600 ppt Atrazin) und einen Null-Standard zur Verfügung.

Die *Vorbereitung* des Tests besteht aus Temperieren der Reagentien und Herstellung der Waschpufferlösung.

Die *Durchführung* (Zugabe von Reagentien, Proben und Waschschrift) gestaltet sich sehr einfach.

### **3.3.4 Messung von dotierten Proben und deren Ergebnisse mit verschiedenen Auswertemöglichkeiten**

Die Auswertung der dotierten Proben konnte nicht durchgeführt werden, da im Laufe unserer praktischen Arbeiten zu dieser Studie die Firma agri-diagnostics / Quantix Lieferschwierigkeiten mit ihren Atrazinstandards hatte. Wir mußten daher auf eine eingehende Prüfung verzichten.

### 3.3.5 Reproduzierbarkeit, Präzision

siehe Pkt. 2.5

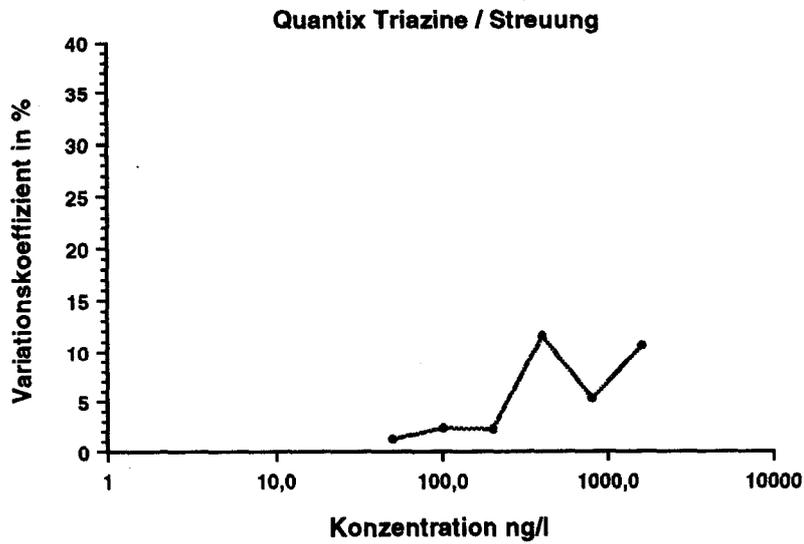


Abb. 14

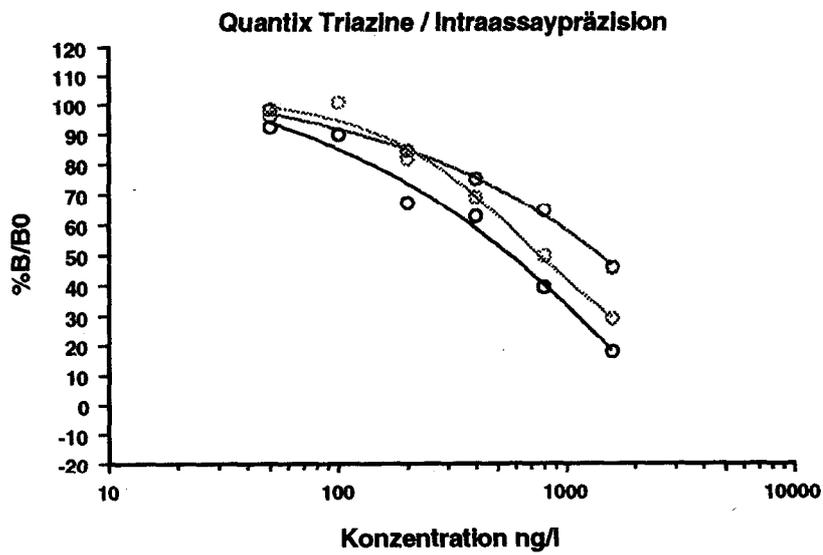


Abb. 15

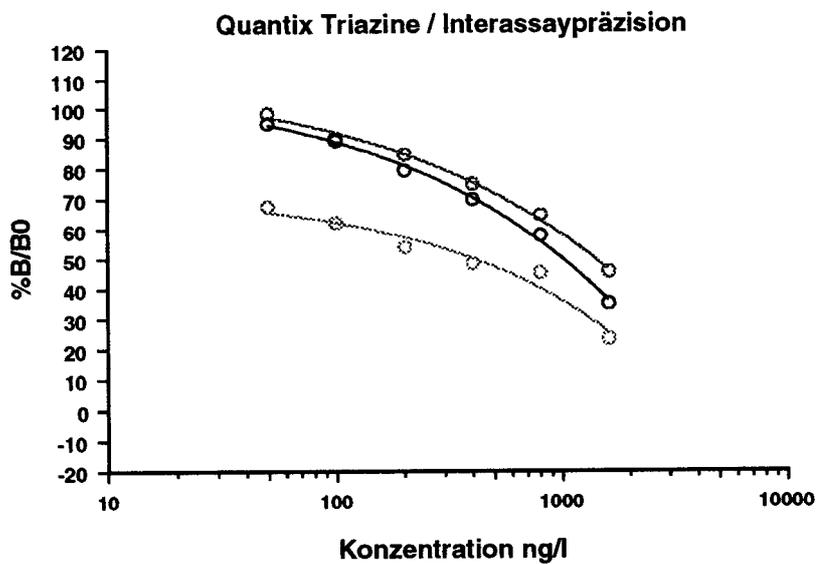


Abb. 16

### 3.4 QUANTIX - ATRAZINE 0.1<sup>HS</sup>

#### 3.4.1 Firmenangaben zum ELISA Kit

- **Kurzinformation zum Anwendungsbereich des Kits:**

Der Test ist ein kompetitiver Enzym-Immunoassay für die quantitative Analyse von Atrazin in Wasser und Boden.

- **Kreuzreaktivitäten:**

Atrazin	100 %
Propazin	155 %
Prometon	39 %
Prometryn	34 %
Ametryn	18 %
Hydroxy-Simazin	11 %
Hydroxy-Atrazin	7 %
Simazin	3 %
Desethylatrazin	2 %

- **Zeitbedarf:**

75 Minuten

- **Nachweisgrenze:**

50 ng/l Wasser (ppt)

#### 3.4.2 Inhalt des Testkits und zusätzliche Geräte

siehe 3.3.2 Quantix Triazine 0.1<sup>HS</sup> - Inhalt des Testkits und zusätzliche Geräte

#### 3.4.3 Testdurchführung und Handhabung

- **Testdurchführung lt. Hersteller (vereinfacht und gekürzt)**

- 200 µl Standardlösung oder Probe in Kavität pipettieren (Doppelbestimmung empfohlen)
- 50 µl Enzym-Konjugat zugeben
- Auf einem Schüttler bei 800 U/min 60 Minuten inkubieren
- Kavitäten fünfmal mit Waschpuffer waschen
- 200 µl Substrat zugeben
- Auf Schüttler nun 10 Minuten inkubieren
- 50 µl Stoppreagens zugeben und gut durchmischen
- Extinktionen bei 650 nm photometrisch bestimmen

- **Kommentar zur Handhabung des Testkits:**

siehe 3.3.3 Quantix Triazine 0.1<sup>HS</sup> - Kommentar zur Handhabung des Testkits

### 3.4.4 Messung von dotierten Proben und deren Ergebnisse mit verschiedenen Auswertmöglichkeiten

Testkit: Quantix Atrazine      Anzahl der Parallelbestimmungen: 3  
 Anzahl der Kalibrationspunkte: 7      (inklusive 0-Standard)  
 Zugrundegelegte y-Werte: %B/BO

Probe	Manuelle Auswertung ng/l	VK %	Lineare Interpolation ng/l	VK %	Polygonale Interpolation ng/l	4-Parameter Funktion ng/l	VK %	Spline-Approximation ng/l	GC/MS			
									Atrazin ng/l	Propazin ng/l	Atrazin + Propazin ng/l	Errechnete Werte* ng/l
1	64	18,0	69	3,4	69	75	31,1	59	n.n.	-	n.n.	n.n.
2	215	3,8	227	9,9	241	213	2,2	242	150	-	150	150
3	485	4,1	482	2,9	475	489	2,5	414	98	136	234	309
4	525	3,8	524	2,0	517	531	0,9	570	101	160	261	349
5	539	4,4	535	1,9	523	541	2,2	482	291	190	481	586
6	153	3,9	175	15,2	170	162	8,3	206	114	-	114	114

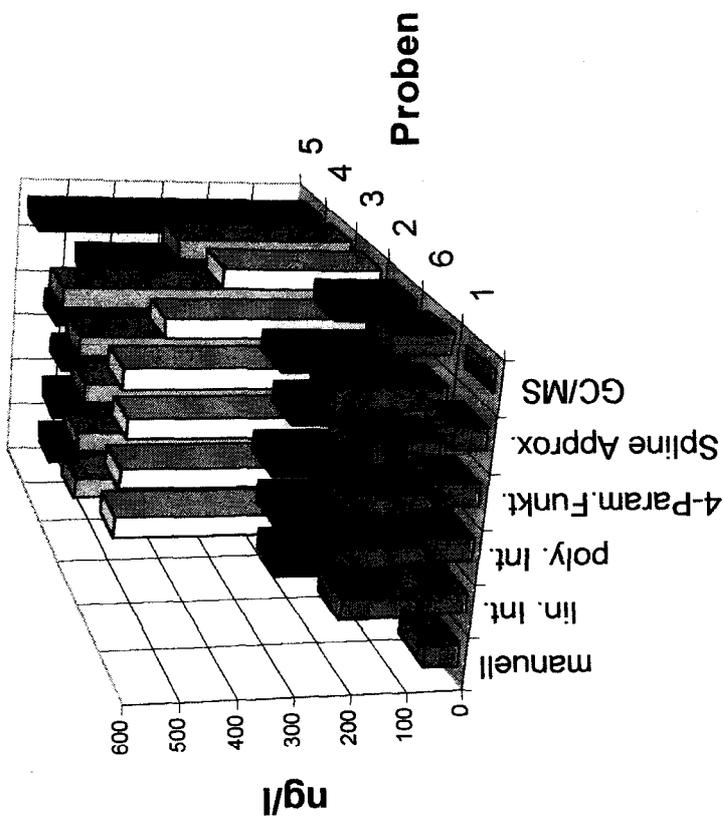
Kreuzreaktivitäten: Atrazin 100%  
 Propazin 155%

\* ... die errechneten Werte sind zum Vergleich mit den ELISA-Auswertungen heranzuziehen (Berücksichtigung der Kreuzreaktivität)  
 VK ... Variationskoeffizient

Tab. 3

## QUANTIX ATRAZINE

### Vergleich ELISA-Auswertungen / GC-MS-Daten\*



\* ... ermittelt durch Umrechnung der gemessenen GC-MS-Daten; die Kreuzreaktivität von Propazin (nach Herstellerangaben, siehe Kap. 4.2) wurde berücksichtigt

Abb. 17

### 3.4.5 Reproduzierbarkeit, Präzision

siehe Pkt. 2.5

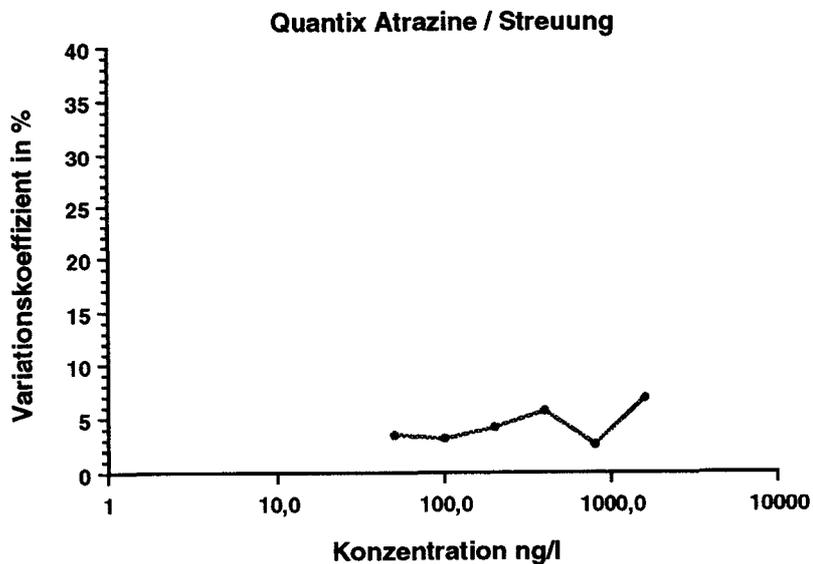


Abb. 18

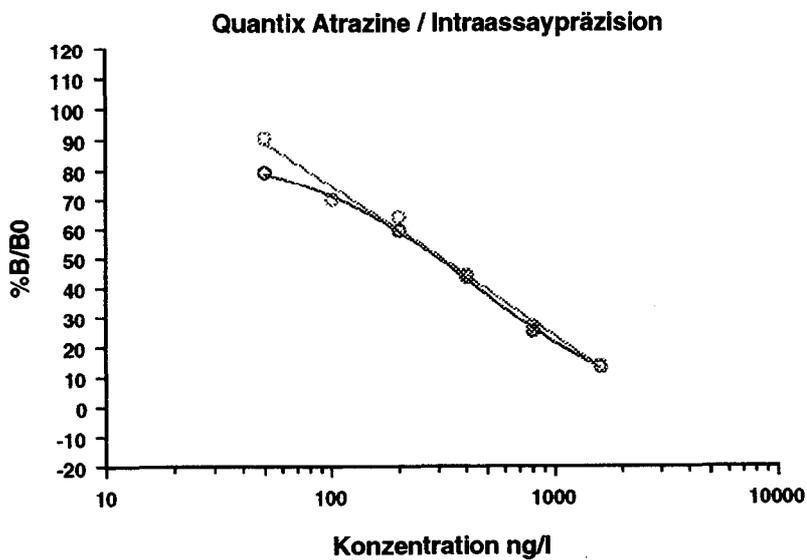


Abb. 19

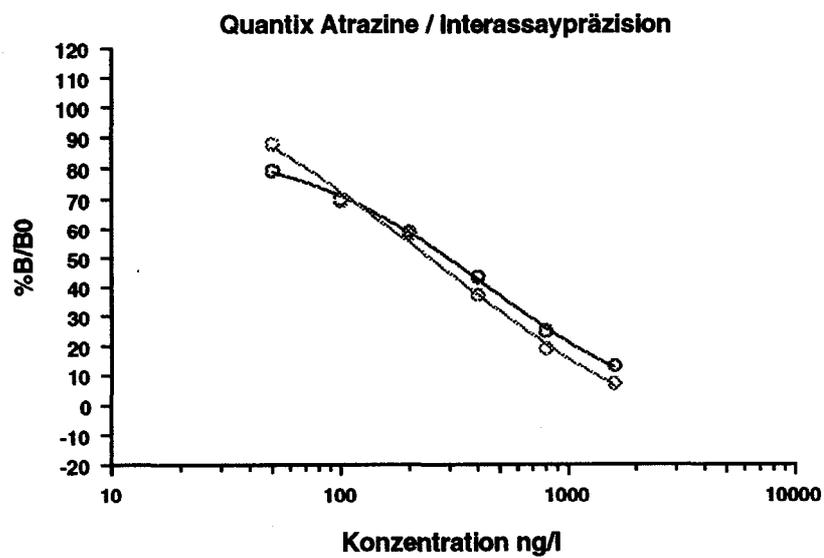


Abb. 20

### 3.5 R-BIOPHARM - RIDASCREEN<sup>(R)</sup> TRIAZIN

#### 3.5.1 Firmenangaben zum ELISA Kit

- **Kurzinformation zum Anwendungsbereich des Kits:**

Der Test ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Triazi-  
nen in Wasser.

- **Kreuzreaktivitäten:**

Atrazin	100 %
Dipropetryn	150 %
Atraton	150 %
Propazin	110 %
Prometon	100 %
Ametryn	100 %
Methoprotryn	100 %
Desmetryn	100 %
Aziprotryn	100 %
Prometryn	100 %
Desehtylatrazin	35 %
Simazin	5 %
Simetryn	4 %
Terbutylazin	3 %
Terbutryn	2 %

- **Zeitbedarf:**

Ohne Probenvorbereitung ca. 1 Stunde

- **Nachweisgrenze:**

ca. 10 ng/l (ppt)

#### 3.5.2 Inhalt des Testkits und zusätzlich benötigte Geräte

- **Packungsinhalt:**

- 1 Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten - 12 Streifen à 8 Kavitäten (vertikal)
- Je ein Fläschchen 0, 10, 30, 90, 270 und 810 ng/l Atrazin in Wasser
- Waschpuffer-Konzentrat
- Je ein Fläschchen Konjugat, Substrat, Chromogen sowie Stoppreagens

- **Zusätzlich benötigte Geräte:**

- 25, 50, und 100 µl-Mikropipetten
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)

### 3.5.3 Testdurchführung und praktische Handhabung

- **Testdurchführung lt. Hersteller (vereinfacht und gekürzt):**

- 100 µl Standardlösung oder Probe in Kavität pipettieren (Doppelbestimmung empfohlen)
- 25 µl Atrazin-Enzymkonjugat dazupipettieren
- durchmischen und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- Kavitäten dreimal mit jeweils 300 µl Waschpuffer waschen und auf saugfähigen Labortüchern kräftig ausklopfen
- 50 µl Substrat dazupipettieren
- 50 µl Chromogen zugeben
- durchmischen und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (im Dunkeln)
- 100 µl Stoppreagens zugeben und gut durchmischen
- Extinktionen bei 450 nm photometrisch bestimmen

- **Kommentar zur Handhabung des Testkits:**

In der dem Test beigelegten *Gebrauchsanweisung* (in deutscher sowie in englischer Sprache) wird neben genauen Anweisungen zur Testdurchführung auch auf die Probenvorbereitung der Wasserproben, die Haltbarkeit des Tests sowie Hinweise auf Fehlergebnisse, bedingt durch Reagentienverfall, eingegangen. Bezüglich der zusätzlich benötigten Geräte wären noch einige Dinge wie z.B. Abdeckfolien, wie sie später bei der Durchführung erwähnt werden, oder evtl. Schüttler für die Durchmischungsschritte anzuführen.

Die *mitgelieferten Bestandteile* des Testkits könnten noch eine Abdeckfolie aufweisen.

Die *Vorbereitung* des Tests besteht aus folgenden Schritten: Reagentien auf Raumtemperatur bringen und Waschpuffer aus Konzentrat herstellen.

Die *Durchführung* (Zugabe von Reagentien, Proben und Waschschrift) gestaltet sich sehr einfach. Doch bleibt offen, ob für eine zusätzliche Vereinfachung der Waschsequenz ein kommerziell erhältlicher Washer bzw. Mehrkanalpipetten oder Automaten für die Reagentienzugabe verwendet werden kann.

Die *Zeitangabe* des Herstellers kann eingehalten werden.

### 3.5.4 Messung von dotierten Proben und deren Ergebnisse mit verschiedenen Auswertmöglichkeiten

Testkit: r-biopharm

Anzahl der Parallelbestimmungen: 3

Anzahl der Kalibrationspunkte: 6 (inklusive O-Standard)

Zugrundegelegte y-Werte: %B/BO

Probe	Manuelle Auswertung	VK	Lineare Interpolation	VK	Polygonale Interpolation	4-Parameter Funktion	VK	Spline-Approximation	GC/MS				
									Atrazin	Propazin	Atrazin + Propazin	Errechnete Werte*	
1	ng/l	%	ng/l	%	ng/l	ng/l	%	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l
2	n.n.	--	n.n.	--	n.n.	n.n.	--	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
3	124	1,8	126	5,7	124	121	6,5	118	150	150	150	150	150
4	188	3,0	194	2,8	184	186	2,0	185	98	136	234	248	248
5	197	3,3	203	2,8	192	196	6,8	159	101	160	261	277	277
6	307	2,1	337	7,8	322	323	1,0	313	291	190	481	500	500
7	89	7,7	94	8,9	94	93	6,7	88	114	--	114	114	114

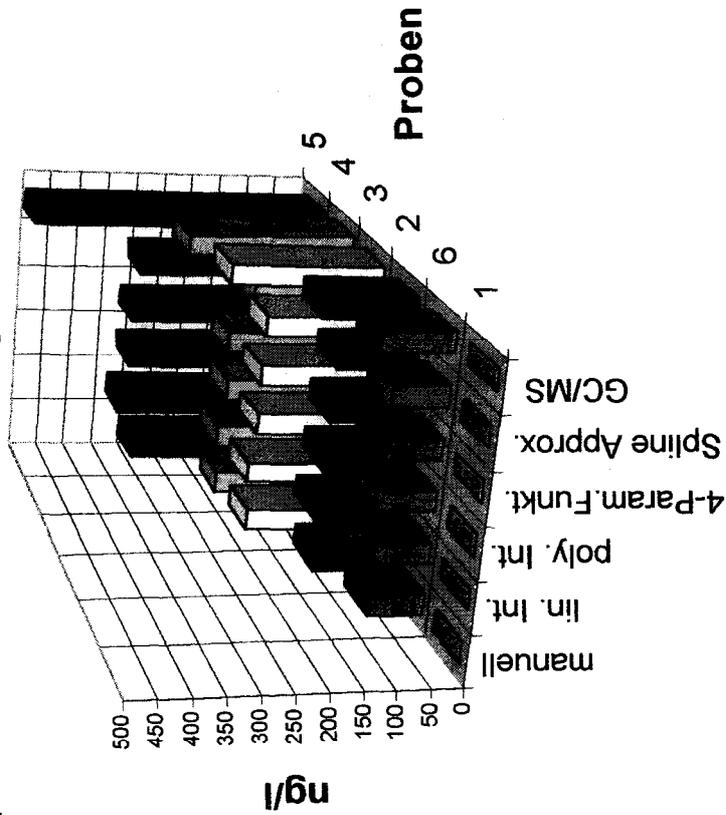
Kreuzreaktivitäten: Atrazin 100%  
Propazin 110%

\* ... die errechneten Werte sind zum Vergleich mit den ELISA-Auswertungen heranzuziehen (Berücksichtigung der Kreuzreaktivität)

VK ... Variationskoeffizient

Tab. 4

## R-BIOPHARM Vergleich ELISA-Auswertungen / GC-MS-Daten\*



\* ... ermittelt durch Umrechnung der gemessenen GC-MS-Daten; die Kreuzreaktivität von Propazin (nach Herstellerangaben, siehe Kap. 4.2) wurde berücksichtigt

Abb. 21

### 3.5.5 Reproduzierbarkeit, Präzision

siehe Pkt. 2.5

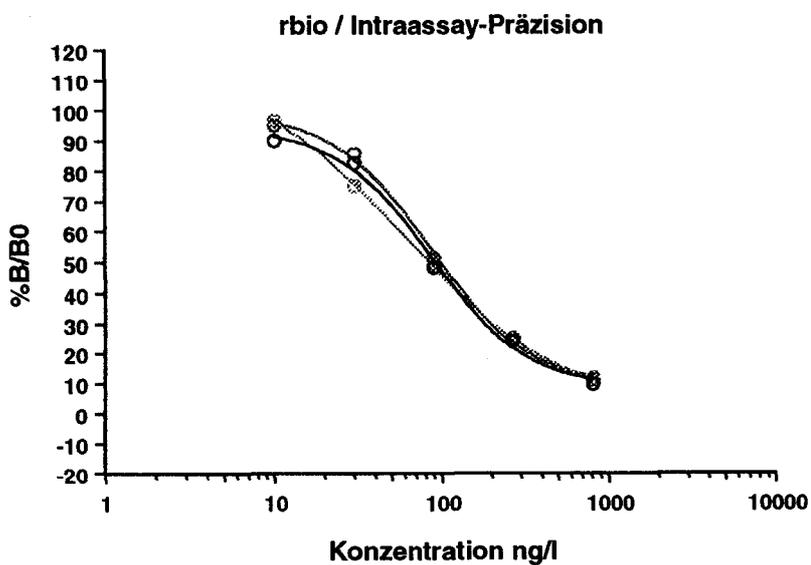
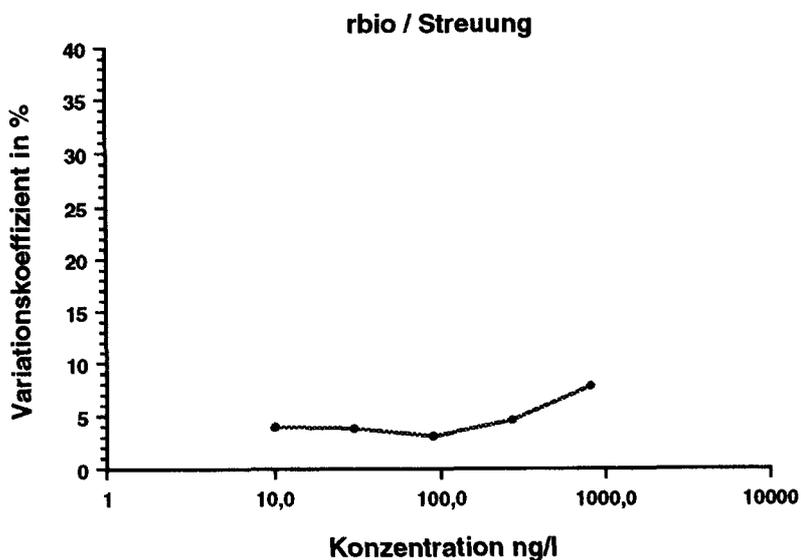


Abb. 22 und 23

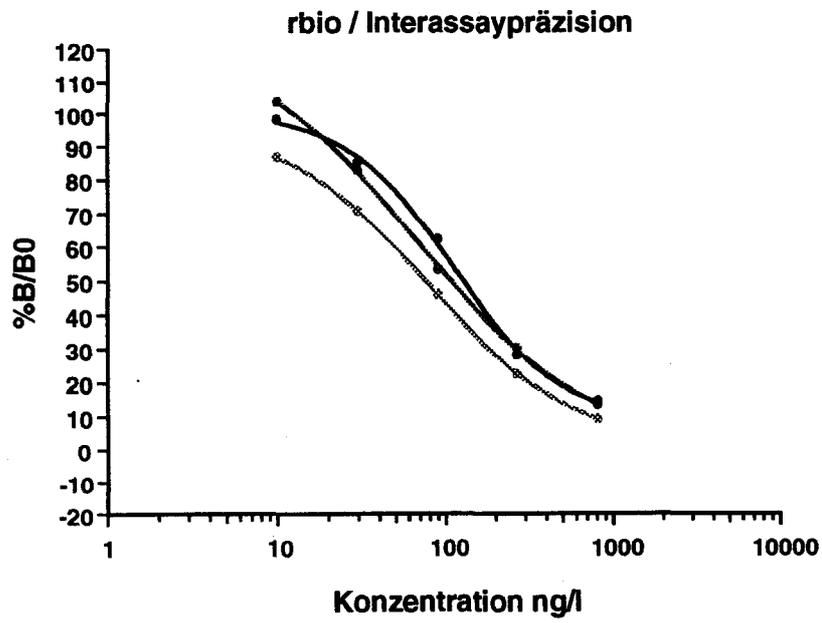


Abb. 24

## 3.6 RIEDEL-DE HAËN - TRIAZIN ELISA

### 3.6.1 Firmenangaben zum ELISA Kit

- **Kurzinformation zum Anwendungsbereich des Kits:**

Kompetitiver Enzymimmunoassay zum Nachweis von Atrazin, Propazin, Sebuthylazin, Simazin, Terbutylazin und Trietazin in Wasserproben - im Konzentrationsbereich von 10-1000 ng/l. Atrazinäquivalente mit ca. 90% Wiederfindungsrate.

- **Kreuzreaktivitäten:**

Atrazin	100 %
Propazin	150 %
Sebuthylazin	150 %
Simazin	15 %
Terbutylazin	15 %
Trietazin	15 %
Desisopropylatrazin	3 %
Desethylatrazin	3 %
Cyanazin	2 %

- **Zeitbedarf:**

ca. 2 Stunden (bei max. 80 Doppelbestimmungen)

- **Nachweisgrenze:**

10 ng/l (ppt)

### 3.6.2 Inhalt des Testkits und zusätzlich benötigte Geräte

- **Packungsinhalt:**

- 1 Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten - 12 Streifen à 8 Kavitäten (vertikal)
- Je 5 ml Standardlösungen - 0, 10, 25, 50, 100, 500, 1000 ng/l Atrazin in Wasser
- Konjugat-Konzentrat und Konjugat-Puffer
- Waschpuffer-Konzentrat
- Substrat und Chromogen sowie Stoppreagens

- **Zusätzlich benötigte Geräte:**

- Meßpipetten
- 10, 25, 100, 125, 500 µl-Mikropipetten
- evtl. Mehrkanalpipette
- PESTANAL<sup>(R)</sup> - Wasser bzw. Reinstwasser
- Schüttler
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)

### 3.6.3 Testdurchführung und Handhabung

- **Testdurchführung lt. Hersteller (vereinfacht und gekürzt):**

- 100 µl Standardlösung oder Probe in Kavität pipettieren (2-fach Bestimmung empfohlen)
- 25 µl Enzymkonjugat dazupipettieren
- 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubieren (mit Abdeckfolie zugedeckt)
- Dreimal Kavitäten mit je 250 µl Waschlösung waschen und die Restfeuchtigkeit zwischen und nach den einzelnen Waschschrritten durch Ausklopfen entfernen
- 125 µl einer Mischung Chromogen und Substrat dazupipettieren
- 30 Minuten bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluß inkubieren (mit Deckel zugedeckt)
- 125 µl Stoppreagens dazupipettieren, durchmischen
- Extinktion bei 450 nm photometrisch bestimmen

- **Kommentar zur Handhabung des Testkits:**

In der dem Test beigelegten *Gebrauchsanweisung* (in deutscher sowie in englischer Sprache) wird neben genauen Anweisungen zur Testdurchführung auch sehr detailliert auf potentielle Fehlerquellen, die zu systematischen Fehlern führen können, hingewiesen und Strategien zur Vermeidung dieser Fehler aufgezeigt.

So werden etwa Angaben zur Haltbarkeit des Tests, Lagerbedingungen oder richtige Durchführung der Waschschrritte genannt. Außerdem werden auf Fehlergebnisse, verursacht durch Effekte der zu analysierenden Probe - wie etwa Lagerung der Probe, falsche Analytkonzentration für diesen Test, pH-Wert der Probe oder der Einfluß von Aziden, Cyaniden, Sulfiden oder Fluoriden - hingewiesen.

Der Testkit ist bezüglich der *mitgelieferten Bestandteile* sehr komplett. So wurde selbst an die Abdeckfolie sowie den Deckel zum Inkubieren nach Chromogengabe gedacht.

Die *Vorbereitung* für den Test besteht aus folgenden Schritten: Reagentien auf Raumtemperatur bringen, Atrazin-Enzymkonjugat mit Konjugat-Puffer verdünnen (kein Gefäß dafür im Test vorgesehen), Waschlösung aus Waschpufferkonzentrat herstellen, Mischung aus Chromogen und Substrat herstellen (Gefäß dafür im Testkit vorhanden).

Die *Durchführung* (Pipettieren von Proben und Reagentien in die Mikrotiterplatte bzw. Waschen) gestaltet sich sehr einfach. Fraglich bleibt, ob (gemäß Gebrauchsanleitung) zur Vereinfachung der Waschsequenz ein kommerziell erhältlicher Washer verwendet werden kann oder nicht.

Die *Zeitangabe* des Herstellers bezieht sich nur auf die reine Arbeitszeit, ohne Berücksichtigung des Zeitbedarfs für z.B. Reagentienherstellung und Auswertung.

### 3.6.4 Messung von dotierten Proben und deren Ergebnisse mit verschiedenen Auswertemöglichkeiten

Testkit: Riedel-de Haen      Anzahl der Parallelbestimmungen: 3      (inklusive O-Standard)  
 Anzahl der Kalibrationspunkte: 7  
 Zugrundegelegte y-Werte: %B/BO

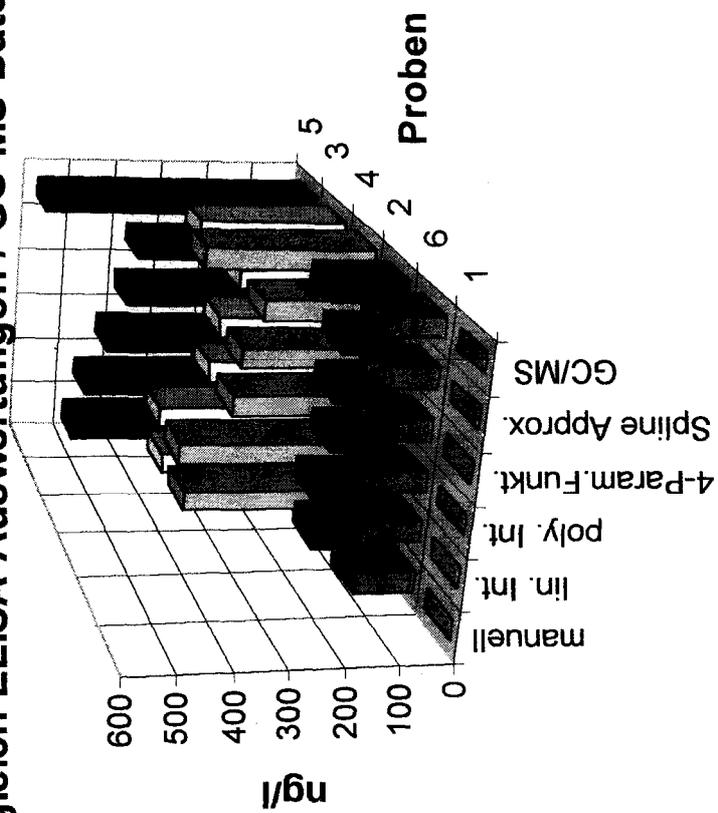
Probe	Manuelle Auswertung	VK	Lineare Interpolation	VK	Polygonale Interpolation	4-Parameter Funktion	VK	Spline-Approximation	GC/MS				
									Atrazin	Propazin	Atrazin + Propazin	Errechnete Werte*	
1	ng/l	%	ng/l	%	ng/l	ng/l	%	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l
2	n.n.	--	n.n.	--	n.n.	n.n.	--	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
3	137	10,6	144	7,6	120	123	1,1	117	150	--	150	150	150
4	343	23,6	366	2,8	258	246	5,4	210	98	138	234	302	302
5	345	22,9	360	2,8	261	248	3,4	214	101	160	261	341	341
6	492	12,1	472	1,6	429	395	1,2	378	291	190	481	576	576
6	117	3,6	115	8,7	107	110	2,8	106	114	--	114	114	114

Kreuzreaktivitäten:      Atrazin      100%  
    Propazin      150%

\* ... die errechneten Werte sind zum Vergleich mit den ELISA-Auswertungen heranzuziehen (Berücksichtigung der Kreuzreaktivität)  
 VK ... Variationskoeffizient

**Tab. 5**

### RIEDEL-DE HAEN Vergleich ELISA-Auswertungen / GC-MS-Daten\*



\* ... ermittelt durch Umrechnung der gemessenen GC-MS-Daten; die Kreuzreaktivität von Propazin (nach Herstellerangaben, siehe Abb. 4.2) wurde berücksichtigt.

Abb. 25

### 3.6.5 Reproduzierbarkeit, Präzision

siehe Pkt. 2.5

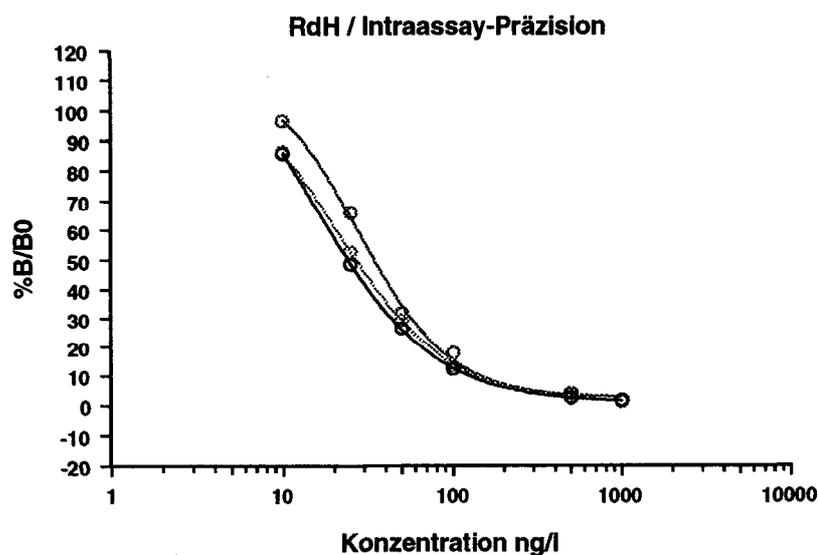
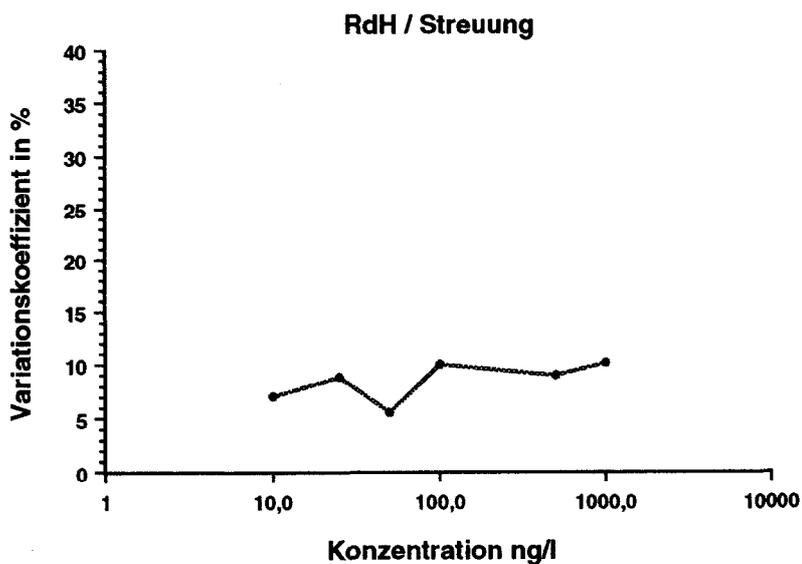


Abb. 26 und 27

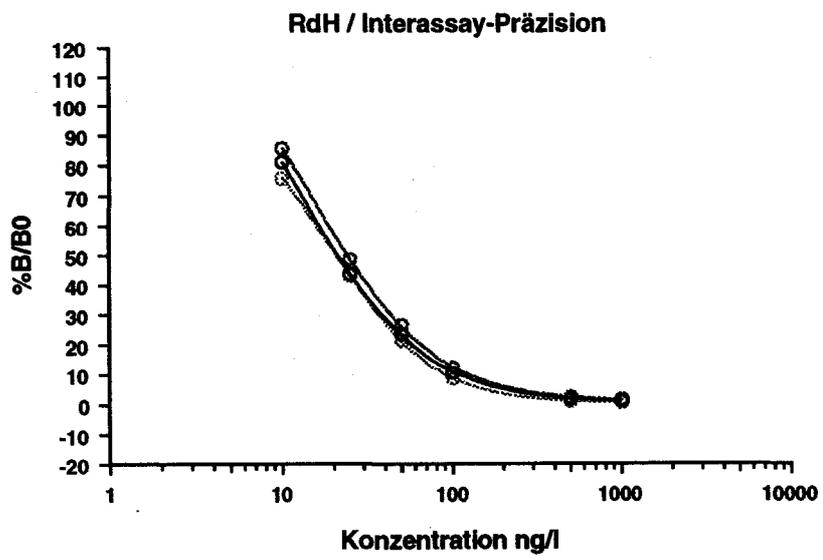


Abb. 28

### 3.7 TRANSIA - TRIAZINE DOSAGE KIT

#### 3.7.1 Firmenangaben zum ELISA Kit

- **Kurzinformation zum Anwendungsbereich des Kits:**

Der Test ermöglicht eine rasche Detektion von Triazinen in Grundwasser, Abwasser, Boden und Geweben von Pflanzen und Tieren.

- **Kreuzreaktivitäten:**

Atrazin	100 %
Propazin	91 %
Prometryn	54 %
Ametryn	67 %
Prometon	25 %
Desethylatrazin	12 %
Simazin	8 %

- **Zeitbedarf:**

1 Stunde

- **Nachweisgrenze:**

50 ng/l (ppt) für Atrazin

#### 3.7.2 Inhalt des Testkits und zusätzlich benötigte Geräte

- **Packungsinhalt:**

- 1 Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten - 8 Streifen à 12 Kavitäten (horizontal)
- Je ein Fläschchen 0, 100, 250 und 1000 ng/l Atrazin-Standard-Lösungen
- Je ein gebrauchsfertiges Fläschchen Triazin-Enzym-Konjugat, Substrat, Chromogen und Stoppreagens

- **Zusätzlich benötigte Geräte:**

- 50 und 100 µl-Mikropipetten
- Multipipette
- Schüttler (200 U/min)
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)

### 3.7.3 Testdurchführung und praktische Handhabung

- **Testdurchführung lt. Hersteller (vereinfacht und gekürzt):**

- 100 µl Standardlösung oder Probe in Kavität pipettieren (Doppelbestimmung empfohlen)
- 100 µl Enzymkonjugat dazupipettieren
- 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (mit Schütteln bei 200 U/min)
- Herstellung Mischung Substrat: Chromogen = 1:1
- Fünfmal Kavitäten mit destilliertem Wasser füllen und wieder ausleeren; dann auf Papiertuch Platte ausschütteln
- 100 µl Gemisch Substrat/Chromogen dazupipettieren
- 30 Minuten bei Raumtemperatur und unter Schütteln (200 U/min) inkubieren
- 50 µl Stoppreagens dazupipettieren und gut durchmischen
- Extinktionen bei 450 nm photometrisch bestimmen

- **Kommentar zur Handhabung des Testkits:**

Die *Gebrauchsanweisung* des Tests (in englischer Sprache) ist kurz und übersichtlich abgefaßt. Matrixeffekte, die Störungen des Tests verursachen könnten, werden in der Beschreibung nicht angeführt.

Der Testkit wirkt bezüglich der *mitgelieferten Bestandteile* sehr komplett, jedoch sind leider nur drei Standards und ein Null-Standard im „Package“ enthalten, wodurch eine Auswertung nach komplexeren Modellen nicht mehr möglich ist.

Die *Vorbereitung* des Tests besteht aus maximal 2 Schritten - Reagentien auf Raumtemperatur bringen und Vereinigen von Substrat und Chromogen - und führt daher zu keiner Komplizierung.

Die *Durchführung* (Zugabe der Lösungen und Waschschrift) ist einfach. Die Option, für den Waschschrift einen automatischen Washer zu verwenden, wird in der Bedienungsanleitung nicht erwähnt.

Die *Zeitangabe* des Herstellers kann sich nur auf die Inkubationszeiten beziehen (60 min). Die Arbeitsschritte und eine Auswertung der erhaltenen Meßergebnisse können innerhalb der angegebenen Zeit nicht bewältigt werden.

**3.7.4 Messung von dotierten Proben und deren Ergebnisse mit verschiedenen Auswertemöglichkeiten**

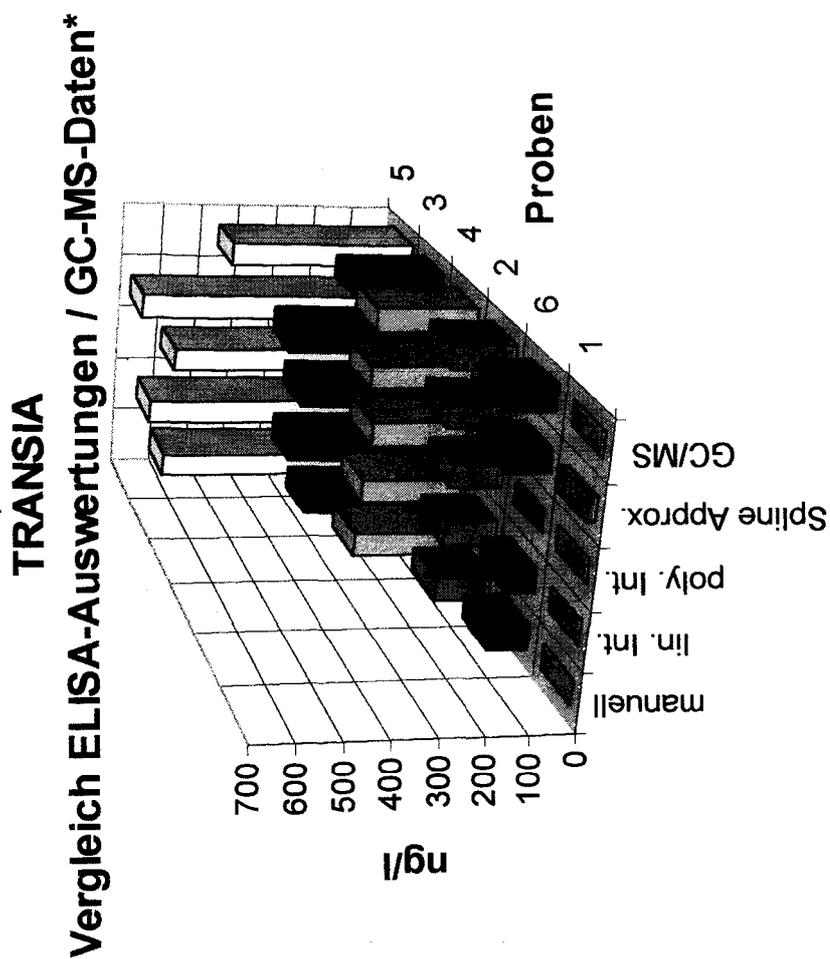
Testkit: Transia      Anzahl der Parallelbestimmungen: 3      (inklusive O-Standard)  
 Anzahl der Kalibrationspunkte: 4  
 Zugrundegelegte y-Werte: %B/BO

Probe	Manuelle Auswertung	VK	Lineare Interpolation	VK	Polygonale Interpolation	4-Parameter Funktion	VK	Spline-Approximation	GC/MS			
									Atrazin	Propazin	Atrazin + Propazin	Errechnete Werte*
1	ng/l	%	ng/l	%	ng/l	ng/l	%	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l
2	n.n.	--	n.n.	--	<100	nicht möglich	--	18	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
3	132	4,0	126	8,5	122	nicht möglich	--	144	150	150	150	150
4	303	9,3	354	25,4	333	nicht möglich	--	373	98	136	234	222
5	251	8,7	244	17,2	234	nicht möglich	--	248	101	160	261	247
6	611	7,8	650	17,7	594	nicht möglich	--	685	291	190	481	464
6	94	7,4	66	60,6	<100	nicht möglich	--	105	114	--	114	114

Kreuzreaktivitäten: Atrazin 100%  
 Propazin 91%

\* ... die errechneten Werte sind zum Vergleich mit den ELISA-Auswertungen heranzuziehen (Berücksichtigung der Kreuzreaktivität)  
 VK ... Variationskoeffizient

**Tab. 6**



\* ... ermittelt durch Umrechnung der gemessenen GC-MS-Daten; die Kreuzreaktivität von Propazin (nach Herstellerangaben, siehe Kap. 4.2) wurde berücksichtigt

Abb. 29

### 3.7.5 Reproduzierbarkeit, Präzision

siehe Pkt. 2.5

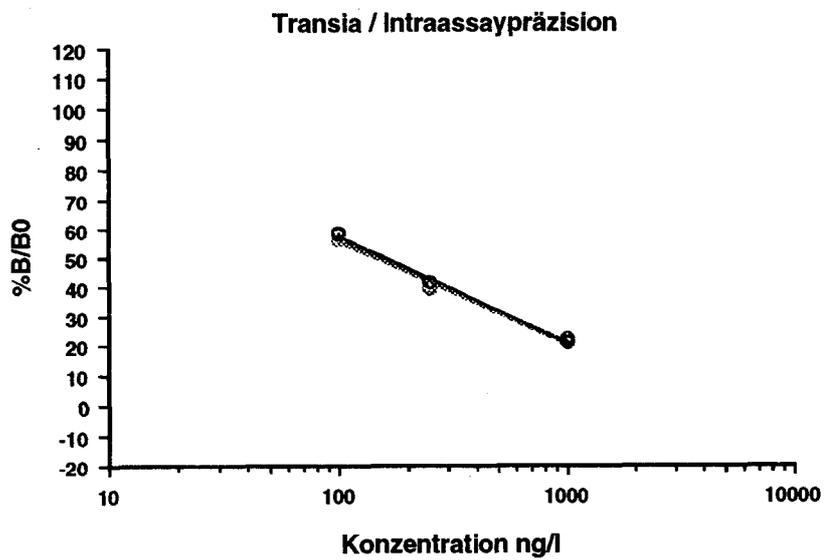
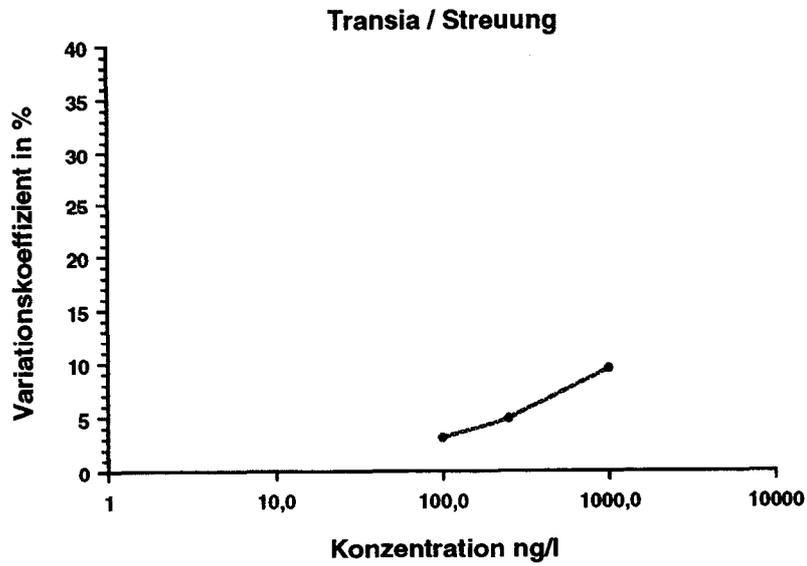


Abb. 30 und 31

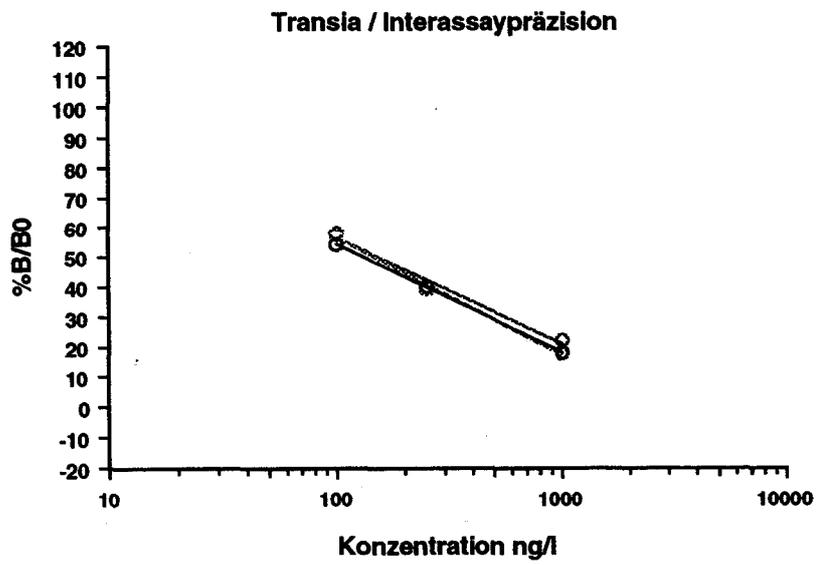


Abb. 32

4. Überblick der zum Zeitpunkt der Untersuchungen (1) in Österreich kommerziell erhältlichen Testkits für Triazine

4.1 Vertrieb der Testkits, Inhalt, Zeitbedarf und Nachweisgrenzen

	Millipore-Envirogard Triazin-ELISA	Millipore-Envirogard High Sensitivity Triazin ELISA I	Quantix Triazine 0.1 HS	Quantix Atrazine 0.1 HS	r-biopharm Ridascreen Triazin	Riedel-de Haen Triazin-ELISA	Transia Triazin Dosage Kit
Vertrieb in Österreich	Fa. Millipore Ges.m.b.H	Fa. Millipore Ges.m.b.H	Fa. Noack Ges.m.b.H*	Fa. Noack Ges.m.b.H*	Fa. Noack Ges.m.b.H	Donau-Chem Handels Ges.m.b.H	Fa. Noack Ges.m.b.H
Zeitbedarf	90 min	90 min	keine Angabe	75 min	60 min	120 min	60 min
(lt. Herstellerangaben)							
Nachweisgrenze Atrazin	37 ng/l	25 ng/l	50 ng/l	50 ng/l	10 ng/l	10 ng/l	50 ng/l
(lt. Herstellerangaben)							
Inhalt der Testkits:							
Mikrotiterplatte beschichtet	x	x	x	x	x	x	x
Standardlösungen	x	x			x	x	x
Atrazinstandards (ohne 0-Std.)	3	5	extra zu beziehen	extra zu beziehen	5	6	3
Bereich der Standards	100 - 2000 ng/l	25 - 500 ng/l	50 - 1600 ng/l	50 - 1600 ng/l	10 - 810 ng/l	10 - 1000 ng/l	100 - 1000 ng/l
Reagentien **	x	x	x	x	x	x	x
eigener Waschpuffer nötig			x	x	x	x	
Abdeckfolie							
Abdeckplatte							
Halblogarithmisches Papier	x	x					

\* ... Produkt wird durch Firma nicht mehr vertrieben  
 \*\* ... Konjugat, Chromogen, Stoppreagens  
 (1) ... Zeitraum der Untersuchungen: 1994-1995

Tab. 7

## 4.2 Kreuzreaktivitäten der Triazine

Herstellerangaben	Millipore-Envirogard Triazin-ELISA	Millipore-Envirogard High Sensitivity Triazin ELISA I	Quantix Triazine 0.1 HS	Quantix Atrazine 0.1 HS	r-biopharm Ridascreen Triazin	Riedel-de Haen Triazin-ELISA	Transia Triazin Dosage Kit
Nachweisgrenze Atrazin (lt. Herstellerangaben)	37 ng/l	25 ng/l	50 ng/l	50 ng/l	10 ng/l	10 ng/l	50 ng/l
Kreuzreaktivitäten in % bei 50% B/B0 (Atrazin = 100):							
Atrazin	100	100	100	100	100	100	100
6-Hydroxy-Atrazin	6	1	10	7			
Ametryn	291	156	26	18	100		67
Atraton					150		
Aziprotyn					100		
Cyanazin	3	1	81			2	
Desethylatrazin	3	2	2	2	35	3	12
Deisopropylatrazin						3	
Desmetryn					100		
Dipropetyln					150		
Hydroxy-Simazin							
Methoprotyn				56	100		
Prometon		86	10	39	100		25
Prometryn	94	93	56	34	100		54
Propazin	110	132	139	155	110	150	91
Sebuthylazin						150	
Simazin	48	17	56	3	5	15	8
Simetryn	94	22			4		
Terbutyn	32	8			2		
Terbutylazin	14	10			3	15	
Trietazin	6	2				15	

Tab. 8

**4.3 Überblick über die in der Studie verwendeten Auswertemodelle**

	Millipore-Envirogard Triazin-ELISA	Millipore-Envirogard High Sensitivity Triazin ELISA I	Quantix Triazine 0.1 HS *	Quantix Atrazine 0.1 HS	r-biopharm Ridascreen Triazin	Riedel-de Haen Triazin-ELISA	Transia Triazin Dosage Kit
Manuelle Auswertung	x	x	nicht durchgeführt *	x	x	x	x
Lineare Interpolation	x	x	nicht durchgeführt *	x	x	x	x
4-Parameter Funktion	nicht möglich	x	nicht durchgeführt *	x	x	x	nicht möglich
Polygonale Interpolation	x	x	nicht durchgeführt *	x	x	x	x
Spline Interpolation	nicht durchgeführt	x	nicht durchgeführt *	x	x	x	x
Ergebnisse tabelliert	S. 18	S. 23	nicht tabelliert *	S. 31	S. 36	S. 41	S. 46

\* ... wegen Liefer Schwierigkeiten wurden keine Tests mit dotierten Proben durchgeführt

**4.4 Streuung, Intraassay- und Interassaypräzision der einzelnen Kits**

	Millipore-Envirogard Triazin-ELISA	Millipore-Envirogard High Sensitivity Triazin ELISA I	Quantix Triazine 0.1 HS	Quantix Atrazine 0.1 HS	r-biopharm Ridascreen Triazin	Riedel-de Haen Triazin-ELISA	Transia Triazin Dosage Kit
Streuung	S. 20	S. 26	S. 30	S. 35	S. 41	S. 47	S. 53
Intraassaypräzision	S. 20	S. 26	S. 30	S. 35	S. 41	S. 47	S. 53
Interassaypräzision	S. 21	**	S. 31	S. 36	S. 42	S. 48	S. 54

\*\* ... nicht ermittelt, da während der Analysen zu dieser Studie der Test auf anderen Antikörper umgestellt wurde

**Tab. 9 und 10**

## **5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK**

### **5.1 Zusammenfassung der Testergebnisse**

Die in dieser Studie verglichenen, zum Zeitpunkt der Untersuchungen in Österreich erhältlichen Testkits unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Arbeitsbereiche, Nachweisgrenzen und Kreuzreaktivitäten, wodurch sie für unterschiedliche Zielgruppen interessant sind (vergleiche Tab.7 und 8).

Die Nachweisgrenzen (nach Herstellerangaben) ermöglichen großteils eine Detektion von Atrazin in einer Konzentration von 0,1 µg/l (EU-Richtwert für Pestizide in Trinkwasser).

Generell stellte sich heraus, daß die ermittelte Interassaypräzision der Testkits die Verwendung einer Kalibrationskurve für mehrere Platten limitiert und auf jeder Mikrotiterplatte mindestens eine Kalibrationskurve aufgetragen und zur Quantifizierung herangezogen werden muß. Weiters sollte jeder Standard und jede Probe mindestens dreimal auf der Mikrotiterplatte aufgetragen und analysiert werden (der DIN-Entwurf sieht sogar eine viermalige Bestimmung vor).

Gründe für eine schlechte Interassaypräzision sind geringe Unterschiede der Beschichtungsdicke der Mikrotiterplatten mit Antikörpern und die bestenfalls halbautomatische Reagentienzugabe; Proben und Standards werden händisch pipettiert, was trotz größtmöglicher Sorgfalt zu Schwankungen bei der hierfür benötigten Zeit und damit zu Unterschieden in der Kinetik der Antigen-Antikörper-Reaktion führt. Dazu kommen von Test zu Test unterschiedliche Labor-Rahmenbedingungen wie Temperatur und Luftfeuchtigkeit.

Die meisten der genannten Fehlerquellen können natürlich durch in der Anschaffung teure ELISA-Vollautomaten bzw. Inkubatoren beseitigt werden. Dies würde auch zu einer weiteren Effizienzsteigerung bezüglich Probandendurchsatz-Kosten-Verhältnis führen. In der medizinischen Diagnostik wird dieser Weg schon seit langer Zeit beschritten.

Bezüglich der Kreuzreaktivitäten der durchgeführten Tests kann gesagt werden, daß ein Test mehrere Triazine im selben Ausmaß erfaßt - also annähernd die Summe dieser ausgewählten Triazine widerspiegelt (r-Biopharm), während bei den anderen Tests die verschiedenen Triazine unterschiedlich mit den Antikörpern reagieren (siehe Tab. 8).

Die Studie zeigt auch die Unterschiede der Präzision bezüglich der Konzentration der gemessenen Standards auf (siehe Abb. 7, 10, 12, 15, 18, 21 und 24). Hinsichtlich der Schwankungen kann eine Verdünnung bzw. Aufkonzentrierung in den optimalen Bereich empfohlen werden.

Im absoluten Vergleich zu den GC-MS-Ergebnissen zeigte sich bei fast allen Testkits gute Übereinstimmung der Ergebnisse. Vor allem hinsichtlich der Verwendbarkeit der Immunoassays für Screeningzwecke kann man sagen, daß kein Test falsch negative Resultate lieferte. Aufgrund von Zeit-, Kosten- und Logistikgründen ist eine Verwendung von ELISA-Tests für Screening- und Monitoringzwecke daher empfehlenswert.

Eine weitere interessante Einsatzmöglichkeit des Immunoassays ist seine Verwendung als zweite unabhängige Analysenmethode; einzelanalytisch gewonnene Ergebnisse können durch eine zweite Methode abgesichert werden. Nach Berücksichtigung der in einer Probe eventuell enthaltenen bekannten Kreuzreaktanden können Umrechnungen auf ELISA-Ergebnisse durchgeführt und so die einzelanalytischen Werte überprüft werden. Dies wurde

in dieser Studie beim Vergleich der GC-MS-Ergebnisse mit den ELISA-Daten ebenfalls praktiziert (siehe Tab.1-6).

## 5.2 Ausblick

Zusammenfassend kann man sagen, daß die Analytik mit Immunoassays sich bestens zum Screening im Rahmen der traditionellen Rückstandsanalytik eignet. In Anbetracht der Anzahl von Proben, die einer aufwendigen Einzelanalytik unterzogen werden und bei denen dann im Analysenprotokoll „nicht nachweisbar“ zu lesen ist, könnte ein solches Screening von großem wirtschaftlichen Nutzen sein. Da falsch negative Befunde bei dieser Methode ausgeschlossen werden können, kann man Ergebnissen der Immunoassays Vertrauen schenken, wie verschiedene Untersuchungen (u.a. SCHMIDT I., 1994; THURMAN E.M. et al, 1990; GOOLSBY D.A. et al, 1990; FLEEKER J.R. et al, 1990;GRUESSNER B. et al, 1995) gezeigt haben. Bei Proben mit den mittels Enzymimmunoassay erhaltenen Ergebnis „nicht nachweisbar“ kann man daher von einer weiteren Analytik Abstand nehmen.

Die in dieser Studie verglichenen Mikrotiterplattenimmunoassays für Triazine in Wasserproben zeigen sowohl hinsichtlich der Analyte als auch der Immunoassaytechniken nur einen begrenzten Bereich dieser vielfältig in der Umwelt einsetzbaren Methode auf.

Mittlerweile gibt es für eine große Anzahl von Substanzen in verschiedenen Matrices (Wasser, Boden, Schlamm) kommerziell erhältliche Immunoassaysysteme auf Mikrotiterplatten- oder „Tube“-Basis (SHERRY J.P., 1992). Die Anwendung von Immuntestsystemen bei Boden- oder Schlammproben ist bei in Kapitel 1.1 genannten, vergleichbaren Verwendungen noch effizienter als bei Wasseruntersuchungen. Die oftmals extrem komplizierte und zeitaufwendige Probenvorbereitung für eine „herkömmliche Rückstandsanalytik“ in diesen Matrices verringert sich nämlich wesentlich.

Im Hinblick auf die hohen Kosten von Analysen, die stetig wachsende Anzahl zu überwachender Parameter und die ständig zunehmende Zahl an Proben, bietet sich der Immunoassay als eine wertvolle Ergänzung zu den momentan gebräuchlichen Analysemethoden in der Umweltanalytik an.

Zukunftsperspektiven in der Routineanwendung von Immunoassays sind die Kopplung der Antigen-Antikörper-Reaktion mit opto-elektronischen Sensoren, mit deren Hilfe On-Line-Überwachungen von Fließgewässern oder Abflüssen denkbar wären.

Eine wichtige Entwicklung stellt auch der sogenannte „Microspot-Immunoassay“ dar, der jedoch in der Routineanwendung noch nicht verfügbar ist. Dabei werden unterschiedliche Antikörper gegen verschiedene Analyte in „Mikroflecken“ auf einer Oberfläche, ähnlich einer Mikrotiterplatte, immobilisiert und die zu analysierende Lösung wird aufgetragen. Mit Hilfe eines Laser-scannenden konfokalen Mikroskops können nun die einzelnen fluoreszenzmarkierten Mikroflecken ausgewertet werden, wobei verschiedene Varianten (kompetitive oder nicht kompetitive Immunoassays) zur Anwendung gelangen können. Diese Multianalyt-Immunoassays würden mit minimalsten Probenmengen (100 µl) und maximaler Nachweisempfindlichkeit (bis zu  $4 \times 10^{-15}$  mol/l) vielleicht sogar einer Multirückstandsanalytik im heutigen Sinne in Präzision und Genauigkeit ebenbürtig, im Hinblick auf Kosten, Zeit und Ressourcen jedoch überlegen sein.

## 6. ANHANG

### 6.1 Begriffsdefinitionen

#### Immunologie:

Wissenschaftliche Lehre von den Abwehrmechanismen tierischer Organismen und der durch diese vermittelten Immunität. Zunächst denke man an die allgemeinen und spezifischen Abwehrvorgänge, die ein Organismus gegen alle eingedrungenen Fremdkörper und Keime richtet.

#### Antigen:

Abkürzung für *Antisomatogen* (= Antikörperbildner); ein großes, chemisch komplexes Molekül oder ein Hapten-Protein-Konjugat, das in einem tierischen Organismus oder in vitro eine Immunantwort in Form von spezifischen Antikörpern induzieren kann.

#### Immunogen:

Substanz, mit der die Antikörperbildung stimuliert wird. Wenn Antikörper gegen niedermolekulare Verbindungen erzeugt werden sollen, muß zunächst ein kovalentes Konjugat mit einem hochmolekularen Protein synthetisiert werden, da nur hochmolekulare Verbindungen die Immunantwort anregen können (siehe auch **Antigen** und **Hapten**).

#### Hapten:

(Halbantigen, von griech.: *haptain* = befestigen); Bezeichnung für ein 'unvollständiges Antigen', das wegen seiner geringen Größe (ca. < 1000 Dalton), keine Immunantwort induzieren kann (wie etwa ein Antigen), jedoch mit vorhandenen Antikörpern eine Immunreaktion eingehen kann. Um Antikörper für ein gewisses Hapten zu erhalten, wird dieses zumeist an ein Protein gekoppelt und einem tierischen Organismus inkorporiert, welcher daraufhin Antikörper bildet. Diejenigen Antikörper, die das Hapten und nicht das gekoppelte Protein als 'Schloß' für ihre Immunantwort ('Schlüssel') benutzen, werden isoliert und als Antikörper gegen das betreffende Hapten verwendet.

#### Antikörper:

Hochmolekulare Proteine, die als Antwort auf das Eindringen einer artfremden, hochmolekularen Verbindung in einen tierischen Organismus bzw. in vitro gebildet werden. Sie gehören zu den Immunglobulinen und bestehen aus zwei Paaren von Polypeptidketten, die durch Disulfidbrücken verbunden sind. Sie verbinden sich nach einem „Schlüssel-Schloß-Prinzip“ an einer bestimmten Stelle mit dem Antigen oder Hapten und bilden so einen Komplex.

**monoklonale Antikörper:**

Eine homogene Antikörperpopulation, die aus einer spezifischen Zellart *in vitro* gewonnen wird. Der Vorteil solcher monoklonaler Antikörper ist die mengenmäßig unbeschränkte Synthesemöglichkeit.

**polyklonale Antiseren:**

Das Serum wird für gewöhnlich aus einem Wirbeltier gewonnen und enthält eine heterogene Antikörperpopulation; das heißt, es enthält Antikörper unterschiedlicher Spezifität und Affinität und wurde durch verschiedenartige Zellen produziert.

**in vitro / in vivo:**

(*vitrum* = lat. für Glas); Bezeichnung für medizinisch naturwissenschaftliche Experimente, die unter künstlichen Bedingungen (wörtl. 'im Glas') und nicht am oder im lebenden Organismus (*in vivo*) durchgeführt werden.

**Immunoassay:**

(*assay* = engl. für Probe, Prüfung); Sammelbezeichnung für die verschiedenen Analysemethoden, die sich der Immunchemie, insbesondere der Antigen-Antikörper-Reaktion bedienen. An die Stelle von Antigenen können auch Haptene treten.

**homogener Immunoassay:**

Test, der keine Abtrennung von freier und antikörpergebundener Fraktion des markierten Antigens erfordert. Spezielle Eigenschaften der markierten Verbindung ändern sich durch die Bindung an die Antikörper derart, daß die gebundene Fraktion eindeutig von der freien unterschieden werden kann.

**heterogener Immunoassay:**

Test, bei dem eine Trennung von antikörpergebundener und freier Fraktion des markierten Antigens erforderlich ist, weil das Meßsignal in beiden Fraktionen gleich ist.

**Festphasen-Immunoassay:**

Heterogener Immunoassay, in dem die Antikörper an eine feste Phase gekoppelt vorliegen. Dies kann zum einen durch rein physikalische Adsorption an geeigneten Trägern wie Polystyrol erfolgen. Zum anderen ist auch die kovalente Bindung der Antikörper an modifizierte Cellulose oder Sepharose möglich. Dieses Vorgehen erleichtert in der Regel die Trennung.

**Enzymimmunoassay:**

Immunologisches Bestimmungsverfahren, bei dem als markiertes Antigen eine enzymatische Verbindung eingesetzt wird. Als Meßmethode im Enzymimmunoassay wird die enzymatische Nachweisreaktion verwendet. Enzymimmunoassays können heterogen oder

homogen ablaufen. Dies hängt davon ab, ob sich die Enzymaktivität des markierten Antigens durch die Bindung an den Antikörper ändert.

### **ELISA:**

Abkürzung für enzyme linked immunosorbent assay; ein heterogenes Verfahren unter Verwendung von Festphasen zur Trennung von antikörpergebundener und freier Antigenfraktion.

### **EMIT:**

Abkürzung für enzyme multiplied immunoassay technique; homogener Immunoassay, der für niedermolekulare Verbindungen verwendet wird. Die enzymatische Aktivität ändert sich in der Abhängigkeit von der vorliegenden Antigenkonzentration.

### **kompetitiver Enzymimmunoassay:**

Bei dieser Technik befinden sich enzymmarkierte und nichtmarkierte Antigene oder Haptene im Wettstreit um im Unterschluß vorliegende Antikörper. Nach Trennung der Ligand-Antikörperkomplexe von freien Liganden wird die Enzymaktivität in der Ligand-Antikörper-Komplexfraktion gemessen. Die Konzentration enzymmarkierter Ligand-Antikörper-Komplexe in dieser Fraktion ist umgekehrt proportional zur Konzentration der Antigene (Haptene) - d.h. der zu bestimmenden Analyte - im Assay.

### **%B/B0:**

$$\%B/B0 = \frac{\text{Extinktion des Standards}}{\text{Extinktion des Leerwertes}} * 100 \quad (2)$$

Diese Umrechnung normiert den Leerwert auf der Ordinate auf 100 % (siehe auch Kapitel 2 - Meßdaten und deren Umrechnung).

### **%B/B0 Ü:**

$$\%B/B0 \ddot{U} = \frac{\text{Extinktion des Standards} - \text{Extinktion des Überschußstandards}}{\text{Extinktion des Leerwertes} - \text{Extinktion des Überschußstandards}} * 100 \quad (3)$$

Diese Umrechnung normiert den Leerwert auf der Ordinate auf 100 % und einen Überschußstandard auf 0 % (siehe auch Kapitel 2 - Meßdaten und deren Umrechnung).

**Kreuzreaktivität:**

Die prozentuelle Angabe der Kreuzreaktivitäten ergibt sich wie folgt:

Atrazin bei 50 % B/B0, das heißt, bei halber Testbereichskonzentration, wird für Angabe der Kreuzreaktionen gleich 100 % gesetzt (100 % B/B0 entspricht der Reaktion eines Nullstandards; d.h. 100 % Bindung des Konjugats an die Antikörper).

Das Ansprechen der anderen, miterfaßten Kreuzreaktanden wird prozentuell aus der Konzentration von Atrazin bei 50 % B/B0 durch die zugehörige Konzentration des Kreuzreaktanden bei 50 % B/B0 der Atrazinkalibrationskurve mal 100 berechnet.

$$\text{Kreuzreaktanden \%} = \frac{\text{Konzentration Atrazin bei 50 \% B/B0}}{\text{Konzentration Kreuzreaktand bei 50 \% B/B0}} * 100 \quad (7)$$

## 6.2 HERLEITUNG DER LINEARISIERUNG DER 4-PARAMETER-FUNKTION (LOGIT)

$$y = \frac{a - d}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b} + d \quad (4)$$

$$y \left(1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b\right) = a - d + d \left(1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b\right) \quad (4.1)$$

$$y + y \left(\frac{x}{c}\right)^b = a + d \left(\frac{x}{c}\right)^b \quad (4.2)$$

$$y - a = d \left(\frac{x}{c}\right)^b - y \left(\frac{x}{c}\right)^b \quad (4.3)$$

$$a - y = y \left(\frac{x}{c}\right)^b - d \left(\frac{x}{c}\right)^b \quad (4.4)$$

$$a - y = \left(\frac{x}{c}\right)^b (y - d) \quad (4.5)$$

$$\frac{a - y}{y - d} = \left(\frac{x}{c}\right)^b \quad (4.6)$$

$$\frac{y - d}{a - y} = \left(\frac{c}{x}\right)^b \quad (4.7)$$

$$\frac{y - d}{a - y} = c^b \cdot x^{-b} \quad (4.8)$$

$$\log \left( \frac{y - d}{a - y} \right) = -b \cdot \log(x) + b \cdot \log(c) \quad (4.9) \text{ entspricht (5)}$$

## 6.3 LITERATURVERZEICHNIS

### Verwendete Literatur

- Alder F.L. et al., 1971:** F.L. Alder, L. Chi-Tan (1971); Detection of morphine by haemagglutination-inhibition. *J.Immunol.* 106: 1684
- Amtsblatt der EG, 1980:** Richtlinie des Rates über die Qualität des Wasser für den menschlichen Gebrauch; Nr. L 229/II (80,778/EWG)
- Cais M. et al., 1977:** M. Cais, S. Dani, Y. Eden, O. Gandolfi, M. Horn, E.E. Isaaco, Y. Josephy, Y. Sarr, E. Slovin, L. Snarsky (1977); Metalloimmunoassay; *Nature* 270: 534
- Cambiaso C.L. et al., 1977:** C.L. Cambiaso, A.E. Leek, F. de Steenwinkel, J. Billen, P.L. Masson (1977); Particle counting immunoassay (PACIA) 1: A general method for the determination of antibodies, antigens and haptens; *J.Immunol.Methods* 40: 231
- Canellas P.F. et al., 1981:** P.F. Canellas, A.E. Karu (1981); Statistical package for analysis of competition ELISA results; *Journal of Immunological Methods*, 47(1981)375-385
- Chan D.W., 1987:** D.W. Chan (1987); General principle of immunoassay; in: *Immunoassay - A practical guide*, Academic Press 1987
- De Boor C., 1978:** *A practical guide to splines*, Springer-Verlag New York Inc.
- DIN-Entwurf:** DEV zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Suborganismische Testverfahren (Gruppe T) Rahmenbedingungen für selektive Immuntestverfahren (Immunoassays) zur Bestimmung von Pflanzenbehandlungs- und Schädlingsbekämpfungsmitteln (T 2)
- Ebert et al., 1985:** Ebert/Ederer (1985); *Computer Anwendungen in der Chemie*, 2. Auflage VCH 1985
- Engvall E. et al., 1971:** E. Engvall, P. Perlmann (1971); Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G; *Immunochemistry* 8: 871
- Engvall E. et al., 1972:** E. Engvall, P. Perlmann (1972); Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulins in antigen-coated tubes; *J.Immunol.* 109: 129.
- Ercegovich C.D., 1971:** C.D. Ercegovitch, *Pesticide Identification at the Residue Level*; *Advances in Chemistry* 104; American Chemical Society: Washington DC, 1971; pp 162-78
- Fleeker J.R. et al.:** J.R. Fleeker, L.W. Cook; Reliability of commercial enzyme immunoassay in detection of atrazine in water; *Immunoassays for trace chemical analyses*, chapter 7

- Goding J.W., 1983:** Monoclonal Antibodies - Principles and Practise; 1st Ed., Academic Press, London, 1983
- Goolsby D.A. et al., 1989:** D.A. Goolsby, E.M. Thurman, M.L. Clark, M.L. Pomes (1989); Immunoassay as a screening tool for triazine herbicides in streams; Immunoassays for trace chemical analysis/Chapter 8
- Gruessner B. et al., 1995:** B. Gruessner, N.C. Shambaugh, M.C. Watzin (1995); Comparison of an enzyme immunoassay and gas chromatography/mass spectrometry for the detection of atrazine in surface waters; Environ.Sci.Technol.1995, 29, pp 251-254
- Grundwasserschwellenwertverordnung:** Grundwasserschwellenwertverordnung; BGBl 502/91
- Haimovich J. et al., 1970:** J. Haimovich, E. Hurwitz, N. Novik, M. Sela (1970); Use of protein-bacteriophage conjugates for detection and quantitation of proteins; Biochim.Biophys. Acta 207: 125
- Hammock B.D. et al, 1980:** B.D. Hammock, R.O. Mumma; Recent Advances in Pesticides: Analytical Methodology; ACS Symposium Series 136; American Chemical Society: Washington DC 1980, pp 321-52
- Herndl R. et al., 1975:** R. Herndl, I. Marschner; Comparison of various mathematical methods for the calculation of radioimmunoassay data; 21.Symp.Dtsch.Ges.Endokrin.Abstract No.117, Acta.endocr. (Kbh.) Supplement 193(1975)117
- Hock B., 1993:** B. Hock (1993); Enzymimmunoassays for pesticide analysis; Acta hydrochim.hydrobiol.21(1993) 2, pp 71-83
- Hock B. et al, in press:** B. Hock and Immunoassay Study Group; Standardization of Immunoassays for water and soil analysis; in press
- Köhler G. et al., 1975:** G. Köhler, C. Milstein; Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity; Nature 256, pp 495 - 497; (1975)
- Landsteiner K., 1945:** K. Landsteiner; The specificity of Serological Reactions, Cambridge, Massachusetts; Harvard University Press
- Leute R. et al., 1972:** R. Leute, E.F. Ullmann, A. Goldstein (1972); Spin Immunoassay of opiates and narcotics in urine and saliva; JAMA 221: 1231
- Lötz A. et al., 1976:** A. Lötze, W. Vogt, B. Popp, M. Kneidel (1976); Polygonal interpolation, a simple, rapid, and versatile approximation method requiring minimal computing facilities; Computers and Biomedical Research 9, 21-30(1976)
- Marschner I. et al.:** I. Marschner, F. Erhardt, P.C. Scriba; Calculation of the radioimmunoassay standard curve by „Spline function“; IAEA-SM-177/71
- Nakane P.K. et al., 1966:** P.K. Nakane, Sir J. Ram, G.B. Pierce (1966); Enzyme-labelled antibodies for light and electron microscope localization of antigens; J.Histochem.Cytochem. 14: 789

- Niessner R., 1993:** R. Niessner (1993); Immunoassays in environmental analytical chemistry: Some thoughts on trends and status; Analytical Methods and Instrumentation, Vol.1, No.3, 134-144 (1993)
- Oppenheimer L. et al., 1983:** L. Oppenheimer, Th.P. Capizzi, R.M. Weppelman, H. Metha; Determining the lowest limit of reliable assay measurement; Anal.Chem. 1983, 55, pp 638-643
- O'Sullivan M.J., 1984:** Michael J. O'Sullivan; Enzyme Immunoassay; Practical Immunoassay - The State of the Art, edited by Wilfrid R. Butt; Clinical and Biochemical Analysis Vol. 14 (1984)
- Rodbard D., 1974:** D. Rodbard; Statistical Quality Control and Data Processing for Radioimmunoassays and Immunoradiometric Assays; Clin.Chem. (Winston-Salem N.Y.) 20, 1255.
- Rodbard D., 1977:** D. Rodbard (1978); Statistical estimation of the minimal detectable concentration („sensitivity“) for radioligand assays; Analytical Biochemistry 90, 1-12 (1978)
- Rodgers R., 1984:** R.P. Channing Rodgers, Data Analysis and Quality Control of Assays: A Practical Primer; in Practical Immunoassay - The State of the Art (ed. W.R. Butt); Clinical and Biochemical Analysis Vol. 14
- Sandel P. et al., 1976:** P. Sandel, W. Vogt, B. Popp, M. Kneidel (1976); Smoothing-Spline und Polygonal-Interpolation, Logit-Log- und Logit-Quadrat-Regression: Eine Gegenüberstellung mathematischer Verfahren zur Ergebniswertberechnung von Radioimmunoassays; Z.Anal.Chem., Band 279; Heft 2 (1976)
- Schmidt I., 1994:** I. Schmidt (1994); Einsatz von ELISAs (enzyme-linked immunosorbent assays) in der Umweltanalytik; Umweltbundesamt / Federal Environmental Agency (Austria), UBA-IB-450
- Schroeder H.R. et al., 1976:** H.R. Schroeder, P.O. Vogelhut, R.J. Carrico, R.C. Boguslaski, R.T. Buckler (1976); Competitive protein binding assay for biotin monitored by chemoluminescence; Anal.Chem. 48: 1933-1937
- Sherry J.P., 1992:** J.P. Sherry (1992); Environmental chemistry: The immunoassay option; Critical Reviews in Analytical Chemistry, 23 (4): 217-300 (1992)
- Thurman E.M. et al., 1990:** E.M. Thurman, M. Meyer, M. Pomes, Ch.A. Perry, A.P. Schwab (1990); Enzyme-linked immunosorbent assay compared with gas chromatography/mass spectrometry for the determination of Triazine Herbicides in Water; Analytical Chemistry Vol. 62, No. 18 (1990)
- Trinkwasser-Pestizidverordnung:** Trinkwasser-Pestizidverordnung; BGBl 448/91
- Ullmann E.F. et al., 1976:** E.F. Ullmann, M. Schwarzberg, K.E. Rubenstein (1976); Fluorescent transfer immunoassay. A general method for the determination of antigens; J.Biol.Chem. 251: 4172

- Vanderlaan M. et al., 1988:** M. Vanderlaan, B.E. Watkins, L. Stanker (1988); Environmental monitoring by immunoassay; Environ.Sci.Technol., Vol.22, No.3, 1988, VCH - Verlag, Weinheim
- Van Weemen B.K. et al., 1971:** B.K. Van Weemen, A. Schuurs (1971); Immunoassay using antigen-enzyme conjugates; FEBS Lett. 15: 232
- Van Weemen B.K. et al., 1975:** B.K. Van Weemen, A. Schuurs (1975); The influence of heterologous combinations of antiserum and enzyme-labelled estrogen on the characteristics of estrogen EIAs; Immunochemistry 12: 667
- Wassergüte-Erhebungs-**  
**verordnung:** Wassergüte-Erhebungsverordnung; BGBl 338/91
- Yalow R.S. und**  
**Berson S.A., 1960:** Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods; Nature 184: 1684

-----

*(unterstrichen = Im Text zitierte Literaturstelle)*

## **Übersichtsartikel**

- Butt W.R., 1984:** W.R. Butt, edit. (1984); Practical Immunoassay, The state of the art; Clinical and Biochemical Analysis, Volume 14
- Chan D.W., 1987:** D.W. Chan (1987); General principle of immunoassay; in: Immunoassay - A practical guide, Academic Press 1987
- Davies D.R. et al., 1990:** D.R. Davies, E.A. Padlan (1990); Antibody-antigen complexes; Annu.Rev.Biochem. 1990. 59:439-73
- Ekins R.P. et al., 1990:** R.P. Ekins, F.W. Chu, E.M. Biggart (1990); Multianalyte immunoassay: The immunological „Compact Disk“ of the future; Volume 13, No. 4, 1990, pp 169-181
- Haiber G. et al., 1995:** G. Haiber, H.F. Schöler (1995); Evaluierung von PCB-Schnelltests; GIT Fachz. Lab. 6/95
- Harrison R.O. et al., 1993:** R.O. Harrison, N. Melnychuk (1993); Rapid analysis of PCBs in soil by enzyme immunoassay; Intern.J.Envirn.Anal.Chem., Vol. 59, pp. 179-185
- Hock B. et al., 1989:** B. Hock, A. Dankwardt, S. Pullen (1989); Ultrasensitive Pestizidanalytik: Immunfiltrations- und Enzymimmunoassays; TU München (Weihenstephan), Lehrstuhl f. Botanik, W 8050 Freising 12
- Hock B. et al.:** B. Hock, T. Giersch, A. Dankwardt, F. Just, K. Kramer, S. Pullen, S. Rauchalles; Toxicity assessment and On-line monitoring: Immunoassays; TU München (Weihenstephan), Lehrstuhl f. Botanik, W 8050 Freising 12

- Ius A. et al., 1993:** A. Ius, M.A. Bacigalupo, G. Meroni, A. Pistillo, A. Roda (1993); Development of a time-resolved fluoroimmunoassay for phthalate esters in water; *Fresenius J. Anal. Chem.* (1993), 345:589-591
- Keuchel C. et al., 1994:** C. Keuchel, R. Niessner (1994); Rapid field screening test for determination of 2,4,6-trinitrotoluene in water and soil with immunofiltration; *Fresenius J. Anal. Chem.* (1994) 350 : 538-543
- Krämer P.A. et al., 1991:** P.A. Krämer, R.D. Schmid (1991); Automated quasi-continuous immunoanalysis of pesticides with a flow injection system *Pestic. Sci.* 1991, 32, pp 451-462
- Lassak H.F. et al., 1989:** H.F. Lassak (1989); Fluoreszenzimmunoassays; *Labor Praxis Juni 1989*
- Märtlbauer E. et al., 1993:** E. Märtlbauer, E. Schartner (1993); Kompetitive Enzymimmuntests zum Nachweis von Rückständen; *Labor direct 1993/3*
- Müller H. et al., 1994:** H. Müller, A. Zürn (1994); Pestizidanalytik in Umweltproben - biologische und biochemische Tests; *CLB Chemie in Labor und Biotechnik*, 45. Jahrgang, Heft 6/1994
- Murray R.A. et al., 1993:** R.A. Murray (1993); Factors influencing immunogen design in pesticide immunoassay; *BCPC Monograph No.55 - Opportunities for molecular biology in crop production*, 1993
- Niessner R., 1993:** R. Niessner (1993); Immunoassays in environmental analytical chemistry: Some thoughts on trends and status; *Analytical Methods and Instrumentation*, Vol.1, No.3, 134-144 (1993)
- O'Sullivan M.J., 1984:** Michael J. O'Sullivan; *Enzyme Immunoassay; Practical Immunoassay - The State of the Art*, edited by Wilfrid R. Butt; *Clinical and Biochemical Analysis Vol. 14* (1984)
- Perkins L.B. et al., 1991:** L.B. Perkins, M. Flint, G. Schröder, T.S. Fan, A. Karen, L. Ferguson, B.S. Ferguson (1991); The detection of benomyl and procymidone in wine by competitive inhibition enzyme immunoassay at part per billion levels; *Immuno Systems, Inc., Scarborough, ME, American Society for Enology and viticulture*
- Scharpe S.L. et al., 1976:** S.L. Scharpe, W.M. Cooreman, W.J. Blomme, G.M. Laekeman (1976); Quantitative enzyme immunoassay: Current status; *Clinical Chemistry*, Vol.22, No.6, 1976
- Schwalbe-Fehl M., 1986:** Immunoassays - Schwerpunktthema
- Schwedt G., 1989:** G. Schwedt (1989); *Biosysteme für die chemische Analytik; Labor Praxis, Juni 1989*
- Sherry J.P., 1992:** J.P. Sherry (1992); Environmental chemistry: The immunoassay option; *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 23 (4): 217-300 (1992)
- Stanker L.H. et al., 1991:** L.H. Stanker, B.E. Watkins, M. Vanderlaan; Environmental monitoring by immunoassay; H. Frehse - „Pesticide Chemistry“, VCH 1991

- Stearman G.K. et al., 1992:** G.K. Stearman, V.D. Adams (1992); Atrazine soil extraction techniques for enzyme immunoassay microtiter plate analysis Bull. Environ. Contam. Toxicol. (1992) 48: pp. 144-151
- Van Emon J.M. et al., 1992:** J.M. Van Emon, V. Lopez-Avila (1992); Immunochemical methods for environmental analysis; Analytical Chemistry, Vol. 64, No. 2, 1992
- Vanderlaan M. et al., 1988:** M. Vanderlaan, B.E. Watkins, L. Stanker (1988); Environmental monitoring by immunoassay; Environ. Sci. Technol., Vol. 22, No. 3, 1988, VCH - Verlag, Weinheim
- Weisgerber C., 1995:** ELISA-Systeme, Nahrungs-, Futtermittel- und Wasseranalytik mit Enzymimmunoassays, Riedel-de Haen AG, Hoechst High Chem, Sonderdruck Magazin 15
- Wortberg M. et al., 1994:** M. Wortberg, S.B. Kreissig, G. Jones, D.M. Rocke, B.D. Hammock (1994); An immunoarray for the simultaneous determination of multiple triazine herbicides; Analytica Chimica Acta 304 (1995) pp 339-352

## **Normen/Richtlinien**

- Amtsblatt der EG, 1980:** Richtlinie des Rates über die Qualität des Wasser für den menschlichen Gebrauch; Nr. L. 229/II (80/778/EWG)
- Amtsblatt der EG, 1995:** Vorschlag für eine Richtlinie des Rates über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch; Nr. C.131/5 (95/C 131/03)
- DIN-Entwurf:** DEV zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Suborganismische Testverfahren (Gruppe T) Rahmenbedingungen für selektive Immuntestverfahren (Immunoassays) zur Bestimmung von Pflanzenbehandlungs- und Schädlingsbekämpfungsmitteln (T 2)
- Grundwasserschwellenwertverordnung:** Grundwasserschwellenwertverordnung; BGBl 502/91
- Trinkwasser-Pestizidverordnung:** Trinkwasser-Pestizidverordnung; BGBl 448/91
- Wassergüte-Erhebungsverordnung:** Wassergüte-Erhebungsverordnung; BGBl 338/91

**Herstellung Immunoassays / Antikörper / Varianten Immunoassays**

- Alder F.L. et al., 1971:** F.L. Alder, L. Chi-Tan (1971); Detection of morphine by haemagglutination-inhibition. *J.Immunol.* 106: 1684
- Cais M. et al., 1977:** M. Cais, S. Dani, Y. Eden, O. Gandolfi, M. Horn, E.E. Isaaco, Y. Josephy, Y. Sarr, E. Slovin, L. Snarsky (1977); Metalloimmunoassay; *Nature* 270: 534
- Cambiaso C.L. et al., 1977:** C.L. Cambiaso, A.E. Leek, F. de Steenwinkel, J. Billen, P.L. Masson (1977); Particle counting immunoassay (PACIA) 1: A general method for the determination of antibodies, antigens and haptens; *J. Immunol. Methods* 40: 231
- Engvall E. et al., 1971:** E. Engvall, P. Perlmann (1971); Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G; *Immunochemistry* 8: 871
- Engvall E. et al., 1972:** E. Engvall, P. Perlmann (1972); Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulins in antigen-coated tubes; *J.Immunol.* 109: 129
- Ercegovich C.D., 1971:** C.D. Ercegovitch, *Pesticide Identification at the Residue Level; Advances in Chemistry* 104; American Chemical Society: Washington DC, 1971; pp 162-78
- Giersch Th. et al., 1990:** Th. Giersch, B. Hock (1991); Production of monoclonal antibodies for the determination of s-triazines with enzyme immunoassays; *Food & Agricultural Immunology* (1990) 2, pp 85-97
- Giersch Th. et al., 1993:** Th. Giersch, K.Kramer, M.G. Weller, B. Hock (1993); Improvement of a monoclonal antibody-based immunoassay for the determination of terbutryn; *Acta hydrochim.hydrobiol.* 21 (1993) 6, pp 312-315
- Giersch Th., 1991:** Th. Giersch; Herstellung monoklonaler Antikörper gegen s-Triazine; *Z.Wasser-Abwasser Forschung* 24.7-9 (1991)
- Goding J.W., 1983:** *Monoclonal Antibodies - Principles and Practise*; 1st Ed., Academic Press, London, 1983
- Haimovich J. et al., 1970:** J. Haimovich, E. Hurwitz, N. Novik, M. Sela (1970); Use of protein-bacteriophage conjugates for detection and quantitation of proteins; *Biochim.Biophys.Acta* 207: 125
- Hurn B.A.L. et al., 1980:** B.A.L. Hurn, S.M. Chantler (1980); Production of reagent antibodies; *Methods in enzymology* Vol. 70, pp 104-142 (1980)
- Karu. A.E. et al., 1991:** A.E. Karu, R.O. Harrison, D.J. Schmidt, C.E. Clarkson, J. Grassman, M.H. Goodrow, A. Lucas, B.D. Hammock, J.M. Van Emon, R.J. White (1991); Monoclonal Immunoassay of triazine herbicides Development and Implementation; *Immunoassays for trace chemical analysis, ACS symposium series* 451, 1991

- Keuchel C. et al., 1992:** C. Keuchel, L. Weil, R. Niessner (1992); Effect of the variation of the length of the spacer in an competitive enzyme immunoassay (ELISA) for the determination of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT); *Fresenius.J.Anal.Chem.* (1992) 343:143
- Köhler G. et al., 1975:** G. Köhler, C. Milstein; Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity; *Nature* 256, pp 495 - 497; (1975)
- Kramer K. et al., 1995:** K. Kramer, B. Hock; Rekombinate Antikörper in der Umweltanalytik; *Lebensmittel- & Biotechnologie* 1995/2
- Landsteiner K., 1945:** K. Landsteiner; The specificity of Serological Reactions, Cambridge, Massachusetts; Harvard University Press
- Leute R. et al., 1972:** R. Leute, E.F. Ullmann, A. Goldstein (1972); Spin Immunoassay of opiates and narcotics in urine and saliva; *JAMA* 221: 1231
- Nakane P.K. et al., 1966:** P.K. Nakane, Sir J. Ram, G.B. Pierce (1966); Enzyme-labelled antibodies for light and electron microscope localization of antigens; *J.Histochem.Cytochem.*, 14: 789
- Schroeder H.R. et al., 1976:** H.R. Schroeder, P.O. Vogelhut, R.J. Carrico, R.C. Boguslaski, R.T. Buckler (1976); Competitive protein binding assay for biotin monitored by chemoluminescence; *Anal.Chem.* 48: 1933-1937
- Ullmann E.F. et al., 1976:** E.F. Ullmann, M. Schwarzberg, K.E. Rubenstein (1976); Fluorescent transfer immunoassay. A general method for the determination of antigens; *J.Biol.Chem.* 251: 4172
- Ulrich P. et al., 1991:** P. Ulrich, M. Weller, L. Weil, R. Nießner (1991); Optimierung der immunologischen Bestimmung von Triazin-Herbiziden im Wasser mit Hilfe unterschiedlicher Enzymtracer; *Vom Wasser*, 76, 251-266 (1991)
- Van Weemen B.K. et al., 1971:** B.K. Van Weemen, A. Schuurs (1971); Immunoassay using antigen-enzyme conjugates; *FEBS Lett.* 15: 232
- Van Weemen B.K. et al., 1975:** B.K. Van Weemen, A. Schuurs (1975); The influence of heterologous combinations of antiserum and enzyme-labelled estrogen on the characteristics of estrogen EIAs; *Immunochemistry* 12: 667
- Yalow R.S. und Berson S.A., 1960:** Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods; *Nature* 184: 1684

**Pestizidimmunoassays**

- Bushway R.J. et al., 1988:** R.J. Bushway, B.Perkins, S.A. Savage, S.J. Lekousi, B.S. Ferguson (1988); Determination of atrazine residues in water and soil by enzyme immunoassay; Bull.Environ.Contam.Toxicol. (1988)40:647-654
- Bushway R.J. et al., 1989:** R.J.Bushway, B.Perkins, S.A. Savage, S.L. Lekousi, B.S. Ferguson (1989); Determination of atrazine residues in food by enzyme immunoassay; Bull.Environ.Contam.Toxicol.(1989) 42:899-904
- Dankwardt A. et al., 1993:** A. Dankwardt, B. Hock (1993); Immunchemischer Schnelltest zum Nachweis von Atrazine in Wasserproben und Bodenextrakten; GIT Fachz. Lab. 37 (1993)839-844
- Dankwardt A. et al., 1993:** A.Dankwardt, J.Seifert (1993); Magnetpartikel-Enzymimmunoassay als schnelle Screening-Methode zur Bestimmung von Atrazin in Umweltproben; Acta hydrochim.hydrobiol.21 (1993) 2, pp 110-113
- Dankwardt A. et al.:** A. Dankwardt, S. Wüst, W. Elling, E.M. Thurman, B. Hock; Determination of atrazine in rainfall and surface water in germany by enzyme immunoassay; TU München (Weihenstephan), Institut f. Botanik, 85350 Freising
- Gerhold S., 1990:** S. Gerhold (1990); Stoffstromrechnung: Pestizide; Statistische Nachrichten 45/1990, Heft 7
- Goh K.S. et al., 1990:** K.S. Goh, J. Hernandez, S.J. Powel, C.D. Greene; Atrazine soil residue analysis by enzyme immunoassay: Solvent effect and extraction efficiency; Bull.Environ, Contam.Toxicol. (1990)45:208-214
- Goolsby D.A. et al., 1989:** D.A. Goolsby, E.M. Thurman, M.L. Clark, M.L. Pomes (1989); Immunoassay as a screening tool for triazine herbicides in streams; Immunoassays for trace chemical analysis/Chapter 8
- Haberer K. et al., 1988:** K. Haberer, P. Krämer (1988); Verfügbarkeit immunochemischer Nachweisverfahren für Pflanzenschutzmittel im Wasser; Vom Wasser, 71, 231-244(1988)
- Hammock B.D. et al, 1980:** B.D. Hammock, R.O. Mumma; Recent Advances in Pesticides: Analytical Methodology; ACS Symposium Series 136; American Chemical Society: Washington DC 1980, pp 321-52.
- Hock B., 1988:** B. Hock (1988); Bestimmung von Pflanzenschutzmitteln mit Hilfe von Enzymimmunoassays; 12. Aachener Werkstattgespräch, 1988
- Hock B., 1989:** B. Hock (1988); Enzymimmunoassays zur Bestimmung von Pflanzenschutzmitteln im Wasser; Z.Wasser-Abwasser-Forsch. 22, 78-84 (1989)

- Hock B., 1992:** B. Hock (1992); Verwendung von Enzymimmunoassays zur Bestimmung von Pflanzenschutzmitteln im Rahmen der Trinkwasserverordnung; Schr.Reihe Verein WaBoLu 89, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1992
- Hock B., 1993:** B. Hock (1993); Enzymimmunoassays for pesticide analysis; Acta hydrochim.hydrobiol. 21(1993) 2, pp 71-83
- Huber S.J. et al., 1985:** S.J. Huber, B. Hock (1985); Solid-Phase-Enzymimmunoassay zum Nachweis von Pflanzenschutzmitteln in Gewässern; GIT.Fachz.Lab.10/85
- Huber S.J., 1985:** S.J. Huber (1985); Improved solid-phase enzyme immunoassay systems in the ppt range for atrazin in fresh water; Chemosphere, Vol.14, No.11/12, pp 71-83
- Jaeger E., 1988:** E. Jaeger (1988) Immunoassays - Grundlagen und Bestimmung von Atrazin mit monoclonalen Antikörpern, Aachener Werkstattgespräch (1988)
- Kaufman B.M. et al., 1991:** B.M. Kaufman, M.Clower Jr. (1991); Immunoassay of pesticides; J.Assoc.of Anal.Chem.(Vol.74, No.2, 1991)
- Klamp S., 1993:** S. Klamp (1993); Enzym-Immunoassays zum Nachweis von Pestizid-Rückständen in Wasser; GIT Fachz.Lab.10/93
- Muldoon M.Th., 1993:** M.Th. Muldoon (1993); Development of immunoassays for monitoring pesticide waste treatment (atrazine, simazine, cyanazine); Dissertation - University of Maryland, College Park - 1993
- Nam K.S. et al., 1994:** K.S. Nam, J.W. King (1994); Supercritical fluid extraction and enzyme immunoassay for pesticide detection in meat products; J.Agric.Food Chem.1994, 42, 1469-1474
- Pfeiffer W. et al., 1988:** W. Pfeiffer, W. Mies (1988); Methodische Grundlagen des Atrazin-Monitorings mittels Immunoassays; 12. Aachener Werkstattgespräche 1988
- Reed J.P. et al., 1990:** J.P. Reed, F.R. Hall, H.R. Krueger (1990); Measurement of ATV applicator exposure to atrazine using an ELISA method; Bull.Enviroin.Contam.Toxicol. (1990) 44:8-12
- Ruppert Th. et al., 1992:** Th. Ruppert, L. Weil, R. Nießner (1992); Influence of water contents on an enzyme immunoassay for triazine herbicides; Vom Wasser, 78, 387-401 (1992)
- Schlaeppli J.M. et al., 1989:** J.M. Schlaeppli, W. Föry, K. Ramsteiner (1989); Hydroxyatrazine and atrazine determination in soil and water by enzyme-linked immunosorbent assay using specific monoclonal antibodies; J.Agric.Food Chem.1989, 37, 1532-1538
- Schmidt I., 1994:** I. Schmidt (1994); Einsatz von ELISAs (enzyme-linked immunosorbent assays) in der Umweltanalytik; Umweltbundesamt / Federal Environmental Agency (Austria), UBA-IB-450

- Schneider R.J. et al., 1991:** R.J. Schneider, L. Weil, R. Niessner (1991); Screening and monitoring of herbicides behaviour in soils by enzyme immunoassays; Intern.J. Environ.Anal.Chem. Vol.46, pp.129-140 (1991)
- Schulze P.A. et al., 1992:** P.A. Schulze, P.D. Capel (1992); A laboratory and field evaluation of a portable immunoassay test for triazine herbicides in environmental water samples; Intern.J. Environ Anal.Chem., Vol.53, pp.307-319
- Seifert J., 1992:** J. Seifert (1992); Baker RaPID Assay - ein ELISA zur Bestimmung von Pestiziden mit magnetischen Partikeln als fester Phase; 16. Aachener Seminar 1992
- Smith A.E., 1993:** A.E. Smith (1993); A review of analytical methods for sulfonylurea herbicides in soil; Intern.J. Environ.Anal.Chem., Vol.59, pp.97-106
- Staimer N. et al., 1994:** N. Staimer, K. Bürcky, G. Steinle, B. Hock (1994); Determination of atrazine residues in electro-ultrafiltration soil extracts by a sensitive enzyme immunoassay; Z.Pflanzenernähr.Bodenk. 157,41-46(1994)
- Stangl G. et al., 1995:** G. Stangl, M.G. Weller, R. Niessner (1994); Increased sensitivity and selectivity of an enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of triazine by use of non-ionic surfactants; Fresenius J.Anal.Chem. (1995) 351:301-304
- Stearman G.K., 1993:** G.K. Stearman (1993); Enzyme immunoassay determination of atrazine degradation in soil: Moisture, sterilization, and storage effects; Journal of Soil Contamination, 2(4):331-342(1993)
- Wassermann O., 1989:** O. Wassermann (1989); Pestizide im Trinkwasser; Ökologie + Landbau 71 (1989), pp 11-13
- Weil L. et al., 1991:** L. Weil, J. Schneider, O. Schäfer, P. Ulrich, M. Weller, T. Ruppert, R. Nießner (1991); A heterogeneous immunoassay for the determination of triazine herbicides in water; Fresenius J.Anal.Chem.(1991) 339 : 468-469
- Weil L. et al., 1991:** L. Weil, W.D. Hörmann (1991); Atrazinbestimmung im Wasser; Z.Umweltchem.Ökotox.3 (5) 306-309 (1991)
- Weins C. et al., 1992:** C. Weins, B. Becker, H.R. Kim (1992); Bewertung der Anwendbarkeit von immunologischen Nachweisverfahren für Triazine in der routinemäßigen Grundwasseranalytik; Vom Wasser, 78, 377-385(1992)
- Wittman C. et al., 1990:** C. Wittmann, B. Hock (1990); Evaluation and performance characteristics of a novel ELISA for the quantitative analysis of atrazine in water, plants and soil; Food & Agricultural Immunology (1990)2, 65-74
- Wittmann C. et al., 1990:** C. Wittmann, B. Hock (1990); ELISAs zur Bestimmung von Atrazin und Atrazin-Metaboliten in Wasser; Vom Wasser, 75, 115-126(1990)

- Wittmann C. et al., 1991:** C. Wittmann, B. Bock (1991); Enzyme-linked immunosorbent assays zur quantitativen Bestimmung von Atrazin und Atrazin-Metaboliten; Z.Wasser-Abwasser-Forsch.24, 2-7 (1991)
- Wittmann C. et al., 1991:** C. Wittmann, B. Hock (1991); Development of an ELISA for the analysis of atrazine metabolites deethylatrazine and deisopropylatrazine; J.Agric.Food Chem. 1991, 39, pp 1194-1200
- Wortberg M. et al., 1993:** M. Wortberg, K. Cammann (1992); Determination of triazine herbicides with time-resolved fluoro-immunoassay using europium(III)-chelates; Fresenius J.Anal.Chem. (1993) 346:757-760
- Wüst S. et al., 1990:** S. Wüst, U. Dohr, Th. Giersch, Ch. Wittmann, B. Hock (1990); Sensitiver s-Triazin-Enzymimmunoassay für Wasserproben in Polystyrol-Röhrchen; GIT Fachz.Lab.2/90, pp 99-106

### **Auswertung, Technik, Geräte**

- Ayers G. et al., 1981:** G. Ayers, D. Burnett, A. Griffiths, A. Richens (1981); Quality control of drug assays; Clinical Pharmacokinetics 6:106-117(1981)
- Bechert C. et al., 1995:** C. Bechert, G. Marbach, M. Hennecke; Einsatz eines Mikrotiterplattenphotometers in der Umweltanalytik; Labor Praxis April 1995
- Canellas P.F. et al., 1981:** P.F. Canellas, A.E. Karu (1981); Statistical package for analysis of competition ELISA results; Journal of Immunological Methods, 47(1981)375-385
- Clark M.F. et al., 1987:** M.F. Clark, D.J. Barbara (1987); A method for the quantitative analysis of ELISA data; Journal of Virological Methods, 15(1987)213-222
- De Boor C., 1978:** A practical guide to splines, Springer-Verlag New York Inc.,
- De Lean A. et al., 1978:** A. De Lean, P.J. Munson, D. Rodbard (1978); Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay and physiological dose-response curves; Am J.Physiol.1978 235:E97-102
- Dietzler D.N. et al., 1982:** D.N. Dietzler, M.P. Leckie, C.R. Hoelting, S.E. Porter, C.H. Smith, V.L. Tieber (1982); Logit-log calibration curves for EMIT assays; Clinica Chimica Acta.127(1983) pp 239-250
- Dudley R.A. et al., 1985:** R.A. Dudley, P. Edwards, R.P. Ekins, D.J. Finney, I.G.M. McKenzie, G.M. Raab, D. Rodbard, R.P.C. Rodgers (1985); Guidelines for immunoassay data processing; Clinical.Chemistry, Vol.31, No.8, 1985, pp 1264-1271

- Ebert et al., 1985:** Ebert/Ederer (1985); Computer Anwendungen in der Chemie, 2.Auflage VCH 1985
- Franco E.L. et al., 1984:** E.L. Franco, K.W. Walls, A.J. Sulzer, G.H. Campbell, J.M. Roberts (1984); Computer-assisted multiple categorization of absorbance values in ELISA through pictorial emulation of 96-well plates; Journal of Immunological Methods, 70(1984), pp 45-52
- Gigase P.L. et al., 1987:** P.L. Gigase, C.H. Bridts, L.S. De Clerck, W.J. Stevens (1987); A useful method for determining class-specific rheumatoid factors with computerized analyses of data; Journal of Immunological Methods, 107(1988), pp 93-101
- Gomeni R. et al., 1980:** R. Gomeni, C. Gomeni (1980); A conversational graphic program for the analysis of the sigmoid curve; Computers and Biomedical Research 13, 489-499(1980)
- Hawker F.J. et al., 1981:** F.J. Hawker, G.S. Challand (1981); Effect of outlying standard points on curve fitting in radioimmunoassay; Clinical Chemistry, Vol.27, No.1, 1981, pp 14-17
- Herndl R. et al., 1975:** R. Herndl, I. Marschner; Comparison of various mathematical methods for the calculation of radioimmunoassay data; 21.Symp.Dtsch.Ges.Endokrin.Abstract No.117, Acta.endocr. (Kbh.) Supplement 193(1975)117
- Kiessig S.T. et al., 1994:** S.T. Kiessig, P. Pas, T. Porstmann, M. Partowinia-Peters (1994); Auswertung von Enzymimmunoassays; GIT-Labor-Medizin 2/94 pp 58-64
- Kramer S.M. et al., 1983:** S.M. Kramer, N.P. Jewell, N.E. Cremer (1983); Discriminant analysis of data in enzyme immunoassay; Journal of Immunological Methods, 60(1983) pp 243-255
- Lötz A. et al., 1976:** A. Lötze, W. Vogt, B. Popp, M. Kneidel (1976); Polygonal interpolation, a simple, rapid, and versatile approximation method requiring minimal computing facilities; Computers and Biomedical Research 9, 21-30(1976)
- Marschner I. et al.:** I. Marschner, F. Erhardt, P.C. Scriba; Calculation of the radioimmunoassay standard curve by „Spline function“; IAEA-SM-177/71
- Munson P.J. et al., 1980:** P.J. Munson, D. Rodbard (1980); LIGAND: A versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems; Analytical Biochemistry 107, 220-239(1980)
- Nelson R.W. et al., 1995:** R.W. Nelson, J.R. Krone, A.L. Bieber, P. Williams (1995); Mass Spectrometric Immunoassay; Analytical Chemistry, Vol.67, No.7, April 1, 1995
- Noij Th. et al., 1991:** Th. Noij, H. van Beveren (1991); Evaluation of an atrazine immunoassay test for real-life water analysis; RIUM-Workshop, Pesticides 1991

- Oppenheimer L. et al., 1983:** L. Oppenheimer, Th.P. Capizzi, R.M. Weppelman, H. Metha; Determining the lowest limit of reliable assay measurement; Anal. Chem. 1983, 55, pp 638-643
- Pegg P.J. et al., 1981:** P.J. Pegg, F.R.C.Path, E.M. Miner (1981); The effect of data reduction technic on ligand assay proficiency survey results; American Journal of clinical Pathology, March 1982
- Pengelly W.L., 1985:** Validation of Immunoassays; Plant Growth Substances Springer Verlag Berlin-Heidelberg 1986
- Rodbard D. et al., 1977:** D. Rodbard, S.W. McClean (1977); Automated computer analysis for enzyme-multiplied immunological techniques; Clinical Chemistry, Vol.23, No.1,1977, pp 112-115
- Rodbard D., 1974:** D. Rodbard; Statistical Quality Control and Data Processing for Radioimmunoassays and Immunoradiometric Assays; Clin.Chem. (Winston-Salem N.Y.) 20, 1255.
- Rodbard D., 1977:** D. Rodbard (1978); Statistical estimation of the minimal detectable concentration („sensitivity“) for radioligand assays; Analytical Biochemistry 90, 1-12(1978)
- Rodgers R., 1984:** R.P. Channing Rodgers, Data Analysis and Quality Control of Assays: A Practical Primer; in Practical Immunoassay - The State of the Art (ed. W.R. Butt); Clinical and Biochemical Analysis Vol. 14
- Sandel P. et al., 1976:** P. Sandel, W. Vogt, B. Popp, M. Knedel (1976); Smoothing-Spline und Polygonal-Interpolation, Logit-Log- und Logit-Quadrat-Regression: Eine Gegenüberstellung mathematischer Verfahren zur Ergebniswertberechnung von Radioimmunoassays; Z.Anal.Chem. Band 279; Heft 2(1976)
- Schwedt G. et al., 1992:** G. Schwedt, A. Swaid (1992); Analysengeräte, Umwelt-Magazin, Oktober 1992

### **Vergleichsstudien**

- Brady J.F. et al., 1995:** J.F. Brady, G.S. LeMasters, R.K. Williams, J.H. Pittman; J.P. Daubert, M.W. Cheung, D.H. Skinner, J.L. Turner, M.A. Rowland, J. Langer, St.M. Sobek (1995); Immunoassay analysis and gas chromatography confirmation of atrazine residues in water samples from a field study conducted in the state of Wisconsin; J.Agric.Food Chem. 1995, 43, 268-274
- Dankwardt A. et al., 1995:** A. Dankwardt, S. Pullen, St. Rauchalles, K. Kramer, F. Just, B. Hock (1995); Atrazine residues in soil two years after the atrazine BAN-A comparison of enzyme immunoassay with HPLC; Analytical Letters, 28(4), 621-634(1995)

- Fleeker J.R. et al.:** J.R. Fleeker, L.W. Cook; Reliability of commercial enzyme immunoassay in detection of atrazine in water; Immunoassays for trace chemical analyses, chapter 7
- Gascon J. et al., 1994:** J. Gascon, D. Barceló (1994), Rapid magnetic particle-based ELISA assay compared with gas chromatography-nitrogen phosphorus detection for determining atrazine in freeze-dried water samples; *Chromatographia* Vol.38, No.9/10, May 1994
- Gruessner B. et al., 1995:** B. Gruessner, N.C. Shambaugh, M.C. Watzin (1995); Comparison of an enzyme immunoassay and gas chromatography/mass spectrometry for the detection of atrazine in surface waters; *Environ.Sci.Technol.* 1995, 29, pp 251-254
- Hansen P.D. et al., 1991:** P.D. Hansen, B. Hock, R. Kanne, G. Müller, A. Krotzky, U. Obst, U. Oehmichen, C. Schlett, R. Schmid, P. Krämer, L. Weil (1991); Zweite Vergleichsuntersuchung zur Bestimmung von s-Triazinen in Wasserproben; *Z.Wasser-Abwasser-Forschung* 24, 65-70(1991)
- Hansen P.D. et al., 1991:** P.D. Hansen, B. Hock, R. Kanne, A. Krotzky, U. Obst, U. Oehmichen, C. Schlett, R. Schmid, L. Weil (1991); Anwendung von Enzymimmunoassays zur Bestimmung von s-Triazinen in Wasserproben: Vergleichsuntersuchungen von 13 Laboratorien; *Z.Wasser-Abwasser-Forsch.* 24, 20-25(1991)
- Hock B. et al., 1991:** B. Hock (1991); Enzyme Immunoassays for the determination of s-triazines in water samples: Two interlaboratory tests; *Analytical Letters* 24(4), 529-549(1991)
- Mouvet C. et al., 1995:** C. Mouvet, S. Broussard, R. Jeannot, C. Maciag, R. Abuknesha, G. Ismail (1995); Validation of commercially available ELISA microtiter plates for triazines in water samples; *Analytical Chimica Acta* 311(1995)331-339
- Rubio F.M. et al., 1991:** F.M. Rubio, T.S. Lawruk, A.M. Scutellaro, Ch.E. Lachman, R.G. Sandberg, D.P. Herzog (1991); Evaluation of a rapid atrazine immunoassay; Poster presented at the 105th AOAC Annual International Meeting and Exposition, Phoenix, Arizona, August 13th, 1991
- Sherry J.P. et al., 1993:** J.P. Sherry, A. Borgmann (1993); Enzyme-immunoassay techniques for the detection of atrazine in water samples: Evaluation of a commercial tube based assay; *Chemosphere*, Vol. 26, No.12, pp 2173-2184, 1993
- Thurman E.M. et al., 1990:** E.M. Thurman, M. Meyer, M. Pomes, Ch.A. Perry, A.P. Schwab (1990); Enzyme-linked immunosorbent assay compared with gas chromatography/mass spectrometry for the determination of Triazine Herbicides in Water; *Analytical Chemistry* Vol. 62, No. 18, (1990)
- Wiedman S.S. et al., 1991:** S.S. Wiedman, C.A. Townsend, J.X. Dautlick, D.P. Herzog; Inter-verus Intra-laboratory evaluation of an atrazine EIA; Poster presented at the 105th AOAC Annual International Meeting and Exposition, Phoenix, Arizona, August 13th, 1991

## 6.4 TABELLENVERZEICHNIS

<u>Tab. 1:</u>	Seite 18	Millipore / Messung dotierter Proben und Ergebnisse mit verschiedenen Auswertemodellen
<u>Tab. 2:</u>	Seite 24	Millipore High Sensitivity / Messung dotierter Proben und Ergebnisse mit verschiedenen Auswertemodellen
<u>Tab. 3:</u>	Seite 33	Quantix Atrazine / Messung dotierter Proben und Ergebnisse mit verschiedenen Auswertemodellen
<u>Tab. 4:</u>	Seite 39	r-Biopharm / Messung dotierter Proben und Ergebnisse mit verschiedenen Auswertemodellen
<u>Tab. 5:</u>	Seite 45	Riedel-de Haën / Messung dotierter Proben und Ergebnisse mit verschiedenen Auswertemodellen
<u>Tab. 6:</u>	Seite 51	Transia / Messung dotierter Proben und Ergebnisse mit verschiedenen Auswertemodellen
<u>Tab. 7:</u>	Seite 55	Vertrieb der Testkits, Inhalt, Zeitbedarf und Nachweisgrenzen
<u>Tab. 8:</u>	Seite 56	Kreuzreaktivitäten der Testkits
<u>Tab. 9:</u>	Seite 57	Überblick über die in der Studie verwendeten Auswertemodelle für die einzelnen Tests
<u>Tab. 10:</u>	Seite 57	Streuung, Intraassay- und Interassaypräzision der einzelnen Testkits

## 6.5 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<u>Abb. 1:</u>	Seite 5	Grafik - Prinzip eines kompetitiven ELISA
<u>Abb. 2:</u>	Seite 8	Grafik zur manuellen Auswertung (Scatterplot)
<u>Abb. 3:</u>	Seite 9	Grafik Lineare Interpolation
<u>Abb. 4:</u>	Seite 10	Grafik 4-Parameter Funktion
<u>Abb. 5:</u>	Seite 11	Grafik linearisierte 4-Parameter Funktion
<u>Abb. 6:</u>	Seite 12	Grafik polygonale Interpolation
<u>Abb. 7:</u>	Seite 19	Millipore / Vergleich ELISA-Auswertungen - GC/MS-Daten
<u>Abb. 8:</u>	Seite 20	Millipore / Streuung in Abhängigkeit von der Konzentration
<u>Abb. 9:</u>	Seite 20	Millipore / Intraassaypräzision
<u>Abb. 10:</u>	Seite 21	Millipore / Interassaypräzision
<u>Abb. 11:</u>	Seite 25	Millipore High Sensitivity / Vergleich ELISA-Auswertungen - GC/MS-Daten
<u>Abb. 12:</u>	Seite 26	Millipore High Sensitivity / Streuung in Abhängigkeit von der Konzentration
<u>Abb. 13:</u>	Seite 26	Millipore High Sensitivity / Intraassaypräzision
<u>Abb. 14:</u>	Seite 30	Quantix Triazine / Streuung in Abhängigkeit von der Konzentration
<u>Abb. 15:</u>	Seite 30	Quantix Triazine / Intraassaypräzision
<u>Abb. 16:</u>	Seite 31	Quantix Triazine / Interassaypräzision
<u>Abb. 17:</u>	Seite 34	Quantix Atrazine / Vergleich ELISA-Auswertungen - GC/MS-Daten
<u>Abb. 18:</u>	Seite 35	Quantix Atrazine / Streuung in Abhängigkeit von der Konzentration
<u>Abb. 19:</u>	Seite 35	Quantix Atrazine / Intraassaypräzision
<u>Abb. 20:</u>	Seite 36	Quantix Atrazine / Interassaypräzision
<u>Abb. 21:</u>	Seite 40	r-Biopharm / Vergleich ELISA-Auswertungen - GC/MS-Daten
<u>Abb. 22:</u>	Seite 41	r-Biopharm / Streuung in Abhängigkeit von der Konzentration
<u>Abb. 23:</u>	Seite 41	r-Biopharm / Intraassaypräzision
<u>Abb. 24:</u>	Seite 42	r-Biopharm / Interassaypräzision
<u>Abb. 25:</u>	Seite 46	Riedel-de Haën / Vergleich ELISA-Auswertungen - GC/MS-Daten
<u>Abb. 26:</u>	Seite 47	Riedel-de Haën / Streuung in Abhängigkeit von der Konzentration

<u>Abb. 27:</u>	Seite 47	Riedel-de Haën / Intrassaypräzision
<u>Abb. 28:</u>	Seite 48	Riedel-de Haën / Interassaypräzision
<u>Abb. 29:</u>	Seite 52	Transia / Vergleich ELISA-Auswertungen - GC/MS-Daten
<u>Abb. 30:</u>	Seite 53	Transia / Streuung in Abhängigkeit von der Konzentration
<u>Abb. 31:</u>	Seite 53	Transia / Intraassaypräzision
<u>Abb. 32:</u>	Seite 54	Transia / Interassaypräzision

## 6.6 FORMELVERZEICHNIS

(1)	Seite 5	Gleichgewichtsreaktion Antigen - Antigen markiert - Antikörper
(2)	Seite 6, 62	Berechnung %B/B0
(3)	Seite 7, 62	Berechnung %B/B0 Ü
(4)	Seite 10, 64	4-Parameter Funktion
(4.1) - (4.9)	Seite 64	Umformung der 4-Parameter Funktion in linearisierte Funktion
(5)	Seite 10, 64	Linearisierte 4-Parameter Funktion
(6)	Seite 11	Linearisierte 4-Parameter Funktion nach logit-Transformation
(7)	Seite 63	Berechnung der Kreuzreaktivität

## **6.7 BEZUGSQUELLEN VERWENDETER TESTKITS UND MATERIALIEN**

### **Immunoassays**

Millipore Ges.m.b.H, Hietzinger Hauptstraße 145, A-1130 Wien

Quantix/Agri Diagnostics Ass., One Executive Drive, Suite 10, Moorestown, NJ 08057, USA  
(bezogen über Noack Ges.m.b.H, Auhofstraße 190, A-1130 Wien)

r-Biopharm Ges.m.b.H, Rößlerstraße 94, D-64293 Darmstadt  
(bezogen über Noack Ges.m.b.H, Auhofstraße 190, A-1130 Wien)

Riedel-de Haën AG, D-3016 Seelze 1, Hannover  
(bezogen über Donau-Chem, Handels Ges.m.b.H, Lisztstraße 4, A-1030 Wien)

Transia - Diffechamb SA, 8, Rue Saint - Jean Dieu, 69305 Lyon,  
Cedex 7, Frankreich  
(bezogen über Noack Ges.m.b.H, Auhofstraße 190, A-1130 Wien)

### **Photometer, Auswertegeräte**

Behring ELISA Processor II + Bess 3.0 (Steuerungs- und Auswertesoftware)  
Behring Institut GmbH, Altmannsdorfer Straße 104, A-1121 Wien

Dynatech MRX Revelation  
Dynatech Laboratories Inc., Chantilly Virginia  
(bezogen über Laborpartner, Wurzbachgasse 18, A-1150 Wien)

### **PROBEN**

Stadtwerke Mainz AG, Postfach 3809, D-55028 Mainz  
(anlässlich Ringtest 1995 Prof. B. Hock, Technische Universität München, Lehrstuhl für  
Botanik (Weihenstephan), D-85350 Freising )

## **GC-MS Ergebnisse**

Stadtwerke Mainz AG, (siehe oben)

## **Verwendete Software für Auswertungen**

- |                           |  |
|---------------------------|--|
| Lineare Interpolation:    | - Microsoft Excel 5.0  |
| Polygonale Interpolation: | - Bess 3.0 - Behring Institut (siehe oben)   |
| 4-Parameter Funktion:     | - Fig. P. for Windows, Biosoft, 49 Bateman Street, Cambridge<br>CB2 1LR, U.K.<br>- Microsoft Excel 5.0 |
| Spline Approximation:     | - Dynatech Revelation  |